

Université de Montréal

Volt-ampérométrie : conception de logiciels de contrôle et élaboration d'une
méthode de dosage de la lipoxygénase.

par

Pascal Pérusse

Département de chimie

Faculté des arts et sciences

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

1998

© Pascal Pérusse, 1998



QD

3

U54

1999

V.008



Identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Volt-ampérométrie : conception de logiciels de contrôle et élaboration d'une
méthode de dosage de la lipoxycgénase.

présenté par :

Pascal Pérusse

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Thomas Ellis

Michel Lafleur

Dónal Leech

Mémoire accepté le : 19 février 1999

Sommaire

S'il est vrai que la chimie a évolué à une vitesse vertigineuse au cours des dernières années, on ne saurait qualifier les progrès récemment réalisés en informatique. Les ordinateurs sont de plus en plus puissants et les prix de plus en plus abordables. En chimie analytique comme ailleurs, l'informatique joue un rôle de plus en plus important. Les analyticiens veulent avoir à leur disposition des outils informatiques performants, répondant à leurs besoins spécifiques, pour à la fois contrôler leurs instruments et acquérir (et traiter) leurs données expérimentales. On peut maintenant reléguer aux oubliettes une bonne partie de l'équipement utilisé auparavant par un grand nombre de chimistes. Par exemple, on peut utiliser des logiciels remplaçant les traceurs XY et X-t.

La disponibilité des logiciels n'est pas toujours parfaite. Ainsi, aucun logiciel de contrôle et d'acquisition de données n'est disponible commercialement pour un détecteur ampérométrique à la sortie d'un capillaire d'ÉC. Nous nous proposons donc de concevoir et de programmer un logiciel permettant le contrôle du détecteur électrochimique, ainsi que la saisie de données et leur traitement. L'environnement de programmation LabVIEW de National Instrument, conçu pour le contrôle et l'acquisition de données scientifiques, a été utilisé pour coder ce logiciel.

Certains logiciels disponibles pour l'instrumentation ont des lacunes importantes, notamment au niveau de leur simplicité d'utilisation. Les pertes de temps et d'énergie à essayer de maîtriser un logiciel sont toujours monnaie courante avec certains logiciels commerciaux, sans compter le prix souvent prohibitif demandé pour ceux-ci. Ces raisons nous ont amenés à développer notre propre logiciel pour contrôler un bipotentiostat, le AFCBP1 de Pine Instrument Corporation, qui permet d'effectuer des expériences de volt-ampérométrie cyclique. Encore une fois, LabVIEW a servi d'environnement de développement.

Non seulement les logiciels de contrôle informatique simplifient la vie des expérimentateurs, ils permettent également la création de nouvelles techniques. La volt-ampérométrie à onde carrée est une technique qui a connu un essor important lorsque le coût des micro-ordinateurs est devenu plus abordable. Cette technique a été mise à profit pour élaborer une méthode permettant le dosage de la lipoxigénase, une enzyme impliquée dans les processus inflammatoires. Son dosage peut permettre de découvrir des composés ayant des applications thérapeutiques. La méthode présente certains avantages par rapport à d'autres techniques fréquemment utilisées : elle peut être utilisée en milieu turbide et elle est sans danger pour l'environnement. Une limitation importante de la technique a cependant été déterminée expérimentalement : le système donne une réponse pour les composés ayant des propriétés anti-oxydantes.

Table des matières

1. VOLT-AMPÉROMÉTRIE	1
1.1 INTRODUCTION	1
1.1.1 Composantes du courant en volt-ampérométrie.....	1
1.1.2 L'ampérométrie.....	3
1.1.3 La volt-ampérométrie à balayage linéaire et la volt-ampérométrie cyclique	4
1.1.4 La volt-ampérométrie impulsionnelle différentielle.....	7
1.1.5 La volt-ampérométrie à onde carrée.....	9
2. PROGRAMMES DE CONTRÔLE D'INSTRUMENTS ET D'ACQUISITION DE DONNÉES	14
2.1 INTRODUCTION	14
2.2 FONCTIONNEMENT DE LABVIEW	16
2.2.1 Exemple de VI.....	19
2.2.2 Ordre d'exécution.....	22
2.2.3 LabVIEW pour le contrôle et l'acquisition de données d'instrumentation scientifique.....	24
2.2.4 Le constructeur d'application	25
2.3 CE QU'IL FAUT SAVOIR POUR PROGRAMMER LE BIPOTENTIOSTAT PINE AFCBP1	26
2.3.1 Introduction.....	26
2.3.2 Carte d'acquisition de données.....	28
2.3.3 Communication digitale entre le AFCBP1 et l'ordinateur.....	29
2.3.4 Communication analogue entre le AFCBP1 et l'ordinateur	32
2.4 PROGRAMME DE CONTRÔLE ABC POUR LE BIPOTENTIOSTAT AFCBP1	33
2.4.1 Aperçu des caractéristiques du programme	33
2.4.2 Contrôle du Pine AFCBP1 à l'aide de ABC.....	35
2.4.3 Validation du système ABC / Pine.....	57
2.5 CONCEPTION D'UN DÉTECTEUR ÉLECTROCHIMIQUE POUR L'ÉC.....	66
2.5.1 Introduction.....	66
2.5.2 Circuit utilisé.....	68
2.5.3 Vérification du fonctionnement du circuit.....	69
2.5.4 Aperçu du logiciel de contrôle et d'acquisition de données pour le détecteur électrochimique.....	76

3. DOSAGE DE LA LIPOXYGÉNASE PAR TECHNIQUES VOLT-AMPÉROMÉTRIQUES.....	89
3.1 INTRODUCTION	89
3.2 ENZYME - RÔLE ET IMPORTANCE	89
3.3 TRAVAIL PRÉCÉDENT	91
3.3.1 <i>Polarographie</i>	91
3.3.2 <i>Absorption en UV</i>	92
3.3.3 <i>Méthode d'absorption indirecte</i>	93
3.4 MÉTHODES PROPOSÉES	94
3.4.1 <i>Utilisation directe des électrodes solides</i>	94
3.4.2 <i>Dosage du BM par électrochimie</i>	94
3.5 PARTIE EXPÉRIMENTALE	95
3.5.1 <i>Réactifs utilisés</i>	95
3.5.2 <i>Conditions typiques de l'essai</i>	96
3.5.3 <i>Appareillage</i>	97
3.5.4 <i>Conditions d'analyse</i>	97
3.6 RÉSULTATS ET DISCUSSION	102
3.6.1 <i>Détection du bleu méthylène par électrochimie</i>	102
3.6.2 <i>Détection de l'activité enzymatique par le bleu méthylène</i>	104
3.6.3 <i>Recherche des paramètres optimaux</i>	107
3.6.4 <i>Possibilité d'automatisation du système</i>	110
3.6.5 <i>Problème d'adsorption</i>	115
3.6.6 <i>Détermination d'inhibiteurs avec la méthode d'injection alternée</i>	119
3.6.7 <i>Propriétés anti-oxydantes des inhibiteurs</i>	123
3.7 CONCLUSION.....	125
4. RÉFÉRENCES.....	127

Liste des tableaux

Tableau 1_ Comparaison des pentes obtenues par les deux systèmes (concentrations variables)	63
Tableau 2_ Coefficients de corrélation R pour Pine / ABC (conc. variables).....	63
Tableau 3_ Comparaison des pentes obtenues par les deux systèmes (vitesses variables)	64
Tableau 4_ Coefficients de corrélation R pour Pine / ABC (vitesses variables).....	65
Tableau 5_ Inhibition de la conversion LBM - BM par les inhibiteurs considérés lors de l'étude.....	124

Liste des figures

Figure 1_	Forme du potentiel appliqué en fonction du temps en ampérométrie.....	3
Figure 2_	Forme d'onde utilisé pour la volt-ampérométrie à balayage linéaire.....	4
Figure 3_	Forme d'onde utilisée pour la volt-ampérométrie cyclique.....	4
Figure 4_	Volt-ampérogramme typique de la volt-ampérométrie cyclique (couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4+}$, concentration 2 mM, 100 mV / s).....	6
Figure 5_	Forme d'onde utilisée en volt-ampérométrie impulsionnelle différentielle.....	8
Figure 6_	Forme d'onde utilisée en volt-ampérométrie à onde carrée.....	9
Figure 7_	Volt-ampérogramme typique de la volt-ampérométrie à onde carrée.....	11
Figure 8_	Panneau avant réel du HP34401	17
Figure 9_	Panneau avant virtuel du HP34401	17
Figure 10_	Relation entre le panneau avant et le diagramme-bloc	19
Figure 11_	Panneau avant d'un VI utilisé pour calculer la moyenne d'une série de données	20
Figure 12_	Diagramme-bloc du VI calculant la moyenne d'un tableau de valeurs numériques	21
Figure 13_	Dépendance de données dans LabVIEW	23
Figure 14_	Utilisation des agrégats	24
Figure 15_	Relation entre LabVIEW, NI-DAQ et les cartes d'acq. de données	25
Figure 16_	Bipotentiostat AFCBP1 de Pine.....	26
Figure 17_	Représentation binaire du nombre 20.	30
Figure 18_	Panneau avant virtuel du Pine AFCBP1	39
Figure 19_	Boite de dialogue de configuration	40
Figure 20_	Boite de dialogue de synchronisation.....	42
Figure 21_	Autres contrôles du balayage	46
Figure 22_	Autres contrôles généraux.....	47
Figure 23_	Fenêtre de l'acquisition de données en temps réel	51
Figure 24_	Module de traitement de données d'ABC.....	55

Figure 25_ Volt-ampérogrammes comparatifs entre le système Pine / ABC et le BAS-100B/W, pour des solutions de 2 mM (a) et de 100 mM (b) de cyanure de fer(III).	60
Figure 26_ Volt-ampérogrammes comparatifs entre le système Pine/ABC et le BAS-100B/W, pour des vitesses de balayages de 20 mV/s (a) et de 7500 mV/s (b) pour les solutions de cyanure de fer (III) 10 mM.	61
Figure 27_ Courant en fonction de la concentration pour chaque segment, par ABC/Pine et BAS-100B/W	62
Figure 28_ Variation du courant en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage	64
Figure 29_ Volt-ampérogramme typique, obtenu à 100 mV / s avec la solution de cyanure de fer (III) 9.781 mM.	71
Figure 30_ Influence de la concentration de cyanure de fer (III) sur le courant anodique.	72
Figure 31_ Influence de la concentration de cyanure de fer (III) sur le courant cathodique.	72
Figure 32_ Volt-ampérogramme, avec une vitesse de balayage de 5000 mV / s.	73
Figure 33_ Variation du courant anodique en fonction de la vitesse de balayage utilisée.	74
Figure 34_ Variation du courant cathodique en fonction de la vitesse de balayage.	75
Figure 35_ Panneau avant du logiciel d'acquisition de données pour ÉC	77
Figure 36_ Boite de dialogue de configuration	78
Figure 37_ Paramètres d'acquisition.....	79
Figure 38_ Module de traitement de données	85
Figure 39_ Volt-ampérogrammes du bleu méthylène produit enzymatiquement (1000 unités lipoxygénase / mL), par DPV (a) et par SWV (b).	103
Figure 40_ Variation du pic correspondant à la réduction électrochimique (par DPV) du bleu méthylène en fonction de l'activité enzymatique.	105
Figure 41_ Variation du pic de bleu méthylène en fonction de la concentration d'inhibiteur.	106

Figure 42_ Effet du pH sur le système	107
Figure 43_ Effet de la force ionique sur le système	109
Figure 44_ Dosage du bleu méthylène avec l'aide du système à flot continu par (a) absorption UV-VIS à 660 nm et par (b) le pic de volt-ampérométrie près de - 0.210 V.	111
Figure 45_ Tracés 3D correspondant à une solution de blanc (a) et à une solution contenant de l'inhibiteur (b)	113
Figure 46_ Pourcentage d'inhibition calculé à partir du pic correspondant au bleu méthylène, par SWV et par spectrophotométrie UV-VIS.	114
Figure 47_ Adsorption associée aux système DPV et SWV (BM produit enzymatiquement par 1000 unités / mL de lipoxigénase)	116
Figure 48_ Adsorption présente dans le système FIA-SWV pour le blanc et les solutions avec inhibiteur.....	117
Figure 49_ Utilisation des injections successives pour calculer l'inhibition.	118
Figure 50_ Courbe d'inhibition pour le dithizone.....	120
Figure 51_ Courbe d'inhibition pour le curcumine.....	120
Figure 52_ Courbe d'inhibition pour l'acide caféine	121
Figure 53_ Courbe d'inhibition pour le quercetin.....	121
Figure 54_ Courbe d'inhibition pour la phénidone	122
Figure 55_ Courbe d'inhibition pour l'esculine	122
Figure 56__ Courbe d'inhibition pour NDGA	123

Liste des abréviations

ADC	Convertisseur analogue à digital
BM	Bleu méthylène
DAC	Convertisseur digital à analogue
DAQ	Acquisition de données
DMF	Diméthylformamide
DPV	Volt-ampérométrie différentielle impulsionnelle
EC	Électrophorèse capillaire
FIA	Système d'injection en flot continu
5-HPETE	Acide 5-hydroperoxyéicosatétraénoïque
13-HPOD	Acide 13-hydroperoxy-9,11-octadécadiénoïque
LBM	Benzoyl-leuco bleu méthylène
LO	Lipoxygénase
NDGA	Acide nordihydroguaiarétique
SWV	Volt-ampérométrie à onde carrée
TRIS	Tris[hydroxyméthyl]aminométhane
VI	Instrument virtuel

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord ma femme Wendy de son amour et son support, d'avoir accepté de laisser les plaines du Nebraska pour venir vivre avec moi au Québec, et ainsi me permettre de rester près des gens que j'aime. Je veux remercier Olivier pour son sourire unique, qui fait souvent naître sur mon visage un sourire aussi unique.

Des remerciements du fond du cœur vont à mes parents Michel et Dominique pour leur support sans équivoque au cours des dernières années. Je souhaite uniquement réussir aussi bien qu'eux à établir une relation de parfaite confiance avec mes enfants.

Je tiens également à remercier les étudiants (et l'étudiante) du laboratoire de Dónal Leech de l'université de Montréal, pour leur amitié et leur bonne humeur. Enfin, merci à Dónal pour sa supervision et son enthousiasme.

1. Volt-ampérométrie

1.1 Introduction

Cette partie se veut une description des techniques électroanalytiques de volt-ampérométrie. Les logiciels de contrôle d'instruments décrits dans la partie 2 de ce mémoire permettent d'effectuer certaines de ces techniques, soient la volt-ampérométrie cyclique et la détection ampérométrique. Les expériences décrites dans la partie 3 ont recours à différentes techniques de volt-ampérométrie impulsionnelles. Il convient donc ici de présenter un aperçu de chaque technique volt-ampérométrique utilisée, et de préciser les fondements électrochimiques de ces techniques. Un bref aperçu de la théorie requise pour comprendre la base des techniques électroanalytiques est donné en premier lieu ; le lecteur aura intérêt à aller consulter les références citées pour plus de détails.

1.1.1 Composantes du courant en volt-ampérométrie

Les courants mesurés en volt-ampérométrie cyclique possèdent deux composantes majeures: une composante capacitive et une composante faradaïque. Lors d'un changement de potentiel appliqué à l'électrode E, le potentiel ζ de la double-couche électrique varie également : c'est l'origine du courant capacitif. L'interface électrode - solution peut être considérée comme un condensateur en première approximation.¹

Lors de l'acquisition de mesures en électrochimie, seul le courant faradaïque est d'intérêt analytique. En effet, seul celui-ci est relié à la concentration de l'espèce électroactive par une relation de proportionnalité. Ce courant origine du transfert d'électrons existant entre une électrode et une espèce rédox présente en solution.

Les espèces électro-actives peuvent parvenir à la surface de l'électrode par trois processus distincts. La diffusion est le processus par lequel les espèces diffusent d'un endroit de concentration forte en espèces jusqu'à une région moins concentrée. Dans le cas de l'interface électrode - solution, la région de faible concentration sera à la surface de l'électrode. En effet, si une espèce subit une transformation à la surface de l'électrode, sa concentration y diminue et devient plus faible que celle du reste de la solution : un gradient de concentration étant créé, le processus de diffusion va permettre à de nouvelles molécules de l'espèce électroactive de se retrouver près de la surface de l'électrode.²

Le transport mécanique est un autre moyen pour les molécules d'accéder à la surface de l'électrode. Le transport mécanique peut provenir d'une agitation externe de la solution ou peut être d'origine thermique (mouvement Brownien). Comme le transport mécanique est très difficile à reproduire d'une expérience à l'autre (à moins d'utiliser une électrode à disque rotatif), des mesures doivent être prises pour le rendre négligeable. Ainsi, la solution n'est pas agitée, et le montage expérimental est souvent placé sur une base de marbre pour minimiser les vibrations provenant de l'édifice.³

Les molécules peuvent également parvenir à la surface de l'électrode par attraction (ou migration) électrostatique. L'importance de ce processus est à minimiser, car il n'existe pas de relation quantitative simple entre le courant dû à la migration et la concentration de l'espèce. Une façon simple d'éliminer la contribution de la migration consiste à ajouter un électrolyte de support à toutes les solutions à analyser : le nombre de transport associé à l'analyte est alors négligeable. Généralement, une concentration d'électrolyte de support 100 fois plus grande que l'analyte est utilisée.⁴

1.1.2 L'ampérométrie

La technique d'électroanalyse la plus simple est la détection ampérométrique. Les techniques volt-ampérométriques permettent habituellement d'étudier la réponse du courant mesuré à une électrode de travail en fonction du potentiel lui étant appliqué. La détection purement ampérométrique utilise un potentiel constant : on mesure la réduction ou l'oxydation d'une espèce à un potentiel donné.⁵ Le potentiel appliqué à l'électrode de travail en fonction du temps sera tel qu'à la Figure 1.

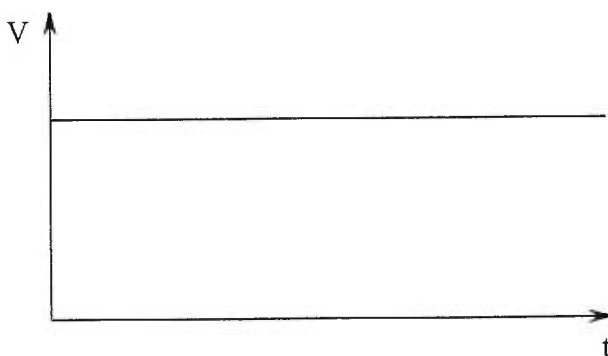


Figure 1_ Forme du potentiel appliqué en fonction du temps en ampérométrie

La principale qualité de la détection ampérométrique est sa simplicité. On peut utiliser cette technique à la sortie d'un capillaire d'électrophorèse ou d'une colonne chromatographique. Le courant mesuré à l'électrode de travail en fonction du temps permet de détecter les analytes à la sortie de la colonne ou du capillaire.⁶

La sensibilité de la technique est excellente (elle est cependant inférieure à celle obtenue par les techniques impulsionnelles). Des problèmes d'adsorption à la surface de l'électrode peuvent toutefois survenir. Lorsqu'un produit est adsorbé à la surface de l'électrode, elle devient moins accessible aux espèces électroactives, ce qui risque de rendre les signaux mesurés plus faibles. Des problèmes concernant la reproductibilité des résultats expérimentaux peuvent être observés. La sélectivité est bonne, mais pourrait être améliorée : en effet, toutes les molécules s'oxydant ou

se réduisant au potentiel choisi vont donner un signal. L'utilisation d'électrodes modifiées peut permettre d'augmenter la sélectivité.⁷

1.1.3 La volt-ampérométrie à balayage linéaire et la volt-ampérométrie cyclique

Comme son nom l'indique, la volt-ampérométrie à balayage linéaire implique un changement linéaire en fonction du temps du potentiel appliqué à l'électrode de travail. La forme d'onde utilisée est illustrée à la Figure 2. On peut parler de volt-ampérométrie cyclique (VC) si le potentiel est inversé à la limite et qu'un nouveau segment du balayage est effectué en sens inverse. L'onde triangulaire peut être répétée plusieurs fois en fonction du temps (Figure 3).

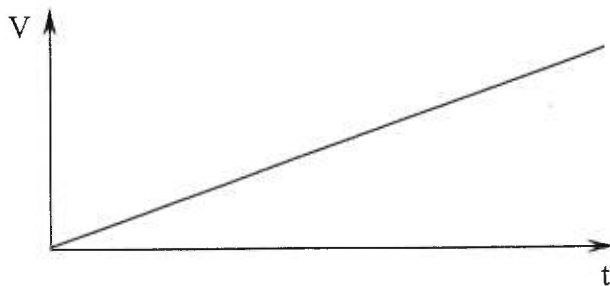


Figure 2_ Forme d'onde utilisé pour la volt-ampérométrie à balayage linéaire

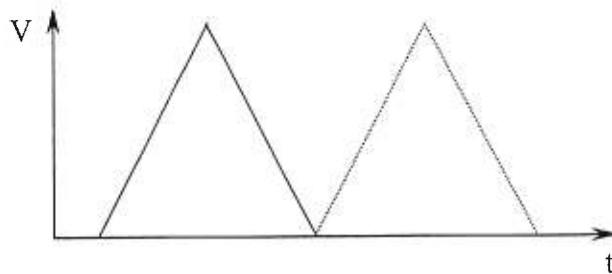


Figure 3_ Forme d'onde utilisée pour la volt-ampérométrie cyclique

La volt-ampérométrie cyclique a des usages multiples. Elle peut être utilisée dans un but analytique, les courants des pics cathodiques et anodiques étant directement proportionnels à la concentration de l'analyte électroactif. Elle est aussi utile pour étudier des mécanismes de réaction (elle aide notamment à calculer des constantes d'équilibre de réaction) et pour caractériser des espèces rédox.⁸

Les paramètres importants en volt-ampérométrie cyclique sont les suivants :

- le potentiel initial E_i
- la direction initiale de balayage (anodique ou cathodique)
- la vitesse de balayage v
- la borne supérieure E_{\max}
- la borne inférieure E_{\min}
- le potentiel final E_f

En général, les résultats de volt-ampérométrie (cyclique ou d'une autre technique) sont présentés sur un volt-ampérogramme. Ce type de graphique affiche le courant mesuré à l'électrode en fonction du potentiel appliqué.

Comme mentionné précédemment, la réponse à l'application d'un potentiel à une électrode a deux composantes : le courant faradaïque et le courant capacitif. La contribution de ce dernier s'accroît lors de l'augmentation de la vitesse de balayage : le courant capacitif augmente linéairement en fonction d'une augmentation de la vitesse de balayage.⁹

Les mesures doivent être prises pour que seule la contribution faradaïque du courant soit considérée, en éliminant le courant capacitif. Pour ce faire, lors des mesures, il ne faudra pas uniquement lire la valeur du maximum de courant pour chaque pic de volt-ampérométrie cyclique. Une ligne de base devra être tracée, correspondant au courant de charge. Un volt-ampérogramme typique, illustrant le tracé de la ligne de

base pour la mesure des courants anodique et cathodique, est représenté à la Figure 4 :

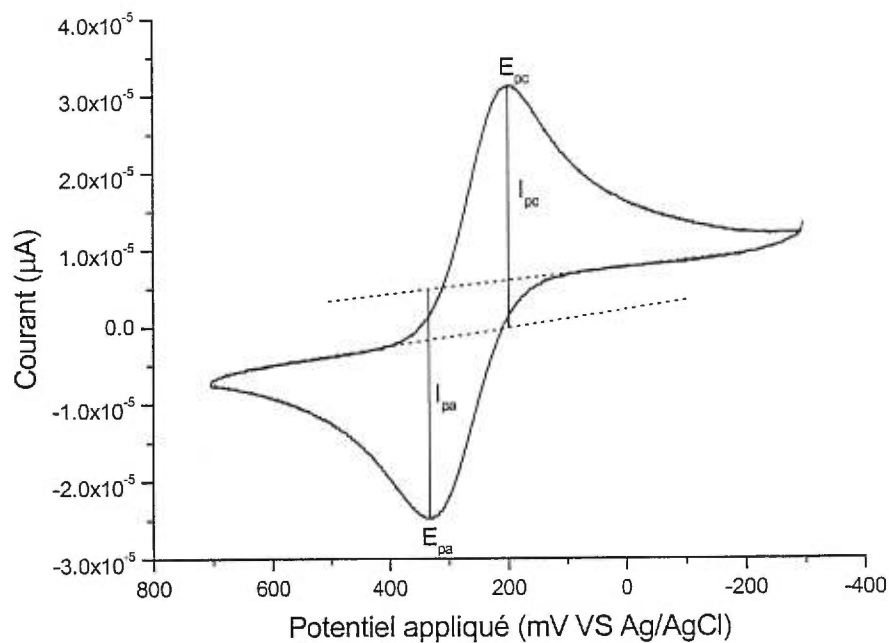


Figure 4_ Volt-ampérométrie typique de la volt-ampérométrie cyclique (couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, concentration 2 mM, vitesse de balayage 100 mV / s)

La loi de Randles-Sevcik relie le courant du pic mesuré en VC et la concentration de l'espèce électroactive en solution par la relation :

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} CAD^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{à } 25^\circ\text{C seulement}) \quad (1)$$

où I_p est le courant du pic (A), n le nombre d'électrons échangés à l'électrode, C la concentration de l'espèce (moles / cm^3), A l'aire de la surface de l'électrode (cm^2), D le coefficient de diffusion de l'espèce (cm^2/s) et v la vitesse de balayage (V/s). Cette équation est valide pour les systèmes électrochimiquement réversibles.

Si n , A , D et v sont maintenus constants, on peut écrire :

$$I_p \propto C \quad (2)$$

Si on maintient C constant et que v est variable, on obtient :

$$I_p \propto v^{1/2} \quad (3)$$

1.1.4 La volt-ampérométrie impulsionnelle différentielle

La technique de volt-ampérométrie cyclique peut permettre des analyses puissantes de mécanismes de réaction, d'évaluation de constantes de vitesse, etc. Pour l'analyse quantitative cependant, la volt-ampérométrie cyclique présente une limitation importante : la limite de détection n'est pas tellement basse, à cause surtout de la contribution du courant capacitif. À vitesse de balayage moyenne ou élevée (plus de 100 mV / s), des concentrations supérieures à 1 mM doivent être utilisées¹⁰. Heureusement, grâce à l'électronique, plusieurs nouvelles techniques ont pu être développées ; elles peuvent améliorer sensibilité et limite de détection de façon appréciable. Ces techniques ont toutes un point en commun : elles utilisent des impulsions de potentiel. Elles seront donc désignées « techniques impulsionnelles ».

La volt-ampérométrie impulsionnelle différentielle (DPV - Differential Pulse Voltammetry) utilise la forme d'onde représentée sur la Figure 5. La figure démontre également que l'onde utilisée est celle utilisée en volt-ampérométrie à balayage linéaire à laquelle des impulsions périodiques sont superposées. Contrairement à la volt-ampérométrie à balayage linéaire, la réponse de courant de l'électrode n'est pas acquise continuellement. Elle est plutôt mesurée immédiatement avant l'impulsion et à la fin de l'impulsion (intégrée typiquement sur 17 ms dans les deux cas). Les endroits où les courants sont acquis sont indiqués par I_1 et I_2 sur le schéma.

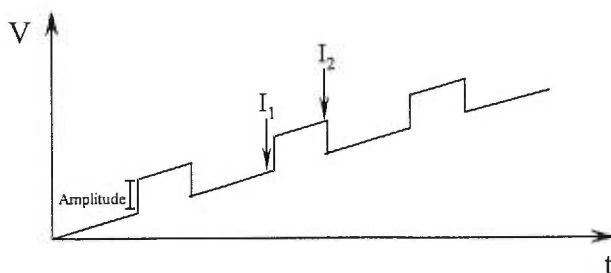


Figure 5_ Forme d'onde utilisée en volt-ampérométrie impulsionnelle différentielle

L'échantillonnage du courant à la fin de l'impulsion permet de diminuer à un niveau minimum le courant capacitif. Au début de l'impulsion, le courant augmente (à cause du nouveau potentiel, le courant faradaïque augmente à cause de la réaction électrochimique qui devient plus complète, et le courant capacitif augmente à cause du potentiel de la double couche qui augmente également). La double couche pouvant être représentée par un condensateur, la valeur du courant lui étant associée décroît exponentiellement en fonction du temps¹¹. Le courant faradaïque décroît en fonction $1/(t)^{1/2}$, donc plus lentement. En mesurant le courant vers la fin de l'impulsion, on s'assure que la contribution du courant faradaïque au courant total est plus importante qu'au début de l'impulsion. La mesure différentielle est acquise. Le volt-ampérogramme obtenu à partir de cette technique est sensiblement la dérivée de celui obtenu par volt-ampérométrie à balayage linéaire¹².

L'amplitude des impulsions est un paramètre à choisir avec attention. Des impulsions entre 5 et 150 mV sont habituellement choisies. La sensibilité augmente généralement lorsque l'amplitude des impulsions augmente alors que la résolution décroît. Un compromis est souvent recherché.¹³

1.1.5 La volt-ampérométrie à onde carrée

La volt-ampérométrie à onde carrée (SWV - Square Wave Voltammetry) est une technique impulsionnelle extrêmement sensible. Elle possède un grand nombre d'avantages sur la volt-ampérométrie impulsionnelle différentielle, et elle devrait être amenée à devenir la technique de volt-ampérométrie impulsionnelle la plus utilisée.

La technique a été développée en grande partie par G. Barker dans les années 50 en Angleterre. Ce n'est que récemment, avec l'arrivée des microprocesseurs et des ordinateurs, que la technique a commencé à être utilisée pour des fins analytiques en dehors de laboratoires de recherche. La plupart des informations de cette section proviennent d'un article de J. et R. Osteryoung¹⁴

La forme d'onde utilisée peut facilement être décrite comme étant la combinaison d'une onde carrée avec une onde d'escalier, pour donner la forme résultante de la Figure 6.

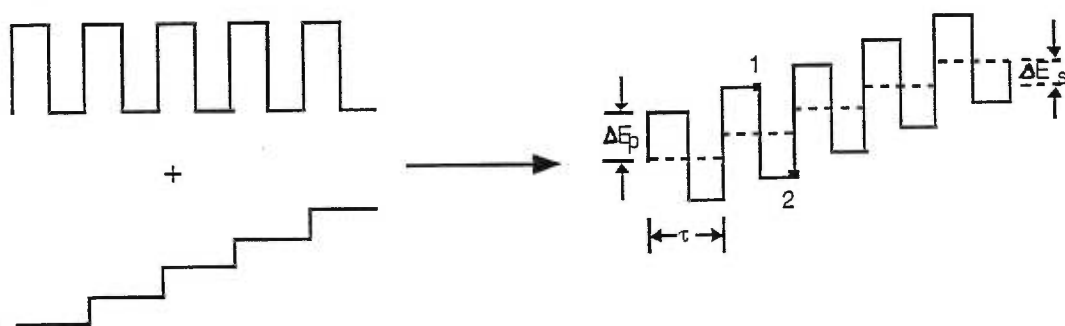


Figure 6_ Forme d'onde utilisée en volt-ampérométrie à onde carrée

Sur la Figure 6,

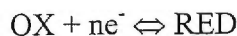
τ représente la période de l'onde (ou le temps de répétition de l'impulsion) ;

ΔE_p le changement de potentiel d'impulsion et

ΔE_s représente la hauteur de la marche (step height).

En général, la période est très courte (environ 5 ms), alors que ΔE_p est relativement important (aux alentours de 25 mV), et ΔE_s est d'environ 10 mV. Le courant est mesuré à deux endroits, identifiés par 1 et 2 sur la figure. Le tracé des ΔI_p en fonction du potentiel appliqué donne un pic semblable à celui qu'on obtient en volt-ampérométrie différentielle impulsionnelle¹⁵.

Prenons l'exemple d'une réaction réversible pour l'expliquer plus en détails :



où OX représente la forme oxydée et RED la forme réduite d'une espèce électroactive. Si un analyte est présent initialement sous sa forme oxydée, un balayage vers les potentiels négatifs est effectué. Lorsque le potentiel devient assez négatif, la réaction de réduction commence. Comme indiqué sur la figure 6, le potentiel est chuté immédiatement après le point 1, une fois le courant de réduction mesuré. ΔE_p étant assez grand, l'espèce venant d'être réduite va être réoxydée (si la réaction est réversible). Le courant associé à l'oxydation sera mesuré au point 2. On fait la différence entre le courant anodique et le courant cathodique ; cette différence sera forcément supérieure au courant mesuré en tenant compte uniquement d'une des deux réactions. La comparaison des courants mesurés aux points 1 et 2 peut également donner des renseignements sur le mécanisme de la réaction.

Étant donné la méthode différentielle utilisée, plus la réaction est réversible, plus la méthode est sensible, la réaction inverse étant plus complète. On peut être porté à croire qu'on a toujours avantage à travailler avec des valeurs très fortes de ΔE_p . On peut cependant observer dans la pratique qu'élever ΔE_p à des valeurs supérieures à

$50 / n$ mV (où n est le nombre d'électrons échangés) ne fait qu'élargir le pic sans augmenter sa hauteur, donc cause une perte de résolution sans gain appréciable de sensibilité. $50 / n$ mV est l'amplitude d'impulsion optimale pour un système réversible.

