

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE

FACULTE DES SCIENCES EXACTES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

N^o d'ordre :191/Ds/2017

N^o de série :28/Ch/2017

THESE

PRESENTEE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

EN CHIMIE PHYSIQUE ET ANALYTIQUE

OPTION :

ELECTROCHIMIE ORGANIQUE

**Comportement électrochimiques des hétérocycles
azotés et des biomolécules biologiquement actifs.**

Par

ISSAAD Fatima Zohra

Devant le jury composé de :

Président	Pr. A. CHIBANI	U. des frères Mentouri-Constantine (Algérie)
Rapporteur	Pr. C. MOUATS	U. des frères Mentouri-Constantine (Algérie)
Co-rapporteur	Pr. A. M. OLIVEIRA BRETT	U. de Coimbra-Coimbra (Portugal)
Examineur	Pr. T. DOUADI	U. Ferhat Abbes-Sétif (Algérie)
Examineur	Pr. K. BELMOKRE	U. de Skikda-Skikda (Algérie)
Examinatrice	MCA. F. LOUAFI	U. des frères Mentouri-Constantine (Algérie)

Année universitaire : 2016-2017

A la mémoire de ma mère, ce travail est pour moi le fruit de tes prières.

Qu'Allah l'accueille en son éternel paradis.

1961-2016



Remerciements

Avant tout développement, il apparaît convenable de remercier, tout d'abord, mon encadreur Professeur C. MOUATS, pour sa disponibilité, ses conseils, ses corrections, son encouragement tout au long de la réalisation de ce travail de recherche.

Je tiens à remercier très chaleureusement le Professeur Docteur A. M. OLIVEIRA-BRETT de l'Université de Coimbra-Portugal, pour son accueil, sa gentillesse, sa disponibilité et sa générosité illimitée dès notre premier contact qui, m'ont permis de trouver les ressources nécessaires pour mener à terme ce travail. Meus profundos agradecimentos Professora.

Je suis extrêmement reconnaissante à l'égard du Professeur A. CHIBANI (Président de jury), je remercie les Professeurs T. DOUADI (Un. de Sétif), K. BELMOKRE (Un. de Skikda) et F. LOUAFI (Un. de Constantine1) pour avoir accepté de faire partie de ce jury et de mobiliser leur temps pour juger ce travail.

Je remercie tout particulièrement et je témoigne toute ma reconnaissance au Professeur H. BENBOUZA (ex. Directrice du Centre de Recherche en Biotechnologie C. R. Bt) de m'avoir donné l'opportunité de postuler à un stage de longue durée, et même pour ses conseils précieux.

En parallèle, je gratifie les personnes que j'ai rencontré au Portugal, les membres de l'équipe de bio-électrochimie (laboratoire de corrosion et bioanalyse, Universidade da Coimbra) qui m'ont beaucoup appris au cours de ce stage: Adrian, Madi, Victor, Luciana, Isabeal, Bruno et Ana Maria. Et les personnes qui ont fait de ma résidence à l'étranger des moments inoubliables Lamyae, Souha, Khadidja, Souad, Isabeal, Mohamed Javad, Jaafer, Jihane, Samuel et Dona Vitalina.

Je tiens également à remercier mes proches amies Hayet, Souad, Hanane, Insaf, Sara, Razika, Soraya, Sandra et Sara.

Mes remerciements s'adressent également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail : Fadila, Seif, Tarek, Abderrahmane, Saleh, Sihem, Borhane, Ryma, Insaf et Moussa.

Enfin, je voudrais remercier les plus chers à mes yeux: mes parents, mes nièces (Kinda et Joumana), Malika, Soumia, Raouf et Ahmed.

Après plusieurs tentatives infructueuses, ce travail était en totale adéquation avec mes attentes professionnelles et personnelles.

شكراً

Muito Obrigada...

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES SCHEMAS

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE 01

PARTIE I

CHAPITRE 1 : NOTIONS FONDAMENTALES

1. Processus électrochimique	03
2. Cellule électrochimique	03
3. Paramètres électrochimique	05
3.1. Interface métal / électrolyte	05
3.2. Cinétique électrochimique	06
3.3. Transfert d'électrons / Transport de la matière	07

CHAPITRE 02 : ELECTROSYNTHESE DES HETEROCYCLES

1. Synthèse électrochimique des hétérocycles	09
2. Cyclisation oxydative sur l'anode	11
2.1. Cyclisation intramoléculaire	11
2.2. Cyclisation intermoléculaire	12
3. Cyclisation réductive sur cathode	13
3.1. Cyclisation intramoléculaire	13
3.2. Cyclisation intermoléculaire	15

CHAPITRE 03 : ELCTROCHIMIE DES ANTICORPS

1. Les acides aminés	17
1.1. Propriétés physico-chimiques des acides aminés	17
1.1.1. Polarité	17
1.1.2. Ionisation	18

1.2. Propriétés électrochimiques des acides aminés	18
1.2.1. Cystéine	18
1.2.2. Histidine	19
1.2.3. Tryptophane	19
1.2.4. Méthionine	19
1.2.5. Tyrosine	19
2. Les protéines	19
2.1. Immobilisation des protéines sur une surface solide	20
3. Les anticorps	22
3.1. Structure des anticorps	22
3.2. Bevacizumab (Avastin)	24
Effet thérapeutiques de Bevacizumab	24
4. L'électrochimie et les produits pharmaceutiques	25
5. La dénaturation	27
5.1. Sodium Dodécyl Sulfate (SDS)	27
5.2. L-Dithiothreitol (DTT)	27
5.3. Tris (2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP)	28

CHAPITRE 04: ELCTROCHIMIE DES FLAVONOIDES

1. Stress oxydatif	29
2. Les antioxydants	30
2.1. Antioxydants Enzymatiques	31
2.2. Antioxydants non-enzymatiques	32
3. La conservation des aliments	35
3.1. Le traitement chimique	36
3.2. Le traitement biologique	36
3.3. Le traitement physique	36
La lyophilisation	36
4. L'extraction végétale	37
4.1.1. Extraction assisté par micro-ondes (MAE)	38
4.1.2. Extraction assistée par ultrasons (UAE)	39
5. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	41
5.1. Détecteur photodiode (PDA)	43
5.2. Détecteur électrochimique (ED)	43

6. Evaluation de l'activité antioxydante totale	48
6.1. Méthodes spectroscopiques (Teste du radical libre DPPH)	49
6.2. Méthodes électrochimiques	50

PARTIE II

CHAPITRE 1 : TECHNIQUES, MATERIELS & REACTIFS

CHAPITRE 1.1. TECHNIQUES ELECTROCHIMIQUES

1. Polarographie Classique	54
2. Voltammétrie Cyclique (CV)	55
3. Voltammétrie à Signaux Carrés de Potentiel (SWV)	57
4. Voltammétrie Impulsionnelle Différentielle (DPV)	59
5. Chronoamperométrie	61
6. Electrolyse et Coulométrie	61
7. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)	63
8. Electrode de travail	65
8.1. Electrode à goutte de mercure tombante (DME)	65
8.2. Électrode de carbone vitreux (GCE)	66

CHAPITRE 1.2. MATERIELS ET REACTIFS

1. Matériels de la partie électrochimie des hétérocycles	68
1.1. Electrosynthèse des hétérocycles de départ	68
a. 2-(2-nitro phényl) acétate d'éthyle	68
b. 2-(2-nitro phényl) acétate de phényle	68
c. 2-(2-nitro phényl) acétamide	69
1.2. Electrolyse et Coulométrie	69
1.3. Cytotoxicité	71
2. Matériels de la partie électrochimie du Bevacizumab (BEVA)	72
2.1. Réactifs	72
2.2. Matériels	73
2.3. Procédures d'analyses	75
a. Procédure 1- BEVA en solution	75
b. Procédure 2-BEVA native	75
c. Procédure 3-BEVA dénaturé	75

3. Matériels de la partie électrochimie des flavonoïdes	76
3.1. Réactifs	76
3.2. Prétraitement du matériel végétal	76
3.3. Extraction des flavonoïdes	78
a. Choix du solvant	78
b. Procédure d'extraction	78
3.4. Détection et identification des flavonoïdes par RP-HPLC-ED et PDA	78
3.5. Paramètres Voltammétrie	82
3.6. Paramètres de l'UV-Vis spectrophotométrie	83

CHAPITRE 2 : ELECTROCHIMIE DES DERIVES NITRES

1. Etude polarographique et voltammétrie cyclique	84
2. Réductions préparatives	87
2.1. 2-(2-nitro phényl) acétate d'éthyle	87
2.2. 2-(2-nitro phényl) acétate de phényle	88
2.3. 2-(2-nitro phényl) acétamide	88
3. Evaluation de l'électroactivité des produits d'arrivée	89
4. Test de cytotoxicité des produits d'arrivée	91

CHAPITRE 3 : ELECTROCHIMIE DU BEVACIZUMAB

1. Electrochimie des acides aminés électro actifs de l'anticorps Bevacizumab	93
2. Bevacizumab en solution	96
2.1. Voltammétrie cyclique	96
2.2. Voltammétrie Impulsionnelle Différentiels	98
2.3. Voltammétrie à vague carrée	100
3. Bevacizumab Immobilisé	101
3.1. Bevacizumab native	101
Spectroscopie d'impédance électrochimique de l'électrode modifiée	104
3.2. Bevacizumab dénaturés	108
4. Profil d'hydrophobicité du Bevacizumab (Kyte-Doolittle)	110
5. Etude comparative entre les anticorps Rituximab et Bevacizumab	112

CHAPITRE 4 : ELECTROCHIMIE DES FLAVONOÏDES ‘Détection et activité AO’

1. L’activité antioxydante totale par des paramètres électrochimique	114
1.1. Standard catéchine	114
1.2. Extraits de fruits lyophilisés	117
1.2.1. Extrait des prunes Japonaise	117
1.2.2. DPV des extraits de fruits lyophilisés	117
1.2.3. Chronoampérométrie des extraits de fruits lyophilisés	121
2. L’activité antioxydante totale par le test de piégeage des radicaux libres	122
2.1. Standard catéchine	122
2.2. Extraits de fruits lyophilisés	123
3. Discussion des résultats	125
4. Détection et identification des flavonoïdes par HPLC	129
4.1. Chromatogrammes de catéchine	130
4.2. Chromatogrammes des fruits lyophilisés (FD fruits)	131
4.3. Chromatogrammes des fruits congelés (F) et lyophilisés (FD)	135

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **138**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

Symbole	Désignation
A. A.	Acide Aminé
AE	Efficacité anti-radicalaire (Antiradical Efficiency)
ARP	Pouvoir anti-radicalaire (Anti-Radical Power)
BDD	Electrode de diamant dopé au bore (Boron-doped Diamond Electrode)
BDE	Energie de dissociation (Bond Dissociation Energy)
BEVA	Anticorps Bevacizumab
C	Constant (Constant)
CDR	Complementary Determining Regions
CE	Contre électrode (Counter Electrode)
CV	Voltammétrie cyclique (Cyclic Voltammetry)
Da	Dalton (équivalent de 1g/mol.)
DME	Electrode à goutte de mercure (Dropping Mercury Electrode)
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle
DPV	Voltammétrie impulsionnelle différentielle (Differential Pulse Voltammetry)
E	Potentiel (V/SCE)
E_{1/2}	Potentiel de demi-vague (V/SCE)
EC₅₀	Concentration efficace (Efficient Concentration) (mg/ml)
ED	détecteur électrochimique (Electrochemical Detector)
EI	Index électrochimique (Electrochemical Index) (A/V)
EIS	Spectroscopie d'impédance électrochimique (Electrochemical Impedance Spectroscopy)
F	Congelé (Frozen)
Fab	Antigen binding Fragment
Fc	crystallizable fragment
FcR	Récepteur Fc (Fc receptor)
FD	Fruit lyophilisé (Freeze Dried Fruit)
H	Lourd (Heavy)
GCE	Electrode au Carbone vitreux (Glassy carbon electrode)
H₂SO₄	Acide sulfurique
HAT	Transfert des atomes d'hydrogène (Hydrogen Atome Transfer)
HOMO	Plus haute orbitale moléculaire occupée (highest occupied molecular orbital)
Ig	Immunoglobine
L	Légère (Light)
LC₅₀	Concentration létale (Lethal Concentration) (µg / ml)
LUMO	Plus basse orbitale moléculaire inoccupée (Lowest unoccupied molecular orbital)
MAE	Extraction assistée par micro-onde (Microwave Assisted Extraction)
PDA	Détecteur photodiode (Photodiode Array)
ppm	Partie par million (Parts Per Million)
PS	Solvant polaire (Polar Solvent)
RP-HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance à phase inverse

	(Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography)
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
RNS	Espèces réactives de l'azote (Reactive Nitrogen Species)
rpm	Rotation par minute (Revolutions per minute)
RTX	Anticorps Rituximab
SCE	Electrode au calomel saturée en KCl (Saturated Calomel Electrode)
SET	Transfert d'un seul électron (Single Electron Transfer)
SW	Voltammétrie à signaux carrés de potentiel (Square Wave Voltammetry)
UAE	Extraction assistée par ultrasons (Ultrasound Assisted Extraction)
V	Variable (Variable)
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor)
WE	Electrode de travail (Working Electrode)
λ	Longueur d'onde (cm^{-1})
ρ	Rendement (%)

LISTE DES TABLEAUX

Titre	Page
Conductivité ionique de quelques solvants-électrolytes support	04
Les différentes formes d'électro-synthèses des composés hétérocycliques	16
Nomenclature internationale des différentes catégories d'anticorps monoclonaux	23
Electro-analyses des composés pharmaceutiques sur des électrodes en carbone vitreux	26
Présentation des espèces réactives oxygénées et azotées	29
Détecteurs pour HPLC	42
Techniques d'extractions et d'analyses des flavonoïdes	45
Potentiels de pics anodiques de quelques flavonoïdes	53
Les potentiels de demi-vague de quelques groupes fonctionnels sur une DME à pH=7	55
Les dérivés de l'acide 2-(2-nitrophényl) acétique	68
Composition des électrolytes support de l'électrolyse	69
Composition des électrolytes support	73
Conditions opératoires des techniques électrochimiques	74
Présentation des fruits méditerranéens utilisés	77
Conditions opérationnelles de HPLC/ED / PDA	80
Potentiel de l'électrode de référence Ag / AgCl/Cl ⁻	82
Présentation des produits de départ	84
Potentiels de demi-vagues de réduction des dérivés nitrés	85
Potentiels d'oxydation et de réduction des produits de départ	86
Valeurs des potentiel (E) et intensités (I) des pics d'oxydation des produits d'arrivée	91
Equations des potentiels des pics d'oxydation par unité de pH des produits d'arrivée	91
Taux de mortalité en fonction de la concentration des produits d'arrivée	92
Concentration létale médiane (LC ₅₀) des produits d'arrivée	92
Les potentiels d'oxydation des acides aminés individuel, dans un tampon phosphate pH = 7.0 (0.1 M)	98
Valeurs des potentiel (E) et les largeurs à mi-hauteur (W _{1/2}) des pics d'oxydation du BEVA 5 mg mL ⁻¹ à différents tampon 0.1 M sur une électrode GCE (1er cycle)	100
Valeurs des potentiel (E) et les largeurs de mi-hauteur (W _{1/2}) du pic d'oxydation du biocapteur GCE-BEVA native à différents tampon 0.1 M (1er cycle)	104
Echelle d'hydrophobie de Kyte et Doolittle	111
Potentiels d'oxydation (Ep), intensités (Ip), Indices Electrochimiques(EI) et surface des pics (Parea), calculés à partir des voltammogrammes DP des extraits des fruits dilués (facteur de dilution 1:200) et de la catéchine 10 µM	120
Courants Chronoamperométriques (Ia) des extraits de fruits (facteur de dilution 1:100) et une solution de catéchine (concentration de 10 µM) à un potentiel de + 0.6 V (vs. Ag/AgCl).	122
SLOP et concentration efficace (EC ₅₀) des extraits de fruits et de la catéchine	125
Temps de rétention des standards	132

LISTE DES SCHEMAS

Titre	Page
Quelques potentiels approximatifs des électrolytes support en H ₂ O	05
Mécanisme de transfert des électrons à une électrode	06
Mécanisme de Kolbe	09
Mécanisme de Haber	09
Différents réactions d'un radical Cation	10
Différents réactions d'un radical Anion.	10
Mécanismes de cyclisations des molécules électroactives	11
Addition intramoléculaire du radical de Kolbe à une double liaison	11
Oxydation anodique en présence d'un groupement électro-auxiliaire	12
Exemples sur l'addition anodique.	13
Couplage intramoléculaire du cis-1,2-dialkyl-cycloalkanols	13
Cyclisation électro-réductive des esters oléfiniques	14
Les isomères de 2(-3',4'-diméthoxy) phenyl-3ethoxycarbonyl-4-methylene-tetrahydrofuran.	14
Cyclisation des composés nitroaryl o-substitué	15
Alkylation réductive des sels d'iminium	15
Les formes ioniques d'un acide aminé	18
Structure de l'anticorps monoclonale Bevacizumab	24
Formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS)	30
Classement des Antioxydants	31
A) Système fermé et B) système ouvert de la micro-onde	38
Développement et effondrement des bulles de cavitation	40
A) bain à ultrasons et B) sonde à ultrasons	41
Déprotonation des groupements OH en position 3' et 4' et complexation des flavonoïdes	48
Mécanisme d'oxydation du A) phénol et B) phénol para-substitué.	52
A) Montage d'une électrode à goutte de mercure tombante, B) Schéma du courant de la goutte de mercure en fonction du temps	66
A) Représentation de la structure de l'électrode à carbone vitreux B) Représentation des différentes fonctions oxygénés sur la surface du carbone	67
Cellule du détecteur électrochimique	81
Mécanisme proposé pour la formation de 1-Hydroxy-1,3-dihydro-indol-2-ylidene-oxonium	87
Mécanisme proposé pour la formation de 3H-Indol-2-ylamine.	89
Structures chimique des acides aminés électroactives.	93
Mécanisme proposée d'oxydation électrochimique de l'acide aminé Tyrosine	94
Mécanisme d'oxydation électrochimique de l'acide aminé Tryptophane	95
Structure de la catéchine	114
Mécanisme de l'oxydation électrochimique de la Catéchine sur une électrode GCE (1er pic).	116

Neutralisation du radical DPPH par une molécule de catéchol	123
Le radical libre n'arrachant un atome d'hydrogène de la molécule phénol (ArOH) qu'à partir d'une forme libre	127
Réaction du phénol avec DPPH. via des mécanismes PCET/HAT, ET-PT ou PT-ET	128

LISTE DES FIGURES

Titre	Page
Diagramme de l'orbitale moléculaire du transfert d'électrons	12
Structure de base d'un acide aminé	17
Différents niveaux de structure des protéines	20
Structure d'un anticorps monoclonal	23
Structure du Sodium Dodécyl Sulfate (SDS)	27
Structure du DL-Dithiothreitol (DTT)	27
Structure de Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP)	28
Structure de base des flavonoïdes	33
Micrographies optique des feuilles d'Epimedium: (A) avant et (B) après traitement par MAE	39
Orthosiphon stamineus au microscope électronique à balayage (A) avant et (B) après traitement par sonication	41
L'effet de l'activité antioxydante sur l'absorbance du radical libre DPPH	50
Modèle d'un Polarogramme	54
(A) Allure de la variation triangulaire $E=f(t)$ (B) allure d'un voltammogramme cyclique (C) système réversible et quasi-réversible	57
(A) Allure de la tension imposée en fonction du temps. (B) voltammogramme d'une impulsion «ondes carrées ».	59
(A) Allure de la tension imposée en fonction du temps, (B) voltampérogramme différentiel impulsioneille avant intégration (C) après intégration	60
Polarogramme de l'électrolyse $i=f(E)$	62
La réponse d'une excitation par une tension sinusoïdale	63
(A) Représentation du diagram de Nyquist (B) Circuit électrique équivalent de Randles	64
Structure moléculaire de l'acide 2-(2-nitro phényle) acétique ($R=COOH$)	68
Cellule d'électrolyse	70
Potentiostat modèle 362 Scanning et l'électrode à goutte de mercure	70
Table traçante XY KIPP & ZONEN	71
Avastin de Roche	72
Une mini-cellule électrochimique et les trois électrodes : (A) électrode de référence (Ag/AgCl) (B) électrode auxiliaire (Pt) (C) électrode de carbone vitreux (GCE).	74
Présentation des fruits méditerranéens utilisés	77
Détecteur électrochimique Concorde Wall-Jet « Water »	81
Voltammogramme de l'acétate d'éthyle en milieu T. Acétique (0.5 mol.L^{-1}), Vitesse de balayage= 50 mV/s	86
Réduction du 2-(2-nitro phényle) acétate d'éthyle en milieu H_2SO_4 (0.5 mol.L^{-1}) + éthanol (1/1) à $E_T = -0.16 \text{ V/SCE}$. (1) Avant et (2) Au cours de la réduction	88
Voltammogrammes impulsioneils différentiels d'une solution de F1 à une concentration de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ sur une électrode GCE	89
Voltammogrammes impulsioneils différentiels d'une solution de F2 à une	90

concentration de $5 \times 10^{-3} \text{M}$ sur une électrode GCE	
Voltammogrammes impulsionnels différentiels d'une solution de F3 à une concentration de $5 \times 10^{-3} \text{M}$ sur une électrode GCE	90
Histogramme de la % Mortalité en fonction des concentrations des produits d'arrivée	92
Voltammogrammes Cycliques (1er cycle) d'une solution BEVA de 5 mg mL^{-1} sur une électrode GCE à différents pH. Vitesse de balayage de potentiel : 100 mVs^{-1}	97
(A) Voltammogrammes impulsionnels différentiels en 3D d'une solution de 5 mg mL^{-1} du BEVA sur une GCE en fonction du pH. (B) Graphe du BEVA (○) Ipa et (●) Epa en fonction du pH.	99
Voltammogrammes à vague carrée de 5 mg mL^{-1} du BEVA sur GCE dans différents tampon (1er cycle). Pulse amplitude 50 mV , fréquence 50 Hz , It courant totale; If courant aller; Ib courant retour	101
(A) Voltammogrammes impulsionnels différentiels en 3D du BEVA immobilisé sur la surface d'une GCE en fonction du pH. (B) graphe du BEVA (●) Ipa et (○) Epa en fonction du pH	103
Voltammogrammes cycliques d'une solution de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ à différentes concentrations dans un tampon phosphate 0.1 M ($\text{pH} = 6.9$).	105
Voltammogrammes cycliques du couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ avant et après immobilisation du BEVA sur la surface de GCE, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	105
Diagramme de Nyquist de GCE avant (●) et après immobilisation du BEVA dans une solution de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ à une concentration de (○) 1 mM , (□) 3 mM et (Δ) 5 mM .	107
La gamme de fréquence : (A) 50500 et 0.100 Hz , (B) 50500 et 50 Hz	
Voltammogrammes DP du BEVA immobilisé sur une électrode GCE (—) avant et (—) après incubation dans (A) 33.33 mM SDS, (B) 10 mM DTT et (C) 10 mM TCEP dans un tampon phosphate $\text{pH}=6.9$	110
Profil d'hydrophobie de Kyte-Doolittle des séquences des amino acides de l'anticorps BEVA (—) chaîne légère et (—) chaîne lourde	111
Profil d'hydrophobie de Kyte-Doolittle des séquences des acides aminés des anticorps (—) RTX et (—) BEVA ; chaînes (A) lourdes et (B) légères	113
Voltammogrammes DP de $10 \text{ }\mu\text{M}$ catechin, sur GCE, à $\text{pH} = 2.2$: (—) premier scan, (●●●) deuxième scan, et (—) électrolyte support, taux de balayage 5 mV s^{-1}	115
Voltammogrammes DP de différentes concentrations de l'extrait de la prune Japonaise sur une GCE, à $\text{pH} = 2.2$, vitesse de balayage 5 mV s^{-1}	117
Voltammograms DP des extrait de fruits lyophilisés diluée 200 fois et du catéchine $10 \text{ }\mu\text{M}$ sur une électrode GCE, à $\text{pH} = 2.2$, vitesse de scan 5 mV s^{-1}	118
Chronoampérogrammes des extraits de fruits lyophilisés à un potentiel de 0.6 V (vs. Ag/AgCl)	121
Activité de piégeage des radicaux DPPH (%) par rapport aux différentes concentrations des extraits de fruits lyophilisés (mg/mL)	124
(A) Histogramme des concentrations efficaces (EC_{50}) des extraits des fruits.	126
(B) Histogramme des Indices Electrochimiques (EI) des extraits de fruits.	

Chromatogrammes HPLC de la catéchine (A) par PDA et (B) ED	131
RP-HPLC-ED sur une électrode GCE, à + 0.50 V vs. ISAAC : Abricot 10X, Cerise 30X, Datte 5X, Figue de B. 2X, Nectarine 10X, Grenade 5X, Prune Eu. 20X, prune Jp. 30X.	135
RP-HPLC-ED sur une électrode GCE, à + 0.50 V vs. ISAAC : Datte congelé (DaF) 5X, Datte Pelure (Pe) 5X, Datte Pulpes (Pu) 5X et Grenade congelée (GF) 2X.	137

INTRODUCTION

GENERALE

L'électrochimie peut être considérée comme « une science qui analyse et décrit les transformations de la matière à l'échelle atomique par déplacement de charges électroniques contrôlable à l'aide de dispositifs électriques »¹.

L'analyse électrochimique ou l'électroanalyse sur les modèles biologiques, a connu son apparition en 1791 par l'article glorieux «*De viribus electricitatis in motu musculari commentarius*» du **L. GALVANI**², il a démontré la conductivité électrique des nerfs d'une grenouille, en observant les contractions musculaires sur les muscles des cuisses suspendues par un fil de cuivre accroché sur un rail de fer. Ultérieurement, **P. MITCHEL** a défini le principe de transformation de l'énergie dans le système biologique (1961)³.

L'électroanalyse se subdivise en quatre méthodes principales:

- La conductimétrie : détermine la conductivité électrique d'une solution électrolytique.
- La coulométrie : mesure la quantité d'électricité consommée.
- La voltammétrie : étudie le mécanisme des réactions électrochimiques.
- La potentiométrie : définit le potentiel d'équilibre d'une électrode en absence du courant.

Ces méthodes présentent un certain nombre d'avantages tels que la sélectivité, la sensibilité et une très faible limite de détection. Le domaine de l'électrochimie couvre un ensemble de techniques très puissantes pour la synthèse, la caractérisation, le contrôle des réactions chimiques, la production et le stockage d'énergie et explore continuellement de nouvelles voies d'application.

La modification des surfaces d'électrodes via des (bios) nanomatériaux et la miniaturisation constitue une avancée majeure, conduit à la réduction de la quantité des produits utilisés, la diminution des déchets sans la perte des performances analytiques et le faible coût des instruments mis en œuvre⁴.

¹ C. Lefrou, P. Fabry, J.-C. Poignet, « Electrochimie - concepts fondamentaux et illustrés », EDP Sciences (2013).

² L. Galvani « *De viribus electricitatis in motu musculari commentarius* » Bononiae : Ex Typographia Institutii Scientiarum, (1791).

³ P. Mitchell « Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. » *Nature* (1961) 191, 144-148.

⁴ M. D. Scanlon, D. WM. Arrigan « Enhanced Electroanalytical Sensitivity via Interface Miniaturisation: Ion Transfer Voltammetry at an Array of Nanometre Liquid-Liquid Interfaces. » *Electroanalysis* (2011) 23 (4) 1023-1028.

Notre travail repose sur trois volets différents : l'électrosynthèse des hétérocycles à partir des dérivés nitrés et leurs comportements électrochimiques, l'électroanalyse d'un anticorps approuvé pour traiter le cancer métastatique et l'évaluation de l'activité antioxydante totale des extraits naturels.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à la bibliographie, elle se divise en quatre chapitres : Le premier chapitre présente une brève description de quelques notions fondamentales d'électrochimie, le deuxième expose une approche historique de la synthèse des hétérocycles par voie électrochimique, le troisième aborde la description détaillée des anticorps et leurs interactions avec l'électrochimie, le dernier concerne les antioxydants naturels, les techniques de conservation, d'extraction, de séparation et d'analyse.

La partie expérimentale renferme de multiples applications des techniques électrochimiques. Le premier chapitre se divise en deux sous chapitres, une description des différentes techniques utilisées dans ce travail ainsi que les protocoles, les conditions expérimentales et les réactifs consommés. Le deuxième chapitre introduit l'électrosynthèse de trois hétérocycles, le comportement électrochimique et l'activité cytotoxique. Au troisième chapitre, nous nous intéressons au comportement électrochimique d'un anticorps monoclonal anticancéreux, en solution et immobilisé sur la surface d'une électrode solide sous forme native et dénaturée. Le dernier chapitre se déroule sur l'extraction, la détection et l'évaluation de l'activité antioxydante totale des extraits naturels de quelques fruits locaux.

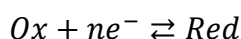
PARTIE I

Chapitre 1

NOTIONS FONDAMENTALES

1. Processus électrochimique

Le processus électrochimique est l'ensemble des phénomènes associés à la production d'un transfert d'une charge électrique à l'interface conducteur électronique / conducteur ionique¹. Une réaction d'oxydoréduction (redox) est une réaction dans laquelle se produit un transfert d'électron (s) depuis une espèce chimique vers une autre. Un oxydant est une espèce chimique capable d'accepter un ou plusieurs électrons et un réducteur est capable de donner un ou plusieurs électrons.



2. Cellule électrochimique

Selon SKOOG et al. (2015), « La cellule électrochimique est un dispositif qui comprend des électrodes plongeant dans des solutions dont les compositions sont généralement différentes. La liaison interne est assurée par une jonction électrolytique et les électrodes sont connectées à des circuits de commande et de mesure à l'extérieur de la cellule »². Une cellule au sein de laquelle une réaction spontanée produit de l'électricité est dite galvanique. Une cellule au quel une réaction non spontanée est gouvernée par une source extérieure de courant direct est dite électrolytique³.

Un électrolyte support est un sel de métal alcalin ajouté en excès à la solution d'analyse. Habituellement, c'est un sel qui ne réagit pas à l'électrode de travail dans le domaine de potentiel utilisé². Cet électrolyte sert à réduire la résistance de la cellule, ce qui réduit la chute ohmique et minimise donc la variation de potentiel dans la solution. La conductivité (κ) des électrolytes est la capacité de la solution à assurer le flux du champ électrique à partir du déplacement des particules chargées:

$$\kappa(\text{ohm}^{-1}\text{cm}^{-1}) = (1/R)(L/A)$$

R : Résistance électrique

A : Surface des plaques

L : Distance

¹ C. Barus, « Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique - Application aux produits dermo cosmétiques » Thèse, Université de Toulouse (2008).

² D. A. Skoog, D. M. West, C. Buess-Herman, J. Dauchot, "Chimie analytique" 3^{ème} ed. De Boeck Supérieur, France (2015).

³ P. W. Atkins, « Éléments de chimie physique » De Boeck Supérieur, Belgique (1998).

Le **Tableau.1** présente quelques électrolytes support dont la plage de potentiel est limitée par la décomposition du solvant et / ou de l'électrolyte support⁴.

Tableau.1. Conductivité ionique de quelques solvants-électrolytes support⁴.

Solvant	Electrolyte	Concentration (M)	Température (°C)	Conductivité (Ohm ⁻¹ cm ⁻¹)
H ₂ O	HCl	6.0	25	0.84
H ₂ O	HCl	1.0	25	0.33
H ₂ O	H ₂ SO ₄	0.53	25	0.039
H ₂ O	KCl	1.05	25	0.11
H ₂ O	LiClO ₄	0.1	25	0.0089
CH ₃ CN	TEAClO ₄	1.0	25	0.050
CH ₃ CN	TEABF ₄	1.0	25	0.056
(CH ₃) ₂ NCH	TBABF ₄	1.0	25	0.0145
CP	TBABF ₄	1.0	25	0.0074
THF	TBAPF ₆	0.1	Ambiante	0.0005

(CH₃)₂NCH Diméthyl formamide, TEABF₄ Tetrabutyl ammonium tetrafluoroborate, CP carbonate Propylène, TBAPF₆ Tetrabutylammonium hexafluoro phosphate, THF Tetrahydrofurane, LiClO₄ Perchlorate de Lithium.

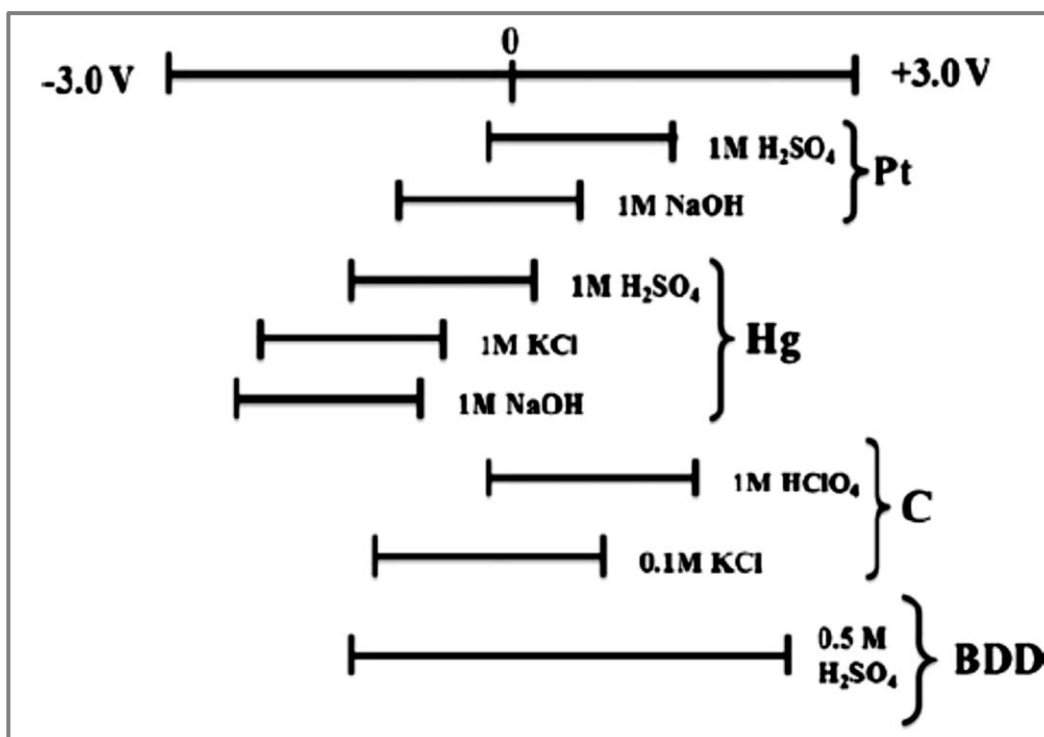
La concentration de l'électrolyte support doit être 100 fois supérieure à celle des espèces électroactives (varie entre 0,01 M et 1M)⁵ afin de supprimer le courant de migration. On distingue deux catégories d'électrolytes: les électrolytes forts totalement dissociés en solution (NaCl, NaOH, KOH et HCl) et les électrolytes faibles, qui se dissociés partiellement (CH₃COOH).

L'eau distillée (solvant universel) est le solvant le plus utilisé dans la préparation des solutions, elle dissout les métaux alcalins, les sels d'ions ammonium, les métaux alcalino-terreux tel que les chlorures, les acétates, les oxydes, les sulfates ainsi que les nitrates et les perchlorates⁶. Le **Schéma.1** présente quelques électrolytes support et leurs potentiels d'activation.

⁴ C. G. Zoski, "Handbook of Electrochemistry" 1er ed. Elsevier, Oxford UK (2007).

⁵ A. M. Oliveira Brett, C. M. A. Brett, "Electroquímica: princípios, métodos, e aplicações» Oxford University Press, Coimbra (1993).

⁶ F. Scholz, «Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications» Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, USA (2010).

Schéma.1 Quelques potentiels approximatifs des électrolytes support en H₂O⁷.

3. Paramètres électrochimiques

3.1. Interface métal / électrolyte

Lorsqu'un métal est en contact avec un électrolyte, la répartition des charges à l'interface est différente de la répartition au sein de chaque phase⁸.

- Double couche électrochimique : c'est l'accumulation de charge ionique à la surface de l'électrode au contact de l'électrolyte, Son épaisseur est de l'ordre de nanomètre, sa composition dépend du potentiel et de la nature chimique des ions présents.
- Couche de diffusion : dans laquelle un gradient de concentrations des espèces électroactives existe, son épaisseur dépend de la nature de ces espèces et le coefficient de diffusion.
- Le bulk de la solution : concerne toute la phase liquide. Sa concentration évolue en fonction du degré d'avancement de la réaction.

⁷ É. T. Gomes Cavalheiro, C. M. A. Brett, A. M. Oliveira-Brett, O. Fatibello-Filho, "Bioelectroanalysis of pharmaceutical compounds" *Bioanal Rev* (2012) 4:31-53.

⁸ J. P. Pulicani, "Etude du comportement électrochimique de composés polyfonctionnels et de dérivés comportant un groupement xanthate." Thèse de l'École polytechnique, France (2013).

Deux types de processus peuvent se produire à l'électrode :

- Le courant faradique : résulte du transfert d'électrons à travers l'interface électrode / solution (réaction d'oxydation ou de réduction). Ces réactions suivent la loi de Faraday.
- Le courant non faradique : résulte du phénomène d'adsorption ou désorption.

3.2. Cinétique électrochimique

Pour assurer le passage du courant entre une électrode et un milieu ionique conducteur, il existe trois phénomènes de transport des espèces: diffusion, convection et migration.

La diffusion : mouvement des espèces au voisinage de l'électrode sous l'effet d'un gradient de concentration entre la solution et le voisinage de l'électrode.

La convection : mouvement des espèces sous l'effet de l'agitation mécanique, elle ne contribue pas au passage du courant.

La migration : déplacement des ions sous l'effet du champ électrique généré par l'application d'un gradient de potentiel entre les électrodes.

Nous considérons le cas d'un couple redox Fe^{2+}/Fe^{3+} dont le mécanisme de transfert de charge et transport de matière, sont illustrés par le **Schéma.2**⁵:

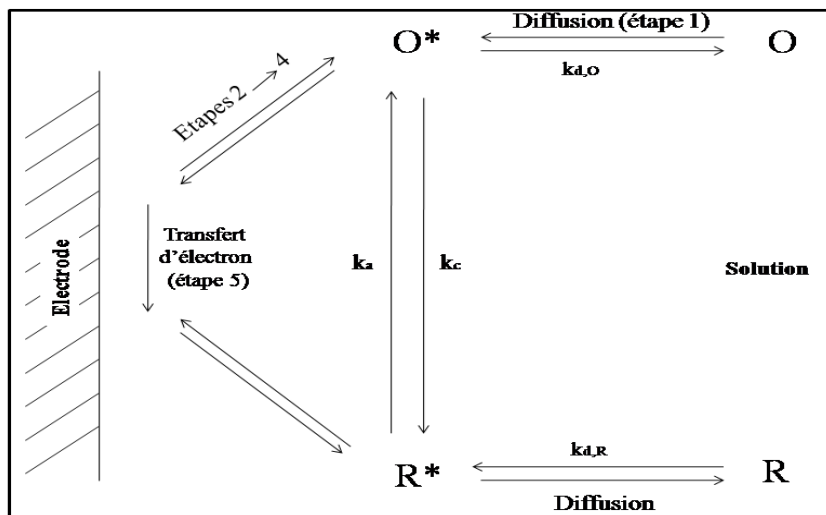
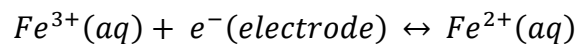


Schéma.2 Mécanisme de transfert des électrons à une électrode⁵.

1. Diffusion de l'espèce (k_d coefficient de transfert de masse).
2. Réarrangement de l'atmosphère ionique (10^{-8} s).
3. Réorientation des dipôles du solvant (10^{-11} s).
4. Altérations de la distance entre le centre des ions et le ligand (10^{-14} s).
5. Transfert de l'électron (10^{-16} s).
6. Relaxation au sens inverse.

Les étapes 2-5 incluent les coefficients de transfert de charge (k_a ou k_c) et l'adsorption / désorption du réactif à la surface de l'électrode.

Les étapes 2-4 présentent un pré-équilibre avant le transfert des électrons. Pendant ce transfert les positions des atomes obéissent au principe de Frank-Condon (processus adiabatique).

3.3. Transfert d'électrons / Transport de la matière

On distingue trois cas de transfert d'électrons par rapport au transport de la matière à l'interface électrode-électrolyte⁹ :

- a. Transfert d'électrons plus rapide que le transport: les concentrations des espèces oxydées et réduites c_{ox} et c_{red} du couple redox, sont définies par la loi de Nernst (transfert réversible) :

$$\frac{c_{ox}}{c_{red}} = \exp \left[\frac{nF}{RT} (E - E^0) \right]$$

Où

- E Potentiel d'équilibre
- E^0 Potentiel standard du couple Ox/Red
- R Constante des gaz parfaits ($R = 8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mole}^{-1}$)
- T Température (K)
- n Nombre d'électrons échangés
- F Constant de Faraday ($F = 96500 \text{ C.mole}^{-1}$)

Le courant est proportionnel à la quantité de la matière transportée à l'électrode par unité de temps.

⁹ B. Speiser, "Methods to Investigate Mechanisms of Electroorganic Reactions." Encyclopedia of Electrochemistry, Wiley-VCH (2007).

- b. Transfert d'électrons plus lent que le transport : le courant suit l'équation de Butler-Volmer dont la densité est proportionnelle à la concentration de l'oxydant ou du réducteur :

$$i = i_0 \left\{ \exp \left[\frac{-\alpha n F}{RT} (E - E^0) \right] - \exp \left[\frac{(1 - \alpha) n F}{RT} (E - E^0) \right] \right\}$$

i_0 Courant d'échange à $E=E^0$ (Transfer d'électrons irréversible)

- c. Transfert d'électrons comparable au transport: cas d'un système quasi-réversible.

PARTIE I

Chapitre 2

ELECTROSYNTHESE DES HETEROCYCLES

1. Synthèse électrochimique des hétérocycles

Les plus remarquables mécanismes dans l'histoire de la synthèse des produits organiques à l'aide d'un réactif « électron » sont la synthèse des alcanes à partir des acides (mécanisme de KOLBE), et les amines à partir du nitrobenzène (mécanisme de HABER). (Schéma.1 et 2)

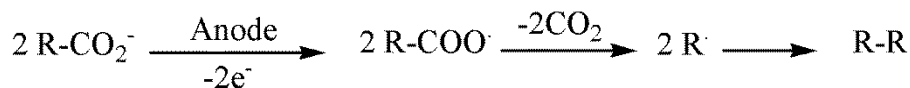


Schéma.1 Mécanisme de Kolbe¹.

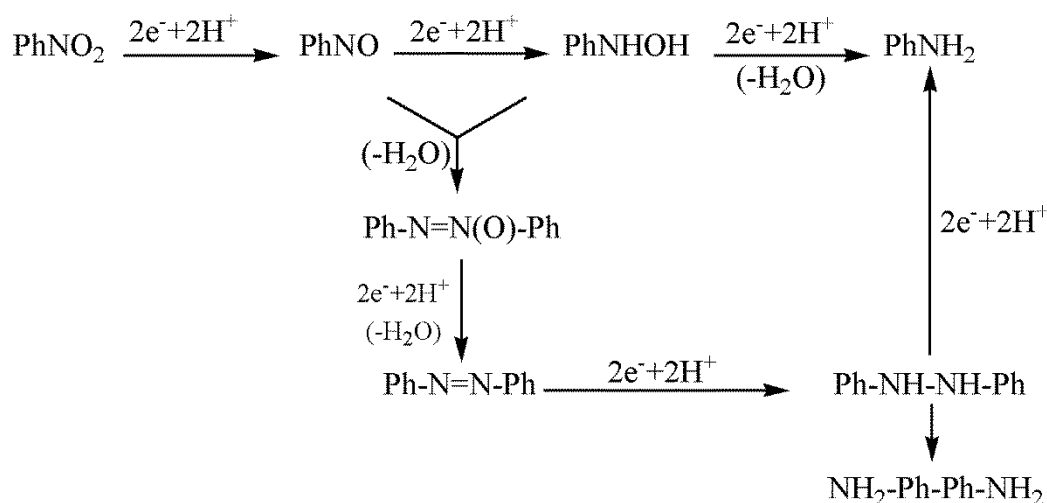


Schéma.2 Mécanisme de Haber².

