

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمّار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES

قسم علوم المادة

Département Sciences de la Matière



Mémoire master

Domaine : Sciences de la Matière

Filière : Chimie

Option : Chimie inorganique

Présentée par : -Boudjemaa Abir

-Khamed Asma

THEME

A sensitive Multi-Walled Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode for Sensing of Anti-Cancer Drug Regorafenib in pharmaceutical Samples

Elaboration d'une électrode de carbone vitreux modifiée par des nanotubes de carbone multi-parois ; Application à la détection de l'anticancer (Regorafenib) dans les formulations pharmaceutiques

Soutenu publiquement devant le jury composé de :

Mr. Saidat Boubakeur

Professeur

Président

Mr. Sebiane Sofiane

MAA

Examineur

Mr. Douliche Merzak

MCA

Promoteur

Année Universitaire 2020- 2021



Dédicace

Je dédie ce travail :

En premier lieu et avant tout, je remercie dieu de m'avoir donné la volonté et le courage d'achever mes études.

Mes très chers parents, Mon père Boudjemaa Ahmed et Ma mère Belgharbi Fatiha qui m'ont soutenu, encouragé pour que je puisse mener à bien mes études, et qui ont attendu ce jour avec impatience

Mes chères sœurs : Hasna, Amira, Melek, Oumima, Tamtouma.

Mes chères frères : Nabil, aissa

Les familles : Boudjemaa et Belgharbi

Toutes mes amies : Asma, Linda, Zineb, Souad, Arwa, Fatima, Houda,

Amiana, Abdallah

Et spécialement : Guerbati Rekia, Doukma Rachid

Dédié à mon bras droit et compagnon à ceux qui m'ont encouragé pendant cette période :

Ammari Abdennour

Tous mes collègues de la promotion chimie fondamentale.

Les enseignants et a tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail

Boudjemaa Abir

Dédicace

A mon très cher père Mustafa et ma très chère mère

A mes frères : Mohamed islam et Ibrahim elkhalil

A mes sœurs : Iman ; Douaa et Ansar

A mon autre moitié et mon compagnon :B.Maroin

A mes amis surtout : K.Mahdjou ba ; D.Nour elhouda ; B.Abir ; G.Rekia ;

D.Linda

A tous ceux qui m'aiment

A tous ceux qui j'aime

Je dédie ce travail

Khamed Asma

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu source de toute connaissance.

Nous voudrions aussi remercier très sincèrement notre promoteur **Mr. Doulache Merzak** MCA pour nous avoir encadré, suivi, conseillé et aidé durant ce mémoire.

Merci aux membres de jury: Pr. **Saidat Boubakeur** et Dr. **Sebiane Sofiane** pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant dévaluer et examiner notre travail.

Nous ne manquons pas l'occasion de remercier chaleureusement l'équipe de laboratoire SM à l'université de Laghouat de nous avoir fournis la matière première et l'équipe de laboratoire de chimie organique au niveau de labo de recherche et à leur tête le Professeur **Youcefi Mohammed**. Veuillez trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre reconnaissance.

Nous remercions également tous ceux qui ont contribué à l'accomplissement de ce travail de près ou de loin.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau.II.1	: Liste des produits utilisés dans la partie expérimentale.	17
Tableau.II.2	: La rugosité de la surface obtenue pour les électrodes GCE et MWCNT/GCE.	23
Tableau.II.3	: Comparaison des résultats obtenus par chromatographie, spectrométrie et électrochimique.	28
Tableau.II.4	: La variation de la réponse de courant du REG calcule du Bias.	29

LISTE DES FIGURES

Figure.I.1	Principe de mesure potentiométrique accumulation de charges électriques à la surface de l'électrode indicatrice.	4
Figure.I.2	(A) Schéma d'un montage de détection par ampérométrie. (B) Schéma d'une électrode de référence.	4
Figure.I.3	Schéma de principe des mesures conductimétrique.	5
Figure.I.4	Structure schématique d'un nanotube multi-feuilets (MWCNT), où l'on voit bien l'arrangement concentrique des feuilles de graphène.	10
Figure.I.5	(A) Variation du potentiel au cours Du temps Lors d'un Voltamétrie cyclique. (B) Réponse en courant potentiel lors d'un Voltamétrie cyclique.	13
Figure.I.6	(A) Variation du potentiel au cours Du temps Lors d'un voltamètre a vague carré. (B) Réponse en courant potentiel lors d'un voltamètre a vague carré.	14
Figure.I.7	(A) réponse en courant en fonction potentiel lors voltamétrie impulsionnelle Différentielle.(B) variation du potentiel au cours du temps lors voltamétrie impulsionnelle différentielle.	14
Figure.I.8	Structure chimique de Régorafenib ($C_{21}H_{15}ClF_4N_4O_3$).	15
Figure.II.1	Photographie de la chaine de mesures électrochimiques.	17
Figure.II.2	Cellule électrochimique.	18
Figure.II.3	Protocole schématique de la préparation de MWNCTs/GCE.	19

- Figure.II.4** Voltammogrammes cycliques de GCE et de MCNTs/GCE dans 0.1M 20
PBS à pH 2.0 en présence de 0.1 mM REG à une vitesse de balayage
50 mV s⁻¹.
- Figure.II.5** (A) Voltampérogrammes impulsionnel différentiels de 0.1 mM REG 21
dans 0.1 M PBS sur l'électrode MWCNTs/GCE préparée à différents
quantité en MWCNTs. (B) variation de I_p en fonction de la quantité de
MWCNTs.
- Figure.II.6** Voltamogrammes de l'électrode GCE et MWCNT/GCE. Mesures 22
effectuées dans 5.0 mM de K₃ [Fe(CN)₆⁴⁻] / K₄[Fe(CN)₆³⁻] dans le KCl
(0.1 M) entre -0.4 et 0.6 V, avec une vitesse de balayage 50 mV/s.
- Figure.II.7** (A) Voltammogrammes impulsionnels différentiels de 0.1 mM de REG 23
sur l'électrode MWCNTs/GCE dans différentes pH. (B) Variation de la
réponse voltammétrique en fonction de pH en présence de 0.1mM
REG sur l'électrode MWCNTs/GCE.
- Figure.II.8** Variation du pic de potentiel en fonction de pH en présence de 0.1mM 24
REG.
- Figure.II.9** (A) Voltamogrammes cyclique de MWCNTs/GCE en présence de 0.1 25
mM REG dans 0.1 M PBS de pH 2.0 à différents vitesse de balayage
(5 - 500 mVs⁻¹). (B) variation de I_{pa} en fonction de la vitesse de
balayage.
- Figure.II.10** Courbe de variation de E_p en fonction de logarithme de la vitesse de 26
balayage.
- Figure.II.11** (A) Voltamogrammes impulsionnels différentiels obtenus sur 27
l'électrode modifiée MWCNTs/GCE dans 0.1 M PBS à pH=2.0
contenant des concentrations croissantes de REG [1 -100 μM]. (B)
droite d'étalonnage de calibration du capteur MWCNTs/GCE.
- Figure.II.12** Etude L'interférence métallique et organique sur la concentration du 29
REG

LISTE DES ABREVIATIONS

CE	: Electrode auxiliaire.
CV	: Voltamétrie cyclique
DMF	: Diméthylformamide .
DPV	: Voltamétrie impulsionnelle différentielle.
ECM	: Les électrodes chimiquement modifiées.
ER	: Electrode de référence.
ET	: Electrode de travail.
GCE	: Electrode de carbone vitreux.
LOD	: Limite de détection.
LOQ	: Limite de quantification.
MWCNT	: Les nanotubes de carbone multifeuillets.
NTC	: Les nanotubes de carbone.
PBS	: solution tampon de phosphate.
REG	: Regorafenib.
SWV	: Voltamétrie à vague carrée .

sommaire

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

Introduction générale **1**

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les captures électrochimiques **3**

I.1.1. Définition et principe de fonctionnement **3**

I.1. Classification des captures **3**

A. Capteurs potentiométriques **3**

B. Capteurs ampérométriques **4**

C. Capteurs conductimétriques **5**

I.2 Validation d'une méthode analytique **6**

I.2.1. Limite de détection et de quantification **6**

A. Limite de détection (LOD) **6**

B. Limite de quantification (LOQ) **6**

I.2.2. Fidélité (précision) **7**

A. Répétabilité **7**

B. Reproductibilité **7**

I.2.3. Sensibilité	7
I.2.4. Linéarité	7
I.2.5. Calcul du taux de recouvrement	8
I.3. Les Electrodes chimiquement modifiées(ECM)	8
I.3.1. Intérêts de la modification d'électrodes (CME) en électroanalyse	9
I.4. Les nanotubes de carbone (NTCs)	9
I.4.1. Les nanotubes de carbone multifeuillets (MWCNT)	10
I.4.2. Les propriétés des nanotubes de carbone (NTC)	10
A. Propriétés optiques	10
B. Propriétés électriques	11
C. Propriétés électroniques	11
I.5. Le carbone vitreux (GCE)	12
I.5.1. Structure	12
I.5.2. Les propriétés	12
I.6. Techniques électrochimiques	12
I.6.1 La voltamétrie	12
A.La voltamétrie cyclique (CV)	12
B. Voltamétrie à vague carrée (SWV)	13
C. Voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV)	14
I.7. Détection électrochimique de le régorafenib	15

I.7.1. Régorafenib	15
I.7.2. Le mécanisme d'action du régorafenib	15
I.7.3. Propriétés	15
I.8. Méthodes de détermination du régorafenib	16

PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Produits chimiques et appareillages utilisés	17
II.1.1. Produits chimiques	17
II.1.2. Appareillage et montage électrochimique	17
II.1.2.1. Cellule électrochimique	18
II.1.2.2. Les Electrodes	18
II.1.3. Préparation de l'électrode modifiée MWCNTs/GCE	19
II.2. Activité électrocatalytique de MWCNTs/GCE vis-à-vis de l'oxydation du REG	19
II.2.1. Comportement électrochimique de REG sur l'électrode MWCNTs/GCE	19
II.2.2. Optimisation de la réponse de capteur en fonction de la quantité de MWCNTs	20
II.2.3. Caractérisation de l'électrode modifiée par la voltamétrie cyclique	21
II.2.4. Facteur de rugosité de l'électrode MWCNT/GCE	22
II.2.5. Effet du PH	23
II.2.6. Effet de la vitesse de balayage du potentiel (v)	24
II.3. Performance analytique de l'électrode MWCNTs/GCE	26

II.3.1. Courbes d'étalonnage et caractéristiques analytiques	26
II.3.2. Effet d'interférence	28
Conclusion	30
Référence	31

Abstract:

In this study, an electrochemical sensing platform was prepared to determine of regorafenib (REG) on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) modified glassy carbon electrode (GCE) using differential pulse voltammetric (DPV) technique. The electrooxidation of REG was totally irreversible reaction and governed by adsorption process which is pH dependent. According to the oxidation mechanism study, two electrons were required for electrochemical oxidation of REG in a 0.1 M phosphate buffer solution (PBS; pH 2). Using DPV mode, a significant improvement in the response signal of REG was registered on the surface of MWCNTs/GCE as compared to bare GCE. The MWCNTs/GCE could be successful sensor for the sensitive, reproducible, and stable determination of REG in the real samples.