Pour une réaction réversible, l'équation suivante est valide :

$$i = \left[nFAD^{1/2}C / (\pi t_p)^{1/2} \right] \Psi(\Delta E_p, \Delta E_s) \quad (4)$$

où i est le courant mesuré à chaque impulsion, n le nombre d'électrons échangés à la surface de l'électrode, F la constante de Faraday, A l'aire de l'électrode et D le coefficient de diffusion, C la concentration de réactifs loin de la surface de l'électrode et t_p la largeur de l'impulsion. On peut voir que la quantité entre crochets correspond au courant maximum observable en volt-ampérométrie d'impulsion normale. Ψ est la fonction de courant, sans dimension, qui est fonction des paramètres ΔE_p et ΔE_s . La fonction Ψ peut être déterminée mathématiquement. Les tracés de Ψ en fonction des potentiels normalisés $n(E-E_{1/2})$, ne sont ni fonction de l'espèce ni de la concentration. On peut obtenir un Ψ_1 correspondant au point 1 de la Figure 6 et un Ψ_2 correspondant au point 2, ainsi qu'un $\Delta\Psi$ correspondant à la différence des deux. Sur la figure suivante, $I(1)$ représente Ψ_1 , $I(2)$ représente Ψ_2 et ΔI représente $\Delta\Psi$.

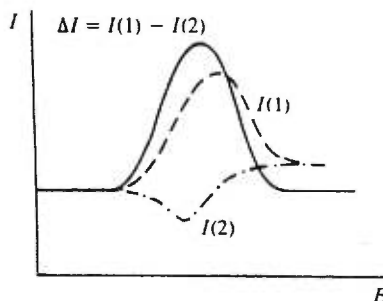


Figure 7_ Volt-ampérogramme typique de la volt-ampérométrie à onde carrée

D'après l'équation 4, le courant mesuré va augmenter lorsque t_p diminue. On a donc intérêt à travailler à une fréquence rapide (car $t_p = 1 / f$). Même si en théorie on devrait travailler à des fréquences très élevées, une fréquence de 200 Hz est souvent choisie en raison des problèmes d'électronique rencontrés à fréquences plus élevées.

Dans le cas des réactions réversibles, la volt-ampérométrie à onde carrée est plus sensible par un facteur de 5 que la volt-ampérométrie différentielle. Pour les réactions irréversibles, on peut montrer qu'elle est au moins aussi sensible que la DPV.

La sensibilité n'est pas le plus grand avantage de la volt-ampérométrie à onde carrée. D'après les valeurs typiques de ΔE_s et de f données précédemment (respectivement 10 mV et 200 Hz), on obtient une valeur de vitesse de balayage de 2 V / s, valeur considérablement supérieure à celle utilisée par toute autre technique impulsionnelle. Cette vitesse élevée permet des applications difficiles à réaliser par toute autre technique de volt-ampérométrie. Par exemple, un détecteur électrochimique avec SWV peut être utilisé à la sortie d'un système d'injection à flot continu (FLA) ou de chromatographie liquide à haute performance (HPLC), puisqu'on peut balayer un potentiel de 500 mV en un quart de seconde. Pour les méthodes chromatographiques, les avantages sont encore plus marqués puisqu'on ajoute le pouvoir de spécification de la technique électrochimique de détection au pouvoir de séparation de la colonne¹⁶. Également, la réduction du temps d'analyse peut permettre l'enregistrement d'un grand nombre de volt-ampérogrammes pour un essai donné, permettant une augmentation du rapport signal/bruit et par conséquent une meilleure limite de détection. Des concentrations de l'ordre du nanomolaire peuvent alors être détectées. Aussi, seule une très faible quantité d'analyte est consommée durant l'analyse.

L'élimination des courants de fond est un autre avantage important de la technique. Si on travaille à un potentiel où les courants sont limités par le transfert de masse pour une espèce donnée, le courant d'oxydation sera d'amplitude égale au courant de réduction. La différence des courants sera par conséquent nulle. Ceci peut permettre d'éliminer le courant dû à la réduction de l'oxygène en solution. Cet avantage est important lorsqu'on travaille à des potentiels inférieurs à 0 V VS Ag/AgCl¹⁷. De même, le signal sera moins sensible à la convection (en HPLC ou en FIA, une variation du débit n'affectera pas beaucoup le détecteur). La volt-ampérométrie à onde carrée est moins sujette à des problèmes dus à l'adsorption que la plupart des techniques impulsionnelles, en raison de sa rapidité.

2. Programmes de contrôle d'instruments et d'acquisition de données

2.1 Introduction

Un programmeur a toujours avantage à explorer toutes les possibilités qui s'offrent à lui pour effectuer une tâche donnée, surtout si celle-ci est complexe. Le choix de l'environnement à utiliser est souvent à effectuer en premier lieu. Ensuite, il faut sélectionner un langage de programmation permettant d'atteindre efficacement, facilement et le plus rapidement possible les objectifs fixés.

Chaque langage de programmation possède ses avantages propres. Par exemple, le Pascal est simple, très près de la langue anglaise. Le C est puissant, il permet d'effectuer des tâches très variées et il est très utilisé. Le Java est multienvironnement, c'est-à-dire qu'un programme n'a pas à être modifié pour être exécutable d'une plate-forme à l'autre.

En programmation traditionnelle, le programmeur doit donner une série d'instructions à l'ordinateur décrivant les tâches à accomplir. Ces instructions sont données pour la plupart des langages de programmation par texte, ressemblant plus ou moins à l'anglais écrit. Un peu comme les langues orales, chaque langage de programmation est unique. Et comme pour les langues, on doit respecter beaucoup de règles syntaxiques pour que les idées exprimées soient comprises par l'auditeur, ici un ordinateur. La plupart des langages les plus couramment utilisés (C, Pascal) existent depuis plusieurs décennies, et ont peu évolué avec le temps, même si la puissance des micro-ordinateurs a augmenté de façon saisissante au cours des dernières années.

LabVIEW est un environnement de programmation fort différent des langages de programmation dits traditionnels. Au lieu d'être un langage basé sur le texte, LabVIEW (acronyme pour LABoratory Virtual Instrument Environnement Workbench) est un environnement où la programmation est graphique¹⁸. L'utilisation d'un langage graphique comprend plusieurs avantages par rapport à celui d'un langage textuel. Certains parallèles peuvent être faits pour illustrer ces avantages. Prenons l'exemple des panneaux routiers. Il n'est pas du tout nécessaire d'être capable de lire une langue écrite pour reconnaître un signal d'arrêt en conduisant une automobile: il suffit de savoir que le panneau qui est associé par convention à l'action d'arrêter est un octogone rouge. Le feu de couleur verte signifie que le passage est libre. Une fois que ces conventions sont connues, il est très facile de les appliquer pour conduire de façon sûre un véhicule, peu importe le pays où l'on est. Si, au lieu de lumières vertes, jaunes et rouges, on aurait des indications sous forme de texte comme: « Avancez, vous avez priorité », ou « Stoppez et laissez les autres autos passer », on pourrait imaginer la détresse d'un automobiliste conduisant dans un pays où il ne maîtrise pas la langue locale.

Des idées plus complexes que l'exemple précédent peuvent être illustrées à l'aide de schémas. Les schémas de circuits électriques en sont un bon exemple: les résistances sont représentées par \sim , les condensateurs par $||$, les amplificateurs opérationnels par \triangleright . Le courant circulant dans les fils est représenté par des traits (—) sur le schéma. La programmation dans LabVIEW est inspirée de cette approche : on programme en créant des schémas.

LabVIEW est plus qu'un simple langage de programmation, car il contient des outils de développement reliés spécifiquement à l'instrumentation scientifique. Lorsqu'on réfère à LabVIEW, on parle de l'ensemble de l'environnement de programmation (incluant les outils pour l'acquisition de données, pour l'analyse de données, etc., en plus du langage de programmation proprement dit). On nomme G (pour Graphic) le langage de programmation graphique.

LabVIEW a été créé par National Instruments, compagnie spécialisée dans la vente de produits pour contrôler l'instrumentation scientifique. National Instruments est présentement le leader incontesté de vente de périphériques (hardware) reliés à l'acquisition de données et au contrôle de l'instrumentation scientifique. Pour la programmation reliée au contrôle d'instrumentation et à l'acquisition de données, LabVIEW est présentement le deuxième environnement de programmation le plus utilisé au monde. La récente mission de la sonde PathFinder sur Mars a montré que la NASA faisait appel à LabVIEW pour contrôler une partie de l'instrumentation utilisée pour explorer le sol martien. Cet environnement de programmation est donc utilisé pour des projets de la plus haute envergure¹⁹.

La section suivante donne un bref aperçu du fonctionnement de LabVIEW.

2.2 Fonctionnement de LabVIEW

Un programme conçu sur LabVIEW est appelé VI, acronyme pour Virtual Instruments (instruments virtuels). Cette terminologie provient du fait que l'interface offerte à l'utilisateur peut mimer un instrument réel. Par exemple, un VI conçu pour contrôler et lire les données d'un oscilloscope pourra ressembler à un oscilloscope, avec les boutons et les interrupteurs que l'on retrouve habituellement sur ce type d'instrument.



Figure 8_ Panneau avant réel du HP34401²⁰

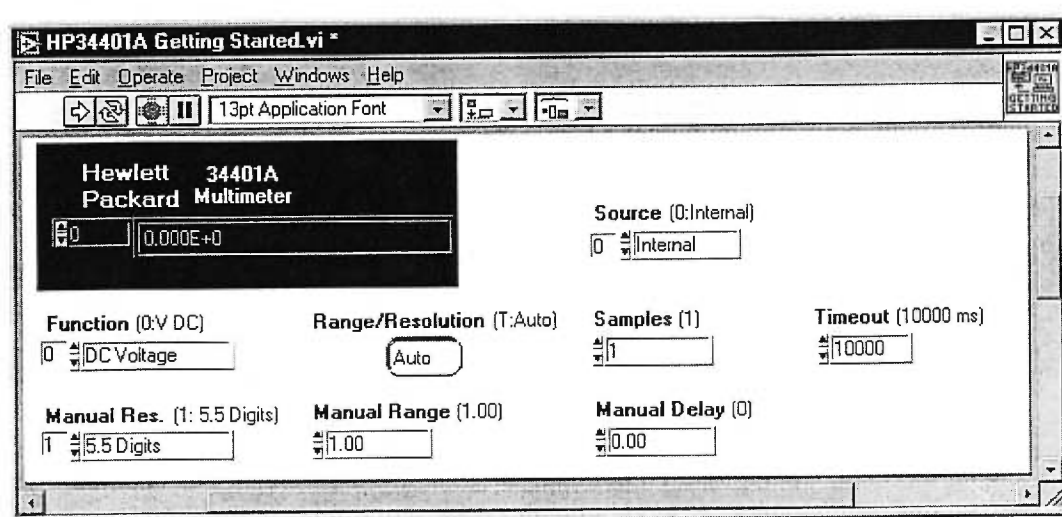


Figure 9_ Panneau avant virtuel du HP34401²¹

Plus spécifiquement, c'est la partie du VI nommée panneau avant (front panel) qui peut ressembler à un instrument réel. À l'aide de la souris et/ou du clavier, l'utilisateur peut changer les valeurs des contrôles de l'instrument virtuel. Les résultats sont affichés sur des indicateurs (ceux-ci peuvent être simples, comme un indicateur digital affichant uniquement un nombre, ou passablement complexes, comme un graphe affichant plusieurs centaines de points simultanément). L'utilisateur (celui qui exécute et utilise le programme) a uniquement accès au panneau avant du VI.

La deuxième partie importante d'un VI est le diagramme-bloc (block diagram). Ce diagramme est l'endroit où le langage G est utilisé pour que le VI accomplisse la tâche désirée. Le diagramme-bloc est équivalent au code-source textuel des langages de programmation traditionnels. Les programmes en G de LabVIEW ont une allure semblable à celles des représentations graphiques des circuits électriques. L'information circule dans les diagrammes-blocs à l'intérieur de fils représentés par des traits, tout comme dans le cas des schémas électriques. Mais si seulement des électrons circulent dans les fils représentés sur les circuits électriques, l'information pouvant circuler dans les diagrammes-bloc est beaucoup plus variée et complexe. Les catégories suivantes de fils sont couramment utilisées:

- fils de nombres;
- fils de texte;
- fils de tableaux de données;
- fils agrégats (cluster en anglais).

Une relation intrinsèque existe entre le panneau avant et le diagramme-bloc. Ainsi, pour un contrôle numérique créé sur le panneau avant, un petit icône lui correspondant va devenir disponible sur le diagramme-bloc. C'est à partir de cet icône que l'on peut accéder à la valeur entrée par l'utilisateur sur le panneau avant. De même, pour un indicateur de données créé sur le panneau avant, un icône devient disponible sur le diagramme-bloc. Un fil, donnant le résultat du programme par exemple, pourra y être branché. Une fois le programme exécuté, l'utilisateur pourra voir le résultat affiché sur l'indicateur (Figure 10).

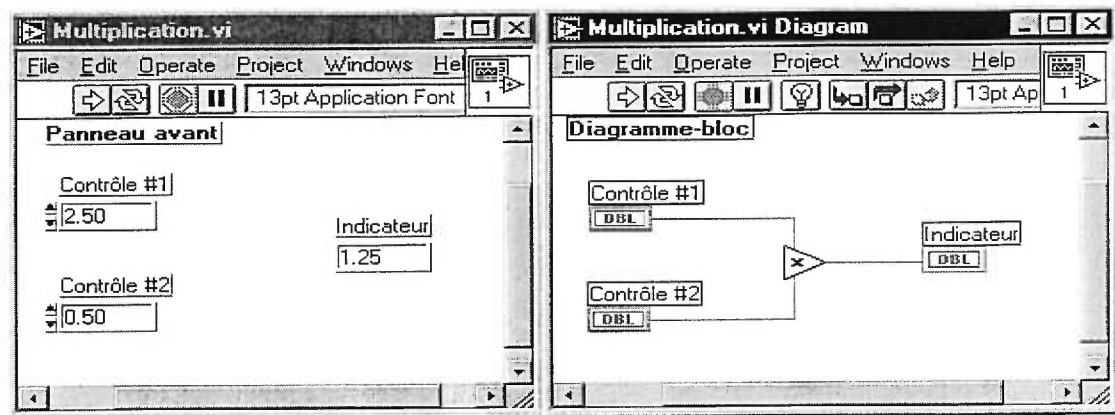


Figure 10_ Relation entre le panneau avant et le diagramme-bloc

LabVIEW encourage une approche modulaire à la programmation, tout comme la plupart des langages de programmation modernes. Les VI peuvent être utilisés de façon hiérarchique, et des données peuvent être échangées d'un VI à l'autre de façon dynamique. Une tâche complexe peut être divisée en une série de tâches beaucoup plus simples. Chaque tâche simple est effectuée par un VI. Puis, créant un VI de haut niveau, le programmeur relie ces VI, qui deviennent des sous-VI du VI principal. Cette approche rend la programmation beaucoup plus facile et augmente l'efficacité et la performance. La facilité accrue provient notamment du fait que chacune des sous-VI peut être exécutée de façon indépendante, ce qui rend la correction des programmes (debugging) beaucoup plus facile. Un sous-VI devient comme une fonction pré-définie de LabVIEW.

2.2.1 Exemple de VI

On donne maintenant un exemple illustrant l'usage de LabVIEW pour exécuter une tâche simple: le calcul de la moyenne d'une série de nombres compris dans un tableau. Des fonctions de plus haut niveau disponibles dans LabVIEW permettent

de faire cette tâche en moins d'étapes, mais on a choisi d'utiliser des fonctions de base pour que l'exemple soit le plus simple possible.

Le panneau avant est la partie du VI accessible à l'utilisateur. La tâche à effectuer étant de calculer la moyenne des nombres et d'afficher le résultat, un seul contrôle (un tableau de valeurs numériques), et un seul indicateur (un afficheur digital indiquant un seul nombre - le résultat) sont nécessaires. Un contrôle spécial, soit le bouton *Stop*, est ajouté pour que le programme puisse être arrêté en cours d'exécution. Les contrôles et les indicateurs peuvent facilement être créés à partir des menus, pour donner le panneau avant représenté sur la Figure 11.

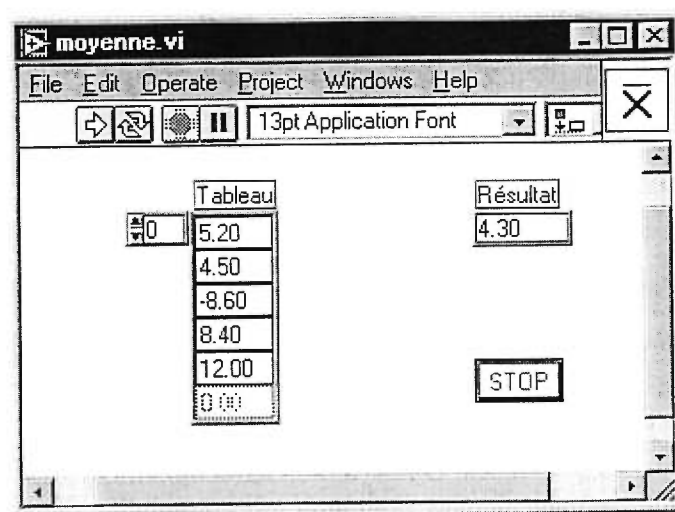


Figure 11_ Panneau avant d'un VI utilisé pour calculer la moyenne d'une série de données

Les opérations suivantes doivent être accomplies par le diagramme-bloc:

- L'addition de toutes les valeurs comprises dans le tableau ;
- L'obtention du nombre de valeurs comprises dans le tableau ;
- Le calcul du rapport entre la somme des valeurs et le nombre de valeurs, et l'affichage du résultat ;
- La sortie du programme lorsqu'on appuie sur le bouton Stop.

Le diagramme-bloc suivant accomplit ces opérations:

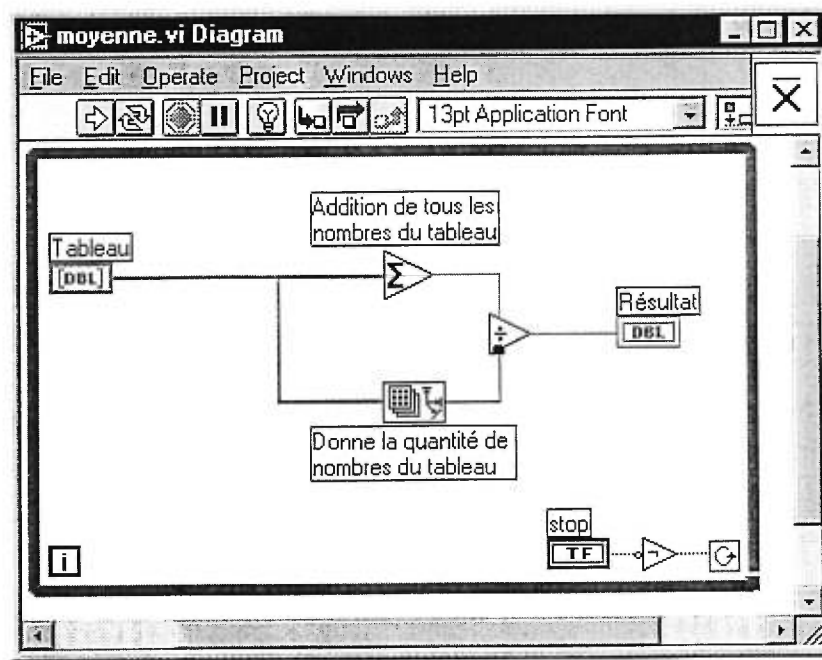


Figure 12_ Diagramme-bloc du VI calculant la moyenne d'un tableau de valeurs numériques

Des structures de contrôles peuvent être utilisées dans LabVIEW. On a choisi ici d'inclure les opérations à l'intérieur d'une telle structure, une boucle LORSQUE (WHILE en anglais). Ce type de boucle s'exécute perpétuellement, jusqu'à ce qu'une condition donnée devienne fausse. Pour cet exemple, la condition est déterminée par le bouton *Stop* présent sur le panneau avant. Lorsque l'utilisateur du VI n'appuie pas sur le bouton avec le bouton de la souris, la valeur correspondante au bouton sur le diagramme-bloc est FAUX; un opérateur l'inverse pour donner VRAI comme condition d'itération. Le programme effectue alors une autre itération. Lorsque l'utilisateur appuie sur le bouton, la valeur correspondante au bouton devient VRAI et la condition d'itération FAUX; le programme cesse de s'exécuter après l'itération en cours.

Il est à noter que LabVIEW comprend un bon nombre de fonctions pour effectuer des opérations statistiques tels la moyenne, l'écart-type, etc. On a toutefois choisi de montrer comment il était possible d'effectuer la moyenne à partir d'opérations mathématiques simples. Une fois que l'utilisateur appuie sur le bouton d'exécution, le programme calcule la moyenne des valeurs présentes dans le tableau.

2.2.2 Ordre d'exécution

Une explication de l'ordre d'exécution au sein d'un VI s'impose. En programmation textuelle, il est très facile de déterminer l'ordre dans lequel les commandes seront exécutées: celles-ci sont lues ligne après ligne. Des structures de contrôle peuvent exécuter certaines lignes de façon répétitives jusqu'à ce qu'une certaine condition soit remplie. La situation est fort différente dans le cas du G. En effet, pourquoi l'information circulerait dans un fil avant qu'elle ne circule dans un autre? La réponse est simple: une fonction s'exécute une fois que toutes ses entrées (inputs) sont disponibles. C'est la seule règle absolue qui dicte l'ordre d'exécution. On ne peut pas supposer par exemple qu'une fonction située physiquement en haut d'une autre va être exécutée en premier. LabVIEW fournit des structures de contrôle (toujours graphiques) qui permettent d'effectuer plusieurs itérations pour une série d'opérations données, ou encore pour exécuter dans un ordre défini des commandes pour lesquelles il n'existe pas de dépendance de données.

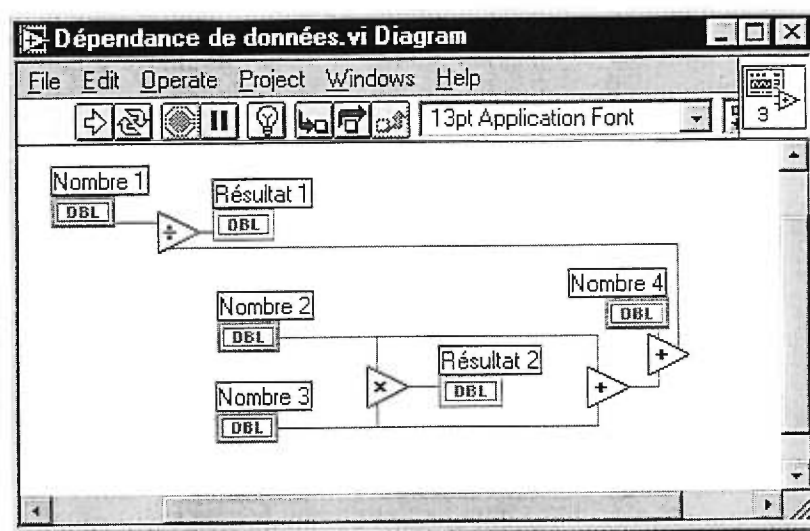


Figure 13_ Dépendance de données dans LabVIEW

On pourrait penser en jetant un coup d'œil sur la Figure 13 que la première opération effectuée par le VI est la division, parce qu'elle est située en haut à gauche. L'opérateur division doit attendre ses deux entrées avant d'être exécuté. Une des entrées est disponible immédiatement (Nombre 1). Pour obtenir l'autre entrée, le VI doit tout d'abord additionner Nombres 2 et 3, puis additionner Nombre 4 au résultat. La division peut alors être calculée, et le résultat affiché sur l'indicateur Résultat 1.

Le VI calcule également Résultat 2, le produit de Nombre 1 et de Nombre 2. Il n'est pas possible de prédire si Résultat 2 va être affiché avant ou après Résultat 1, puisqu'il n'existe pas de dépendance de données entre les deux indicateurs. Si l'ordre dans lequel les résultats sont affichés était important, il faudrait utiliser des structures de contrôle.

Quelques mots pour expliquer l'usage des agrégats. Ils ont pour unique fonction de simplifier les diagrammes-bloc: les agrégats sont des fils spéciaux, contenant eux-mêmes des fils plus simples. On assemble un agrégat en combinant une série de fils simples. L'information contenue dans ces fils peut être différente d'un fil à l'autre:

on peut par exemple assembler un agrégat à partir de cinq fils numériques et de deux fils de texte. Les agrégats sont très analogues aux fils de téléphones, qui sont en réalité uniquement un moyen de simplifier les circuits téléphoniques, en ayant un seul fil pour transporter plusieurs fils. Pour avoir accès à l'information contenue dans un fil simple dans un fil agrégat, il faut tout d'abord utiliser une fonction pour avoir accès à ce fil, qui peut alors nous donner l'information voulue.

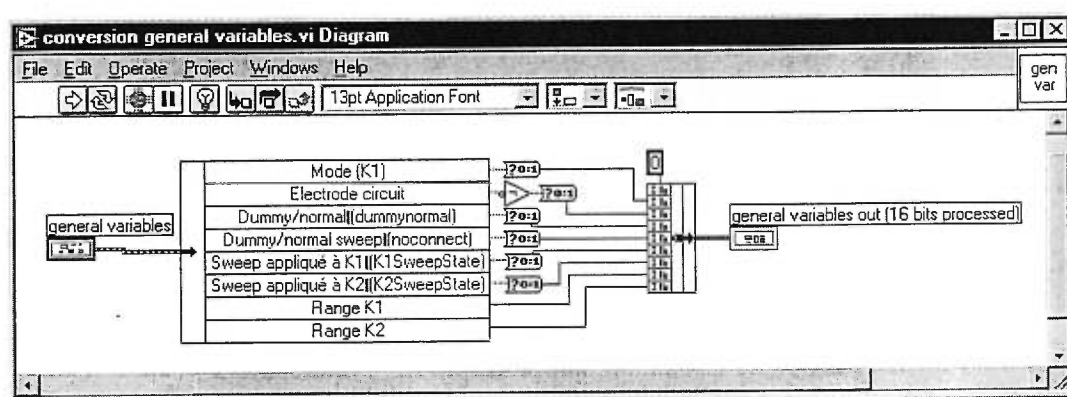


Figure 14_ Utilisation des agrégats

La Figure 14 illustre l'usage des agrégats. Un agrégat nommé « general variables » contient une série de variables. Certaines de ces variables sont lues. Des opérations sont ensuite effectuées sur les valeurs correspondant à ces variables. Un nouvel agrégat nommé « general variables out (16 bits processed)» est alors assemblé à partir des valeurs calculées. Le nouveau cluster peut ensuite être utilisé pour transmettre à un autre VI toutes les informations, à l'aide d'un seul fil.

2.2.3 LabVIEW pour le contrôle et l'acquisition de données d'instrumentation scientifique

LabVIEW utilise une librairie dynamique de liens Windows (Windows Dynamic Link Library ou DLL) nommée NI-DAQ (acronyme de National Instrument – Data

Acquisition) pour communiquer avec les différents appareils servant à la capture des données. NI-DAQ se doit donc d'être installé correctement sur le système utilisé, sans quoi les VIs ne pourront pas être exécutés. La figure suivante résume la relation existante entre les VIs, les drivers de NI-DAQ et les cartes d'acquisition de données.

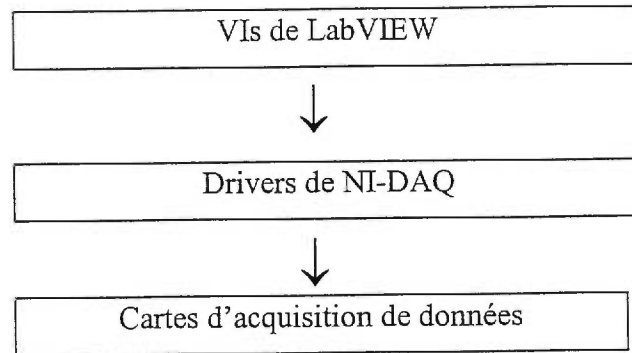


Figure 15_Relation entre LabVIEW, NI-DAQ et les cartes d'acquisition de données²²

2.2.4 Le constructeur d'application

Même si LabVIEW est un environnement de programmation, ses VIs ne peuvent pas être exécutés sur un ordinateur où LabVIEW n'est pas installé. Ceci pose un certain problème : il faut installer LabVIEW sur chaque ordinateur contrôlant un instrument, et il faut posséder légalement une copie de LabVIEW pour chaque appareil. Aussi, les ordinateurs branchés sur l'instrumentation à utiliser peuvent ne pas tous être assez puissants pour utiliser LabVIEW.

LabVIEW est en effet un environnement de programmation demandant un ordinateur relativement puissant. Un processeur Pentium est de mise. Pour les projets d'envergure (comme celui du contrôle et de l'acquisition de données pour le Pine AFCBP1 présenté plus loin), un minimum de 16 mégaoctets de mémoire vive

est fortement à conseiller. L'installation complète du logiciel est très gourmande pour l'espace-disque; environ 40 mégaoctets sont requis.

National Instruments a mis sur le marché un module nommé constructeur d'application (Application Builder) permettant de corriger en partie ces lacunes. Le constructeur d'application permet de rendre un VI exécutable sans l'aide de LabVIEW. Pour les concepteurs de VI visant des applications commerciales, il devient donc possible de vendre un produit conçu à l'aide de LabVIEW sans forcer les acheteurs potentiels à se procurer LabVIEW. NI-DAQ est toujours requis, mais on peut l'obtenir sans frais directement de National Instruments. Un autre avantage à utiliser le constructeur d'application est que les VIs s'exécutent plus rapidement une fois convertis en applications.

2.3 Ce qu'il faut savoir pour programmer le bipotentiostat Pine AFCBP1

2.3.1 Introduction

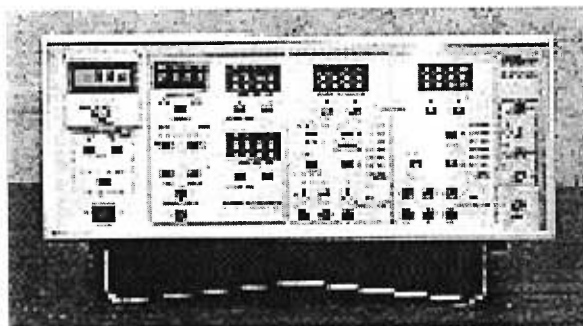


Figure 16_ Bipotentiostat AFCBP1 de Pine²³

Le Pine AFCBP1 (Pine Instrument Co., Grove City, PA, USA) est un potentiostat très performant, principalement pour les raisons qui suivent.

Le balayage est réellement analogue. L'instrumentation de volt-ampérométrie cyclique moderne utilise des balayages digitaux dans la quasi-totalité des cas pour simuler des balayages linéaires. Les balayages digitaux ne peuvent générer de vraies ondes triangulaires ; les segments ne sont pas linéaires mais bien « en escalier ».

Des écarts par rapport à la réponse de courant prévue par les théories électrochimiques seront observées; à vitesse de balayage élevée, ces écarts peuvent devenir importants, le rapport $\Delta E / \Delta t$ devenant plus important. Le bipotentiostat AFCBP1 possède un générateur d'onde analogue permettant d'obtenir des segments parfaitement linéaires.²⁴

Le bipotentiostat permet de contrôler simultanément deux électrodes de travail. Ceci permet d'effectuer un nombre important d'expériences impossibles à réaliser à l'aide d'un potentiostat utilisant une seule électrode de travail. On peut par exemple effectuer une réaction à une des électrodes de travail, maintenue à potentiel constant, puis analyser par électrochimie à l'autre électrode de travail le produit de cette réaction en effectuant un balayage de volt-ampérométrie cyclique. On peut également utiliser les deux sorties du potentiostat pour contrôler une électrode à disque rotatif.²⁵

Un logiciel pour contrôler l'instrument est disponible de Pine. Celui-ci a cependant la réputation d'être difficile à utiliser et peu performant. De plus, il est vendu à prix prohibitif. Pour ces raisons, il est apparu important à notre groupe de recherche de développer notre propre logiciel pour le contrôle, l'acquisition ainsi que le traitement des données obtenues du Pine AFCBP1. La conception de notre logiciel a été effectuée en fonction des objectifs suivants:

- création d'un système simple d'utilisation
- coût de développement modeste par rapport au prix du logiciel commercial

- possibilité de développer des fonctions pour répondre à des besoins spécifiques de notre laboratoire, notamment des opérations de traitement de données.

Pine met de la documentation technique à la disposition des gens désirant développer leur propre logiciel.²⁶ Cette documentation indique sommairement comment utiliser une carte d'acquisition de données pour communiquer avec le AFCBP1. La section suivante décrit brièvement les étapes à accomplir pour communiquer avec le AFCBP1, ainsi que les périphériques (hardware) nécessaires.

2.3.2 Carte d'acquisition de données

La carte d'acquisition de données (ou DAQ) sert non seulement à acquérir les données du bipotentiostat, mais aussi à envoyer de l'ordinateur au potentiostat les données requises pour définir un balayage. Pour effectuer le lien entre le bipotentiostat et l'ordinateur, la carte doit posséder les caractéristiques suivantes:

- Elle doit posséder au moins huit canaux d'entrée (convertisseurs analogue à digital - ADC), pour acquérir les données provenant du AFCBP1 (le courant à chacune des électrodes de travail étant les deux signaux les plus importants). Les signaux analogues sont ici convertis en signaux digitaux pouvant être traités par l'ordinateur.
- Elle doit posséder au moins deux canaux de sortie (convertisseurs digital à analogue - DAC). Ceux-ci sont utilisés pour ajouter un potentiel de décalage aux électrodes de travail. Les potentiels digitaux demandés par l'ordinateur sont ici convertis en signaux analogiques pour pouvoir être appliqués aux électrodes par le bipotentiostat.
- Elle doit posséder au moins 8 lignes digitales, qui servent à communiquer avec le microprocesseur du AFCBP1. C'est à l'aide de ces lignes que toutes les données définissant l'état du potentiostat, notamment le balayage, sont envoyées au

AFCBP1. Ces mêmes lignes servent également à recevoir un message de réponse du AFCBP1.