Les propriétés du produit organiques synthétisé par voie électrochimique dépendent des paramètres tels que : le matériau de l'électrode, la nature du solvant et de l'électrolyte support, la température et le pH du milieu³.

L'électrosynthèse présente une méthode simple pour générer et étudier une grande variété d'intermédiaires. Le procédé d'oxydation au niveau atomique est expliqué par le transfert d'un électron à partir de l'orbitale moléculaire la plus haute du substrat (HOMO). En cas de nombreux substrats sensibles à l'oxydation, la sélectivité du processus d'oxydation dépend de la différence entre les niveaux occupés HOMO⁴.

¹ R. Tyagi, "Organic Reactions: Mechanism With Problems" Discovery Publishing House (2005).

² (a) E. Soazara Chan-Shing, "Réduction électrochimique des dérivés nitrocumyles sur électrodes de mercure et de métaux de raney" Thèse, Université de Sherbrooke, Canada (1999) (b) F.Haber, « Gradual Electrolytic Reduction of Nitrobenzene with Limited Cathode Potential. » *Z. Elektrochem.* (1898) 22, 506–514.

³ M. M. Gvozdenović, B. Z. Jugović, J. S. Stevanović, B. N. Grgur, « Electrochemical synthesis of electroconducting polymers » *Hem. Ind.* (2014) 68 (6) 673–684.

⁴ J. Yoshida, K. Kataoka, R. Horcajada, A. Nagaki "Modern Strategies in Electroorganic Synthesis" *Chem. Rev.* (2008) 108, 2265–2299.

Le **schéma.3** décrit les différents mécanismes réactionnels d'un radical, dont le symbole N représente un agent nucléophile, tel que la pyridine, l'ion hydroxyle, l'ion cyanide ou acétate⁵.

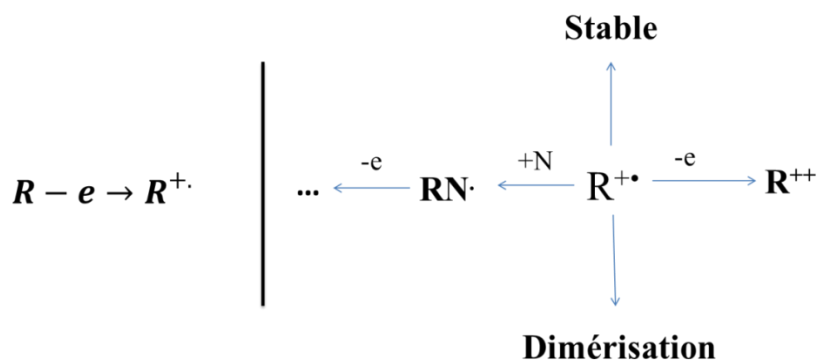


Schéma.3 Différentes réactions d'un radical Cation.

Généralement, la formation d'un radical anion, commence par l'addition d'un électron à l'orbitale moléculaire la plus basse (LUMO), cette étape est considérée rapide et réversible. (**Schéma.4**). Le symbole E présente une espèce électrophile comme le cation d'hydrogène (H^+) ou le dioxyde de carbone (CO_2).

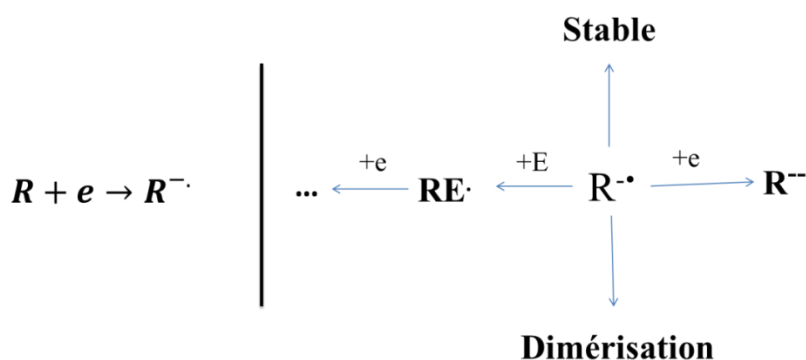
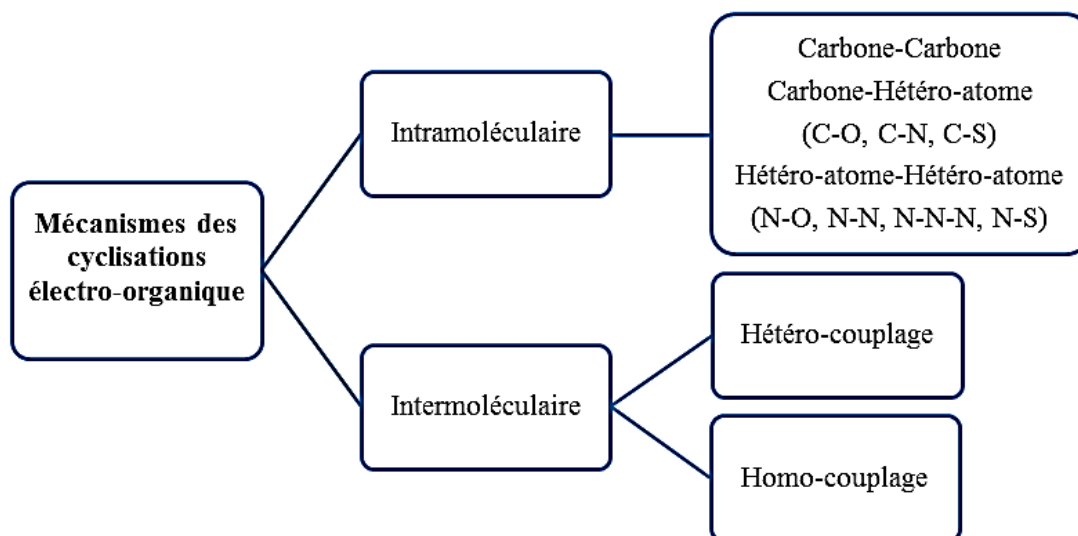


Schéma.4 Différentes réactions d'un radical Anion.

Le **Schéma.5** montre les principaux mécanismes de cyclisation intra et intermoléculaire par voie électrochimique.

Les oxydations anodiques fournissent souvent des centres électrophiles ou acides, tandis que les réductions cathodiques conduisent à des centres nucléophiles ou basiques.

⁵ A. J. Bard « The electrochemistry of organic compounds in aprotic solvents—methods and applications » *Pure Appl. Chem.* (1971) 25 (2) 379-393.

Schéma.5 Mécanismes de cyclisations des molécules électroactives⁶.

2. Cyclisation oxydative sur l'anode

2.1. Cyclisation intramoléculaire : ce type de cyclisation regroupe la formation d'une liaison carbone-carbone, carbone-hétéroatome ou hétéroatome-hétéroatome ;

- **Liaison Carbone-Carbone :** Les radicaux obtenus à partir d'une oxydation anodique des anions ou par réaction de Kolbe peuvent se coupler avec d'autres radicaux⁶. (Schéma.6)

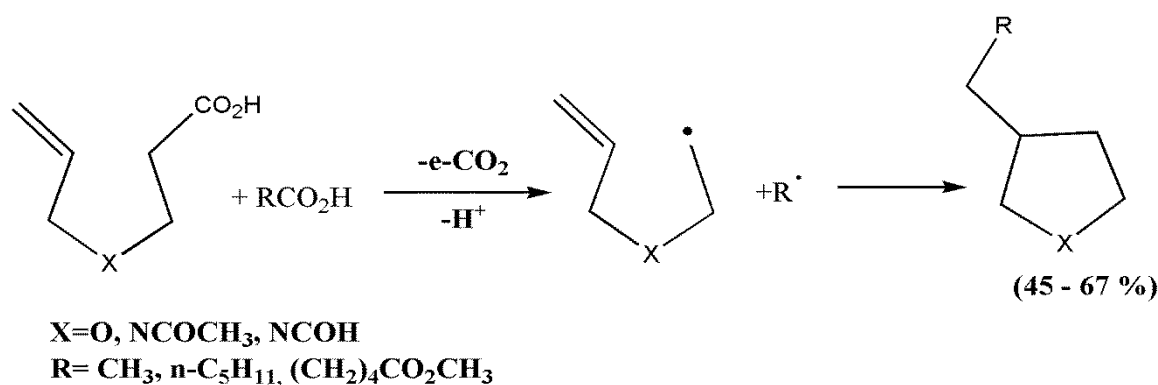


Schéma.6 Addition intramoléculaire du radical de Kolbe à une double liaison.

⁶ C. Moinet, "Electrochemistry of Heterocycles." Encyclopedia of Electrochemistry (2007).

- **Liaison Carbone-Hétéroatome :** l'oxydation anodique d'un composé organique contenant un hétéroatome ayant un groupement électro-auxiliaire (EA), provoque un clivage sélectif de la liaison C-EA, qui conduit à la formation d'un carbocation⁴. (Schéma.7)

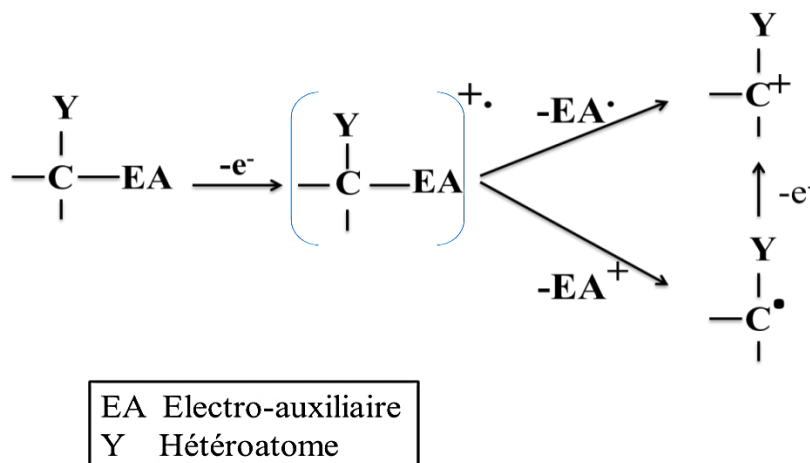
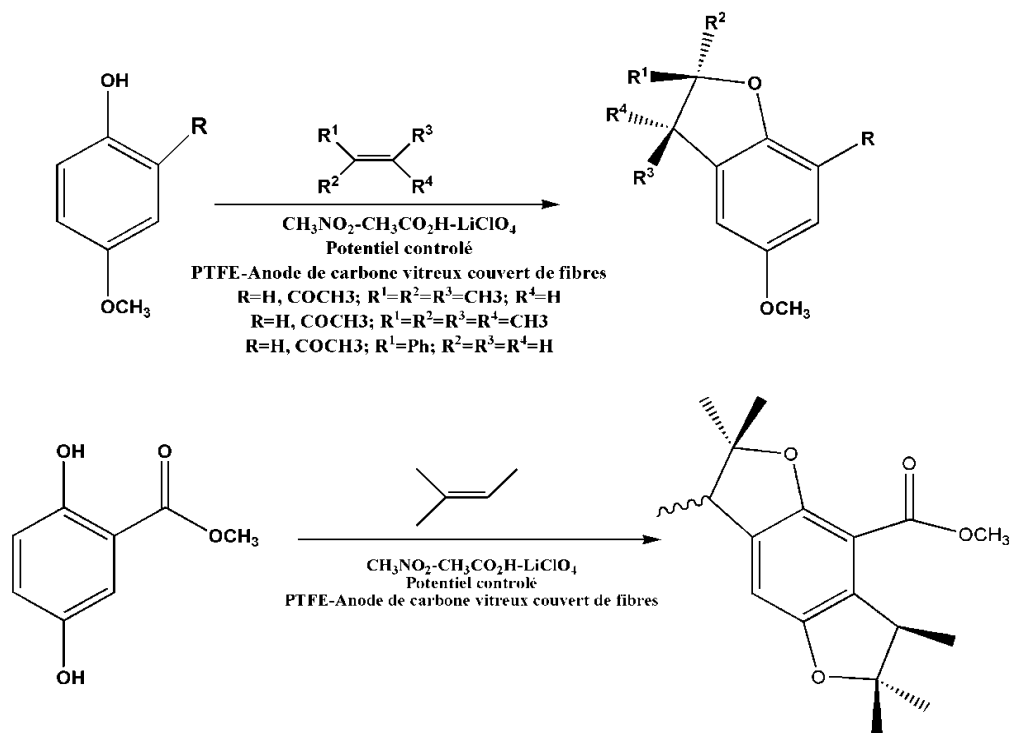


Schéma.7 Oxydation anodique en présence d'un groupement électro-auxiliaire⁴.

2.2.Cyclisation intermoléculaire

- **Réaction homo-couplage:** la dimérisation anodique peut conduire à des pyrroles (oxydation des esters) ou des dihydrofuranes (oxydation des phénols).
- **Réaction hétéro-couplage :** l'oxydation électrochimique des hydroquinones via une cycloaddition avec les alcènes conduit à une cycloaddition [3+2].

Schéma.8 Exemples sur l'addition anodique⁶.

3. Cyclisation réductive sur la cathode

3.1. Cyclisation intramoléculaire :

- **Liaison Carbone-Carbone** : un couplage électro-réductif des énones non-conjugués conduit à un cis-1,2-dialkyl-cycloalkanols⁷. (Schéma.9)

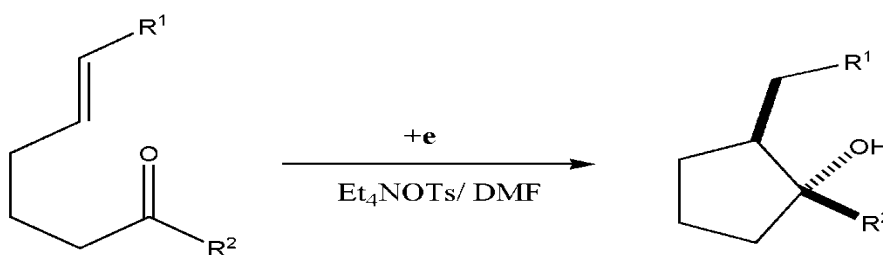


Schéma.9 Couplage intramoléculaire du cis-1,2-dialkyl-cycloalkanols.

KASHIMURA et ses collaborateurs ont explicité qu'une électro-réduction d'un ester oléfinique sur une électrode de magnésium, conduit à une cyclisation intramoléculaire d'un radicale intermédiaire⁸. (Schéma.10)

⁷ M. S. Workentin, F. Maran, K. Chiba, J. M. Savéant "Organic Electrochemistry: Proceedings of the Fifth International Manuel." The Electrochemical Society (2002).

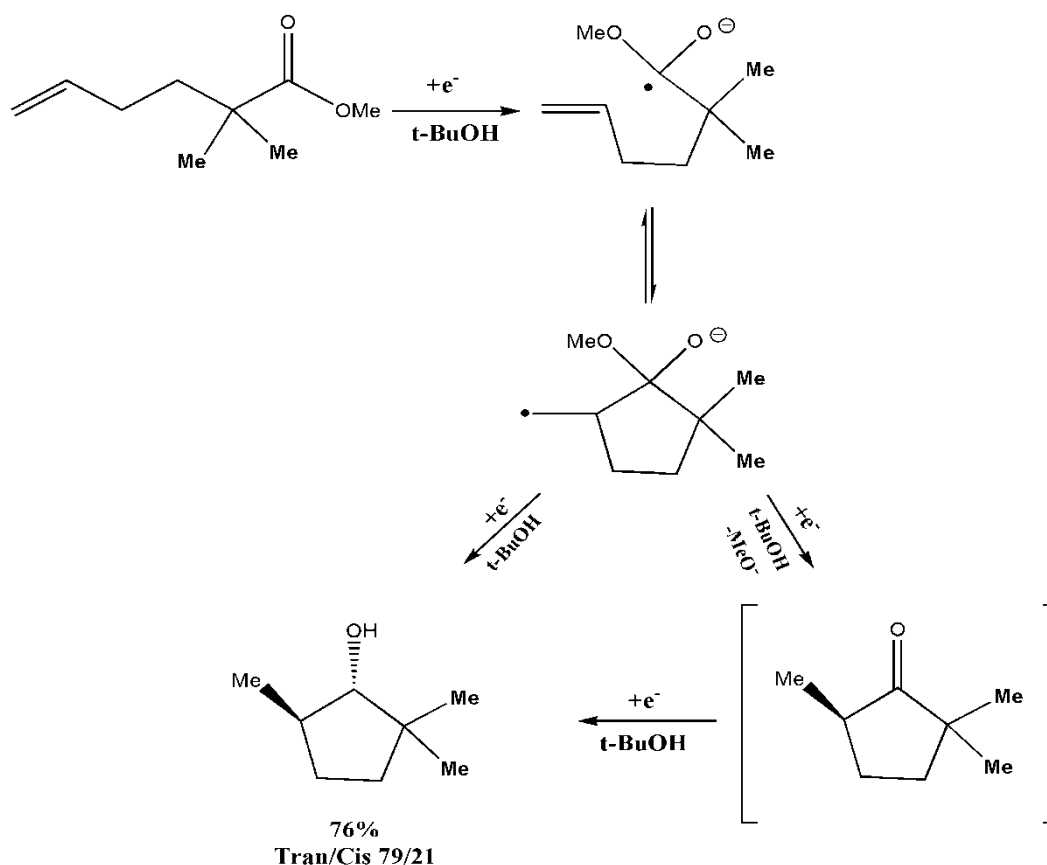


Schéma.10 Cyclisation électro-réductive des esters oléfiniques.

- **Liaison Carbone-Hétéro-atome:** la cyclisation électroactive indirecte des dérivés de bromo alkoxylate à l'aide d'un complexe électro généré de Nickel (I) conduit à un cycle de 2-(3',4'-diméthoxy) phényl-3éthoxycarbonyl-4-méthylene-tetrahydrofuran et ses isomères endo-cyclique⁹. (Schéma.11)

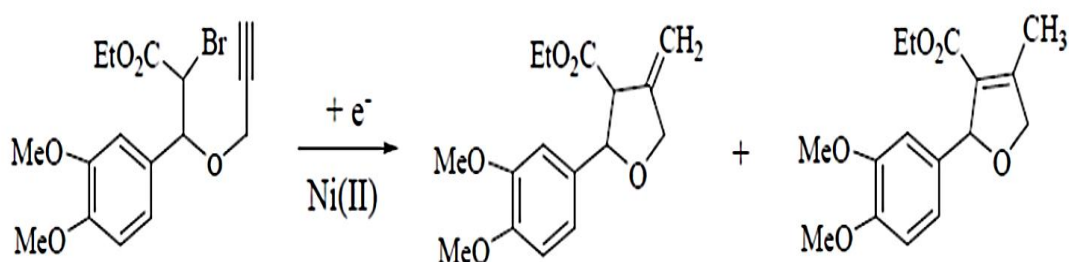


Schéma.11 Les isomères de 2-(3',4'-diméthoxy) phényl-3éthoxycarbonyl-4-méthylene-tetrahydrofuran.

⁸ S. Kashimura, Y. Murai, M. Ishifune, H. Masuda, M. Shimomura, H. Murase, T. Shono, "Electroreductive Intramolecular Cyclization of Olefinic Esters and its Application to the Synthesis of Muscone." *Acta.Chem.Scand.* (1999) 53, 949-951.

⁹ M. J. Neto, J.M.S.S. Esperança, A.P. Esteves, M.J. Medeiros, M.M. Silva "The Study of Indirect Electroreductive Cyclization of Propargyl Derivatives using [Ni(tmc)]Br₂ as Catalyst in Ionic Liquids" *ECS Trans.*(2014) 61 (30) 51-55.

CHIBANI et ses collaborateurs ont démontré qu'une réduction électrochimique des composés nitrés en position ortho dans un milieu acide, mène aux dérivés quinolines¹⁰. (Schéma.12)

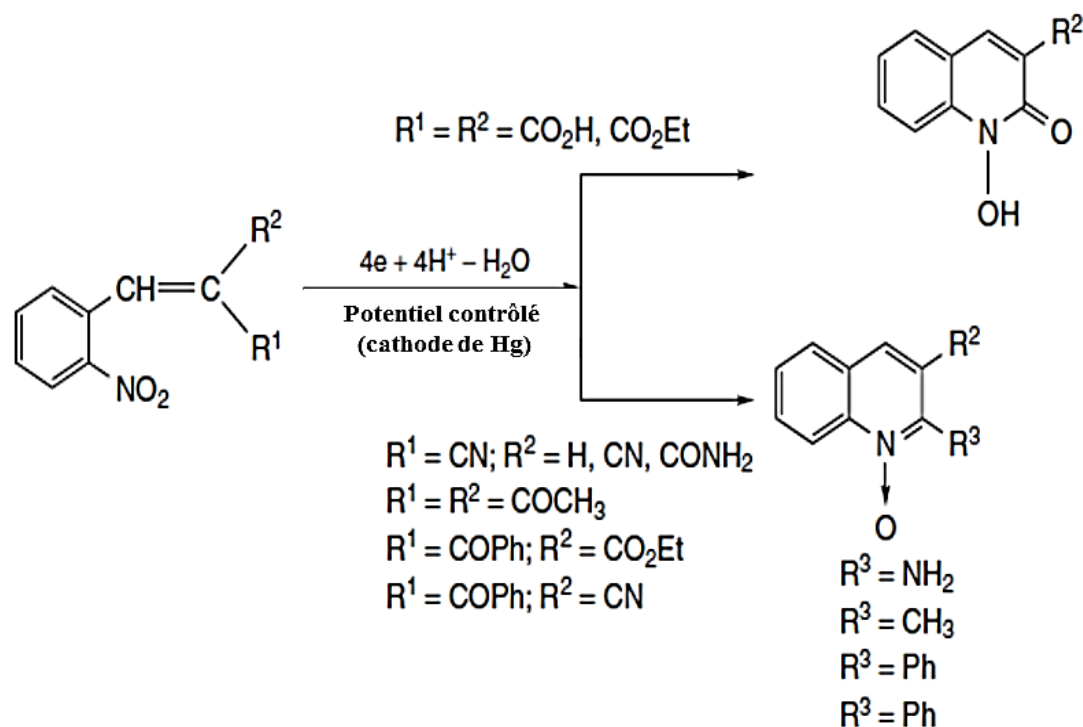


Schéma.12 Cyclisation des composés nitroaryl o-substitué.

3.2. Cyclisation intermoléculaire

- **Réaction hétéro-couplage** : la réduction des sels d'immonium à un potentiel contrôlé en présence de bromo-esters tel que les o-bromométhyle benzoates, conduit à une cyclisation intermoléculaire¹¹. (Schéma.13)

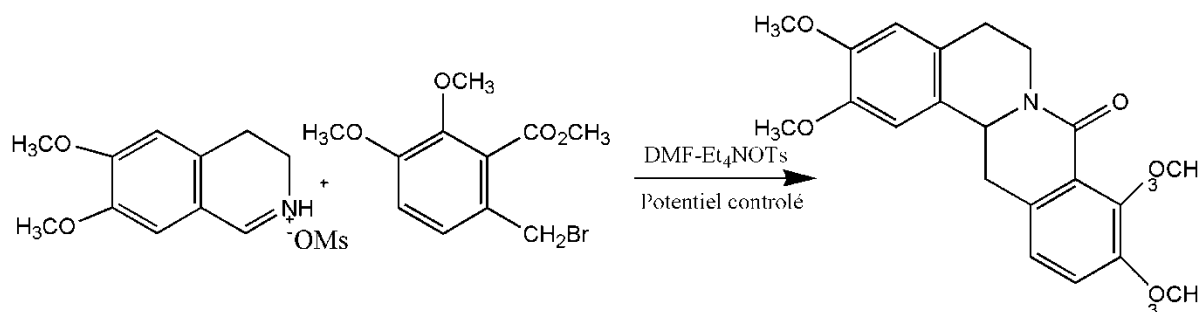


Schéma.13 Alkylation réductive des sels d'iminium.

¹⁰ A. Chibani, R. Hazard, M. Jubault, A. Tallec «Electrochemical synthesis of quinolone derivatives. II. Electrochemical reduction of o-substituted nitrobenzylidenes. » *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1987) 795.

¹¹ T. Shono, Y. Usui, T. Mizukami, H. Hamaguchi, «A new electro reductive annellation useful in synthesis of alkaloids. » *Tetrahedron Lett.* (1980) 21 (32) 3073-3076.

- **Réaction homo-couplage :** La réduction cathodique des bromides de phényle dans un milieu aprotique, conduit à la formation des furanes substitués⁶.

L'électrosynthèse des composés hétérocycliques repose sur plusieurs mécanismes. (Tableau.1)

Tableau.1 Les différentes formes d'électro-synthèses des composés hétérocycliques⁶.

Electrosynthèse des hétérocycles	
Réduction Cathodique	Oxydation Anodique
Hydrogénation de la double liaison	Formation de la double liaison
Fonctionnalisation par : <ul style="list-style-type: none"> - Addition - Substitution - Couplage intramoléculaire - Dimérisation 	Fonctionnalisation par : <ul style="list-style-type: none"> - Méthoxylation - Acétoxylation - Hydroxylation - Cyanation - Halogénéation - Trifluorométhylation - Couplage Intramoléculaire - Dimérisation
Expansion Contraction du Cycle Ouverture	

PARTIE I

Chapitre 3

ELECTROCHIMIE DES ANTICORPS

1. Les acides aminés (A. A.)

Les acides aminés sont des unités structurales de base de protéine, leur structure comprend : un atome de carbone (carbone alpha), une fonction amine ($-\text{NH}_2$), un groupe carboxylique ($-\text{COOH}$), un atome d'hydrogène ($-\text{H}$) et un groupement latéral ($-\text{R}$). (**Figure.1**) Ces molécules présentent deux configurations spatiales (énantiomères) sauf la glycine qui possède un seul atome d'hydrogène¹. (ANNEXE.1)

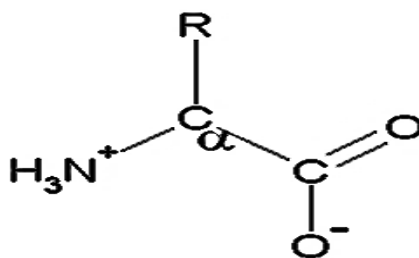


Fig.1. Structure de base d'un acide aminé.

1.1. Propriétés physico-chimiques des acides aminés

1.1.1. Polarité

La polarité de chaque acide aminé est reliée à sa chaîne latérale:

- **Les acides aminés polaires (hydrophiles) :** le Sérine (Ser), Thréonine (Thr), Asparagine (Asn), Glutamine (Gln), Tyrosine (Tyr), Lysine (Lys), Arginine (Arg), Histidine (His), Acide glutamique (Glu) et l'Acide Aspartique (Asp).
- **Les acides aminés non-polaires (hydrophobes) :** l'Alanine (Ala), Leucine (Leu), Phénylalanine (Phe), Valine (Val), Proline (Pro), Leucine (Leu) et l'Isoleucine (Ile).
- **Les acides aminés amphiphiles :** possèdent à la fois un caractère polaire et non polaire : Méthionine (Met), Tryptophane (Trp).

¹ (a) G. A. Petsko, D. Ringe, C. Sanlaville, D. Charmot, « Structure et fonction des protéines », Chapitre 1 « De la séquence à la structure » Edition de Boeck Université, Bruxelles, Belgique (2004). (b) G. Barrett, « Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids. » Springer Netherlands (2012). (c) J.W. Moore, C.L. Stanitski, P.C. Jurs, « Chemistry: The Molecular Science. » 4th ed. Cengage Learning (2010).

1.1.2. Ionisation

En raison de la présence des deux fonctions acide (-COOH) et base (-NH₂), les acides aminés présentent un comportement amphotère ou zwitterion et existent sous trois formes dépendant du pH de la solution¹ :

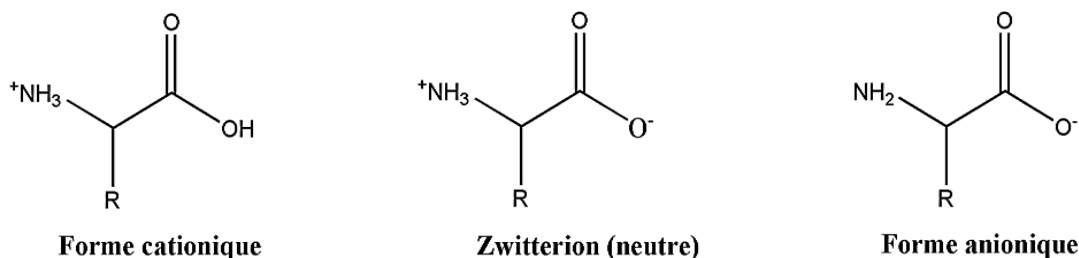


Schéma.1. Les formes ioniques d'un acide aminé¹.

1.2. Propriétés électrochimiques des acides aminés

Parmi les vingt acides aminés qui constituent les protéines, seules la tyrosine^{2,3}, l'histidine², la cystéine⁴, la méthionine et le tryptophane^{2, 5} sont oxydable à la surface des électrodes en carbone.

1.2.1. Cystéine

Le comportement électrochimique de la cystéine a été investigué sur plusieurs type d'électrodes : graphite, nanotubes de carbone/graphite⁶, platine⁷ et Or/ fibre de carbone⁸. L'oxydation de la cystéine sur une électrode de carbone vitreux (GCE) présente un système irréversible dépendant du pH⁹. L'oxydation du groupement thiol (-SH) du résidu cystéine et la formation d'un pont disulfure entre deux unités conduit à la formation d'une cystine.

² B. Malfroy, J. A. Reynaud, "Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part II. Amino acids containing no sulfur atoms: Tryptophan, tyrosine, histidine and derivatives." *J. Electroanal. Chem* (1980) 114 (2) 213-223.

³ M. Chiku, K. Horisawa, N. Doi, H. Yanagawa, Y. Einaga, "Electrochemical detection of tyrosine derivatives and protein tyrosine kinase activity using boron-doped diamond electrodes." *Biosens. Bioelectron* (2010) 26 (1) 235-240.

⁴ N. Spătaru, B. V. Sarada, E. Popa, D. A. Tryk, A. Fujishima, "Voltammetric determination of L-cysteine at conductive diamond electrodes." *Anal Chem* (2001) 73 (3) 514-519.

⁵ V. Brabec, V. Mornstein, "Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions." *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct* (1980) 625(1) 43-50.

⁶ S. Fei, J. Chen, S. Yao, G. Deng, D. He, Y. Kuang, "Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at carbon nanotube electrode modified with platinum." *Anal. Biochem.* (2005) 339, 29-35.

⁷ L. Moreno, A. Merkoci, S. Alegret, S. Hernandez-Cassou, J. Saurina, "Analysis of amino acids in complex samples by using voltammetry and multivariate calibration methods." *Anal. Chim. Acta.* (2004) 507, 247-253.

⁸ L. H. Wang, W. S. Huang, "Electrochemical Oxidation of Cysteine at a Film Gold Modified Carbon Fiber Microelectrode Its Application in a Flow—Through Voltammetric Sensor." *Sensors* (2012) 12, 3562-3577.

⁹ T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett, "Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the anodic behaviour of cysteine and methionine." *Bioelectrochemistry* (2011) 81, 46–52.

1.2.2. Histidine

Plusieurs travaux ont été réalisés sur le comportement électrochimique du résidu d'histidine sur des électrodes solide tels que : le platine, l'or et le graphite¹⁰.

Des études sur une électrode de carbone vitreux (pH = 7,0) ont dévoilé un seul pic d'oxydation, aucun pic de réduction n'a été observé, ce qui a démontré l'irréversibilité de ce système¹¹.

1.2.3. Tryptophane

Le comportement électrochimique de l'acide aminé tryptophane sur une électrode d'acier inoxydable indique l'absence d'un aspect électroactif, d'un autre côté l'oxydation sur une électrode de carbone vitreux aboutit à deux pics d'oxydation irréversible¹¹ dépendant du pH. Le potentiel du pic d'oxydation du tryptophane est similaire à celui de la tyrosine sur une GCE¹².

1.2.4. Méthionine

L'oxydation de la méthionine sur une électrode de carbone vitreux ou une électrode de diamant dopé au bore (BDD) présente un système irréversible dépendant du pH¹¹.

1.2.5. Tyrosine

L'oxydation de la tyrosine sur une électrode de carbone vitreux, présente un seul pic anodique (même potentiel d'oxydation du phénol)¹².

2. Les protéines

Les protéines sont des polymères composées d'un enchainement de 20 acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. Celles-ci se font par une condensation du groupement acide au groupement basique de l'acide aminé adjacent (-NH-CO-), avec perte d'une molécule d'eau.

L'enchainement des acides aminés constitue la structure primaire de la molécule protéique. Le repliement de ces acides aminés en hélices alpha et brins bêta décrit la structure

¹⁰ V. Brabec, V. Mornstein, "Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. II. Electrooxidation of amino acids." *Biophys Chem* (1980) 12, 159-165.

¹¹ T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett, "Peptide methionine sulfoxidereductase A (Msra): Direct electrochemical oxidation on carbon electrodes » *Bioelectrochemistry* (2013) 89, 11-18.

¹² T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, "Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways." *J. Electroanal. Chem.* (2011) 655, 9-16.

secondaire dont son repliement, forme une structure tertiaire¹. L'association de plusieurs chaînes polypeptidiques constitue une structure quaternaire. (Figure.2)

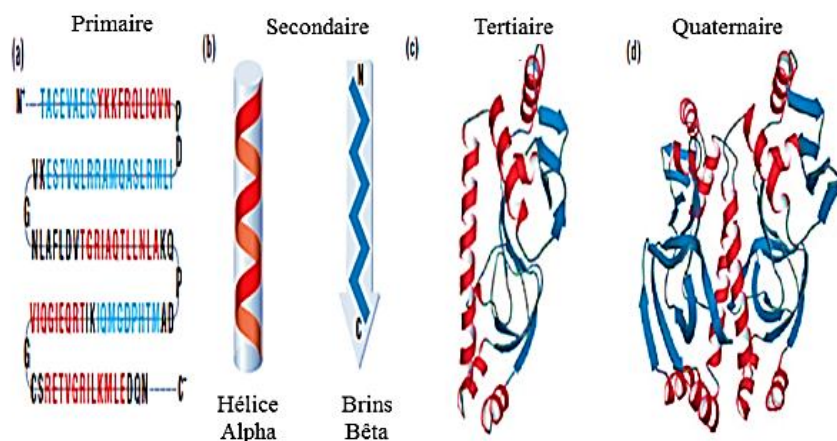


Fig.2 Différents niveaux de structure des protéines¹:
(a) structure primaire (b) structure secondaire : hélices alpha (en rouge) et bêta (en Bleu) (c) structure tertiaire (d) structure quaternaire.

2.1. Immobilisation des protéines sur une surface solide

L'immobilisation de biomolécules¹³, sur les surfaces solides en verre, polystyrène¹⁴, ou métal¹⁵ est définie comme une technique qui limite leur migration libre, elle permet d'obtenir un transfert d'électron direct entre la surface de l'électrode et la biomolécule redox-active¹⁶. L'orientation des protéines et la distance entre le cofacteur électrochimique actif et la surface de l'électrode, empêchent le transfert des électrons, ce qui justifie l'utilisation des médiateurs¹⁷. En générale, les protéines présentent une adsorption plus élevée sur les surfaces hydrophobes¹⁸, de ce fait, des indices d'hydrophobicité et d'hydrophilicité ont été donnés aux acides aminés.

Il existe de nombreuses techniques pour l'immobilisation d'espèces biologiques. Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients:

¹³ H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, "Analysis of yeast protein kinases using protein chips." *Nat. Genet.* (2000) 26: 283-289.

¹⁴ O. H. Aina, T. C. Sroka, M. L. Chen, K. S. Lam, "Therapeutic cancer targeting peptides." *Biopolymers* (2002) 66: 184-199.

¹⁵ S. Ameer, C. Bureau, J. Charlier, S. Palacin, "Immobilization of Biomolecules on Electrodes Modified by Electrografted Films." *J. Phys. Chem. B* (2004) 108 (34), 13042-13046.

¹⁶ R. S. Freire, C. A. Pessoa, L. D. Mello, L. T. Kubota, «Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity." *J. Braz. Chem. Soc.* (2003) 14 (2) 230-243.

¹⁷ J. E. Frew, H. A. Hill, "Direct and indirect electron transfer between electrodes and redox proteins." *Eur J Biochem.* (1988) 172 (2):261-269.

¹⁸ M. Wahlgren, T. Arnebrant, "Protein adsorption to solid surfaces." *Trends Biotechnol* (1991) 9 (1) 201-208.

- **Auto-assemblée :** L'auto-assemblage moléculaire désigne la formation de structures généralement ordonnées, voire hiérarchisées, à partir de molécules simples, sans participation ou assistance extérieure.

Il existe deux types d'interaction : des interactions fortes (liaisons covalentes) et des interactions faibles (liaisons Van de Waals)¹⁹.

D'un autre côté plusieurs facteurs influencent la réussite de la formation de la monocouche moléculaire :

- La qualité et l'état cristallin de la surface de l'électrode.
 - La concentration de la solution, la nature de l'adsorbat, la polarité et la viscosité du solvant, la température de la solution lors de l'immersion, la concentration en oxygène et l'humidité²⁰.
- **Réticulation :** Ce type d'immobilisation nécessite la présence d'un agent réticulant tel que le glutaraldéhyde, qui conduit à la formation de liaison entre les fonctions de surface de la biomolécule et l'agent de réticulation via une condensation aldol ou une addition de Michael²¹.
- **Greffage moléculaire :** généralement classé en deux catégories dépendant du type d'interaction molécule/ substrat²² :
 - **Le greffage physique :** les molécules sont reliées via des forces physiques (liaisons hydrogènes, hydrophobes).
 - **Le greffage chimique :** les molécules sont attachées à la surface via une réaction chimique entre la molécule et la surface d'un substrat.

¹⁹ A. Popof, "Importance des interactions faibles dans l'adsorption de molécules organiques fonctionnelles sur des surfaces atomiquement planes : approche expérimentale et théorique." Thèse, Université Paris 6, France (2007).

²⁰ M. Jaouen "Propriétés optiques de monocouches moléculaires auto-assemblées sur surfaces métalliques » Thèse, Université Paris-Sud, France (2014).

²¹ I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, K. C. Waldron, « Glutaraldehyde: behaviour in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking », *Bio Techniques* (2004) 37(5) 790–802.

²² B. Liberelle, "Greffage chimique de molécules et de polymères sur des substrats de mica et étude de leurs propriétés de surface. » Thèse, Université de Montréal (2007).

3. Les anticorps

Un anticorps est une glycoprotéine appartenant à la famille immunoglobine (Ig) produite par les lymphocytes B pour se lier sur un antigène spécifique (un élément étranger au corps) via sa zone hypervariable.

3.1. Structure des anticorps

L'immunoglobuline d'une masse molaire de 150 kDa est constituée de deux chaînes lourdes (50 kDa) et de deux légères (25 kDa). Les chaînes légères sont composées d'un domaine variable (VL) et un domaine constant (CL) et les chaînes lourdes d'un domaine variable (VH) et trois domaines constants (CH1, CH2, et CH3). Chaque domaine variable possède trois boucles hypervariables appelées Complementary Determining Regions (CDR) qui se caractérisent par une extrême variabilité en acides aminés.

La chaîne légère est liée à la chaîne lourde par un pont disulfure localisé aux extrémités C-terminales des domaines CL et CH1. Les chaînes lourdes sont liées entre elles par des ponts disulfures localisés au niveau de leur région charnière (H).

Les anticorps peuvent être caractérisés en différents fragments obtenus par coupure enzymatique à la papaïne. On obtient alors le fragment Fab (antigen binding Fragment) qui est responsable de la liaison spécifique de forte affinité aux antigènes via le CDR et le fragment Fc (crystallizable fragment) qui se lie à des récepteurs FcR.

Il existe cinq classes d'immunoglobulines, A, D, E, G et M, définies par le sous type de leur chaîne lourde α , δ , ϵ , γ ou μ ²³. **(Figure.3)**

²³ W. Wang, S. Singh, D.L. Zeng, K. King, S. Nema, "Antibody structure, instability, and formulation", *J Pharm Sci* (2007) 96, (1) 1-26.

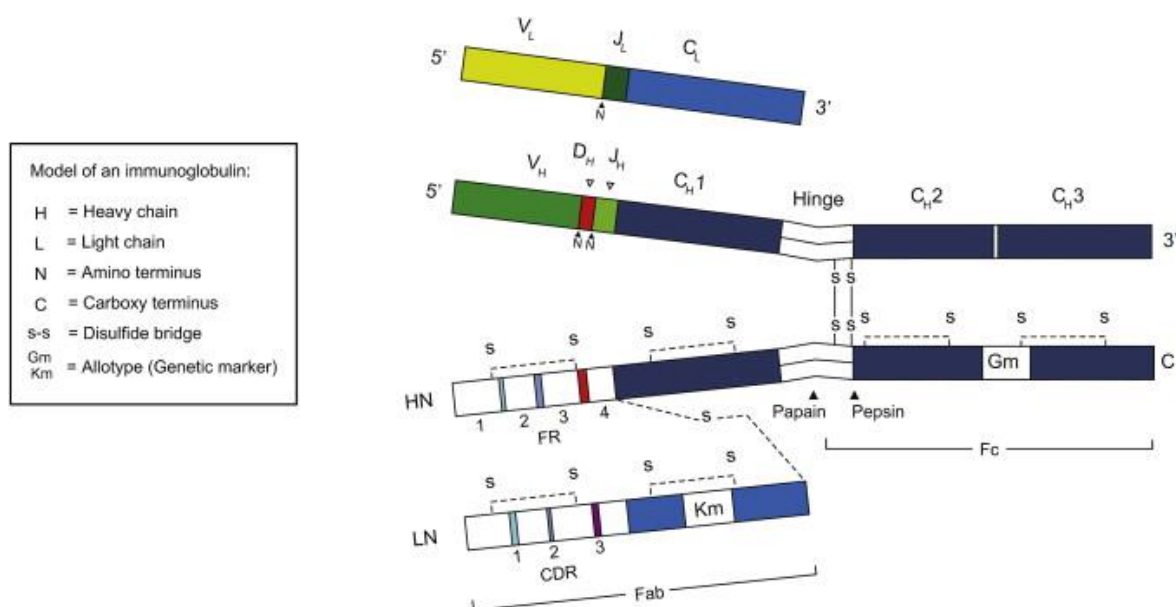


Fig.3 Structure d'un anticorps monoclonal²⁴.

Les anticorps se divisent en deux catégories : les anticorps poly-clonaux qui présentent un mélange hétérogène d'anticorps, produit à partir de différents clones cellulaires et les anticorps monoclonaux qui constituent une population homogène issue d'un seul clone, il ne réagit qu'avec un seul épitope.

La nomenclature des anticorps monoclonaux définie par l'USAN (United State Adopted Name), permet d'en déduire leurs caractéristiques grâce à leur terminologie. Tous les noms des anticorps finissent par le suffixe **-mab**, la syllabe précédant ce suffixe détermine la source de l'anticorps: **o** pour murin (1975), **xi** pour chimérique (1984), **zu** pour humanisé (1988-1991) et **U** pour humain (1994-1999)²⁵. (**Tableau.1**)

Tableau.1 Nomenclature internationale des différentes catégories d'anticorps monoclonaux²⁶.

Type d'anticorps	Suffixe	% Humain	Exemple
Murin	Momab	0	Muromomab (Orthoclone)
Chimérique	Ximab	60-70	Rituximab (Mabthera)
Humanisé	Zumab	> 90	Bevacizumab (Avastin)
Humain	Mumab	100	Adalimumab (Hamira)

²⁴ H. W. Schroeder, L. Cavacini, "Structure and function of immunoglobulins", *J Allergy Clin Immunol* (2010) 125 (2) s S41-S52.

²⁵ C. Prin-Mathieu, P. Aguilar, M. C. Béné, G. Faure, M. N. Kolopp-Sarda « Anticorps monoclonaux, anticorps thérapeutiques. » *Revue Française des Laboratoires* (2003) 2003 (357) 31-39.