Keywords: Regorafenib, Multi walled carbon nanotubes, differential pulse voltammetry, electrochemical sensor, glassy carbon

Résumé:

Une électrode modifiée à base de nanotube de carbone, destinée au dosage de régorafenib (REG) a été réalisée. La modification de l'électrode a consisté la déposition sur la surface du carbone vitreux (GCE) un film mince de nanotube de carbone multi-parois (MWCNTs). Le comportement électrochimique de cette électrode vis-à-vis de l'oxydation du REG a été étudié par voltammétrie cyclique (CV) et voltammétrie à impulsion différentielle (DPV). Le but recherché par cette modification est l'amélioration des performances analytique de l'électrode indicatrice pour la détection du REG.

Mots clés : Regorafenib, nanotube de carbone multi-parois, Voltammétrie cyclique, voltammétrie à impulsion différentielle, capteur électrochimique.

ملخص

خصصت هذه الدراسة لتحضير نوع جديد من القطب المعدل بطبقة من الكربون متعدد الجدران على قطب من الكربون الزجاجي حيث تم دراسة سلوكه الكهروكيميائي اتجاه اكسدة دواء مضاد للسرطان (ريجورافنيب (REG) في محلول موي ذو pH يساوي 2.00. تمت دراسة الخصائص الكهروكيميائية لهذا القطب باستعمال تقنية قياس الجهد الحلقي، تقنية قياس الجهد التفاضلي. النجاعة الكهروتحفيزية لهذا القطب المعدل تمت دراسته بأكسدة هذا الدواء، التحليل الكهروكيمي باستخدام قطب من الكربون الزجاجي المعدل بالكربون متعدد الجدران أثبتت نجاعة تحليلية من ناحية الانتقائية والحساسية لهذه الدواء، حيث يمكن استعمال هذا النوع من الأقطاب في الكشف على هذا الدواء المحاليل البيولوجية والادوية.

الكلمات المفتاحية: القطب الكهربائي المعدل، دواء مضاد للسرطان ريجورافنيب، الكربون متعدد الجدران، قياس الجهد التفاضلي.

Introduction générale

La détermination sélective et précise pour telles substances nécessite de disposer de moyens d'analyse très performants, tels que les chromatographes et les divers spectromètres. La conception de ces instruments permet une analyse complète du milieu, avec une sensibilité qui peut, sous certaines conditions, atteindre sa limite absolue, qui est la détection d'une seule molécule. Malheureusement, ces équipements sont sujets à certaines limitations, ils sont en effet complexes, coûteux, volumineux, et parfois difficile à mettre en œuvre. Une des alternatives les plus prometteuses consiste à développer des dispositifs simples et miniaturisés possédant des caractéristiques équivalentes en termes de fiabilité, sélectivité, rapidité et à un moindre coût. C'est ainsi que différents types de capteurs ont vu le jour et sont de plus en plus demandés à l'exemple des capteurs électrochimiques mettant directement en jeu un processus de type électrochimique ou assimilé.

Les activités de recherche menées actuellement sur la modification contrôlée des électrodes par des films minces de matériaux nanostructurés ont permis le développement de nouveaux capteurs électrochimiques doués de propriétés électroanalytiques mieux adaptées et mieux ciblées, à savoir une grande activité catalytique, une réactivité électrochimique en solution, une grande capacité de transfert de charge, et une stabilité chimique et électrochimique dans un large domaine de potentiel.

A ce jour, de nombreux matériaux à base des nanotubes de carbone (NTC) tels que les nanotubes mono-parois et multi-parois ont été utilisés pour modifier différents types d'électrodes de travail pour la détection en utilisant les méthodes électrochimiques. En raison de leurs propriétés catalytiques, leur conductivité élevée et leur grande surface spécifique, les nanotubes de carbone ont trouvé une variété d'applications dans le domaine de l'électro-analyse.

Ce travail de mémoire est une contribution au développement de nouveaux matériaux fonctionnels appliqués à l'électrochimie analytique. Il s'agit de développer de nouvelle électrode modifiée ayant de grandes performances analytiques par dépôt de couches minces des nanotubes de carbones multi-parois déposées sur un substrat de carbone vitreux. Son utilisation comme capteur électrochimique dédiés à la détection de substances d'intérêt pharmaceutique, telle que le Regorafenib.

Ce mémoire s'articule en deux chapitres

Le premier chapitre est dédié à la présentation des différents types de capteurs électrochimique et leurs principes de fonctionnement. Nous présenterons ensuite les propriétés chimiques et physiques des nanotubes de carbone. Aussi tout au long de ce chapitre, les différentes techniques électrochimiques utilisées dans le cadre de ce travail seront présentées.

Le deuxième chapitre, l'interface modifiée sera appliqué à la détection du regorafenib (REG) afin de déterminer les performances analytiques du capteur (seuil de détection, domaine de linéarité, sensibilité etc....). Les résultats du capteur électrochimique seront comparés à ceux des principaux travaux rencontrés dans la bibliographie.

Une conclusion générale résume l'essentiel des résultats trouvés dans ce présent travail.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les captures électrochimiques

I.1.1. Définition et principe de fonctionnement

Un capteur est un dispositif électronique capable de convertir une grandeur physique, chimique ou biologique appelée le mesurande, en un signal physiquement mesurable souvent une tension ou un courant [1]. Le principe de fonctionnement d'un capteur est basé sur le couplage direct de deux composantes essentielles incluent une couche de reconnaissance (polymères, CNTs, enzyme,...) et d'une composante physique qui constitue ce qu'on appelle le transducteur (quartz, électrodes,...). La couche de reconnaissance interagit avec l'analyte cible et les transformations résultantes de cette interaction sont traduites par l'élément de transduction en signaux exploitables avant d'être transmis à un système informatique pour subir un traitement algorithmique adéquat. Dans le cas d'un capteur électrochimique le signal produit (courbe potentiel-courant) est proportionnel à la concentration de l'analyte [2]. La Figure.I.1 présente le principe de fonctionnement et les principales composantes d'un capteur électrochimique.

I.1.2. Classification des captures

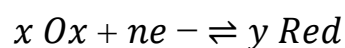
Les capteurs électrochimiques sont classés selon leur mode de transduction Potentiométrique, conductimétrique ou ampérométrique.

Le capteur potentiométrique et ampérométriques sont les plus répandus mais il y a peu de travaux portant sur les capteurs conductimétrique. Toutefois, depuis les années 1980, les capteurs conductimétrique commencent à être à leur tour de plus en plus utilisés compte tenu de leur facilité d'élaboration.

A. Capteurs potentiométriques

La potentiométrie est une méthode électrochimique basée sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence la plus utilisée est en verre, saturée en calomel. Aussi, cette méthode est basée sur l'équation de Nernst qui relie le potentiel d'équilibre d'une réaction aux activités de ces espèces, de manière logarithmique.

Soit la demi-réaction suivante :



L'équation de Nernst s'écrit :

$$E_p = E^0_{\text{ox/red}} + \frac{RT}{nF} \times \ln \frac{a_{\text{Ox}}}{a_{\text{Red}}} \quad \text{Eq.I.1}$$

Avec : E_p : le potentiel du couple redox ; $E^0_{\text{Ox/Red}}$: le potentiel standard de ce couple ; R: la constante des gaz parfaits = $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$; T: la température absolue en Kelvin ; n: le nombre d'électrons transférés ; F: la constante de Faraday = 96500 C mol^{-1} ; $a_{\text{Ox}}/a_{\text{Red}}$: activité chimique de l'oxydant et du réducteur respectivement.

Dans le cas des capteurs potentiométriques, une membrane ou une surface sensible à une espèce est à l'origine d'une différence de potentiel proportionnelle au logarithme de la concentration de l'espèce active. Les dispositifs potentiométriques permettent notamment de mesurer les variations de pH ou la concentration d'autres ions.

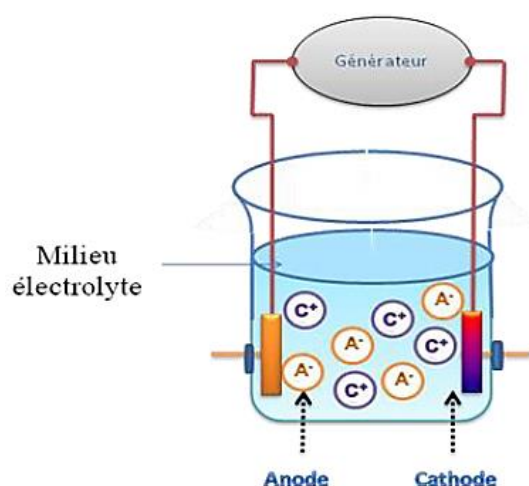


Figure.I.1 Principe de mesure potentiométrique accumulation de charges électriques à la surface de l'électrode indicatrice.

B. Capteurs ampérométriques

Les capteurs ampérométriques mesurent le courant produit par la réaction chimique d'une espèce électroactive à un potentiel imposé. L'intensité de courant mesuré dépend de la concentration des espèces oxydées ou réduites sur une électrode inductrice. Les capteurs ampérométriques sont rapides, plus sensibles et précis comparés aux capteurs potentiométriques, il n'est donc pas nécessaire d'attendre que l'équilibre thermodynamique soit obtenu et la réponse n'est pas obligatoirement une fonction linéaire de la concentration de l'analyte. Cependant, la sélectivité de tels dispositifs n'est régie que par le potentiel redox des espèces électroactives présentes dans le milieu d'analyse. Par conséquent, le courant mesuré par l'instrument peut inclure les contributions de plusieurs espèces chimiques [3].

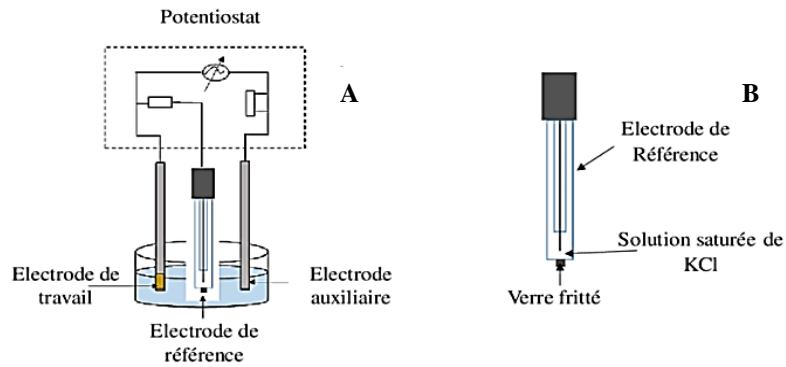


Figure.I.2 (A) Schéma d'un montage de détection par ampérométrie. (B) Schéma d'une électrode de référence

C. Capteurs conductimétriques

La conductimétrie est une technique électrochimique alternative à l'ampérométrie et à la potentiométrie. Le principe d'un capteur conductimétrique est basé sur la mesure de la conductance électrique G d'un électrolyte, entre deux électrodes inattaquables de même nature et de même surface en leur appliquant une tension ou un courant alternatif. Il se mesure par immergeant dans la solution une cellule de mesure comprenant deux électrodes dont la surface S et la longueur l sont données. Elle a pour expression :

$$G = \gamma \times S/l \quad \text{Eq.I.2}$$

Où G est la conductance (S ou Ω^{-1}), γ : est la conductivité spécifique de l'électrolyte ($S.cm^{-1}$) le rapport S/l est dit la constante géométrique de la cellule (cm).