- Elle doit posséder des compteurs, qui permettent d'effectuer des impulsions rapides. Ces impulsions seront utilisées pour dire au AFCBP1 que les lignes digitales sont prêtes à être lues.

La carte AT-MIO-16E-10 de National Instruments a été utilisée, étant donné qu'elle possède toutes les caractéristiques requises pour communiquer avec le AFCBP1.

2.3.3 Communication digitale entre le AFCBP1 et l'ordinateur

Cette section donne un aperçu de la communication digitale entre le AFCBP1 et un ordinateur. Cette communication est effectuée via les lignes digitales présentes sur une carte d'acquisition de données. Ces lignes sont utilisées dans un premier temps pour envoyer les données définissant l'état du potentiostat au microprocesseur 8032 CPU du AFCBP1. Ces mêmes lignes sont utilisées par la suite pour transmettre un message de réplique du bipotentiostat à l'ordinateur. Ce message de réplique a pour objectif principal la confirmation du succès de la transmission des paramètres vers le bipotentiostat.

Cette approche pour communiquer avec un instrument n'est pas idéale; en effet, beaucoup d'instruments utilisent aujourd'hui des normes telles GPIB ou VISA²⁷. Celles-ci permettent, à l'aide de cartes de contrôle appropriées, d'envoyer des commandes simples en ASCII pouvant être comprises par les instruments. Il est déplorable que Pine n'ait pas utilisé de telles conventions. La tâche consistant à écrire un logiciel de contrôle pour le AFCBP1 devient beaucoup plus complexe et laborieuse.

Voyons plus en détails comment les paramètres sont transmis de l'ordinateur jusqu'au AFCBP1. Le micro-processeur du AFCBP1 attend les données définissant l'état du potentiostat dans un ordre donné. Cet ordre est spécifié dans la documentation technique fournie par Pine. Prises ensembles, ces variables définissent complètement le comportement du potentiostat, notamment les réglages du générateur d'onde analogue: potentiel initial et final, bornes, nombre de segments, vitesses de balayage anodiques et cathodiques, à quelle(s) électrode(s) appliquer le balayage, etc. En tout, un total de 31 variables sont envoyées au Pine à chaque balayage. Ces variables sont des valeurs entières longues (16 bits). Comme la carte ne possède que 8 entrées / sorties digitales, l'envoi de chaque variable nécessite deux transmissions. À chaque fois qu'un nouveau octet (8 bits) est écrit sur les lignes digitales pour être lu du potentiostat, un des compteurs de la carte doit envoyer une impulsion bas-à-haut d'une durée de 95 μ s sur une ligne spéciale d'entrée du potentiostat. Une pause d'au moins 5 μ s doit séparer la transmission de deux octets.

Le microprocesseur Intel de l'ordinateur utilisé store ses intégrales de 16 bits avec l'octet le moins significatif en premier. Le microprocesseur 8032 CPU utilise la convention opposée: il store l'octet le plus significatif en premier. Pour chaque variable de 16 bits à transmettre, l'inversion des deux octets doit être effectuée.

Illustrons les étapes à accomplir pour transmettre un nombre jusqu'au bipotentiostat à l'aide d'un exemple. Supposons qu'on veuille transmettre le nombre 20. Sa représentation binaire est la suivante:



Figure 17_ Représentation binaire du nombre 20.

Ce nombre a comme octet le moins significatif 00010100, et a 00000000 comme octet le plus significatif. Il faudra donc transmettre, dans l'ordre, 00000000 et 00010100, pour que le microprocesseur interprète correctement le nombre comme étant 20. Cet ordre est contraire à celui utilisé par le microprocesseur de l'ordinateur ; il faut donc prévoir une inversion des deux octets avant l'envoi.

Un calcul nommé CRC checksum est effectué pour s'assurer qu'il n'y a pas d'erreur dans l'envoi des données. Le calcul est donc effectué à l'aide de l'ensemble des variables envoyées au potentiostat (62 octets); son résultat est une variable de 16 bits, donc de 2 octets. Celle-ci est envoyée au potentiostat à la suite des 62 octets. L'envoi total est de 64 octets. Le microprocesseur du bipotentiostat calcule lui-même un checksum à partir des 62 premiers octets qui lui parviennent. La valeur devrait correspondre à celle transmise par les octets 63 et 64.

Une fois toutes les données envoyées au potentiostat, son microprocesseur envoie un message de réplique, composé de 8 octets, vers la carte. La partie importante du message de réplique est un code indiquant si la transmission a été réussie (si les checksums sont concordants) ou non. À chaque fois qu'un nombre est prêt à être lu par la carte d'acquisition de données, une impulsion est envoyée par le AFCBP1 à la carte.

La première variable envoyée au Pine (premier deux octets) est spéciale: elle détermine l'action globale à effectuer par le bipotentiostat. Trois commandes sont possibles: Stop (en envoyant le nombre 20), Idle (en envoyant 255) et Start (en envoyant 10). La commande Stop sert à arrêter un balayage du AFCBP1 (s'il y en a un en cours). La commande Idle sert à modifier les valeurs définissant le balayage, sans pour autant l'arrêter. Il est donc possible, en cours de balayage, de modifier la vitesse de balayage, le potentiel des bornes, etc., comme si le potentiostat était opéré de façon manuelle. La commande Start sert à amorcer un balayage, mais des précisions s'imposent.

À cause de certains problèmes reliés à la mémoire morte du AFCBP1, la commande Start n'est pas interprétée de façon consistante par l'appareil. Parfois le balayage ne commence tout simplement pas, ou les bornes ne sont pas respectées. On a déterminé que la meilleure façon de contrôler le Pine de façon reproductible est d'envoyer en premier lieu une commande Stop pour arrêter tout balayage en cours. Il convient ensuite d'envoyer une commande Idle avec toutes les autres variables définies avec les valeurs du balayage à effectuer. La commande Start peut alors finalement être envoyée. Même si la documentation technique de Pine n'en faisait pas mention, on a déterminé qu'une pause qu'au moins une-demie seconde était nécessaire entre chaque envoi pour que la communication soit comprise du potentiostat de manière reproductible.

Les variables envoyées au potentiostat doivent tenir compte d'un certain nombre de contraintes additionnelles, qui varient selon leur nature. Ainsi, on doit s'assurer que les variables définissant les vitesses (en mV / s) de balayages anodiques et cathodiques soient des multiples de 5. Le potentiel final se doit d'être compris entre les bornes du balayage.

2.3.4 Communication analogue entre le AFCBP1 et l'ordinateur

Comme mentionné plus haut, deux canaux DAC de la carte sont utilisés pour appliquer un potentiel de décalage aux électrodes de travail 1 et 2. L'utilisation d'un potentiel de décalage est très important, Pine recommandant fortement d'utiliser un potentiel initial de 0 V pour le balayage analogue en tout temps. En modifiant les bornes, ainsi que le potentiel final, pour tenir compte d'un potentiel de décalage, il devient possible d'effectuer des balayages à partir de potentiels autres que 0 V.

L'acquisition des données est une partie importante du logiciel à concevoir. 8 lignes ADC sont utilisées pour transmettre à l'ordinateur les données expérimentales relatives au balayage en cours. Les quatre canaux les plus importants permettent de savoir à quels potentiels sont maintenues les électrodes K1 et K2 (incluant un éventuel décalage), et à indiquer le courant leur correspondant. Un canal est utilisé pour indiquer à quel potentiel se situe le générateur analogue du AFCBP1 (qui diffère du potentiel des électrodes K1 et K2 par le potentiel de décalage leur étant appliqué). Deux canaux sont utilisés pour vérifier si le potentiostat est en surcharge. La surcharge (overload) peut survenir dans plusieurs conditions: sensibilité trop grande pour le courant mesuré, impédance trop grande entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire (peut être causée par des bulles d'air sur les électrodes). Comme cette surcharge peut endommager les électrodes et / ou le potentiostat, on a intérêt à ce que le programme surveille les canaux analogues pour détecter cette condition, indiquant à l'utilisateur qu'une surcharge a lieu afin qu'il puisse stopper le balayage s'il le désire. Le potentiel des deux canaux indicateurs de surcharge se doit d'être compris dans un intervalle donné. Si une valeur lue est à l'extérieur de l'intervalle normal de potentiel, il y a surcharge. Le huitième canal utilisé donne le potentiel auquel le balayage analogue se dirige: celui-ci correspond à une des bornes du balayage. Ce canal peut être utilisé pour déterminer avec précision le moment où le balayage change de direction.

2.4 Programme de contrôle ABC pour le bipotentiostat AFCBP1

2.4.1 Aperçu des caractéristiques du programme

Le programme de volt-ampérométrie cyclique ABC, pour Analog-Bipotentiostat Control Software, conçu dans notre laboratoire pour fonctionner avec le

bipotentiostat AFCBP1 de Pine, est innovateur à plusieurs égards sur les autres programmes de volt-ampérométrie cyclique disponibles sur le marché. ABC est extrêmement simple d'utilisation. L'interface développée pour le contrôle de l'appareil est très similaire à l'opération de l'appareil en mode manuel ou « stand-alone », c'est-à-dire sans contrôle informatique. On opère ABC de la même manière que le potentiostat : le panneau avant du VI principal d'ABC est très similaire au panneau avant du Pine AFCBP1. Une personne sachant opérer le potentiostat en mode manuel n'aura besoin que de quelques minutes pour maîtriser ABC. C'est une innovation importante par rapport à la plupart des logiciels existants. Même le logiciel du système professionnel BAS-100B/W ne possède pas une interface aussi intuitive que celle d'ABC, l'utilisateur ayant à utiliser plusieurs menus pour entrer les paramètres relatifs au balayage. La plupart des autres logiciels utilisés sur des appareils potentiostatiques moins récents ont une interface encore moins intéressante, certains fonctionnant encore sur MS-DOS.

Les possibilités offertes par ABC ne se limitent pas seulement au contrôle de l'instrument; l'acquisition de données y est possible en temps réel. Cette acquisition peut être effectuée sur une ou l'autre des électrodes de travail, ou encore sur les deux en même temps. Le ou les voltamogrammes s'affichent à l'écran à mesure que les données sont captées. Un indicateur de surcharge s'allume en tout temps si une des électrodes entre en condition de surcharge. Il est possible d'interrompre un balayage dont les paramètres mal sélectionnés causeraient une condition de surcharge.

La sauvegarde des données est évidemment essentielle; ABC permet de l'effectuer. La sauvegarde des données permet d'enregistrer tout ce qui est visible sur le panneau avant du VI principal, soient les contrôles définissant le balayage, le ou les volt-ampérogrammes obtenus ainsi que les commentaires que l'utilisateur peut inclure (par exemple la concentration et la nature de la solution utilisée, l'électrode utilisée, son diamètre, etc.). Réunir toutes ces informations dans une même fenêtre peut

aider le chercheur à tirer facilement des conclusions à partir de l'expérience effectuée; le recours aux notes manuscrites expliquant les conditions de chaque balayage est révolu.

L'exportation de données est possible avec ABC, comme dans la plupart des logiciels d'acquisition de données. ABC permet d'exporter les données correspondant à un balayage en format ASCII. Ce format peut ensuite être importé par un grand nombre de logiciels, notamment Origin de Microcal et Excel de Microsoft. On peut alors utiliser ces logiciels pour effectuer du traitement de données à sa guise. Il est à noter que l'exportation n'est souvent pas nécessaire, ABC contenant des outils puissants pour déterminer l'aire sous une courbe et la hauteur des pics permettant de prendre ces mesures en éliminant facilement l'apport du courant de charge présent en volt-ampérométrie cyclique.

Le fonctionnement du module de traitement de données d'ABC est très simple et intuitif. On choisit le segment du voltamogramme à analyser, puis on trace la ligne de base (correspondant au courant de charge) à l'aide d'une interface graphique. ABC indique ensuite la hauteur et l'aire du pic considéré ainsi que sa position (en mV). La location du pic considéré est clairement indiquée, directement sur le volt-ampérogramme, au même moment où la ligne de base est tracée.

2.4.2 Contrôle du Pine AFCBP1 à l'aide de ABC

2.4.2.1 Approche utilisée par ABC pour communiquer avec le AFCBP1

Les diagrammes-bloc de ABC (équivalents au code-sources des langages de programmation textuels) sont disponibles dans les laboratoires du professeur Leech. On livre ici un très bref résumé de l'approche utilisée pour communiquer avec le

AFCBP1; ceci n'est inclus que pour donner une idée des stratégies utilisées pour effectuer le contrôle et l'acquisition de données du potentiostat. Le mode d'emploi du logiciel et un aperçu de ses possibilités sont donnés plus loin.

Une vérification est tout d'abord effectuée pour s'assurer que les données que l'utilisateur veut transmettre au Pine définissant l'état du potentiostat sont raisonnables et conviennent aux normes et contraintes fixées par Pine. ABC vérifie par exemple si le potentiel final est compris entre les bornes du balayage et si la borne supérieure demandée est à un potentiel plus grand que la borne inférieure. Beaucoup d'autres conditions sont évaluées; les valeurs permises pour chaque variable seront mentionnées plus loin.

Lorsque l'utilisateur choisit d'envoyer une commande (start, stop ou idle) au potentiostat et que toutes les variables sont valides, le programme prépare l'envoi des 64 octets requis. Pour ce faire, il prépare tout d'abord les 62 octets définissant complètement l'état du AFCBP1. Les inversions d'octets sont effectuées ici. Un calcul du CRC checksum est ensuite effectué. Les 64 octets sont finalement envoyés au potentiostat. Les potentiels de décalage à appliquer aux électrodes K1 et K2 sont appliqués sur les lignes DAC (digitale à analogue) appropriées au moment où les 64 octets sont envoyés.

La recommandation de Pine concernant le potentiel de départ du balayage analogue a été suivie: le potentiel analogue du générateur d'onde est toujours de 0 V. Comme on veut souvent débiter un balayage à un potentiel autre que 0 V, ABC calcule un potentiel de décalage à appliquer aux électrodes de travail pour que le balayage commence au potentiel voulu. Les bornes et le potentiel final sont également ajustés. Par exemple, pour un balayage allant de -300 mV jusqu'à 700 mV, ABC commande au Pine d'effectuer un balayage de 0 V jusqu'à 1000 mV, et d'appliquer un potentiel de décalage de -300 mV à l'électrode de travail utilisée.

Une fois les octets envoyés, une reconfiguration est rapidement effectuée pour pouvoir lire le message de réplique du AFCBP1. Celui-ci est analysé pour vérifier si la communication a été réussie (checksum concordants). Si le message indique que la communication est valide, ABC poursuit son exécution normale. Dans le cas d'un checksum incorrect, le programme tente d'envoyer les données à nouveau, jusqu'à ce qu'un nombre maximum d'essais soit atteint (nombre spécifié par l'utilisateur), ou jusqu'à ce que le message de réplique du AFCBP1 indique le succès de la communication.

Si une acquisition de données à l'électrode de travail K1 et / ou K2 est désirée, ABC commence ensuite à acquérir les données et à les afficher à l'écran en temps pseudo-réel. Des signaux analogiques correspondant aux paramètres suivants sont acquis : les potentiels appliqués à l'électrode(s) de travail utilisée(s), la réponse de courant lui (ou leur) étant associé, ainsi que les signaux pouvant indiquer les surcharges. La technique d'acquisition de données utilisée permet d'acquérir une partie des données dans un tampon. Une partie de ce tampon est lue au même moment où d'autres données sont acquises. Les opérations requises pour présenter les données lues en volt-ampérogramme (courant en fonction de potentiel) sont effectuées. Une analyse est effectuée pour vérifier si le potentiostat est en surcharge.

2.4.2.2 Exigences minimales pour exécuter ABC

Pour que ABC fonctionne convenablement, les conditions suivantes doivent être réunies:

ABC requiert Windows 95 comme système d'opération. L'ordinateur utilisé doit posséder un processeur 486 (ou mieux), au moins 8 megaoctets de mémoire vive, et environ 10 megaoctets d'espace-disque disponible... LabVIEW étant

multienvironnements, le programme pourrait éventuellement être adapté après modifications mineures pour fonctionner dans d'autres environnements (par exemple sous MacOS ou UNIX).

Une carte d'acquisition de données doit faire le lien entre l'ordinateur et le Pine AFCBP1 (voir section « carte d'acquisition de données » pour les normes minimales associées à la carte). ABC peut être utilisé avec pratiquement toutes les cartes disponibles de National Instruments. La carte utilisée par notre laboratoire est la AT-MIO-16E-10 de National Instruments, qui répond à toutes les exigences requises. NI-DAQ (version 5.1 ou ultérieure) doit être installé correctement.

2.4.2.3 Fonctionnement d'ABC

Pour que le contrôle informatique du AFCBP1 soit possible, il doit évidemment être sous tension. Le bipotentiostat doit être en mode « External » (pour contrôle externe) et non en mode « Manual » (pour contrôle manuel). Le mode « Manual » est utilisé lorsque le potentiostat n'est pas sous contrôle informatique, lorsqu'il est utilisé en conjonction avec une table traçante par exemple.

Le logiciel peut être exécuté à partir de Windows de la manière habituelle. Après un certain temps attribué au chargement, la fenêtre principale du programme apparaît (page suivante):

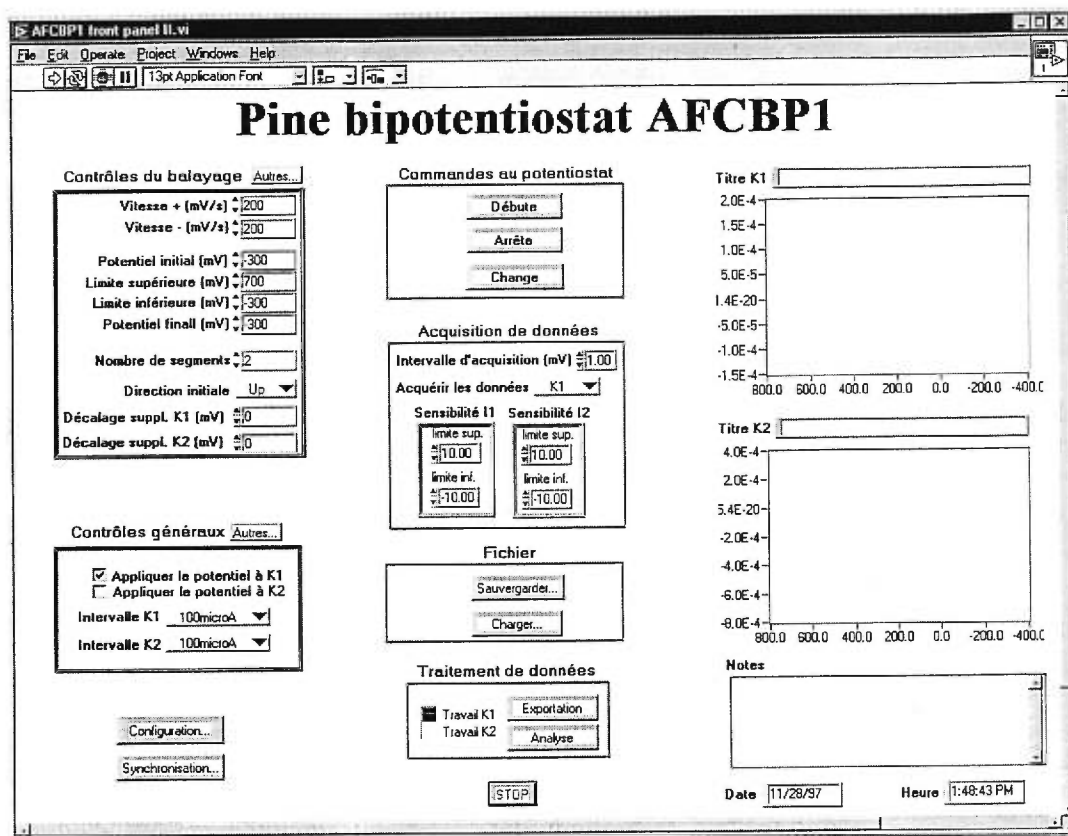


Figure 18_ Panneau avant virtuel du Pine AFCBP1

Une description détaillée de chacun des contrôles disponibles à l'utilisateur pour définir un balayage suit. Les descriptions incluent les limitations propres à chaque contrôle. Il n'est pas nécessaire cependant d'entrer uniquement les valeurs permises, ABC tronquant une éventuelle valeur illégale vers la valeur permise la plus proche, ou donnant un message d'avertissement.

2.4.2.3.1 Configuration

On doit configurer correctement ABC lors de la première exécution sur un nouvel ordinateur ou encore avec une nouvelle carte. Le bouton « Configuration » du panneau avant est disponible à cette fin. La boîte de dialogue suivante apparaît :

Identification de la carte (device #)

Compteur pour envoyer les impulsions

Compteur pour recevoir les impulsions

Pause entre les envois de données (msec)

Nombre maximum d'essais

Ne pas lire le message de réplique du AFCBP1

OK Annuler

Figure 19_ Boite de dialogue de configuration

Voici la description des options à configurer:

Identification de la carte (device #). Le numéro entré ici doit correspondre à celui attribué à la carte d'acquisition de données par NI-DAQ.

Compteur pour envoyer les impulsions. Le compteur utilisé pour envoyer les impulsions lors de l'envoi de chaque octet est nommé ici. Un chiffre est désigné habituellement par ce compteur, mais pour certaines cartes des lettres peuvent être utilisées. La valeur par défaut de ce contrôle est 1 (compteur utilisé par la carte AT-MIO-16E-10).

Compteur pour recevoir les impulsions. Le compteur utilisé pour recevoir les impulsions indiquant qu'un octet envoyé par AFCBP1 est présent sur les lignes digitales est nommé ici. La valeur par défaut de ce contrôle est 0 (compteur utilisé par la carte AT-MIO-16E-10).

Pause entre les envois de données. Comme expliqué précédemment, 3 envois successifs de 64 octets sont requis pour amorcer un balayage. Une pause entre chaque envoi est requise. Cette période donne le temps au Pine de se configurer, selon les valeurs transmises. La durée de cette pause est spécifiée ici. La valeur par

défaut de cette option est de 500 ms, cette valeur fonctionnant bien sur notre système.

Nombre d'essais maximum. Donne le nombre maximum d'essais de communication pour un envoi donné à effectuer par le programme. Une fois ce nombre atteint, le programme renvoie un message d'erreur. Un essai échoue lorsque le message de réponse du potentiostat est absent ou incomplet (<8 octets), ou lorsqu'il indique une erreur dans le CRC checksum (erreur de communication). La valeur par défaut de ce contrôle est de 3.

Ne pas lire le message de réplique de AFBCP1. Lorsque cette option est cochée, ABC ne tente pas de lire le message de réponse du potentiostat et assume le succès de la transmission. Cette option est utile uniquement lorsqu'on utilise un ordinateur trop lent (486 avec peu de mémoire vive) pour reconfigurer les lignes digitales assez rapidement de la carte en mode lecture pour capter la réplique du potentiostat. Pour la transmission des 64 octets d'informations du AFBCP1, les lignes digitales sont en mode écriture. Pour capter le message de réplique du AFBCP1, elles doivent être reconfigurées en mode lecture. Si cette reconfiguration est trop lente, le VI risque d'indiquer une erreur de communication même si la transmission a été réussie. Cette option n'est pas activée par défaut.

2.4.2.3.2 Synchronisation

Les réglages de synchronisation sont utilisés pour que l'acquisition de données puisse être correctement synchronisée avec le balayage analogique du AFBCP1. Il est possible que plusieurs variables doivent être changées pour que la synchronisation soit acceptable sur un nouveau système. Ces variables peuvent être changées en cliquant sur le bouton « synchronisation » de la fenêtre principale de ABC.

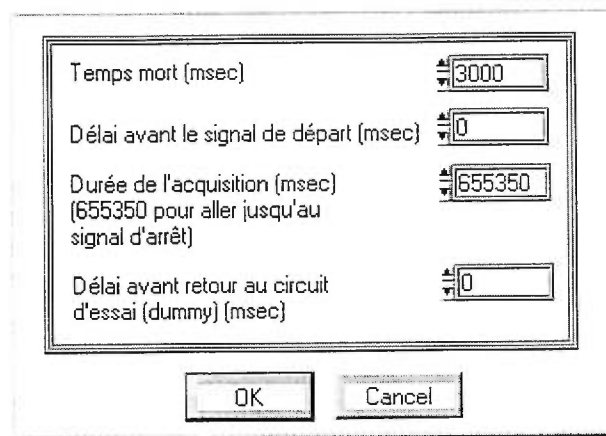


Figure 20_ Boite de dialogue de synchronisation

Les contrôles suivants sont disponibles :

Temps mort. Ce contrôle spécifie le temps mort utilisé (en msec). C'est la période de temps précédant le balayage. Durant cette période, l'électrode est maintenue au potentiel initial utilisé pour le balayage. Cette variable peut être changée par intervalles de 10 msec. Il convient en général d'utiliser un temps mort correspondant à quelques secondes pour une raison technique : le Pine AFCBP1 envoie un signal de départ (synchronisé habituellement avec le balayage, à moins que certaines options décrites plus bas ne soient pas fixées aux valeurs par défaut); si ce signal est envoyé trop rapidement après l'envoi des 64 octets d'information, le logiciel rate le signal de départ et aucune acquisition de données n'est effectuée. Cette situation se présente habituellement dans la première exécution du programme; celle-ci est plus lente parce que LabVIEW doit allouer la mémoire requise pour l'exécution du VI. Le temps mort maximum qu'on peut allouer est de 10 minutes ou 600 000 msec. Si une valeur de 655 350 est utilisée pour ce contrôle (valeur déterminée par Pine), la cellule n'est jamais remise en mode d'essai. La valeur par défaut du temps mort est de 3000 msec.

Délai avant le signal de départ. Ce contrôle spécifie le délai entre le moment où le balayage analogique débute et l'envoi du signal de départ. La valeur par défaut de 0, synchronisant balayage et acquisition, est à utiliser habituellement.

Durée de l'acquisition. Le AFCBP1 envoie un signal d'arrêt un certain temps après son signal de départ. ABC utilise ce signal d'arrêt pour stopper l'acquisition de données. Lorsque ce contrôle est réglé à 655 350 (valeur déterminée par Pine), le AFCBP1 envoie son signal d'arrêt au moment où s'arrête le balayage. Si le contrôle est réglé à une valeur autre que 655 350, alors celle-ci représente le temps séparant le signal d'arrêt du signal de départ. La valeur par défaut de ce contrôle est 655 350. D'autres valeurs pourraient éventuellement être utilisées si on voulait effectuer des expériences où l'acquisition de données ne se limiterait pas à la durée du balayage analogue.

Délai avant retour au circuit d'essai (dummy). Ce contrôle précise le délai (en msec) entre la fin du balayage analogique et le moment où la cellule est mise en mode d'essai. Les électrodes du AFCBP1 peuvent être en mode normal, où le potentiel est appliqué aux deux électrodes de travail, ou encore en mode dummy, où le potentiel est simplement appliqué aux bornes d'une résistance interne du AFCBP1. Le circuit d'essai, souvent appelé dummy, est utilisé pour éviter tout dommage aux électrodes, surtout lorsqu'on effectue des branchements.. Une valeur de 655 530 pour ce contrôle indique que le circuit ne changera jamais vers le mode d'essai. Ce contrôle peut être modifié par intervalles de 10 msec. La valeur par défaut est de 0 msec.

2.4.2.3.3 Contrôles du balayage

Ces contrôles sont utilisés pour définir le balayage à effectuer par le AFCBP1. La plupart de ces contrôles sont accessibles directement dans la fenêtre principale du

programme. Les contrôles utilisés moins fréquemment sont accessibles en cliquant sur le bouton Autres...

Vitesse + et Vitesse -. Ces contrôles numériques sont utilisés pour définir les vitesses de balayages anodiques et cathodiques (en mV / s). Les valeurs des vitesses de balayage ne doivent pas être nulles et doivent être un multiple de 5. La vitesse maximale de balayage est de 9995 mV / sec, donc environ 10 V / sec. La valeur de balayage la plus lente disponible est de 5 mV / sec. On peut cependant mentionner qu'il est possible, en changeant des résistances internes du AFCBP1, de ralentir les vitesses de balayage.

Potentiel initial. Ce contrôle détermine à quel potentiel initial (en mV) les électrodes de travail seront maintenues au début du balayage. ABC applique le potentiel initial aux électrodes voulues en ajoutant un potentiel de décalage.

Limite inférieure. Détermine la valeur de la limite inférieure (en mV) du balayage. Celle-ci peut être comprise entre -9995 et 9995 mV, et doit d'être inférieure à la limite supérieure d'au moins 10 mV.

Limite supérieure. Détermine la valeur de la limite supérieure du balayage (mV). Elle se doit d'être comprise entre -9995 et 9995 mV, et elle doit être supérieure à la limite inférieure d'au moins 10 mV.

Potentiel final. Détermine le potentiel (en mV) auquel le balayage s'arrête, une fois que le nombre de segments requis a été balayé. Le potentiel final correspond habituellement à une des deux bornes de balayage. On peut fournir une valeur autre que celles des bornes, en autant que celle-ci soit comprise dans la fenêtre de potentiel balayée.

Nombre de segments. Ce contrôle numérique permet de déterminer le nombre de segments à balayer. Pour obtenir un voltammogramme complet, deux segments sont requis. Toute valeur entre 0 et 60 000 segments est permise (0 est la valeur à utiliser si on ne veut pas effectuer de balayage).

Direction initiale. Ce contrôle indique la direction initiale du balayage analogique du AFCBP1, vers le haut (vers les potentiels plus positifs) ou vers le bas (vers les potentiels plus négatifs). La direction initiale doit être concordante avec les potentiels initiaux et les bornes choisies.

Décalage supplémentaire à K1 et à K2. Ces deux contrôles servent à appliquer un potentiel de décalage supplémentaire aux électrodes de travail. Ces contrôles peuvent être utiles si on veut que des balayages simultanés sur les électrodes K1 et K2 soient faits à des potentiels différents. Aussi, ils peuvent servir à maintenir une des deux électrodes à un potentiel constant (ce potentiel sera la somme du décalage supplémentaire et du potentiel initial) alors que l'autre électrode effectue un balayage défini par les paramètres usuels.

Les contrôles de balayages suivants étant moins souvent utilisés, ils sont accessibles en cliquant sur le bouton Autres... La boîte de dialogue de la page suivante devient active.

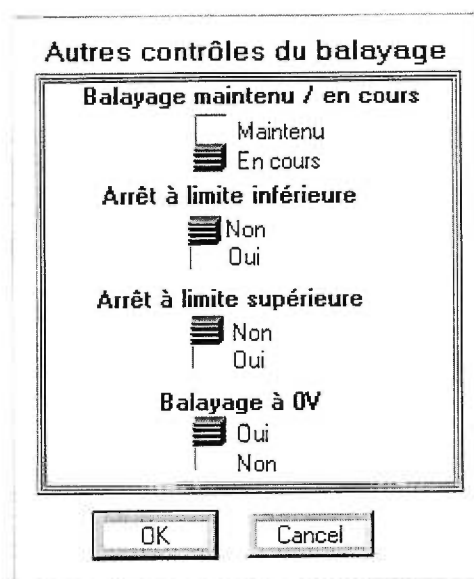


Figure 21_ Autres contrôles du balayage

La description de chaque contrôle de cette boîte de dialogue est disponible au laboratoire du Professeur Leech.

2.4.2.3.4 Contrôles généraux

Les contrôles généraux déterminent l'état général du potentiostat, mais ils ne sont pas impliqués directement dans la définition du balayage analogique. Les contrôles suivants sont accessibles directement depuis la fenêtre principale du programme :

Appliquer le balayage à K1 et **Appliquer le balayage à K2**. Pour que le potentiel généré par le générateur d'onde analogique soit appliqué respectivement aux électrodes K1 et / ou K2, leur case de dialogue respective doit être cochée. Si une des deux électrodes doit être maintenue à un potentiel constant, la case lui correspondant ne doit pas être cochée.

Intervalle K1 et **Intervalle K2**. Ces menus déterminent quelle résistance interne sera utilisée par le AFCBP1 pour chacune des électrodes de travail. Le potentiel analogique correspondant au courant de chaque électrode de travail est obtenu par le produit du courant mesuré par la résistance interne choisie. Ce potentiel est acquis

par l'ordinateur au cours de l'acquisition de données. ABC divise ensuite le potentiel mesuré par la résistance utilisée pour redonner le courant. 7 sensibilités sont disponibles, allant de 100 mA / V jusqu'à 100 nA / V. On peut augmenter encore plus la sensibilité en changeant la résistance utilisée sur la carte d'acquisition de données; ce point sera couvert plus loin.

En cliquant sur Autres... on accède aux contrôles généraux qui sont moins souvent utilisés. Leur description est disponible au laboratoire du Professeur Leech.