²⁶ A. J. Scheen, « nomenclature internationale des différents types d'anticorps monoclonaux. » *Rev Med Liège* 2009; 64 : 5-6: 244-247.

3.2. Bevacizumab (Avastin)

Bevacizumab (BEVA) (Genentech/Roche) est un anticorps monoclonal humanisé (93% humain, 7% murin) produit par la technologie de l'ADN recombinant dans les cellules d'ovaire de Hamster Chinois. La formule moléculaire de BEVA est $C_{6538}H_{10000}O_{2032}N_{1716}S_{44}$ avec une masse molaire de 149,000 Da. Il se compose de six séquences murines greffées sur des chaînes lourdes de 452 acides aminés et des chaînes légères de 214 acides aminés²⁷. (ANNEXE.2)

Bevacizumab est un anti-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF, protéine naturelle qui déclenche la formation des nouveaux vaisseaux sanguins), conçu pour reconnaître et se fixer sur ce facteur, inhibant ainsi la liaison de VEGF à ses récepteurs. Par conséquent, il contrôle la croissance de la tumeur grâce à un manque d'oxygène et de nutriment²⁸. (Schéma.2)



Schéma.2 Structure de l'anticorps monoclonale Bevacizumab²⁷.

▪ Effets thérapeutiques de Bevacizumab

À ce jour, plus de 30 anticorps ou fragments d'anticorps sont disponibles sur le marché mondial²⁹. Ces molécules sont actuellement utilisées pour le traitement de diverses maladies.

²⁷ <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00112>

²⁸ S. Faivre, E. Raymond, « Thérapeutiques anti angiogéniques en cancérologie » Springer Science & Business Media (2008).

²⁹ O. Cochet, M. Chartrain, « Du milligramme à la tonne d'anticorps monoclonaux - Outils et perspectives de production. » *Med Sci (Paris)* (2009) 25 (12) 1078-1084.

Aux Etats-Unis, Genentech a approuvé la première combinaison efficace de l'anticorps BEVA avec une chimiothérapie à base de 5-fluorouracil pour traiter le carcinome métastatique du côlon ou du rectum.

Aujourd'hui, Bevacizumab en association à une chimiothérapie est indiqué chez les patients atteints de cancer colorectal³⁰, du poumon³¹, du sein³² et de l'ovaire ainsi que dans le traitement de rétinopathie diabétique proliférative (PDR)³³, la télangiectasie héréditaire hémorragique (VRL)³⁴ et le glaucome³⁵.

4. L'électrochimie et les produits pharmaceutiques

Le développement des anticorps monoclonaux nécessite des études approfondies sur leurs mécanismes d'action. Les méthodes électrochimiques, de leur côté, offrent des outils simples et rapides pour déterminer leur comportement³⁶.

Des analyses électro-analytiques ont été développées pour identifier les potentiels d'oxydation de divers protéines et produits pharmaceutiques sur des électrodes solides comme l'électrode de carbone^{8, 37}. (**Tableau.2**)

³⁰ F. Kabbinavar, J. Hambleton, R.D. Mass, H.I. Hurwitz, E. Bergsland, S. Sarkar, "Combined Analysis of Efficacy: The Addition of Bevacizumab to Fluorouracil/ Leucovorin Improves Survival for Patients with Metastatic Colorectal Cancer." *J. Clin. Oncol.* (2005) 1; 23(16):3706-3712.

³¹ F. Di Costanzo, F. Mazzone, M. Micol Mela, L. Antonuzzo, D. Checcacci, M. Saggese, F. Di Costanzo, "Bevacizumab in non-small cell lung cancer." *Drugs.* (2008) 68(6):737-746.

³² H. S. Rugo, "Bevacizumab in the Treatment of Breast Cancer: Rationale and current data." *Oncologist* (2004) 9 (1) 43-49.

³³ R. L. Avery, J. Pearlman, D. J. Pieramici, M. D. Rabena, A. A. Castellarini, M.A. Nasir, M. J. Giust, R. Wendel, A. Patel, "Intravitreal Bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy." *Ophthalmology* (2006) 113 (10):1695.e1-15.

³⁴ B. T. Brinkerhoff, N. W. Choong, J. S. Treisman, D. M. Poetker, "Intravenous and topical intranasal bevacizumab (Avastin) in hereditary hemorrhagic telangiectasia." *Am. J. Otolaryngology* (2012) 33(3):349-351.

³⁵ H.F. Jiménez-Ortiz, S.P. Martínez, N.T. Fernández, "Bevacizumab (Avastin) intracamerular en el manejo quirúrgico del glaucoma neovascular." *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* (2012) 87(12):396-400.

³⁶ I. C. Lopes, S. C. B. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett, "In situ electrochemical evaluation of anticancer drug temozolomide and its metabolites-DNA interaction." *Anal. Bioanal. Chem.* (2013) 405(11):3783-3790.

³⁷ V. Ostatná, H. Cernocká, K. Kurzatková, E. Paleček, "Native and Denatured Forms of Proteins can be Discriminated at Edge Plane Carbon Electrodes." *Anal. Chim. Acta* (2012) 735:31-36.

Tableau.2 Electro-analyses des composés pharmaceutiques sur des électrodes en carbone vitreux.³⁸

Analyte	Technique	Milieu	Potentiel/V	LOD
Abacavir	DPV SWV	pH 2.0 BRb*	1.07	$2.2 \times 10^{-7} \text{M}$
Alfuzosin	DPV SWV	pH 6.0 phosphate	0.85	1.610^{-7}M
Benperidol	CV	0.1 M H ₂ SO ₄	1.45	$8.0 \times 10^{-4} \text{M}$
Cefoperazone	DPV SWV	pH 2.0 phosphate	0.87	$2.9 \times 10^{-7} \text{M}$
Codeine	DPV SWV	pH 3.0 acétate	1.2	$3.0 \times 10^{-6} \text{M}$
Droperidol	CV	0.1 M H ₂ SO ₄	1.45	$8.0 \times 10^{-4} \text{M}$
Flupentixol	DPV SWV	pH 7.0 BRb*	0.75	$1.2 \times 10^{-7} \text{M}$
Ganciclovir	DPV SWV	pH 2.0 BRb*	1.15	$8.1 \times 10^{-8} \text{M}$
Hydrochlorothiazide	DPV	pH 3.3 BRb*	1.04	5.0 µg/L
Indinavir	DPV SWV	pH 10.0 BRb*	0.75	$1.3 \times 10^{-7} \text{M}$
Mitoxantrone	CV DPV SWV	pH 2.1 BRb*	0.65	$1.9 \times 10^{-7} \text{M}$
Omeprazole	CV DPV SWV	pH 7.0 phosphate	0.8	$1.0 \times 10^{-6} \text{M}$
Paracetamol	DPSV*	pH 5.7 BRb*	0.75	0.042 mg/L
Quetiapine	DPV SWV	pH 3.5 acétate	1.00	$4.0 \times 10^{-8} \text{M}$
Sertindole	CV DPV SWV	pH 3.5 acétate	1.08	$1.9 \times 10^{-7} \text{M}$
Tamsulosin	DPV SWV	pH 4.5 acétate	1.15	$3.3 \times 10^{-7} \text{M}$
Verapamil	DPV SWV	pH 3.7 acétate	0.94	$1.6 \times 10^{-7} \text{M}$
Ziprasidone	CV	0.1 M H ₂ SO ₄	1.0	$1.0 \times 10^{-4} \text{M}$

*DPSV différentielle des impulsions voltamétriques décapage, BRb électrolyte support Britton-Robinson

³⁸ Éder T. G. Cavalheiro, C. M. A. Brett, A. M. Oliveira-Brett, O. Fatibello-Filho, "Bioelectroanalysis of pharmaceutical compounds." *Bioanal Rev* (2012) 4:31-53.

5. La dénaturation

La rigidité de la structure tertiaire et quaternaire des protéines natives immobilisées sur des surfaces solides, représente un défi majeur pour le transfert des électrons. Le processus de dénaturation de ces protéines conduit à une déformation tridimensionnelle de sa conformation native, ce qui améliore ses réponses électrochimiques. Plusieurs produits chimiques (agents dénaturants) ont été utilisés tels que les agents anioniques et cationiques (l'urée et le chlorure de guanidium) ou encore les agents réducteurs comme le dithiothréitol (DTT) et le tris (2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP). Trois agents ont été testés dans cette présente étude:

5.1. Sodium Dodécyl Sulfate (SDS)

Un détergent anionique puissant qui se lie fortement à la protéine, en dépliant les chaînes polypeptidiques et leur confère une charge négative globale³⁹. (Figure.4)

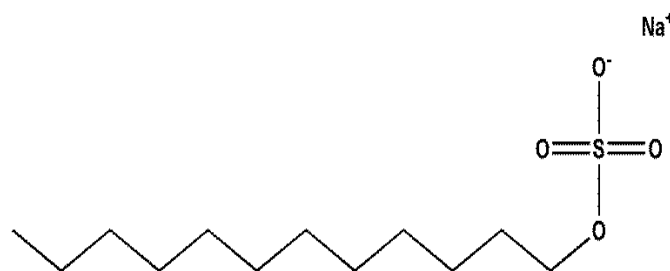


Fig.4 Structure du Sodium Dodécyl Sulfate (SDS).

5.2. L-Dithiothréitol (DTT)

Un agent réducteur fort, relativement instable dans les solutions aqueuses, étant sensible à l'oxydation par l'oxygène de l'air⁴⁰, parfois il nécessite la présence d'autres facteurs dénaturants comme la température ou la présence d'un autre agent (conditions de stabilité)⁴¹. (Figure.5)

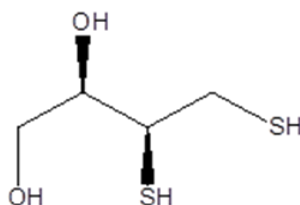


Fig.5 Structure du DL-Dithiothréitol (DTT).

³⁹ T. D. Pollard, W. C. Earnshaw, « Biologie cellulaire. » Elsevier Masson, (2004).

⁴⁰ C. David, « Mécanismes de réduction des ponts S-S dans les protéines étudiés par spectroscopie Raman et modélisation moléculaire. » Thèse, Université Franche-Comté, France (2009).

⁴¹ E.B. Getz, M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke, P.R. Selvin, "A comparison between the sulfhydryl reductants tris (2-carboxyéthyl) phosphine and dithiothréitol for use in protein biochemistry." *Anal. Chem.* (1999) 273, 73–80.

5.3. Tris (2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP)

Un agent réducteur puissant réduit les ponts S-S des protéines, stable dans de nombreuses solutions aqueuses et réactive seulement dans sa forme déprotonée à un pH acide (TCEPH₃, TCEPH₂, TCEPH₁ et TCEPH₀)⁴⁰. **(Figure.6)**

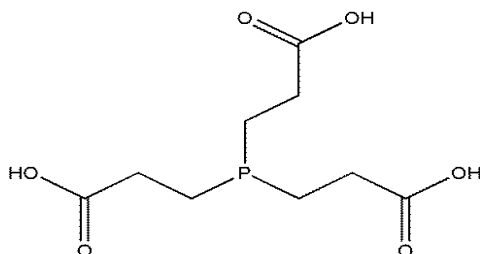


Fig.6 Structure de Tris (2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP).

PARTIE I

Chapitre 4

ELECTROCHIMIE DES FLAVONOIDES

1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un mécanisme physiopathologie. « Etat de déséquilibre entre la production d'espèces réactives et les capacités cellulaires antioxydantes »¹. Ce mécanisme joue un rôle majeur dans la progression de nombreuses maladies chroniques¹.

Une espèce radicalaire est une espèce chimique qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur son orbitale externe. Elle présente une grande instabilité, une extrême réactivité et une courte durée de vie, elle est capable d'extraire un électron sur une molécule ou atome pour se stabiliser. Ce radical libre issu d'une rupture homolytique d'une liaison covalente ou d'un transfert d'électrons.². (**Tableau.1**)

Malgré le rôle physiologique important des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), leurs présences en quantité critique dans l'organisme, conduit au stress oxydatif (dégradation cellulaire).

Tableau.1. Présentation des espèces réactives oxygénées et azotées³.

Espèces réactives oxygénées		Espèces réactives azotées	
Anion superoxyde	O_2^-	Monoxyde d'azote	NO
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	Protoxyde d'azote	N_2O
Radical Hydroxyle	OH^\cdot	Peroxynitrite	NO_3^-
Radical Peroxyle	OH_2^\cdot	Nitroxyle	HNO
Acide Peroxynitrique	HNO_3		

Ces radicaux libres sont capables de provoquer une série de réactions telles que la peroxydation des lipides⁴, l'inactivation des protéines⁵ et la mutation de l'ADN⁶. (**Schéma.1**)

¹ (a) C. Migdal, M. Serres, "Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant." *Med Sci (Paris)* (2011) 27(4) 405 – 412. (b) B. Uttara, A.V. Singh, P. Zamboni, R. T. Mahajan, "Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options." *Curr Neuropharmacol.* (2009) 7(1):65-74.

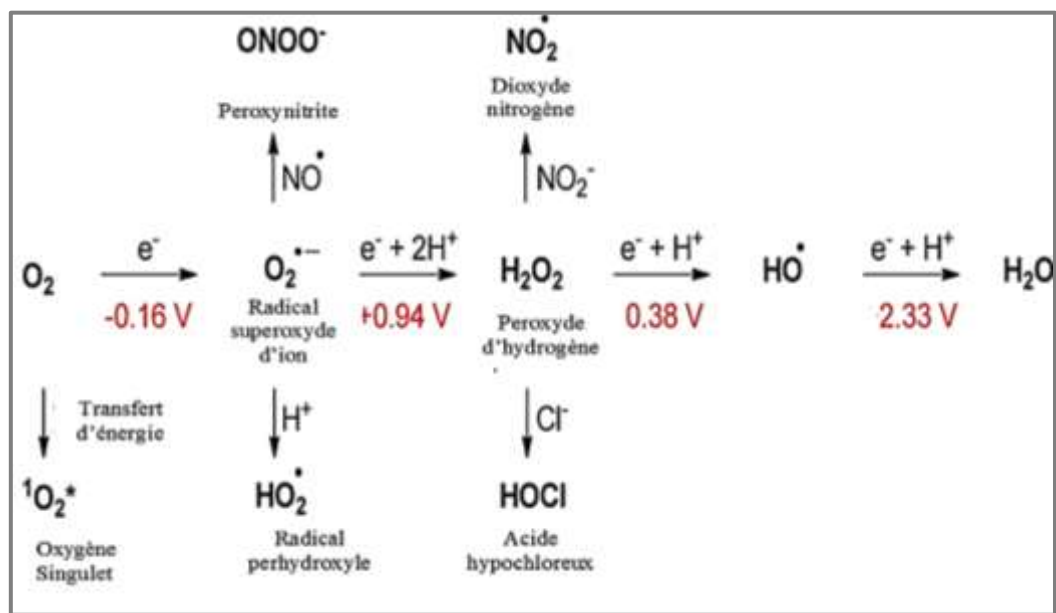
² P. Lacolley, D. Babuty, C. Boulanger, B. Ghaleh, G. Loirand, F. Pinet, J. I. Samuel « Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. » ed. John Libbey Eurotext (Paris) (2007).

³ D. A. Ghareeb, E. M.E. Sarhan, "Role of Oxidative Stress in Male Fertility and Idiopathic Infertility: Causes and Treatment." *J Diagn Tech Biomed Anal* (2014) 3(1) 1-12.

⁴ D. A. Pratt, K. A. Tallman, N. A. Porter, "Free Radical Oxidation of Polyunsaturated Lipids: New Mechanistic Insights and the Development of Peroxyl Radical Clocks" *Acc Chem Res.* (2011) 44 (6) 458-467.

⁵ L. Lyras, R. H. Perry, E. K. Perry, P. G. Ince, A. Jenner, P. Jenner, B. Halliwell, "Oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in cortical brain regions from patients with dementia with Lewy bodies" *J. Neurochem.* (1998) 71, 302–312.

⁶ J. Cadet, T. Douki, J.-L. Ravanat "Oxidatively generated base damage to cellular DNA." *Free Radic. Biol. Med.* (2010) 49, 9–21.

Schéma.1 Formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS)⁷.

2. Les antioxydants

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux.

*"D'elle, Il fait pousser pour vous, les cultures, les oliviers, les palmiers, les vignes et aussi toutes sortes de fruits. Voilà bien là une preuve pour des gens qui réfléchissent." **An-Nahl-11***

De nombreux travaux ont montré que la consommation de légumes et de fruits présentent des activités antibactériennes, antivirales et anti-inflammatoires,⁸ et confère une protection vis-à-vis des taux de maladies cardiovasculaires et des effets nocifs des radiations^{9,10}. Néanmoins, l'Agence internationale de recherche sur le cancer suggère que la consommation de légumes et de fruits ne présente pas un effet associé au taux d'évolution des tumeurs cancéreuses¹¹.

Lorsque les cellules sont exposées à un stress oxydatif, le système de défense mis à la disposition des molécules antioxydantes pour réguler la production des radicaux libres et protéger l'organisme contre leurs effets néfastes. Les modes d'action de ces molécules contre

⁷ K. Krumova, G. Cosa, "Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanoscience." Volume 1. The Royal Society of Chemistry, London, UK (2016). "Overview of Reactive Oxygen Species." Chapter 1, 1-21.

⁸ (a) Y.Y. Lim, T.T. Lim, J.J. Tee, "Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study" *Food Chem.*(2007) 103, 3, 1003–1008, (b) M. Mueller, S. Hobiger, A. Jungbauer, "Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices" *Food Chem.*(2010) 122, 987–996.

⁹ WHO Fruit and Vegetable Promotion Initiative – report of the meeting, Geneva (2003).

¹⁰ L. H. Yao, Y.M. Jiang, J. Shi, F.A. Tomás-Barberán, N. Datta, R., Singanusong, "Flavonoids in Food and Their Health Benefits" *Plant Food Hum Nutr.*(2004) 59, 113-122.

¹¹ T. J. Key, "Fruit and vegetables and cancer risk" *Br. J. Cancer* (2011) 104, 6–11.

le stress oxydatif sont: l'inactivation, l'élimination ou la diminution de concentration¹². Ces défenses antioxydantes sont classées en deux catégories : enzymatiques et non-enzymatiques.

(Schéma.2)

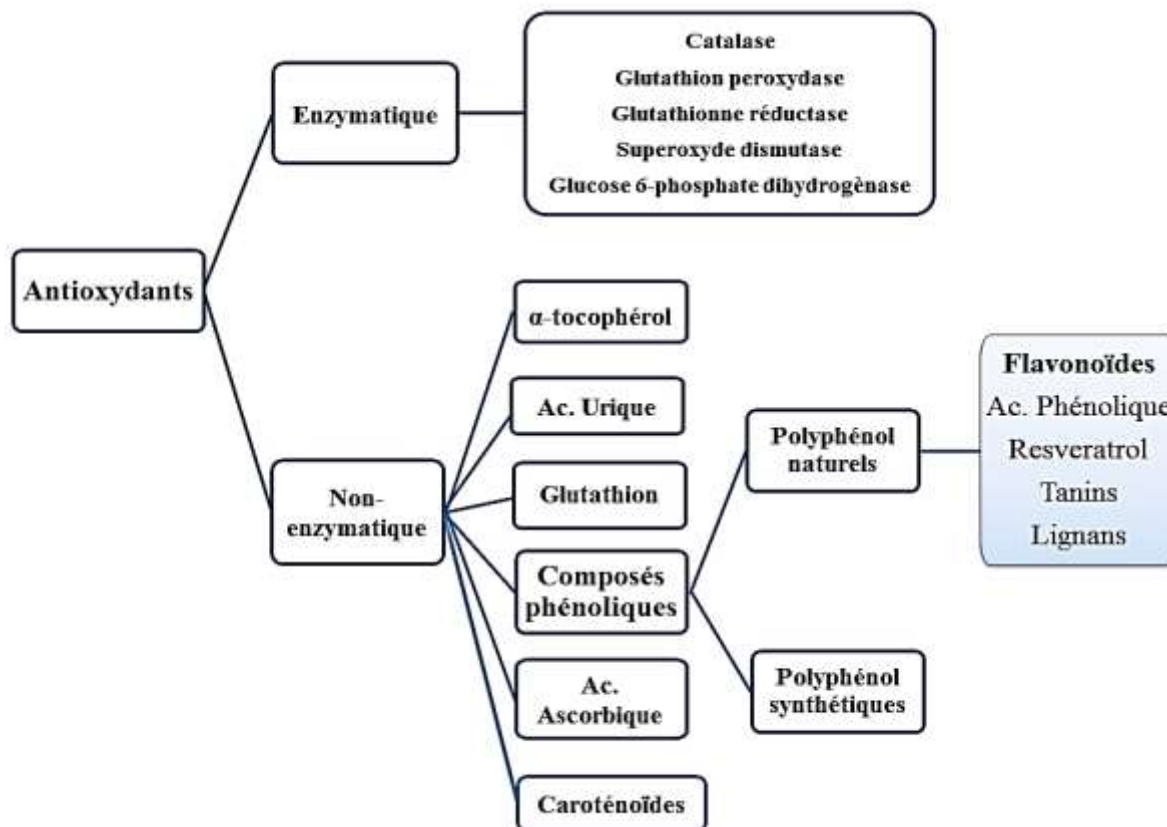


Schéma.2 Classement des Antioxydants.

2.1. Antioxydants enzymatiques

- **Superoxyde dismutase** : une métallo-enzyme qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène.
- **Catalase**: une enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau.
- **Glutathion peroxydase** : une enzyme qui réduit le peroxyde d'hydrogène en eau via une réaction catalysé par le couple oxydoréducteur glutathion/glutathion disulfide (GSH/GSSG)¹³.

¹² B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Loeliger, O. I. Aruoma, "The characterization of antioxidants" *Food Chem Toxicol.* (1995) 33, 601-617.

¹³ C. Vergely, L. Rochette, " Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire." *Médecine thérapeutique Cardiologie* (2003) 1 (3) 131-139.

2.2. Antioxydants non-enzymatiques

- **Rétinol ou vitamine A** : une molécule de nature animale se combine avec le radical pyroxyde d'hydrogène avant la peroxydation des lipides.
- **Acide urique** : un produit qui inhibe les ruptures induites par la xanthine oxydase en présence d'ions ferreux et des hydro-péroxydes.
- **Caroténoïde** : une molécule tetra-tèrpenique capable de piéger l'oxygène singulet.
- **α -tocophérol ou vitamine E** : un liposoluble qui inhibe la peroxydation lipidique.
- **Polyphénols** : une grande famille de métabolites secondaires particulièrement abondants dans les végétaux avec plus de dix mille structures différentes caractérisées. Ils se trouvent sous forme conjugués dans les aliments à l'exception des flavanols¹⁴.

Ces molécules sont de remarquables antioxydants, capables de piéger des radicaux libres et d'inhiber les enzymes génératrices; d'un autre côté, certains polyphénols ont également un effet pro-oxydant indésirable¹⁵.

Les principales classes des composés phénoliques sont présentées comme suit :

- Les acides phénoliques** : se divisent en deux groupes : les acides hydroxy benzoïques (acide benzoïque, acide gallique) et les acides hydroxy cinnamiques (acides caféique, coumarique, sinapique et férulique).
- Les tannins** : des esters de l'acide phénolique associé à un polyol (le glucose). Les groupes les plus importants de cette famille sont les gallotanins et les ellagitanins.
- Les lignanes** : des polymères d'alcool tel que le coniferylique, le sinapique et le p-coumarylique, dérivant de l'acide férulique, sinapylique et p-coumarique successivement.
- Les flavonoïdes** : Une famille de métabolites secondaires de plus de 4000 variétés. Les flavonoïdes possèdent une origine biosynthétique commune et disposent d'un même squelette de quinze atomes de carbones, ils possèdent une structure de base (C6-C3-C6) ; deux cycles benzénique A et B à six atomes de carbones liés avec trois atomes de carbone C3, complété par une fonction éther formant ainsi un cycle central, appelé, cycle C¹⁶.
(Figure.1)

¹⁴ A. Fardet, I. Souchon, D. Dupont, "Structure des aliments et effets nutritionnels." Ed. Quae (2013).

¹⁵ L. R. Fukumoto, G. Mazza, "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds." *J. Agric. Food Chem* (2000) 48: 3597-3604.

¹⁶ G. Isorez, « Contribution à la chimie des flavonoïdes : Accès à des analogues de pigments du vin rouge. », Thèse, Université Louis Pasteur – Strasbourg I (2007).

Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3ols et les anthocyanes.

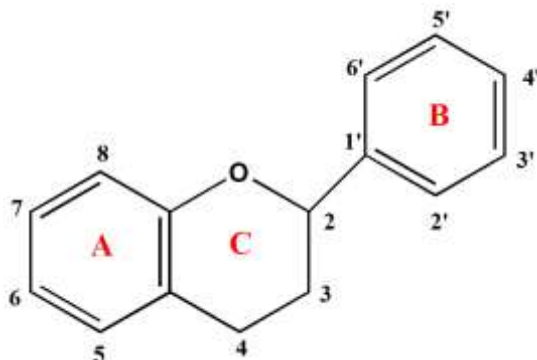
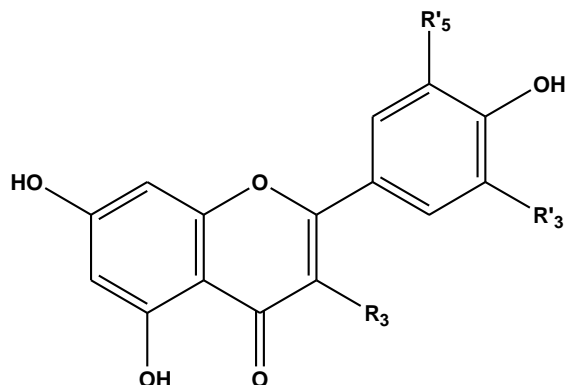


Fig.1 Structure de base des flavonoïdes.

L'activité biologique des flavonoïdes est fortement dépendante de la nature et la position des substituants, en particulier les groupements hydroxyles¹⁷.

▪ Les flavonols

Les flavonols sont caractérisées par la présence d'un groupement hydroxyle en C7, C5, C4', une double liaison en C2-C3 et un groupe carboxyle en position C4, ce qui explique leurs forte activité antioxydante. Ils se trouvent dans les oignons, les brocolis, les abricots, les pommes, les thés et les tomates¹⁸ :



$R_3=OH, R_5'=R_3'=H$ Kaempférol

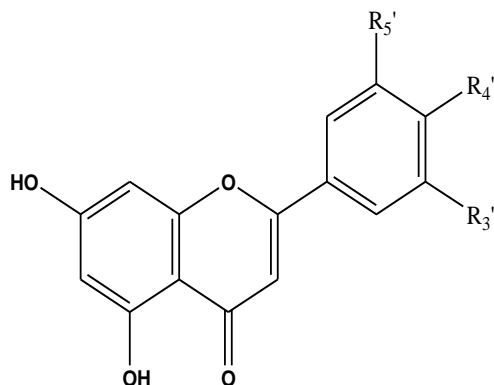
$R_3=R_5'=OH; R_3'=H$ Quercétine

¹⁷ L. Chen, X. Yang, H. Jiao, B. Zhao, "Tea catechins protect against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction and calcium dysregulation in PC12 cells." *Chem. Res. Toxicol.* (2003) 16 (9), 1155-1161.

¹⁸ C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Remesyet, L. Jimenez, "Polyphenols: Food sources and bioavailability." *Am. J. Clin. Nutr.* (2004)79(5): 727-747.

▪ Les flavones

Les flavones se distinguent par la présence du groupement hydroxyle en position C5, C7, une double liaison en C2-C3 et un groupe carboxyle en position C4. Ils sont présents dans certains végétaux comme les persils, les céleris, les poivres¹⁸:

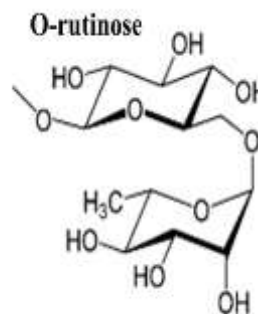


$R'_5 = R'_3 = R'_4 = H$ Chrysin

$R'_4 = OH$ $R'_5 = R'_3 = H$ Apigenine

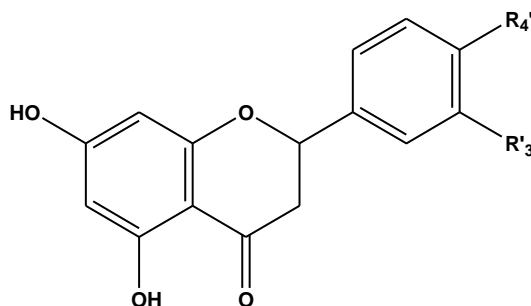
$R'_4 = R'_5 = OH$ Luteolin

$R'_3 = R'_4 = OH$, $R_3 = O\text{-rutinose}$ Rutine



▪ Les flavanones

Les flavanones sont caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle en position C5' et C7' et par l'absence de double liaison en position C2-C3, ils sont présents avec des quantités importantes dans les citrons et les oranges¹⁹ :



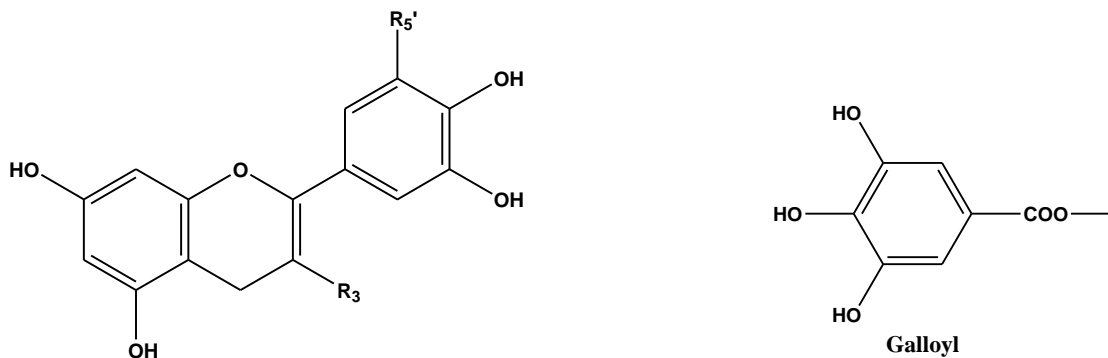
$R'_4 = R'_3 = OH$ Eriodictyol

$R'_4 = OH$, $R'_3 = H$ Naringenine

¹⁹ H. El Gharras, "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review" *Int J Food Sci Tech* (2009) 44 (12): 2512-2518.

▪ Les flavan-3ols

Les flavan-3ols se caractérisent par la présence d'un groupement hydroxyle en position C5, C7, C'4, C'3, ils existent sous formes monomériques (la catéchine et l'épigallocatéchine) et polymériques (la proanthocyanide) et sont présents dans les abricots, les pêches, les thés et les chocolats¹⁸.

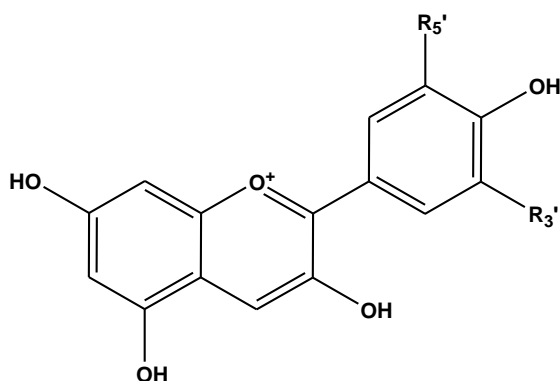


$R_3=OH$ Catéchine

$R_5'=OH; R_3'=H, R_3=O\text{-galloyl}$ Epigallo-catéchine gallate

▪ Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments naturels existant sous forme hétéroside, et sont responsables de la couleur des fruits (pomme, raisin, framboise), les végétaux et les fleurs.



$R_5'=R_3'=OCH_3$ Malvidine

$R_5'=OH, R_3'=H$ Cyanidine

$R_5'=R_3'=H$ Pélargonidine

3. La conservation des aliments

Les techniques de conservation des aliments consistent à préserver leurs propriétés gustatives et nutritives, elles peuvent être classées selon leurs mécanismes d'action :

- Ralentissement ou inhibition de la détérioration chimique ;
- Inactivation directe des bactéries, des levures, des moisissures ou des enzymes ;

- Prévention de la ré-contamination avant et après le traitement²⁰.

Les techniques de conservation comportent trois procédés de traitement : chimique, biologique et physique.

3.1. Traitement chimique: conservation ou transformation des propriétés organoleptiques par des produits actifs à des doses relativement faible.

3.2. Traitement biologique : l'inhibition du développement des germes indésirable par des réactions biochimiques telles que la fermentation²¹.

3.3. Traitement physique : la destruction ou l'inactivation des formes microbiennes susceptible d'endommager l'aliment, il se divise en trois modes :

- La conservation par le froid : Réfrigération²¹, congélation (-18°C), surgélation (inférieure à -18°C).
- La conservation par la chaleur : la pasteurisation (réchauffement inférieur à 100°C), la stérilisation (entre 135°C et 150°C pendant 5 secondes au maximum) et l'appertisation²².
- La conservation par élimination d'eau : la lyophilisation, le fumage, le salage, et l'ionisation²³.

La lyophilisation: un procédé de déshydratation à basse température qui consiste à enlever progressivement l'eau d'un produit préalablement congelé par passage direct de l'état solide à l'état gazeux (sublimation)²⁴.

La lyophilisation comprend trois phases principales : la congélation, la dessiccation primaire qui consiste à extraire l'eau libre (cristaux de glace formés par congélation) et la dessiccation secondaire qui permet d'éliminer la quantité résiduelle de l'eau à la surface du produit par désorption.

Cette technique permet d'empêcher les activités microbiologiques des aliments, ce qui conduit à une stabilité améliorée pour une longue durée, une réduction minimale du volume de l'aliment²⁵, une protection de la valeur nutritionnelle et une conservation des propriétés physiologiques et sensorielles (couleur, odeur, goût).

²⁰ M. Shafiur Rahman « Handbook of Food Preservation. », 2nd Edition CRC Press Taylor & Francis Group Boca Raton (2007).

²¹ C. Bonnard, V. Cabos, L. Destre, D. Gonge, A. Mascart, G. Peignet, E. Sidot, « Projet interdisciplinaire, filière fruits et légumes », DESS Université Lille1 (1999-2000).

²² A. Branger, M. M. Richer, S. Roustel, « Alimentation et processus technologiques » *Educagri*, Dijon (2007).

²³ A. P. Dionísio, R. Takassugui Gomes, M. Oetterer, "Ionizing radiation effects on food vitamins - A Review" *Braz. arch. biol. technol.* (2009) 52 (5) 1267-1278

²⁴ C. Ratti, "Freeze-Drying Process Design, in Handbook of Food Process Design." (ed J. Ahmed and M. Shafiur Rahman), Wiley-Blackwell, Oxford, (2012).

²⁵ P. Chouvenec, S. Vessot, J. Andrieu, P. Vacus, "Optimization of the freeze-drying cycle: a new model for pressure rise analysis." *Drying Technol.* (2004) 22, 1577-1601.

4. L'extraction végétale :

L'extraction est une technique de séparation sélective basée sur la différence de solubilité des substances. L'extraction liquide-liquide se repose sur la solubilité préférentielle d'une substance dans deux solvants différents. Par contre, l'extraction solide-liquide est basée sur un transfert de la matière soluble de la phase solide à la phase liquide (solvant d'extraction) grâce à un gradient de concentration.

Les techniques d'extraction se divisent en deux groupes principaux :

- **Les techniques traditionnelles** : se caractérisent par la simplicité et le prix relativement faible du matériel mis en œuvre. Outre ces avantages, on constate que ces techniques nécessitent une grande quantité de solvant et une longue durée d'extraction²⁶. On distingue l'extraction par Soxhlet, la macération, la décoction et l'hydro-distillation.
- **Les techniques alternatives** : offrent de nombreux avantages notamment une réduction du temps d'extraction, une diminution de la consommation de solvants et l'amélioration du rendement.

A titre d'exemple on cite : l'extraction assistée par ultrason (UAE), l'extraction assistée par microonde (MAE), l'extraction à fluide supercritique (SFE) et à fluide pressurisé (PL).

Durant nos travaux, deux techniques ont été utilisées : l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) et par ultrason (UAE).

Nous nous intéressons ici à l'extraction solide-liquide dont le transfert de la matière suit quatre étapes principales :

- Propagation du solvant dans la matière solide ;
- Dissolution du soluté dans le solvant ;
- Diffusion du soluté vers l'extérieur de la matière végétale ;
- Transfert de la solution enrichie vers tout le milieu.²⁷

Parmi les facteurs qui influencent la performance de l'extraction solide-liquide on compte :

²⁶ C. Grosso, P. Valentão, F. Ferreres, P. B. Andrade, "Alternative and Efficient Extraction Methods for Marine-Derived Compounds." *Mar Drugs*. (2015) 13(5): 3182–3230.

²⁷ R. Poirot, « méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale. »Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (2007).

- La nature et la concentration du solide : le prétraitement par découpage ou broyage réduit la taille de la matière solide ce qui augmente sa surface d'échange et facilite la pénétration du solvant d'extraction²⁸.
- La nature du solvant d'extraction : le solvant doit présenter quelques caractéristiques indispensables comme la faible viscosité et la masse volumique peu élevée.
- Le pH du milieu, l'agitation (homogénéité du milieu), le temps de l'extraction et le ratio solide/ liquide.

4.1.1. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

Les micro-ondes sont des rayonnements non ionisants avec des fréquences entre 300 MHz et 300 GHz et une température de 100 à 150°C.

Les micro-ondes sont classées en système monomode (mode focalisé) où les rayonnements se focalisent sur une zone restreinte et en système multi-mode dont les rayonnements se dispersent aléatoirement dans la cavité. (Schéma.3)

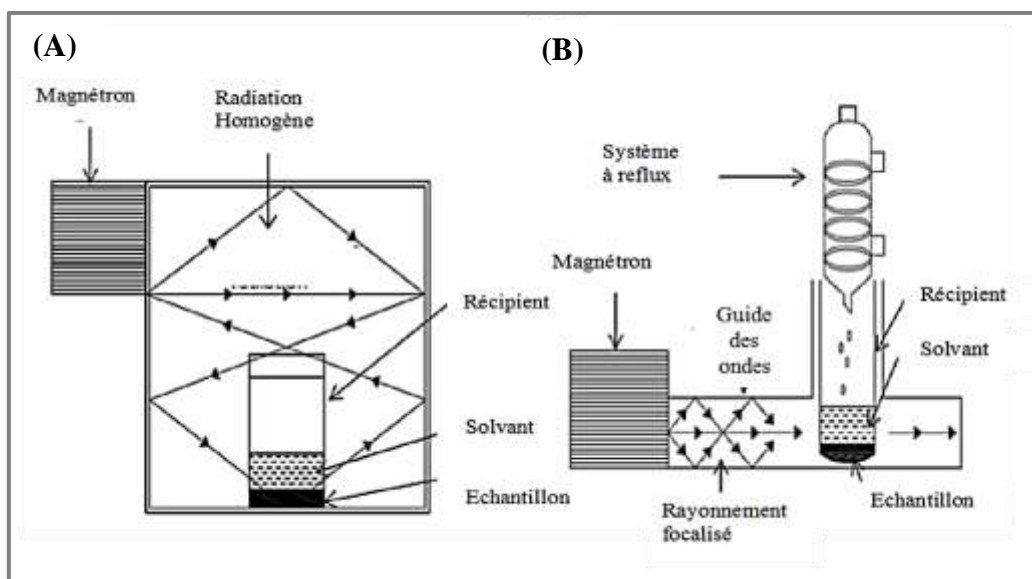


Schéma.3 A) Système fermé et B) système ouvert en mode micro-onde²⁹.

Le mécanisme d'extraction se base sur un chauffage de l'échantillon de l'intérieur vers l'extérieur à partir d'une conduction ionique (migration des ions sous un champ

²⁸ L. Gao, G. Mazza. "Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls." *J. Food sci.* (1996) 61(3) 600-603.

²⁹ C. H. Chan, R. Yusoff, G. C. Ngoh, F. Wai-Lee Kung "Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants." *J. Chromatogr. A* (2011) 1218(37), 6213-6225.

électromagnétique) ou une rotation dipolaire (les molécules s'orientent vers la direction du champ), ce qui conduit à une libération des molécules actives.

Dans un travail de ZHANG et al.³⁰, une extraction assistée par micro-onde des feuilles fraîches d'Epimedium a présenté quelques phénomènes intéressants : **(Figure.2)**

- Des modifications structurelles (l'apparition des interstices dans les tissus).
- Une réduction de la taille des particules par rapport aux échantillons non traités.
- Une diminution du nombre de chloroplastes.

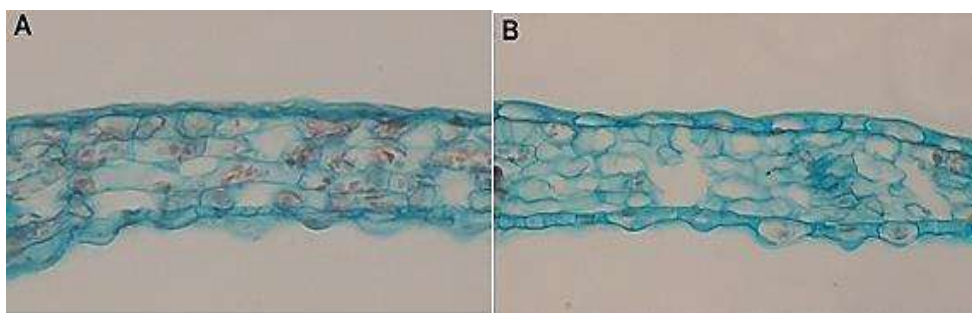


Fig.2 Micrographies optique des feuilles d'Epimedium
(A) avant et (B) après traitement par MAE³⁰.

L'extraction assistée par micro-onde exige des étapes supplémentaires tel que la centrifugation et / ou la filtration et le choix d'un solvant convenable³¹.

D'autres techniques d'extraction ont été développées à partir de la MAE telles que l'extraction assistée par micro-ondes sous vide (VMAE)³², l'extraction protégée par l'azote (NPMMAE)³³ et l'extraction ultrasonique assistée par micro-ondes (UMAE)³⁴.

4.1.2. Extraction assistée par ultrasons (UAE)

Les ultrasons sont des ondes acoustiques, de fréquence supérieure à 20 kHz, la répétition périodique de l'oscillation développe des cavités ou des bulles de vide dans le tissu

³⁰ H. F. Zhang, X. H. Yang, Y. Wang « Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. » *Trends Food Sci Tech* (2011) 22, 672-688.

³¹ Nguyen Di Khanh « Advances in the extraction of anthocyanin from vegetables. » *Food Nutr. Sci.* (2015) 3(1-2): 126-134.

³² V. Pasquet, J. R. Chérouvrier, F. Farhat, V. Thiéry, J. M. Piot, J.B. Bérard, R. Kaas, B. Serive, T. Patrice, J. P. Cadoret, L. Picot « Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. » *Process Biochem.* (2011) 46, 59-67.

³³ Y. Yu, B. Chen, Y. Chen, M. Xie, H. Duan, Y. Li, G. Duan « Nitrogen-protected microwave-assisted extraction of ascorbic acid from fruit and vegetables. » *J. Sep. Sci.* (2009) 32, 4227-4233.

³⁴ Y. Chen, X. Gu, S. Huang, J. Li, X. Wang, J. Tang, « Optimization of Ultrasonic/Microwave Assisted Extraction (UMAE) of Polysaccharides from *Inonotus Obliquus* and Evaluation of Its Anti-Tumor Activities. » *Int. J. Biol. Macromol.* (2010) 46 (4) 429-435.

végétal (pression minimal). Lorsque ces bulles atteignent un volume maximal, elles s'éclatent violemment (pression maximal). (Schéma.4)

Au cours de l'implosion, de très haute températures et haute pressions sont atteintes (5000 K et environ 2000 atm)³⁵.

Différents facteurs influent sur le seuil de cavitation, y compris le temps d'extraction, la quantité du solvant, la fréquence et l'impulsion appliquée.