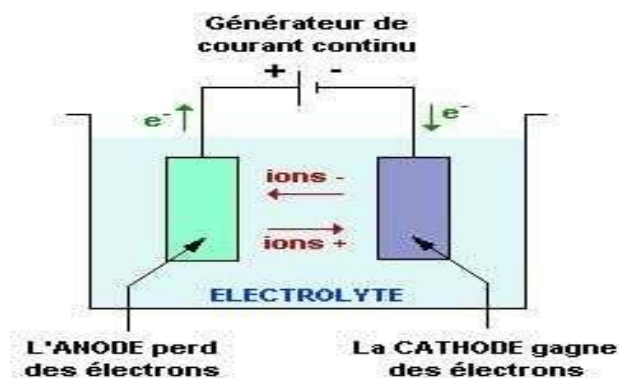


Figure.I.3 Schéma de principe des mesures conductimétrique.

I.2. Validation d'une méthode analytique

La validation d'une méthode d'analyse est une procédure qui permet d'établir, par des études expérimentales, que les critères de performance de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée [4]. Rappelons que l'objectif principal d'une méthode analytique de dosage est de pouvoir quantifier le plus justement et le plus précisément possible chacune des quantités inconnues que l'analyste aura à évaluer. Tandis que l'objectif de la validation est de donner au laboratoire et aux autorités des garanties suffisantes que chacune des mesures qui seront réalisées en routine avec une méthode donnée seront proches de la vérité.

A ce stade, il est important de définir certains termes fréquemment rencontrés en validation.

I.2.1. Limite de détection et de quantification

A. Limite de détection (LOD)

La limite de détection (LOD) est la plus petite concentration ou quantité d'un paramètre ou d'un analyte, qui produit un signal détectable avec une fiabilité définie et statistiquement différent de celui produit par un blanc dans les mêmes conditions [5].

La limite de détection (LOD) peut être estimée selon la formule suivante :

$$LOD = \frac{3\sigma}{p} \quad \text{Eq. I.3}$$

Où : σ est l'écart type résiduel de la droite d'étalonnage, p : la pente de la droite de régression.

B. Limite de quantification (LOQ)

C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec un coefficient de variation du facteur de réponse acceptable [6]. LOQ est calculé selon :

$$LOQ = \frac{10\sigma}{p} \quad \text{Eq. I.4}$$

I.2.2. Fidélité (précision)

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant des multiples prises d'un échantillon homogène dans les conditions prescrites [7]. Elle est généralement exprimée par le coefficient de variation (CV en %) qui est obtenu en effectuant le rapport entre l'écart type (S) des résultats d'essais et la moyenne (m) des réponses observées [8].

$$CV (\%) = \frac{s}{m} \times 100 \quad \text{Eq. I.5}$$

La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée. Les mesures quantitatives de la fidélité dépendent de façon critique des conditions stipulées. Peuvent ainsi être distinguées les conditions de :

A. Répétabilité

Ce sont les conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps [9]. Il s'agit en fait de mesurer la variabilité des résultats d'une même série c'est-à-dire la mesure de la variabilité intra-groupe.

B. Reproductibilité

Ce sont les conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur les échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents. Il s'agit d'une étude inter-laboratoires [7].

I.2.3. Sensibilité

La sensibilité d'une procédure d'analyse peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte [10]. Une procédure est dite sensible si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation significative de la réponse.

I.2.4. Linéarité

L'intervalle de linéarité représente le domaine de concentration exploré lors de la validation des méthodes. Celui-ci doit prendre en considération tous les résultats futurs possibles. En

effet, si lors de l'utilisation en routine de la méthode, les quantités inconnues que le laboratoire aura à doser se trouvent en dehors de l'intervalle de dosage, les résultats fournis ne pourront être considérés comme fiables. La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon [11].

I.2.5. Calcul du taux de recouvrement

Le taux de recouvrement ou pourcentage de récupération permet d'identifier, pour un échantillon donné ou un type de matrice donné et à un niveau concentration donné, la présence d'interférences potentielles lors du processus d'analyse.

Le taux de récupération correspond à la différence en pourcentage entre la concentration mesurée d'un échantillon fortifié et la concentration mesurée du même échantillon non fortifié divisée par la concentration de la substance ajoutée. Ce rapport tient compte de la transformation chimique qui s'est produite, s'il y a lieu. Ce taux est donc exprimé comme suit [12].

$$\text{Taux De Recouvrement (\%)} = \frac{C_f \times C}{C_a} \times 100 \quad \text{Eq. I.6}$$

Avec: C_f : Concentration mesurée de l'échantillon fortifié ; C : Concentration mesurée de l'échantillon non fortifié ; C_a : Concentration de la substance ajoutée

I.3. Les électrodes chimiquement modifiées(ECM)

Le contrôle des propriétés physiques et chimiques de l'interface électrode/électrolyte permet de contrôler et d'orienter la réactivité et la sélectivité d'une réaction électrochimique. Ce contrôle est en particulier rendu possible par une modification de l'électrode de travail, en immobilisant irréversiblement à sa surface une espèce chimique aux propriétés spécifiques (groupe rédox, complexant, catalyseur, photosensibilisateur, etc...). Le terme général d'électrode chimiquement modifiée (CME) désigne toute électrode à la surface de laquelle une espèce chimique a été délibérément fixée. Une électrode ainsi modifiée présente les propriétés chimiques et électrochimiques du système immobilisé (molécule organique ou inorganique simple, assemblage moléculaire, polymère, matériau hybride organique-inorganique, composite, etc...), ce qui explique le grand intérêt qui est porté intérêt aux CME pour des applications dans des domaines tels que l'électronique moléculaire, l'analyse et la catalyse [13].

I.3.1 Intérêts de la modification d'électrodes (CME) en électroanalyse

Ces derniers temps, les stratégies de modification d'électrodes ont permis le développement de procédures analytiques utilisant des réactifs immobilisés. Un des avantages de ces systèmes est qu'ils nécessitent l'utilisation d'une quantité minimum de réactifs, souvent coûteux, pour réaliser les analyses. Un autre avantage est la sélectivité des CMEs. En effet, par un choix judicieux du réactif immobilisé, il est possible de contrôler la sélectivité de l'électrode vis-à-vis une espèce donnée, ce qui présente un intérêt considérable lorsque des mesures doivent être réalisées dans des milieux complexes. Sans oublier les avantages d'ordres économique et temporel par le fait que ces méthodes sont moins coûteuses et moins consommatrices de temps par rapport aux autres méthodes analytiques classiques.

Toutes ces raisons justifient l'effort réalisé actuellement pour mettre au point de nouveaux matériaux ainsi que l'intérêt suscité par les électrodes modifiées dans différents domaines.

I.4. Les nanotubes de carbone (NTCs)

Les nanotubes, uniquement constitués d'atomes de carbone, appartiennent à la famille des allotropes du carbone, comme le diamant, le graphite et les fullerènes. Ce sont des cylindres fermés aux extrémités composés d'un simple feuillet de graphène enroulé (nanotubes à simple paroi) ou de plusieurs plans concentriques (nanotubes à parois multiples). Leurs diamètres sont de l'ordre du nanomètre et leurs longueurs peuvent atteindre plusieurs micromètres. Grâce à leurs propriétés mécaniques, électroniques, physiques et chimiques absolument uniques, les nanotubes sont considérés comme ayant un très grand potentiel non seulement en science des matériaux mais également en nanomédecine. En particulier, l'intérêt de l'utilisation de nanotubes de carbone a commencé à être exploré pour le développement de méthodologies alternatives dans le domaine des traitements anti-cancéreux, ceci grâce à leur capacité à pénétrer dans les cellules.

On distingue deux grandes familles de nanotubes : les nanotubes à simple paroi (SWCNT), constitués d'un seul feuillet de graphène enroulé, et les nanotubes à parois multiples (MWCNT), dont la structure consiste en plusieurs feuillets coaxiaux.

I.4.1. Les nanotubes de carbone multifeuillets (MWCNT)

Les nanotubes de carbone multifeuillets (MWCNT) sont constitués de plusieurs feuillets de graphène enroulés les uns autour des autres, il existe deux modèles pour décrire leurs structure [14]:

- Le modèle poupée russe où les plans de graphène sont arrangés en cylindres concentriques par emboîtement.
- Le modèle parchemin où un seul feuillet de graphène est enroulé en spirale sur lui-même.

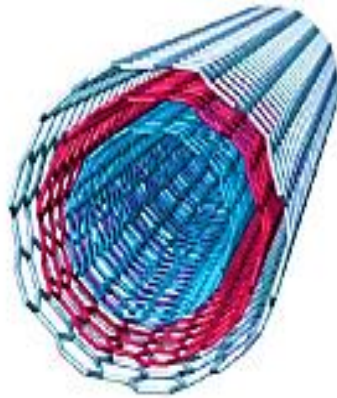


Figure.I.4 Structure schématique d'un nanotube multi-feuillets (MWCNT), où l'on voit bien l'arrangement concentrique des feuilles de graphène.

I.4.2. Les propriétés des nanotubes de carbone (NTC)

A. Propriétés optiques

Les propriétés optiques des nanotubes de carbone sont moins mises en avant que leurs propriétés électroniques, ou mécaniques, mais se révèlent tout aussi intéressantes. Dans cette partie, nous nous intéresserons dans un premier temps aux propriétés optiques linéaires des nanotubes, en fagots ou individualisés, avant de décrire leurs propriétés optiques non-linéaires. Les propriétés électroniques originales des tubes induisent des propriétés optiques également originales. La densité d'états des nanotubes monofeuillets est caractérisée par l'existence de singularités de Van Hove. Les transitions électroniques possibles entre singularités du même ordre déterminent le spectre d'absorption. Ces transitions dépendent évidemment du type de nanotube, métallique ou semi-conducteur, mais également du diamètre d du nanotube considéré, avec une dépendance en $1/d$ t en première approximation.

Il est possible de représenter sur une même figure l'énergie de toutes les transitions entre singularités de Van Hove en fonction du diamètre pour tous les types de nanotubes.

Ce type de figure est appelé diagramme de Kataura, le groupe de Kataura étant le premier à avoir introduit ce type de représentation. Il existe différents diagrammes de Kataura dans la littérature, en fonction de la valeur de l'énergie de recouvrement choisie dans le calcul par le modèle liaisons fortes de la structure électronique des nanotubes.

B. Propriétés électriques

Le graphite est un bon conducteur, cependant, ses capacités de transport électrique sont très sensibles aux perturbations géométriques (notamment la direction) ou chimiques telles que distorsions, ou dopage. Avec le nanotube de carbone la perturbation vient de l'effet de courbure. La conséquence en est que suivant son hélicité; un nanotube est un bon ou un mauvais conducteur. Un tiers des tubes dont les tubes 'chaise' ont un caractère métallique. Cette propriété essentielle a été calculée théoriquement et vérifiée expérimentalement. De plus un certain nombre de phénomènes liés à la basse dimensionnalité ont été mis en évidence sur les tubes conducteurs. Ces phénomènes d'origine quantique sont en général difficiles à étudier faute de pouvoir disposer de systèmes physiques adaptés. La simplicité structurale et la stabilité chimique font du nanotube métallique un objet modèle de fil moléculaire quantique.