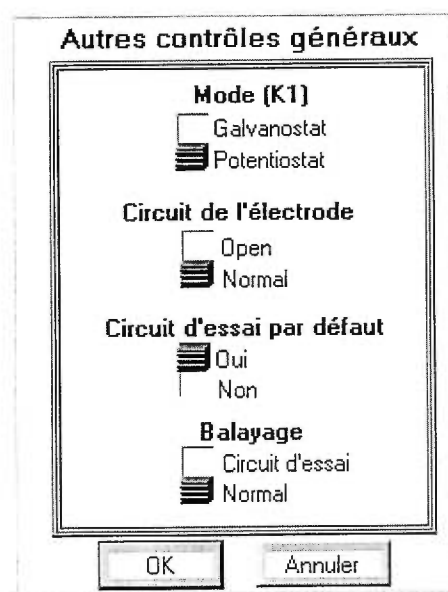


Figure 22_ Autres contrôles généraux

2.4.2.3.5 Contrôle de l'acquisition de données

Les contrôles suivants doivent être réglés correctement avant que toute acquisition de données ne soit effectuée :

Intervalle d'acquisition. Ce contrôle spécifie l'intervalle (en mV) entre chaque point de l'acquisition de données à sauvegarder et à afficher sur le voltampérogramme. Chaque point sauvegardé est en réalité une moyenne d'un plus

grand nombre de points, tel qu'expliqué ci-dessous. On a intérêt à utiliser un intervalle d'acquisition faible, pour avoir le plus grand nombre possible de points expérimentaux. La taille des fichiers sauvegardés sera alors importante. Il pourrait aussi être difficile à ABC d'afficher les données acquises en temps réel, le temps requis pour les traiter à mesure qu'elles arrivent devenant rapidement trop grand. Habituellement, un intervalle d'acquisition de 1 mV ou même de 5 mV est amplement suffisant pour avoir un nombre de points suffisant.

Le mode d'acquisition utilisé par ABC utilise un tampon (zone de mémoire pour stocker les données temporairement) pour permettre une vitesse d'acquisition suffisante. Chaque point sauvegardé et affiché de l'acquisition est la moyenne de plusieurs valeurs acquises. ABC configure la carte d'acquisition de données pour qu'habituellement 500 points à la seconde soient acquis. Des moyennes sont calculées à intervalles donnés pour ne pas afficher (et éventuellement sauvegarder) un trop grand nombre de points. Prenons l'exemple d'un balayage à 100 mV / s, avec un intervalle d'acquisition de 5 mV. Dans ce cas, un point sera affiché à chaque 5/100 de seconde, donc à chaque 0.02 seconde. Durant cette période, un total de $500 * 0.02 = 100$ points auront été acquis. Le point affiché sera donc la moyenne de ces 100 points.

Acquisition de données. Ce contrôle permet de déterminer de quelle(s) électrode(s) les données seront acquises. On peut choisir du menu l'électrode de travail K1, l'électrode de travail K2, les deux simultanément ou encore aucune des deux.

Étendue I1 et Étendue I2. Ces contrôles numériques permettent de spécifier l'étendue (range) des voltages proportionnels aux courants aux électrodes de travail K1 et K2 pouvant être acquis sur la carte d'acquisition de données. L'étendue est définie en spécifiant les voltages minimums et maximums à acquérir. On peut spécifier en théorie n'importe quel maximum et minimum. Les choix sont limités

en pratique cependant par le nombre d'étendues distinctes disponibles sur la carte d'acquisition de données. Le choix de sensibilités disponibles varie selon les cartes.

Pour la carte AT-MIO-16E-10, les étendues suivantes sont disponibles²⁸:

±10 V
±5 V
±2.5 V
±1 V
±500 mV
±250 mV
±100 mV
±50 mV

On peut aussi opérer la carte en mode unidirectionnel, qui donne toujours 0 V comme potentiel minimum de l'étendue. Cependant, étant donné que les courants mesurés en électrochimie peuvent être négatifs ou positifs, on opère toujours en mode bidirectionnel.

Il est important de comprendre qu'un choix approprié d'étendue peut faire la différence entre une expérience avec beaucoup de bruit et une autre où il est minimisé. La résolution de la conversion ADC (analogue vers digitale) est de 12 bits. La précision maximale est donc de 1 partie par 4096 (2 à la puissance 12). On a intérêt à travailler avec une étendue minimale permettant tout juste d'acquérir les voltages maximums et minimums associés aux courants des électrodes de travail, ce qui permet de maximiser la sensibilité. Plus l'intervalle spécifié sera petit, et plus le système pourra détecter de très faibles changements de tension, d'où la sensibilité plus élevée. Ainsi, il n'est souvent pas opportun de travailler avec un intervalle de ±10 V. Sur cet intervalle, la précision maximale de mesure est de 4.88 mV avec la conversion ADC de 12 bits, ce qui peut s'avérer insuffisant dans certaines circonstances.

Si un signal se situe en dehors de l'étendue spécifiée, on observe un plafonnement du signal. Il faut éviter de spécifier une étendue ne couvrant pas totalement le signal observé.

2.4.2.3.6 Actions pouvant être accomplies par le programme

Sur le panneau avant virtuel du AFCBP1, 8 boutons ont une action immédiate. On décrit ici brièvement l'action de chacun de ces boutons. 3 boutons sont regroupés sous « Commande au potentiostat », 2 sous « Traitement de données », 2 sous « Fichier » et le bouton « STOP » est situé au bas de l'écran.

Boutons regroupés sous « commandes à envoyer » :

Début. Ce bouton permet d'amorcer un balayage du AFCBP1 et l'acquisition des données. Les paramètres définissant ce balayage et l'acquisition de données ont été expliqués à la section précédente. L'acquisition de données est effectuée pour la ou les électrodes choisie(s) du menu « Acquisition de données ». Une fois l'acquisition de données débutée, on peut voir une nouvelle fenêtre apparaître à l'écran (Figure 23).

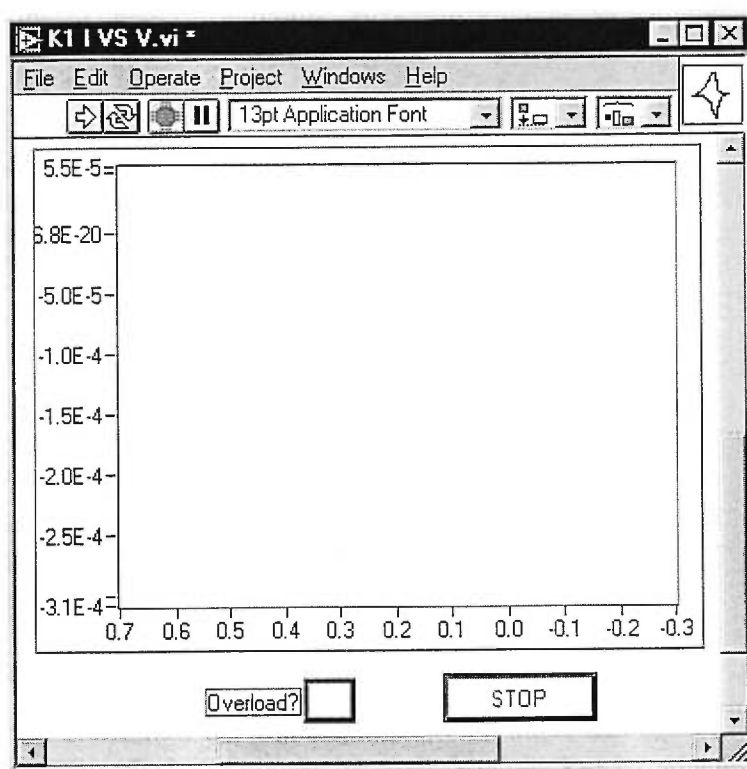


Figure 23_ Fenêtre de l'acquisition de données en temps réel

Si l'acquisition de données est effectuée simultanément aux deux électrodes, deux volt-ampérogrammes seront affichés, correspondant à chacune des électrodes. L'acquisition de données en temps pseudo-réel est affichée sur les volt-ampérogrammes: on y voit un tracé du courant en fonction du potentiel appliqué à l'électrode de travail considérée. L'ordinateur agit comme un (ou deux) traceur(s) XY. Comme expliqué précédemment, chaque point affiché à l'écran est en vérité une moyenne d'un plus grand nombre de points acquis expérimentalement. De plus, pour accélérer davantage l'affichage des données, les données n'apparaissent pas point par point. Une série de points sont traités puis affichés simultanément.

L'acquisition de données peut être arrêtée en tout temps en appuyant sur le bouton STOP. Ce bouton ne fait pas uniquement arrêter l'acquisition de données : une nouvelle commande est envoyée au potentiostat pour lui demander d'arrêter son balayage analogique et de se remettre en mode de circuit d'essai.

La fenêtre d'acquisition de données en temps réel présente aussi un indicateur, sous forme de DEL (lumière), indiquant une éventuelle condition de surcharge du potentiostat. Comme la surcharge peut être dommageable au potentiostat et / ou aux électrodes, il est recommandé d'appuyer sur le bouton STOP lorsque l'avertisseur s'allume pour une période suffisamment longue. Le balayage ne s'arrête pas automatiquement pour laisser la liberté à l'expérimentateur de laisser un balayage se compléter même si une surcharge temporaire a été observée. Souvent la surcharge est simplement causée par un choix de résistance interne trop faible du AFCBP1, causant un voltage trop grand. Les volt-ampérogrammes vont alors avoir tendance à plafonner. Un mauvais branchement d'électrodes et des bulles d'air à la surface de celles-ci sont également d'autres causes fréquentes de surcharge.

Arrête. Ce bouton sert à envoyer une commande d'arrêt au bipotentiostat. Il est à souligner que ce bouton ne fonctionne que lorsqu'aucune acquisition n'est en cours, c'est-à-dire lorsque le AFCBP1 balaye et qu'on n'acquiert pas les données associées aux électrodes de travail K1 ou K2. Pour stopper le balayage lorsqu'une acquisition est en cours, il faut appuyer sur le bouton STOP de la fenêtre de l'acquisition de données en temps réel (voir plus haut).

Change. Ce bouton sert à changer les paramètres du balayage du AFCBP1, sans pour autant stopper le balayage. Il peut être utilisé par exemple pour changer la vitesse de balayage, le nombre de segments, une des deux bornes, etc. Il faut toutefois noter que ce bouton ne peut pas opérer lorsqu'une acquisition de données est en cours.

Boutons regroupés sous « Fichier ».

Sauvegarder. Ce bouton permet de sauvegarder dans un fichier binaire toutes les valeurs associées aux contrôles et aux indicateurs du panneau-avant virtuel du AFCBP1. Les données les plus importantes sauvegardées sont sans doute les volt-ampérogrammes acquis à partir des électrodes de travail 1 et 2. Tous les paramètres ayant servi au balayage sont également sauvegardés, ainsi que les titres des deux volt-ampérogrammes, le texte de la section « Note », et l'heure et la date à laquelle le ou les volt-ampérogrammes ont été acquis.

Une boîte de dialogue apparaît pour que l'on nomme le fichier, en respectant les restrictions imposées par le système d'exploitation utilisé.

Charger. Ce bouton permet de charger en mémoire et d'afficher à l'écran un fichier de données binaire. On peut par exemple ensuite utiliser les outils de traitement de données du programme pour pouvoir faire de l'analyse, ou encore exporter les données ou les imprimer.

On peut également se servir de la commande charger lorsqu'on veut utiliser pour une expérience des conditions similaires à celles d'expériences déjà effectuées. Pour ce faire, on charge un fichier où une expérience a été effectuée en utilisant les conditions voisines à celles voulues. On peut à ce moment modifier les conditions si désiré, puis simplement cliquer sur « Débute » pour amorcer la nouvelle expérience.

Boutons regroupés sous « Traitement de données ».

L'action des boutons regroupés sous « Traitement de données » s'applique uniquement à l'une OU l'autre des électrodes de travail. Un interrupteur permet de choisir à quelle électrode l'action va être effectuée. Pour exporter ou pour analyser

les données des deux électrodes de travail, deux étapes sont requises: exporter ou analyser les résultats de l'électrode K1, et ensuite exporter ou analyser les résultats de l'électrode K2. Cette approche est privilégiée pour que les données puissent être traitées plus aisément.

Exportation. Même si ABC comprend un outil puissant d'analyse des volt-ampérogrammes, il peut parfois être souhaitable d'exporter les données en format ASCII. Par exemple, si on veut représenter plusieurs volt-ampérogrammes sur un même graphique, des logiciels tels Origin de Microcal ou Excel de Microsoft sont tout indiqués. Une boîte de dialogue permet de nommer le fichier à exporter. Une fois le fichier sauvegardé, il pourra être lu par n'importe quel programme pouvant importer le format texte. ABC ne peut pas « réimporter » un fichier exporté. Il est toujours plus prudent de sauvegarder, à l'aide de la commande « sauvegarder », le fichier en format binaire avant de l'exporter. Aussi, le format texte sauvegarde uniquement les données associées à une des électrodes : il n'indique pas les conditions expérimentales, la date ou l'heure à laquelle le voltampérogramme a été acquis, etc.

Analyse. Ce bouton permet d'accéder à la section d'analyse du programme. Une nouvelle fenêtre apparaît. Le voltampérogramme associé à l'électrode sélectionnée pour l'analyse y est affiché. On explique en détail, dans la section suivante, le fonctionnement du module d'analyse de données.

Bouton « STOP ».

Ce bouton sert tout simplement à quitter ABC.

2.4.2.3.7 Traitement des données

Le module de traitement de données, accessible par le bouton « analyse », est un outil puissant pour établir la hauteur des pics et leur aire. Il est en général

préférable d'utiliser ce module à Origin ou Excel par exemple, parce qu'il est adapté à l'analyse des données obtenues par voltampérométrie cyclique. Son utilisation est très simple : l'utilisateur n'a qu'à sélectionner le segment à analyser et à tracer une ligne de base, et le module affiche l'aire et la hauteur du pic. Voici le panneau-avant du module de traitement de données :

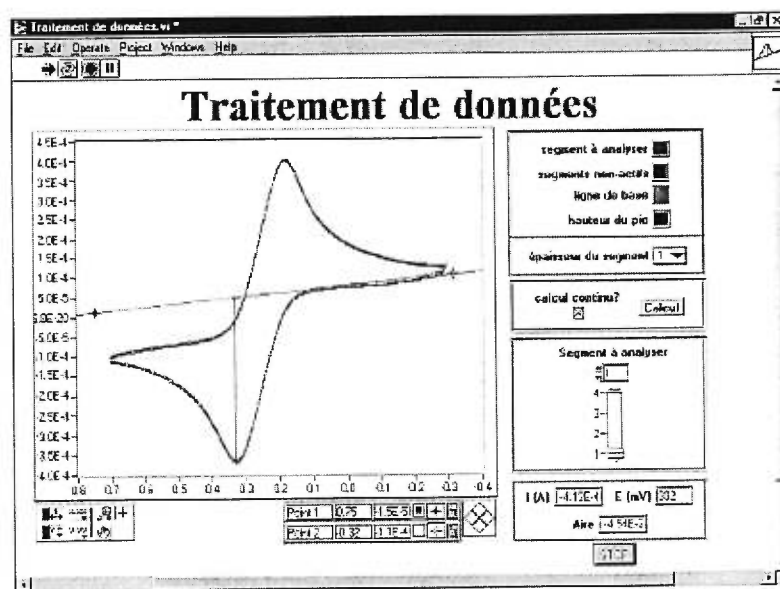


Figure 24_ Module de traitement de données d'ABC
 (couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, concentration 2 mM, vitesse de balayage
 100 mV / s)

Pour sélectionner le segment à analyser, il suffit d'entrer son numéro dans la case appropriée, ou encore de le sélectionner à l'aide du sélecteur à glissoire. Ensuite, à l'aide des deux curseurs présents sur le graphique, on trace la ligne de base (qui va passer automatiquement par les deux points définis par les curseurs). On peut voir la location de la hauteur du pic analysé. Le potentiel du courant maximum (en mV) et sa valeur (en A) sont affichés dans le coin bas droit. L'aire sous la courbe (en C) est également indiquée. À noter que l'aire est la surface (charge) totale sous la courbe *comprise entre les deux curseurs*.

Une description détaillée de chaque contrôle et de chaque indicateur du module de traitement de données suit.

Segment à analyser représente le segment sur lequel l'analyse sera effectuée. On peut changer la couleur utilisée en cliquant sur l'indicateur de couleur; on peut alors choisir n'importe quelle couleur disponible dans le sous-menu. Comme mentionné plus haut, on sélectionne le segment à analyser en entrant le chiffre dans la case prévue à cet effet, ou en le sélectionnant à l'aide du sélecteur à glissoire. On peut voir le segment qui est sélectionné sur le voltampérogramme : celui-ci devient de la couleur choisie.

Segments non-actifs représentent les segments sur lesquels aucune analyse n'est effectuée. Il est judicieux de choisir une couleur contrastant bien avec celle du segment à analyser.

Ligne de base permet de choisir la couleur associée à la ligne de base.

Hauteur du pic permet de choisir la couleur associée à la hauteur du pic.

Épaisseur du segment permet de sélectionner l'épaisseur du segment à analyser. Cette option peut être utile lorsqu'on travaille avec des volt-ampérogrammes comprenant un très grand nombre de segments, où il peut être difficile de discerner le segment à analyser, celui-ci pouvant être sous des segments non-actifs. Le choix d'une épaisseur plus grande permet alors de trouver le segment à coup sûr. La précision du tracé de la ligne de base peut perdre cependant en précision; il est judicieux de revenir à une épaisseur plus faible une fois le segment localisé.

Calcul continu. Ce contrôle détermine si les calculs sont effectués de façon continue, ou si le module attend l'ordre de calculer. Pour les ordinateurs relativement rapides, il est plus simple de laisser les calculs se faire en continu;

ainsi l'utilisateur peut voir la hauteur et la position du maximum déterminés par le module à mesure qu'il trace la ligne de base. La valeur du maximum, sa position et l'aire sont affichées uniquement lorsqu'on appuie sur le bouton « Calcul » une fois la ligne de base tracée si l'option n'est pas sélectionnée.

STOP. Ce bouton est utilisé pour quitter le module d'analyse de données. On retourne alors au panneau-avant du VI principal, où on peut exécuter de nouvelles expériences.

Une bonne connaissance des outils de manipulation des graphes de LabVIEW peut aider à tirer un profit maximum du module d'analyse de données. On peut par exemple se servir de la loupe (accessible par la barre d'outils graphiques) pour faire l'agrandissement d'une partie du graphique pour pouvoir estimer la hauteur d'un pic très mince. On peut alors se servir de l'outil main pour se déplacer sur le graphique agrandi, pour bien localiser le pic.

2.4.3 Validation du système ABC / Pine

2.4.3.1 Approche utilisée

Une fois le logiciel ABC et son module de traitement de données développés, des expériences s'imposent pour s'assurer de la validité des résultats. Une approche comparative a été utilisée, étant donné qu'on pouvait avoir accès au potentiostat 100B/W de BioAnalytical Systems (BAS, West Lafayette, IN, USA), et à son logiciel de traitement de données.

Un voltampérogramme acquis sur le 100B/W devrait être identique à un voltampérogramme acquis sur le Pine contrôlé par ABC pour une même solution. De

plus, on s'attend à ce que cette similitude s'applique sur toutes les concentrations et à toutes les vitesses de balayages. Les courants des pics doivent être les mêmes.

La superposition des volt-ampérogrammes permet uniquement de confirmer que le contrôle et l'acquisition de données par ABC sont correctes. Elle ne confirme pas cependant que le module de traitement de données donne des résultats acceptables. Pour s'assurer du bon fonctionnement du module d'acquisition de données, les données des balayages effectués sur ABC seront analysées à l'aide du logiciel d'acquisition de données d'ABC. Les données acquises à l'aide du BAS-100B/W sont analysées à l'aide du logiciel de traitement de données BAS-100B/W. Les deux systèmes doivent donner des résultats similaires (confirmation des relations 2 et 3, Section 1.1.3, qui découlent de la loi de Randles-Sevcik).

On a choisi d'effectuer l'expérience avec du cyanure de fer (III), cette espèce démontrant une réaction électrochimique réversible dans les conditions usuelles.²⁹

2.4.3.2 Procédures expérimentales

3.218 g de $K_3Fe(CN)_6$ a été dissout dans 100 mL d'eau déminéralisée, contenant 1 M de KCl, pour donner une solution-mère de cyanure de fer (III) de 100 mM. La solution-mère a été utilisée pour préparer quatre solutions supplémentaires, contenant entre 2 et 20 mM de cyanure de fer (III).

La procédure expérimentale suivante a été respectée pour la partie sur les solutions à concentrations variables. Pour chaque solution, un volt-ampérogramme a été acquis sur ABC/Pine à l'aide d'une cellule contenant une électrode de travail de carbone (BAS), une électrode auxiliaire de platine (Goodfellow, Cambridge, UK) et une électrode de référence de Ag / AgCl (BAS). La même cellule a été ensuite utilisée pour effectuer un balayage sur le 100B/W de BAS. La fenêtre du balayage

s'étendait de -300 mV jusqu'à 700 mV (VS électrode de Ag / AgCl). La vitesse de balayage a été maintenue à 100 mV / s. Un temps mort de 3 secondes a été utilisé. 4 segments ont été acquis pour chaque solution.

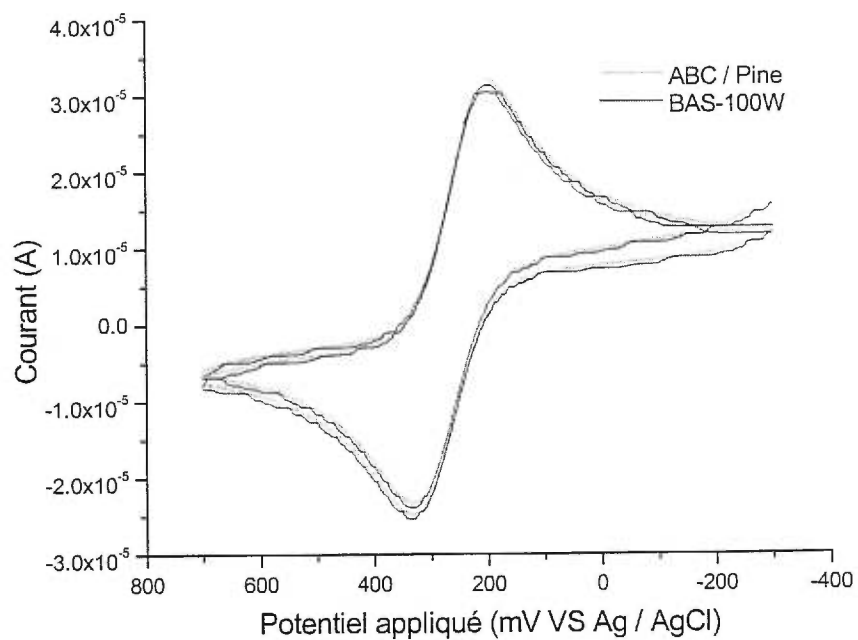
La solution de 10 mM a été utilisée pour la partie de l'expérience où la vitesse de balayage fut variée. Des balayages de 5 mV / s jusqu'à 9995 mV / s ont été effectués sur les deux systèmes (la même cellule a été utilisée tout au long de cette partie de l'expérience ; un balayage était effectué sur ABC / Pine puis sur BAS100B/W à la même vitesse). Tous les autres paramètres (tant sur ABC / Pine que sur BAS100B/W) ont été maintenus à leur valeur par défaut.

Les courants associés aux pics ont été mesurés à l'aide du module de traitement de données d'ABC pour les balayages effectués sur le Pine. Le logiciel de traitement de données du BAS100B/W a été utilisé pour estimer les courants des pics des expériences effectuées sur le BAS100B/W. Les régressions linéaires ont été obtenues à l'aide du logiciel Origin de Microcal.

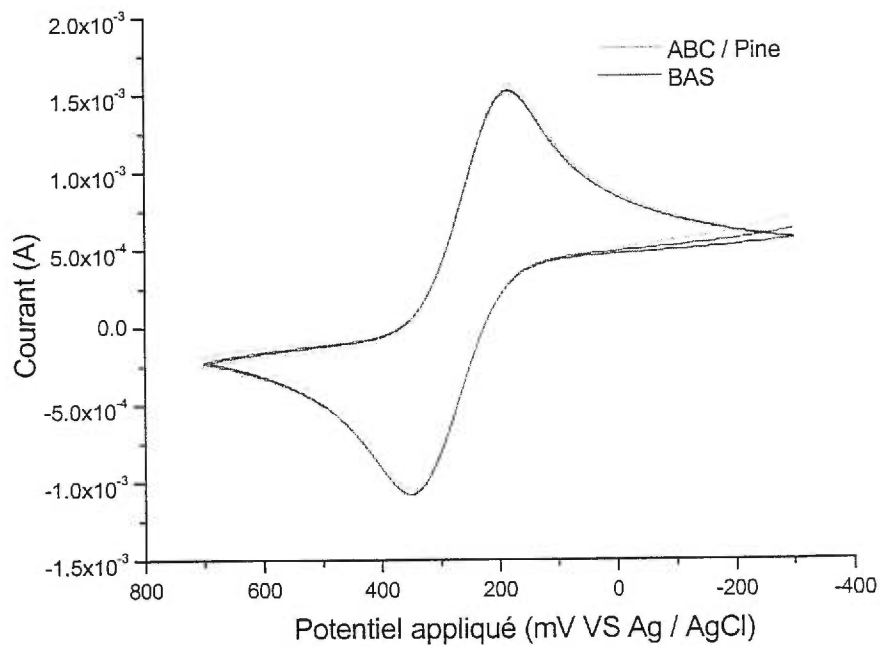
2.4.3.3 Résultats

2.4.3.3.1 Superposition des volt-ampérogrammes

À toutes les concentrations et à toutes les vitesses de balayages, les volt-ampérogrammes acquis par les deux systèmes étaient similaires. La Figure 25 illustre les volt-ampérogrammes de BAS100B/W (trait foncé) et de ABC (trait pâle) pour deux concentrations différentes :



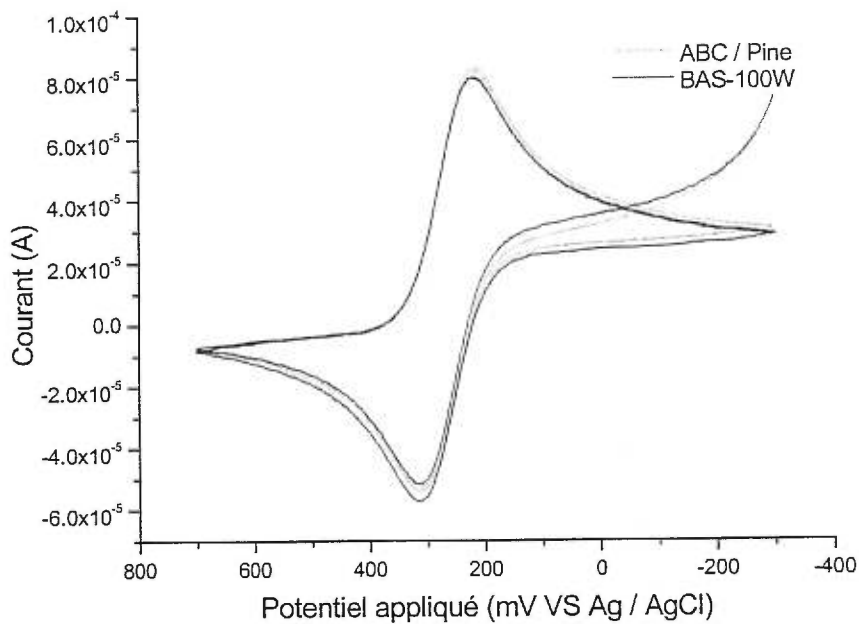
(a)



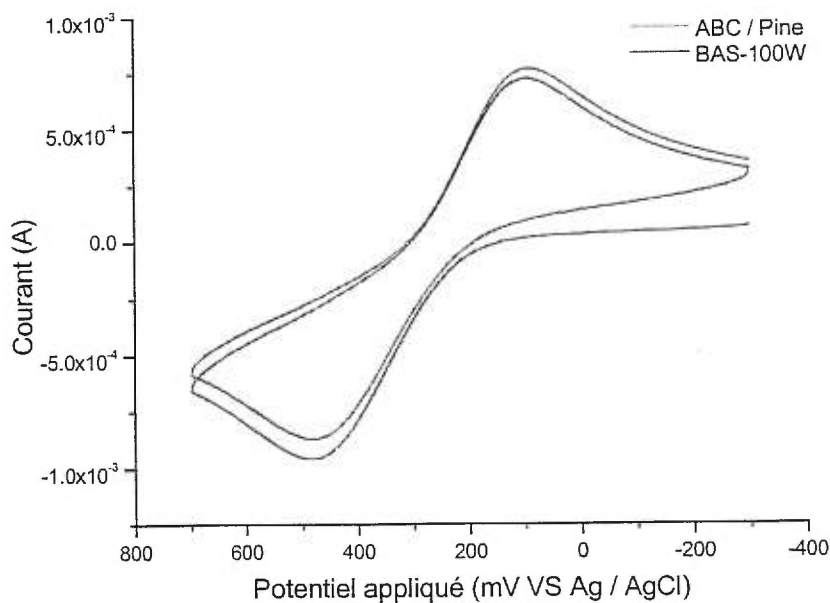
(b)

Figure 25_ Volt-ampérogrammes comparatifs entre le système Pine / ABC et le BAS-100B/W, pour des solutions de 2 mM (a) et de 100 mM (b) de cyanure de fer(III).

La Figure 26 illustre les volt-ampérommes acquis à des vitesses de balayages différentes.



(a)



(b)

Figure 26_Volt-ampérommes comparatifs entre le système Pine/ABC et le BAS-100B/W, pour des vitesses de balayages de 20 mV/s (a) et de 7500 mV/s (b) pour les solutions de cyanure de fer (III) 10 mM.

2.4.3.3.2 Confirmation de la loi de Randles-Sevcik par les deux logiciels de traitement de données

La Figure 27 illustre la variation du courant du pic en fonction de la concentration pour chacun des segments (les segments 1 et 3 résultant d'un balayage anodique, les segments 2 et 4 d'un balayage cathodique).

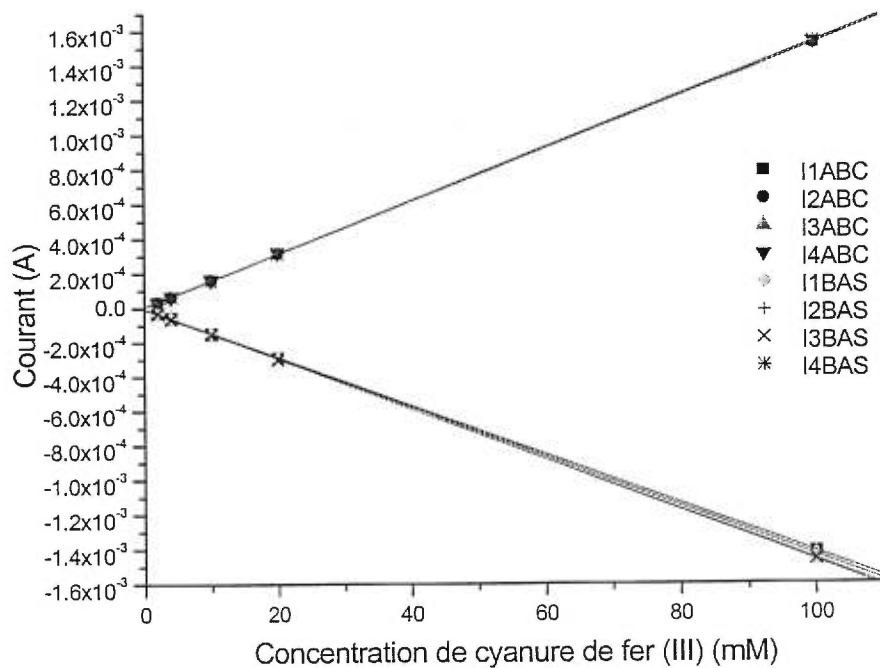


Figure 27_ Courant en fonction de la concentration pour chaque segment, par ABC/Pine et BAS-100B/W

Le Tableau 1 illustre la comparaison des pentes de la Figure 27 pour chacun des segments :

**Tableau 1_ Comparaison des pentes obtenues par les deux systèmes
(concentrations variables)**

Segment	Pente Pine / ABC (A/mM)	Pente BAS- 100B/W (A/mM)	écart (%)
1	$-1.416 * 10^{-5}$	$-1.468 * 10^{-5}$	3.5
2	$1.515 * 10^{-5}$	$1.527 * 10^{-5}$	0.8
3	$-1.436 * 10^{-5}$	$-1.459 * 10^{-5}$	1.6
4	$1.526 * 10^{-5}$	$1.528 * 10^{-5}$	0.1

Comme on peut voir sur la Figure 27, les droites sont superposables. Le Tableau 1 montre que l'écart entre les pentes varie de 3.5% jusqu'à 0.1% pour chacun des segments. Cet écart est faible, et confirme que les deux systèmes donnent des résultats comparables. Outre l'écart des pentes entre les deux méthodes, il faut considérer la qualité de la relation linéaire attendue pour le système ABC / Pine pour s'assurer de sa fiabilité. Le Tableau 2 illustre les coefficients de corrélation R pour chaque segment.