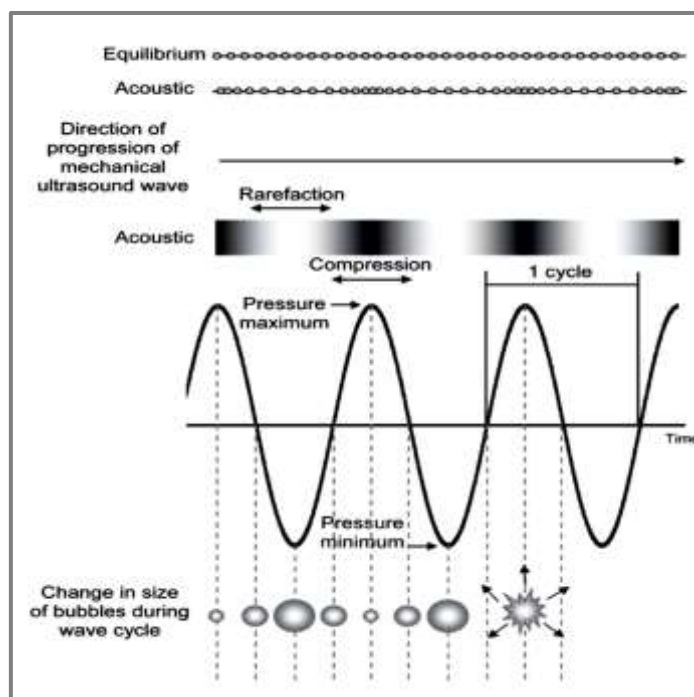


Schéma.4 Développement et effondrement des bulles de cavitation³⁵.

Selon HO et al, l'analyse par le microscope électronique à balayage de la surface d'une espèce médicinale nommée *Orthosiphon stamineus*, permet de visualiser des transformations cellulaires significatives. L'extraction assistée par ultrasons est capable de fragiliser le tissu végétal, ce qui provoque une rupture des parois cellulaires et facilite la pénétration du solvant³⁶. (Figure.3)

³⁵ (a) S. Seidi, Y. Yamini, "Analytical sonochemistry; developments, applications, and hyphenations of ultrasound in sample preparation and analytical techniques" *Cent. Eur. J. Chem.*(2012) 10(4) 938-976. (b) C.E. Banks, R.G. Compton, "Ultrasound: promoting electroanalysis in difficult real world media." *Analyst* (2004).129, 678. (c) A. C. Soria, M. Villamiel, "Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review." *Trends Food Sci Technol* (2010) 21, 323-331.

³⁶ S. K. Ho, C. P. Tan, Y. Y. Thoo, F. Abas, C. W. Ho, "Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidants in Misai Kucing (*Orthosiphonstamineus*)" *Molecules* (2014) 19(8), 12640-12659.

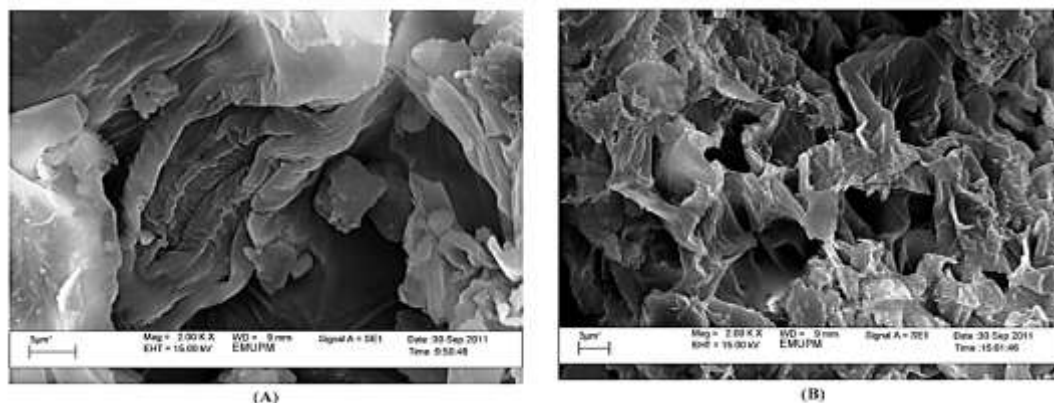


Fig.3 *Orthosiphon stamineus* au microscope électronique à balayage

(A) avant et (B) après traitement par sonication³⁶.

L'extraction assistée par ultrason peut être réalisée par deux modes de sonication : le bain et la sonde ultrasonique. (Schéma.5)

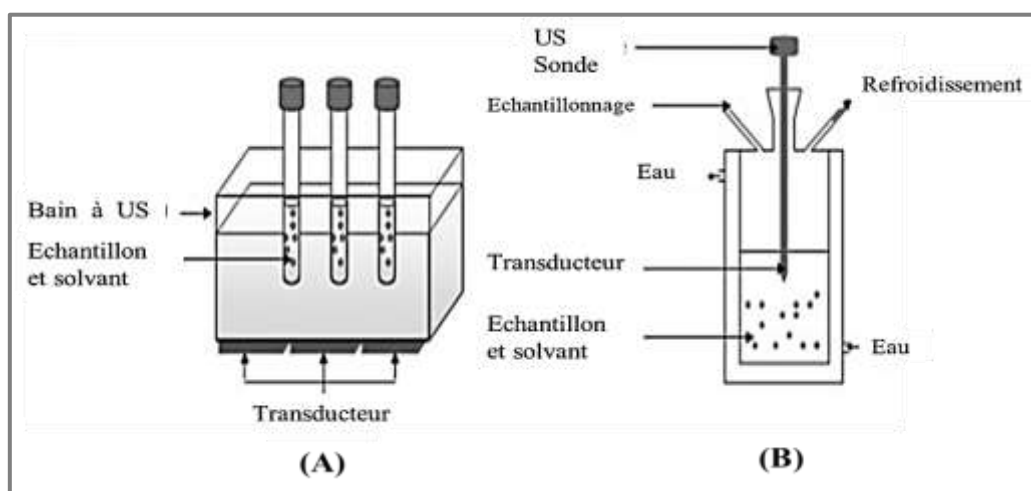


Schéma.5 A) bain à ultrasons et B) sonde ultrasonique³⁷.

5. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie en phase liquide à haute performance est une technique analytique séparative basée sur la répartition sélective des molécules d'un mélange entre une phase mobile liquide et une phase stationnaire solide (colonne chromatographique) sous forte pression. Le temps de rétention d'un échantillon varie selon ses propriétés intrinsèques et son affinité avec la phase stationnaire et la phase mobile.

³⁷ N. Rombaut, A. S. Tixier, A. Bily, F. Chemat, "Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery." *Biofuels, Bioprod. Bioref.* (2014) 8: 530–544.

Selon la nature de la phase stationnaire, on distingue plusieurs modes de séparation: la chromatographie d'exclusion (en fonction de la taille des composés), d'adsorption (composés polaires), par échange d'ions (composés ioniques) et de partage (composés non ionique et polaires)³⁸.

La technique HPLC rassemble quatre modules principaux : un système d'injection, une pompe, une colonne chromatographique et un détecteur:

- Le système d'injection : (boucle d'échantillonnage) permet d'avoir un volume constant d'échantillon.
- La pompe : permet la livraison de l'éluant à un débit constant sous deux modes : élution isocratique et gradient.
- La colonne chromatographique : en mode normale (NP) et inverse (RP). En chromatographie de phase inversée, la phase mobile est un solvant polaire (méthanol, eau, acétonitrile) alors que la phase stationnaire est apolaire.
- Le détecteur : se situe à la sortie de la colonne chromatographique couplée à un enregistreur. Il existe différents types de détecteurs : le détecteur UV-VIS, photodiode (PDA), électrochimique (ED), spectrométrie de masse (MS), indice de réfraction (RID), spectrométrie de masse par ionisation par électro-spray (ESI-MS) et détecteur de spectrométrie de masse par désorption / ionisation à laser assistée par matrice (MALDI-MS). (**Tableau.2**)

Tableau.2 Détecteurs pour HPLC³⁹.

Détecteur	Caractéristiques de l'Analyte	Sensibilité
UV/ Vis	UV- Chromophore	ng
Diode	UV- Chromophore	ng
Fluorescence	Fluorescence native ou marqueur fluorescent	fg-pg
Indice de réfraction	Polymères, sucres, acides organiques, triglycérides	0.1-10µg
Electrochimique	Electro-actifs	pg
Conductivité	Anion, cation, acide organique	ng
Radioactif	Radioactif	faible
Spectrométrie de masse	Universel	fg-pg-ng

³⁸ M. Haddou, « Dégradation de dérivés de l'acide benzoïque par les procédés d'oxydation avancée en phase homogène et hétérogène : procédés Fenton, photo-Fenton et photo-catalyse. » Thèse, Université de Toulouse (2010).

³⁹ S. Ahuja, M. Dong, "Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC." Volume 6, *Elsevier*, San Diego (2005).

5.1. Détecteur photodiode (PDA)

Le détecteur photodiode fonctionne comme un détecteur UV-vis à plusieurs longueurs d'ondes. Il est destiné pour les composés qui absorbent la lumière dans la région 190 et 800 nm⁴⁰. L'absorption est caractérisée par la loi de Beer Lambert, avec une sensibilité de l'ordre de 10⁻⁸ mol/L.

$$A = \log \left[\frac{I_0}{I} \right] = \epsilon \cdot l \cdot C$$

I_0 Intensité de la lumière incidente envoyée sur l'échantillon

I Intensité de la lumière transmise

ϵ Coefficient d'absorption molaire

l Longueur de la cuve

C Concentration molaire

Deux sources d'émission sont utilisées : la lampe de deutérium et celle de tungstène-halogène à travers la région ultraviolette (190 et 400 nm) et la région visible (400-750 nm), la lumière passe à travers la cellule et est séparée en plusieurs longueurs d'onde.

Un détecteur photodiode offre trois avantages pour les analyses par HPLC: la détection à plusieurs longueurs d'ondes, l'identification des pics et la détermination de la pureté.

5.2. Détecteur électrochimique (ED)

Le détecteur électrochimique mesure le changement du courant des espèces électro-actives oxydées ou réduites sur la surface d'une électrode à un potentiel choisi. Le carbone l'or, le platine, les amalgames du mercure sont souvent utilisées comme matériaux d'électrodes.

La chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à un détecteur électrochimique offre une excellente sensibilité et une grande sélectivité pour la détection des molécules à l'état de trace dans des matrices complexes⁴¹.

⁴⁰ K. Ramni, N. Kaur, A. Upadhyay, O. P. Suri, T. Arti, « High Performance Liquid Chromatography Detectors – A Review », *IRJP* (2011) 2(5) 1–7.

⁴¹ L. M.L. Nollet, F. Toldra, « Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods. » CRC Press, Boca Raton USA (2012).

Les polyphénols offrent une bonne réponse aux détecteurs électrochimiques. Cependant, ces molécules, ou leurs produits d'oxydation s'adsorbent à la surface de l'électrode et interfèrent dans les réactions, ce qui nécessite un nettoyage après chaque mesure⁴².

La sélectivité et la sensibilité du réseau électrochimique simplifient la préparation de l'échantillon et l'interprétation des données.

Le **Tableau.3** montre quelques techniques d'extraction et d'analyses ainsi que les produits retenus.

⁴² P. A. Kilmartin, « Forum Method Communication Electrochemical Detection of Natural Antioxidants: Principles and Protocols. » *Antioxid. Redox Signal* (2004) 3(6): 941-955.

Tableau.3 Techniques d'extraction et d'analyse des polyphénols.

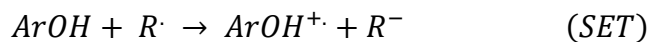
Matériel végétale	Partie utilisée	Techniques d'extraction	Techniques d'analyse	Quelques polyphénols détectés	Références
Prunus persica var. nucipersica	Mésocarpe et épicarpe	Homogenisation (Polytron) (eau/ méthanol 2:8 + 2 mM fluorure de sodium)	HPLC-DAD HPLC-ESIMS	Acide neochlorogénique Procyanidin b1 Catéchine Acide chlorogénique Epicatechine; Cyanidin 3-glucoside Cyanidin 3-rutinoside Quercetin 3-galactoside (tentative) Quercetin3-glucoside Quercetine pentosyl hexoside	<i>J. Agric. Food Chem.</i> , (2001) 49 (10) 4748- 4760.
Prunus domestica L	fruit	UAE (méthanol + 1% acide chlorhydrique + 1% hydroxytoluène butylé)	HPLC-DAD HPLC – RI/ MS/UV	Acideneochlorogénique Rutine Acide p-coumaroylquinique Acide chlorogénique	<i>Food Chem. (2008) 111,</i> 830–836.
Prunus domestica L.	Mésocarpe et épicarpe et graines	Macération (méthanol) Soxhlet (hexane)	HPLC–ESI-MS GC–MS	Acide cryptochlorogénique Rutine Acide 3,4-dihydroxybenzoic Acide chlorogénique Vanillin Acide neochlorogénique Aldehydedehydro-diconiferyl Aldehyde coniferyl Syring aldehyde Acide syringique Acide gallique	<i>Food Chem. (2012) 133,</i> 697–706.
Prunus salicina	Mésocarpe et épicarpe	Macération (méthanol)	HPLC-DAD	Acide Cafféique Acide Chlorogénique Cyanidin-3-glucoside	<i>Food Chem. (2014) 164,</i> 363–370.

				Cyanidin-3galactoside Quercetine	
Opuntia ficus-indica	épicarpe (Margarine)	Maceration (méthanol)	HPLC-DAD-ESI-MS	Acide Piscidique Acide Eucomique Feruloyl glucose Isorhamnetin-Glc-Rha-Rha	<i>Food Chem. (2015) 173, 382-390.</i>
Prunus cerasus L.	Fruit et jus	UAE (éthanol + acide chlorhydrique) Chaleur-reflux (éthanol)	HPLC-UV/VIS-PDA	Cyanidin-3-glucosylrutinoside Cyanidin-3-rutinoside Cyanidin-3-sophoroside Cyanidin-3-glucoside Acide hydroxycinnamique	<i>Food Technol. Biotechnol. (2015) 53(2):215-222.</i>
Prunus armeniaca L.	Mésocarpe et épicarpe	Macération agitation UAE Acétone / méthanol/ eau	HPLC-UV-ED	Acide p-aminobenzoïque Acide p-coumarique Acide Chlorogénique Acide Caféique Vanilline Acide Protocatechique Acide Ferulique Rutine Quercetine Quercitrine Resveratrol	<i>Molecules (2011) 16, 2914-2936.</i>
Prunus armeniaca L.	Mésocarpe et épicarpe	Macération (méthanol /eau 8:2 v/v)	HPLC-DAD HPLC-MS/MS	kaempferol 3-rhamnosoyl-hexoside Quercetine 3-rutinoside Quercetin 3-acetyl-hexoside Cyanidin 3-rutinoside Procyanidin Acide chlorogénique Acide neochlorogénique Acide hydroxycinnamique	<i>J. Agric. Food Chem., (2005) 53 (24) 9544-9552.</i>

Phoenix dactylifera	Mésocarpe et épicarpe	Macération (méthanol: eau (4:1))	LC-DAD-MS	Acide Ferulique, Acide coumarique Acide sinapique Acide Caffeique Acide Cinnamique Flavonol glycoside Flavone glycoside Xantoxylin Acide 5-ocaffeoylshikimique Acide Hydrocaffeique	<i>Food Chem. (2005) 89, 411-420.</i>
Punica granatum L.	jus	Pressage manuel	HPLC-DAD HPLC-MS UV	Delphinidin 3-diglucoside Delphinidin 3,5-diglucoside Cyanidin 3-glycoside Cyanidin 3,5-diglucoside Pelargonidin 3-glycoside Galloyl-glucose Punicalagin Acide ellagique Acide ellagique glucoside	<i>J. Agric. Food Chem., (2000) 48 (10) 4581-4589.</i>
Punica granatum L.	épicarpe	UAE (70% éthanol-eau)		Delphinidine Acide gallique Cyanidine Luteoline Pelagonidine Kaempferol Catéchine	<i>Food Chem. (2015) 174, 417-425.</i>

6. Evaluation de l'activité antioxydante totale

Les antioxydants naturels sont des molécules qui empêchent ou retardent les dommages cellulaires via un transfert mono-électronique (SET), un transfert d'atome hydrogène (HAT) :



Ou une chélation des métaux de transition⁴³ à un radical libre, ce qui conduit à un radical relativement stable et moins réactif. (Schéma.6)

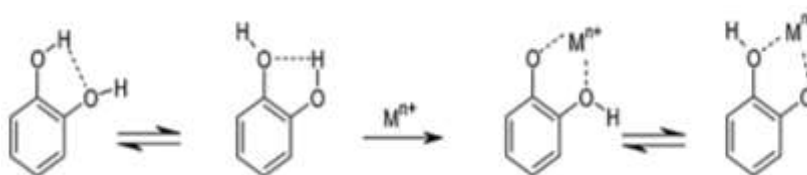


Schéma.6 Déprotonation des groupements OH en position 3' et 4' et complexation des flavonoïdes⁴³.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante telles que la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), la méthode FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma); les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) et la méthode du radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle).

Des recherches sur la relation structure-activité (SAR)⁴⁴ et leurs rapports quantitatifs (QSAR)⁴⁵ affirment que la configuration des substituants tel que le groupement hydroxyle en C-3 et le fragment 3', 4'-dihydroxy au niveau du cycle B influe sur l'activité antioxydante des flavonoïdes et leurs métabolites.

Par ailleurs, des facteurs comme la coplanarité du cycle B en présence de groupement méthyle ou o-glycosyle⁴⁴, le nombre de radicaux glycosides⁴⁶ et le degré de polymérisation⁴⁷ influent sur la délocalisation des électrons, ainsi que sur l'activité antioxydante.

⁴³ S. Memon, A. H. Laghari, A. A. Kandhro, F. N. Memon, A. Nelofar, « Purification of flavonoid metal complexes from Alhagi camelorum with calix[4]arene based impregnated resin” *Anal. Methods* (2014) 6, 6332-6336.

⁴⁴ K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya, « Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity Relationships” *J Nutr. Biochem.* (2002) 13, 572-584.

⁴⁵ B. F. Rasuleva, N. D. Abdullaev, V. N. Syrovand J. Leszczynski, « A Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Study of the Antioxidant Activity of Flavonoids.” *QSAR Comb Sci.* (2005) 24, 9, 1056 – 1065.

⁴⁶ G. W. Plumb, K. R. Price, G. Williamson “Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea” *Redox Rep.* (1999) 4(1-2):13-16.

⁴⁷ H-C. Zhou, NF-y. Tam, Y-M. Lin, Z-H Ding, W-M. Chai, S-D. Wei, “Relationships between Degree of Polymerization and Antioxidant Activities: A Study on Proanthocyanidins from the Leaves of a Medicinal Mangrove Plant *Cerriops tagal.*” *PLoS One* (2014) 9 (10) e107606.

D'autres facteurs influent sur l'activité antioxydante totale des extraits, notamment l'espèce botanique, le stade de maturité et le teneur en composés phénoliques et les conditions de stockage des extraits, la nature du solvant, le pH et la température du milieu⁴⁸.

6.1. Méthodes spectroscopiques (Teste du radical libre DPPH)

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature des antioxydants, il n'y a pas une méthode universelle pour évaluer l'activité antioxydante totale⁴⁹.

La méthode de piégeage du radical libre '2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl' (DPPH) est l'un des tests les plus utilisés pour évaluer la quantité optimale d'un antioxydant nécessaire pour neutraliser ce radical. Cette méthode a été initialement développée par Marsden Blois (1958). Ensuite, Brand-Williams (1995) a présenté la méthode d'évaluation de la capacité de piégeage radicalaire (la décoloration) par spectrophotométrie⁵⁰.

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl est considéré comme un radical libre stable dû à la délocalisation de ses électrons. Deux radicaux de DPPH ne forment pas un dimère (stable dans sa forme monomère).

L'ajout d'un antioxydant, à une solution de DPPH réduit ce dernier et sa couleur violette transforme en couleur jaune du 2,2-diphényl 1-picryl hydrazine. Cette activité est déterminée par une diminution de l'absorbance mesurable à une longueur d'onde d'environ 516 nm. **(Figure.4)**

La concentration efficace (EC₅₀) est définie comme la concentration en antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de la concentration initiale du radical⁵¹.

⁴⁸ L. G. D'Alessandro, « Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'Aronia melanocarpa et ses coproduits. » Thèse, Université Lille 1 (2013).

⁴⁹ R. Salazar, M. E. Pozos, P. Cordero, J. Perez, M. C. Salinas, N. Waksman, « Determination of the Antioxidant Activity of Plants from Northeast Mexico. » *Pharm Biol* (2008) 46:3, 166-170.

⁵⁰ W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity" *LWT - Food sci. technol.* (1995) 28 (1) 25-30

⁵¹ Y. Lu, L. Y. Foo "Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace." *Food Chem.* (2000) 68:81-85.

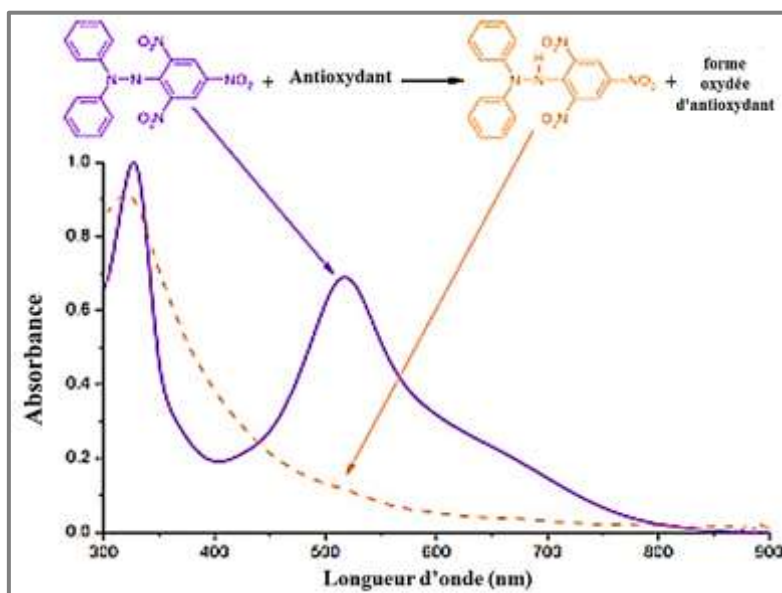


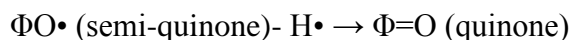
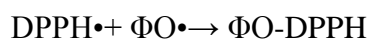
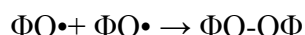
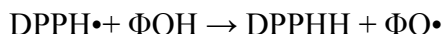
Fig.4 L'effet de l'activité antioxydante sur l'absorbance du radical libre DPPH⁵².

Ces résultats peuvent être également exprimés en pouvoir anti-radicalaire (ARP) calculés comme $1/EC_{50}$ et en terme d'efficacité anti-radicalaire (AE) :

$$AE = 1/(EC_{50} \times T_{EC_{50}})$$

$T_{EC_{50}}$ Temps nécessaire pour atteindre l'état stationnaire⁵³.

Le mécanisme principal de piégeage des radicaux libres en présence des flavonoïdes est le transfert d'atome d'hydrogène, dont plusieurs voies réactionnelles sont possibles⁵⁴ :



6.2. Méthodes électrochimiques

Les techniques électroanalytiques possèdent des avantages considérables à savoir la simplicité, la rapidité et la faible limite de détection via des électrodes appropriées (or, platine, carbone, diamant et mercure).

⁵² A. Wollinger, É. Perrin, J. Chahboun, V. Jeannot, D. Touraud, W.Kunz, "Antioxidant activity of hydro distillation water residues from Rosmarinus officinalis L. leaves determined by DPPH assays." *C. R. Chim.* (2016) 19 (6) 754-765.

⁵³ E. Bendary, R.R. Francis, H.M.G. Ali, M.I. Sarwat, S. El Hady, "Antioxidant and structure-activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds." *AOAS* (2013) 58 (2) 173-181.

⁵⁴ a) P. Molyneux, "The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity." *Songklanakarin J. Sci. Technol.* (2004) 26 (2), 211-219. b) C. Sanchez-Moreno, A. Larrauri Jose, F. Saura-Calixto, "A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols." *J. Sci. Food & Agric.* (1998) 76(2), 270-276.

Parmi les méthodes électrochimiques utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des produits pharmaceutiques et des extraits naturels, on cite : la coulométrie, la voltammétrie (CV, DPV), les détecteurs électrochimiques couplés avec des systèmes chromatographiques et l'analyses par injection en flux continu (FIA).

Ces méthodes offrent la possibilité de caractériser et d'évaluer l'activité antioxydante totale des espèces électro-actives dans des extraits naturels. A cet effet, les approches électrochimiques offrent une meilleure compréhension de la relation structure-activité antioxydante⁵⁵ et présentent une bonne corrélation avec les méthodes spectrométriques.

Le comportement électrochimique des flavonoïdes est lié, principalement, par leurs caractéristiques structurales, qui varient en fonction de la nature, du nombre et de la position des substituants.

Leur mécanisme d'action en tant qu'antioxydants implique la capacité des phénols à piéger les radicaux libres par un atome d'hydrogène ou un processus de transfert d'électrons. Le phénol est converti en un radical phénoxy qui ne conduit pas à la formation d'un autre radical libre du fait de la stabilisation par délocalisation des électrons.

Une étude sur les propriétés de transfert d'électrons du phénol par voltampérométrie impulsionnelle sur une électrode de carbone vitreux (GCE) a présenté :

- Au premier balayage : un seul pic d'oxydation impliquant le transfert d'un seul électron et un proton (dépendante du pH) correspondant au développement d'un radical phénoxy stable.
- Au deuxième balayage (sans nettoyage de l'électrode) : deux pics anodiques impliquant le transfert de deux électrons et deux protons (dépendant du pH) correspondent à l'oxydation des produits d'oxydation du phénol (ortho et para) et conduit à la formation d'ortho quinone et para-quinone. La réduction de ces derniers conduit à la formation du catéchol et hydroquinone via un transfert de deux électrons et deux protons (mécanisme électrochimique-chimique EC)⁵⁶. (**Schéma.7**)

⁵⁵ E. S. Gil, R. O. Couto "Flavonoid Electrochemistry: A Review on the Electroanalytical Applications." *Rev. Bras. Farmacogn.* (2013) 23(3): 542-558.

⁵⁶ T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett "Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways." *J. Electroanal. Chem.* (2011) 655, 9-16.

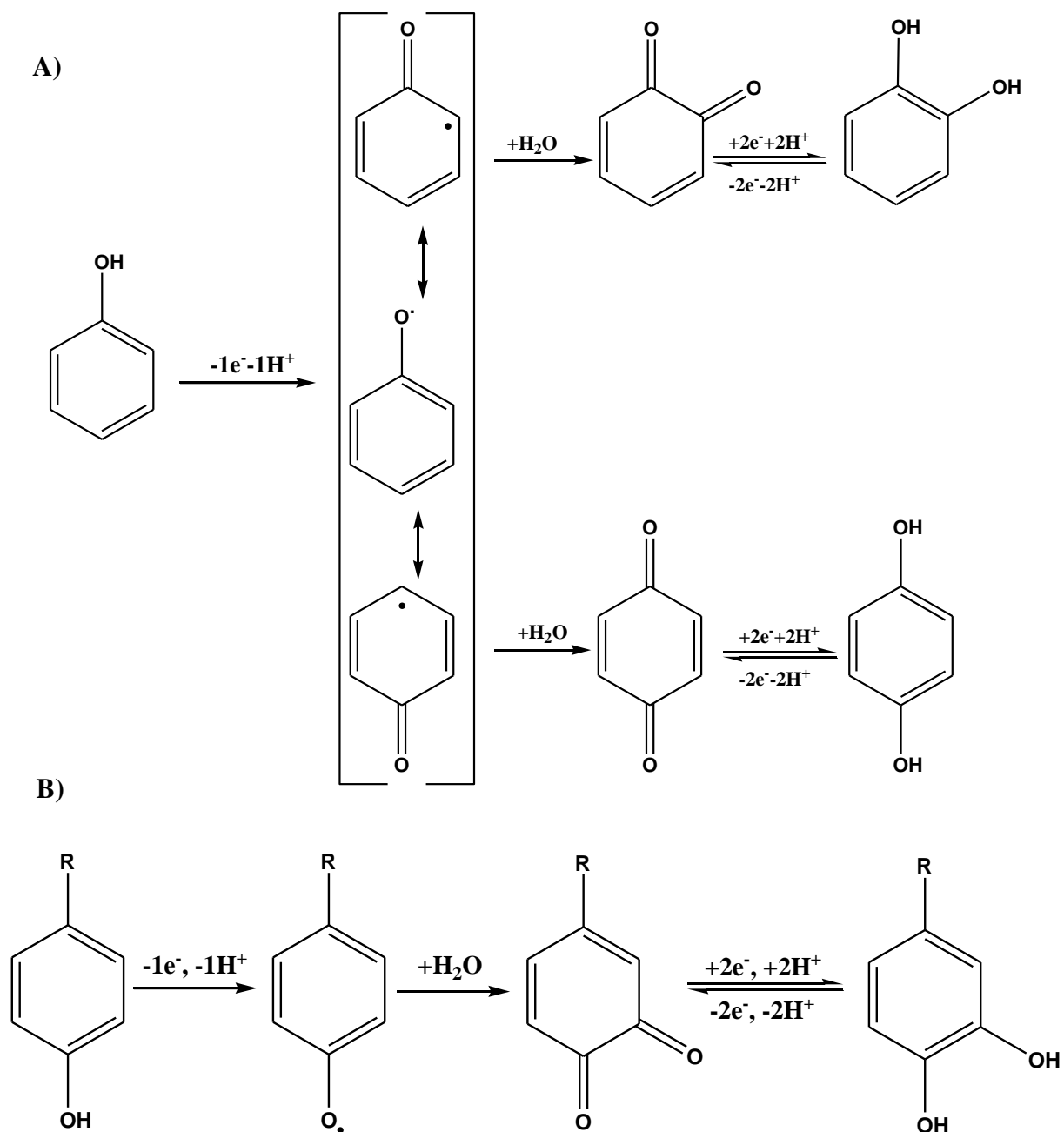


Schéma.7 Mécanisme d'oxydation du A) phénol et B) phénol para-substitué⁵⁶.

Le **Tableau.4** regroupe quelques analyses électrochimiques des flavonoïdes sur des électrodes de carbone.

Tableau.4 Potentiels de pics anodiques de quelques flavonoïdes⁵⁵.

Composé	E _p a1 (V)	E _p a2 (V)	pH	Cycle concerné*		Référence
				A	B	
Quercetine	0.33	1.03	4.0	R	C	<i>Electroanal.</i> (2003)15: 1745-1750.
Rutine	0.40	1.06	4.0	P	C	<i>Electroanal.</i> (2003)15: 1745-1750.
Fisetine	0.39	1.00	4.0	P	C	<i>J. Phy. Chem. A</i> (2009) 113: 14170-14179.
Myricetine	0.30	nd	3.6	R	G	<i>J. Electrochem.</i> (2007) 13: 29-34.
Morine	0.44	0.98	4.0	R	R	<i>Electroanal.</i> (2005) 17: 733-738.
Kampferol	0.45	nd	3.6	R	P	<i>Anal. Chim. Acta</i> (1996) 320: 255-261.
Catéchine	0.33	0.74	4.0	R	C	<i>Croat. Chem. Acta</i> (2010) 83: 197-207.
Epicatchine	0.33	0.74	4.0	R	C	<i>J. Agr. Food Chem.</i> (2011) 59: 10277-10285.
Cyanine	0.42	0.91	4.0	P	C	<i>Electroanal.</i> (2007) 19:1779-1786.
Malvine	0.49	0.91	4.0	P	P	<i>Electroanal.</i> (2007) 19:1779-1786.
Luteoline	0.40	1.05	4.0	R	C	<i>Chem. Pharm. Bull</i> (Tokyo). 2008, 56(6):745-8.
Chrisine	-	1.05	4.0	R	-	<i>Electroanal.</i> (2005)17: 1059-1064.
Myrtillin	0.36	0.85	4.0	R	G	<i>Electroanal.</i> (2007) 19:1779-1786.

*Groupes électroactive: Gallique (G), Catéchol (C), Résorcinol (R), Phénol (P) Non déterminé (nd).

PARTIE II

Chapitre 1.1

TECHNIQUES ELECTROCHIMIQUES

1. Polarographie classique

La polarographie à balayage linéaire est la plus ancienne techniques électro-analytiques, sa découverte été en 1922 par le scientifique tchèque Jaroslav Heyrovský, elle a été un des techniques utilisées pour l'analyse des métaux, des espèces chimiques organiques et inorganiques.

Elle est basée sur l'enregistrement des courbes courant-potentiel appliqué $i=f(E)$ des espèces électroactives d'une concentration allant de 10^{-3} à 10^{-4} M à la surface d'une goutte de mercure tombante¹.

Les oscillations observées sur le polarogramme sont liées à la variation périodique de la surface des gouttes de mercure, le courant augmente progressivement lorsque la goutte croit et tombe à zéro lorsqu'elle chute (**Figure.1**). Cette vague permet de déterminer le potentiel de demi-vague ($E_{1/2}$) et le courant limite de diffusion (i_l).

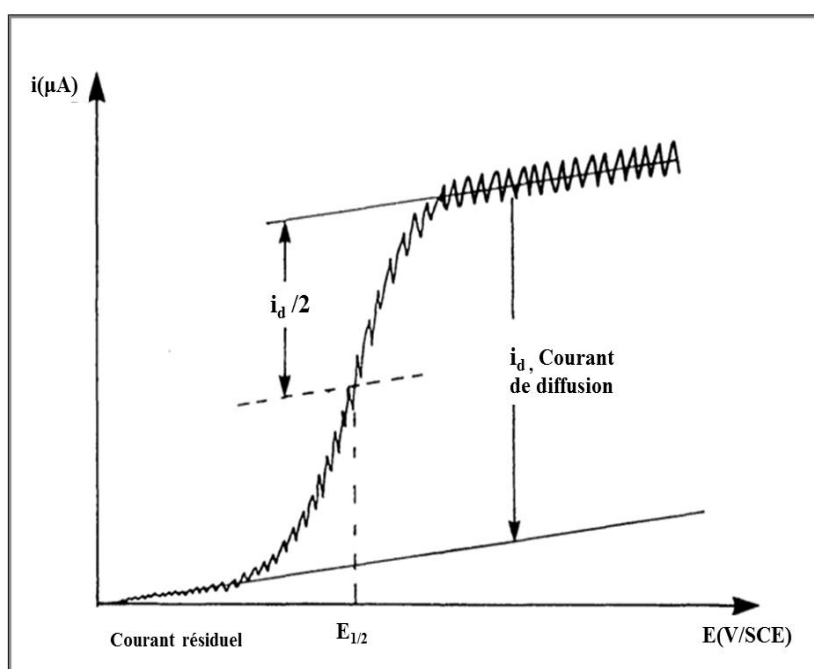


Fig.1. Modèle d'un Polarogramme

Le courant limite de diffusion est égal à la différence entre le courant limite et le courant résiduel. Il est directement proportionnel à la concentration de l'analyte et la vitesse de croissance de l'électrode sphérique, ce courant est présenté par l'équation d'Ilkovic:²

¹ G. H. Jeffery, J. Bassett, J. Mendham, R. C. Denney, "Vogel's text book of quantitative Chemical Analysis." 5th Ed., John Wiley & Sons. INC., New York (1989).

² D. A. Skoog, D. M. West, « Chimie analytique » 3^{ème} ed. De Boeck Supérieur, (2015).

$$(i_d)_{max} = 708. n. D^{1/2}. C. m^{2/3}. t^{1/6}$$

i_d	Courant maximal de diffusion à l'électrode à goutte tombante (μA)
n	Nombre d'électrons échangés
D	Coefficient de diffusion de l'espèce (cm^2s^{-1})
m	Débit du mercure dans le capillaire (mg/sec)
t	Durée de vie de la goutte (sec)
C	Concentration de l'analyte (mM)

Le tableau.1 présente les valeurs de potentiels de réduction de quelque fonction redox sur une électrode à goutte de mercure.

Tableau.1. Les potentiels de demi vague de quelques groupes fonctionnels sur une DME à pH=7³.

Groupe fonctionnel	Fonction	$E_{1/2}$ (V/SCE)
Azo	-N=N-	-0.4
Carbon-carbone double liaison	-C=C-	-2.3
Carbonyle	C=O	-2.2
Disulfide	S-S	-0.3
Nitro	NO ₂	-0.9
Halogéne	C-X (X=Br, Cl, I)	-1.5

2. Voltammétrie Cyclique (CV)

La voltammétrie cyclique est une technique qui exploite des données sur le comportement redox des espèces électroactives en solution, la cinétique et la réversibilité des réactions.

Cette technique consiste à balayer linéairement le potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence $E(t)$ entre deux potentiels choisis: un potentiel final E_f et un potentiel initial E_i . Lorsque le potentiel final est atteint (balayage aller), le sens de balayage est inversé jusqu'à la valeur de départ (balayage retour)⁴. (**Figure.2**)

$$E(t) = E_i + vt$$

$$E(t) = E_f - vt$$

³ J. Wang « Analytical Electrochemistry » 3rd edition John Wiley & Sons, New Jersey (2006).

⁴ H. H. Girault « Electrochimie physique et analytique » 2^{ème} édition Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne (2007).

Pour un système réversible, la vitesse de transport de charge est plus rapide que la vitesse de transport des espèces vers la surface de l'électrode, la réponse se présente sous forme de deux pics, le produit formé dans l'oxydation (ou la réduction) initiale (balayage aller) va être réduit ou oxydé respectivement (balayage retour),

Pour un système réversible, l'équation (de réduction) consiste à définir le courant du pic en fonction de la concentration de l'espèce (O) et la vitesse de balayage⁵:

$$i_{p,c} = -2.69 \times 10^5 n^3 A D_0^{\frac{1}{2}} [O] v^{\frac{1}{2}}$$

$$E_{p,c} = E_{\frac{1}{2}}^r - 0.0285/nV$$

$$|E_{p,c} - E_{\frac{1}{2},c}| = 2.2 \frac{RT}{nF} = \frac{56.6}{n} mV \text{ à } 298K$$

A Surface de l'électrode (cm²)

D Coefficient de diffusion (cm². s⁻¹)

n Nombres d'électrons échangés

v Vitesse de balayage (Vs⁻¹)

Pour un système irréversible, le transfert de charge est plus faible que le transfert de la matière. Le courant est proportionnel à la concentration et la vitesse de balayage :

$$i_{p,c} = -2.99 \times 10^5 n (\alpha_c n')^{\frac{1}{2}} A [O]_{\infty} D_0^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}}$$

α Coefficient de transfert de charge.

Pour un système quasi-réversible, le courant est contrôlé par le transfert de charge et le transport de masse³.

⁵ C. Brett, A. M. Oliveira Brett "Electroanalysis" The Bath Press Ltd UK (1998).

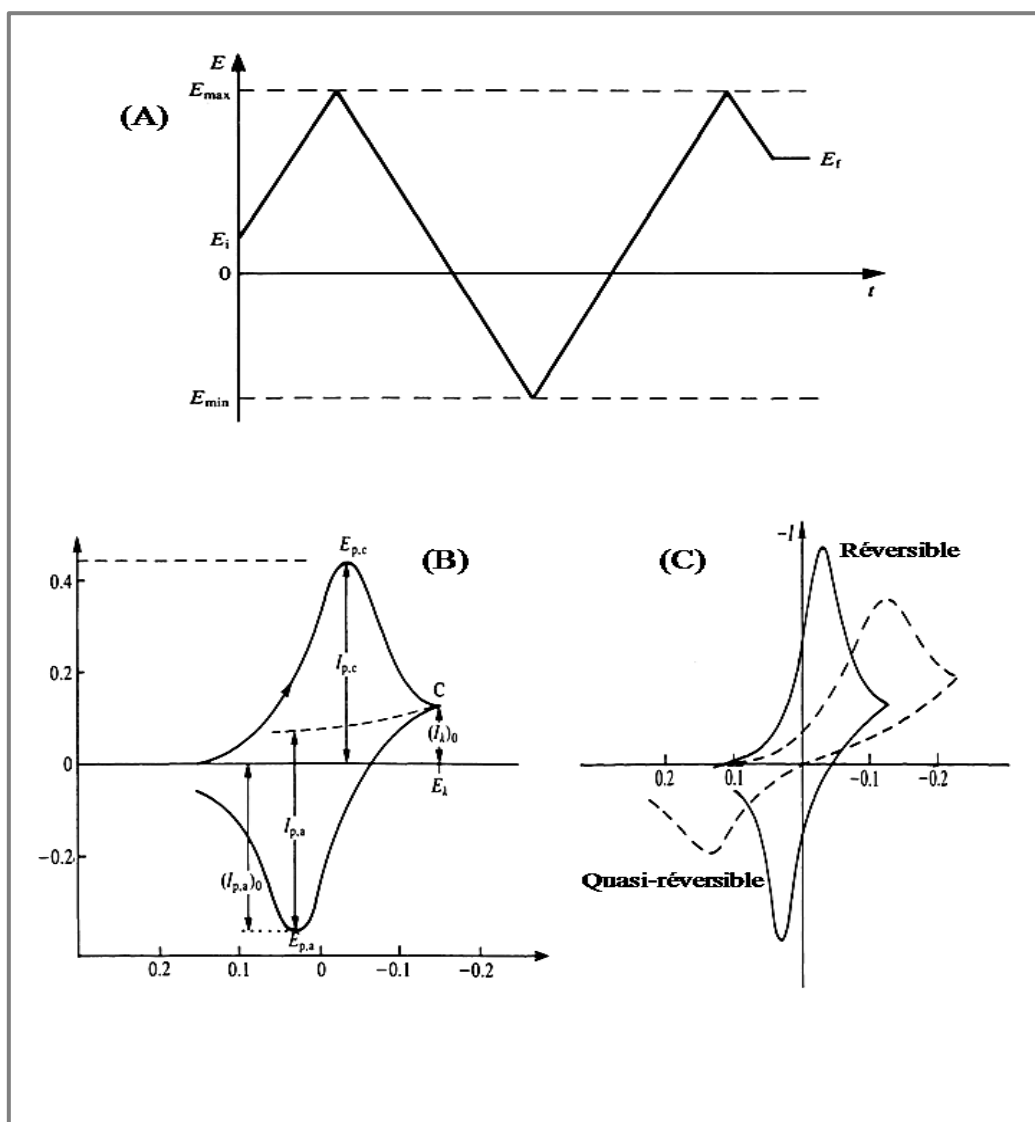


Fig.2. (A) Allure de la variation triangulaire $E=f(t)$
 (B) allure d'un voltammogramme cyclique
 (C) système réversible et quasi-réversible⁵.

3. Voltammétrie à Signaux Carres de Potentiel (SWV)

La voltammétrie à signaux carrés est une technique impulsionnelle appliquée sur des électrodes à goutte de mercure et des électrodes solides⁶. Le courant dans un voltammogramme carré est mesuré deux fois, une première fois à la fin de l'impulsion dans le sens direct (i_1) et une deuxième fois à la fin de l'impulsion dans le sens inverse (i_2).
(Figure.3)

⁶ J. O'Dea, M. Wojciechowski, J. Osteryoung, K. Aoki "Square Wave Voltammetry at Electrodes Having a Small Dimension" *Anal. Chem* (1985) 57 (4) 954-955.

La voltammétrie à signaux carrés se caractérise par une vitesse de balayage élevée et une limite de détection de l'ordre de 10^{-8} M^3 , ce qui offre une faible consommation du produit à analyser et un facteur d'adsorption négligeable.