C. Propriétés électroniques

La structure orbitale d'un atome de carbone isolé est $1s^2 2s^2 2p^2$, les atomes de carbone possèdent donc quatre électrons sur la couche externe. Dans le plan de graphite, chaque atome de carbone possède à priori deux électrons sur l'orbitale 2s. En fait, celle-ci s'hybride avec les orbitales $2p_x$ et $2p_y$ pour former trois orbitales σ contenant chacune un électron de valence par atome de carbone. Le quatrième électron de valence se retrouve dans une orbitale $2p_z$ perpendiculaire au plan de graphite et susceptible de participer à une double liaison. En fait, la conjugaison de ces doubles liaisons dans le graphite conduit à la formation d'une orbitale moléculaire π géante délocalisée sur tout le plan. Étant donné la courbure finie de la surface de graphite qui compose les nanotubes, les orbitales σ et π sont plus ou moins hybridées. Les diagrammes de densités d'états comportant les densités d'états partiels des orbitales σ et π montrent leur présence simultanée aux alentours de l'énergie de Fermi pour des nanotubes de petit rayon, donc de grande courbure. On comprend aisément que toute condition aux limites

va restreindre encore la zone de conduction et pourra conduire à la création d'une bande interdite. C'est le cas dans certains nanotubes de carbone, puisque la discrétisation de la zone de Brillouin dépend de la circonférence du tube [15]. Ainsi, les nanotubes présentent un comportement métallique pour $n = m$, semi-conducteur à faible gap pour $n - m = 3q$, $q \in \mathbb{N}^*$ et semi-conducteur dans les autres cas.

I.5. Le carbone vitreux (GCE)

Le carbone est un élément largement utilisé en électrochimie existant sous plusieurs d'autres. Toutes ces formes ne permettent pas la conduction électrique entre les atomes, en conséquence tous les électrodes utilisées ayant une hybridation de type sp^2 (les électrodes en carbone vitreux, les nanotubes de carbone et de graphite) [16].

Le carbone vitreux, appelé communément GC en anglais « Glassy Carbon » ; est un carbone non graphitisable.

I.5.1. Structure

Les premiers modèles structurels supposent que les atomes liés à la sp^2 et sp^3 étaient présents, mais il est maintenant connu que le carbone vitreux est à 100% sp^2 .

I.5.2. Les propriétés

- Contrairement au graphite, le GC est dur et microstructurallement isotrope. Il est imperméable aux gaz et aux liquides et a une conductivité électrique et thermique en quelque sorte faible.
- L'électrode de carbone vitreux (ou Glassy Carbon Electrode : GCE) dans les solutions aqueuses est considérée comme une électrode inerte pour la réduction des hydronium (H_3O^+).

I.6. Techniques électrochimiques

I.6.1. La voltammétrie

La voltammétrie consiste à tracer la courbe de polarisation (courbe intensité-potentiel) d'une substance sur une électrode fixe métallique.

A. Voltamétrie cyclique (CV)

La voltampérométrie à balayage linéaire en tension est une méthode électrique d'étude dynamique des systèmes électrochimiques. Dans ce type de méthode on impose à l'électrode

une tension et l'on étudie l'évolution temporelle du courant qui la traverse. Il existe deux grandes familles de voltamétrie. Ce sont :

- La voltamétrie impulsionnelle : Il s'agit de la voltamétrie à impulsion différentielle (DPV en anglais: Differential Pulse voltammetry) ou la voltamétrie à vague carrée (SWV de l'anglais Square Wave Voltammetry).

- La cyclovoltamétrie est donc une technique permettant d'obtenir des informations sur les procédés électrochimiques de la réaction d'oxydoréduction telle que le mode de transport des espèces du système. Pour que les espèces puissent réagir à l'électrode, soit elles doivent diffuser pour se rendre jusqu'à l'électrode, soit elles sont adsorbées à l'électrode. Dans un système contrôlé par l'adsorption, l'analyste ne se déplace pas à l'électrode. Ainsi, lorsque le potentiel requis pour la réaction est atteint, le courant augmente et diminue beaucoup plus rapidement que lorsque l'analyste doit atteindre la surface de l'électrode (diffusion). Le résultat est un pic étroit avec un courant élevé (tout l'analyste peut réagir en même temps). Cette rapidité de réaction fait que les pics anodique et cathodique sont plus proches l'un de l'autre que dans un système contrôlé par la diffusion [3].

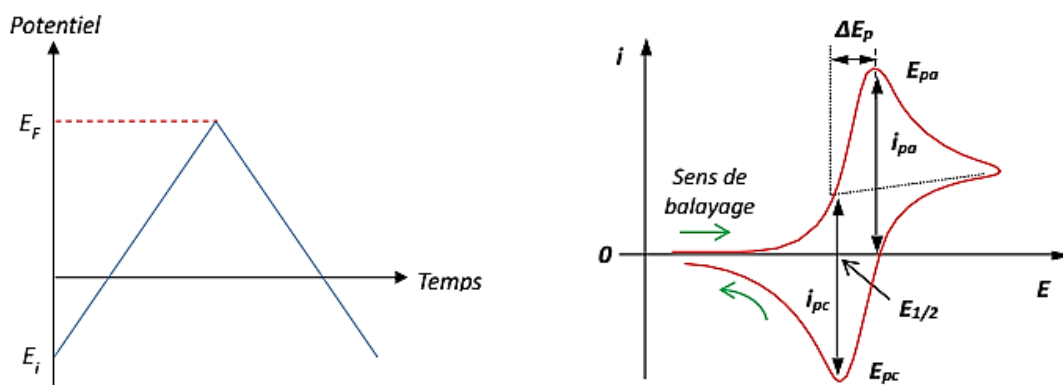


Figure.I.5 (A) Variation du potentiel au cours Du temps Lors d'un Voltamétrie cyclique.

(B) Réponse en courant potentiel lors d'un Voltamétrie cyclique.

B. Voltamétrie à vague carrée (SWV)

La voltamétrie à vague carrée (ou SWV pour l'anglais square wave voltammetry) utilise des impulsions rectangulaires de potentiel d'amplitude constante et de durée égale à la moitié de la période de la « vague ». La hauteur de l'impulsion de la vague ou amplitude est notée A . La hauteur du pas de potentiel qui correspond à la différence de hauteur entre deux impulsions consécutives s'écrit ΔE . Le courant est mesuré à la fin de l'impulsion (I_1) et avant l'impulsion suivante (I_2).

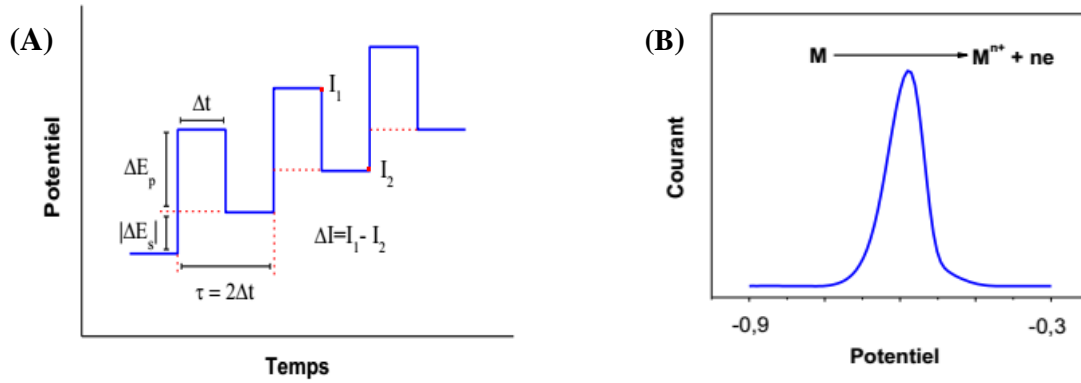


Figure.I.6 (A) Variation du potentiel au cours Du temps Lors d'un voltamètre a vague carré. (B) Réponse en courant potentiel lors d'un voltamètre a vague carré.

C. Voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV)

La voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) est la plus importante et la plus largement appliquée des technique voltamétriques impulsionnelles [17]. La DPV utilisée comme outil d'analyse offre des avantages par rapport à d'autres techniques électrochimiques. Le DPV est très sensible, permettant souvent des analyses directes au niveau. Le DPV doit sa sensibilité au temps d'impulsion relativement court et à sa nature différentielle.

Le principe de la voltamétrie impulsionnelle différentielle est de superposer des impulsions d'amplitude constante à une tension continue qui varie linéairement avec le temps. Une impulsion rectangulaire d'amplitude E et de durée t est superposée sur chaque marche de hauteur E_s et de durée t_1 , d'un escalier de potentiel. L'impulsion aboutit à la fin de la marche de l'escalier et $t_1 > t$.

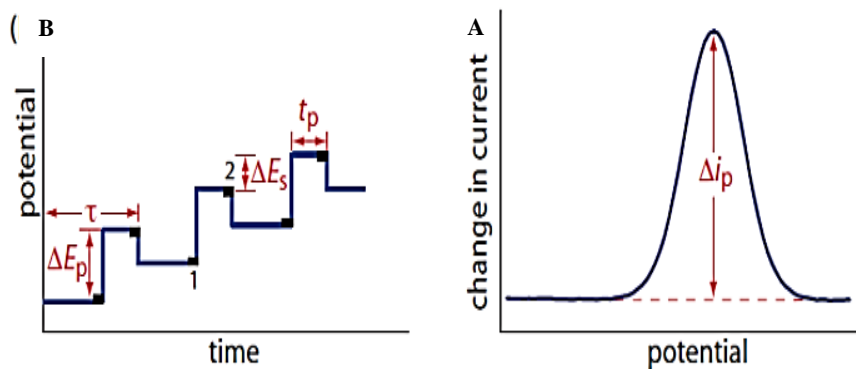


Figure.I.7 (A) réponse en courant en fonction potentiel lors voltamétrie impulsionnelle

Différentielle

(B) variation du potentiel au cours du temps lors voltamétrie impulsionnelle différentielle.

I.7. Détection électrochimique de le régorafenib

I.7.1. Régorafenib

Le régorafenib (REG, Figure I.8) est un inhibiteur de la tyrosine kinase à large spectre. REG montre une activité anti-angiogénique en raison de sa double inhibition ciblée de la tyrosine kinase VEGFR2-TIE2 [18]. Il est actuellement étudié dans le traitement de plusieurs types de tumeurs. Il a été démontré que la RGE augmentait la survie globale des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et d'un carcinome hépatocellulaire [19]. Le nom chimique approprié pour REG est 4-[4-({[4-Chloro-3-(trifluorométhyl) phényle] carbamoyl} amino)-3-fluorophénoxy]-*N*-méthylpyridine-2-carboxamide hydrate.