Tableau 2_ Coefficients de corrélation R pour Pine / ABC (concentrations variables)

Segment	R
1	-0.99997
2	0.99998
3	-0.99998
4	0.99997

Comme on peut le constater, la valeur absolue de chaque coefficient de corrélation est très voisine de 1. Le système permet donc une excellente précision. Les résultats de l'expérience à vitesse de balayage variable sont illustrés sur la figure suivante :

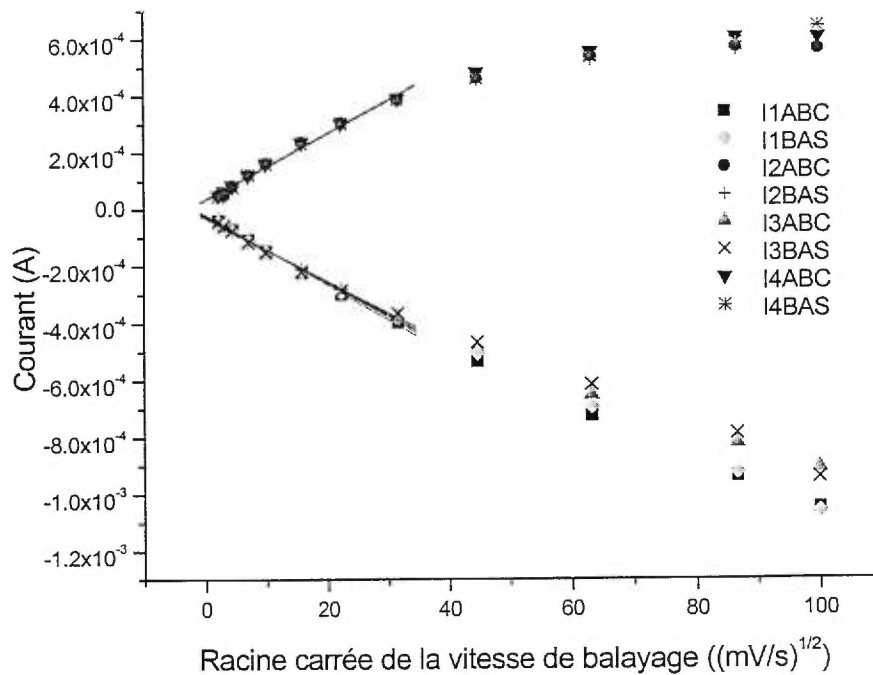


Figure 28_ Variation du courant en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage

Le Tableau 3 illustre de nouveau la comparaison des pentes pour la partie linéaire de chaque segment.

Tableau 3_ Comparaison des pentes obtenues par les deux systèmes (vitesses variables)

Segment	Pente Pine / ABC ($A s^{1/2}/m^{1/2}V^{1/2}$)	Pente BAS- 100B/W ($A s^{1/2}/m^{1/2}V^{1/2}$)	écart (%)
1	$-1.228 * 10^{-5}$	$-1.178 * 10^{-5}$	4.1
2	$1.169 * 10^{-5}$	$1.167 * 10^{-5}$	0.2
3	$-1.147 * 10^{-5}$	$-1.104 * 10^{-5}$	3.7
4	$1.171 * 10^{-5}$	$1.180 * 10^{-5}$	0.8

La Figure 28 illustre bien que les deux méthodes donnent des résultats superposables. Même à vitesse de balayage élevée, où la relation de Randles-Sevcik n'est plus respectée (cinétique irréversible), les points expérimentaux des deux méthodes sont pratiquement superposables.

Le Tableau 3 permet de constater que l'écart des pentes établies pour chacun des segments est d'au maximum 4.1% pour chacun des segments. Les méthodes semblent donc toutes deux donner des résultats très similaires. Une fois de plus, une analyse de la qualité de la corrélation (pour la partie linéaire de la Figure 28) a été effectuée (Tableau 4) :

Tableau 4_ Coefficients de corrélation R pour Pine / ABC (vitesses variables)

Segment	R
1	-0.999
2	0.993
3	-0.997
4	0.996

Comme pour chaque segment, la valeur absolue du paramètre R est très voisine de 1, la corrélation des données est bonne. Comme tous les résultats démontrent que le système donne des résultats précis pour des expériences relatives à la théorie de Randles-Sevcik, on peut présager que le système est fiable, et devrait donner les bons résultats pour toutes les expériences.

2.5 Conception d'un détecteur électrochimique pour l'ÉC

2.5.1 Introduction

L'électrophorèse capillaire (ÉC) est une technique analytique de séparation de plus en plus utilisée. Le mécanisme de séparation en ÉC étant complètement différent de celui de la chromatographie, les séparations possibles par les deux techniques sont différentes. Les techniques sont complémentaires.

Le type de détection le plus souvent utilisé en ÉC est l'absorption UV-VIS, surtout en raison de son caractère universel: la quasi-totalité des molécules absorbent dans le domaine de l'ultra-violet et / ou du visible. Plusieurs problèmes sont cependant associés à cette détection : faible sélectivité (les molécules absorbant souvent à des longueurs d'onde peu spécifiques) et sensibilité assez faible (à cause du parcours optique limité).

La sensibilité est encore plus faible dans le cas des carbohydrates en raison de leurs coefficients d'absorption molaire très peu élevés. Pour obtenir une sensibilité acceptable, de très faibles longueurs d'onde sont requises, impliquant une sélectivité encore plus faible (un très grand nombre de molécules absorbant à ces longueurs d'onde).

Pour les carbohydrates, l'électrochimie est un moyen tout indiqué pour effectuer la détection. Une faible fraction de molécules sont électroactives, ceci explique en partie la sélectivité élevée des techniques électrochimiques. L'utilisation d'électrodes modifiées peut conduire à une sélectivité encore plus élevée.

Un autre avantage de la détection électrochimique est son coût modeste. Il faut déboursier plusieurs milliers de dollars pour se doter d'un détecteur UV-VIS, d'un

laser ou d'un spectromètre de masse pour l'ÉC. Le potentiostat à la base des détecteurs électrochimiques peut être construit à partir d'un nombre très limité de résistances et d'amplificateurs opérationnels, d'où son coût abordable. Un générateur d'onde est requis pour envoyer le potentiel désiré au potentiostat. Un générateur d'onde externe peut être utilisé ; une meilleure approche consiste à utiliser un ordinateur muni d'une carte d'acquisition de données. La carte peut fournir le potentiel à appliquer au potentiostat, en plus d'effectuer l'acquisition de données. On possède à ce moment un appareillage compact, peu coûteux et répondant à toutes nos attentes.

On propose en premier lieu de construire un potentiostat, et de vérifier son fonctionnement en l'utilisant pour effectuer des expériences de voltampérométrie cyclique. Une fois le bon fonctionnement du potentiostat confirmé, il sera couplé avec un système d'électrophorèse capillaire pour effectuer la détection électrochimique des carbohydrates à la sortie de la colonne. Le système sera testé en injectant des solutions contenant plusieurs types de sucres à des concentrations variables. L'acquisition de données, de même que le potentiel appliqué à l'électrode de travail, seront contrôlés par ordinateur, au moyen d'un logiciel que l'on va développer.

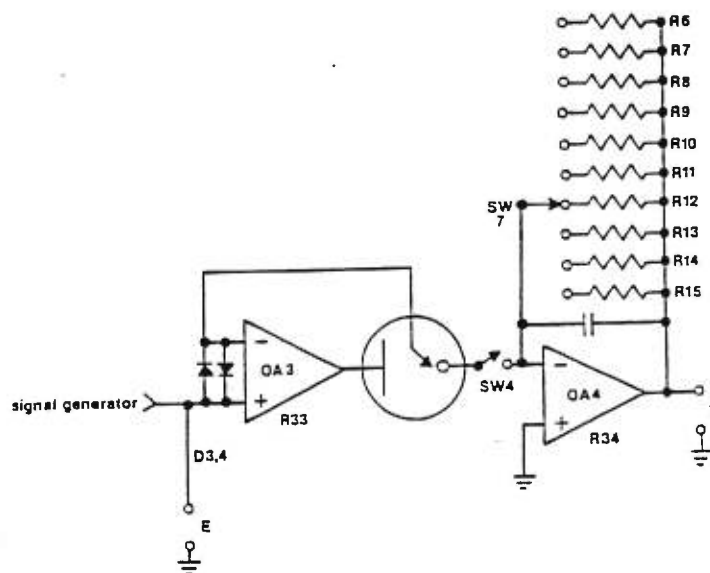
La partie de ce mémoire portant sur l'électrophorèse capillaire a été effectuée en collaboration avec M. Éric Villiard, étudiant de 2^e cycle sous la direction de D. Leech et la co-direction de K. Waldron. Le travail a été divisé comme suit : M. Villiard s'est occupé des expériences d'électrophorèse capillaire, ma tâche consistant principalement à programmer le logiciel. La construction du circuit a été une tâche partagée, et n'aurait pu être réalisée sans l'aide du personnel de l'atelier mécanique du département de Chimie de l'Université de Montréal.

Compte tenu de cette division du travail, on présente ici uniquement l'approche utilisée pour s'assurer que le circuit fonctionne correctement, et on donne un aperçu

de l'utilisation du logiciel de contrôle et d'acquisition de données. Les expériences d'électrophorèse capillaires seront présentées dans le mémoire d'Éric Villiard (à paraître).

2.5.2 Circuit utilisé

La figure suivante représente le schéma du circuit électrique utilisé pour construire le potentiostat.



Le schéma électrique du potentiostat est composé de deux parties importantes. La première est un dispositif permettant d'appliquer un potentiel à une électrode de travail par rapport à une électrode de référence (dont le potentiel est constant). Le premier amplificateur opérationnel du circuit effectue cette tâche. La deuxième partie du circuit sert à mesurer le courant à l'électrode de travail. La différence de potentiel V entre les points A et B du schéma est mesurée; connaissant la valeur de la résistance comprise entre A et B, on est en mesure de calculer le courant.³⁰

Les deux amplificateurs opérationnels utilisés (QA3 et QA4 sur le schéma) sont de type CA3140E. Le sélecteur de résistance (représenté sur le schéma par les résistances R6 à R15) comprend les résistances suivantes : 10 k Ω , 100 k Ω et 1 M Ω . Le condensateur utilisé possède une capacité de 0.01 μ F.

2.5.3 Vérification du fonctionnement du circuit

Avant même d'effectuer des essais avec un système d'ÉC, il est judicieux de vérifier si le circuit assemblé donne des résultats prévisibles. Plusieurs approches peuvent être considérées pour effectuer cette vérification. On a choisi d'accomplir une série d'expériences de volt-ampérométrie cyclique. Les volt-ampérogrammes obtenus devraient exhiber la forme sigmoïdale attendue, et l'analyse des données devraient être conforme à la théorie de Randles-Sevcik.

Les expériences effectuées sont similaires à celle décrite à la section précédente, pour la validation du logiciel de contrôle et d'acquisition de données ABC. Les courants de diffusion d'une série de solutions dont les concentrations sont variées sont mesurées. Le graphique de I_p en fonction de C devrait être linéaire. La vitesse de balayage pour une solution est ensuite variée. Le graphique du courant de diffusion en fonction de $v^{1/2}$ devrait être également linéaire selon la loi de Randles-Sevcik.

Un des problèmes de cette approche expérimentale est qu'il fasse posséder un moyen de générer l'onde triangulaire requise en volt-ampérométrie cyclique. Le bipotentiostat Pine AFCBP1 étant disponible et déjà sous contrôle informatique, il a été utilisé pour générer l'onde.

2.5.3.1 Procédures expérimentales

0.3220 g de $K_3Fe(CN)_6$ a été dissout dans 100 mL d'eau déminéralisée, contenant 0.1 M de KCl, pour donner une solution-mère de cyanure de fer (III) de 0.009781 M. La solution-mère a été utilisée pour préparer quatre solutions supplémentaires, contenant entre 0.2 et 2 mM de cyanure de fer (III).

Des volt-ampérogrammes à 100 mV / s ont été acquis pour chacune des solutions. La solution de 0.9781 mM a été utilisée pour les expériences à vitesse de balayage variable. Des vitesses de balayages de 5 mV / s jusqu'à 9995 mV / s ont été utilisées.

L'approche suivante a été suivie pour effectuer l'acquisition des données du potentiostat assemblé et pour générer l'onde triangulaire requise en volt-ampérométrie cyclique par le AFCBP1 :

- ABC sert à envoyer les commandes au AFCBP1, notamment les bornes et la vitesse du balayage (comme décrit au chapitre précédent). Le balayage analogique est effectué sur circuit d'essai, et aucune donnée provenant du Pine AFCBP1 n'est acquise. La sortie de potentiel (E) du Pine, habituellement reliée à une table traçante, est utilisée comme signal d'entrée sur le circuit du potentiostat à tester.

- Pour acquérir les données, une version modifiée du module d'acquisition de données de ABC est utilisée. Les données provenant de la carte d'acquisition Lab-PC+ (de National Instruments), branchée sur le potentiostat, sont acquises. Le système ne vérifie pas la présence de signaux de départ et d'arrêt : l'acquisition peut être arrêtée manuellement une fois le balayage requis complété.

- Deux signaux sont acquis. Le premier correspond au potentiel appliqué entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. Ce potentiel doit normalement correspondre au potentiel provenant de la sortie E du AFCBP1. Le deuxième signal correspond au voltage mesuré proportionnel au courant.

Tous les volt-ampérogrammes ont été obtenus en utilisant les paramètres suivants : potentiels initial, borne inférieure et potentiel final de -300 mV (VS Ag / AgCl). Borne supérieure de 700 mV. Deux segments balayés. Tous les autres contrôles ont été laissés aux valeurs par défaut de ABC.

Les courants associés aux pics ont été mesurés à l'aide du module de traitement de données d'ABC. Les régressions linéaires ont été effectuées à l'aide du logiciel Origin de Microcal.

2.5.3.2 Résultats

2.5.3.2.1 Variation de la concentration

Un volt-ampérogramme typique obtenu lors de l'expérience est illustré à la Figure 29.

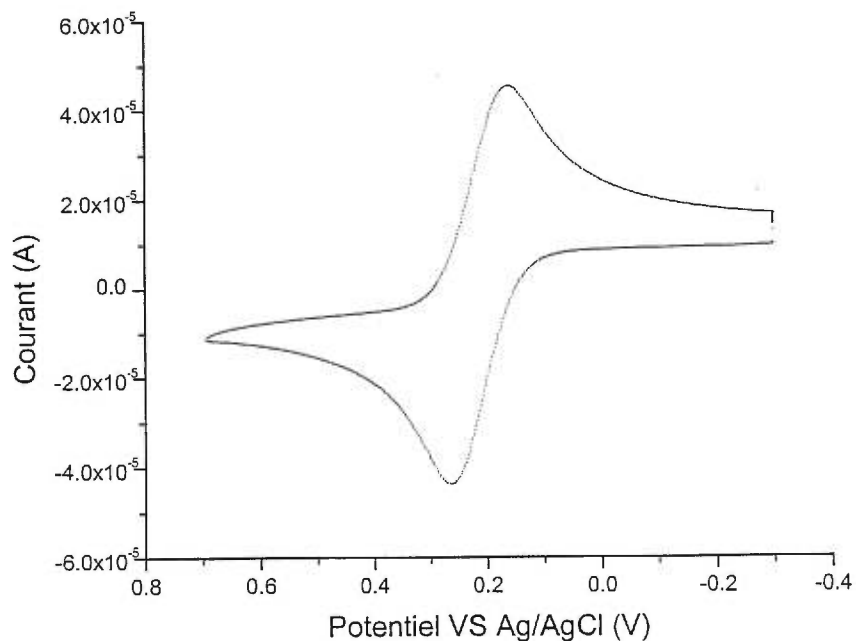


Figure 29_Volt-ampérogramme typique, obtenu à 100 mV / s avec la solution de cyanure de fer (III) 9.781 mM.

Les courants cathodiques (réduction) et anodiques (oxydation) ont été mesurés. Les résultats sont affichés sur la Figure 30 et sur la Figure 31.

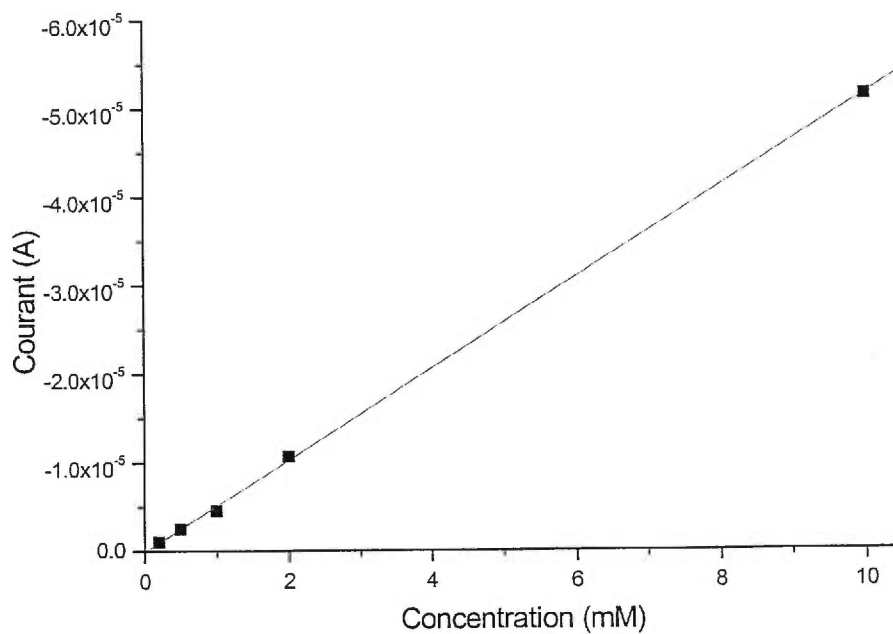


Figure 30_Influence de la concentration de cyanure de fer (III) sur le courant anodique.

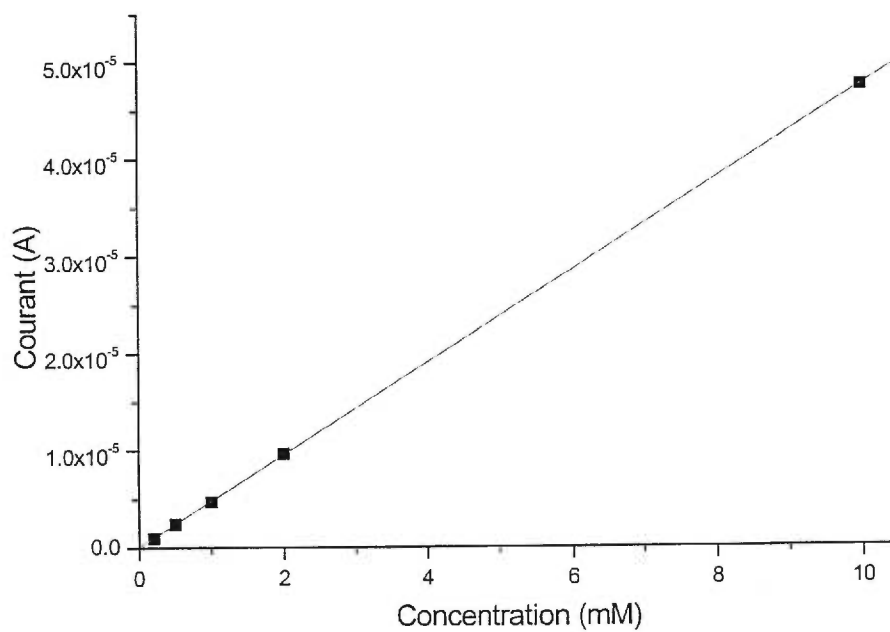


Figure 31_Influence de la concentration de cyanure de fer (III) sur le courant cathodique.

Les deux graphiques précédents montrent que l'équation 2 est respectée : le courant de diffusion est proportionnel à la concentration de l'espèce électroactive utilisée. La corrélation des résultats est excellente (-0.99987 pour la Figure 30 et 0.99999 pour la Figure 31). Comme le potentiel initial est de -300 mV et que le potentiel est balayé vers le haut, on a oxydé tout d'abord l'espèce à la surface de l'électrode, ce qui est illustré par le premier segment des volt-ampérogrammes. Le potentiel maximal est de 700 mV. Une fois que le balayage atteint ce potentiel, un autre segment est balayé, cette fois vers les potentiels plus négatifs. L'espèce ayant été oxydée à la surface de l'électrode est alors réduite.

La loi de Randles-Sevcik est de nouveau respectée pour l'oxydation et pour la réduction. La réponse du potentiostat est telle que prévue.

Un volt-ampérogramme typique d'une expérience à balayage rapide est illustré à la Figure 32.

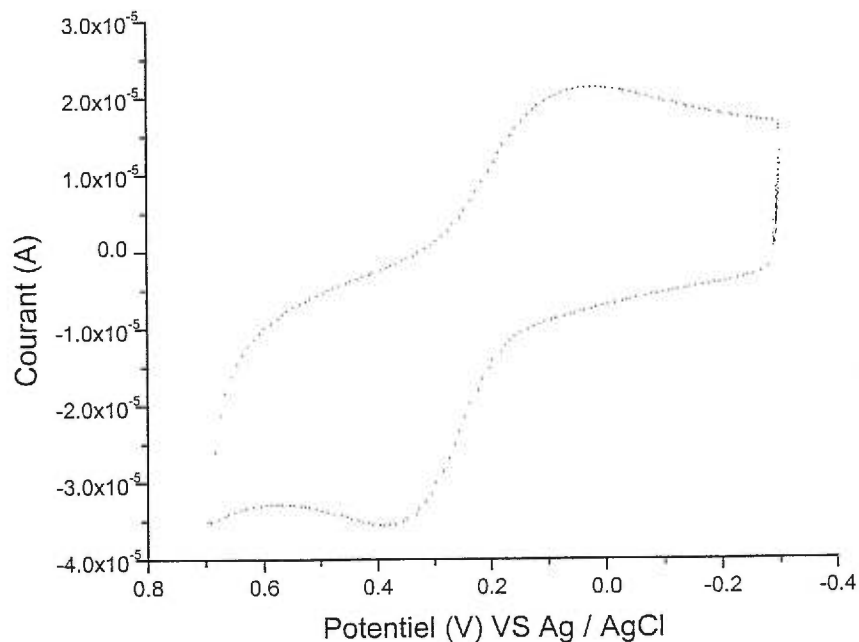


Figure 32_Volt-ampérogramme, avec une vitesse de balayage de 5000 mV / s.

La figure démontre que la méthode d'acquisition permet d'obtenir un nombre assez élevé de points pour un traitement quantitatif, même à vitesses de balayage très élevées. À ces vitesses, la séparation entre les pics anodiques et cathodiques augmente : la réaction devient irréversible.

Le résultat de l'expérience où la vitesse est variée est illustré sur les Figure 33 et Figure 34.

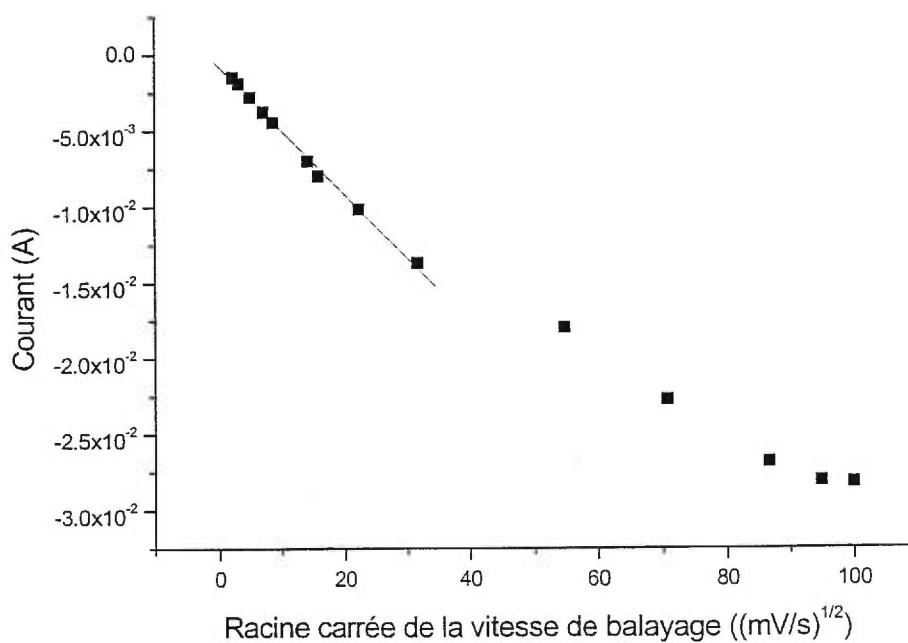


Figure 33_Variation du courant anodique en fonction de la vitesse de balayage utilisée.

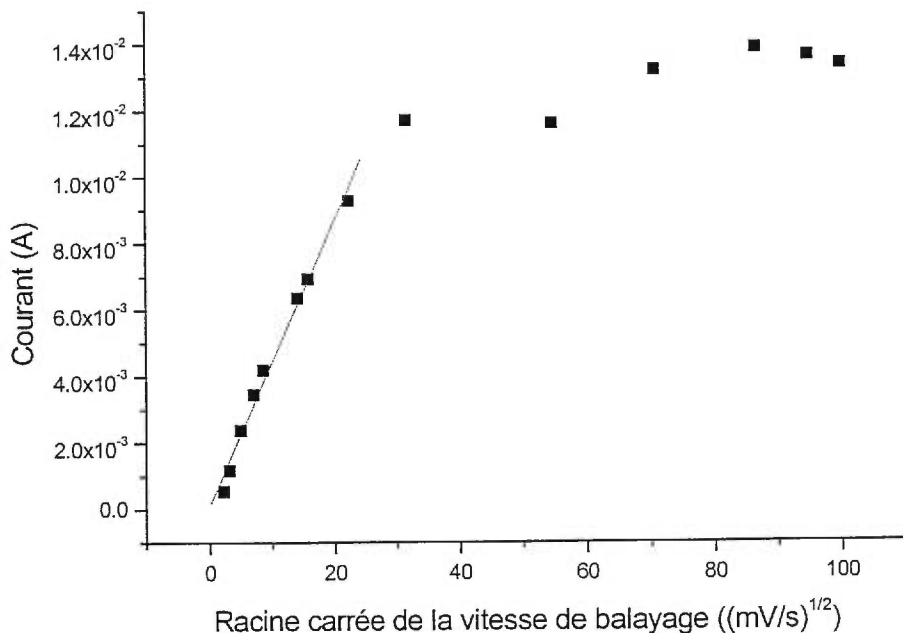


Figure 34_Variation du courant cathodique en fonction de la vitesse de balayage.

Comme la réaction du cyanure de fer (III) devient irréversible à vitesse de balayage élevée, seuls les points correspondant à des vitesses de balayage inférieures à 500 mV / s ont été utilisés pour la régression linéaire. Les deux figures précédentes illustrent clairement que la loi de Randles-Sevcik est respectée à basse vitesse de balayage, où la réaction est réversible. Le domaine d'applicabilité de la loi est confirmé : la loi n'est pas valide pour les réactions irréversibles.

Ces expériences permettent de conclure que le potentiostat construit fonctionne pour les conditions expérimentales utilisées. Elles démontrent également que le logiciel de contrôle ABC fonctionne convenablement, et que l'acquisition des données est possible même à des vitesses de balayage voisines de 10 V / s, maximum permis par le Pine AFCPB1. Elles ne démontrent cependant pas que le potentiostat peut être utilisé comme détecteur en électrophorèse capillaire, les courants mesurés en électrophorèse capillaire étant beaucoup plus faibles que ceux

obtenus. Des expériences d'électrophorèse capillaire effectuées par Éric Villiard confirment le bon fonctionnement du détecteur utilisé. Les résultats seront inclus dans son mémoire.

2.5.4 Aperçu du logiciel de contrôle et d'acquisition de données pour le détecteur électrochimique

Une fois le fonctionnement du potentiostat confirmé, un logiciel devait être développé pour le système d'électrophorèse capillaire. LabVIEW a été encore une fois l'environnement de programmation choisi, principalement en raison de sa simplicité d'utilisation et de son environnement adapté à l'acquisition de données.

2.5.4.1 Instrumentation utilisée

Un Pentium 200 MMX a été utilisé pour le développement du logiciel. Un ordinateur de puissance beaucoup plus faible, doté d'un microprocesseur 486 (66 MHz), a servi pour les expériences d'électrophorèse capillaire une fois la phase de développement du logiciel complétée.

Une carte Lab-PC+, de National Instruments, a été utilisée. Un accessoire (un «General-Purpose Termination Breadboards» modèle SC-2070 de National Instruments) permettant d'effectuer les branchements plus facilement, était branché à la carte.

2.5.4.2 Communication entre la carte et le potentiostat

La communication entre la carte d'acquisition de données et le potentiostat construit est beaucoup plus simple que celle utilisée pour communiquer avec le AFCBP1. Dans le cas du AFCBP1, des envois digitaux étaient requis : toutes les informations relatives au balayage devaient être transmises au microprocesseur du

AFCBP1. Pour le potentiostat développé dans notre laboratoire, aucune communication digitale n'est requise : il suffit d'envoyer au potentiostat un signal analogique fixant le potentiel de l'électrode de travail.

Pour l'acquisition de données, un seul signal est à acquérir, qui correspond au courant mesuré à l'électrode de travail. L'acquisition de tout autre signal serait superflue, l'électrophérogramme donnant la variation d'un seul signal (le courant dans le cas d'un détecteur électrochimique) en fonction du temps.

2.5.4.3 Fonctionnement du logiciel

Le panneau-avant du VI est représenté à la Figure 35:

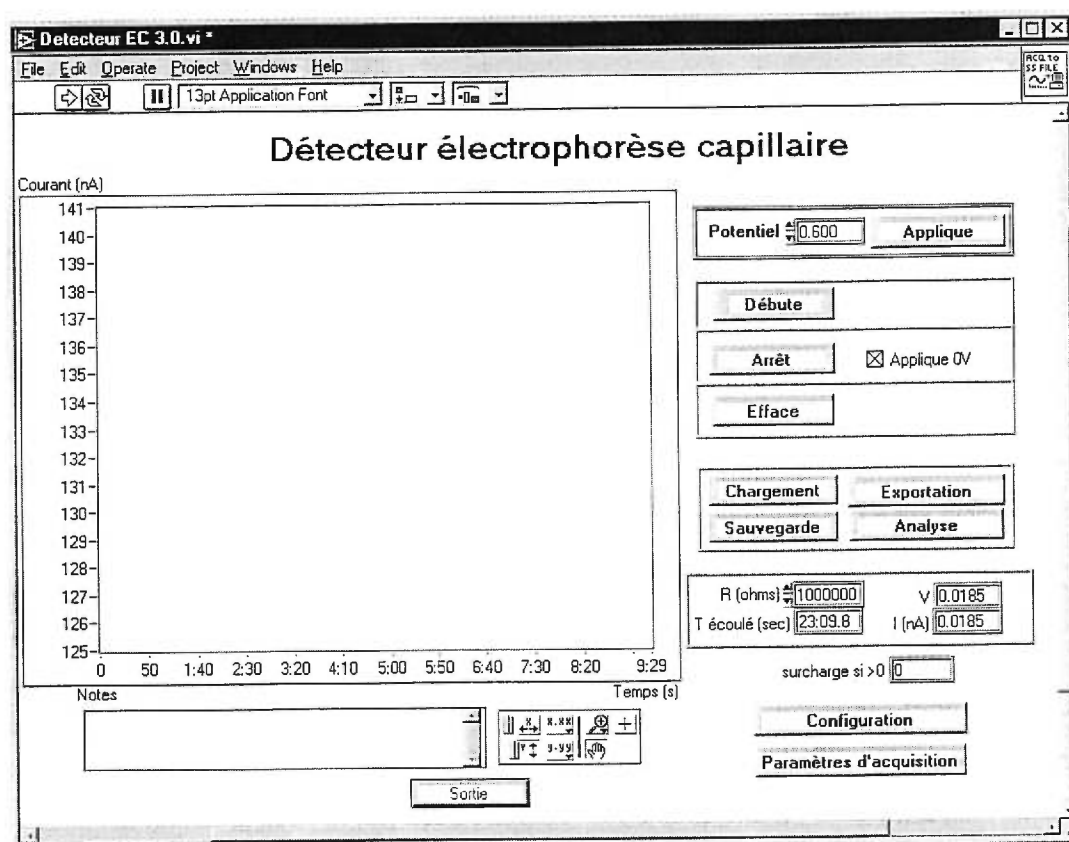


Figure 35_ Panneau avant du logiciel d'acquisition de données pour EC

L'utilisation du logiciel d'acquisition de données est très intuitive. Une fois le logiciel configuré correctement pour la carte et l'ordinateur utilisé, les expériences peuvent être effectuées. L'acquisition de données peut être amorcée en cliquant sur le bouton « Début », elle peut être arrêtée en cliquant sur « Arrêt ». La section « Notes » sert à l'ajout de commentaires. Les données peuvent être sauvegardées, exportées, ou analysées à l'aide d'un module spécial de traitement de données. La section suivante donne une description détaillée de l'usage de chaque contrôle.

2.5.4.4 Description des contrôles

Configuration. Ce bouton fait apparaître à l'écran la fenêtre de dialogue suivante :

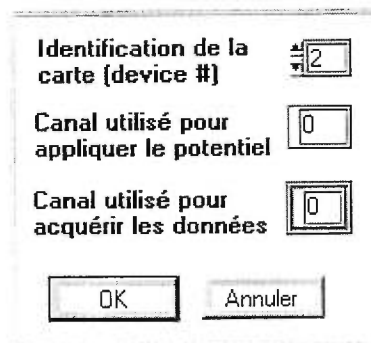


Figure 36_ Boite de dialogue de configuration

Les options suivantes peuvent être modifiées :

Identification de la carte (device #). Ce numéro doit correspondre à celui attribué à la carte d'acquisition de données utilisée par NI-DAQ.

Canal utilisé pour appliquer le potentiel. Ce contrôle sert à identifier le canal convertisseur digital à analogique (DAC) utilisé pour envoyer le potentiel à

l'électrode de travail. La valeur par défaut est 0. Tous les canaux DAC de la carte peuvent être utilisés à cette fin.

Canal utilisé pour acquérir les données. Le canal convertisseur analogique à digital (ADC), où le courant associé à la réaction électrochimique est acquis. 0 est la valeur par défaut. Tous les canaux ADC de la carte peuvent être utilisés à cette fin.

Paramètres de l'acquisition. Ce bouton affiche une boîte de dialogue (Figure 37), où certaines options reliées à l'acquisition de données peuvent être modifiées.