Le courant du pic (δi_p) varie linéairement avec la concentration des espèces électroactive et avec la racine carrée de la fréquence du signal imposé (f)⁷:

$$\delta i_p = nFAC_0 \frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \sqrt{\frac{D_f}{\pi}} \quad \text{avec} \quad \sigma = \exp\left(\frac{nF \Delta E}{RT}\right)$$

δi_p	Courant différentiel (A)
c	Concentration du produit (mole m^{-3})
D	Coefficient de diffusion (m^2s^{-1})
ΔE	Amplitude du signal carré (V) (50mV)
n	Nombre d'électrons échangés
f	Fréquence du signal imposé(Hz)
F	Constante de Faraday, 96500 ($\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$)
R	Constante des gaz parfaits, ($\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)
T	Température absolue (K)
σ	Densité de la charge surfacique (C m^{-2})

⁷ P. Chamelot, B. Lafage, P. Taxil, « Using square-wave voltammetry to monitor molten alkaline fluoride baths for electrodeposition of niobium. », *Electroch. Acta* (1997) 43 (5–6) 607–616.

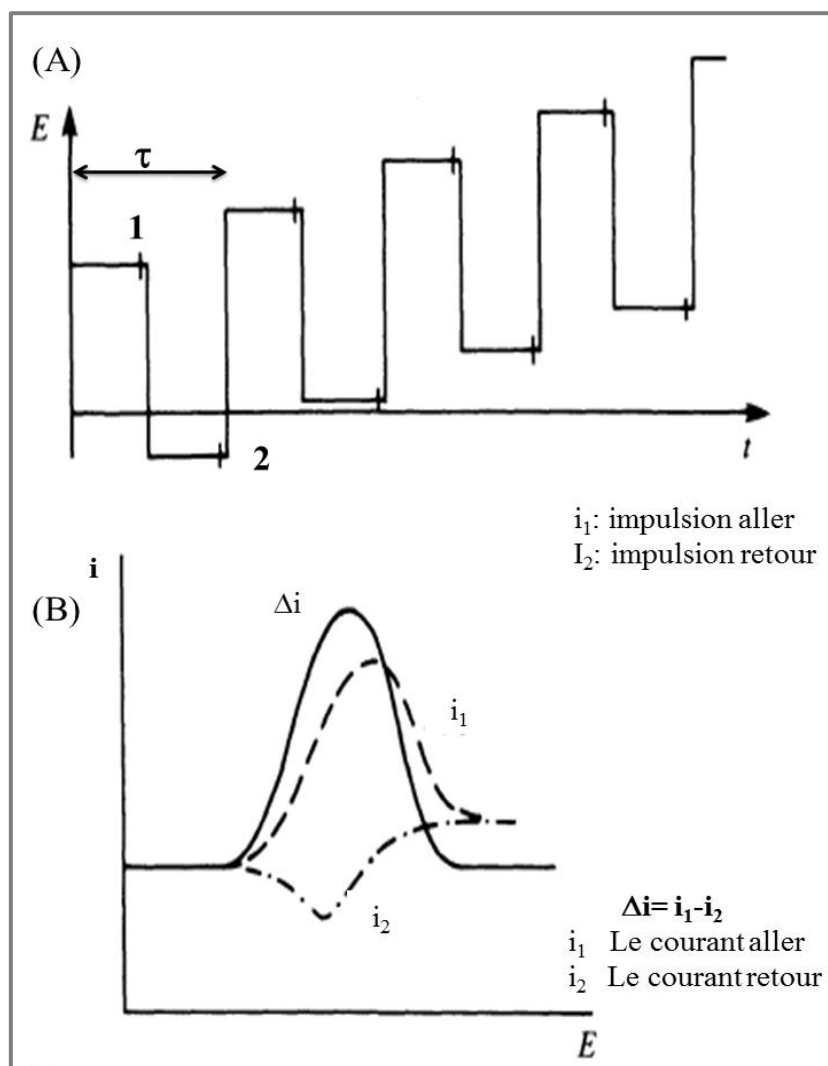


Fig.3. (A) Allure de la tension imposée en fonction du temps. (B) voltammogramme d'une impulsion «ondes carrées»⁵.

4. Voltamétrie Impulsionnelle Différentielle (DPV)

En voltammétrie impulsionnelle différentielle, on surimpose périodiquement des impulsions rectangulaires d'amplitude. Le courant est mesuré deux fois, avant et à la fin de l'impulsion ce qui permet d'éliminer le courant capacitive⁸. Cette technique offre une limite de détection est de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8} M². (Figure.4)

Pour un système réversible, la hauteur du pic (Δi_p) d'un voltammogramme est définie comme⁸:

⁸ F. Scholz, «Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications.» 2nd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York (2010).

$$\Delta i_p = \frac{nFAD_{Ox}^{1/2}C_{Ox}^*}{\pi^{1/2}t_p^{1/2}} \left(\frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \right)$$

Où : $\sigma = \exp\left(\frac{nF}{RT} \frac{\Delta E}{2}\right)$.

En conséquence de la double mesure du courant, le potentiel du pic suit la formule⁸ :

$$E_p = E_c^\theta + \frac{RT}{nF} \ln(D_{Red}|D_{Ox})^{1/2} - \frac{\Delta E_p}{2}$$

La largeur du pic à mi-hauteur ($W_{1/2}$) du voltammogramme en DPV permet de définir le nombre d'électrons dans un mécanisme réactionnel mis en jeu:

$$W_{\frac{1}{2}} = 3.52RT/nF$$

A 25°C, et n=1, 2 et 3, la valeur de $W_{1/2}$ est de 90.4, 45.2 et 30.1 mV, respectivement⁸.

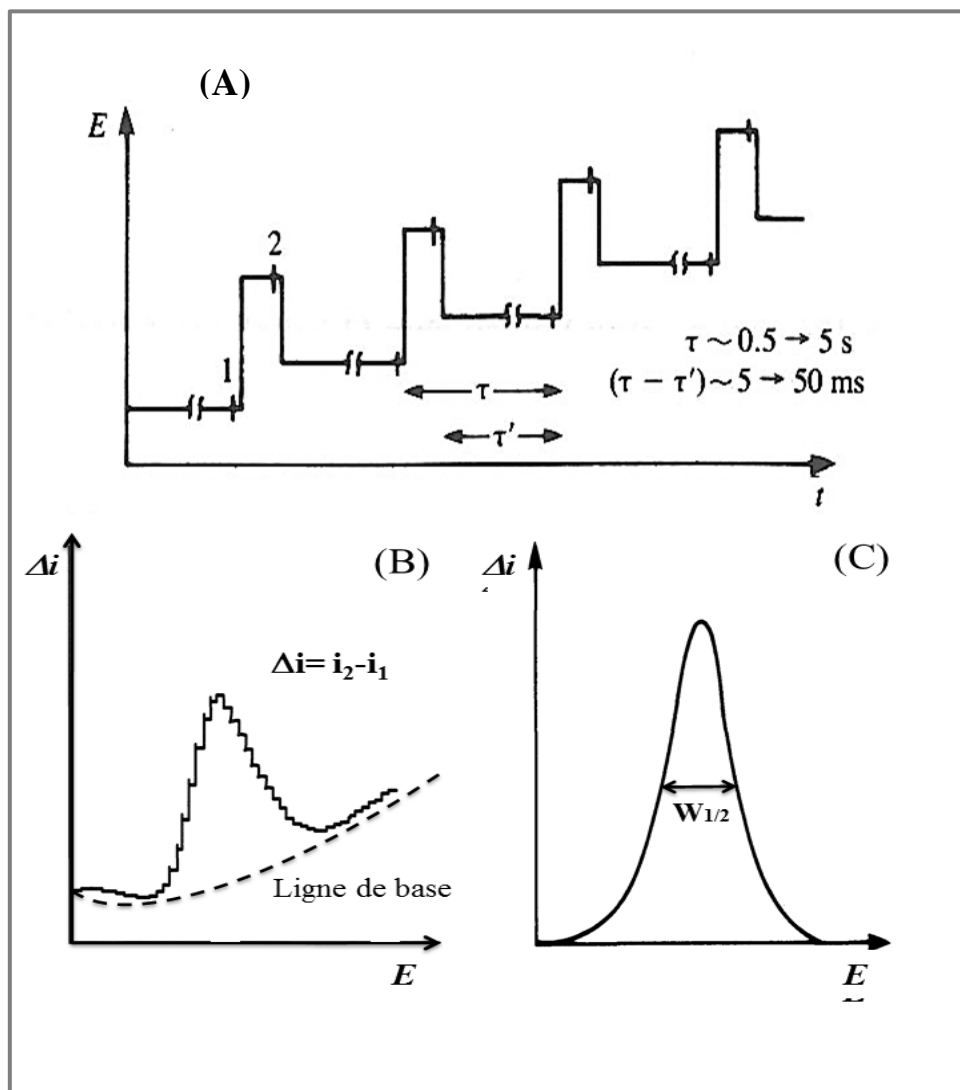


Fig.4. (A) Allure de la tension imposée en fonction du temps⁵, (B) Voltampéromme différentiel impulsionnelle avant intégration (C) après intégration.

5. Chronoampérométrie

La chronoampérométrie est une méthode basée sur le suivi de l'évolution du courant en fonction du temps à un potentiel constant. On commence avec un potentiel prédéfini E_1 et au bout de quelques minutes le courant faradique (i_f) augmente progressivement, correspond à la réponse de l'espèce à analyser.

6. Electrolyse et Coulométrie:

Les méthodes de polarographie et voltampérométrie permettent de déterminer les conditions convenables d'obtention d'un produit d'oxydation ou de réduction d'une substance électroactive. L'électrolyse consiste à manipuler sur des quantités du réactif assez importantes. Au cours de l'électrolyse, Le potentiel imposé est fixé à une valeur choisie à partir des analyses voltammétriques et le courant diminue à cause de la disparition total du produit de départ⁹. La géométrie de la cellule électroanalytique, le type des électrodes, la distribution du potentiel et le transport de la masse, ont été discutées dans plusieurs travaux¹⁰. La coulométrie permet de contrôler le processus d'électrolyse grâce à l'acquisition de la quantité de l'électricité consommée.

La quantité du produit formé ou consommé dans une réaction électrochimique est proportionnelle à la quantité d'électricité Q qui traverse la cellule, et est donnée par¹¹:

$$m = \frac{MQ}{96487n}$$

M Masse moléculaire de la substance formée ou consommée

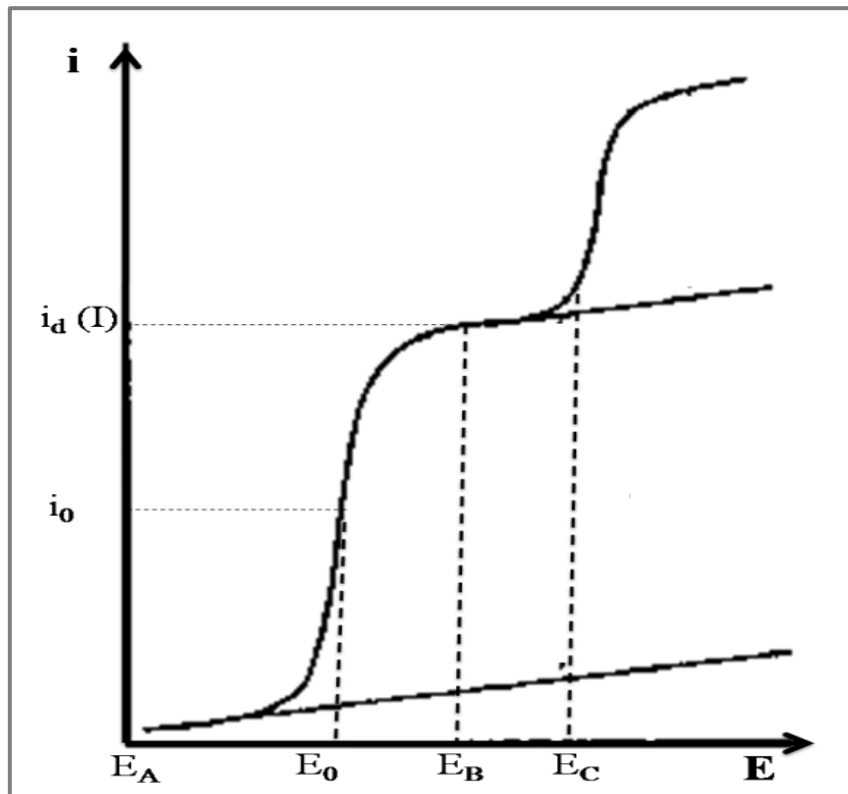
n Nombre des électrons échangés

La **Figure.5** présente un polarogramme $i=f(E)$ d'une espèce ayant deux groupes réductibles à potentiels différents.

⁹ H. Lund, «Organic Electrochemistry » 3 ed, édité par Marcel Dekke. M. .M., New York, 162, (1963).

¹⁰ R. J. Marshall, F. C. Walsh «A review of some recent electrolytic cell designs. » *Surface Technology* (1985) 24, 45-77.

¹¹ J. Mendham, « Analyse chimique quantitative de Vogel. » De Boeck Supérieur (2005).

Fig.5 Polarogramme de l'électrolyse $i=f(E)$

i_0	Courant appliqué
E_0	Potentiel correspond au courant appliqué i_0
$0-E_A$	Aucun transfert d'électrons (courant nulle)
$E > E_A$	Transfert des électrons possible
$E_A \leq E \leq E_B$	Courant passe en fonction du potentiel
$E = E_B$	Toutes les espèces sur la surface de l'électrode ou à proximité sont réduites
$E_B \leq E \leq E_C$	Courant est limité par le transport des espèces réductibles à l'électrode (courant limite i_d)
$E = E_C$	Deuxième réduction

Le rendement ρ (%) d'une électrolyse est défini à partir de la quantité d'électricité consommée lors de l'électrolyse comme suit:

$$\rho(\%) = \frac{Q_{exp}}{Q_{th}} * 100$$

Q_{exp} Quantité d'électricité consommée pendant l'électrolyse

Q_{th} Quantité d'électricité théorique correspond à la formation du produit final.

7. Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (EIS)

La spectroscopie d'impédance électrochimique consiste à suivre la réponse d'un système électrochimique soumis à des perturbations sinusoïdales (E ou i) de faible amplitude; ce qui offre des informations sur les propriétés physico-chimiques du système à l'interface métal/solution. La réponse d'une tension alternative (sinusoïdale) de faible amplitude sera un courant alternatif déphasé d'un angle φ : (**Figure.6**)

$$E(t) = E \sin(\omega t)$$

$$i(t) = i \sin(\omega t + \varphi)$$

ω Pulsation ($\omega = 2\pi f$)

f Fréquence de la perturbation (Hz)

φ Déphasage

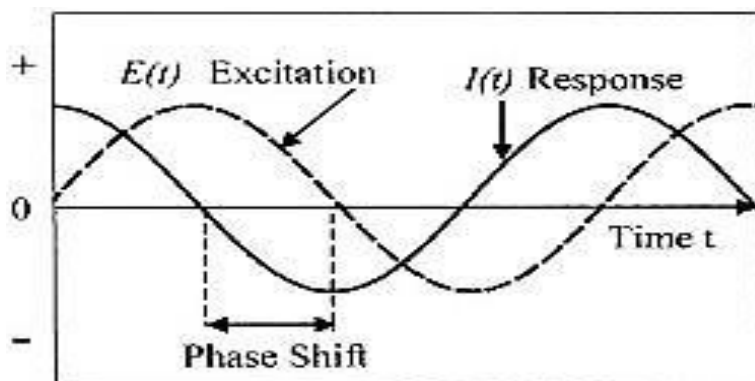


Fig.6 La réponse d'une excitation par une tension sinusoïdale¹².

L'impédance électrochimique $Z(\omega)$ d'un système peut être défini par un nombre complexe: une partie réelle Z_r et une partie imaginaire Z_j :

$$Z(\omega) = Z_r(\omega) + j Z_j(\omega)$$

¹² N. Perez, "Electrochemistry and Corrosion Science." Springer Science & Business Media, (2004).

Avec

$$j = \sqrt{-1}$$

$|Z(\omega)|$ Module de l'impédance

La corrélation entre l'impédance et le circuit électrique équivalent facilitera l'interprétation des mesures d'impédance. La représentation des données d'impédance électrochimique peut être présentée selon deux types de diagrammes : Les diagrammes de Bode et de Nyquist, ce dernier est représenté par l'opposé de la partie imaginaire de l'impédance en fonction de la partie réelle. (Figure.7)

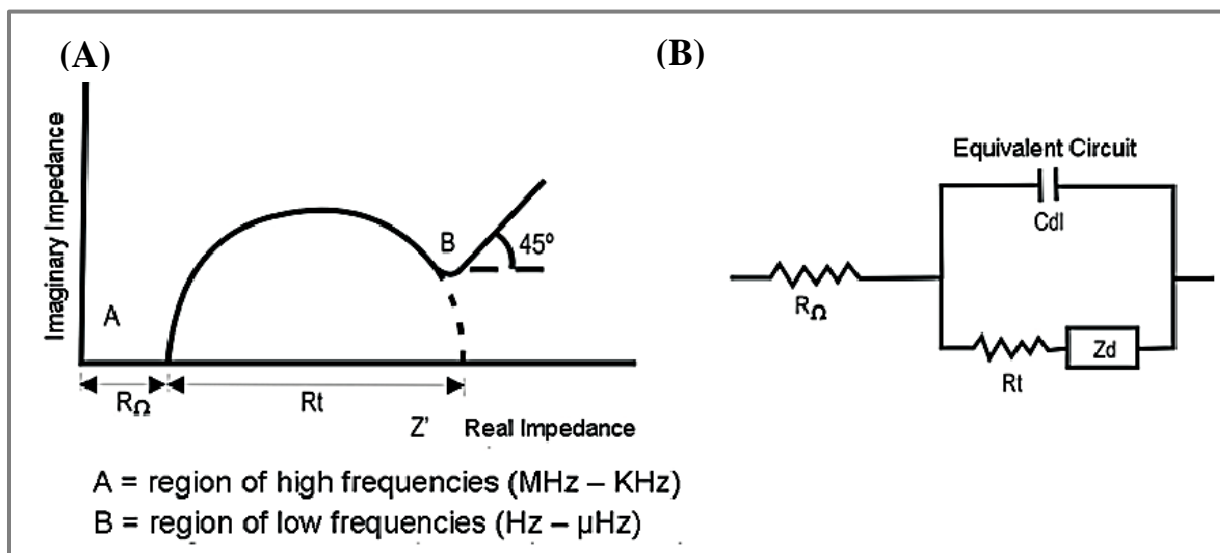


Fig. 7 (A) Représentation du diagram de Nyquist

(B) Circuit électrique équivalent de Randles¹³.

- R_t Résistance de transfert de charge électronique
- Z_d Impédance de diffusion
- C_{dl} Capacitance de double couche

¹³ (a) D.V. Ribeiro, C.A.C. Souza, J.C.C. Abrantes, « Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. » *Rev. IBRACON Estrut. Mater.* (2015) 8 (4) 529-546. (b) K.R.R. Freire, « Avaliação Do desempenho de inibidores de corrosão em armaduras de concreto. », Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná Curitiba (2005).

8. Electrode de travail

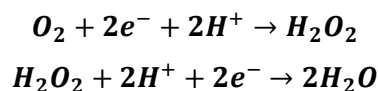
L'électrode de travail est l'endroit où la réaction se déroule, dont le potentiel est mesuré par rapport à une électrode de référence.

a. Electrode à goutte de mercure tombante (DME)

L'électrode à goutte de mercure tombante est une électrode liquide renouvelable et contrôlée, elle est constituée d'un tube capillaire d'environ 10 cm de longueur et un diamètre intérieur d'environ 0.05 mm, reliée à un réservoir de mercure via une colonne d'environ 50 cm. Le diamètre de la goutte est compris entre 0.3 et 1 mm.² (Schéma.1)

Le domaine d'électro-activité de l'électrode à goutte de mercure est limité vers le côté anodique, il est facilement oxydable en cation mercurieux Hg_2^{2+} (+0,25V / SCE), par contre au côté cathodique, DME est utilisable jusqu'à -1,8 V/ SCE.

La solubilité de l'oxygène dans l'eau est d'environ $2.5 \cdot 10^{-4}$ moleL⁻¹ à une température ambiante. L'électro-réduction de l'oxygène présente deux vagues polarographique successives à l'électrode de mercure, correspondant à la réduction en H_2O_2 et en H_2O , ce qui peut couvrir la réduction des espèces à analyser¹¹ :



Le travail par une électrode de mercure nécessite alors l'élimination de l'oxygène dissous en faisant barboter de l'azote ou de l'hydrogène dans la solution.

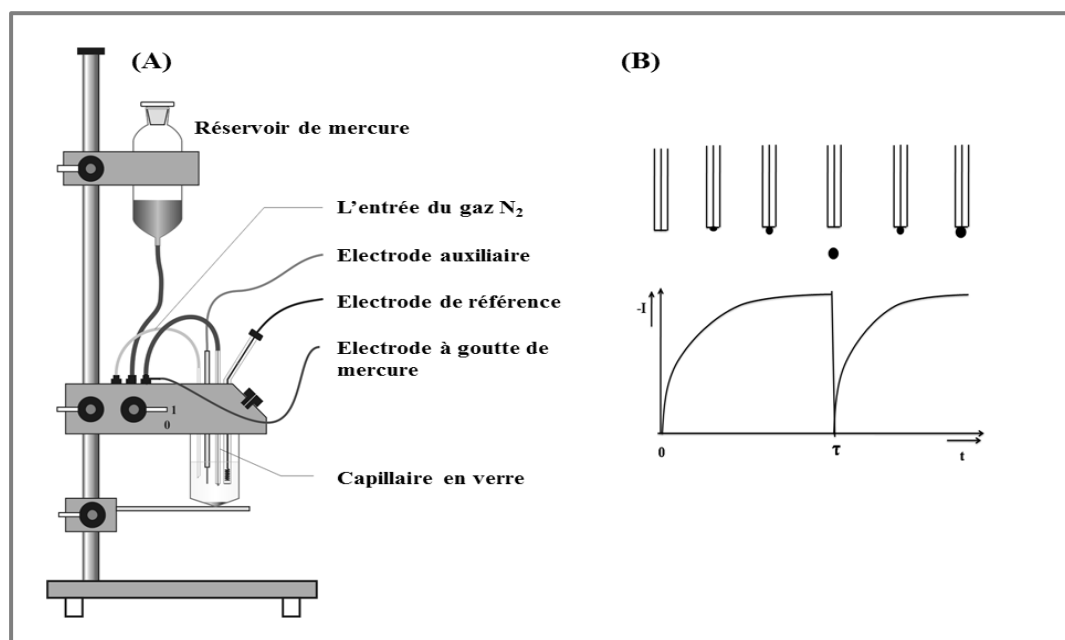


Schéma.1 (A) Montage d'une électrode à goutte de mercure tombante¹⁴, (B) Schéma du courant de la goutte de mercure en fonction du temps⁵.

b. Electrode de carbone vitreux (GCE)

Le carbone est un élément largement utilisé en électrochimie existant sous plusieurs formes allotropiques radicalement différentes: le graphite, le diamant et les fullerènes et 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 sp² (les électrodes en carbone vitreux, les nanotubes de carbone et de graphite)¹⁵. Sauf le diamant (hybridation sp³) qui se transforme à un métal conducteur après l'introduction des impuretés telles que le bore et le nitrogène¹⁶.

Tous les carbones sp² peuvent être comparés structurellement en considérant la longueur de microcrystallites (L_a) et l'épaisseur de la microcrystallite perpendiculaire aux graphites planes. (Schéma.2A)

¹⁴ Generalic, Eni."Dropping mercury electrode." Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary.23 Feb. 2017. KTF-Split. 25 Feb. 2017. <<http://glossary.periodni.com>>.

¹⁵ M. Brun, «Electrodes nanocomposites pour applications en Micro fluidique », Thèse, Université Claude Bernard Lyon 1 France (2011).

¹⁶ R. L. Mc Creery, "Advanced carbone electrode materials for molecular electrochemistry." *Chem. Rev.* (2008) 108 (7) 2646-2687.

La fabrication de l'électrode du carbone vitreux consiste à chauffer la carbonisation par chauffage des polymères de phénol / formaldéhyde ou du polyacrylonitrile entre 1000 ° C et 3000 ° C sous pression¹⁷.

On distingue deux plans du cristal du graphite: le plan de base (basal-plane) et le plan de bordure (edge-plane) perpendiculaire au plan de base. (**Schéma.2 B**)

Diverses techniques ont révélé la présence des groupements de surface contenant l'oxygène notamment des carboxyles, hydroxyle et quinone. La présence de ces groupes peut améliorer la réponse cinétique des électrodes ou bien inhibe le taux de transfert d'électrons¹⁸.

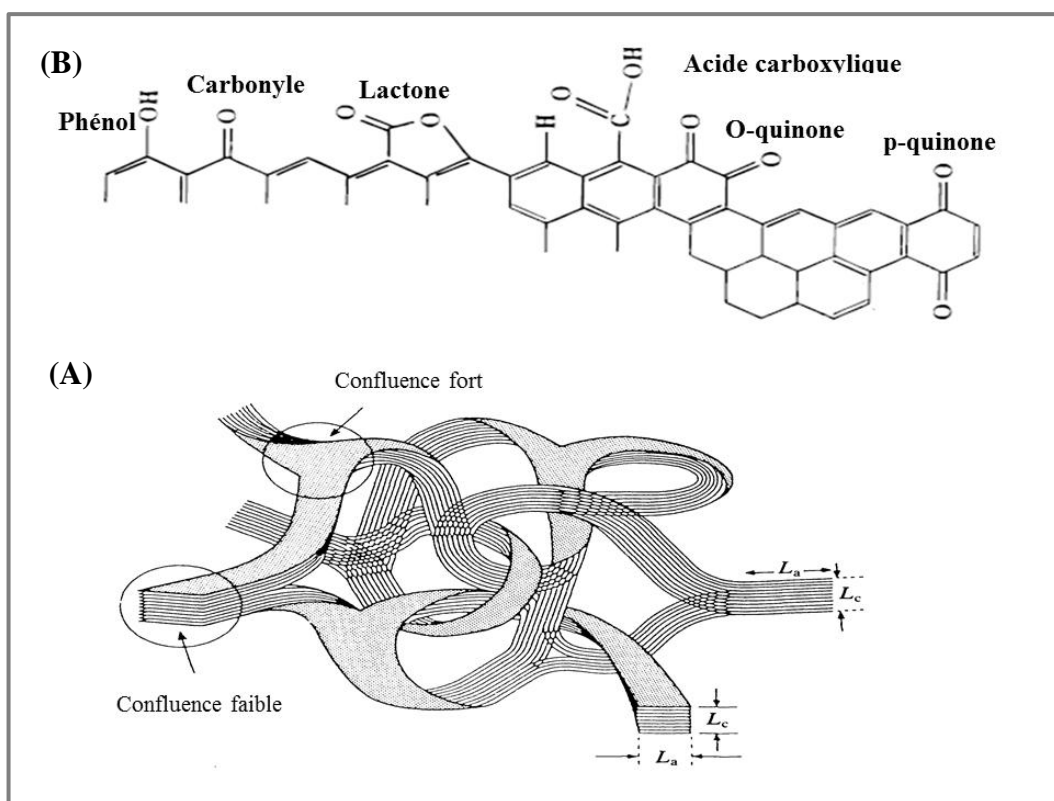


Schéma.2. (A) Représentation de la structure de l'électrode à carbone vitreux¹⁷.

(B) Représentation des différentes fonctions oxygénées sur la surface du carbone¹⁸.

(L_a : la longueur des micros cristallines et L_c l'épaisseur des microcristallines)

¹⁷ C. M. A. Brett, A. M. Oliveira Brett, "Electrochemistry Principles, Methods, and Applications » Oxford University Press, Book craft (Bath) Ltd UK (1993).

¹⁸ C. A. Thorogood, G. G. Wildgoose, J. H. Jones, R. G. Compton, "Identifying quinone-like species on the surface of graphitic carbon and multi-walled carbon nanotubes using reactions with 2,4-dinitrophenylhydrazine to provide a voltammetric fingerprint." *New J. Chem.* (2007) 31, 958–965.

PARTIE II

Chapitre 1.2

MATERIELS & REACTIFS

1. Matériels de la partie électrochimie des hétérocycles

1.1. Synthèse des hétérocycles de départ

Les dérivées utilisées dans ce chapitre ont été synthétisés à partir de l'acide 2-(2-nitro phényl) acétique : (Tableau.1)

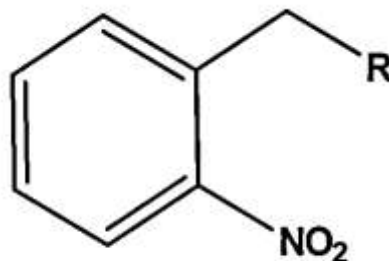


Fig.1 Structure moléculaire de l'acide 2-(2-nitro phényl) acétique avec $R=CO_2H$.

Tableau.1 Les dérivés de l'acide 2-(2-nitrophényl) acétique.

R	Nomenclature
COOH	acide 2-(2-nitro phényl) acétique
COOC ₂ H ₅	2-(2-nitro phényl) acétate d'éthyle
COOC ₆ H ₅	2-(2-nitro phényl) acétate de phényle
CONH ₂	2-(2-nitro phényl) acétamide

a. 2-(2-nitro phényl) acétate d'éthyle :

On mélange 1g de l'acide 2-(2-nitro phényl) acétique, 15 cm³ d'éthanol et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. On laisse à reflux pendant 4 heures, on évapore le solvant et on neutralise par une solution de bicarbonate de potassium (KHCO₃) à 10%.

Après recristallisation dans EtOH/H₂O, on obtient des plaques blanches avec un rendement de 80%.

F=69°C (EtOH+H₂O), Spectre IR (KBr): $\gamma_{C=O}$ (carbonyle)=1730 cm⁻¹, γ_{NO_2} = 1344.3 et 1537.2 cm⁻¹, γ_{C-O} (ester)=1028 cm⁻¹

b. 2-(2-nitro phényl) acétate de phényle :

On mélange 1 g de l'acide 2-(2-nitro phényl) acétique, 0.9 g de phénol et quelques gouttes de H₂SO₄ concentré, ensuite on ajoute du Toluène, après 4 heures à reflux, il se

forme un précipité. Après évaporation du solvant, neutralisation et recristallisation dans le méthanol, on obtient une poudre verte avec un rendement de $\rho = 80\%$ ¹

F=135°C (MeOH), Spectre IR (KBr): $\gamma_{C=O}$ (carbonyle)=1708.8 cm^{-1} , γ_{NO_2} =1344.3 et 1537.2 cm^{-1} , γ_{C-O} (ester)= 1242.1 cm^{-1} , γ (cycle aromatique)=1429 cm^{-1} .

c. 2-(2-nitro phényl) acétamide:

A 1.5 g de l'ester méthylique, on ajoute de l'ammoniac ($d = 0.91$) en excès et on laisse agiter pendant 24 heures. On filtre et on dissout le résidu avec l'éthanol.

La recristallisation du précipité blanc formé dans l'éthanol, donne des plaques blanches avec un rendement de 80%.

F= 159°C (EtOH), Spectre IR (KBr): $\gamma_{NO_2} = 1521.7$ et 1342.4 cm^{-1} , γ (cycle aromatique)= 1651.0 cm^{-1} , γ_{NH_2} (double bande) =3400.3 et 3193.9 cm^{-1} .

1.2. Electrolyse et Coulométrie:

Nous avons préparé trois solutions à partir de l'éthanol et l'électrolyte-support (Volume à Volume). (Tableau.2)

Tableau.2 Composition des électrolytes support de l'électrolyse.

Electrolytes-support	Formule	Concentration (mole L ⁻¹)	pH
Acide sulfurique	H ₂ SO ₄	0.5	0
Tampon ammoniacal	NH ₄ Cl, NH ₃	0.5	9.25
Tampon acétique	CH ₃ COOH, CH ₃ COONa	0.5	4.75

Le principe de l'électrolyse des produits nitrés consiste à fixer le potentiel de travail à une valeur correspondant au palier de la vague à étudier.

La cellule d'électrolyse se compose de :

Deux compartiments anodique et cathodique séparés par une paroi conductrice (verre fritté).

¹ B.S. Furniss, A.J. Hannaford, P.W.G. Smith, A. R. Tatchell, VOGEL'S "Textbook of Practical Organic Chemistry", 5 ed. , Londres, (1989).

- La cathode est une nappe de mercure continuellement agité (épaisseur de 1 cm)². (**Figure.2**)
- L'anode est un fil de platine, sous forme d'une spirale
- Le volume suffisant d'électrolyte est d'environ 140 mL.

Les électrolyses sont réalisées à l'aide d'un montage électronique constitué de :

- Potentiostat modèle 362 Scanning. (**Figure.3**)
- Table traçante XY KIPP & ZONEN. (**Figure.4**)

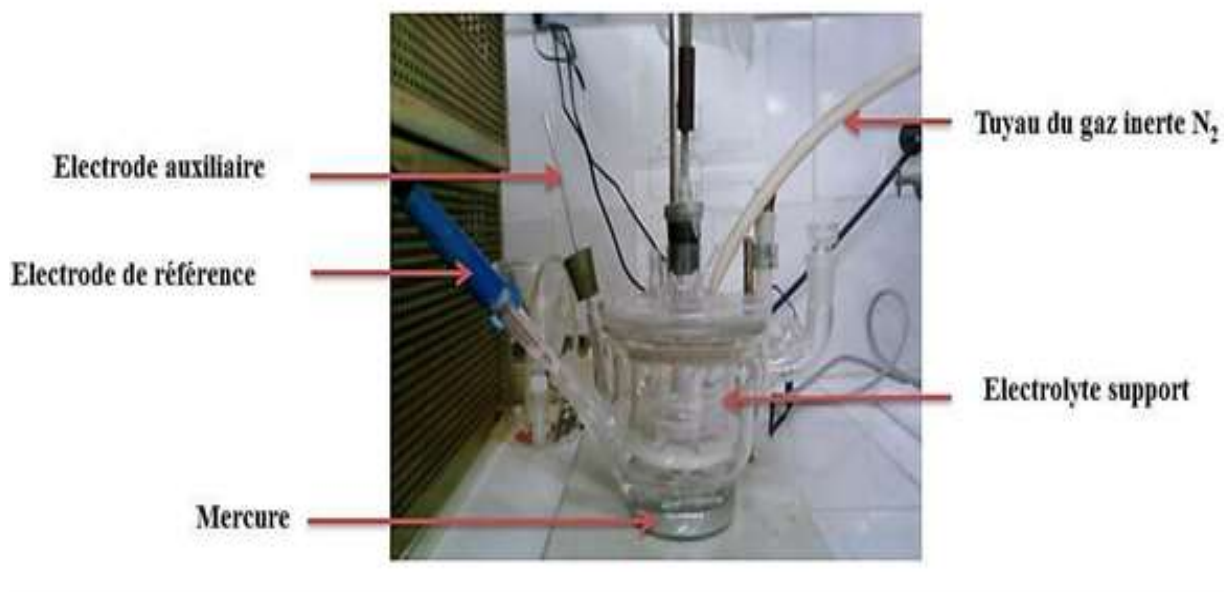


Fig .2 Cellule d'électrolyse.

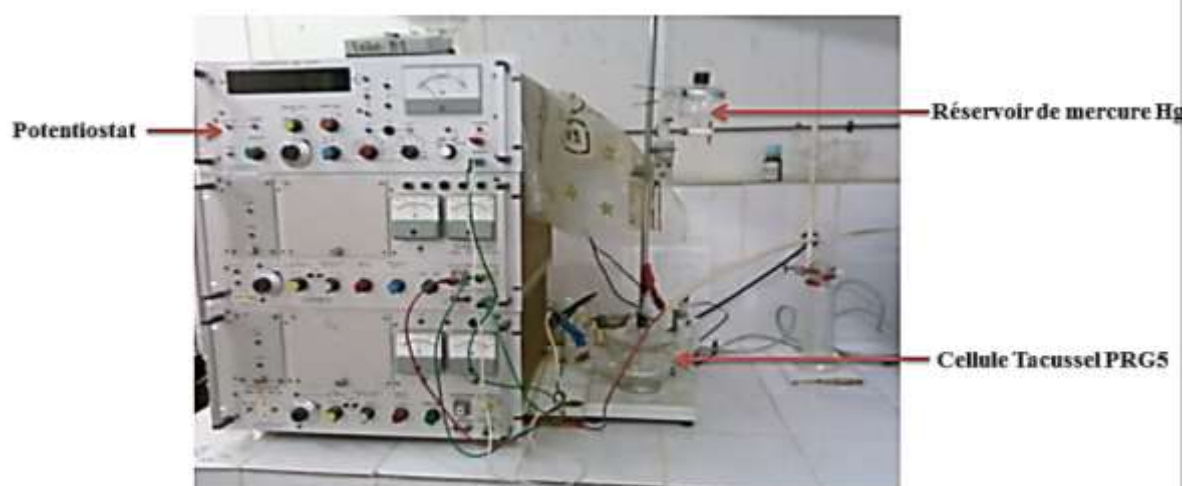


Fig .3. Potentiostat modèle 362 Scanning et l'électrode à goutte de mercure.

² C. Moinet, D. Peltier, *Bull.Soc.Chim.Fr*, 690 (1969).



Fig .4 Table traçante XY KIPP & ZONEN.

1.3. Cytotoxicité

Pour évaluer la toxicité de nos produits, on a utilisé le test de toxicité Brine Shrimp sur les larves d'*Artemia salina* (petit crustacé d'eau salé.)

De ce fait, 2 g de cystes sont mis à éclore dans de l'eau salé sous fort bullage pendant 48 heures (temps nécessaire pour l'éclosion des *Artémia*)³.

Selon la méthode de **MEYER**⁴, les tests de létalité ont été réalisés dans des plaques multi puits. Dix naupliis ont été ajoutés dans chaque puits et les produits ont été dissous dans 1% de diméthylsulfoxyde (DMSO : eau salé 1% :99%) pour atteindre les concentrations d'essai requises 10, 100 et 1000 µg/ml. La solution contrôle contient uniquement des larves placées dans de l'eau salé.

Après 24 heures à une température ambiante, les plaques ont été examinées via une loupe (comptage des larves).

La mortalité est définie lorsque chaque larve ne présente plus de mouvement pendant au moins 10 secondes. Le pourcentage de mortalité des larves est déterminé en utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ Mortalité} = \left[\frac{(\text{nombre total des larves} - \text{nombre des larves vivante})}{\text{nombre total des larves}} \right] * 100$$

La Concentration Létale LC_{50} a été déterminée par la méthode graphique arithmétique grâce au logiciel Biostate 2009.

³ S. Pisutthanan, P. Plianbangchang, N. Pisutthanan, S. Ruanruay, O. Muanrit, « Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae. » *Naresuan Univ J.* (2004) 12(2): 13-18.

⁴ B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. Mc Laughlin « Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. » *Planta Med.* (1982) 45, 31–34.

2. Matériels de la partie électrochimie de Bevacizumab (BEVA)

2.1. Réactifs

Bevacizumab est un anticorps monoclonal, administré par voie intraveineuse⁵. Il ne fonctionne pas comme la chimiothérapie qui s'attaque directement à la tumeur, mais il attaque les vaisseaux sanguins qui entourent la tumeur.

Avastin 25 mg/ml de Roche Pharmaceuticals contient : 25 mg mL⁻¹ de Bevacizumab (BEVA), le tréhalose dihydraté, le phosphate de sodium et le polysorbate 20 de l'eau. (**Figure.5**)

Durant les analyses, Bevacizumab a été conservé au réfrigérateur à 4°C à l'abri de la lumière.



Fig.5 Avastin de Roche

Les solutions mères de 6 mg mL⁻¹ et 10 mg mL⁻¹ du BEVA, ont été préparées quotidiennement.

L'eau milliQ issue d'un système de purification millipore, exempte de toute trace de matière organique possède une conductivité $\leq 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Les agents dénaturants utilisés sont :

- Le L-Dithiothreitol (DTT) : solution de concentration 0,1 M, préparée dans l'eau milliQ, fourni par Sigma.
- Le tris (5-carboxyéthyl) phosphine (TCEP) : solution de concentration 0,1 M, préparée dans une solution de tampon acétate (0,1 M) pH = 5,4 fourni par Sigma.
- Le dodécylsulfate de sodium (SDS) : solution de concentration 0,1 M préparé dans l'eau déminéralisée est fourni par Sigma.

Les solutions mères de 1 mM d'une solution de K₄Fe(CN)₆ de MERK ont été préparées hebdomadairement dans un tampon phosphate (pH = 6,9). Les potentiels moyens de + 0,45 V pour l'électrode de carbone vitreux (GCE) propre et de + 0,52 V pour BEVA immobilisé sur la surface de GCE, ont été déterminés après les enregistrements des voltammogrammes cycliques. (**Partie II Chapitre 3**)

Les électrolytes support ont été préparés selon les indications du **tableau.3**.

⁵ Feuille d'information, Santé Canada, Ontario (2011). http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/notices-avis/conditions/avastin_fs_fd_130719-fra.php.

Les mesures de pH ont été effectuées avec un pH-mètre micropH 2001 de Crison avec une électrode de verre combinée Ingold (Erreur de mesure $\leq 0,005$).

Les micro-volumes ont été mesurés en utilisant des pipettes microlitres P20, P200 et P1000 (Gilson S. A., Villiers-le-Bel, France).

Toutes les expériences ont été réalisées à une température ambiante.

Tableau.3 Composition des électrolytes support.

Solutions Tampon	pH
KCl + HCl	1.2
KCl + HCl	2.02
NaAcO + HAcO	3.4
NaAcO + HAcO	4.5
NaAcO + HAcO	5.4
Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄	6.08
Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄	6.9
Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄	8.05
Na₂B₄O₇.10 H₂O + NaOH	9.25
KCl + NaOH	12.04
KCl + NaOH	12.85

2.2. Matériels :

Les mesures électrochimiques ont été effectuées à l'aide d'un potentiostat/ galvanostat Autolab type III (Metrohm) piloté par le logiciel GPES 4.9, Metrohm / Autolab, Utrecht, Pays-Bas.

Dans les analyses par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), on a utilisé un potentiostat/ galvanostat Autolab 10 piloté par le logiciel FRA 4.9.

Le montage comprend une cellule en verre pyrex et trois électrodes : **(Figure.6)**

- Une électrode auxiliaire: fil de platine.

- Une électrode de travail : électrode de carbone vitreux (GCE).
- Une électrode de référence : électrode de Ag | AgCl, KCl (saturé).

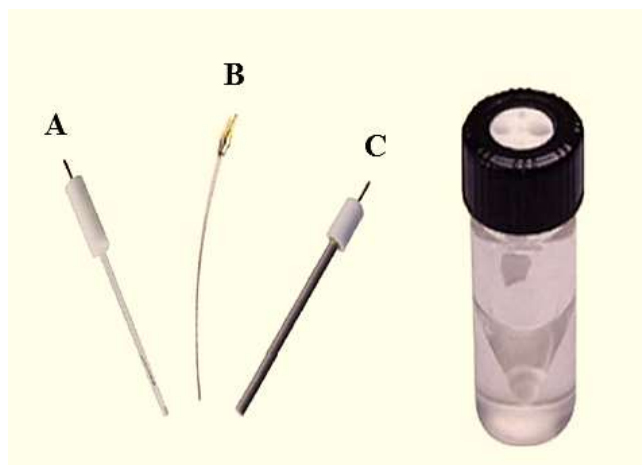


Fig.6 Une mini cellule électrochimique et les trois électrodes : (A) électrode de référence (Ag/AgCl) (B) électrode auxiliaire (Pt) (C) électrode de carbone vitreux (GCE).

L'électrode de travail de carbone vitreux (GCE) ($d = 1,5 \text{ mm}$) a été polie en utilisant le diamant de pulvérisation (granulométrie 1 mm , Kement, Kent, Royaume-Uni) avant chaque expérience. Après le polissage, cette électrode a été rincée à fond avec de l'eau Milli-Q.

La procédure de nettoyage a été répétée jusqu'à l'obtention des voltammogrammes reproductibles. Parfois l'électrode nécessite un nettoyage électrochimique par un balayage cyclique prolongé entre $-0,2 \text{ V}$ et $+1,5 \text{ V}$.

Les conditions expérimentales des différentes analyses électrochimiques sont présentées dans le **tableau.4** :

Tableau.4 Conditions opératoires des techniques électrochimiques.