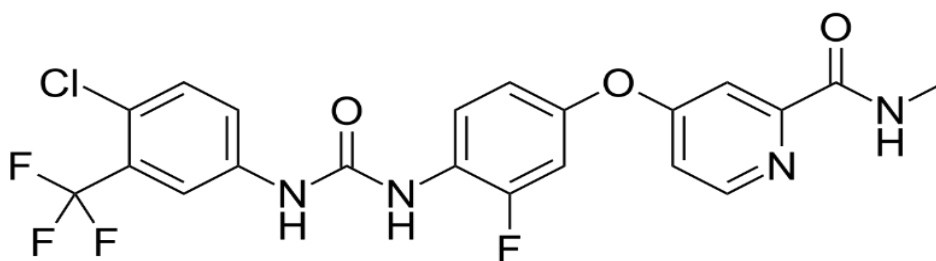


Figure.I.8 Structure chimique de Régorafenib (C₂₁H₁₅ClF₄N₄O₃)

I.7.2 Le mécanisme d'action du régorafenib

Le Régorafenib, aussi appelé 4-[4-({[4-Chloro-3-(trifluorométhyl) phényle] carbamoyl} amino)-3-fluorophénoxy]-*N*-méthylpyridine-2-carboxamide hydrate, est un inhibiteur de la multikinase actif sur les récepteurs tyrosine kinases angiogéniques (VEGFR1, 2, 3, TIE2), stromaux (PDGFR, FGFR) et oncogènes (KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAFV600E). En particulier, le régorafenib inhibe la protéine KIT mutée, un facteur oncogène majeur dans les tumeurs stromales gastro-intestinales, et bloque ainsi la prolifération des cellules tumorales.

I.7.3 Propriétés

- Pic plasmatique atteint 3 à 4 après administration orale.
- Forte liaison aux protéines plasmatiques (99.5%).
- Métabolisation hépatique par le CYP3A4, ainsi que par glucuroconjugaison par l'intermédiaire de l'UGT1A9.
- Demi-vie comprise entre 20 et 30 heures [20].

I.8 Méthodes de détermination du régorafenib

La plus forte dose de régorafénib étudiée cliniquement a été de 220 mg par jour. Les effets indésirables observés le plus fréquemment à cette dose ont été des événements dermatologiques, dysphonie, diarrhée, inflammation des muqueuses, sécheresse de la bouche, diminution de l'appétit, hypertension et fatigue.

La détermination du REG est un aspect important du contrôle de la qualité dans les formulations pharmaceutiques et sa détermination dans les fluides biologiques (tels que l'urine, le sang ou le plasma sanguin) est importante pour le domaine médical.

Un grand nombre de méthodes a été annoncé pour la détermination du régorafenib: La chromatographie en phase liquide à haute performance [21], spectrofluorimétrie [22] et énantiométrique LC/MS/MS [23]. Cependant, Certaines de ces méthodes manquent de spécificité et sont sujettes à des interférences, quelques-unes même ne sont pas adaptées à des échantillons colorés ou présentant des troubles. D'autres méthodes sont compliquées et nécessitent une durée longue pour l'analyse. Ainsi, il y a un besoin de développer des méthodes simples et rapides pour la détermination du REG en employant les techniques électrochimiques (voltamétrie cyclique, potentiométrie, ampérométrie), qui ont prouvé leur efficacité en chimie analytique. Ces méthodes sont moins coûteuses, sensibles et sélectives (mise en place d'électrodes modifiées) [24, 25].

Ce travail est consacré à la détection électrochimique du REG avec une interface du carbone vitreux (GCE) modifiée par un film de MWCNTs. Dans le souci d'améliorer les performances de capteur proposé et en particulier la sensibilité et la sélectivité de la mesure électrochimique, l'influence des paramètres de déposition sur la réponse électrochimique du capteur est explorée dans la partie II.

PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION

II.1 Produits chimiques et appareillages utilisés

II.1.1 Produits chimiques

Les produits que nous avons utilisés dans notre étude sont listés dans le (tableau II.1) ci-dessous :

Tableau .II.1: liste des produits utilisés dans la partie expérimentale.

Nom du produit	Formule brute	Producteur
Régorafenib	$C_{21}H_{15}ClF_4N_4O_3$ (100%)	Bayer Health Care Pharmaceuticals Inc (USA)
L'acétonitrile	CH_3CN	SIGMA-ALDRICH
Acide phosphorique	H_3PO_4 (85-90%)	Fluka
Diméthylformamide (DMF)	$HCO-N(CH_3)_2$ (68%)	SIGMA-ALDRICH
Hydroxyde de sodium	$NaOH$ (98%)	Fluka
Chlorure de potassium	KCl (100%)	SIGMA-ALDRICH
Chlorure de sodium	$NaCl$ (100%)	SIGMA-ALDRICH
Nitrate de potassium	KNO_3	SIGMA-ALDRICH
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	SIGMA-ALDRICH

II.1.2 Appareillage et montage électrochimique

Toutes les expériences électrochimiques, sont basées sur le montage expérimental de la (Figure. II.1) ce dernier est composé d'un Potentiostat/Galvanostat (modèle PGZ402 de marque Radiometeranalytical) piloté par logiciel Volta master 4, et d'une cellule électrochimique constituée de trois électrodes.



Figure.II.1 Photographie de la chaîne de mesures électrochimiques.

II.1.2.1 Cellule électrochimique

Toutes les expériences électrochimiques sont réalisées dans une cellule électrochimique en verre, de volume 50 ml, à trois électrodes : une électrode de travail (ET), une électrode de référence (ER) et une contre-électrode (CE).



Figure.II.2 Cellule électrochimique.

II.1.2.2 Les Electrodes

- **Electrode de référence (ER)** : les valeurs de potentiel sont mesurées par rapport à une électrode au calomel en solution aqueuse saturée en KCl (ECS; $E = 0.242 \text{ V /ENH}$ à 25°C).

- **Electrode auxiliaire (CE)** : ce type d'électrode utilisé tout au long des essais électrochimiques est un fil de platine. Le fil de platine est maintenue parallèle à l'électrode de travail pour assurer une bonne répartition des lignes de courant. Le contact électrique est assuré par une pince métallique.

- **Electrode de travail (ET)**: l'électrode de travail qui sert comme support de dépôt est un disque de carbone vitreux d'une surface 0.07 cm^2 .

II.1.3 Préparation de l'électrode modifiée MWCNTs/GCE

Avant toute manipulation électrochimique, l'électrode de carbone vitreux a été polie manuellement avec une suspension d'alumine (0.07cm^2) sur un tissu de polissage jusqu'à obtenir une surface de type miroir. Cette étape est suivie d'un rinçage avec l'eau distillée. La suspension de MWCNTs a été préparée en mélangeant 1mg de MWCNTs avec ; 1mL de diméthylformamide (DMF). La suspension ainsi obtenue est soumise aux ultrasons dans un bain, pendant 30 min, puis un volume de $3\ \mu\text{L}$ de suspension a été déposé sur la surface de GCE et laissées précipiter à température $60\ ^\circ\text{C}$.



Figure.II.3 Protocole schématique de la préparation de MWCNTs/GCE.

II.2 Activité électrocatalytique de MWCNTs/GCE vis-à-vis de l'oxydation du REG

II.2.1 Comportement électrochimique de REG sur l'électrode MWCNTs/GCE

Tout d'abord, une étude électrochimique sur le comportement électrocatalytique de MWCNTs/GCE vis à-vis de l'oxydation de REG a été effectuée. La figure.II.4 représente les voltammogrammes cycliques sur l'électrode de carbone vitreux et l'électrode modifiée MWCNTs/GCE dans PBS ($0.1\ \text{M}$; $\text{pH}\ 2.0$) en présence de 0.1mM REG enregistrée à une vitesse de balayage de $50\ \text{mV}\ \text{s}^{-1}$. Sur l'électrode non modifiée, une vague anodique correspondant à l'oxydation du REG est observée à potentiel de $1.04\ \text{V}$ et une réponse de courant égale à $7.05\ \mu\text{A}$. Aucun signal n'est observé lors du balayage retour, confirmant que le système est irréversible. Ces résultats sont en accord avec les données bibliographique [25, 26]. En revanche, sur l'électrode modifiée, Le pic d'oxydation apparaît à $1.01\ \text{V}$ avec une

réponse de courant environ 2 fois plus importante ($I_p=15.25 \mu\text{A}$) par rapport à l'électrode non modifiée. L'augmentation du pic d'oxydation témoigne d'un transfert électronique plus rapide et d'une surface active plus importante.

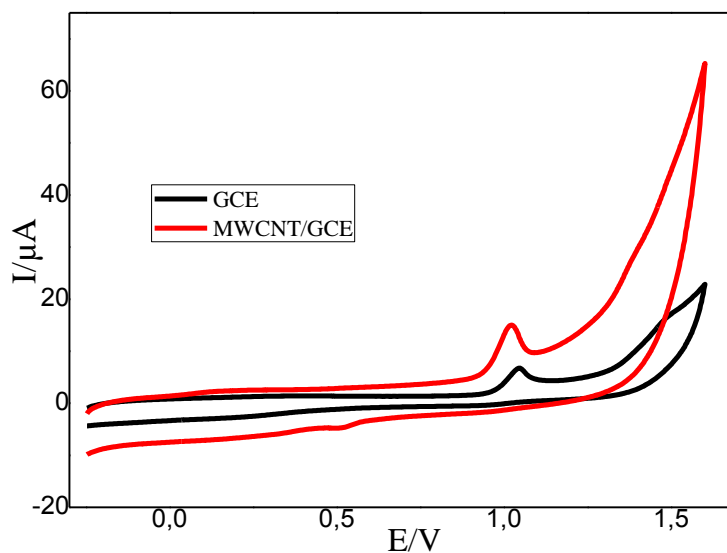


Figure.II.4 Voltammogrammes cycliques de GCE et de MWCNTs/GCE dans 0.1M PBS à pH 2.0 en présence de 0.1 mM REG à une vitesse de balayage 50 mV s^{-1} .

II.2.2 Optimisation de la réponse de capteur en fonction de la quantité de MWCNTs

La quantité optimale du MWCNTs déposée sur l'électrode de travail a été minutieusement étudiée par une série d'expériences où la quantité de MWCNTs a été modifiée de 0 à $7 \mu\text{L}$. Les voltampérogrammes de DPV sur l'électrode modifiée en présence de 0.1 mM REG ont été enregistrés et présentés dans la figure.II.5.

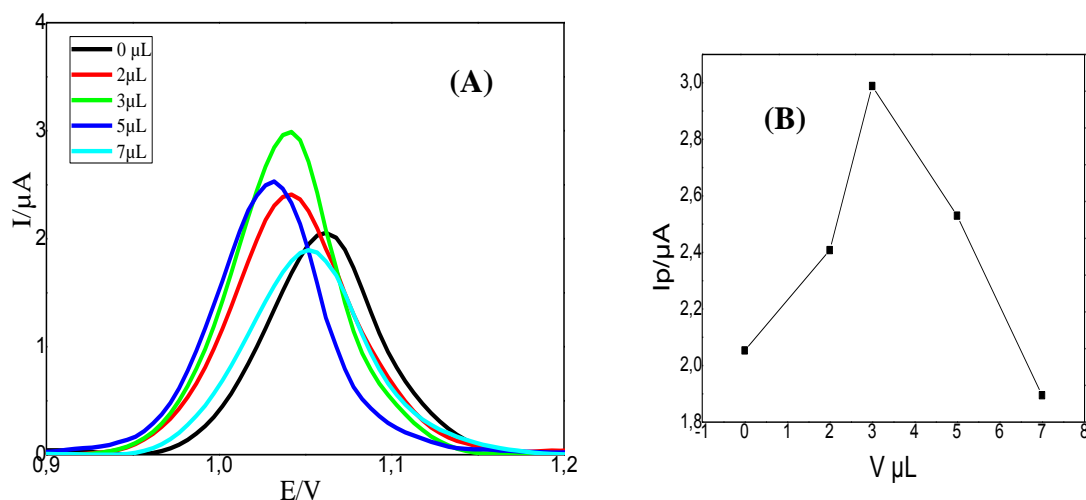


Figure.II.5 (A) Voltampérogrammes impulsionsnel différentiels de 0.1 mM REG dans 0.1 M PBS sur l'électrode MWCNTs/GCE préparée à différents quantité en MWCNTs.