La figure 37 est une boîte de dialogue intitulée 'Paramètres d'acquisition'. Elle contient quatre paramètres réglables :

- vitesse d'acquisition** : réglé sur 250.00
- nombre de balayages à moyenner** : réglé sur 50
- taille du tampon** : réglé sur 2500
- Étendue** : une sous-boîte de dialogue contenant deux paramètres :
 - limite sup.** : réglé sur 10.00
 - limite inf.** : réglé sur -10.00

En bas de la boîte de dialogue, il y a deux boutons : 'OK' et 'Annuler'.

Figure 37_ Paramètres d'acquisition

Vitesse d'acquisition. Ce contrôle permet de spécifier le nombre de balayage effectués (ou de points acquis) par la carte d'acquisition de données. En général, plus la valeur du contrôle est grande, plus le rapport signal / bruit va augmenter. Il convient par conséquent d'utiliser la valeur la plus élevée possible. Une vitesse d'acquisition peut cependant être trop élevée pour être supportée par la carte d'acquisition de données ou par l'ordinateur : un message d'erreur est alors affiché. La valeur par défaut de ce contrôle est de 250 points / s, cette valeur fonctionnant bien sur l'ordinateur utilisé dans notre laboratoire.

Nombre de balayages à moyenner. Ce contrôle permet de spécifier le nombre de points à moyenner pour l'affichage et la sauvegarde des données. Si ce contrôle est fixé à une valeur faible, un très grand nombre de points seront utilisés pour tracer l'électrophérogramme. Cette situation peut être désirable, mais elle implique une grande taille de fichiers créés ; l'ordinateur risque également de ne pas pouvoir afficher les données assez rapidement à l'écran (un message d'erreur est alors affiché). La valeur par défaut du contrôle est de 50 points, cette valeur donnant de bons résultats sur notre système. Les valeurs par défaut affichent 5 points à l'écran par seconde (250 points s^{-1} / 50 s). Les pics en électrophorèse capillaire étant habituellement d'une largeur de plusieurs secondes, la sauvegarde d'un point par 0.2 seconde permet de déterminer le maximum des pics avec une précision acceptable.

Taille du tampon. Ce contrôle permet de spécifier la taille du tampon à utiliser lors de l'acquisition de données. Le tampon est la zone de mémoire réservée à l'acquisition de données. L'ordinateur peut traiter une partie des données inscrites dans ce tampon tout en continuant l'acquisition. L'utilisation d'une valeur trop faible pour ce contrôle risque d'engendrer un problème majeur. Il est possible que le programme ne puisse traiter les données assez rapidement pour les afficher en temps pseudo-réel. Le programme doit alors inscrire des nouvelles données sur des données déjà inscrites dans le tampon qui n'ont pas encore été traitées. Cette situation cause une erreur. La valeur de ce contrôle doit donc être assez grande. L'espace-mémoire requis augmente lorsque la valeur du contrôle augmente. Une trop grande demande de mémoire peut causer un message d'erreur. La valeur par défaut est de 2500 points, cette valeur ne causant pas de problèmes sur notre système.

Étendue. Ce contrôle numérique permet de spécifier l'étendue (range) du voltage pouvant être acquis par la carte d'acquisition de données. Ce voltage est

proportionnel au courant à l'électrode de travail utilisée. L'étendue est définie en spécifiant les voltages minimums et maximums à acquérir. N'importe quels maximums et minimums peuvent être spécifiés ; les choix sont limités en pratique par le nombre d'étendues distinctes disponibles sur la carte d'acquisition de données, qui varie selon les cartes.

Un choix approprié d'étendue peut parfois faire la différence entre une expérience avec beaucoup de bruit observé et une autre où il est minimisé. On a intérêt à spécifier l'étendue minimale permettant d'acquérir les voltages maximums et minimums associés au courant de l'électrode de travail. Il n'est donc pas toujours opportun de travailler avec un intervalle de ± 10 V (valeur par défaut). La résolution de la conversion ADC (analogue vers digitale) est de 12 bits sur la carte LabPC+ utilisée. La précision maximale est de 1 partie par 4096 ($2^{\text{à la puissance } 12}$). Sur un intervalle de ± 10 V, la précision maximale de mesure est donc de 4.88 mV, ce qui peut s'avérer insuffisant dans certaines circonstances.

Potentiel et Applique. Le contrôle Potentiel est utilisé pour spécifier à quel potentiel (en mV) l'électrode de travail est maintenue par rapport à l'électrode de référence. Une modification de potentiel à l'électrode de travail est effectuée uniquement lorsqu'on clique sur le bouton « Applique ». Ceci permet d'éviter d'envoyer des potentiels par erreur au potentiostat.

Le potentiel produit par la carte d'acquisition de données est très stable. L'ordinateur envoie une seule commande pour chaque potentiel demandé à la carte d'acquisition de données. Le potentiel analogue produit par la carte ne variera pas en fonction du temps pour un envoi donné.

Début. Ce bouton sert à amorcer l'acquisition des données. Ce bouton est cliqué habituellement lorsque l'injection vient tout juste d'être effectuée, pour que le

temps zéro de l'échelle de temps correspond au moment où les espèces commencent à migrer à l'intérieur du capillaire.

Arrête et Applique 0 V. Le bouton Arrête sert à stopper l'acquisition de données. Il peut être cliqué en tout temps. Si « Applique 0 V » est cochée, un potentiel de 0 V est appliqué à l'électrode de travail immédiatement au moment où l'acquisition est arrêtée. Le potentiostat construit ne comprenant pas de circuit d'essai, appliquer un potentiel de 0 V peut permettre de minimiser le risque d'endommager le circuit ou les électrodes.

Efface. Ce bouton permet d'effacer l'électrophérogramme de l'écran. Il est utilisé typiquement lorsqu'on veut effacer de l'écran un électrophérogramme dont l'acquisition est complétée. Cette commande peut toutefois fonctionner même si l'acquisition est en cours. Elle est alors utile pour effacer des données superflues et continuer l'acquisition.

Sauvegarde. Ce bouton permet d'enregistrer les données de l'électrophérogramme en cours. Le fichier doit être nommé, en respectant les conventions imposées par l'environnement utilisé. La sauvegarde est effectuée dans un format de fichier propre au logiciel d'acquisition ; les fichiers sauvegardés de cette manière ne peuvent pas être lus par d'autres programmes. Toutes les informations du panneau avant du VI principal sont sauvegardées: électrophérogramme, potentiel appliqué, résistance utilisée et notes.

Chargement. Ce bouton permet d'accéder à un fichier de données sauvegardé préalablement. Le fichier n'est pas ouvert dans le VI principal du logiciel d'acquisition de données : il devient plutôt accessible directement dans le module d'acquisition de données (automatiquement exécuté lorsqu'on clique sur le bouton). Ceci permet d'éviter de devoir cliquer sur « Analyse » après le chargement du fichier. Toutes les données présentes sur le panneau avant du VI principal seront

aussi affichées sur le module d'acquisition de données (décrit en détails à la section suivante).

Exportation. Ce bouton permet d'exporter l'électrophérogramme. L'exportation est effectuée en format texte. Deux colonnes de nombres sont exportées : la première correspondant au temps, la deuxième au courant mesuré. L'exportation n'est pas souvent nécessaire, le module d'analyse permettant d'évaluer efficacement la hauteur des pics et leur aire. L'exportation peut par exemple permettre d'utiliser Origin pour imprimer les résultats de plusieurs électrophérogrammes sur le même graphique.

Analyse. Ce bouton permet d'exécuter le module de traitement de données. Son fonctionnement est décrit en détails à la section suivante.

R (ohms). Ce contrôle sert à spécifier la résistance utilisée pour mesurer le courant sur le circuit du potentiostat. Il est important de s'assurer que la valeur de ce contrôle corresponde effectivement à celle du potentiostat. Le VI utilise cette valeur pour calculer le courant.

Notes. Du texte peut être entré ici. On peut par exemple inscrire les conditions expérimentales pour ne pas à avoir recours à des notes manuscrites. On peut alors voir toutes les conditions expérimentales sur le même écran que l'électrophérogramme, ce qui peut faciliter une interprétation rapide des résultats.

Sortie. Ce bouton sert à quitter le programme d'acquisition de données.

2.5.4.5 Description des indicateurs

L'électrophérogramme. L'électrophérogramme est l'indicateur le plus important. L'acquisition permettant l'affichage en temps réel, les données sont affichées à l'écran à mesure qu'elles sont acquises. Le minimum et le maximum des axes s'ajustent automatiquement pour afficher tous les points.

Des outils sont disponibles pour effectuer des opérations sur le graphique. L'outil loupe permet d'agrandir une partie de l'électrophérogramme. L'outil main permet de se déplacer sur l'électrophérogramme. D'autres outils sont disponibles pour changer l'apparence des axes (format de nombre utilisé, précision, etc.).

V (voltage). Cet indicateur affiche la valeur du voltage correspondant au dernier point affiché sur l'électrophérogramme.

I (courant). Cet indicateur affiche la valeur du courant (en nA) correspondant au dernier point affiché.

T écoulé (s). Cet indicateur indique le temps écoulé depuis le début de l'acquisition de données.

Surcharge si >0. Cet indicateur affiche normalement 0. Si une valeur autre que 0 est affichée, une erreur est décelée dans l'acquisition de données, et certains balayages demandés ne peuvent être effectués. Ceci peut être dû à une fréquence de balayage trop élevée : la carte et l'ordinateur ne peuvent alors capter et traiter les données à la vitesse demandée. Une diminution de la vitesse de balayage (accessible par la boîte de dialogue « Paramètres d'acquisition ») est alors à envisager. Les données peuvent être captées même quand cet indicateur indique une surcharge ; le nombre plus faible de balayages implique une précision plus faible sur les points acquis.

2.5.4.6 Module de traitement de données

Le module de traitement de données sert à estimer la hauteur et l'aire des pics obtenus. Cette mesure est à la base de l'analyse quantitative en électrophorèse capillaire ; à partir de celle-ci, on peut établir des courbes d'étalonnages permettant d'évaluer par la suite la concentration de solutions inconnues. De plus, le module permet d'obtenir précisément la position du maximum de chaque pic, rendant ainsi possible une analyse qualitative (le temps d'élution étant caractéristique de chaque espèce étudiée).

La description du fonctionnement du module d'acquisition de données suit. Le module est très similaire à celui utilisé par ABC pour analyser les volt-ampérogrammes. On peut accéder au module d'acquisition de données en cliquant sur le bouton « Analyse » du VI principal d'ÉC pour l'électrophérogramme à l'écran, ou en cliquant sur le bouton « Charger » pour choisir un fichier correspondant à l'électrophérogramme à analyser. La fenêtre du module d'acquisition de données est représentée sur la Figure 38:

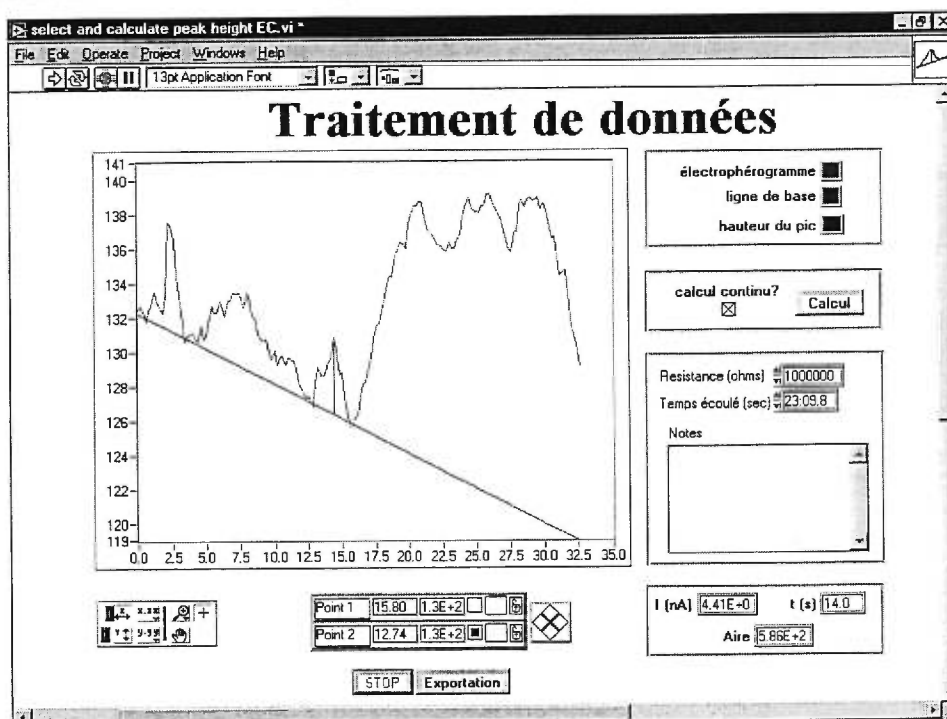


Figure 38_ Module de traitement de données

L'utilisation du module de traitement de données est très simple et intuitive. La ligne de base est tracée à l'aide des deux curseurs visibles sur l'électrophérogramme (la ligne passe automatiquement par les deux points définis par les curseurs). On peut voir sur l'électrophérogramme la location du pic (sa hauteur étant représentée par une ligne de couleur différente). Les valeurs qui correspondent au temps du pic, à sa hauteur ainsi qu'à son aire sont affichées dans le coin inférieur gauche de l'écran. L'aire est la surface totale comprise entre les deux curseurs : on doit donc comprendre uniquement un pic entre les deux curseurs si l'estimation quantitative de l'aire du pic est désirée.

La description de tous les contrôles utilisés dans le module d'acquisition de données suit :

Électrophérogramme. Ce contrôle sert à spécifier la couleur utilisée pour représenter l'électrophérogramme à l'écran. Lorsque l'utilisateur clique sur la couleur utilisée, un menu apparaît permettant de sélectionner n'importe quelle autre couleur disponible.

Ligne de base. Ce contrôle permet de sélectionner la couleur correspondant à la ligne de base spécifiée.

Hauteur de pic. Ce contrôle permet de spécifier la couleur utilisée pour tracer la hauteur du pic, c'est-à-dire l'espace compris entre le maximum du pic et la ligne de base.

Calcul continu. Ce contrôle détermine si les calculs sont effectués de façon continue, ou si le module attend l'ordre de calculer. Pour les ordinateurs relativement rapides, il est plus simple de laisser les calculs se faire en continu; ainsi l'utilisateur peut voir la hauteur et la position du maximum déterminés par le

module à mesure qu'il trace la ligne de base. La valeur du maximum, sa position et l'aire sont affichées uniquement lorsqu'on appuie sur le bouton « Calcul » une fois la ligne de base tracée si l'option n'est pas sélectionnée.

Résistance. Cet indicateur montre la résistance utilisée sur le potentiostat pour l'acquisition de données. Cette valeur correspond à celle entrée par l'utilisateur sur le panneau avant du VI principal.

Durée totale. La durée totale de l'acquisition de données est affichée sur cet indicateur.

Notes. Les notes, entrées sur le VI principal, sont affichées ici.

I (nA). Cet indicateur affiche, en nano-ampères, le courant correspondant au pic mesuré. Cette valeur peut servir à l'analyse quantitative.

t (s). Le temps correspondant au pic mesuré est affiché sur cet indicateur. Cette valeur est utile à l'analyse qualitative.

Aire. La valeur de l'aire considérée est affichée sur cet indicateur. À noter que l'aire considérée est la surface contenue entre la courbe et la ligne de base comprise entre les deux curseurs. Il convient donc que les deux curseurs soient uniquement aux bornes du pic à mesurer, sinon l'aire d'autres pics risquera d'être comprise dans la valeur de l'aire affichée par cet indicateur. L'aire est en unité nA s.

Stop. Ce bouton sert à quitter le module d'acquisition de données (retour à la fenêtre du VI principal).

Exportation. Ce bouton sert à exporter les données de l'électrophérogramme en cours. Son fonctionnement, ainsi que les fichiers exportés, sont identiques à ceux

obtenus par l'utilisation du bouton Exportation... du VI principal. Ce bouton est disponible au cas où l'exportation est désirée, mais n'aurait pas été effectuée immédiatement après l'acquisition de données. Les données sauvegardées étant accessibles par le module de traitement de données, leur exportation y est aussi possible.

3. Dosage de la lipoxigénase par techniques volt-ampérométriques

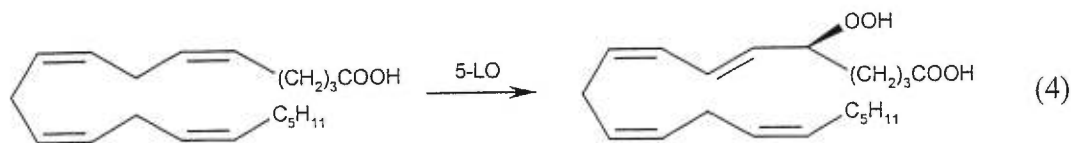
3.1 Introduction

La première partie de ce mémoire présentait un aperçu des différentes techniques électrochimiques, celles-ci étant essentielles à la compréhension des sections 2 et 3. La section 2 présentait deux logiciels de contrôle d'instrumentation et d'acquisition de données permettant d'effectuer des expériences de volt-ampérométrie. La présente section donne un exemple d'application des techniques volt-ampérométriques au dosage d'une enzyme, la lipoxigénase.

Cette section démontre que pour étudier l'activité de l'enzyme, des techniques telles la volt-ampérométrie différentielle impulsionnelle et la volt-ampérométrie à onde carrée ont été requises. La programmation du Pine AFCBP1 pour effectuer de telles expériences aurait été envisageable : la superposition d'impulsions (pour DPV) ou d'une onde carrée (pour SWV) permettant d'obtenir les ondes requises pour chacune des techniques.

3.2 Enzyme - rôle et importance

Les lipoxigénases sont une classe d'enzymes que l'on retrouve à l'état naturel dans les plantes et les animaux. Elles catalysent la dioxygénation des acides gras polyénoliques contenant au moins une unité structurale 1,4-cis,cis-pentadiène.³¹ L'équation suivante illustre l'action de la lipoxigénase-5 (5-LO) sur l'acide arachidonique:



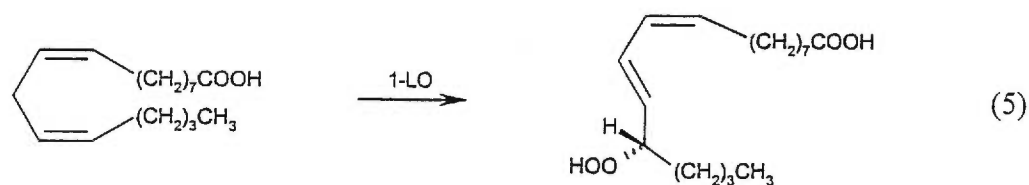
Le produit de cette réaction est le 5-HPETE, ou acide 5-hydroperoxyéicosatétraénoïque. Suivant l'oxydation de l'acide arachidonique par la lipoxygénase dans les cellules animales, plusieurs métabolites sont formés. Ces métabolites sont désignés collectivement par l'appellation d'écicosanoïdes. Les prostaglandines ont été les premiers membres des écosanoïdes à être identifiés et caractérisés. Elles sont responsables de nombreux processus inflammatoires relatifs à la douleur. Les leucotriènes sont une autre classe d'écicosanoïdes. Ces molécules sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques. Certaines d'entre elles peuvent causer la vasoconstriction et la bronchoconstriction.

Des recherches relient les leucotriènes à un très grand nombre de maladies. Elles sont impliquées dans des maladies ayant des contributions inflammatoires (notamment asthme, arthrite, allergies, psoriasis et autres maladies de peau, maladies inflammatoires du colon (maladie de Crohn) et certaines maladies inflammatoires (ischaemia du myocarde)).³²

Comme la 5-lipoxygénase et la cyclo-oxygénase sont impliquées à la base de ces processus, la recherche de modulateurs de l'activité enzymatique est d'un grand intérêt thérapeutique. La découverte d'inhibiteurs de ces enzymes peut avoir un impact médical important en permettant à l'industrie pharmaceutique de découvrir des « leads » permettant le développement de nouveaux médicaments. La sélection des inhibiteurs d'intérêt peut être effectuée au moyen du screening d'une banque de composés. Par cette technique, chaque molécule est testée à l'aide d'une méthode de dosage donnée ; si une propriété inhibitrice est décelée, le composé peut être étudié davantage pour confirmer les propriétés inhibitrices avant qu'une recherche clinique plus poussée puisse être amorcée.

Plusieurs méthodes de dosage de l'activité de la lipoxigénase ont été développées au cours des dernières années. La section suivante donne un aperçu des avantages et des inconvénients associés à chacune de ces méthodes. Les méthodes que l'on propose sont ensuite présentées, avec les résultats de recherche obtenus.

Les recherches cliniques sont normalement exécutées sur la lipoxigénase (ou la cyclo-oxygénase) de souche humaine. Comme la présente recherche est avant tout un travail préliminaire, la décision de travailler avec la lipoxigénase-1 (de souche végétale, extraite de la fève de soya) a été prise. Le substrat naturel de cet enzyme est l'acide linoléique, qui est converti en 13-HPOD ou acide 13-hydroperoxy-9,11-octadécadiénoïque par l'équation suivante³³ :



3.3 Travail précédent

3.3.1 Polarographie

Un grand nombre de méthodes électrochimiques publiées au sujet du dosage de la lipoxigénase font appel à la polarographie (volt-ampérométrie utilisant une électrode de mercure comme électrode de travail), pour doser le substrat³⁴ ou le produit³⁵ de la réaction enzymatique, chacun de ces dosages pouvant permettre d'établir l'activité de la lipoxigénase.

Ces méthodes présentent certains avantages par rapport aux méthodes spectrophotométriques : elles sont utilisables en milieu turbide (condition souvent observée expérimentalement, la solubilité du substrat étant faible) sans addition de

surfactant. L'utilisation du mercure permet de travailler à des potentiels suffisamment négatifs pour effectuer la réduction du substrat grâce à la surtension élevée associée à la réduction des ions H^+ qui permet de réaliser la réaction dans la cellule (la réduction survient à $-1.12 \text{ V VS Ag/AgCl}$)³⁶.

Plusieurs désavantages sont cependant associés aux techniques polarographiques. L'usage du mercure est à souligner : pour effectuer des procédures de screening, la quantité totale de métal liquide à utiliser devient rapidement importante. Le mercure est une neuro-toxine dangereuse : une exposition trop grande à ce produit peut causer une démence progressive, se traduisant souvent par une grande agressivité. Des pertes de mémoire sont également à redouter, de même que des spasmes musculaires. La toxicité aigüe est également inquiétante : le mercure peut s'avérer fatal si inhalé ou ingéré, et est nocif par contact percutané³⁷.

Outre la toxicité du mercure, plusieurs autres problèmes sont communs aux méthodes polarographiques. Dans le cas du dosage du produit de la réaction enzymatique (peroxyde pouvant être réduit au voisinage de 0 V VS Ag / AgCl), le barbotage d'un gaz inerte est requis, l'oxygène présent naturellement en solution pouvant être réduit dans cette zone de potentiel³⁸. La technique polarographique est lente dans le cas du dosage du produit ; pour obtenir des résultats acceptables, 200 secondes sont requises par balayage.

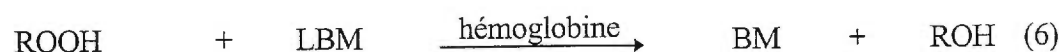
3.3.2 Absorption en UV

La spectrophotométrie est la méthode de routine pour effectuer l'essai de l'enzyme³⁹. Le produit principal de la réaction enzymatique, le 13-HPOD ou 15-HPETE selon la souche d'enzyme utilisée, absorbent dans l'ultra-violet à 234 nm. La méthode a comme principal avantage d'être simple et rapide (la détection du produit est instantanée).

Plusieurs problèmes sont cependant associés à la technique : un manque de sélectivité (beaucoup d'espèces, notamment les protéines, absorbent à 234 nm). La méthode ne présente pas une bonne sensibilité ou n'est tout simplement pas utilisable en milieu turbide.

3.3.3 Méthode d'absorption indirecte

La méthode d'absorption indirecte est une variation de la méthode d'absorption en UV⁴⁰. L'hydroperoxyde formé par la réaction enzymatique peut réagir, en présence d'hémoglobine, rapidement et complètement avec le benzoyl-leuco bleu méthylène pour former du bleu méthylène, selon l'équation suivante :



où ROOH est l'hydroperoxyde, LBM le benzoyl-leuco bleu méthylène, BM le bleu méthylène et ROH l'alcool formé.

Le bleu méthylène (BM) formé par cette réaction absorbant très fortement à 660 nm, il peut facilement être dosé par spectrophotométrie.

L'avantage principal d'utiliser cette méthode par rapport à l'absorption UV directe est sa plus grande sélectivité : les peroxydes sont les seules espèces dosées. La procédure est cependant plus longue, et ne peut pas être utilisée en milieu turbide.

Tout composé bloquant la réaction (6) sera détecté par la méthode. Les molécules possédant des propriétés anti-oxydantes (réducteurs) risquent par conséquent de donner un signal positif. La sélectivité de la méthode est donc réduite à cause de cette possibilité d'interférence.

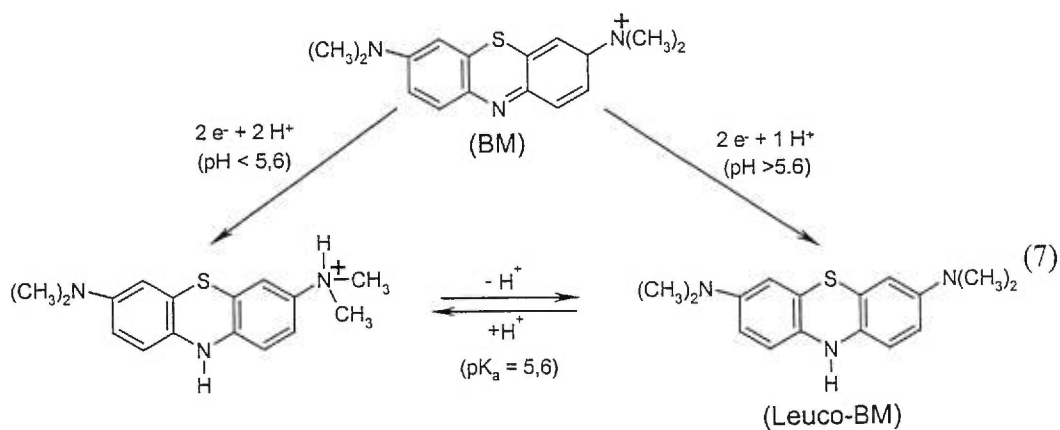
3.4 Méthodes proposées

3.4.1 Utilisation directe des électrodes solides

La plus simple approche pour effectuer l'essai de l'enzyme par électrochimie sans utiliser le mercure consiste à tenter d'adapter une des méthodes polarographiques en remplaçant Hg par une électrode solide. L'utilisation des électrodes de carbone, d'or et de platine a été envisagée. Le dosage du substrat par cette méthode s'est avéré impossible. En effet, sa réduction survient uniquement à des potentiels très négatifs (autour de -1.1/-1.2 V VS Ag / AgCl) ; à ces potentiels commence l'électrolyse de l'eau. Le dosage s'avère impossible, la surtension associée aux électrodes solides étant très inférieure à celle du mercure (à titre indicatif, l'électrode de platine possède une surtension de 0.015 V et l'électrode d'or de 0.475V, alors que le mercure possède une surtension inégalée de 0.879V)⁴¹, le dosage s'avère impossible.

3.4.2 Dosage du BM par électrochimie

La méthode d'absorption indirecte peut être adaptée à l'électrochimie. Le BM est une espèce électro-active, pouvant être facilement réduite à la surface des électrodes solides ($E^{\circ} = -242$ mV). Le BM est impliqué dans les équilibres suivants⁴² :



Le dosage du BM à l'aide d'une électrode solide devient donc possible, le potentiel où le BM est réduit étant facilement accessible à l'aide de n'importe quelle électrode solide. La concentration de BM étant liée à celle de l'hydroperoxyde produit enzymatiquement, l'activité de l'enzyme peut être déterminée.

La méthode proposée par notre laboratoire est d'adapter la méthode d'absorption UV-visible indirecte à l'électrochimie. Le système doit être validé (en prouvant que des inhibiteurs connus de la lipoxygénase peuvent être détectés par la méthode). Des conditions expérimentales doivent être déterminées pour que l'essai puisse être effectué avec une sélectivité et une sensibilité acceptable.

La possibilité d'utiliser un système à flot continu (FIA) doit être évaluée : un tel système permettrait de démontrer que l'automatisation de l'essai est possible. L'adsorption, problème propre aux électrodes solides, doit être contrôlée pour ne pas nuire à l'automatisation de la méthode.

3.5 *Partie expérimentale*

3.5.1 Réactifs utilisés

Tous les réactifs utilisés ont été choisis de la plus grande pureté disponible. L'hémoglobine (de souche bovine), la myoglobine (provenant du muscle squelettique du cheval), le quercetin (dihydrate), le bleu méthylène (trihydraté) et la lipoxygénase (type 1B, 110 600 unités / mg solide, 187 400 unités / mg protéine) ont été obtenus de Sigma. L'acide linoléique, le dithizone et le tampon TRIS (tris[hydroxyméthyl]aminométhane) ont été acquis d'Aldrich; le phosphate de sodium (monobasique), le borax et l'acide borique d'Anachemia. Le phosphate de sodium (dibasique), l'acétate de sodium, le N,N-diméthylformamide et l'éther ont été achetés de ACP. L'acide acétique a été acquis de Biopharm. Le curcumin,

l'acide caféinique, la phénidone, le NDGA (acide nordihydroguaiarétique) et l'esculin ont été obtenus de Biomol. Le benzoyl leuco bleu méthylène provenait de TCI (Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.).

3.5.2 Conditions typiques de l'essai

Des solutions désignées par A et B ont été utilisées tout au long des expériences. La solution A a été obtenue en diluant 38.2 μL d'acide linoléique pur dans 250 mL de solution tampon, pour donner une solution de 0.5 mM d'acide linoléique. La solution B a été préparée en ajoutant 5 mg de bezoyl-leuco bleu méthylène (d'abord solubilisé à l'aide de 8 mL de diméthylformamide) à 92.000 mL de solution tampon contenant 5.5 mg de myoglobine pour donner une solution 0.12 mM de LBM. Le tampon utilisé a été changé au cours des expériences.

Les expériences de volt-ampérométrie différentielle impulsionnelle ont été effectuées en balayant entre 100 et -400 mV VS électrode de Ag/AgCl, en utilisant une amplitude d'impulsion de 100 mV et un temps mort de 2 secondes. Une vitesse de balayage de 5 mV par seconde a été utilisée. Les expériences de volt-ampérométrie à onde carrée ont été effectuées dans la même fenêtre de potentiel. Pour celles-ci, la hauteur de la marche (step height) a été fixée à 5 mV, l'amplitude d'impulsion à 50 mV et la fréquence à 120 Hz. Ces paramètres permettent l'obtention d'un balayage en moins d'une seconde. Pour les essais avec le système à injection, le volume d'injection utilisé a été de 50 μL , le diamètre interne des tubes de 0.25 mm, la longueur séparant l'injecteur du détecteur SWV 75 cm (150 cm jusqu'au détecteur UV-VIS). Le débit a été fixé à 0.5 mL / min à l'aide d'une pompe péristaltique (Rainin Co.). Pour tous les essais du système à flot continu, un fichier SWV fut sauvegardé à chaque 2 secondes.

3.5.3 Appareillage

Les expériences de volt-ampérométrie ont été effectuées sur un système BAS-100B/W (BioAnalytical Systems). Les essais spectrophotométriques ont été effectués à l'aide d'un spectrophotomètre Hitachi 100-20 équipé d'une cellule à flot continu.

3.5.4 Conditions d'analyse

3.5.4.1 Détection du bleu méthylène par électrochimie

Les solutions A et B ont été préparées dans un tampon phosphate (0.05 M, pH 6.0). La solution d'essai a été obtenue en combinant 100 μ L de solution de lipoxygénase (31 000 unités / mL) avec 2.000 mL de solution B. 1.000 mL de solution A a ensuite été ajouté. L'activité résultante de lipoxygénase était de 1000 unités / mL. La réaction a été effectuée durant une heure. Avant d'effectuer les expériences de volt-ampérométrie, de l'azote sans oxygène a été barboté dans la solution pendant 5 minutes. Des balayages de DPV et de SWV ont été effectués sur électrode de Pt, en utilisant les conditions décrites plus haut.

Un blanc, contenant tous les réactifs à l'exception de la lipoxygénase, a été utilisé comme solution de contrôle.

3.5.4.2 Détection de l'activité enzymatique par la détection du bleu méthylène

3.5.4.2.1 Variation du signal du bleu méthylène en fonction de l'activité enzymatique

Les solutions A et B ont été préparées en utilisant un tampon TRIS (0.05 M, pH 9.0). Plusieurs essais ont été effectués avec des activités d'enzyme différentes (variées par dilution de la solution de lipoxigénase). Les réactifs ont été combinés de la même manière qu'à la section précédente, avec le même temps de réaction et les mêmes paramètres de DPV. Les activités résultantes des solutions d'essai en terme de lipoxigénase étaient comprises entre 0 (blanc) et 1000 unités / mL.

3.5.4.2.2 Détection d'inhibiteurs de la lipoxigénase

10 μ L d'éthanol, contenant des quantités variables de l'inhibiteur quercétin, ont été ajoutés à la solution B. L'addition d'enzyme (activité résultante de 1000 unités / mL) a ensuite été effectuée, suivie par l'addition de 1.000 mL de solution A. La procédure expérimentale de la section précédente a été suivie. La concentration résultante des solutions d'essai en terme d'inhibiteur se situait entre 0 (blanc) et 23 μ M.