Technique électrochimique	Conditions opératoires
Voltammétrie cyclique (CV)	vitesse de balayage de 100 mV s^{-1}
Voltammétrie différentielle d'impulsions (DPV)	amplitude d'impulsion de 50 mV , largeur d'impulsion de 70 ms , temps d'intervalle de $0,4 \text{ s}$, taux de balayage de 5 mV s^{-1}

Voltammétrie de vague carrée (SW)	fréquence de 50 Hz, amplitude d'impulsion de 50 mV, vitesse de balayage efficace de 100 mV s ⁻¹
Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)	perturbation de la tension est de 5 mV sur une plage de fréquences entre 60 kHz et 0,1 Hz, avec six fréquences par décade.

2.3. Procédures d'analyses

a. Procédure 1- BEVA en solution

L'électrode de carbone vitreux a été immergée dans une solution de BEVA à une concentration de 5 mg mL⁻¹ diluée dans un électrolyte support de concentration 0,1 M à un pH variant de 3,4 à 9,25.

b. Procédure 2- BEVA native

L'immobilisation a été réalisée en déposant trois gouttes d'une solution de 5 mg/mL de BEVA sur la surface de l'électrode de carbone vitreux. Après emplacement, on sèche chaque goutte sous un flux constant d'azote.

Le biocapteur BEVA-GCE a été placé dans la cellule électrochimique ne contenant que le tampon pour hydratation pendant 5 minutes avant l'enregistrement du voltammogramme DP.

c. Procédure 3- BEVA dénaturé

Le biocapteur BEVA-GCE préparé selon la **Procédure 2**, a été incubé dans les agents SDS 33,33 mM, TCEP 10 mM ou DTT 10 mM, pendant des périodes variantes de 30 à 300 minutes. L'électrode est retirée de la solution, lavée avec de l'eau pour éliminer l'excès de l'agent dénaturant, et placé dans une cellule électrochimique ne contenant que le tampon phosphate (pH = 6,9). Ensuite les voltammogrammes DP ont été enregistrés.

3. Matériels de la partie électrochimie des flavonoïdes

3.1 Réactifs

Les fruits utilisés sont : *Prunus armeniaca* L. (abricot), *Prunus domestica* L. (prune européenne), *Prunus salicina* (prune japonaise), *Prunus persica nuspersica* L. (nectarine), *Prunus cerasus* L. (cerise), *Phoenix dactylifera* (datte), *Opuntia ficus indica* (figue de Barbarie) et *Punica granatum* (grenade). Ils ont été achetés sur un marché local (Constantine, Algérie), durant la période de Mai à Septembre 2015, par la suite, transférés au Centre de recherche en Biotechnologie CRBt Constantine.

Catéchine hydrate et 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich, Madrid, Espagne.

Gallate d'épigallocatechine, rutine, quercétine déshydrater, resvératrol, morine, délphinidine chlorure, chlorure malvidol, chlorure péonidine-3-o-glucoside, chlorure kuromanin, acide ferrulique, procyanidine A2, hyperoside, fisetine et myricetine, ont été achetés auprès de Extrasynthèse, Genay, France.

















Toutes les solutions ont été préparées en utilisant des réactifs de qualité analytique et de l'eau purifiée à partir d'un système Millipore Milli-Q (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{Scm}^{-1}$).

3.2 Prétraitement du matériel végétal

Après lavage des fruits, ils ont été coupés et conservés au congélateur à une température de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Ensuite, ils ont été lyophilisés via un lyophilisateur 1-4 LD Plus Freeze Dryer (Christ, Allemagne) sous une température de $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ et une pression de 0,12 mBar.

Après broyage, on a tamisé les poudres de fruits lyophilisés sur un tamis de diamètre (35 mesh). Ensuite ils ont été conservés dans des récipients scellés et stockées à l'abri de la lumière. (**Tableau.5**)

Tableau.5 Présentation des fruits méditerranéens utilisés.

Nom scientifique	Nom courant	Fruits fraiche	Fruits lyophilisé et broyer
<i>Opuntia</i> <i>Ficus indica L.</i>	Figue de Barbarie		
<i>Prunus cerusus L.</i>	Cerise		
<i>Punica granatum L.</i>	Grenade		
<i>Phœnix dactylifera</i>	Datte		
<i>Prunus persica-nusipersica L.</i>	Nectarine		
<i>Prunus armeniaca L.</i>	Abricot		
<i>Prunus domestica L.</i>	Prune Européenne		
<i>Prunus Salicina Lindl.</i>	Prune Japonaise		

3.3. Extraction des flavonoïdes

a. Choix du solvant

D'après ALOTHMAN et ses collaborateurs, les solvants polaires tel que l'éthyle acétate, l'acétone, l'éthanol et le méthanol offrent plus d'efficacité pour l'extraction des composés phénoliques à partir de la matrice végétale⁶. Suite aux travaux préliminaires de GOMES et ses collaborateurs pour déterminer le rapport optimal solide/liquide, on a constaté que le méthanol acidifié (solvant d'extraction) utilisés pendant une extraction assisté par micro-ondes (MAE) et ultrasons (UAE) améliore le rendement d'extraction des flavonoïdes⁷.

b. Procédure d'extraction

Le protocole d'extraction, pour les sept fruits lyophilisés, comprend l'ajout d'un gramme de poudre à 4 ml du solvant d'extraction CH₃OH/HCl 99: 1 (v / v), puis placé dans un four à micro-ondes à une puissance de 450 watts pendant 15 secondes.

L'extrait a été versé dans un tube conique et placé dans un bain à ultrasons à 25°C, à une fréquence de 35 kHz, pendant 15 min.

Après sonication, la solution a été laissée à une température ambiante pendant 1 heure, ensuite on a centrifugé à 3500 rpm pendant 20 minutes.

Le résidu est soumis à la même procédure répétée deux fois : 3 mL du solvant, 30 minutes puis 15 min à l'ultrason et 20 min de centrifugation.

Avant l'analyse, les extraits ont été filtrés à l'aide du filtre de seringue de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne).

Les extraits ont été conservés au congélateur à l'abri de la lumière.

3.4. Détection et identification des flavonoïdes par RP-HPLC-ED et PDA

Les extraits des fruits ont été soumis à une analyse qualitative via une chromatographie liquide à haute performance en phase inverse couplée à un détecteur électrochimique (ED) et

⁶ M. Alothman, R. Bhat, A.A. Karim "Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvent." *Food Chem.* (2009) 115 785–788.

⁷ S. M. C. Gomes, I. P. G. Fernandes, N. S. Shekhawat, S. Kumbhat, A. M. Oliveira-Brett "Calligonum polygonoides Linnaeus Extract: HPLC-EC and Total Antioxidant Capacity Evaluation" *Electroanalysis* (2015) 27 (2) 293-301.

à un détecteur photodiode (PDA). Le pH de la phase mobile devrait être acide (entre 2 et 4) pour maintenir les flavonoïdes en forme neutre⁸.

Dix-sept standard de flavonoïdes ont été détectés: délfhynidine chloride, malvidine chloride, catéchine, (-)-épigallocatechine gallate, épicatechine, kuromanine chloride, acide ferulique, peonidin-3-O-glucoside chloride, procyanidin A2, hyperoside, quercetin-3-O-glucopyranoside, rutine, resveratrol, fisetin, myricetin, morine, quercetindihydrate.

On a testé plusieurs dilutions afin de trouver la meilleure résolution des pics chromatographiques.

La détection par PDA offre plusieurs longueurs d'ondes, on a choisi trois longueurs convenables : $\lambda=280, 360$ et 520 nm afin de confirmer les résultats du détecteur électrochimique.

Dans une étude de NOVAK et ses collaborateurs pour établir un facteur de capacité (k') optimal et un temps de rétention relativement faible, différentes proportions de H_2O/ CH_3OH de la phase mobile ont été testées. La proportion de la phase mobile A pour l'élution des molécules plus polaires était de 83 :16 (v : v), tandis que pour des molécules moins polaires, la quantité du méthanol a été réduite dont les proportions de la phase mobile B était de 68,5 :30 (v : v)⁸.

Une faible quantité d'acide formique ($HCOOH$) a été ajoutée pour atteindre un pH acide de 2.20.

La séquence programmée consiste à une élution isocratique à 100% de la phase mobile A pendant les premières 11 minutes, suivie par une élution à gradient linéaire de 100% de phase mobile B pendant 21 minutes, et enfin une élution isocratique à 100% de phase mobile B, jusqu'à 40 minutes.

La colonne analytique a été maintenue dans une cage de Faraday à une température de $40^\circ C$. L'électrode de référence Ag / AgCl, ISAAC (in situ Ag / AgCl), est en contact direct avec la phase mobile. Il existe une différence de 0,2 V entre le potentiel de l'électrode de référence Ag / AgCl (saturée en KCl) et l'électrode de référence ISAAC.

Le **tableau.7** présente les potentiels de l'électrode de référence Ag/AgCl/ Cl^- et ISAAC à différentes concentrations de Cl^- , par exemple : pour une concentration de 2mM, le potentiel de Ag / AgCl/ Cl^- est de 379 mV, la différence de potentiel ΔE avec ISAAC est de 189 mV.

⁸ I. Novak, P. Janeiro, M. Seruga, A. M. Oliveira-Brett "Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection » *Anal. Chim. Acta* (2008) 630, 107 – 115.

Tableau.6 Conditions opérationnelles de HPLC/ED / PDA

Désignation	Conditions opérationnelles
HPLC	Waters 2690 liquid chromatograph
Phases mobiles	<p>solvant A (H₂O-CH₃OH-HCOOH 83/16/1 en volume)</p> <p>solvant B (H₂O-CH₃OH-HCOOH 68,5/ 30/ 1,5 en volume)</p>
Caractéristique du détecteur photodiode (PDA)	<p>Waters 996</p> <p>512 diodes</p> <p>$\lambda = 190-800$ nm.</p> <p>Résolution 1.2 nm par diode</p> <p>Longueur du trajet optique 1 cm</p>
Caractéristique du détecteur électrochimique ED	<p>Concorde wall-jet electrochemical (ED) detector from Waters, Milford, MA, USA.</p> <p>Electrode de travail en carbone vitreux d'un diamètre de 2 mm</p> <p>Electrode de référence in situ Ag/AgCl</p> <p>Electrode auxiliaire en Acier inoxydable (Figure.7 et Schéma.1)</p>
Colonne chromatographique	150 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m reverse-phase Inertsil® ODS-C18 steel column, with a guard column of the same type, from GL Sciences Inc., Tokyo, Japan.
Conditions caractéristiques	<p>range = 5 nA,</p> <p>ajustement = 0,1 s,</p> <p>offs = 10%.</p> <p>débit de la phase mobile = 1,0 ml / min,</p> <p>volume injecté = 25 μl.</p> <p>débit de travail=200 μL/min</p>

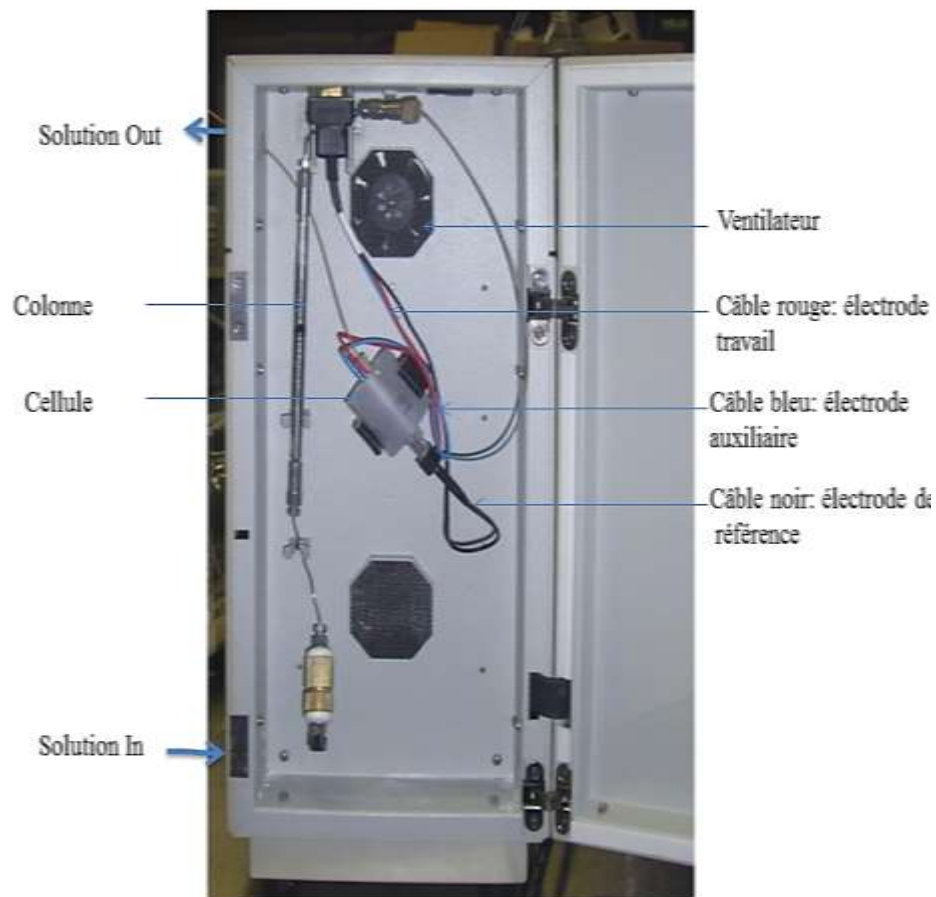


Fig.7 Détecteur électrochimique Concorde Wall-Jet « Water »

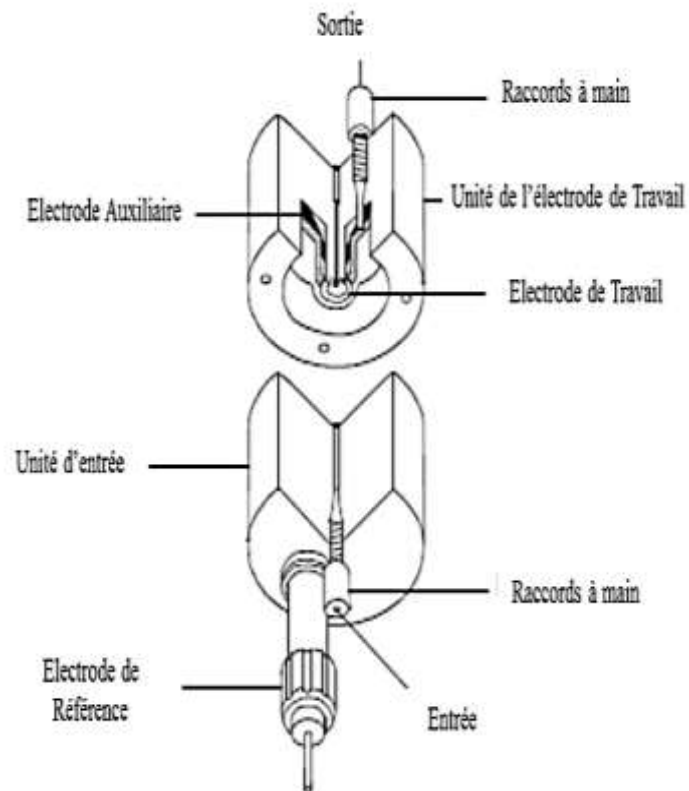


Schéma.1 Cellule du détecteur électrochimique⁹.

⁹ "Waters 2465 Electrochemical Detector" Operator's Guide, Milford MA USA (2007).

Tableau.7 Potentiel de l'électrode de référence Ag / AgCl ⁹.

Concentration Cl ⁻ (mM)	E Ag / AgCl (mV)	ΔE(mV)
3500 (KCl saturé)	190	0
2500	199	09
1500	212	22
500	240	50
100	280	90
20	331	131
10	338	148
8.0	344	154
6.0	351	161

Toutes les mesures ont été effectuées au potentiel de $E_{ap} = +0,5$ V vs. ISAAC ($E_{ap} \sim +0,7$ V vs. Ag / AgCl (KCl saturé)).

Les solutions des standards phénoliques ont été préparées à une concentration de 10 mM, dans la phase mobile de l'HPLC (solvant A).

Les flacons de solutions mères ont été protégés de la lumière avec du papier aluminium, et conservés dans un congélateur. Ces solutions ont été diluées de façon appropriée pour l'injection directe dans le système HPLC.

3.5. Paramètres Voltammétriques

Les voltammogrammes DP et Chronoampérométrie ont été réalisées à l'aide d'un potentiostat IVIUM en combinaison avec Ivium Soft version 2.219 (Ivium Technologies, Eindhoven, Pays-Bas). Les mesures ont été effectuées dans une cellule électrochimique à un seul compartiment (2mL) qui comprend trois électrodes : une électrode de carbone vitreux (GCE) ($d = 1$ mm) (e DAQ, Pologne), une électrode auxiliaire de fil Pt et une électrode de référence Ag / AgCl (3 M KCl).

Les mesures chrono-ampérométriques ont été réalisées à un potentiel de $E_{ap} = +0,6$ V vs Ag / AgCl.

L'activité antioxydante totale des extraits a été définie par l'indice électrochimique (EI), calculé à partir des voltammogrammes DPV¹⁰ :

$$EI = (I_{p1}/E_{p1}) + (I_{p2}/E_{p2}) + \dots + (I_{pn}/E_{pn})$$

Toutes les données électrochimiques présentées ont été répétées trois fois. L'écart-type (SD) a été trouvé inférieure à 0,05%.

3.6. Paramètres spectrophotométriques

L'évaluation de l'activité antioxydante totale de nos extraits a été effectuée par le test du piégeage des radicaux libres à l'aide d'un radical stable DPPH. Les spectres d'absorbance ont été enregistrés sur un spectrophotomètre U-2810 Digilab Hitachi sous une vitesse de balayage de 400 nm/min, dans un intervalle de longueur d'onde de 380 à 800 nm.

La masse molaire du radical DPPH est 394,32 g/mole et le coefficient d'extinction molaire (ϵ) (dans le méthanol ou l'éthanol, à une longueur d'onde $\lambda=516$ nm) est $1,1 \cdot 10^4$, ce qui signifie que : une concentration de 100 mM correspond à une absorbance maximale de 1 a.u.

La solution mère du radical DPPH a été préparée hebdomadairement à une concentration de 80 mM, ce qui correspond à 0,8 absorption à une longueur d'onde $\lambda = 516$ nm.

Douze concentrations différentes, de chaque extrait, ont été analysées, après incubation du mélange (extrait/ DPPH \cdot) à l'abri de la lumière pendant 30 min.

Pour évaluer l'influence de la concentration des extraits, la réactivité est estimée par la concentration effective EC₅₀ (ou l'inverse 1/EC₅₀) correspondant à une réduction de 50% de l'absorbance du DPPH \cdot . L'activité antioxydante d'un extrait est d'autant plus élevée que sa valeur EC₅₀ est plus petite.

$$\text{Activité Antiradicalaire (\%)} = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100$$

A₀: Absorbance de la solution du DPPH \cdot .

A : Absorbance de la solution du DPPH \cdot après réaction avec l'extrait.

Toutes les expériences ont été répétées trois fois (n = 3), à une température ambiante.

¹⁰ (a) A. J. Blasco, M. C. Rogerio, M. C. González, A. Escarpa, "“Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal" *Anal. Chim. Acta* (2005) 539, 237–244. (b) F.M.A. Lino, L.Z. de Sá, I.M.S. Torres, M.L. Rocha, T.C.P. Dinis P.C. Ghedini, V.S.Somerset, E.S.Gil, « Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines" *Electrochimica Acta* (2014) 128, 25–31.

PARTIE II

Chapitre 2

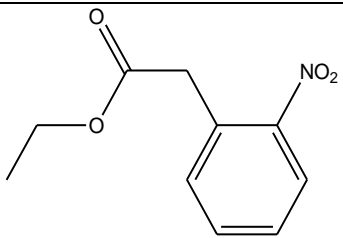
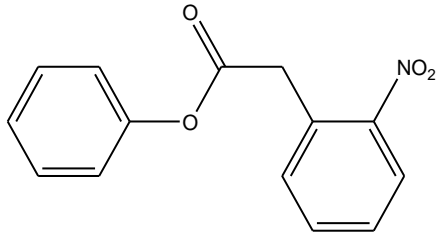
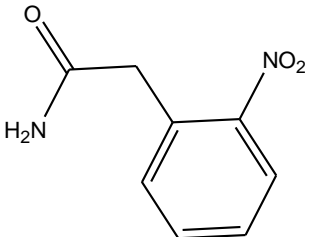
ELECTROCHIMIE DES DERIVES

NITRES

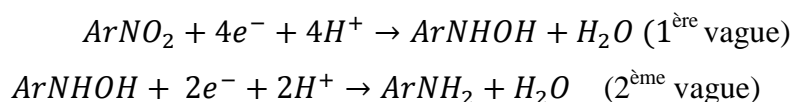
1. Etudes polarographique et voltammétrie cyclique

Les produits de départ synthétisés par voie chimique à partir de l'acide nitro phényl acétique sont: 2-(2-nitro phényl) acétate d'éthyle, 2-(2-nitro phényl) acétate de phényle et 2-(2-nitro phényl) acétamide. (Tableau.1) (Chapitre 1.2)

Tableau.1 Présentation des produits de départ.

Composé	Formule brute	Structure
2-(2-nitro phényl) acétate d'éthyle	$C_{10}H_{11}O_4N$	
2-(2-nitro phényl) acétate de phényle	$C_{14}H_{12}O_4N$	
2-(2-nitro phényl) acétamide	$C_8H_8O_3N_2$	

En milieu acide sulfurique ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH}=0$), les polarogrammes enregistrés sur une solution diluée à $2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, présentent deux vagues, la première vague à 4 électrons, correspond à la formation de l'hydroxylamine par réduction du groupement nitré. La deuxième vague à 2 électrons correspond à la réduction de l'hydroxylamine en amine :



En milieu tampon acétique (0,5 mol.L⁻¹ ; CH₃COOH, CH₃COONa : pH=4,75), les polarogrammes montrent une seule vague correspondant à une réduction à 4 moles d'électrons par mole de substrat. Le produit formé n'est pas réductible.

En milieu tampon ammoniacal (NH₄Cl, NH₃ 0,5 mol.L⁻¹: pH=9,25), les polarogrammes présentent le même comportement sauf pour le 2-(2-nitro phényl) acétate de phényle.

Le **tableau.2** rassemble les potentiels de demi-vague de réduction des trois produits de départ.

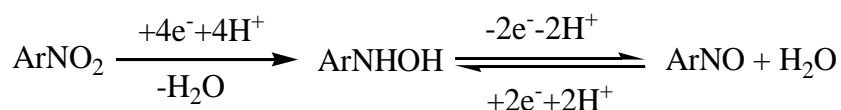
Tableau.2 Potentiels de demi-vagues de réduction des produits de départ (E_{1/2} V/SCE).

pH	2-(2-nitro phényl) acétate d'éthyle		2-(2-nitro phényl) acétate de phényle		2-(2-nitro phényl) acétamide	
	1 ^{ère} vague	2 ^{ème} vague	1 ^{ère} vague	2 ^{ème} vague	1 ^{ère} vague	2 ^{ème} vague
0	-0.18	-0.53	-0.18	-0.62	-0.14	-0.87
4.75	-0.52	-	-0.54	-	-0.44	-
9.25	-1.40	-	-0.80	-1.24	-0.74	-

L'étude voltammétrique a été réalisée dans le tampon acétique à une vitesse de balayage des potentiels de 50 mVs⁻¹. Au 1^{er} balayage cathodique, on observe un pic à un potentiel de -0.59V/SCE correspond à la réduction du groupement nitré en hydroxyle amine.

Au balayage retour vers les potentiels anodiques, on observe un pic d'oxydation correspondant à l'oxydation de l'hydroxyle amine en nitroso. Une nouvelle inversion du sens des balayages fait apparaître un pic cathodique à un potentiel de +0,01V/ SCE. Ces pics sont caractéristique du système réversible entre l'hydroxyle amine NHOH et le nitroso NO :

(Figure.1)



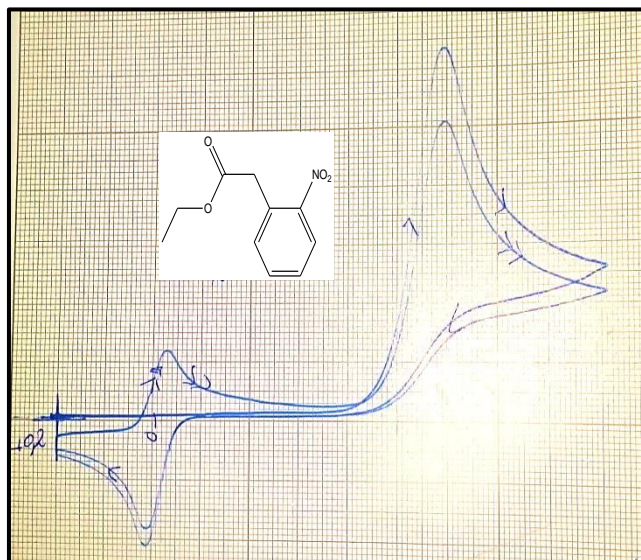


Fig.1 Voltammogramme de 2-(2-nitro phényl) acétate d'éthyle en milieu T. Acétique (0.5 mol.L⁻¹), Vitesse de balayage=50mV/s.

Le **tableau.3** rassemble les potentiels de réduction et d'oxydation des trois produits de départ.

Tableau.3 Potentiels d'oxydation et de réduction des produits de départ (V/SCE)

Produits	Balayage	E pc2 (V/SCE)	E pc1 (V/SCE)	Epa1 (V/SCE)	ΔEp (V)
2-(2-nitro phényl) acétate d'éthyle	1 ^{er} balayage	-	-0.59	+0.01	+0.58
	2 ^{ème} balayage	-0.03	-0.59	+0.01	+0.58
2-(2-nitro phényl) acétate de phényle	1 ^{er} balayage	-	-0.62	+0.01	+0.61
	2 ^{ème} balayage	-0.05	-0.62	+0.01	+0.61
2-(2-nitro phényl) acétamide	1 ^{er} balayage	-	-0.63	+0.02	+0.61
	2 ^{ème} balayage	-0.08	-0.63	+0.02	+0.61

1. Réductions préparatives

Les électrolyses à potentiel contrôlé sont réalisées dans la cellule décrite par MOINET et PELTIER sur une cathode de mercure.¹ Le potentiel de travail choisi est déterminé après l'enregistrement des polarogrammes dans les mêmes conditions.

La solution à électrolyser est identique à celle utilisée en polarographie, cependant son volume est plus important. Le degré d'avancement de la réaction a été effectué par polarographie.

A la fin de l'électrolyse, la solution est soumise au traitement suivant: évaporation de la solution jusqu'à 40-50 ml, ensuite la solution aqueuse est extraite à l'éther éthylique puis on ajuste le pH avec une solution de NaCO₃ 10%. La phase organique est extraite à l'éther est séchée.

2.1. 2-(2-nitro phényl) acétate d'éthyle :

Dans un milieu acide H₂SO₄ 0.5M, on applique un potentiel de -0.16 V/SCE. Le nombre d'électrons consommée est de 4e⁻/mole de substrat. Après l'évaporation de l'éthanol, une extraction à l'éther permet d'isoler un produit sous forme de cristaux blancs fondant à 174°C. (**Figure.2**) (Produit F1)

D'après la littérature, on suggère un mécanisme de cyclisation intramoléculaire du phényle hydroxylamine et la formation d'un 1-Hydroxy-1,3-dihydro-indol-2-one C₈H₇NO₂.

(Schéma.1)

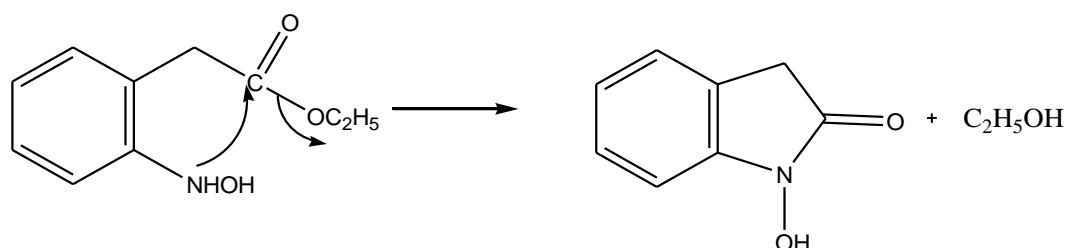


Schéma.1 Mécanisme proposé pour la formation de 1-Hydroxy-1,3-dihydro-indol-2-ylidene-oxonium (F2).

¹ C. Moinet, D. Peltier, Bull.Soc.Chim.Fr, 690 (1969).

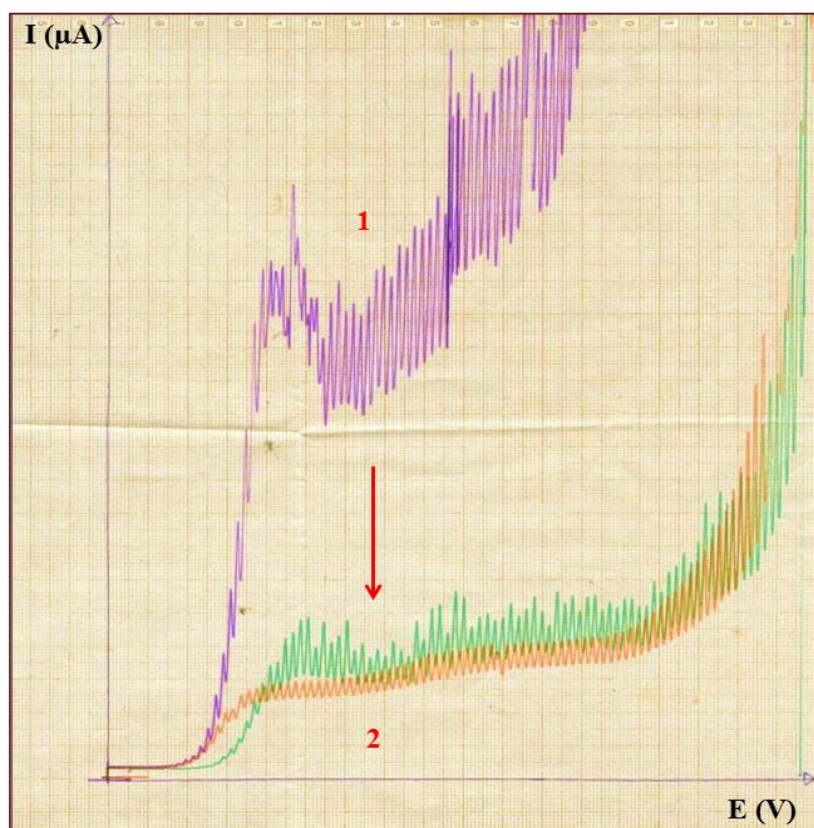


Fig.2 Réduction du 2-(2-nitro phényl) acétate d'éthyle en milieu H_2SO_4 (0.5 mol.L^{-1}) + éthanol (1/1) à $E_T = -0.16 \text{ V/SCE}$. (1) Avant et (2) Au cours de la réduction.

2.2. 2-(2-nitro phényl) acétate de phényle:

Dans un milieu de tampon ammoniacal 0.5M, on applique un potentiel de -0.85 V/SCE . La quantité des électrons consommés est 4 moles d'électrons/mole de substrat.

Après l'évaporation de l'éthanol, une extraction à l'éther permet d'isoler un produit sous forme d'une poudre marron foncée. (Produit F2)

2.3. 2-(2-nitro phényl) acétamide:

Dans un milieu tampon acétique 0.5M, on applique un potentiel de -0.5 V/SCE , la quantité des électrons consommés est 4 moles d'électrons/mole de substrat. Après l'évaporation de l'éthanol, une extraction à l'éther permet d'isoler un produit sous forme d'une poudre marron claire qui fond à une température de 136°C . (Produit F3)

D'après la littérature, on suggère la formation de 3H-Indol-2-ylamine (132.16 g/mole) $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_2$.

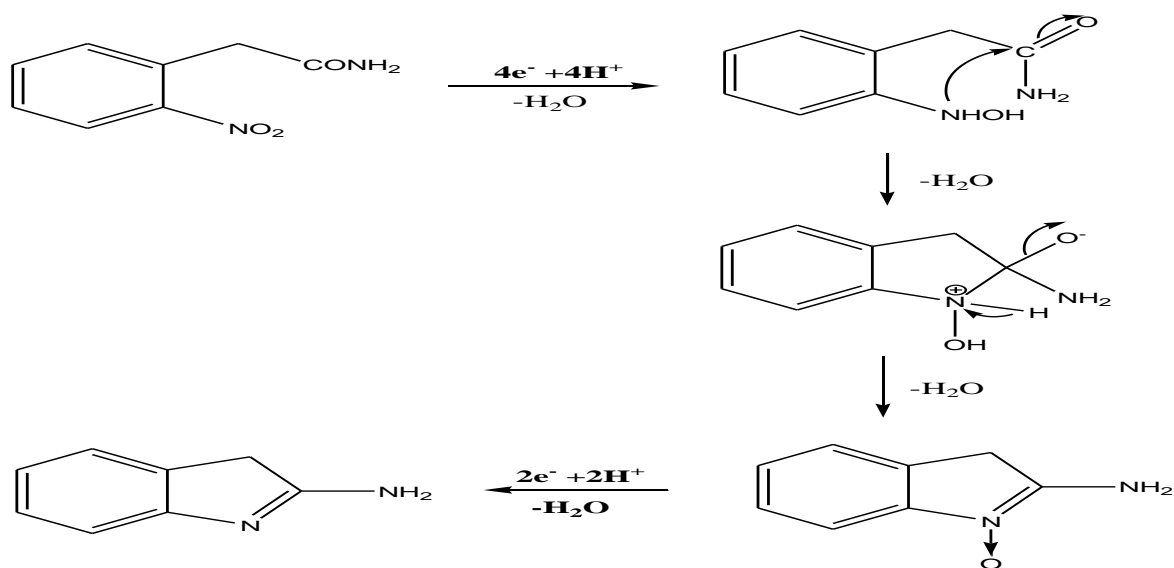


Schéma.2 Mécanisme proposé pour la formation de 3H-Indol-2-ylamine (F3).

3. Evaluation de l'électro-activité des produits d'arrivée.

Une analyse par voltammétrie différentielle DPV a été réalisée sur les trois produits d'arrivée avec une concentration de $5 \times 10^{-3} M$ sur une électrode de carbone vitreux (GCE) à différents pH.

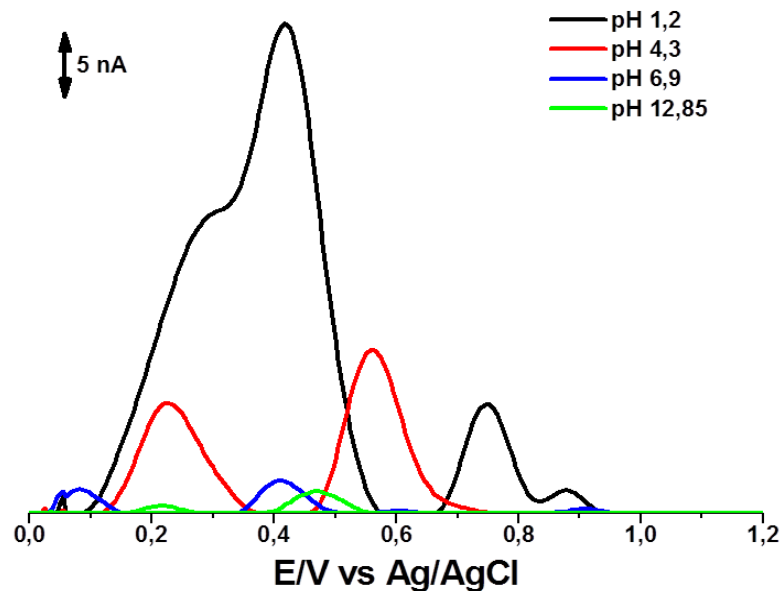


Fig.3 Voltammogrammes impulsions différentiels d'une solution de F1 à une concentration de $5 \times 10^{-3} M$ sur une GCE.

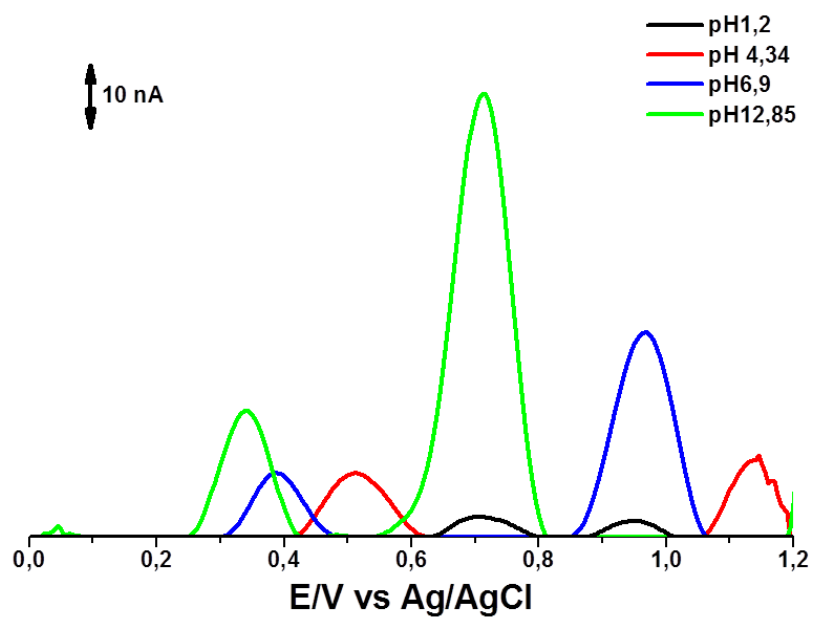


Fig.4 Voltammogrammes impulsions différentiels d'une solution de F2 à une concentration de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ sur une GCE.

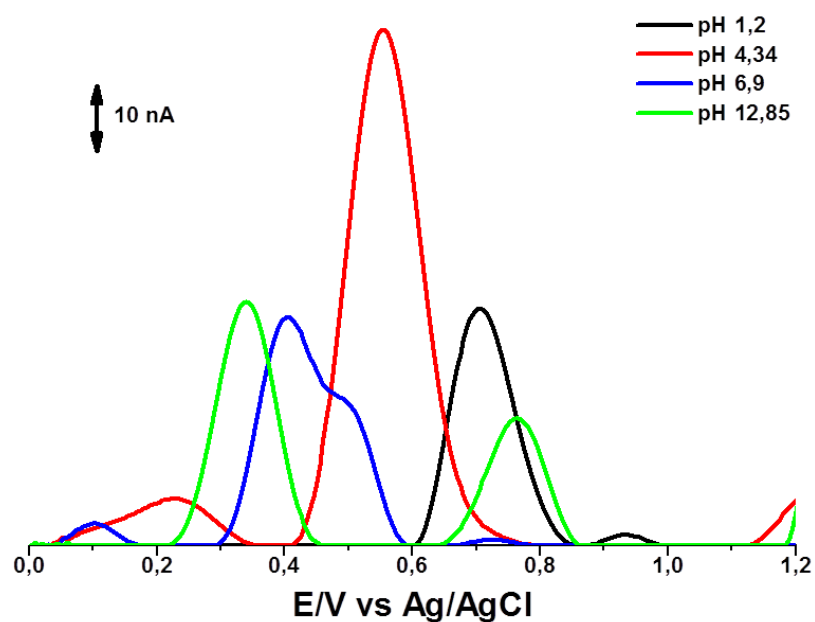


Fig.5 Voltammogrammes impulsions différentiels d'une solution de F3 à une concentration de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ sur une GCE.

Tableau.4 Valeurs des potentiel (E) et intensités (I) des pics d'oxydation des produits d'arrivée

Produit \ pH	1.2		4.3		6.9		12.85	
	E_1 (V vs Ag/AgCl)	$I_1 10^{-8}$ (A)	E_1 (V vs Ag/AgCl)	$I_1 10^{-8}$ (A)	E_1 (V vs Ag/AgCl)	$I_1 10^{-8}$ (A)	E_1 (V vs Ag/AgCl)	$I_1 10^{-8}$ (A)
F1	0.29	2.39	0.23	0.89	0.21	0.058	0.08	0.19
F2	0.71	0.316	0.51	1.01	0.39	1.01	0.33	1.98
F3	0.70	3.58	0.55	7.78	0.40	3.43	0.34	3.67

D'après les **Figures 3, 4 et 5**, on constate que le produit F1 est plus électro-actif dans les milieux acides pH=1.2 avec un pic intense à un potentiel de 0.29V. Par contre, les produits F2 et F3 présentent une électro-activité importante dans des milieux très alcalin pH=12.25 avec un potentiel de ~0.33V. (**Tableau.4**)

Tableau.5 Equations des potentiels des pics d'oxydation par unité de pH des produits d'arrivée.

Produit	Equation	r
F1	$E_p = -0.02pH + 0.314$	0.99
F2	$E_p = -0.03pH + 0.680$	0.91
F3	$E_p = -0.03pH + 0.689$	0.93

Les potentiels des pics d'oxydation présentent une dépendance linéaire du pH. Une pente de ~ 30 mV par unité de pH, montre que le nombre de protons transférés est la moitié du nombre d'électrons impliqués dans le mécanisme d'oxydation. (**Tableau.5**)

4. Test de cytotoxicité des produits d'arrivée

Pour mesurer le pouvoir de toxicité des produits d'arrivée, un test de cytotoxicité Brine Shrimp sur les larves d'*Artemia salina* a été réalisé. La concentration létale médiane (LC_{50}) est une mesure quantitative indicative du taux de toxicité d'un produit. Cette valeur exprime la concentration du produit causant la mort de 50% d'une population animale (larves d'*Artemia salina*). Le teste a été réalisé pour mesurer la toxicité des produits d'arrivée à trois concentrations différentes 10, 100 et 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. L'ensemble des résultats obtenus montrent une corrélation linéaire approximative entre les concentrations testées et le pourcentage de mortalité. (**Tableau.6**)

Tableau.6 Taux de mortalité en fonction de la concentration des produits d'arrivée.

Produits	(%Mortalité ± SD)		
	Concentration µg / mL		
	1000	100	10
F1	20 ± 0.82 ^{**} ; □	05 ± 0.58	—
F2	32.5 ± 0.5 ^{***} ; □□□	7.5 ± 0.5 [*]	—
F3	15 ± 0.58 ^{**}	—	—
Contrôle négatif	—	—	—

(□) P<0.05; (□□) P<0.01; (□□□) P<0.001 [tous les produits vs contrôle négatif].
 (•) P<0.05; (••) P<0.01 (•••) P<0.001 [1000 µg / ml vs 100 µg / ml].

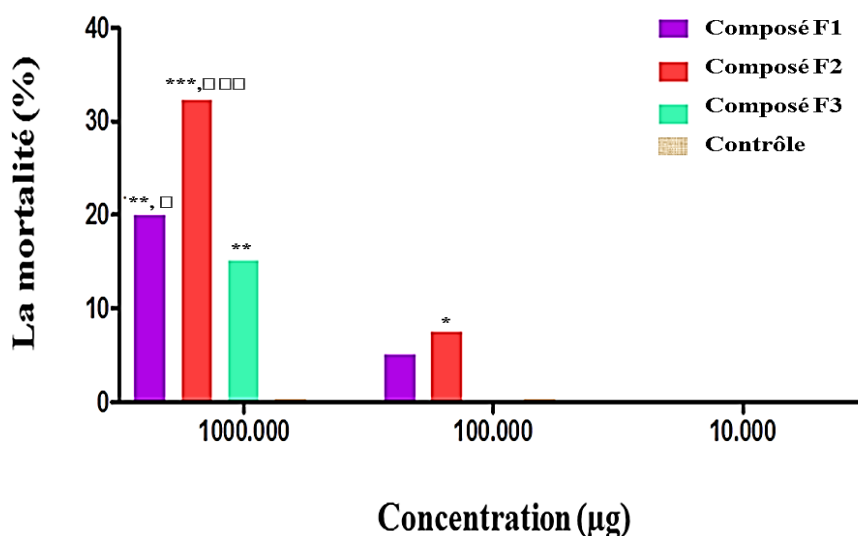


Fig.6 Histogramme du taux de mortalité en fonction des concentrations des produits d'arrivée.