(B) variation de I_p en fonction de la quantité de MWCNTs.

La figure.II.5 (B) montre l'évolution de la réponse du capteur en fonction de la quantité de MWCNTs déposé sur l'électrode de GCE. Comme le montre cette courbe, l'intensité du pic de REG atteint une valeur maximale quand le volume du modifiant est de 3 μL, au-delà de 3 μL, l'intensité du pic de REG diminue. L'amélioration de la réponse du capteur pour des quantité en MWCNTs entre 2 et 3 μL est attribuée à l'augmentation de la conductivité de l'électrode ce qui va faciliter le transfert de charge lors de l'oxydation du REG sur la surface de MWCNTs/GCE [26]. Après cet intervalle, l'intensité du courant diminue, ceci s'explique par la saturation au niveau d'électrode de travail, c'est à dire la quantité de modifiant sur la surface atteint un maximum qui traduit un recouvrement limite à des quantités de MWCNTs plus élevées. Un volume de 3 μL en MWCNTs a donc été choisi comme un volume optimal pour la suite des expériences.

II.2.3 Caractérisation de l'électrode modifiée par la voltamétrie cyclique

La voltammétrie cyclique d'une espèce électro-active comme $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ est un excellent outil pour évaluer la cinétique électronique de l'interface d'une électrode. Quand la surface d'une électrode est modifiée par l'addition des couches catalytiques, on peut examiner les changements du comportement de l'électrode à l'interface électrode/électrolyte en utilisant le ferrocyanure comme espèce électro-active et observer la cinétique de transfert électronique qui sera par conséquent perturbée.

La figure.II.6 présente les voltammogrammes de l'électrode de GCE et MWCNTs. les mesures ont été effectués en présence de couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3/4}$, avec une vitesse de balayage de 50 mV/s.

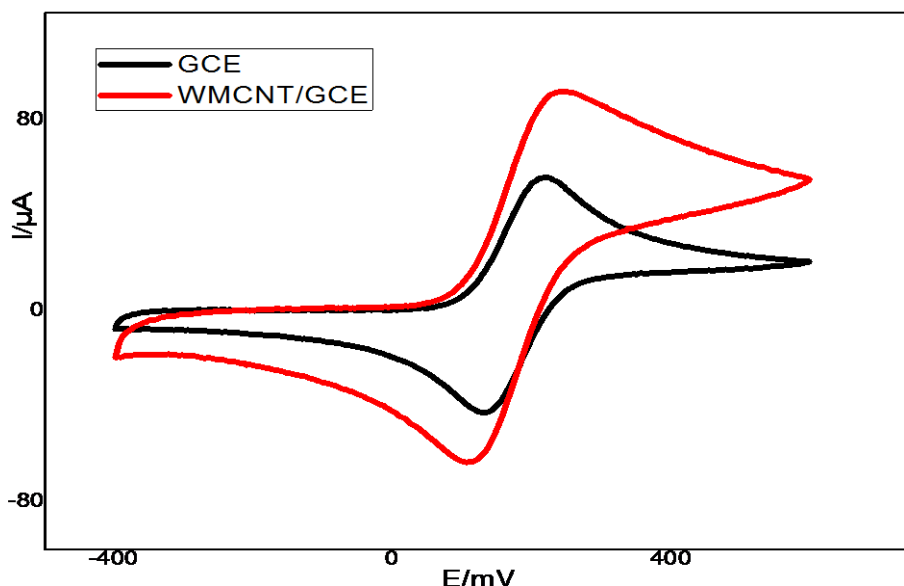


Figure.II.6 Voltammogrammes de l'électrode GCE et MWCNT/GCE. Mesures effectuées dans 5.0 mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}] / \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ dans le KCl (0.1 M) avec une vitesse de balayage 50 mV/s .

Le voltammogramme correspondant à l'électrode non modifiée montre un faible signal où le potentiel d'oxydation est dans la gamme de -400 mV et celui de la réduction à 600 mV. La présence d'une couche de MWCNT entraîne une augmentation du courant correspondant aux pics d'oxydoréduction. En effet, cette couche favorise le transfert d'électron à l'interface de l'électrode de travail, donc elle augmente la conductivité du système d'où l'augmentation de la densité de transfert de charge. En plus, la présence de MWCNT permet d'augmenter la surface spécifique de l'électrode.

II.2.4 Facteur de rugosité de l'électrode MWCNT/GCE

La rugosité de la surface obtenue pour les électrodes GCE et MWCNT/GCE est présentée au tableau.II.2 Le facteur de rugosité (F_R) est calculé en divisant la valeur de la surface réelle obtenue des mesures voltammétriques (Figure.II.6) par la surface géométrique (0.07 cm^2).

Les valeurs de surface réelle, montrées dans le tableau.II.2 ont été estimées en utilisant l'équation suivante (Randles – Sevcik [27]):

$$I_p = 2.69 \cdot 10^5 \text{ n}^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C_0 \quad \text{Eq. II.1}$$

Avec, I_p le courant de pic anodique, v la vitesse de balayage (50 mV/s), n nombre d'électrons échangés ($n=1$), C_0 la concentration de $K_4Fe(CN)_6^{3-}$ (5.0 mM), et D le coefficient de diffusion ($5.69 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)[28].

Tableau.II.2 : La rugosité de la surface obtenue pour les électrodes GCE et MWCNT/GCE.

Electrode de travail	Surface réelle (cm ²)	F _R
GCE	0.079	1.13
MWCNT/GCE	0.128	1.82

Les résultats du tableau montrent que le changement du facteur de rugosité F_R est en accord avec la variation de l'activité électrocatalytique du système MWCNT/GCE étudié par voltamétrie cyclique. Ainsi, plus la rugosité augmente plus l'électrode est performante à cause d'une surface active plus élevée.

II.2.5 Effet du pH

L'activité électrocatalytique de MWCNTs/GCE est aussi dépendante des conditions environnementales et spécialement du pH. Afin d'examiner l'influence de ce paramètre sur les performances analytiques du capteur, nous avons examiné par DPV les réponses électrochimique obtenues avec une concentration de 0.1 mM de REG dans différents solutions tampon de pH allant de 1 à 7 (figure II.7.A).

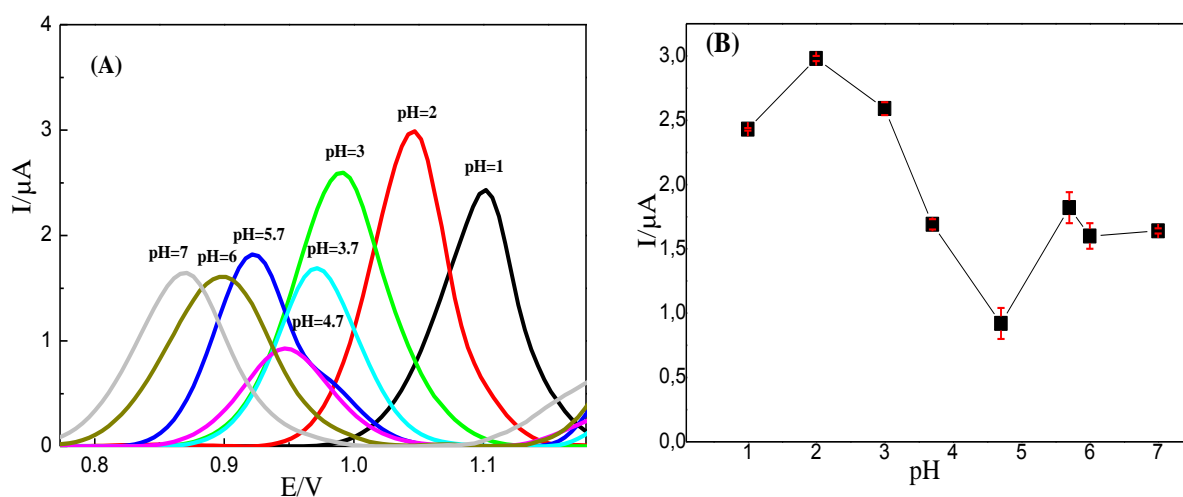


Figure.II.7 (A) Voltammogrammes impulsions différentiels de 0.1 mM de REG sur l'électrode MWCNTs/GCE dans différentes pH. **(B)** Variation de la réponse voltammétrique en fonction de pH en présence de 0.1 mM REG sur l'électrode MWCNTs/GCE.

L'intensité du courant d'oxydation de REG est maximale pour une valeur de pH égal à 2.0. Nous observons aussi que le potentiel d'oxydation se déplace vers des valeurs plus négatives avec l'augmentation de pH (Figure.II.7.B).

D'autre part, le tracé de la variation du pic de potentiel (E_p) en fonction de pH (Figure. II.8), nous a permis de déterminer le nombre d'électrons et protons mise en jeu dans la réaction d'oxydation du REG. La relation entre E_p et pH est donnée par l'équation . II. 2 [29].

$$E^{\circ'} = E^{\circ} - \frac{m}{n} \times 0.059 \text{ pH} \quad \text{Eq. II. 2}$$

Avec E° est le potentiel standard du couple rédox, m et n sont respectivement le nombre de protons et d'électrons échangés.

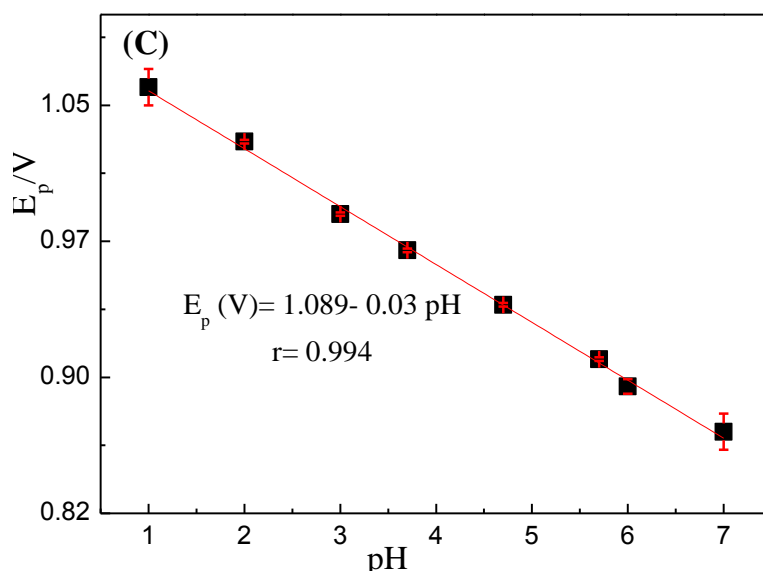


Figure.II.8 Variation du pic de potentiel en fonction de pH en présence de 0.1mM REG.

En effet, en traçant E_p en fonction de pH, on obtient une droite dont la pente est égale à 0.03 V/pH. Cette valeur est inférieure à celle théoriquement calculée (0.059 V/pH) avec un rapport de $\frac{1}{2}$ qui correspond bien à un proton et deux électrons mise en jeu dans le processus d'oxydation du REG sur notre électrode.