3.5.4.3 Recherche des paramètres optimaux

3.5.4.3.1 Effet du pH sur le système

Des conditions similaires à celles de la section précédente ont été utilisées (aucun inhibiteur). Les solutions A et B ont été préparées dans plusieurs tampons. L'acétate de sodium a été utilisé pour les pH inférieurs à 6 et TRIS pour les pH supérieurs. L'intervalle de pH considéré allait de pH = 3 jusqu'à pH = 13.

Une solution de blanc (ne contenant pas d'enzyme) a été préparée à chaque pH. Des balayages de DPV avec les conditions typiques ont été effectués sur les solutions.

3.5.4.3.2 Effet de la force ionique sur le système

Les solutions A et B ont été préparées dans une solution tampon phosphate pH = 6.0 de différentes forces ioniques, obtenues par dilutions (aucun NaCl n'a été ajouté au tampon). La combinaison des solutions et de l'enzyme a été effectuée de la façon établie plus haut. La concentration résultante de tampon phosphate couvrait un intervalle de 5 mM jusqu'à 400 mM. SWV a été utilisée avec les conditions décrites. Pour chaque concentration, le balayage d'un blanc (ne contenant pas d'enzyme) a été effectué.

3.5.4.4 Possibilité d'automatisation du système

3.5.4.4.1 Essais préliminaires avec le système d'injection

Des étalons de bleu méthylène (concentration variant entre 0 et 300 μM) ont été préparés dans une solution tampon de phosphate 0.05 M, pH = 6.0. Ces solutions ont été injectées dans le système à flot continu. Le tampon phosphate 0.05 M a été utilisé comme éluant. Les paramètres associés au système de FIA sont décrits à la section « Conditions typiques de l'essai ». L'électrode de travail était orientée en position « channel ».

3.5.4.4.2 Essai de l'activité de la lipoxigénase avec le système FIA

Les solutions A et B ont été préparées dans une solution tampon phosphate (pH = 6.0, 0.05M) . 10 μL d'éthanol, contenant des quantités variables de la quercetin, ont été combinés à 2.000 mL de la solution B pour chaque solution d'essai (pour le

blanc, la concentration de quercetin était nulle). 1.000 mL de solution A a ensuite été ajouté, puis l'addition d'enzyme a été effectuée (activité résultante de 1000 unités / mL). L'injection de solution d'essai a été effectuée après 1 heure de temps de réaction.

3.5.4.5 Problème d'adsorption

3.5.4.5.1 Étude de l'adsorption

Les solutions A et B ont été préparées dans une solution tampon phosphate (pH = 6.0, 0.05M). La solution utilisée a été obtenue en combinant 1.000 mL de solution A et 2.000 mL de B, puis en ajoutant l'enzyme pour obtenir une activité résultante de 1000 unités / mL. Pour étudier l'adsorption de façon préliminaire, la volt-ampérométrie différentielle impulsionnelle a été utilisée, avec les paramètres décrits à la section « Conditions typiques de l'essai ». 10 balayages successifs ont été effectués sur une même solution, sans aucun polissage d'électrode.

L'adsorption dans le système à flot continu a été étudiée (la solution d'essai a été préparée de la même manière que pour l'expérience préliminaire). Une solution d'essai contenant 80 μM / L de quercetin a été utilisée. 17 injections successives ont été utilisées pour chacune des solutions.

3.5.4.5.2 Screening d'inhibiteurs par la méthode à flot continu

Des essais pour plusieurs inhibiteurs ont été effectués de la façon suivante : l'inhibiteur a tout d'abord été solubilisé (dans une quantité minimale d'éthanol, d'eau ou de DMF, dépendant de sa solubilité). Une quantité variable de la solution d'inhibiteur a été ajoutée à 2.000 mL de solution B. 1.000 mL de solution A a ensuite été ajoutée, puis l'enzyme pour donner une activité résultante de 1000 unités / mL. Dans chaque cas, une solution de blanc (contenant l'enzyme mais ne

contenant pas d'inhibiteur) a été préparée. Les études ont été effectuées avec le système SWV-FIA. Des injections alternées ont été utilisées pour toutes les expériences : après l'injection de chaque solution d'essai, une solution de blanc était injectée.

3.5.4.6 Propriétés anti-oxydantes des inhibiteurs

La solution A ainsi que l'enzyme n'ont pas été utilisées dans cette partie. La solution B a été préparée dans un tampon phosphate (pH = 6.0 ; 0.05 M). 7 solutions d'essai différentes ont été préparées en ajoutant les inhibiteurs à 3 mL de solution B. Les solutions d'essais avaient des concentrations d'inhibiteur résultantes suivantes :

Dithizone : 0.33 mM

Curcumin : 81 nM

Acide caféine : 9.7 nM

Quercetin : 19 nM

Phénidone : 16 nM

Esculine : 3.2 nM

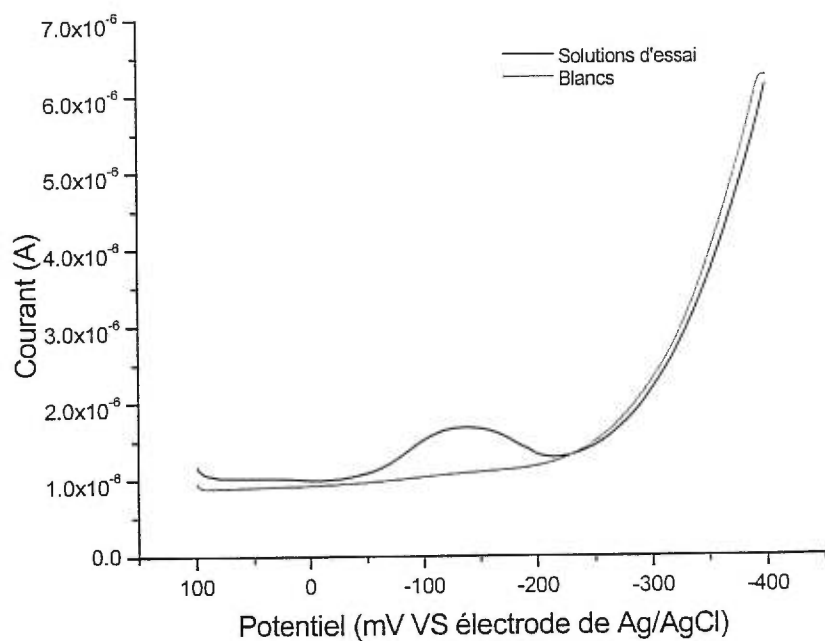
NDGA : 2.4 nM

Ces concentrations ont été choisies à l'aide des résultats des expériences précédentes. 13.8 μ L d'une solution de 13-HPOD 2.25 mM (préparée selon la littérature⁴³) ont été ajoutés à chaque solution d'essai, pour donner des solutions résultantes d'environ 10 μ M en terme de 13-HPOD. Les blancs ont été obtenus en combinant tous les réactifs, à l'exception des inhibiteurs.

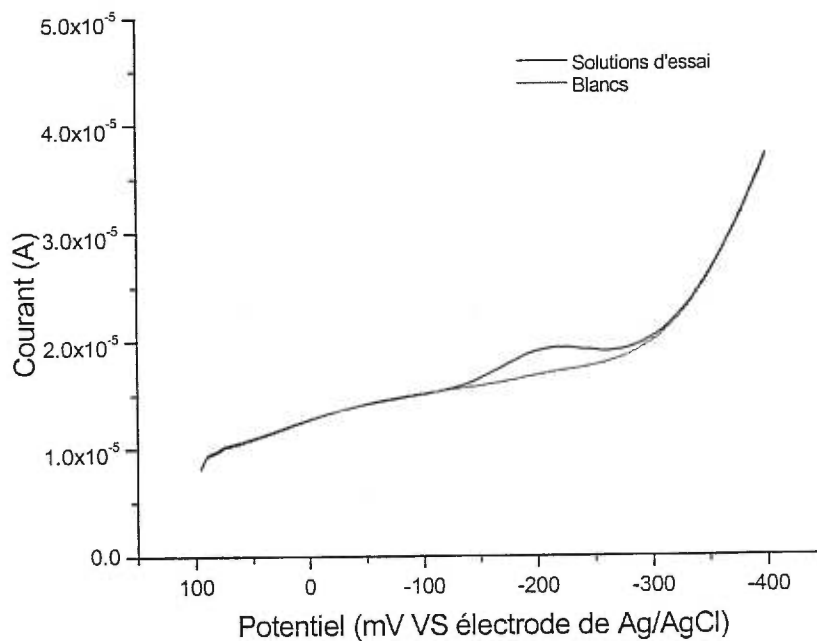
3.6 Résultats et discussion

3.6.1 Détection du bleu méthylène par électrochimie

La conversion du benzoyl- leuco bleu méthylène en bleu méthylène par 13-HPOD requiert l'hémoglobine comme catalyseur⁴⁴. L'hémoglobine a cependant été identifiée comme électro-active près du potentiel normal de réduction du bleu méthylène, masquant complètement le pic de celui-ci. L'essai électrochimique de l'enzyme est donc impossible à effectuer avec l'hémoglobine. Le remplacement de l'hémoglobine par la myoglobine est possible, leur activité catalytique étant similaire⁴⁵. Expérimentalement (Figure 39), on a pu constater que la myoglobine n'est pas électroactive dans la fenêtre de potentiel utilisée pour l'expérience. Le bleu méthylène formé par la réaction enzymatique a donc pu être dosé par électrochimie.



(a)



(b)

Figure 39_ Volt-ampérogrammes du bleu méthylène produit enzymatiquement (1000 unités lipoxygénase / mL), par DPV (a) et par SWV (b).

Les résultats (Figure 39) démontrent que le bleu méthylène peut être facilement réduit dans la fenêtre de potentiel utilisé, et qu'un seul pic est visible sur les volt-ampérogrammes. Aucune autre espèce ne semble interférer avec le dosage même si un nombre relativement grand d'espèces chimiques sont impliquées dans l'essai.

La Figure 39 (b) permet également de constater qu'il n'y a aucun pic associé à la réaction inverse ; la réoxydation à la surface de l'électrode n'est pas observée. La réduction du bleu méthylène est une réaction irréversible, du moins pour la vitesse de balayage utilisée.

3.6.2 Détection de l'activité enzymatique par le bleu méthylène

3.6.2.1 Variation du signal du bleu méthylène en fonction de l'activité enzymatique

La variation de la quantité d'enzyme utilisée pour l'essai permet la confirmation que le bleu méthylène dosé est bien fonction de l'activité enzymatique. Le pic de réduction situé près de -215 mV VS électrode de Ag/AgCl a été utilisé pour obtenir chaque mesure. Les résultats sont démontrés sur la Figure 40.

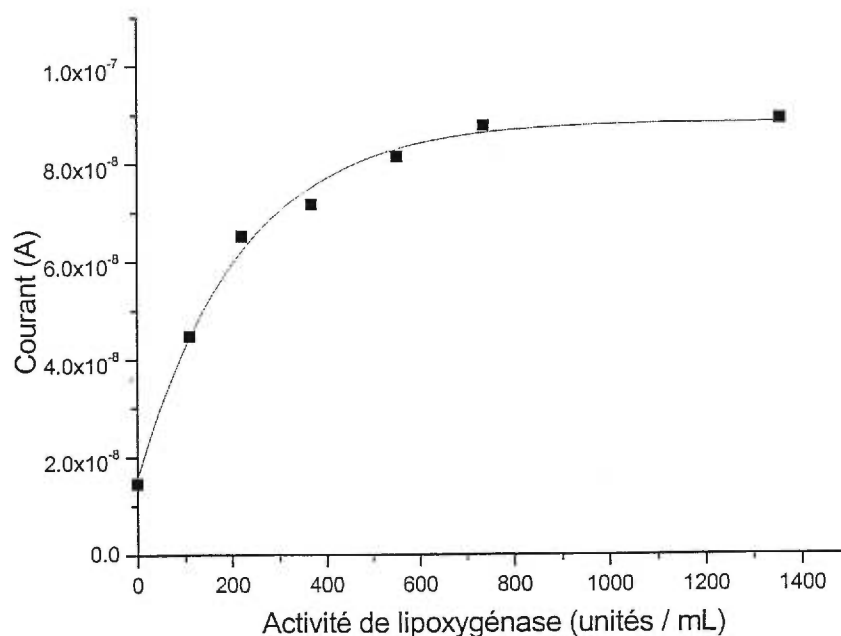


Figure 40_ Variation du pic correspondant à la réduction électrochimique (par DPV) du bleu méthylène en fonction de l'activité enzymatique. Le trait représente une simulation de la théorie de Michaelis-Menten

Les résultats démontrent que le courant augmente lorsque l'activité de la lipoxygénase est augmentée, en suivant la courbe enzyme-substrat prédite par la théorie de Michaelis-Menten. La possibilité de détecter les inhibiteurs de la lipoxygénase peut maintenant être envisagée, la relation entre le signal associé au méthylène bleu et l'activité de l'enzyme étant démontrée.

3.6.2.2 Détection d'inhibiteurs de la lipoxygénase

Pour confirmer la possibilité de détecter les inhibiteurs à l'aide de la technique, plusieurs solutions contenant des quantités différentes de quercétin, un inhibiteur connu de la lipoxygénase, ont été analysées à l'aide de DPV. Une cinétique typique enzyme-substrat a de nouveau été observée : le signal de BM est fonction de l'activité de la lipoxygénase, et le signal plafonne à des pourcentages élevés de

lipoxygénase. Pour représenter le pouvoir d'inhibition des produits, on peut facilement calculer le pourcentage d'inhibition.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Signal du blanc} - \text{Signal de l'analyte}}{\text{Signal du blanc}} \quad (8)$$

Le signal du blanc correspond au signal de la solution sans aucun inhibiteur ; le signal de l'analyte correspond au signal de la solution contenant l'inhibiteur.

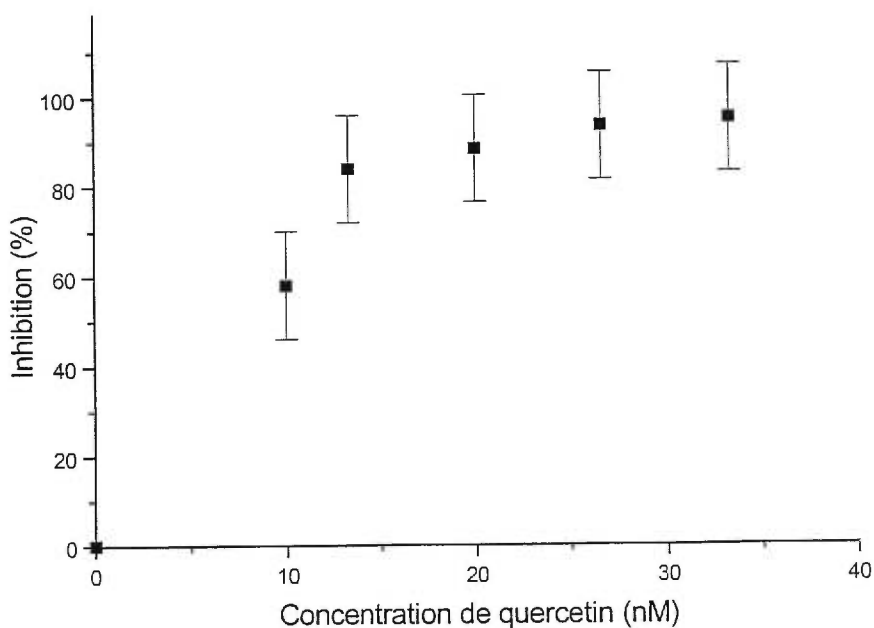


Figure 41_ Variation du pic de bleu méthylène en fonction de la concentration d'inhibiteur.

La Figure 41 a été obtenue en moyennant deux expériences. On peut voir sur la Figure 41 que l'inhibition augmente rapidement avec la concentration d'inhibiteur. L'inhibiteur empêche l'enzyme d'effectuer la conversion du substrat (acide linoléique) en produit (13-HPOD). Le 13-HPOD n'étant plus disponible, la conversion du LBM en BM devient impossible.

3.6.3 Recherche des paramètres optimaux

3.6.3.1 Effet du pH sur le système

L'optimisation des paramètres du système est une étape importante une fois la possibilité de détecter les inhibiteurs de la lipoxigénase démontrée. En effet, un système donnant un signal électrochimique plus élevé pour une solution d'analyse donnée sera probablement plus sensible qu'un système donnant un signal plus faible. Une plus grande sensibilité implique souvent une plus grande précision d'analyse. Le premier paramètre du système ayant été maximisé est le pH. Il est difficile *a priori* de prédire le pH optimal du système à partir de la littérature parce que deux réactions distinctes sont impliquées. La première réaction (conversion du substrat par l'enzyme), s'effectue à un pH optimal de 9 (correspondant au maximum de l'activité de l'enzyme) pour la lipoxigénase de souche végétale. La conversion du LBM en MB s'effectue cependant à des pH plus faibles (elle peut même survenir spontanément en milieu acide, ce qui n'est pas souhaitable pour l'analyse). Une étude pour déterminer le pH optimal du système a été effectuée. Les résultats sont illustrés sur la Figure 42:

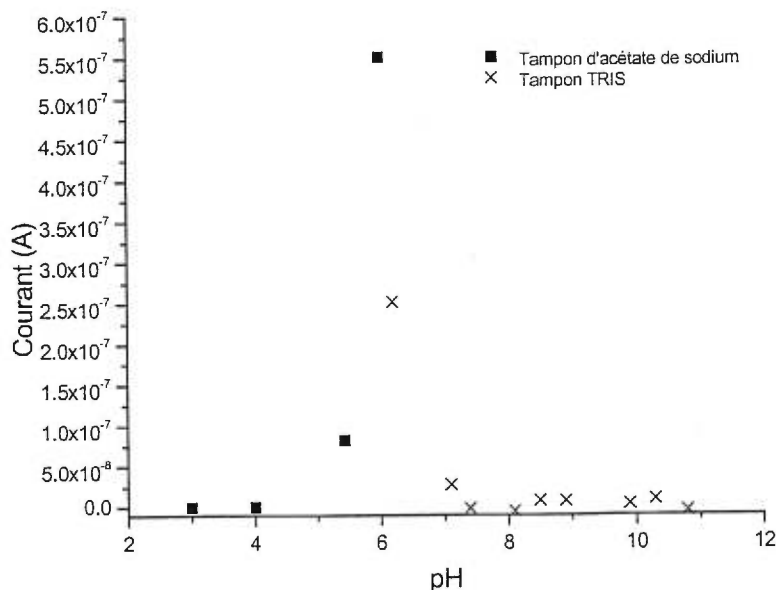


Figure 42_ Effet du pH sur le système

Chaque point expérimental de la figure précédente a été établi à partir de la différence du signal associé aux solutions d'essai (contenant une quantité constante d'enzyme) et de blancs (ne contenant aucune enzyme).

Il faut souligner qu'un courant de réduction très important est observé pour les solutions acides, autant pour les blancs que pour les solutions d'essai. La différence entre les deux signaux est cependant pratiquement nulle. Lorsque le pH est augmenté, une différence entre les deux courants devient observable. À un pH voisin de 5.5, la différence entre les deux courants de diffusion commence à être considérable. Un maximum est observé à un pH de 6. Ce maximum est sans doute dû à la facilité de conversion de LBM en BM à ce pH. L'enzyme est manifestement encore active à ce pH (ce qui explique le fait que la *différence* de signaux est très grande). L'activité décroît à des pH supérieurs à 6, probablement parce que la conversion du LBM en BM devient plus difficile à pH élevé. Même si une quantité importante de 13-HPOD est produite à ce pH, très peu de MB peut être dosé à la surface de l'électrode. Un maximum de faible amplitude est observable sur la figure au voisinage de pH 9. Il est intéressant de constater que ce pH correspond au maximum de l'activité de la lipoxigénase extraite de la fève de soya. La difficulté de convertir le LBM en BM à ce pH pourrait expliquer la faible amplitude de ce maximum.

Le pH d'opération du système a été fixé à 6 pour toutes les expériences subséquentes. Ce n'est pas par hasard que ce pH a été utilisé également pour les expériences préliminaire : c'est à ce pH que les auteurs de la méthode d'adsorption UV-VIS indirecte ont travaillé⁴⁶.

3.6.3.2 Effet de la force ionique sur le système

Une fois le pH du système optimisé, la force ionique permettant de maximiser la sensibilité du système peut être déterminée. La force ionique influence fortement l'activité enzymatique. Des expériences ont été effectuées pour estimer cet effet sur l'essai.

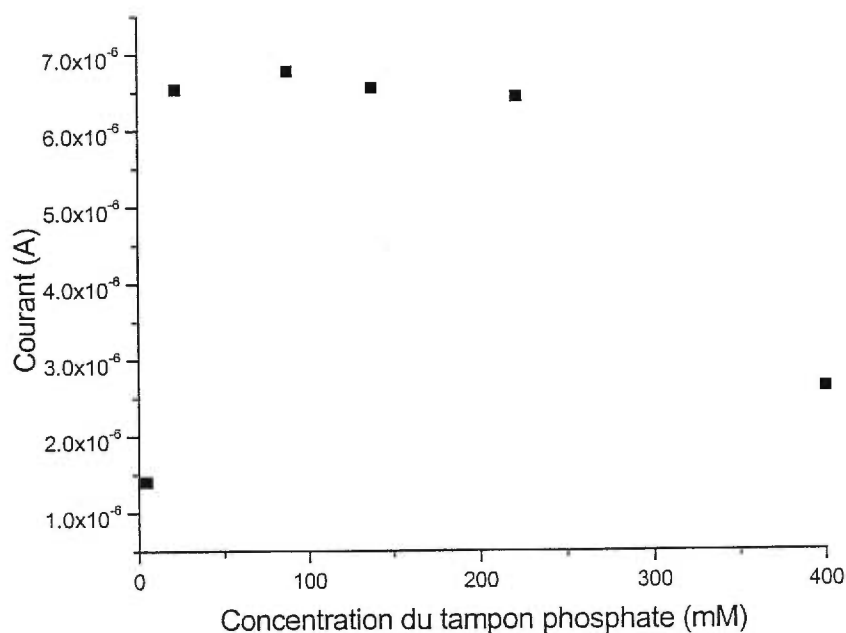


Figure 43_ Effet de la force ionique sur le système

Les résultats montrent une diminution lente du courant lorsque la force ionique est augmentée au-delà de 100 mM. Ceci pourrait être dû à une déstabilisation de la structure tertiaire de l'enzyme à force ionique importante ; les ions réussissent alors à modifier la structure même de l'enzyme, diminuant sa capacité à convertir le substrat en produit. D'autre part, l'attraction de certains ions pour le site métallique actif de l'enzyme pourrait rendre l'atteinte du site actif par le substrat difficile, réduisant ainsi le courant observé. On peut constater une diminution dramatique du courant à force ionique faible ; ceci est probablement dû à l'électro-répulsion du bleu méthylène de la surface de platine de l'électrode, la concentration faible d'ions

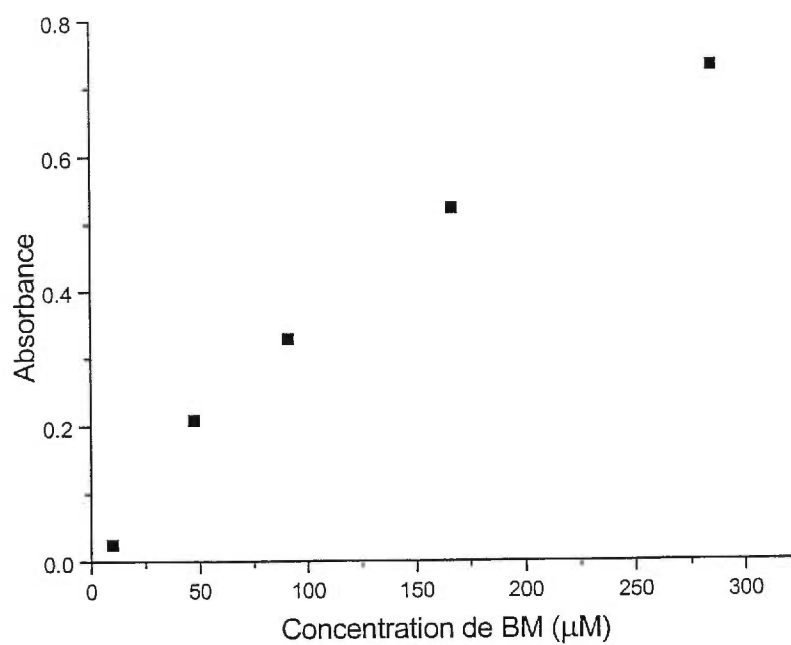
empêchant les molécules d'atteindre la surface de l'électrode par un processus contrôlé par la diffusion.

À la lumière de ces résultats, il s'avère que les solutions tampons doivent avoir la force ionique la plus faible possible pour obtenir un signal maximal, mais elle doit être tout de même assez forte pour permettre aux molécules de bleu méthylène de parvenir à la surface de l'électrode par un processus de diffusion. Une force ionique de 50 mM a été sélectionnée pour les expériences subséquentes.

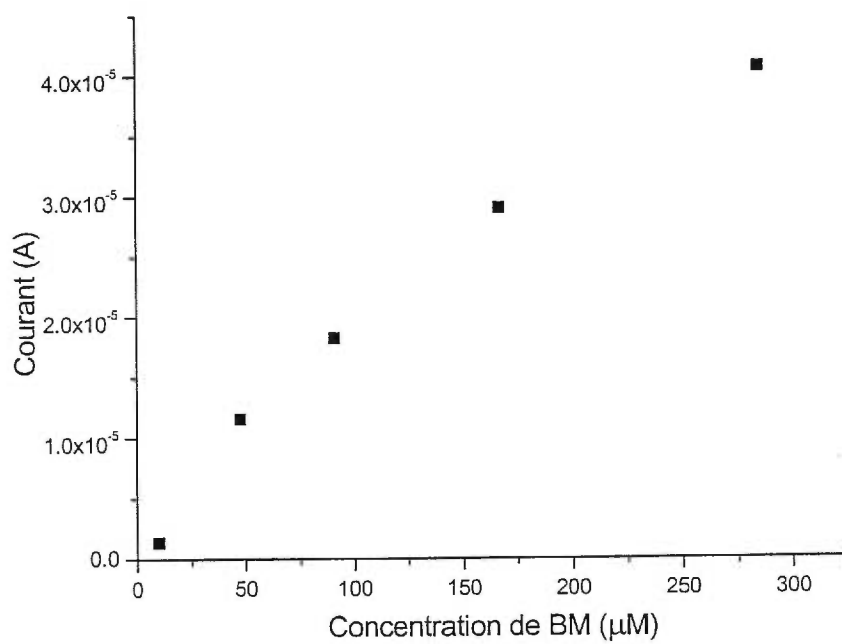
3.6.4 Possibilité d'automatisation du système

3.6.4.1 Essais préliminaires avec le système d'injection

L'objectif du projet étant l'élaboration d'une procédure de screening pour la détermination des modulateurs de l'activité enzymatiques, l'automatisation du système est une étape importante. Il est très difficile d'élaborer une procédure sans intervention humaine constante faisant appel à des cellules statiques. Un système à flot continu très simple a donc été assemblé. Pour confirmer la fonctionnalité du système et du détecteur utilisé, des injections de bleu méthylène ont été effectuées. Des balayages continus devant être effectués pour la détection du produit par ce système, toutes les expériences subséquentes ont été effectuées par SWV, qui permet une vitesse de balayage suffisante. Pour s'assurer que le signal du BM est bien détecté par SWV, un détecteur UV-VIS a été utilisé simultanément. La comparaison des régressions linéaires des courbes obtenues par chacune des méthodes peut permettre d'établir si une des deux méthodes est plus précise. Les résultats de cette expérience préliminaire sont illustrés sur la Figure 44.



(a)



(b)

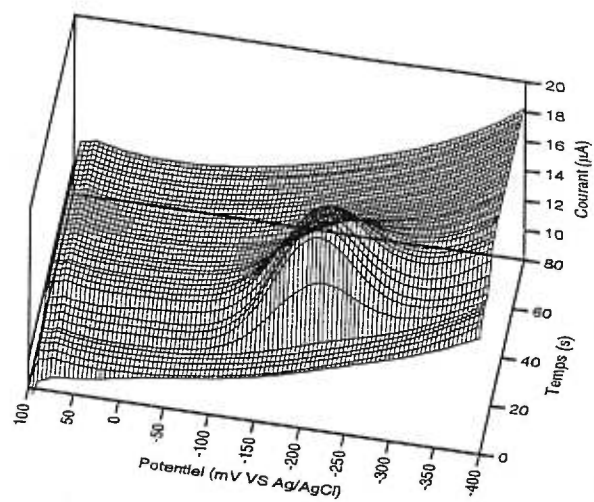
Figure 44_ Dosage du bleu méthylène avec l'aide du système à flot continu par (a) absorption UV-VIS à 660 nm et par (b) le pic de volt-ampérométrie près de -0.210 V.

La méthode spectrophotométrique donne un R^2 de 0.994, la volt-ampérométrie à onde carrée donnant un coefficient de 0.999. On peut conclure que la possibilité d'utiliser SWV pour faire la détection en système de flot continu est réelle et qu'elle peut permettre d'atteindre une excellente linéarité.

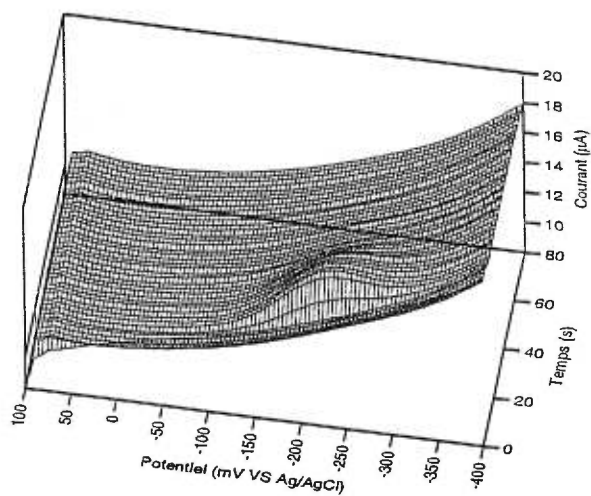
3.6.4.2 Essai de l'activité de la lipoxigénase avec le système FIA

Des expériences ont été effectuées pour démontrer que le système de FIA est utilisable pour doser les modulateurs de l'activité enzymatique de la lipoxigénase. Comme une quantité de temps importante est requise pour obtenir une bonne quantité de BM, la réaction a été effectuée à l'extérieur du système de FIA. Les solutions d'essais entières ont été injectées au système.

Pour déterminer le signal maximal associé à chacune des injections, des tracés tridimensionnels ont été utilisés. Sur les figures suivantes, l'axe des X représente le potentiel, l'axe des Y représente le temps depuis le moment de l'injection, et l'axe des Z représente le courant mesuré à l'électrode de travail. Le point utilisé pour calculer l'inhibition correspond au maximum du pic situé près de -210 mV et 20 secondes.



(a)



(b)

Figure 45_ Tracés 3D correspondant à une solution de blanc (a) et à une solution contenant de l'inhibiteur (b)

La Figure 45 permet de constater qu'il est facile d'estimer avec une bonne précision le maximum du pic avec la fréquence d'échantillonnage permise par le système d'acquisition de données. Pour chaque essai effectué à l'aide du système à FIA-SWV, la valeur maximale de chaque pic a été estimée, pour permettre de construire des courbes d'inhibition en variant la quantité d'inhibiteur utilisé, comme démontré sur la figure suivante. Pour des raisons de comparaison et de validation, la détection UV-VIS a été effectuée simultanément, et le pourcentage d'inhibition a été calculé à l'aide de chacune des deux méthodes.

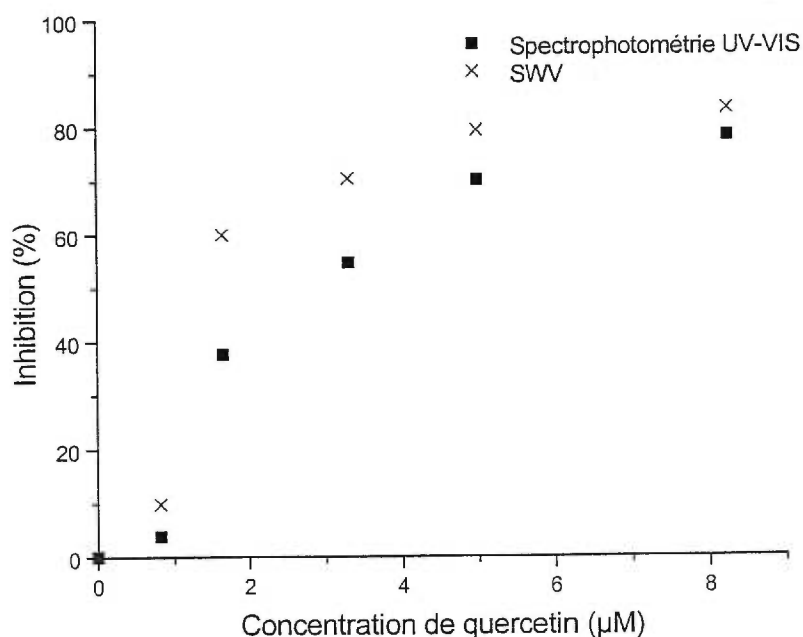


Figure 46_ Pourcentage d'inhibition calculé à partir du pic correspondant au bleu méthylène, par SWV et par spectrophotométrie UV-VIS.