La concentration létale médiane (LC₅₀) a été calculée après 24 heures à l'aide d'un logiciel, BioStat-2008 basé sur l'analyse Finney Probit².

Tableau.7 Concentration létale médiane (LC₅₀) des produits d'arrivée.

Produits	LC ₅₀ (µg/mL)
F1	11641.849
F2	3239.168
F3	1841.624

Les valeurs de LC₅₀ de nos produits ont été exprimées en µg/mL, les résultats présentés dans le **tableau.7** montrent que le composé F1 présente une toxicité moins que le produit F2 avec une LC₅₀ de 11641.85 µg/mL, 1841.62 µg/mL successivement. Tandis que F3 montre plus de toxicité par rapport aux F1 et F2 avec une LC₅₀ de 3239.17 µg/mL³.

² D.J. Finney, "Probit Analysis." Cambridge University Press, London (1971) 68–72.

³ P. N. Solis, C. W. Wright, M. M. Anderson, M. P. Gupta, J. D. Phillipson, "A microwell cytotoxicity assay using Artemia salina (brine shrimp)." *Planta Med.* (1993) 59 (3):250-252.

PARTIE II

Chapitre 3

ELECTROCHIMIE DU BEVACIZUMAB

1. Electrochimie des acides aminés électroactifs de l'anticorps Bevacizumab (BEVA)

La structure fondamentale des protéines redox est constituée de sites catalytiques connectés par des chaînes redox. Ces sites peuvent être définis comme des centres redox multi-électrons ou des groupes de centres redox mono-électron qui interagissent avec les substrats et agissent comme sources ou puits d'électrons¹. Le comportement électrochimique de ces protéines, a été étudié au cours des dernières années à l'aide des électrodes solides via l'immobilisation des protéines sur la surface des électrodes².

Parmi les 20 acides aminés qui constituent les protéines, seuls les résidus de tyrosine (Tyr), tryptophane (Trp), histidine (His), cystéine (Cys) et méthionine (Met) sont aptes à s'oxyder sur des électrodes de carbone vitreux, en présentant un mécanisme de transfert d'électrons dépendant du pH du milieu. (Schéma.1)

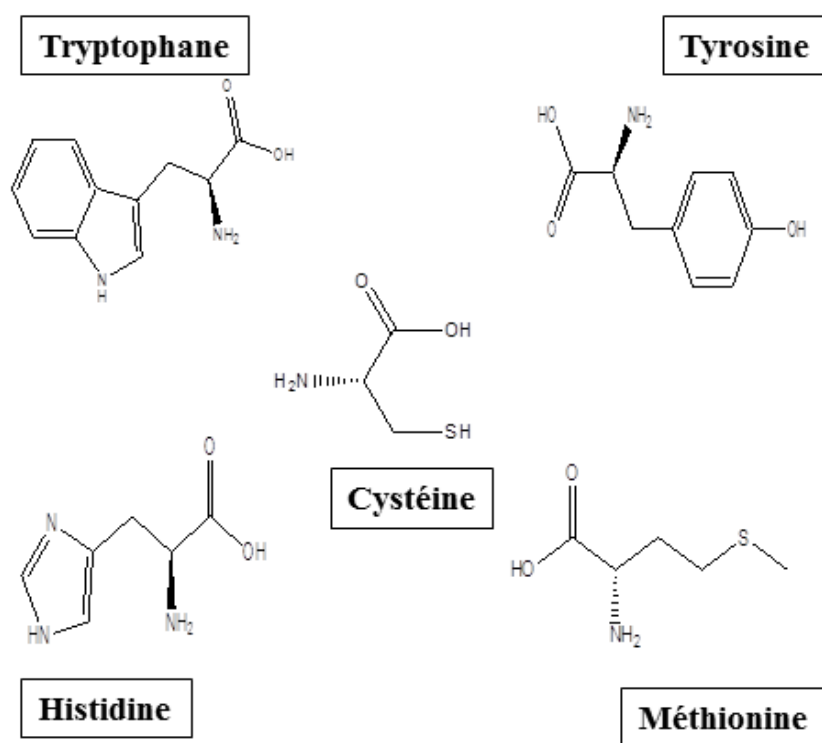


Schéma.1 Structures chimiques des acides aminés électroactifs.

¹ S. Prabhulkar, H. Tian, X. Wang, J. Zhu, C. Li "Engineered Proteins: Redox Properties and Their Applications." » *Antioxid Redox Signal* (2012) 17 (12) 1796-1822.

² E. Paleček, F. Scheller, J. Wang, "Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics." Elsevier (2005).

L'oxydation de l'acide aminé tyrosine conduit à la formation d'un radical instable, puis à une ortho-quinone réversiblement réduite en catéchol par un mécanisme de deux électrons et deux protons³. (Schéma.2)

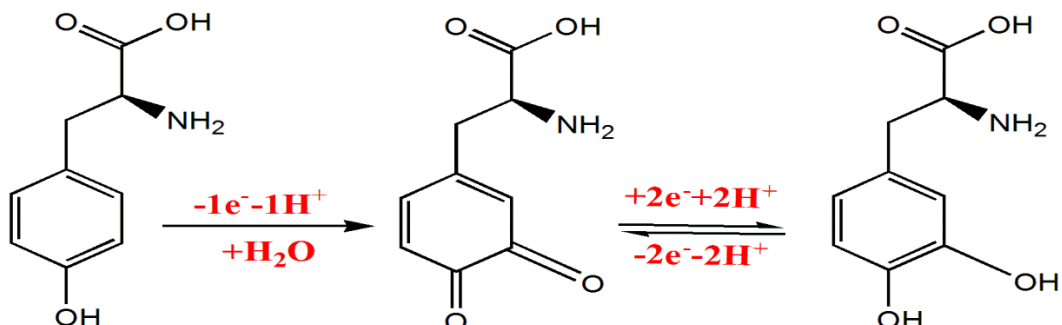
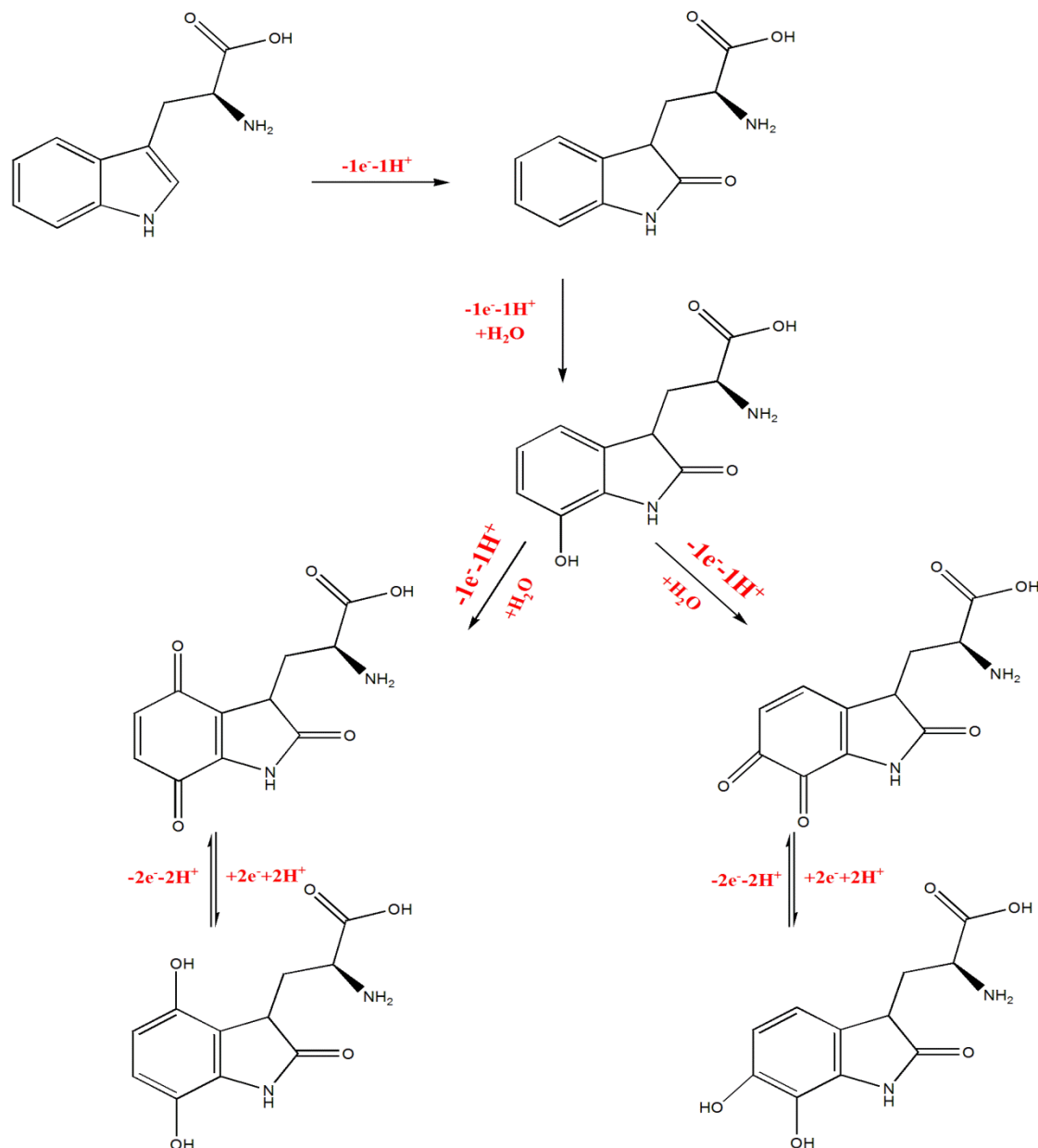


Schéma.2 Mécanisme proposé d'oxydation électrochimique de l'acide aminé Tyrosine⁴.

D'après ENACHE et OLIVEIRA BRETT, l'oxydation du tryptophane se produit en deux étapes irréversibles, l'oxydation du cycle pyrrole et l'hydroxylation de la fraction benzène. La deuxième étape conduit à la formation de deux produits électroactifs qui s'adsorbent sur la surface de l'électrode³. (Schéma.3)

³ T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett, « Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): Direct electrochemical oxidation on carbon electrodes. » *Bioelectrochemistry* (2013) 89, 11-18.

⁴ T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, "Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways." *J. Electroanal. Chem.* (2011) 655, 9-16.



Schema.3 Mécanisme proposé d'oxydation électrochimique de l'acide aminé Tryptophane⁵.

L'acide aminé cystéine subit une oxydation du groupement sulfhydryle et une formation d'un pont disulfide entre deux fractions cystéines similaires, ce qui conduit à la formation d'un cystine³.

D'après ENACHE et OLIVEIRA BRETT, l'oxydation de la méthionine sur la surface d'un GCE, se développe en deux étapes qui correspondent à la formation d'un sulfoxyde ensuite un sulfone⁶.

⁵ T. A. Enache, "Mecanismos redox de compostos aromáticos, aminoácidos e proteínas, em eléctrodos de carbono." Dissertação, Universidade de Coimbra, Portugal (2011).

⁶ T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett "Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behavior of cysteine and methionine." *Bioelectrochemistry* (2011) 81, 46–52.

L'oxydation de l'acide aminé histidine se produit en une seule étape irréversible pour former la 2-oxo-histidine via un transfert d'un électron et un seul proton ($6.0 < \text{pH} < 9.0$)³.

Dans ce manuscrit, la réponse électrochimique d'un anticorps monoclonal nommé Bevacizumab ou Avastin sur une électrode de carbone vitreux, a été étudié, par plusieurs méthodes : la voltampérométrie cyclique (CV), la voltammétrie à onde carrée (SWV), la voltampérométrie différentielle (DPV) et la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS).

L'anticorps BEVA est constituée de 452 acides aminés de la chaîne lourde et 214 acides aminés de la chaîne légère, le nombre des résidus d'acides aminés identifiés comme électroactifs est de 80 acides aminés: 33 Tyr, 12 Trp, 16 Cys, 14 His et 5 Met⁷. Ces acides aminés sont distribués au hasard au long de la chaîne polypeptidique, dont la plupart sont présents dans la région Fab de BEVA.

Cette partie du travail s'articule sur l'influence du pH du milieu sur le comportement électrochimique du BEVA en solution, en forme native et sous l'effet des agents dénaturants. Ce comportement a été déterminé à partir de la variation de la position du potentiel du pic et l'intensité du courant.

L'adsorption des produits redox a été déterminée à partir de la diminution de l'intensité du courant par rapport au nombre de balayages. Le nombre de protons et d'électrons transférés, a été estimé à partir du déplacement du potentiel des pics en fonction du pH du milieu. D'un autre côté, les voltammogrammes de SWV et CV ont été utilisés pour étudier la réversibilité et / ou l'irréversibilité du mécanisme réactionnel du système.

1. Bevacizumab en solution

Le comportement électroactif de l'anticorps BEVA sous sa forme native a été étudié dans des électrolytes support de pH variant de 3.4 à 9.25, par trois techniques voltammétrique : CV, DPV et SWV.

2.1. Voltammétrie cyclique

Les voltammogrammes cycliques d'une solution de 5 mg mL^{-1} du BEVA sur une électrode de carbone vitreux dans des électrolytes à différents pH, permet de mettre en évidence son comportement électrochimique.

⁷ <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00112>.

Les balayages entre + 0,0 V et + 1,4 V à une vitesse de 100 mV/s (**Figure.1**), font apparaître un signal redox irréversible. Au balayage allée, on voit un pic à 0.88 V correspond au signal caractéristique des acides aminés électroactifs du BEVA. Au retour aucun pic n'a été détecté, indiquant un système irréversible.

En augmentant le pH du milieu, l'oxydation se décale à un potentiel de moins en moins anodique. Ceci illustre l'influence du pH du milieu sur le mécanisme d'oxydation du BEVA. (**Figure.1**)

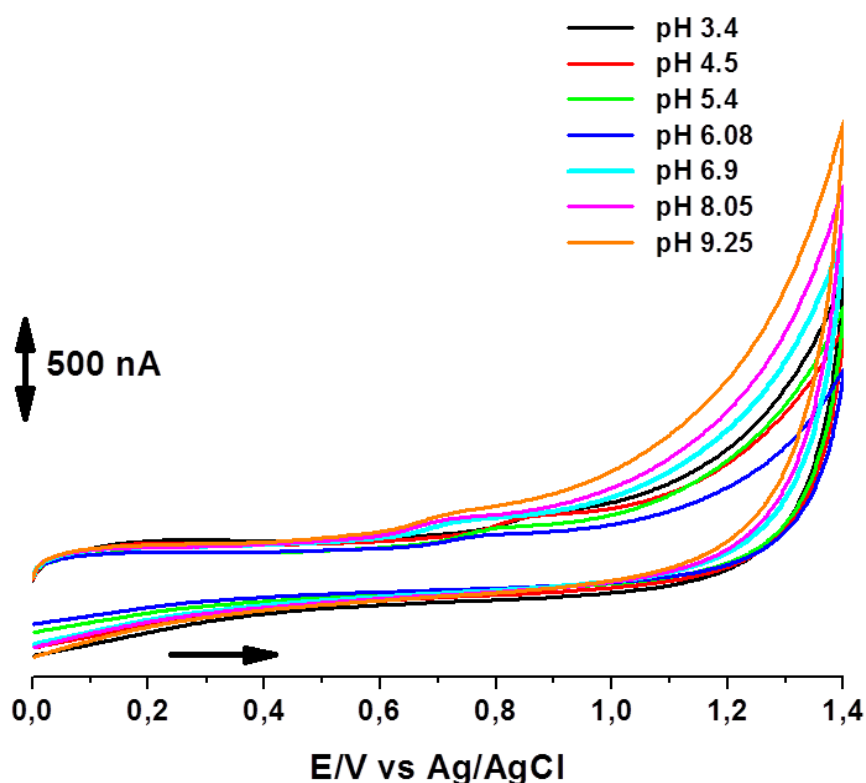


Fig.1 Voltammogrammes Cycliques (1^{er} cycle) d'une solution BEVA de 5 mg mL⁻¹ sur une électrode GCE à différents pH. Vitesse de balayage de potentiel : 100 mVs⁻¹

Les potentiels des pics sont en accord avec la littérature^{8,3}, le pic présenté sur le voltammogramme, correspond à l'oxydation électrochimique des acides aminés : tyrosine (Tyr) et tryptophane (Trp).

L'adsorption des espèces non électroactives bloque la surface de l'électrode, aucun pic n'a été observé au deuxième cycle.

⁸ a) B. Malfroy, J.A. Reynaud, "Electrochemical Investigations of Amino Acids at Solid Electrodes: Part II. Amino Acids Containing no Sulfur Atoms: Tryptophan Tyrosine, Histidine and Derivatives." *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem* (1980) 114 (2) 213-223, b) J.A. Reynaud, B. Malfroy, P. Canesson, "Electrochemical Investigations of Amino Acids at Solid Electrodes: Part I. Sulfur components: Cystine Cysteine, Methionine" *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem*. (1980) 114 (2) 195-211.

Tableau.1 Potentiels d'oxydation des acides aminés individuels, dans un tampon phosphate pH = 7.0 (0.1 M) ^{3,6,8}.

Acide aminé	E_{p1a} / V	E_{p2a} / V	E_{p3a} / V
Tyrosine (Tyr)	0,63	-	-
Tryptophane (Trp)	0,63	1,08	-
Histidine (His)	1,15	-	-
Cystéine (Cys)	0,52	0,88	1,27
Méthionine (Met)	1,12	-	-

2.2. Voltammétrie Impulsionnelle Différentielle (DPV)

La **Figure.2 (A)** montre les voltammogrammes impulsionnels différentiels obtenus pour une solution de 5 mg mL^{-1} du BEVA dans des électrolytes support de pH variant de 3.4 à 12.9. Un seul pic anodique a été observé. Les potentiels d'oxydation sont proportionnels au pH du milieu et suivent l'équation : $E_{pa} = 1.091 - 0,060 \text{ pH}$.

La pente de la ligne correspond à 60 mV par unité de pH, ce qui signifie le même nombre d'électrons et de protons transférés pendant l'oxydation, ainsi la largeur à mi-hauteur du pic d'oxydation $W_{1/2} = 90 \text{ mV}$, nous a permis de suggérer que le mécanisme d'oxydation du BEVA en solution implique le transfert d'un seul électron et d'un seul proton. (**Tableau.2**)

La **Figure.2 (B)** indique en parallèle que le plus haut pic a été observé dans la solution de pH = 6,08 tandis que le plus bas était dans un tampon de pH = 4,5.

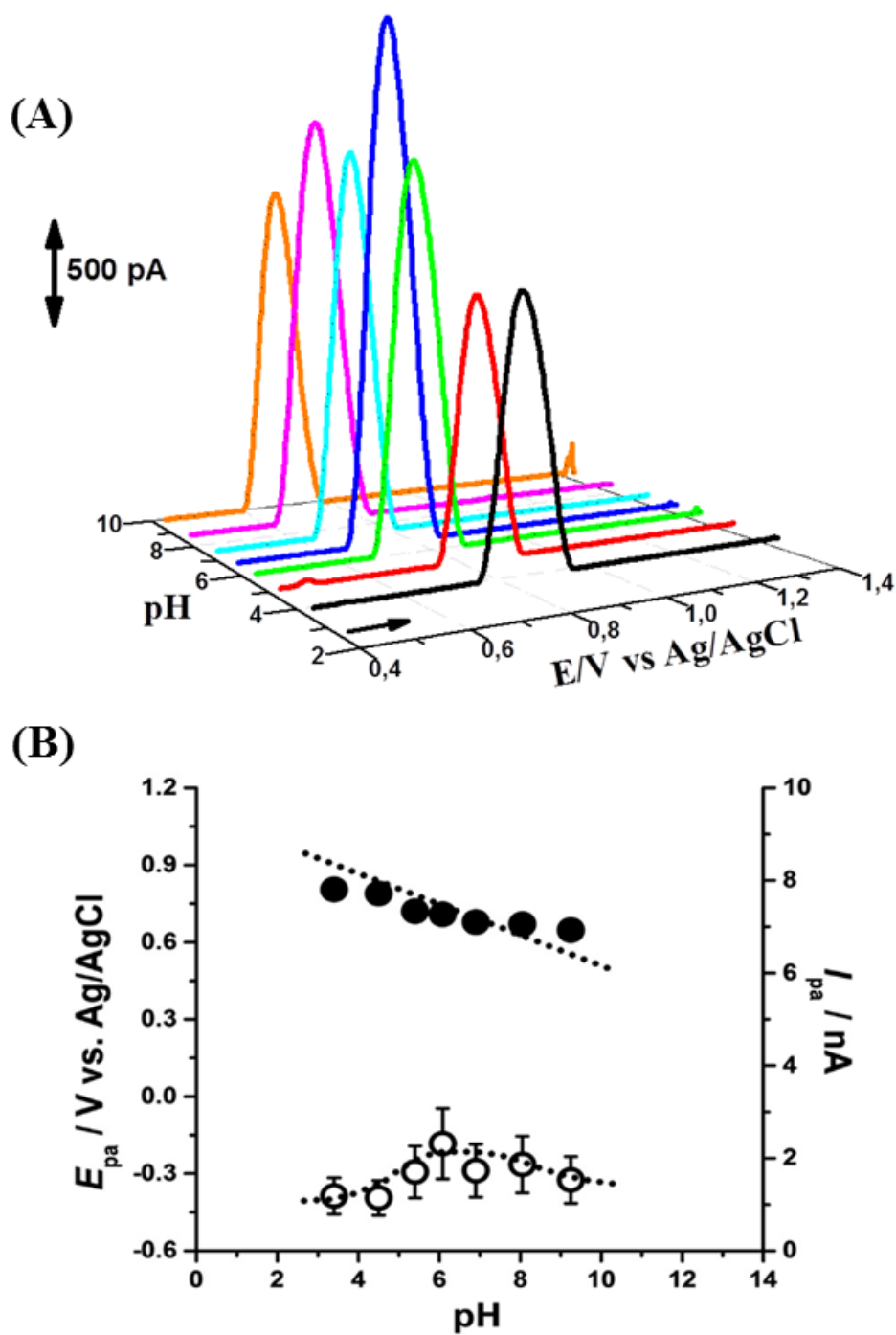


Fig.2 (A) Voltammogrammes impulsions différentiels en 3D d'une solution de 5 mg mL^{-1} du BEVA sur une GCE en fonction du pH. (B) Graphe du BEVA (○) I_{pa} et (●) E_{pa} en fonction du pH.

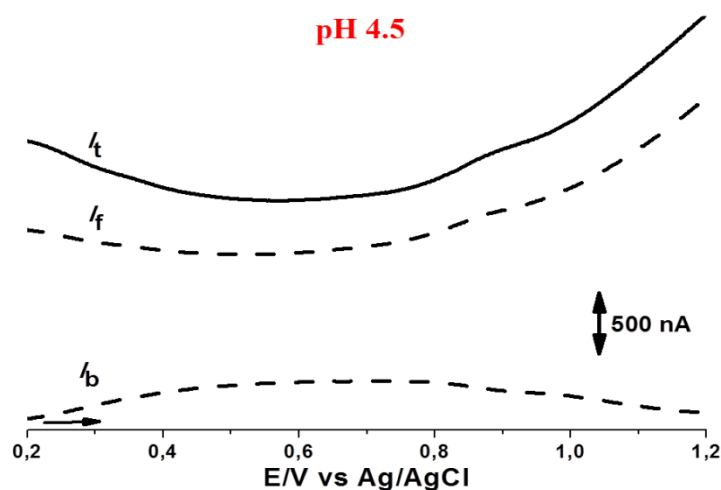
Tableau.2 Valeurs des potentiel (E) et les largeurs à mi-hauteur ($W_{1/2}$) des pics d'oxydation du BEVA 5 mg mL⁻¹ à différents tampon 0.1 M sur une électrode GCE (1^{er} cycle).

pH	E/V (vs. Ag/AgCl)	$W_{1/2} / mV$
3.4	0.81	103
4.5	0.79	97
5.4	0.72	103
6.08	0.71	103
6.9	0.68	91
8.05	0.67	107
9.25	0.65	89

2.3. Voltammétrie à vague carrée (SWV)

Des voltammogrammes à vague carrée de l'anticorps BEVA sous sa forme native ont été enregistrés pour déterminer la réversibilité du système dans des tampons de pH entre 3.4 et 9.25.

Les voltammogrammes SW présentés dans la **Figure.3** présentent un seul pic irréversible, ainsi sans nettoyage de la surface de l'électrode, aucun pic n'a été observé, ce qui correspond à une forte adsorption.



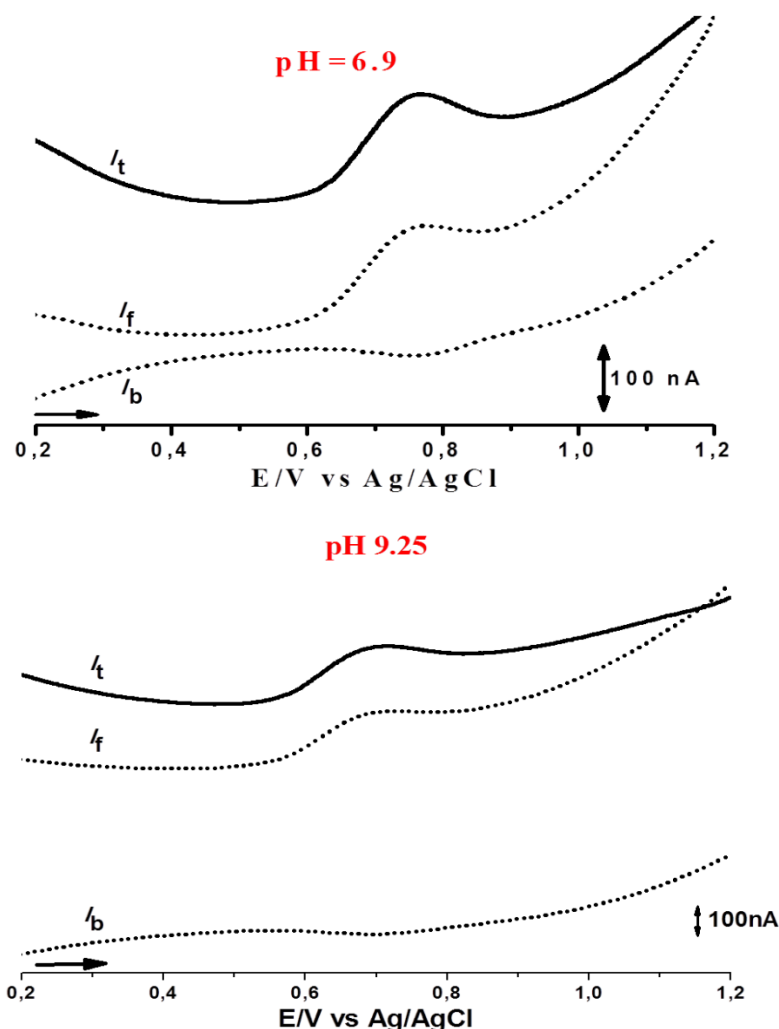


Fig.3 Voltammogrammes à vague carrée de 5 mg ml⁻¹ du BEVA sur GCE dans différents tampon (1^{er} cycle). Pulse amplitude 50 mV, fréquence 50 Hz, I_t courant totale; I_f courant aller; I_b courant retour.

3. Bevacizumab immobilisé

L'oxydation électrochimique de l'anticorps BEVA immobilisé sur la surface de l'électrode de carbone vitreux a été étudiée selon deux protocoles : native et dénaturé dans des électrolytes à pH compris entre 3,4 et 9,25. (Chapitre 1.2)

3.1. Bevacizumab native

Le comportement du film BEVA sur la surface de l'électrode GCE a été caractérisé par voltammétrie cyclique (CV) et Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS).

Les voltammogrammes DP de tri-couche de BEVA native présente un seul pic d'oxydation, dans tous les électrolytes, correspondant à l'oxydation électrochimique des résidu des acides aminés tyrosine (Tyr) et tryptophane (trp). (**Tableau.1**)

Il apparait que les pics d'oxydation sont plus intenses par rapport aux essais en solution, l'intensité maximum apparait dans un tampon phosphate à un pH = 6.9. (**Figure.4, A**)

Le potentiel du pic d'oxydation a montré une dépendance linéaire au pH, selon la relation $E_{pa} = 1.054 - 0.060 \text{ pH}$, de ce fait la pente est de -60 mV par unité de pH qui correspond aux nombres identique d'électrons et de protons transférés. La mi-hauteur du pic d'oxydation $W_{1/2} \sim 90 \text{ mV}$ correspond à un transfert d'un électron et d'un proton. (**Figure.4, B**)

L'oxydation électrochimique du BEVA en solution ou immobilisé sur la surface de l'électrode en forme native a montré un petit pic anodique dépendant du pH. Ces résultats reflètent la difficulté du processus de transfert d'électrons des acides aminés de l'anticorps sous leurs structures native. (**Tableau.3**)

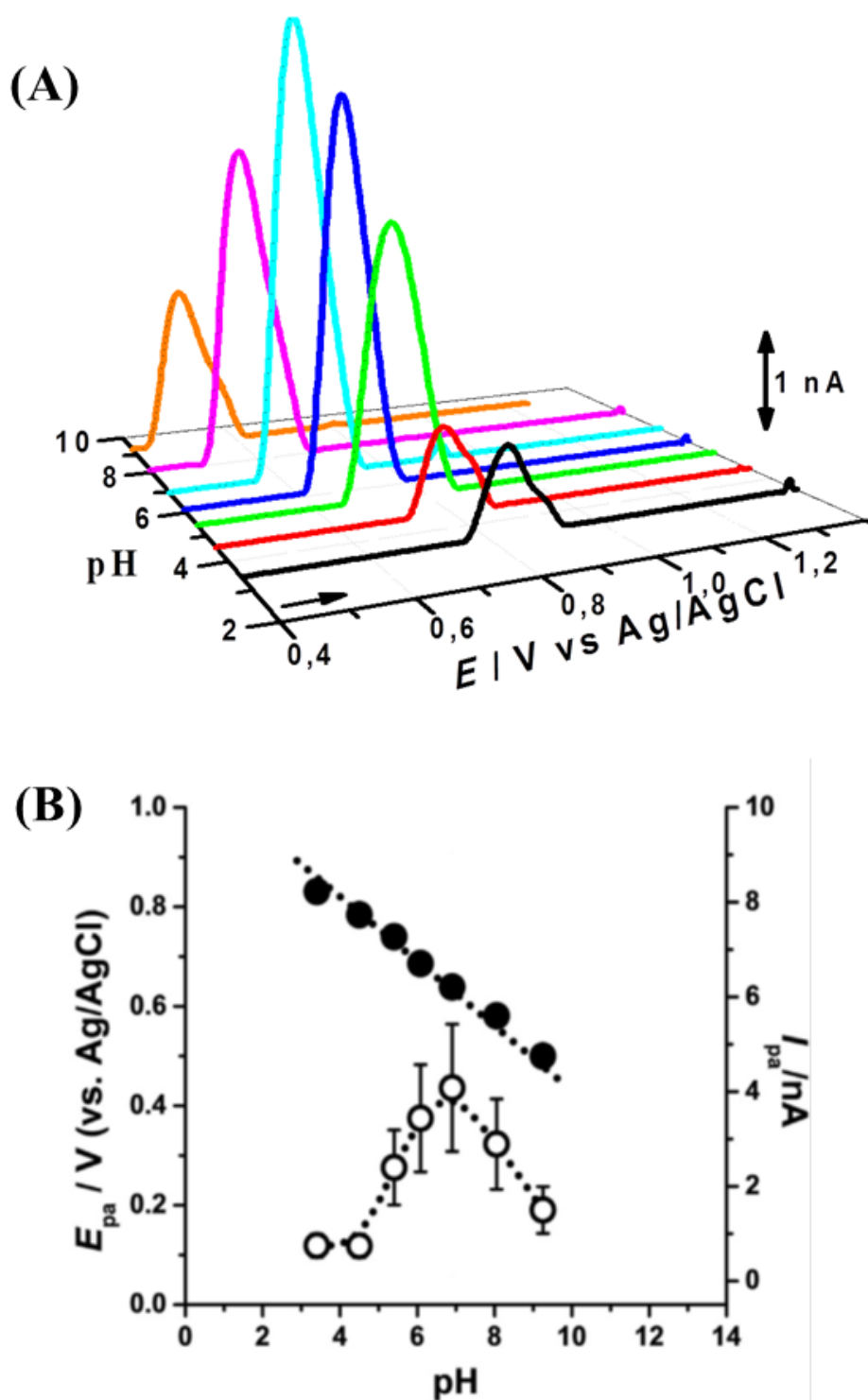


Fig.4 (A) Voltammogrammes impulsions différentiels en 3D du BEVA immobilisé sur la surface d'une GCE en fonction du pH. (B) graphe du BEVA (●) I_{pa} et (○) E_{pa} en fonction du pH.

Tableau.3 Valeurs des potentiel (E) et les largeurs de mi-hauteur ($W_{1/2}$) du pic d'oxydation du biocapteur GCE-BEVA native à différents pH (1^{er} cycle).

pH	E / V (vs. Ag/AgCl)	$W_{1/2} / mV$
3.4	0.83	83
4.5	0.78	95
5.4	0.74	109
6.08	0.69	89
6.9	0.64	97
	0.91	24
8.05	0.58	103
9.25	0.50	97

▪ Spectroscopie d'impédance électrochimique de l'électrode modifiée

Le couple redox $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ est fréquemment utilisé comme une sonde électroactive (système réversible), pour caractériser les propriétés des couches vis-à-vis des transferts d'électrons. (Figure.5)

Les voltammogrammes enregistrés avant la modification montrent des pics réversibles du couple redox $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$, qui correspond au transfert électronique sonde-surface GCE.

Après immobilisation, on observe une diminution de l'intensité des pics, correspondant au blocage de la surface de l'électrode. (Figure.6)

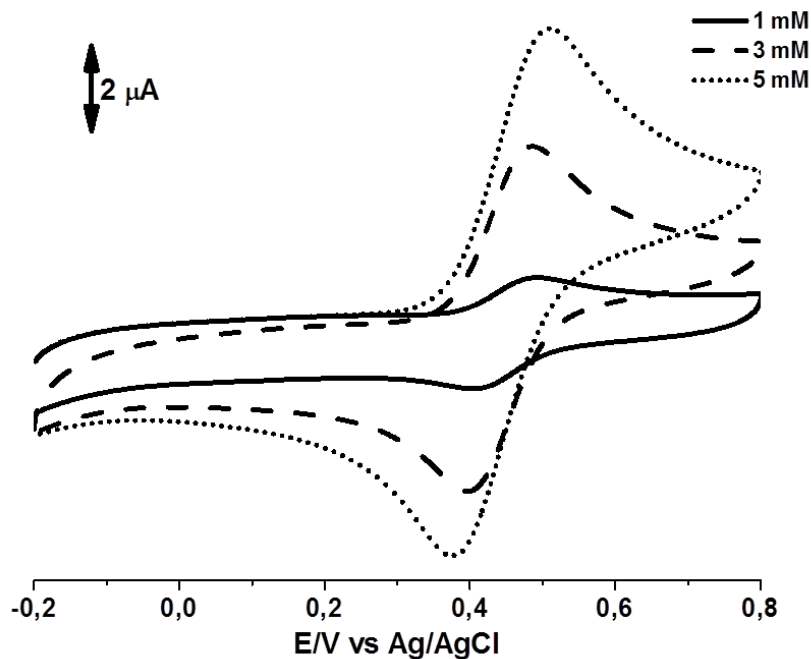


Fig.5 Voltammogrammes cycliques d'une solution de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ à différentes concentrations dans un tampon phosphate 0.1 M (pH = 6.9).

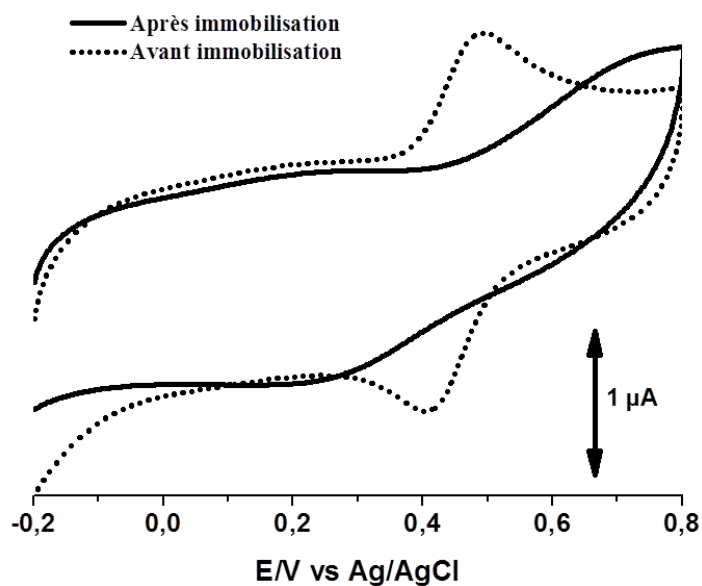


Fig.6 Voltammogrammes cycliques du couple redox $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ avant et après immobilisation du BEVA sur la surface de GCE, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

L'effet de la couche immobilisée sur la surface de l'électrode de carbone vitreux a été évalué par spectroscopie d'impédance électrochimique dans une solution aqueuse de 0.1M KCl en présence du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ à pH = 6.9.

D'après les deux voltammogrammes enregistrés précédemment, la perturbation appliquée était à une tension imposée de +0.45 V pour l'électrode propre, et de +0,52 V pour GCE-BEVA ; six domaines de fréquences : 0.1 Hz-1 Hz-10 Hz-100 Hz-1000 Hz-10 000 Hz-50500Hz, ont été utilisés.

Les mesures de l'EIS, ont été réalisées avant et après immobilisation du BEVA sur la surface de l'électrode dans une solution de concentrations 1, 3 et 5 mM du $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ dans un tampon de phosphate 0,1 M pH 6,9. (**Figure.7**)

Avant l'immobilisation, le diagramme de Nyquist présente un demi-cercle dans les domaines de haute fréquence correspond à la présence du courant faradique (transfert de charge), et une ligne droite de 45° dans les domaines de basse fréquence correspond au phénomène de diffusion, tandis que le diagramme après immobilisation du BEVA, présente un effet capacitif.

La **Figure.7** (A) montre que l'accroissement de la concentration de la solution ferreuse influe sur la taille du demi-cercle, correspondant à l'effet du blocage de la surface, ce qui empêche le transfert électronique entre la surface de l'électrode et le couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$.

⁹ A. M. Oliveira-Brett, L. A. da Silva, C. M. A. Brett, « Adsorption of Guanine, Guanosine, and Adenine at Electrodes Studied by Differential Pulse Voltammetry and Electrochemical Impedance. » *Langmuir* (2002) 18, 2326-2330.

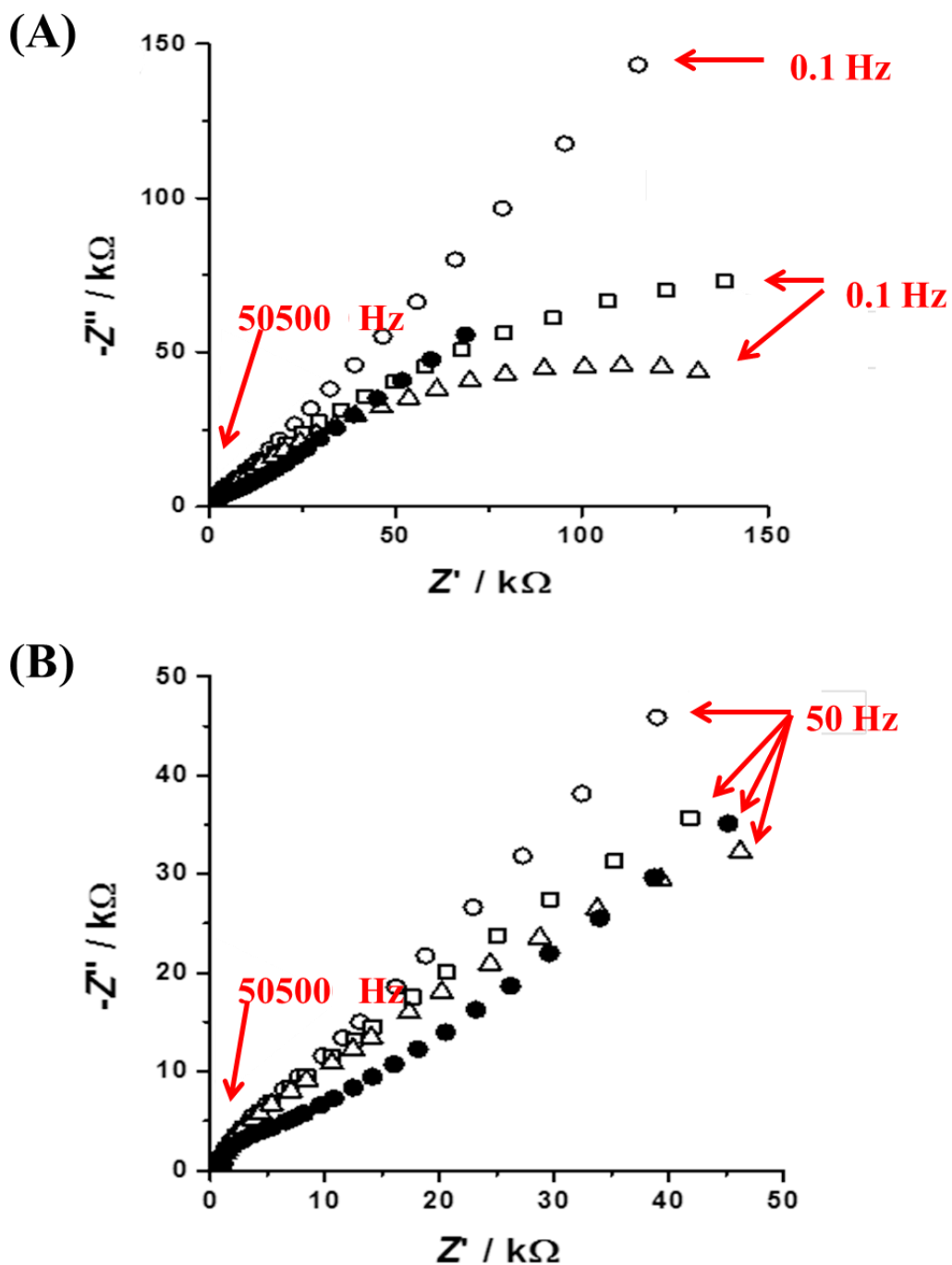


Fig.7 Diagramme de Nyquist de l'électrode GCE avant (●) et après immobilisation du BEVA dans une solution de $K_4Fe(CN)_6$ à une concentration de (○) 1 mM, (□) 3 mM et (Δ) 5 mM.
La gamme de fréquence : (A) 50500 et 0.100 Hz, (B) 50500 et 50 Hz.

3.2. Bevacizumab dénaturé

En raison de la complexité structurale des protéines, l'utilisation des agents dénaturants ou réducteurs tels que le dithiothréitol (DTT), tris (2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP) ou sodium dodecyl sulfate (SDS), est nécessaire pour un dépliement des protéines sur les surfaces solides (électrochimie direct)¹⁰.

Selon OLIVEIRA et ses collaborateurs, la SDS qui modifie la charge protéique globale en négative¹¹, le TCEP et la DTT qui clive la liaison disulfure entre les résidus de cystéine¹⁰, ont été appliqués dans le but d'améliorer le nombre des acides aminés électro-actifs exposés à la surface de l'électrode.

En considère que les agents réducteurs DTT et TCEP sont électroactif, tandis que l'agent dénaturant SDS est non électro-actif¹⁰.

Les concentrations de ces agents ont été choisies en se basant sur les protocoles d'électrophorèse cités par REINER et ses collaborateurs¹².

Le protocole de dénaturation de l'anticorps BEVA natif consiste à incuber le biocapteur GCE-BEVA, dans des solutions de SDS, TCEP ou DTT à des concentrations de 33,33 mM, 10 mM et 10 mM successivement, pendant des périodes de temps: 60, 120, 180 et 300 min.

L'incubation du biocapteur dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 6,9, pour les mêmes périodes de temps a été utilisé pour contrôle (BEVA Contrôle).