II.2.6 Effet de la vitesse de balayage du potentiel (ν)

L'influence de la vitesse de balayage des potentiels sur le pic de courant d'oxydation apporte des informations sur les phénomènes impliqués lors de la réaction à l'électrode. La figure.II.9

montre les voltammogrammes cycliques obtenus avec l'électrode MWCNTs/GCE dans 0.1 M PBS de pH 2.0 contenant 0.1 mM de REG pour des vitesses de balayage allant de 5 à 500 mV s⁻¹.

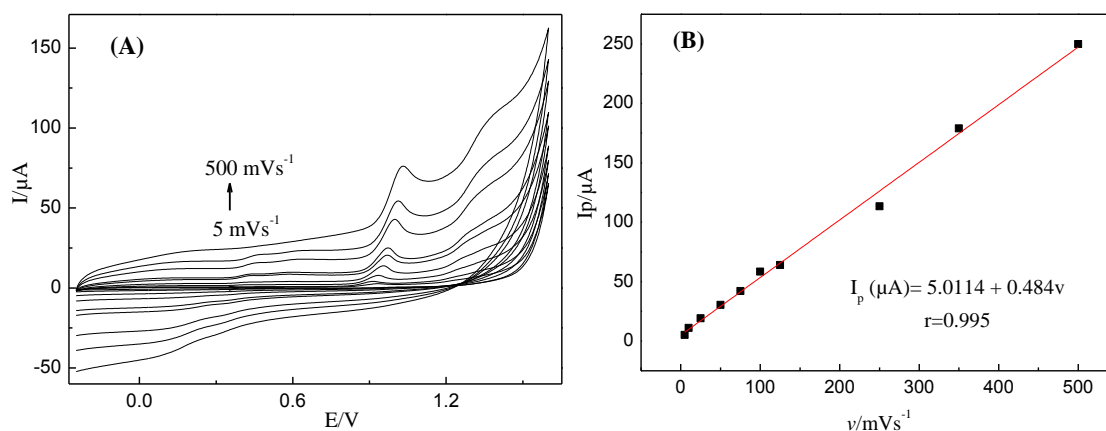


Figure.II.9 (A) Voltammogrammes cyclique de MWCNTs/GCE en présence de 0.1 mM REG dans 0.1 M PBS de pH 2.0 à différents vitesse de balayage (5 - 500 mVs⁻¹).
(B) variation de I_{pa} en fonction de la vitesse de balayage.

L'ensemble des courbes illustrées dans la figure.II.9 (A) est caractérisé par des pics d'oxydation du REG. On constate aussi un déplacement du pic d'oxydation vers les potentiels anodiques avec l'augmentation de la vitesse de balayage.

La figure.II.9 (B) donne les évolutions des pics du courant anodique en fonction de la vitesse de balayage du potentiel. L'obtention de droite indique clairement que la réaction électrochimique se fait sous contrôle d'adsorption [30].

Pour les systèmes irréversibles, le potentiel du pic E_p varie avec la vitesse du balayage en potentiel. Pour une oxydation, E_p se déplace vers les potentiels cathodiques (Figure.II.9). Cette variation, donnée par l'équation .II.3 [31], permet de calculer la valeur de αn :

$$E_{pa} = E^{\circ} + \frac{2.303RT}{\alpha nF} \log \nu \quad \text{Eq. II. 3}$$

Où E[°] est le potentiel standard du couple rédox, α le coefficient de transfert de charge, n est le nombre d'électrons transférés lors de la réaction, F la constante de Faraday (96500 C.mol⁻¹), ν la vitesse de balayage (V.s⁻¹), R la constante des gaz (8.314 J.mol⁻¹.K⁻¹) et T la température (en K).

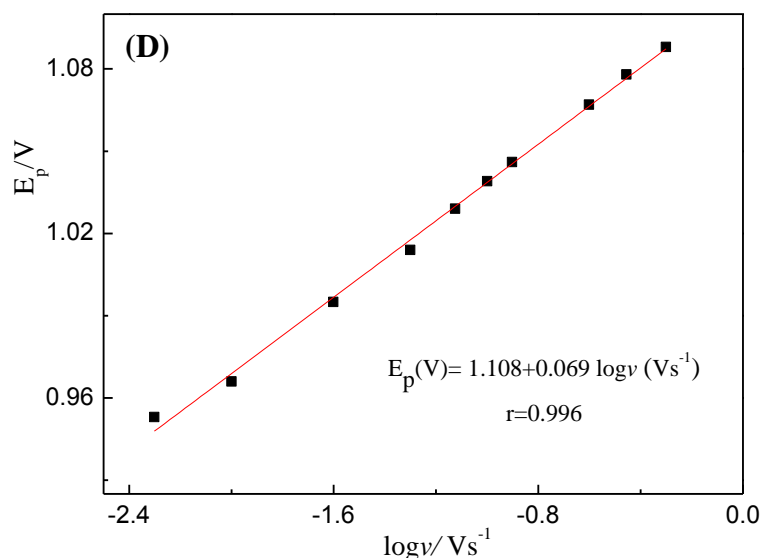


Figure. II.10 Courbe de variation de E_p en fonction de logarithme de la vitesse de balayage.

Dans notre cas, le calcul mène à $an = 0,98$. Cette valeur, a été calculée en remplaçant la pente (0.06) de la relation linéaire entre E_p et $\log v$, extraite du graphe reporté de la Figure. II.10 par sa valeur dans la relation (Eq.II.3). Ainsi, en posant un coefficient de transfert de charge α égal à 0.5 [34], ce qui peut être contestable, nous obtenons le nombre d'électrons transférés lors de la réaction qui est égale à 2 électrons. Il est important de noter le très bon accord entre ces résultats et ceux déjà obtenus par l'étude de pH (section II.2.5).

II.3 Performance analytique de l'électrode MWCNTs/GCE

II.3.1 Courbes d'étalonnage et caractéristiques analytiques

Les courbes de calibration ont été élaborées en utilisant le MWCNTs/GCE dans les conditions expérimentales optimales décrites précédemment. La figure.II.11 (A) présente les voltammogrammes de l'oxydation du REG à différentes concentrations allant de 1 à 100 μM . La droite d'étalonnage résultante exprime l'intensité du courant du pic d'oxydation de l'REG en fonction de sa concentration dans le milieu. Le courant augmente linéairement avec les faibles concentrations de REG Fig.II.11(A). L'équation de corrélation obtenue pour cette droite est : $I_p = 0.241 + 0.129 C$, avec un coefficient de régression linéaire de $R^2 = 0.997$.

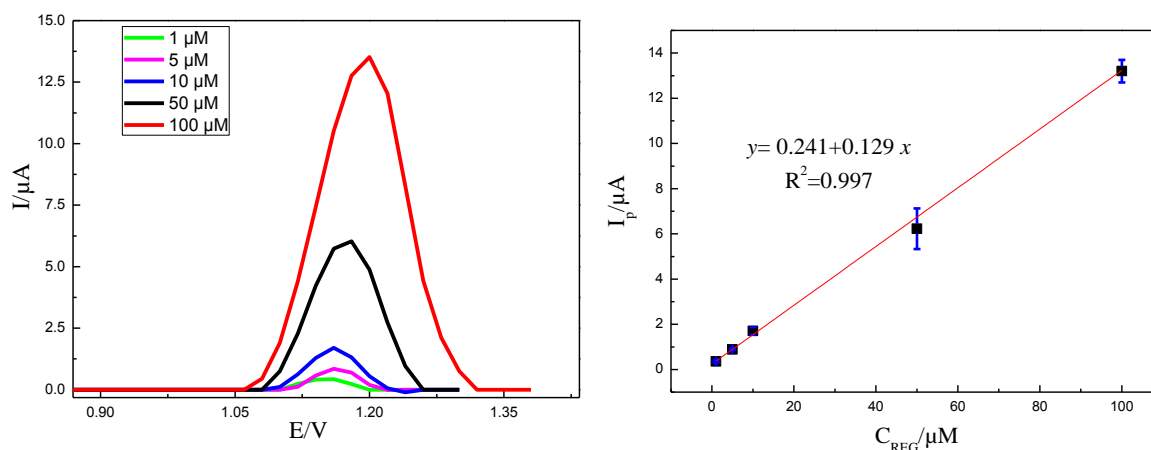


Figure.II.11 (A) Voltamogrammes impulsionnels différentiels obtenus sur l'électrode modifiée MWCNTs/GCE dans 0.1 M PBS à pH=2.0 contenant des concentrations croissantes de REG [1 -100 μM]. (B) droite d'étalonnage de calibration du capteur MWCNTs/GCE.

Le capteur a une réponse linéaire dans la gamme de concentration en REG variant entre 1 et 100 μM avec une limite de détection (LOD) et quantification (LOQ) de 0.53 μM et 1.78 μM , respectivement. Ces valeurs ont été obtenues pour un rapport signal/bruit égal à 3 pour LOD et 10 pour LOQ [32]. La sensibilité de ce capteur est approximativement de 0.129 $\mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1}$. Enfin, la répétabilité de la proposée en utilisant MWCNTs/GCE a été évaluée en analysant 5 μM du REG. Après cinq mesures successives, les coefficients de variations calculées sont de 3.37 et 0.25 % respectivement pour les pics de courant et potentiel.

Le tableau.II.3 rassemble les performances analytiques du capteur issues de cette étude ainsi que celles obtenus par les méthodes classiques (chromatographie et spectrométrie) et électrochimiques.

La performance analytique de la méthode proposée est moins sensible à celles obtenus avec les méthodes analytiques classiques publiées. Mais de point de vue économique, cette méthode est plus simple à mettre en place par rapport aux autres méthodes classiques qui nécessitent toutes l'utilisation de matériels coûteux et impliquent des protocoles opératoires compliqués avec des phases de prétraitement longues.

D'autre part, les résultats obtenus avec cette méthode sont comparables à ceux obtenus avec les méthodes électrochimiques. Même si les performances analytiques de MWCNTs/GCE sont moins bonnes que celle de l'électrode $\text{ZrO}_2/\text{rGO}/\text{GCE}$ et CPE [24, 25], ce capteur reste intéressant en termes de domaine de linéarité. Sans oublier les motivations d'ordres économique et temporel par le fait que l'électrode proposée est moins coûteuse (les produits

utilisés sont beaucoup moins chères) et moins consommatrice de temps (plus simple à mettre en place) par rapport à l'électrode ZrO₂/rGO/GCE.

Tableau.II.3: Comparaison des résultats obtenus par chromatographie, spectrométrie et électrochimique.

Electrode	LOD μM	LOQ μM	Linéarité μM	Référence
HPLC	-	0.0207	0.02-20.7	[21]
LC-MS/MS	-	0.05	0.05-51.7	[33]
LC-MS/MS	-	0.207	0.207-8.28	[23]
Spectrophotometric	0.227	0.6	1.03-51.7	[22]
ZrO ₂ /rGO/GCE	0.017	0.059	0.11-0.343	[24]
EPC	0.207	0.6	1-27	[25]
MWNCT/GCE	0.53	1.7	1-100	Ce travail

II.3.2 Effet d'interférence

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de certaines substances inorganiques (K⁺, Na⁺, NO₃⁻ et Cl⁻) et organiques (glucose) sur la détection électrochimique du REG.