La volt-ampérométrie à onde carrée et la spectrophotométrie UV-VIS donnent des résultats comparables. Une cinétique enzyme-substrat typique est observée, la décroissance du pic SWV indiquant que le quercétin est un inhibiteur de la lipoxygénase pouvant être détecté par la méthode électrochimique et par la méthode

spectrophotométrique. Même si la méthode FIA-SWV semble donner de bons résultats, une étude complète doit inclure des résultats relatifs à la stabilité du système de détection électrochimique en fonction du temps. On sait que les électrodes solides sont trop tristement reconnues pour leur tendance à adsorber un nombre important de composés, empoisonnant rapidement la surface de l'électrode⁴⁷. Ceci cause une décroissance du signal observé en fonction du temps, et affecte la reproductibilité des résultats.

3.6.5 Problème d'adsorption

3.6.5.1 Détermination de l'adsorption

Une des raisons motivant le choix d'utiliser SWV plutôt que DPV pour la détection provient du fait que l'adsorption à la surface de l'électrode est souvent moins importante en SWV qu'en DPV. Le balayage étant beaucoup plus rapide par SWV, une quantité plus faible de produit est formée, et une moins grande partie de l'électrode solide risque d'être empoisonnée par l'adsorption du produit. La DPV et la SWV ont été utilisées pour vérifier l'importance de l'adsorption pour chacune des deux techniques. La Figure 47, obtenue en effectuant des balayages répétés sur une cellule statique, illustre l'adsorption observées dans les deux systèmes.

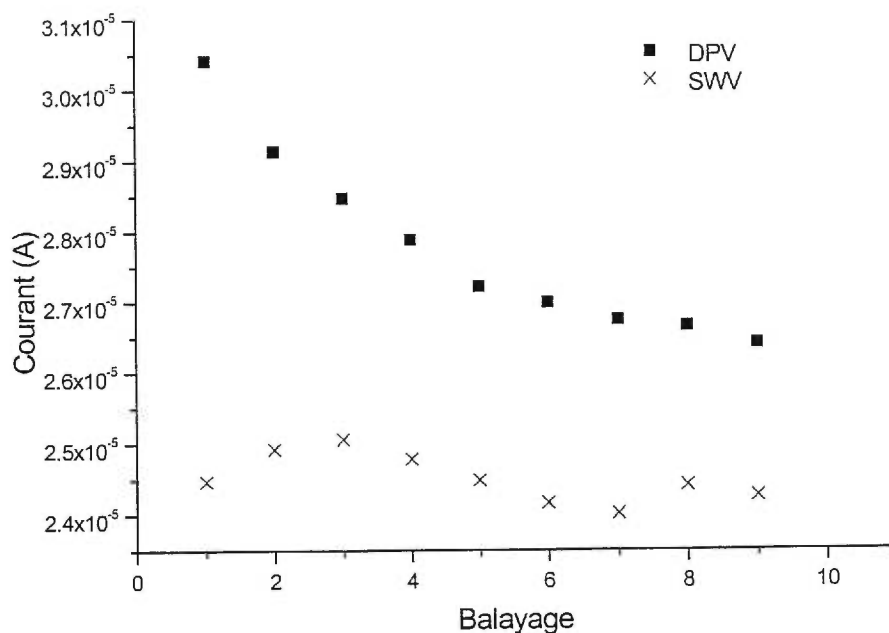


Figure 47_ Adsorption associée aux système DPV et SWV (BM produit enzymatiquement par 1000 unités / mL de lipoxygénase)

Les résultats démontrent clairement que l'électrode est empoisonnée en fonction du temps de façon marquée en DPV. Cet empoisonnement peut être causé par le produit de la réaction (le bleu méthylène sous forme réduite) ou encore par les autres produits présents dans le système (myoglobine ou protéines présentes en raison de l'enzyme). Des essais avec des types d'électrodes autres que le platine, soient l'or et le carbone ont donné de pires résultats, surtout dans le cas du carbone. Les résultats indiquent que SWV est fortement à privilégier par rapport à DPV. Comme expliqué précédemment, un balayage de SWV est effectué très rapidement ; très peu de produit est formé, d'où une probabilité réduite d'absorption à l'électrode. Mais l'utilisation d'un système à flot continu risque d'augmenter l'influence de l'adsorption. Les balayages étant effectués à des intervalles très rapprochés les uns les autres (pour pouvoir déterminer précisément le signal associé au bleu méthylène à l'électrode après l'injection), une quantité beaucoup plus importante de produit peut être adsorbée comparativement à une cellule statique, où

un balayage peut suffire pour évaluer la hauteur du pic. La figure suivante illustre le problème d'adsorption rencontré lorsque le système à flot continu / SWV est utilisé.

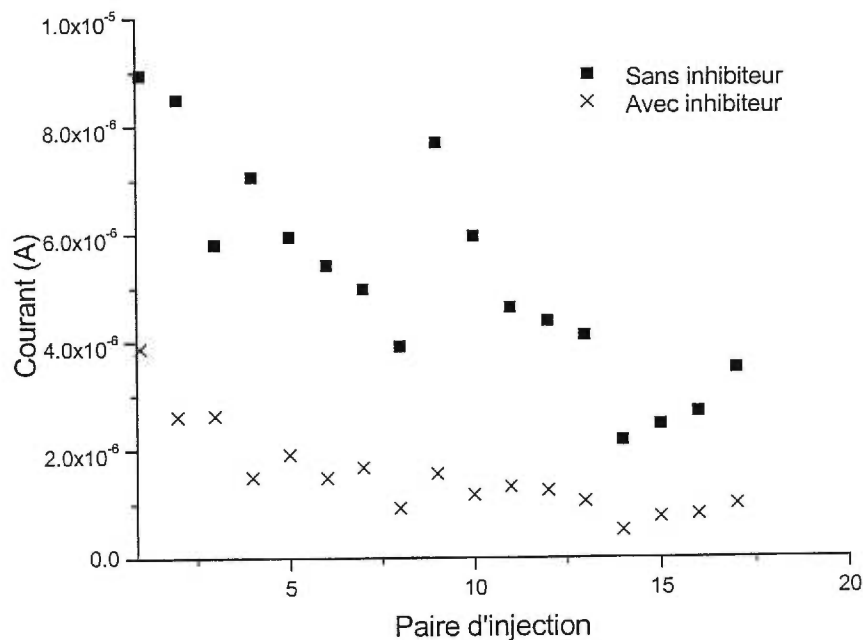


Figure 48_ Adsorption présente dans le système FIA-SWV pour le blanc et les solutions avec inhibiteur. Pour chaque paire d'injection, l'injection du blanc a été effectuée en premier, suivi de la solution d'essai contenant l'inhibiteur.

L'examen de la Figure 48 permet de constater que l'adsorption est très importante avec le système FIA/SWV. Ce résultat remet en question les expériences effectuées sans tenir compte de l'adsorption. Une façon souvent utilisée pour éliminer les espèces adsorbées à la surface des électrodes solides consiste à polir la surface de l'électrode, pour arracher mécaniquement la couche sur laquelle des molécules sont adsorbées. Cette méthode est impraticable avec un système à flot continu ; en effet, on voit mal l'expérimentateur arrêter le système après chaque injection pour ensuite

polir l'électrode de travail. Il est clair qu'une autre solution doit être envisagée si le système à flot continu est utilisé.

3.6.5.2 *Méthode des injections alternées*

Pour minimiser le problème d'adsorption, une approche très simple peut être utilisée. On peut calculer le pourcentage d'inhibition à l'aide de deux injections successives (une avec inhibiteur et une autre, le blanc, sans inhibiteur). Après chaque injection de solution d'essai, un blanc doit être injecté. Même si le signal associé à des solutions de concentration égales diminuera avec le temps, le rapport devrait rester assez constant. À partir des résultats de la Figure 48 (obtenus en effectuant les injections alternées), on a pu calculer des pourcentages d'inhibition pour chaque paire d'injections. Les résultats sont affichés sur la Figure 49.

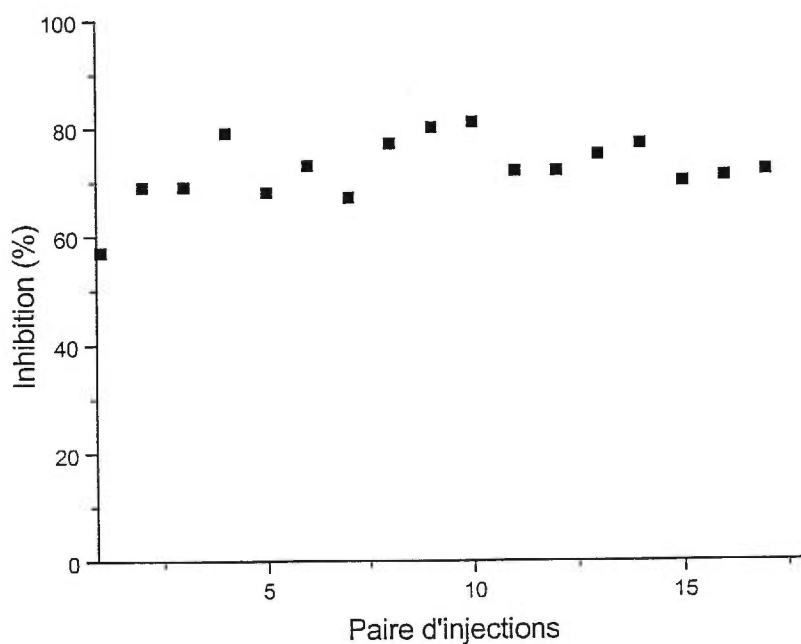


Figure 49_ Utilisation des injections successives pour calculer l'inhibition.

On peut constater sur le graphique que le pourcentage d'inhibition calculé ne diminue pas en fonction du nombre de déterminations. La moyenne donne une inhibition de 72%, et l'écart-type est de seulement 6 %. Il semble possible d'utiliser la méthode des injections alternées pour déterminer l'inhibition avec une précision acceptable. De plus, on peut déterminer le moment où un polissage devient nécessaire par la décroissance du signal du blanc en fonction du nombre de balayages effectués. Lorsque le signal du blanc devient trop faible, un polissage (impliquant un arrêt du système de flot) devient nécessaire.

3.6.6 Détermination d'inhibiteurs avec la méthode d'injection alternée

Plusieurs courbes d'inhibition ont été établies en utilisant la méthode des injections alternées, à partir d'inhibiteurs connus de la lipoxigénase. Les figures suivantes illustrent que la méthode a permis de détecter l'effet inhibiteur de tous les produits utilisés. Il est clair que le système permet de détecter une décroissance du signal du bleu méthylène associé aux modulateurs des réactions impliquées dans l'essai. Les injections alternées démontrent que l'inhibition calculée n'est pas due à une décroissance du signal en fonction du temps dû à un phénomène d'adsorption.

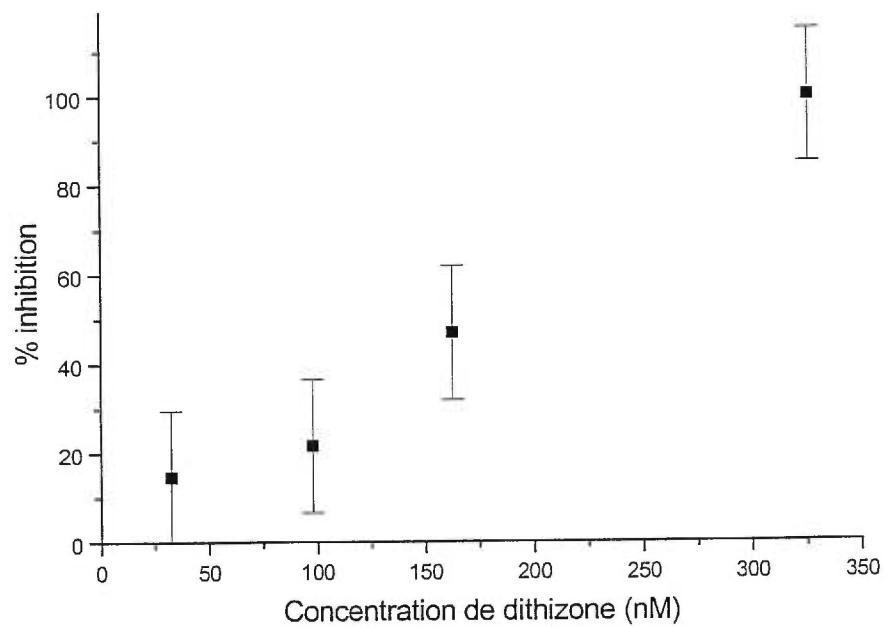


Figure 50_ Courbe d'inhibition pour le dithizone

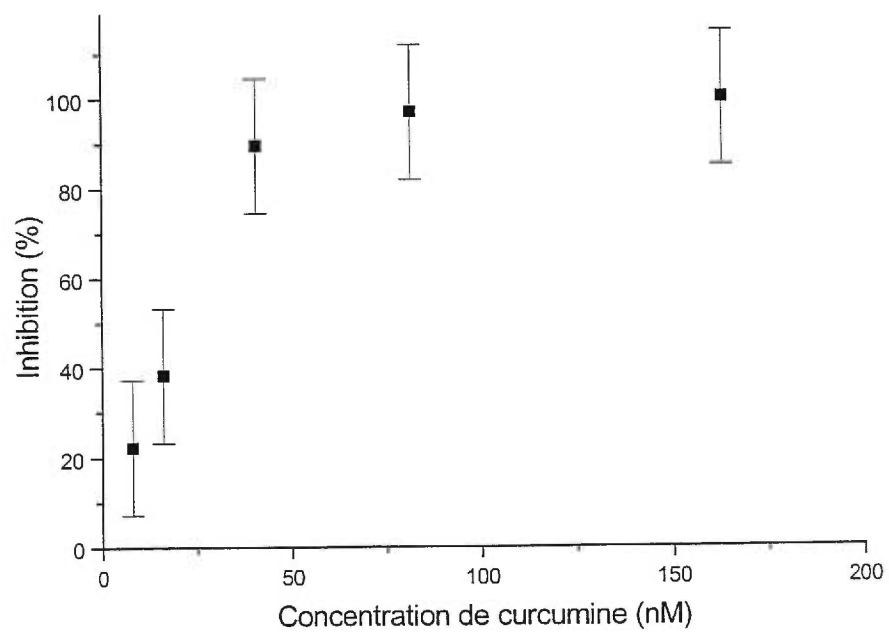


Figure 51_ Courbe d'inhibition pour le curcumine

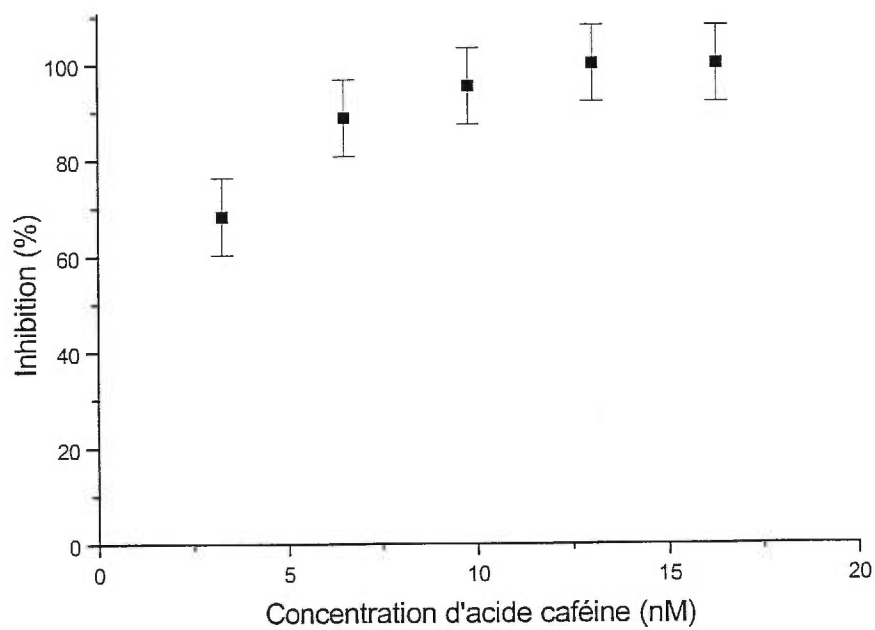


Figure 52_ Courbe d'inhibition pour l'acide caféine

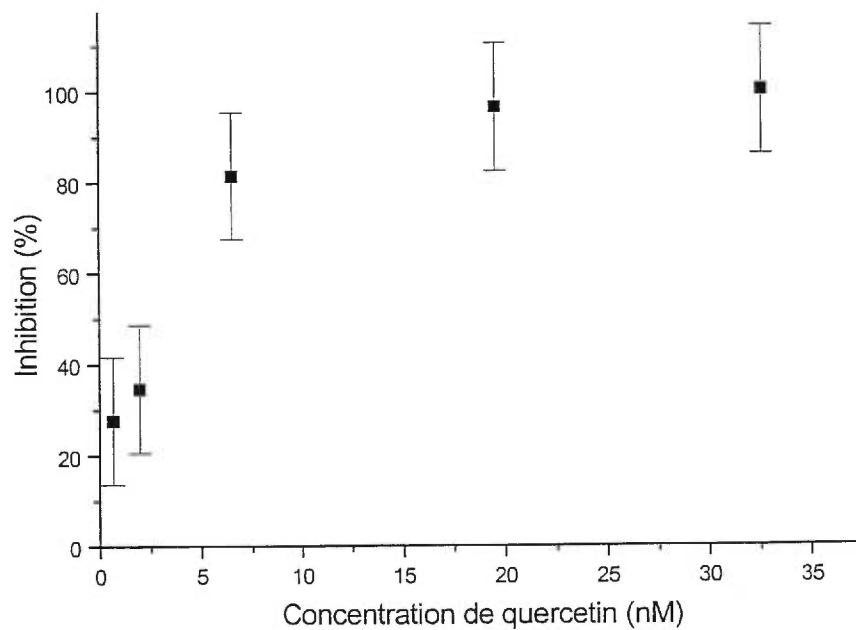


Figure 53_ Courbe d'inhibition pour le quercetin

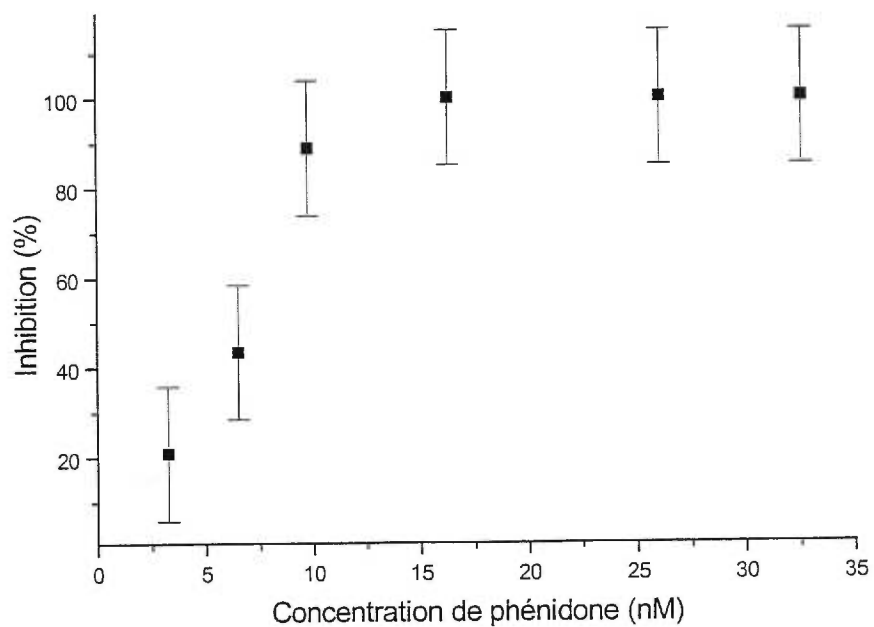


Figure 54_ Courbe d'inhibition pour la phénidone

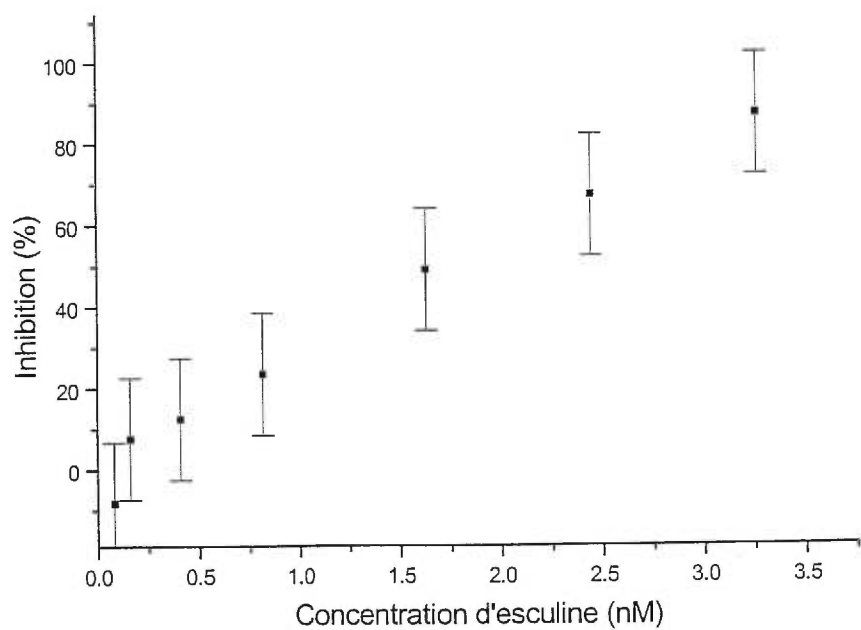


Figure 55_ Courbe d'inhibition pour l'esculetin

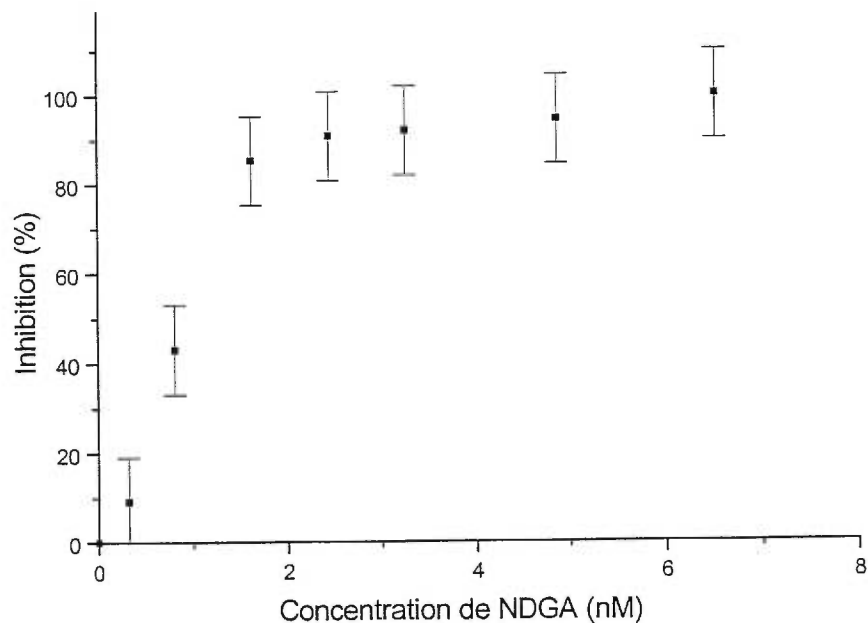


Figure 56__ Courbe d'inhibition pour NDGA

Le système à FIA pouvant facilement être automatisé, il est réaliste de penser que des centaines de courbes similaires aux figures 50 à 56 dans une période de temps très réduite peuvent être effectuées.

3.6.7 Propriétés anti-oxydantes des inhibiteurs

L'essai décrit implique deux réactions qui surviennent dans les solutions d'essai. La première est la conversion enzymatique de l'acide linoléique en 13-HPOD et la deuxième la conversion du LBM en BM par le 13-HPOD (réaction d'oxydo-réduction). La détection d'un composé par la méthode proposée ne signifie donc pas nécessairement que ce composé est un inhibiteur de la lipoxigénase : on sait seulement que le composé inhibe la réaction enzymatique *ou* l'oxydation du LBM. Tout anti-oxydant risque d'interférer avec la réaction d'oxydo-réduction.

La procédure suivante a été utilisée pour étudier l'effet des anti-oxydants dans le système d'essai. La concentration minimale d'inhibiteur pour mesurer une inhibition voisine de 100% sur les Figures 50 à 56 a été déterminée d'après les résultats expérimentaux. Du 13-HPOD a été ajouté à chaque solution d'essai. La concentration de 13-HPOD utilisée, 10 μM , a été choisie parce qu'une concentration de 10 μM en BM donne un signal d'environ 2.5 μA (Figure 44). Ce courant correspond aux mesures usuelles du blanc (solution sans inhibiteur) pour les expériences des Figures 50 à 56.

Comme l'enzyme n'est pas impliquée dans cette expérience de contrôle, on peut conclure que les composés sont des anti-oxydants si une différence entre les solutions d'essai et les blancs est observée. Les résultats sont représentés sur le Tableau 5 :

Tableau 5_ Inhibition de la conversion LBM - BM par les inhibiteurs considérés lors de l'étude

Inhibiteur	% Inhibition
Dithizone	100
Curcumine	97
Acide caféine	100
Quercetin	100
Phénidone	100
Esculine	89
NDGA	91

Comme on peut voir, la conversion du LBM en BM est affectée par toutes les molécules considérées pour l'étude. Ces résultats démontrent une limitation importante du système, soit l'impossibilité de différencier les inhibiteurs de la

lipoxigénase des anti-oxydants. En effet, même si les molécules considérées possèdent des propriétés anti-oxydantes, elles peuvent tout de même être des inhibiteurs spécifiques de la lipoxigénase. Le pourcentage d'inhibition de la réaction enzymatique seule ne peut être établi à partir des résultats obtenus : en effet, même si un composé inhibe à 90% la conversion de LBM en BM et à 100% le signal du système d'essai (réaction enzymatique combinée avec réaction d'oxydo-réduction), on ne peut déduire que l'inhibition de la réaction enzymatique est de seulement 10%. On peut uniquement affirmer que les courbes d'inhibitions (Figures 50 à 56) sont affectées à un certain niveau par l'inhibition de la réaction LBM-BM.

3.7 Conclusion

La méthode présentée ici représente une façon rapide et sensible d'effectuer le dosage de l'activité de la lipoxigénase. La méthode pourrait permettre éventuellement de découvrir de nouveaux modulateurs de l'activité de l'enzyme. Ces composés peuvent avoir une très grande importance thérapeutique pour le traitement de nombreux désordres et maladies.

La sélectivité de la méthode provient de la spécificité de la conversion de LBM en BM par le 13-HPOD, le produit de la dioxygénation enzymatique de l'acide linoléique par la lipoxigénase. Le facteur principal réduisant la sélectivité de la technique est qu'elle répond aux molécules anti-oxydantes : dans ce cas, on ne peut savoir à quel degré la réaction enzymatique est inhibée. La méthode électrochimique proposée permet de travailler en milieu turbide, un avantage net par rapport à la détection spectrophotométrique du bleu méthylène. Les inhibiteurs absorbant près de 660 nm, le maximum d'absorption du bleu méthylène, peuvent être détectés. L'utilisation d'électrodes solides, en remplacement des électrodes de mercure utilisées dans beaucoup de méthodes électrochimiques, rend la technique

inoffensive pour l'environnement. L'utilisation d'un système à flot continu permet d'envisager une automatisation du système..

Il faut mentionner que toutes les expériences présentées ont été effectuées sur la lipoxygénase de souche végétale. Les expériences pouvant déboucher sur la découverte d'inhibiteurs ayant des propriétés thérapeutiques vont devoir être effectuées sur la lipoxygénase de souche humaine.

Un grand nombre d'expériences est à prévoir pour adapter le système à la lipoxygénase de souche humaine. Toutes les expériences visant à l'optimisation du système (pH, force ionique) devraient être refaites pour la nouvelle souche d'enzyme à doser. Les expériences effectuées sur la lipoxygénase végétale jusqu'à présent permettent cependant d'entrevoir avec optimisme la possibilité d'adapter le système d'essai utilisé à la lipoxygénase humaine.

4. Références

- ¹ Brett, C. and Brett, A., *Electrochemistry : Principles, Methods, and Application*, Oxford University Press, Londres, 1993, pp. 39-52.
- ² Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, pp. 460-461.
- ³ Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, p. 461.
- ⁴ Brett, C. and Brett, A., *Electrochemistry : Principles, Methods, and Application*, Oxford University Press, 1993, pp. 138-140.
- ⁵ Brett, C. and Brett, A., *Electrochemistry : Principles, Methods, and Application*, Oxford University Press, 1993, pp. 310-311.
- ⁶ Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, p. 680.
- ⁷ S. Dong and Y. Wang, *Electroanalysis*, 1989, 1, p. 99.
- ⁸ Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, pp. 481-487.
- ⁹ Brett, C. and Brett, A., *Electrochemistry : Principles, Methods, and Application*, Oxford University Press, 1993, p. 176
- ¹⁰ Brett, C. and Brett, A., *Electrochemistry : Principles, Methods, and Application*, Oxford University Press, 1993, p. 181.
- ¹¹ Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, pp. 477-478
- ¹² Brett, C. and Brett, A., *Electrochemistry : Principles, Methods, and Application*, Oxford University Press, 1993, p. 217.
- ¹³ Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, p. 477.
- ¹⁴ Osteryoung, J. et Osteryoung, R., *Analytical Chemistry*, **57**, 1985, 101A-110A.
- ¹⁵ Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, pp. 479-480.
- ¹⁶ Wang, J., *Analytical Electrochemistry*, VCH Publisher, New York, 1994, p. 41.
- ¹⁷ Brett, C. and Brett, A., *Electrochemistry : Principles, Methods, and Application*, Oxford University Press, Londres, 1993, pp. 219-220.
- ¹⁸ LabVIEW User Manual for Windows (version 3.11), National Instruments, Austin, 1994, p. 1-1.
- ¹⁹ Site de National Instrument, <http://www.natinst.com>
- ²⁰ <http://www.tmo.hp.com/tmo/datasheets/Images/img-HP34401A-1lg.gif>

- ²¹ Tiré du réseau de logiciel de contrôle d'instruments de National Instrument, <http://www.natinst.com/idnet/idl.htm>
- ²² *LabView DAQ VI Reference Manual for Windows*, manuel de la version 3.0, pp. 1-18
- ²³ <http://www.pineinst.com>
- ²⁴ *Operating Instructions for AFCBP1 Bipotentiostat*, AFCBP1 Software Package, Pine Instrument Company, Grove City, Pennsylvania, p. 6.
- ²⁵ *Operating Instructions for AFCBP1 Bipotentiostat*, AFCBP1 Software Package, Pine Instrument Company, Grove City, Pennsylvania, p. 39.
- ²⁶ *Technical Reference Manual for the ASCBDEV Developer's Kit*, Pine Instrument Company, Grove City, Pennsylvania.
- ²⁷ *LabView Instrument Manual*, manuel de la version 3.0, p. 1-18
- ²⁸ *AT-MIO-E Series User Manual*, May 1995 Edition, National Instrument Corporation.
- ²⁹ Leech et al., *Manuel de laboratoire de CHM 2173*, Librairie de l'Université de Montréal, 1997.
- ³⁰ Kissinger, P. et Heineman, W., *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, 1996, p.
- ³¹ Schewe, T., Rapoport, S.M., et Kuhn, H. (1986) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **58**, 192-271.
- ³² Batt, D.G. (1992) *Progress in Medicinal Chemistry* **29**, 1-62.
- ³³ Scheller, G., Jäjer, E., Hoffmann, B., Schitt, M., Schreier, Pr. (1995) *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1768-1774.
- ³⁴ Pereira, T. A. et Das, N. P. (1991) *Analytical Biochemistry* **197**, 96-100.
- ³⁵ Daniel, R., Dorizon, J. et Deprez, D., *Analytical Biochemistry* **219**, 154-155.
- ³⁶ Skoog, D., West, D. et Holler, F., *Chimie Analytique (traduction et révision scientifique de la 7^e édition américaine)*, De Boeck Université, Paris, 1997, p. 485.
- ³⁷ <http://www.jtbaker.com/msds/ml599.htm>
- ³⁸ Skoog, D., West, D. et Holler, F., *Chimie Analytique (traduction et révision scientifique de la 7^e édition américaine)*, De Boeck Université, Paris, 1997, p. 475.
- ³⁹ Surrey, K., *Plant Physiology* (1964), **39**, pp. 65-70.
- ⁴⁰ Auerback, B.J., Kiely, J.S., et Cornicelli, A., *Analytical Biochemistry* (1992), **201**, 375-380.
- ⁴¹ D'Amboise, M., *CHM 3171 et CHM 6170 - Chimie analytique instrumentale*, Librairie de l'Université de Montréal, 1995-1996.
- ⁴² Sagara, T., Iizuka, J. et Niki, K., *Langmuir* (1992), **8**, 1018-1025.
- ⁴³ Gibian, M. et Galaway, R. A., *Biochemistry* (1976), **15**, 4209-4214.

- ⁴⁴ Thomas, P. D. et Poznansky, M. J., *Analytical Biochemistry* (1990), **188**, 228-232.
- ⁴⁵ Auerback, B.J., Kiely, J.S., et Cornicelli, A., *Analytical Biochemistry* (1992), **201**, 375-380.
- ⁴⁶ Auerback, B.J., Kiely, J.S., et Cornicelli, A., *Analytical Biochemistry* (1992), **201**, 375-380.
- ⁴⁷ Skoog, D., West, D. et Holler, F., *Chimie Analytique (traduction et révision scientifique de la 7^e édition américaine)*, De Boeck Université, Paris, 1997, p. 485.