Dans cette étude la concentration d'REG a été fixée à C_{REG}= 100 μM dans une solution de 0.1M PBS à pH 2.0. Un voltammogramme impulsions différentiels de 10 μM de REG (sans interférent) a été enregistré comme référence. Ensuite chaque interférent avec une concentration de C_{int}= 0.1M a été mélangé avec le REG, soit un rapport de concentration (C_{int} : C_{REG}) de 100 :1. La figure II.12 représente l'influence de la présence d'espèces interférentes sur le pic d'oxydation du REG.

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas beaucoup de changement au niveau de l'intensité de pic de l'REG au présence des ions K⁺, Na⁺, Cl⁻, NO₃⁻. En effet, pour un rapport (C_{REG}:C_{interf}) égal à 1:100, la variation de la réponse de courant du REG est inférieur à ±10% (tableau II.4). Par contre, le glucose a montré une influence sur la réponse du REG dans l'excès de 100 fois. La présence de glucose à forte concentrations dans le milieu pourrait en effet gêner et inhiber la réaction de l'électrode, probablement en raison d'interactions s'établissant entre le glucose et la surfaces de MWCNTs/GCE.

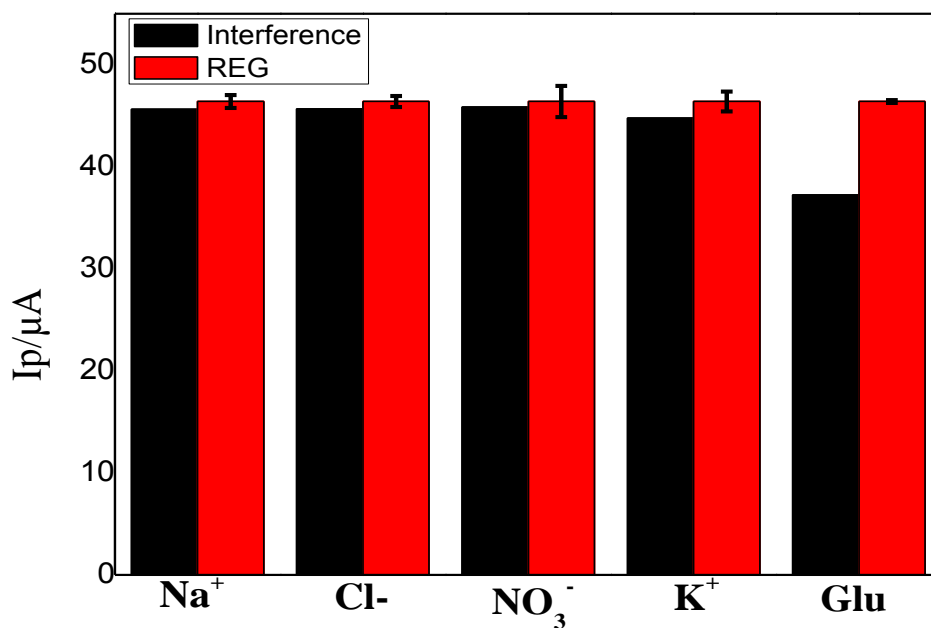


Figure.II.12 Etude L'interférence métallique et organique sur la concentration du REG contenant 0.1mM par addition de quelques éléments comme le K⁺, Cl⁻, NO₃⁻,Na⁺, glucose. Dans une solution de PBS 4 ml.

Tableau .II.4: La variation de la réponse de courant du REG calcule du Bias.

Les éléments	± Erreur %
Cl ⁻	-1.57%
K ⁺	-3.46%
NO ₃ ⁻	-1.14%
Glu	-19.7%
Na ⁺	-1.66%

Conclusion générale

Parmi les nombreuses méthodes physico-chimiques à la disposition de l'analyste, la méthode électrochimique occupe une place particulière car ses applications peuvent être extrêmement variées, soit dans le domaine de l'analyse minérale ou dans celui de l'analyse organique. Les techniques voltammétriques impulsionnelles sont, de ce fait, particulièrement adaptées à la détermination quantitative de traces.

Le travail présenté dans ce mémoire a montré une fois de plus les potentialités des interfaces modifiées pour garantir une mesure électrochimique sensible, sélective et peu coûteuse. La modification de surfaces de carbone vitreux par les nanotubes de carbone induit de fortes variations de l'activité électrocatalytique de l'électrode vis-à-vis de la réaction d'électrooxydation du REG. En effet, le comportement électrochimique du MWCNTs/GCE vis-à-vis de l'oxydation du REG a révélé qu'il possède d'excellente activité électrocatalytique par rapport à l'électrode non modifiée. En utilisant la voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) et sous les conditions expérimentales optimisées, le MWCNTs/GCE a montré de bonnes performances analytiques pour la détermination du REG avec une très basse limite de détection ($0.53 \mu\text{M}$) et une large gamme de linéarité (1 à $100 \mu\text{M}$). Les performances électroanalytiques élevées du MWCNTs/GCE font un outil prometteur pour la détection de REG dans les laboratoires de contrôle qualité, c'est donc une bonne procédure alternative aux méthodes analytiques classiques de détection (chromatographie et spectrométrie). Nous avons donc par ce travail, pu réaliser un capteur électrochimique très simple à préparer, hautement sensible, reproductible et stable.

En perspectives, l'étude menée avec ce capteur, dont les premiers résultats sont prometteurs, mais reste à finaliser.

Dans un premier temps, le renouvellement de surface et la stabilité de réponse de l'électrode modifiée doivent être évalués pour confirmer la fiabilité de ce capteur développé.

Ensuite, le domaine de détection de regorafenib doit être étendu dans les échantillons pharmaceutiques et biologiques. Cela permettra de mieux apprécier ce capteur développé, afin d'offrir une perspective favorable dans la fabrication de capteur électrochimique pour quantifier ce médicament dans les milieux réels.

Les références

- [1] G. Asch, Les capteurs en instrumentation industrielle - 7ème édition. Dunod, 2010.
- [2] J. Wang, Analytical electrochemistry. John Wiley & Sons, 2006.
- [3] L. D. Mello , L. T. Kubota, « Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries », Food Chem., vol. 77, no 2, p. 237-256, mai 2002.
- [4] E. Mullins. Statistics for the quality control chemistry laboratory. The Royal Society of Chemistry, U.K Cambridge 2003.
- [5] C. Sablayrolles , M. Montréjaud-Vignoles, D. Benanou, L. Patria, M. Treilhou,. J. Chrom A., 1072(2005)233-242.
- [6] E. Ezan, J. M Grognet. Problèmes posés par la validation de l'immunoanalyse de médicaments. Immunoanal Biol Spéc., 9(1994)153-158.
- [7] M. Feinberg. Validation interne des méthodes d'analyse. Techniques de l'ingénieur, Paris, France., P224(1995)1-23.
- [8] N. Pal, Y.W. Huang, D. M. Madson, C. Kuster, X. J. Meng, P. G. Halbur, T. Opriessnig, . Journal of Virological Methods., 149(2008)217-225.
- [9] M.M.W.B. Hendriks, H. J. Boer, A.K. Smilde. Robustness of analytical chemical methods and pharmaceutical Technological Products. Data handling in science and technology., 19(1996)1-346.
- [10] C. burgess. Valid Analytical Methods and Procedures. The Royal Society of chemistry 2000.
- [11] L. Halbaut, C. Barbé, M. Aróztegui, C. de la Torre, . A. Inter. J . Pharm., 147(1997)31-40.
- [12] W. Funk, V. Dammann, G. Donnevet, S. Lannelli, E. Iannelli . Quality Assurance in Analytical Chemistry: Applications in Environmental, Food and Materials Analysis, Biotechnology, and Medical Engineering. 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH , Co , KGaA, Weinheim, Germany.
- [13] R. F. Lane, A. T. Hubbard, Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents. The J , Phys Chem, 77(11), (1973)1401-1410.
- [14] A. Eatemadi, H. Daraee, H. Karimkhanloo, M. Kouhi, N. Zarghami, A. Akbarzadeh, ... S. Joo, « Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications », *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 393.

- [15] Nicolas Izard, nanotube de carbone: Système pour la limitation optique, université Montpellier II, (2004).
- [16] E. Desimoni , B. Brunetti, « Presenting Analytical Performances of Electrochemical Sensors. Some Suggestions », *Electro anal*, vol . 25(2013) 1645-1651.
- [17] F. Scholz, *Voltammetric techniques of analysis: the essentials*, ChemTexts. 1 (2015) 1–24.
- [18] S.L. Davis, S.G. Eckhardt, W.A. Messersmith, A. Jimeno, The development of regorafenib and its current and potential future role in cancer therapy, *Drugs Today* 49 (2013) 105-115
- [19] D. Strumberg, B. Schultheis, Regorafenib pour le cancer. *Expert. Opinions. Enquête. Drogues* 21 (2012) 879-889.
- [20] European Medicines Agency/Science Medicines Health. Stivarga: Availableat :https://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2017/20170127136893/anx_136893_fr.pdf(Accessed:19thOctober 2017).
- [21] K. Fujita , M. Miura, H. Shibata, Quantitative Determination of Regorafenib and its Two Major Metabolites in Human Plasma with High-Performance Liquid Chrom and Ultraviolet Detection. *Biomed. Chrom.* 201630, 1611– 1617,
- [22] M, Albayrak . *Lat. Am. J. Pharm.* 37 (2018) 1349-1353.
- [23] N. P. Van Erp, D. D. Wit, H. J. Guchelaar, H. Gelderblom, T. J. Hessing, J. D. A . Hartigh,. *J. Chrom. B* 2013, 937, 33-43,
- [24] M ,Venu, S. Venkateswarlu, Y. V. M. Reddy, A. Seshadri Reddy, V. K. Gupta, M. Yoon, G. Madhavi, Highly Sensitive Electrochemical Sensor for Anti-cancer Drug by Zirconia Nanoparticle-Decorated Reduced Graphene Oxide Nanocomposite. *ACS Omega* 3 (2018) 14597–14605.
- [25] Zeynep Aydoğmuş, S. S. Aslan, G. Yildiz, , A. Senocak *Electrochemical Study and. J .Anal .Chem*, 75(5) , (2020) 691–700.
- [26] A. Cernat, M. Tertiş, R. Săndulescu, F. Bedioui, A. Cristea, et C. Cristea, « Electrochemical sensors based on carbon nanomaterials for acetaminophen detection: A review », *Anal. Chim. Acta* 886 (2015) 16-28
- [27] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Method: Fundamental andApplications*, second ed., Wiley, New York, 2001, pp. 231.
- [28] Y.D. Zhao , W.D. Zhang , Q.M. Luo, S.F.Y. Li , *Microchem. J.* 75 (2003) 189.
- [29] K. Asadpour-Zeynali, F. Mollarasouli, *Biosens. Bioelectron.*, 92 (2017) 509-516
- [30] D.A. Aikens, *J. Chem. Educ.* 60 (1983) A25.

- [31] E. Laviron, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 100 (1979) 263-270.
- [32] S.A. Ozkan, *Electroanal. Methods in Pharm Anal and Their Validation*, HNB Publishing, New York, (2012).
- [33] Luethi, et al. *Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometric Assay for the Multikinase Inhibitor Regorafenib in Plasma*. *Biomed. Chrom.* 28 (2014) 1366– 1370.
- [34] D. K. Gosser, *Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*, John Wiley & Sons, Inc., New York, (1993).