La technique de voltammétrie différentielle DPV a été appliquée afin de suivre l'effet des agents dénaturants sur le comportement électrochimique de BEVA immobilisée sur la surface du GCE.

Les voltammogrammes DP de BEVA (contrôle) ont montré deux pics d'oxydation, à $E_{pa}=+0,65$ V et $E_{pa} = +0,90$ V. (**Figure.8**)

Après incubation dans une solution de SDS, les voltammogrammes DP du biocapteur GCE-BEVA présentent trois pics d'oxydation successifs à $E_{pa} = +0,65$ V, $E_{pa} = +0,90$ V et $E_{pa}=+1,10$ V. le courant du premier pic est beaucoup plus élevée que BEVA contrôle. (**Figure.8, A**)

¹⁰ I. B. Santarino, S. C. B. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett, "Protein reducing agents dithiothreitol and tris (2-carboxyéthyl) phosphine anodic oxidation." *Electrochem. Com.* (2012) 23, 114-117.

¹¹ S. C. B. Oliveira, I. B. Santarino, A. M. Oliveira-Brett, « Direct Electrochemistry of Native and Denatured Anticancer Antibody Rituximab at a Glassy Carbon Electrode." *Electroanalysis* (2013) 25 (4) 1029 – 1034.

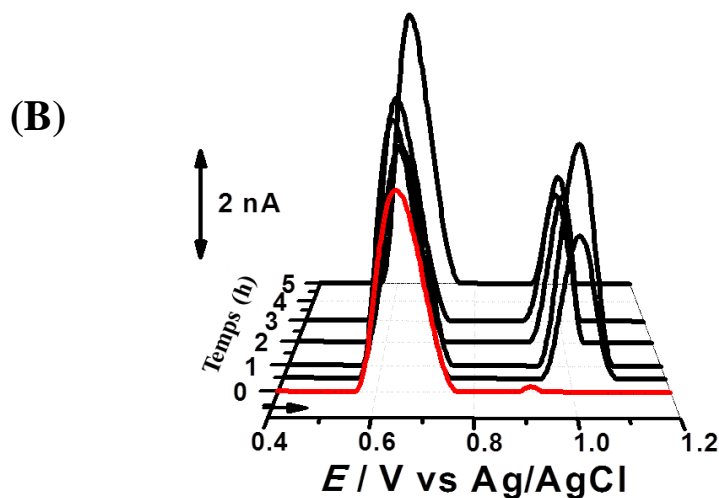
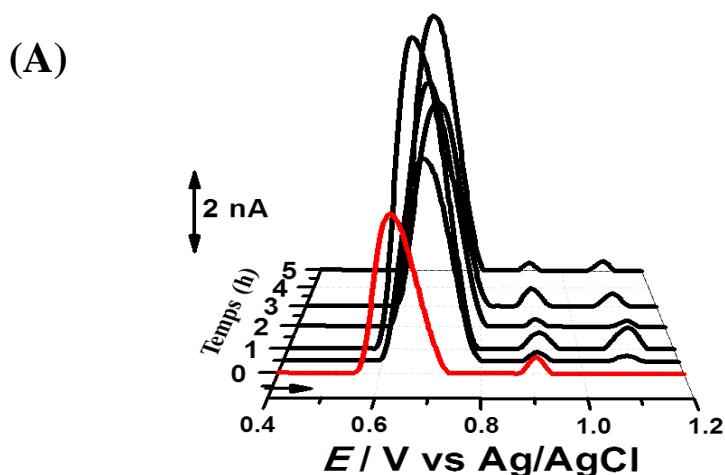
¹² W. Reiner, T. Naven, *Proteomics in Practice*, Wiley-VCH, Berlin (2002).

Des résultats similaires ont été observés après incubation dans TCEP, mais le courant du premier pic d'oxydation ($E_{pa} = +0,65$ V) a connu une diminution. Par contre des courants plus élevés ont été observés pour le deuxième pic à un potentiel plus élevé. **(Figure.8, C)**

Après incubation dans DTT, les voltammogrammes DP ont présenté deux pics d'oxydation avec des courants nettement améliorés, à $E_{pa} = +0,65$ V et $E_{pa} = +1,00$ V. **(Figure.8, B)**

La dénaturation du BEVA conduit à des modifications morphologiques de sa structure 3D, trois réactions de transfert de charge consécutives ont été observées. Le premier pic d'oxydation à $E_{pa} = +0,65$ V, correspond à l'oxydation du résidu Tyrosine et Tryptophane. Le deuxième à $E_{pa} = +0,93$ V est dû à l'oxydation du résidu cystéine et le troisième pic à $E_{pa}=1,10$ V, est attribué au résidu histidine.

L'agent tensio-actif anionique SDS a permis d'augmenter le nombre de résidus d'acides aminés exposés à la surface de l'électrode, ce qui explique le nombre des pics et leurs intensités.



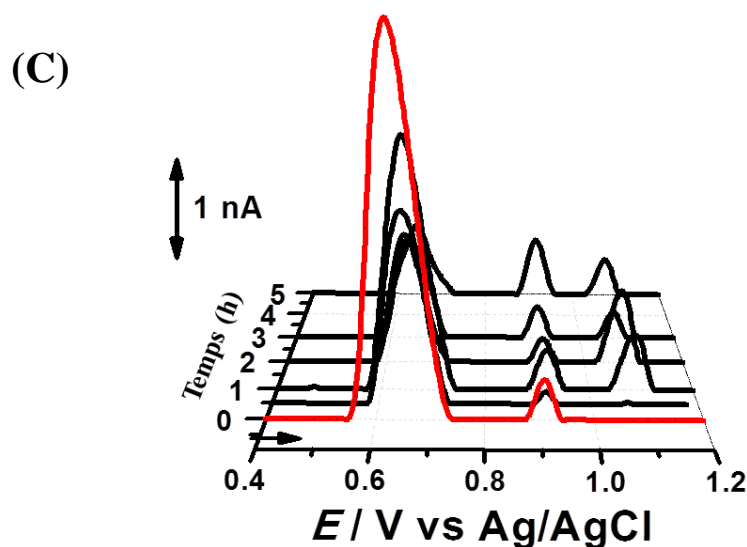


Fig.8 Voltammogrammes DP du BEVA immobilisé sur une électrode GCE (—) avant et (—) après incubation dans (A) 33.33 mM SDS, (B) 10 mM DTT et (C) 10 mM TCEP dans un tampon phosphate pH=6.9.

4. Profil d'hydrophobicité du Bevacizumab (Kyte-Doolittle)

Le caractère d'hydrophobicité des acides aminés se base sur la tendance de construire des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau. L'échelle Kyte-Doolittle¹³, permet de calculer le profil d'hydrophobicité d'une protéine à partir de sa séquence. (**Tableau.4**)

On décrit souvent dans la littérature que la surface hydrophobe est plus favorable à l'adsorption des protéines par rapport à la surface hydrophile^{3, 14}. Dans ce contexte, il est important de connaître l'hydrophobicité afin d'identifier les différentes caractéristiques de notre anticorps. D'après ENACHE et OLIVEIRA-BRETT³, La surface de l'électrode à carbone vitreux présente un caractère hydrophobe favorisant ainsi les domaines hydrophobes d'une protéine.

Le profil d'hydrophobicité Kyte-Doolittle pour les chaînes légères et lourdes de BEVA, a montré un caractère hydrophile général avec des séquences hydrophobes intercalées. (**Figure.9**)

¹³ J. Kyte, R. F. Doolittle, "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein." *J. Mol. Biol.* (1982) 5;157 (1):105-32.

¹⁴ (a) S.J. Haward, P.R. Shewry, M.J. Miles, T.J. McMaster, "Direct real-time imaging of protein adsorption onto hydrophilic and hydrophobic surfaces." *Biopolymers* (2010) 93, 74–84. (b) M. Wahlgren, T. Arnebrant, "Protein adsorption to solid surfaces." *Trends Biotechnol.* (1991) 9,201–208.

Tableau.4 Echelle d'hydrophobie de Kyte-Doolittle¹³.

Acide aminé	KD hydrophathie	Acide aminé	KD hydrophathie
Ala	+1.8	Leu	+3.8
Arg	-4.5	Lys	-3.9
Asn	-3.5	Met	+1.9
Asp	-3.5	Phe	+2.8
Cys	+2.5	Pro	-1.6
Gln	-3.5	Ser	-0.8
Glu	-3.5	Thr	-0.7
Gly	-0.5	Trp	-0.9
His	-3.2	Tyr	-1.3
Lle	+4.5	Val	+4.2

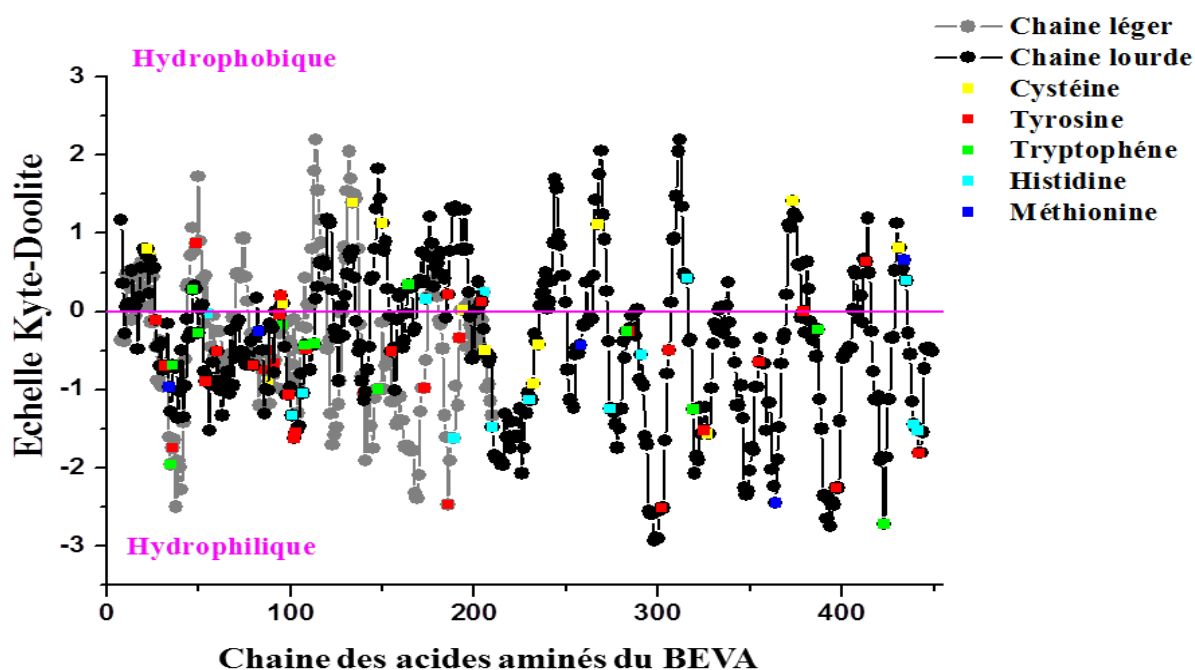


Fig.9 Profil d'hydrophobicité des séquences des amino acides de l'anticorps BEVA (—) chaîne légère et (—) chaîne lourde.
Tyr (rouge), Trp (vert), Met (bleu), (cyan) His, Cys (jaune).

5. Etude comparative entre les anticorps Rituximab et Bevacizumab

Rituximab (Mabthera®) RTX (1993) est un anticorps murin chimérique / monoclonal humain de type IgG1, qui se fixe sur l'antigène CD20 à la surface des lymphocytes B normaux et malins. Il se compose de deux chaînes lourdes de 451 acides aminés et de deux chaînes légères de 213 acides aminés¹¹ et englobe au total 76 résidus d'acides aminés électroactifs: 31 Tyr, 13 Trp, 16Cys, 13His et 3 Met.

RTX est indiqué pour le traitement de plusieurs maladies comme la leucémie lymphoïde chronique et le lymphome non hodgkinien¹⁵.

D'après OLIVEIRA et ses collaborateurs¹¹, les voltammogrammes obtenus pour l'anticorps RTX dénaturé dans une solution de DTT, ont montré un courant d'oxydation plus élevé suivi par deux nouveaux pics, correspondant à l'oxydation des résidus d'acides aminés tryptophane et histidine, confirmant la forte réactivité de la DTT pour favoriser un dépliage total de la structure RTX. Le troisième pic, dû aux transformations morphologiques lentes de RTX déposé sur la surface de l'électrode.

La dénaturation par l'agent SDS a montré une progression du courant de pic d'oxydation des résidus d'acides aminés de tyrosine et de tryptophane due à l'orientation du Rituximab, ce qui améliore le transfert électronique entre les résidus de tyrosine et tryptophane et la surface de l'électrode¹¹.

D'un autre côté, l'influence du TCEP sur le déploiement de la structure tridimensionnelle du RTX n'est pas aussi importante que celle du DTT¹¹.

La dénaturation de RTX et BEVA avec des agents dénaturants SDS, DTT ou TCEP, déploie la molécule, améliore la réponse électrochimique et la sensibilité. Le SDS et le TCEP augmentent l'intensité du pic d'oxydation des résidus d'acides aminés tyrosine et tryptophane, alors que le DTT permet de détecter les pics d'oxydation des acides aminés tyrosine, tryptophane et histidine.

BEVA et RTX partagent des domaines constants d'immunoglobulines à chaînes lourdes et légères. L'analyse des courbes d'hydropathie a montré un profil similaire. La plupart des acides aminés électroactifs responsables des pics anodiques observés après dénaturation, existent dans les chaînes lourdes. **(Figure.10)**

¹⁵ S. M. Jaglowski, J. C. Byrd, « Rituximab in Chronic Lymphocytic Leukemia. » *Semin. Hematol.* (2010) 47, No 2, 156–169.

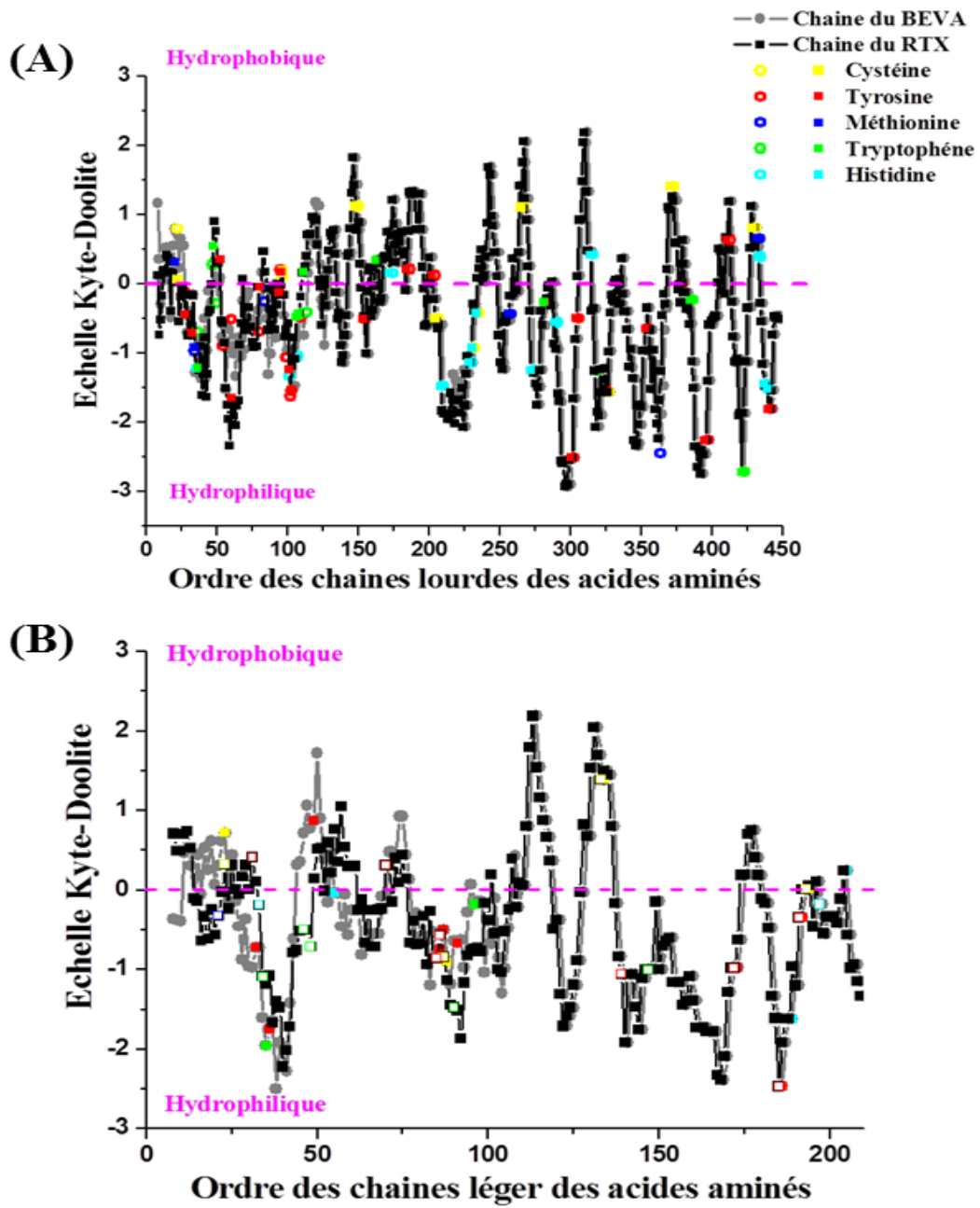


Fig.10 Profil d'hydrophobicité des séquences des acides aminés des anticorps (—) RTX et (—) BEVA ; chaînes (A) lourdes et (B) légères.

PARTIE II

Chapitre 4

ELECTROCHIMIE DES FLAVONOÏDES

‘Détection et activité AO’

1. L'activité antioxydante totale par des paramètres électrochimiques

L'activité antioxydante totale des extraits naturels est liée au comportement redox des substituants attachés aux polyphénols (ex. groupements hydroxyles, méthoxyles ...), ce qui est traduit par des pics d'oxydation (intensités (I_{pa}) et potentiels d'oxydation (E_{pa})).

Plus la valeur E_{pa} est basse, plus la capacité du donneur d'électrons est élevée et, plus l'intensité I_{pa} est élevée, plus le taux / nombre d'électrons transférés est élevé.

1.1. Standard catéchine :

Appartient à la classe des flava-3-ols, dont sa structure se compose de deux cycles aromatiques en C6 : le catéchol (cycle B) et le résorcinol (cycle A) relié par une chaîne en C3 (cycle C). (Schéma. 1)

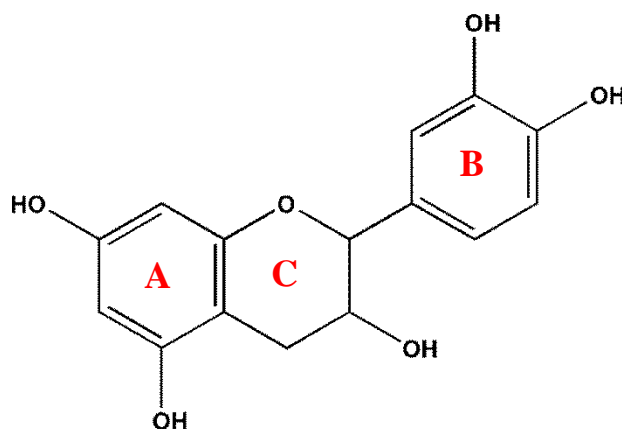


Schéma.1 Structure de la catéchine.

L'oxydation des flavonoïdes se produit en un, deux ou trois étapes, correspondant à leurs structures chimiques et leurs fragments électroactifs.

Les voltammogrammes DP enregistrés pour 10 μM de catéchine sur la surface d'une électrode de carbone vitreux (GCE) dans un électrolyte support d'un $\text{pH} = 2,2$ (solvant A de l'HPLC ; Chapitre 1.2), présente trois pics d'oxydation. (Figure.1)

D'après JANEIRO et ses collaborateurs¹, les réactions d'oxydation de la catéchine varient en fonction du pH du milieu, dont la capacité radicalaire se développe lors de la déprotonation. À cet effet, le premier pic d'oxydation se produit à un très faible potentiel (vers + 0,43V vs. Ag/AgCl/Cl⁻), ce qui implique une activité radicalaire élevée.

¹ P. Janeiro, A. M. Oliveira Brett "Catechin electrochemical oxidation mechanisms" *Anal. Chim. Acta* (2004) 518, 109–115.

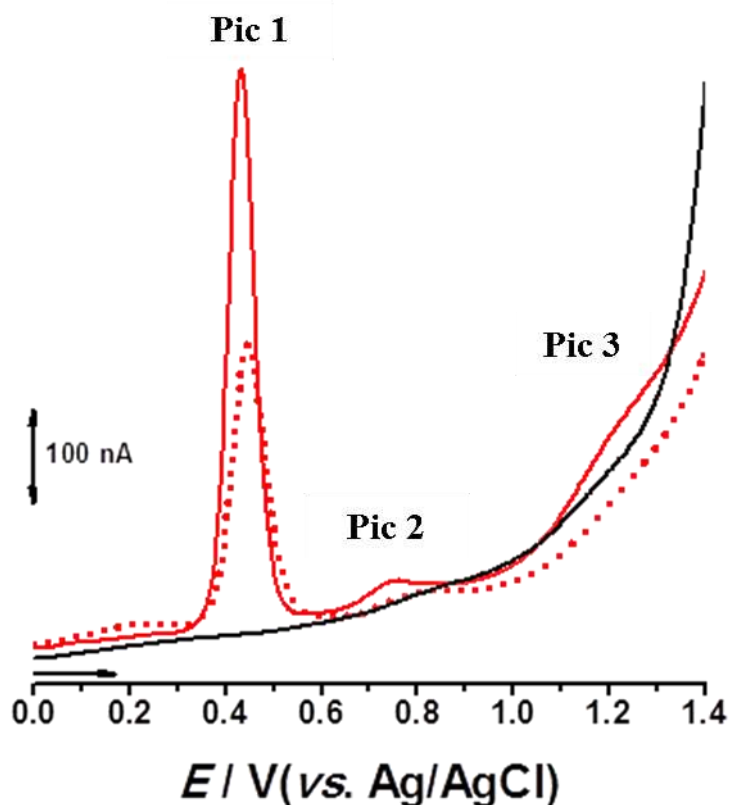


Fig.1 Voltammogrammes DP de 10 μM catéchine, sur GCE à un pH = 2.2: (—) premier scan (•••) Deuxième scan, (—) électrolyte support, vitesse de balayage 5 mVs^{-1} .

Les groupes hydroxyles attachés aux positions 5 et 7 du cycle A, 3' et 4' du cycle B et 3 du cycle C présentent un effet donateur d'électrons².

Le mécanisme d'oxydation de la catéchine est lié principalement aux groupes hydroxyle du cycle B, le plus aisé à s'oxyder, dont son potentiel d'oxydation est très faible $E_p=0.43$ V (pic 1). Les autres groupements présentent moins d'électroactivité et nécessitent un potentiel plus grand $E_p=0.74$ V (pic 2), ce qui justifie le potentiel appliqué par RP-HPLC et Chrono-ampérométrie.

L'intensité du courant du premier pic est très élevée à celle du deuxième pic, ce qui est en accord avec l'activité radicalaire élevée du catéchol.

En outre, l'intensité du courant d'oxydation dépend fortement au pH du milieu, un milieu approprié facilite la déprotonation des radicaux hydroxyles et améliore l'activité antioxydante.

² C. G.M. Heijnen, G. R.M.M. Haenen, R. M. Oostveen, E. M. Stalpers, A. Bast, "Protection of Flavonoids Against Lipid Peroxidation: The Structure Activity Relationship Revisited." *Free Radic Res* (2002) 36 (5) 575–581.

Le troisième pic à un potentiel plus élevé ($E_p=1,2$ V) correspondant à l'oxydation des produits d'oxydation.

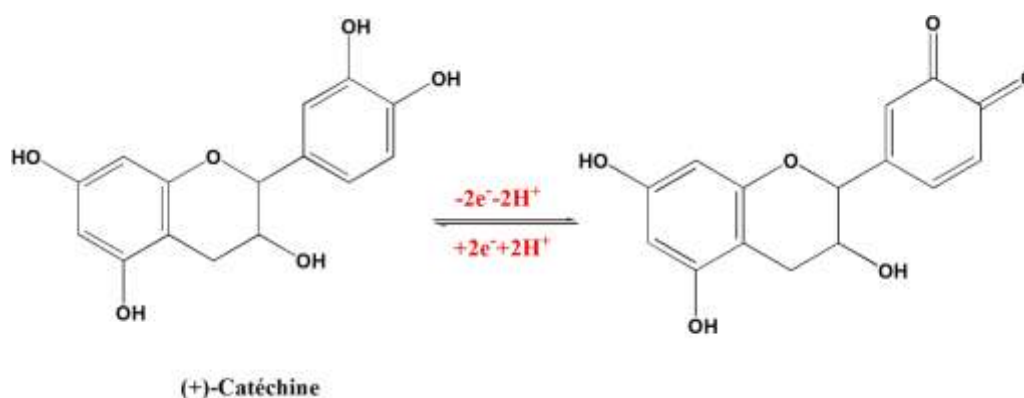


Schéma.2 Mécanisme de l'oxydation électrochimique de la catéchine sur une électrode GCE (1^{er} pic).

Un nouveau voltammogramme DP a été enregistré dans les mêmes conditions, sans nettoyage de la surface de l'électrode, présente deux pics d'oxydation, leurs intensités diminuent par rapport au premier balayage, le dernier pic a totalement disparu ce qui confirme l'adsorption des produits d'oxydation sur la surface de l'électrode.

D'après CREN-OLIVE et ses collaborateurs, la photo-oxydation du flavone, confirmée par la résonance magnétique RMN, indique que les premier pKa des cycles A et B sont très proches : pKa (3'OH)=9.02 pKa (4'OH)=9.12, pKa (5OH)=9.43, pKa (7OH)=9.58. La voltammétrie ultra rapide a confirmé que le radical le plus facile à s'oxyder est celui du cycle B : $E^\circ(4')= 0.110$ V/ECS, $E^\circ(3')= 0.135$ V/ECS , $E^\circ(5)= 0.285$ V/ECS , il présente également la plus faible énergie de dissociation (BDE) des radicaux phénoxyles de la catéchine: BDE (4'OH)=75.1 Kcal/mole, BDE (3'OH)=75.8 Kcal/mole, BDE (5OH)=84.0 Kcal/mole, BDE (7OH)=85.0 Kcal/mole.³

³ C. Cren-Olivé, P. Hapiot, J. Pinson, C. Rolando, "Free Radical Chemistry of Flavan-3-ols: Determination of Thermodynamic Parameters and of Kinetic Reactivity from Short (ns) to Long (ms) Time Scale." *J. Am. Chem. Soc.* (2002) 124(47):14027-14038.

1.2. Extraits de fruits lyophilisés

1.2.1. Extrait des prunes Japonaises

Dans le but de choisir une concentration convenable des extraits et tracer les voltammogrammes DP, on a sélectionné quelques dilutions de l'extrait des prunes Japonaise (1g de poudre/10mL de solvant d'extraction). Les voltammogrammes ont été enregistrés dans les mêmes conditions que celle de catéchine. (**Figure.2**)

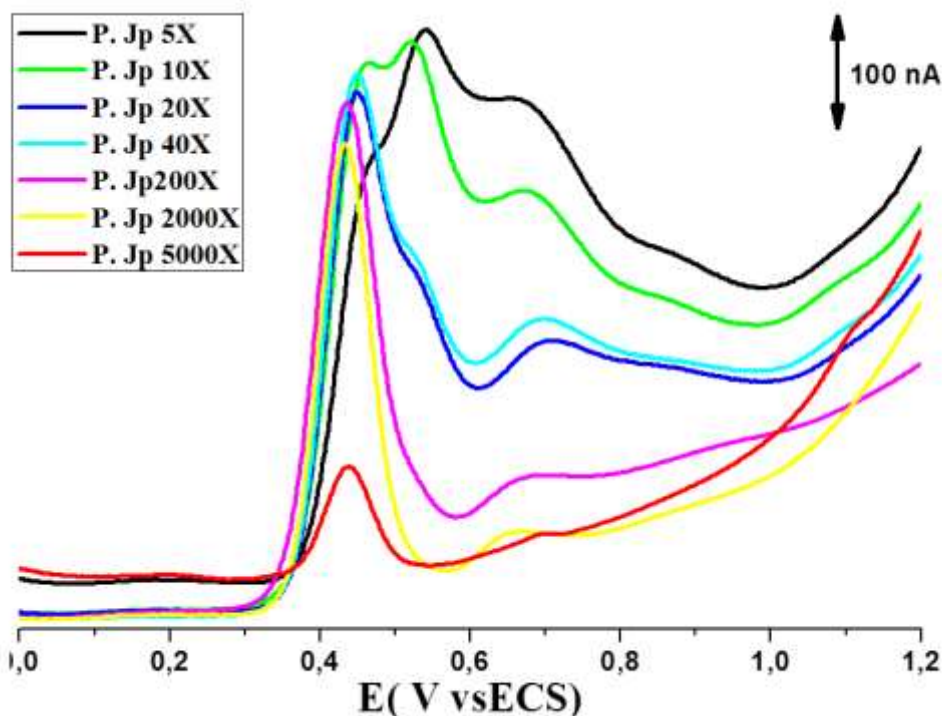


Fig.2 Voltammogrammes DP de différentes concentrations de l'extrait de la prune Japonaise sur GCE, à pH = 2.2, vitesse de balayage 5 mV s⁻¹.

On a observé que la dilution de 200 fois de l'extrait des prunes Japonaise présente une dilution convenable.

1.2.2. DPV des extraits de fruits lyophilisés

Pour évaluer la capacité antioxydante totale de chaque extrait par voie électrochimique, une étude par voltammétrie DP, sur une électrode de carbone vitreux (GCE) immergé dans un électrolyte, pH=2.2, a été réalisée. Les résultats ont été comparés avec le DPV d'une solution de catéchine à une concentration de 10 µM. (**Figure.3**)

Les voltammogrammes DP pour chaque extrait, dilué 200 fois, ont été enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales de la catéchine.

Les voltammogrammes DP enregistrés présentent un profil similaire à celui de la catéchine. La première réaction anodique a eu lieu vers un potentiel de +0,5 V, due à l'oxydation des radicaux hydroxyyles du catéchol. Les DPV de Prune Eu., prune Jp., cerise, datte, abricot et figue de Barbarie montrent un deuxième pic moins intense que le premier. Par contre, la nectarine et la grenade ne présentent qu'un seul pic.

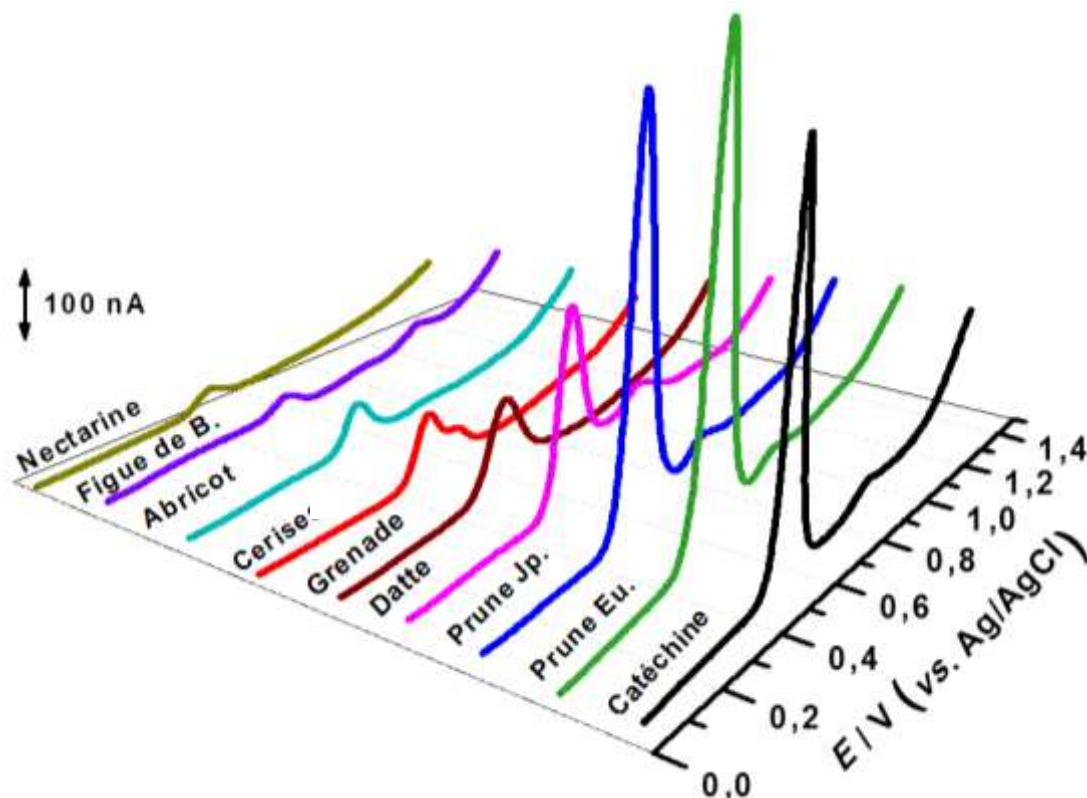


Fig.3 Voltammogrammes DP des extraits de fruits lyophilisés dilués 200 fois et de la catéchine 10 μ M sur une électrode GCE, à un pH = 2.2, vitesse de scan 5 mVs⁻¹.

L'activité antioxydante totale des extraits a été définie par l'Indice Electrochimique (EI), calculé à partir des voltammogrammes DP :⁴

$$EI = (I_{p1}/E_{p1}) + (I_{p2}/E_{p2}) + \dots + (I_{pn}/E_{pn})$$

⁴ (a) A. J. Blasco, M. C. Rogerio, M. C. González, A. Escarpa, "Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods: A proposal" *Anal. Chim. Acta* (2005) 539, 237–244. (b) F.M.A. Lino, L.Z. de Sá, I.M.S. Torres, M.L. Rocha, T.C.P. Dinis P.C. Ghedini, V. S. Somerset, E. S. Gil, « Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines" *Electrochimica Acta* (2014) 128, 25–31.

L'indice électrochimique des extraits et de la catéchine ont montré que la prune Européenne offre la plus grande capacité antioxydante totale avec un Indice de EI = $1,55 \cdot 10^{-6}$ A/V, suivie par la prune Japonaise (EI = $1,38 \cdot 10^{-6}$ A/V), cependant la nectarine a présenté la plus faible capacité avec un Indice de EI = $0,06 \cdot 10^{-6}$ A/V. (**Tableau.1**)

L'extrait de datte, dilué 200 fois, a présenté la valeur la plus proche (EI = $1,33 \cdot 10^{-6}$ A/V) de celle de catéchine $10 \mu\text{M}$ (EI = $1,23 \cdot 10^{-6}$ A/V).

Le transfert d'électrons entre une molécule et la surface d'une électrode peut être quantifié comme le transfert total des charges. La surface des pics d'oxydation intégrée (P_{area}), des extraits a été également évaluée, une surface importante indique une grande capacité antioxydante⁵.

La plus faible capacité antioxydante de la nectarine, correspond à une surface étroite ($P_{\text{area}} = 2,33 \cdot 10^{-9}$ VA). Par contre, la plus élevée de la prune Européenne correspond à une surface large ($P_{\text{area}} = 67,39 \cdot 10^{-9}$ VA), notre standard présente une surface moyenne de $37,2 \cdot 10^{-9}$ VA.

⁵ J. Piljac-Žegarac, L. Valek, T. Stipčević, S. Martinez, "Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions." *Food Chem.* (2010) 121 (3) 820-825.

Tableau.1 Potentiels d'oxydation (E_p), intensités (I_p), Indices Electrochimiques(EI) et surface des pics (P_{area}), calculés à partir des voltammogrammes DP des extraits de fruits dilués (facteur de dilution 1:200) et de la Catéchine 10 μ M.

Echantillon	Nom botanique	E_p (V)			$I_p \times 10^{-9}$ (A)			$EI \times 10^{-6}$ (A/V)	$P_{area} \times 10^{-9}$ (VA)
Catéchine	—	0.43	0.74	1.20	505.68	25.78	7.63	1.23±0.03	37.22±4.88
Prune Eu.	<i>Prunus domestica L.</i>	0.45	0.67	—	684.93	15.77	—	1.55 ±0.19	67.39±5.91
Prune Jp.	<i>Prunus salicina Lindl.</i>	0.44	0.66	—	599.78	21.07	—	1.38 ±0.03	56.58±4.26
Datte	<i>Phœnix dactylifera</i>	0.45	0.68	—	579.89	30.99	—	1.33 ±0.03	43.39±1.81
Grenade	<i>Punica granatum L.</i>	0.45	—	—	129.81	—	—	0.28 ±0.02	16.98±0.26
Cerise	<i>Prunus cerusus L.</i>	0.46	0.55	—	98.06	9.12	—	0.23 ±0.003	11.82±2.78
Abricot	<i>Prunus armeniaca L.</i>	0.45	0.67	—	64.01	3.08	—	0.15 ±0.01	6.35±0.91
Figue de B.	<i>Opuntia ficus indica L.</i>	0.47	0.70	0.90	24.73	3.57	17.66	0.07 ±0.01	3.88±0.49
Nectarine	<i>Prunus persica nusipersica L.</i>	0.46	—	—	25.76	—	—	0.06 ±0.002	2.33±0.03

1.2.3. Chronoampérométrie des extraits de fruits lyophilisés

On a utilisé cette technique afin d'évaluer la capacité antioxydante totale de chaque extrait à un potentiel faible, les courbes chronoampérométriques ont été enregistrées pour chaque extrait dilué de 1: 100 (v/v) à un pH=2.2, sur une électrode de carbone vitreux, à un potentiel + 0,6 V vs. Ag / AgCl. (Figure.4)

Le courant chrono-ampérométrique (I_a) de chaque extrait dilué a été mesuré après 400 secondes (période nécessaire pour un état stable). La capacité antioxydante totale la plus élevée a été obtenue pour la prune Jp. (116 nA), tandis que la figue de Barbarie a présenté la plus faible capacité (18 nA). (Tableau.2)

La différence entre les courbes de chronoampérométrie, peuvent être expliquées par l'adsorption des flavonoïdes sur la surface de l'électrode.

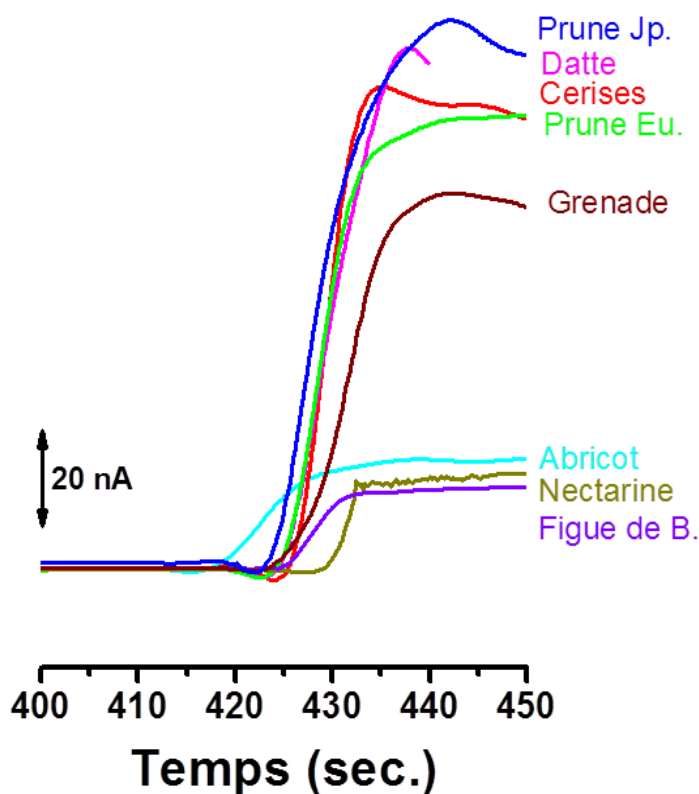


Fig.4 Chronoampérogrammes des extraits de fruits lyophilisés
à un potentiel de 0.6 V (vs. Ag/AgCl).
(Facteur de dilution 1:100)

Tableau.2 Courants Chronoamperométriques (I_a) des extraits de fruits (facteur de dilution 1:100) et une solution de catéchine (concentration de 10 μM), à un potentiel de + 0.6 V (vs. Ag/AgCl).

Echantillon	I_a (nA)
Prune Jp.	116
Datte	110
Cerise	102
Prune Eu.	95
Grenade	79
Abricot	24
Nectarine	21
Figue de Barbarie	18
Catéchine	12.67 (10 μM)

2. L'activité antioxydante totale par le test de piégeage des radicaux libres :

La méthode appliquée pour évaluer l'activité antioxydante totale est celle du piégeage des radicaux libres à l'aide du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

2.1. Standard Catéchine :

Dans le but de minimiser l'interférence de notre standard, l'absorbance de la catéchine 10 μM enregistrée à la longueur d'onde 516nm a été défini comme $Abs_{CA}=0.006$.

Après l'ajout des différentes concentrations de la catéchine à la solution méthanolique du radical DPPH, on observe une diminution rapide de l'absorbance. (**Chapitre 1.2**)

La concentration nécessaire de la catéchine pour réduire de 50% de l'absorbance du DPPH \cdot a été 20,5 μM , correspondant à une réaction stœchiométrique de 1:2 (une molécule catéchine piège deux molécules de DPPH \cdot), ce qui signifie que seule la fraction catéchol agit comme piègeur des radicaux. (**Schéma.3**)

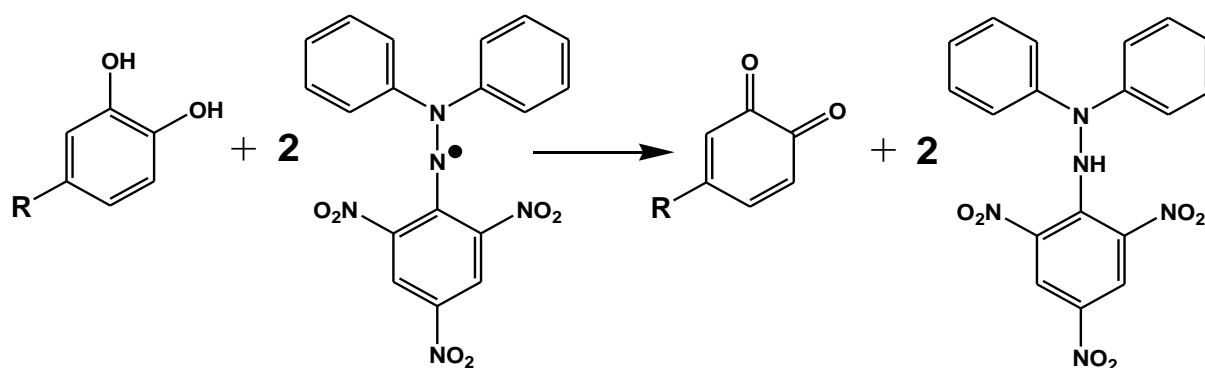


Schéma.3 Neutralisation du radical DPPH par une molécule de catéchol.

2.2. Extraits de fruits lyophilisés

Le profil de l'activité de piégeage des radicaux libres par rapport à chaque concentration des extraits testés vis-à-vis du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est présenté dans la **Figure.5**.

Le calcul de la concentration efficace permet de définir d'autres paramètres:

- L'énergie anti-radicalaire (ARP) : $ARP = 1/EC_{50}$
- La stœchiométrie du réactant dans le mécanisme d'oxydation : $n = EC_{50} \cdot 2$ (n la valeur de la stœchiométrie)
- Le nombre des radicaux libres DPPH réduits ⁶ : Nombre de DPPH réduits = $1/n$

Le test de piégeage des radicaux libres DPPH a été utilisé pour estimer la capacité antioxydante totale, de huit espèces différentes de fruits lyophilisés: nectarine, figue de barbarie, abricot, cerise, prunes Japonaise et Européenne, grenade et datte. Les résultats ont été comparés à celles du standard (la catéchine).

⁶ K. Mishra , H. Ojha, N. K. Chaudhury "Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results » *Food Chem.* (2012) 130, 1036–1043.

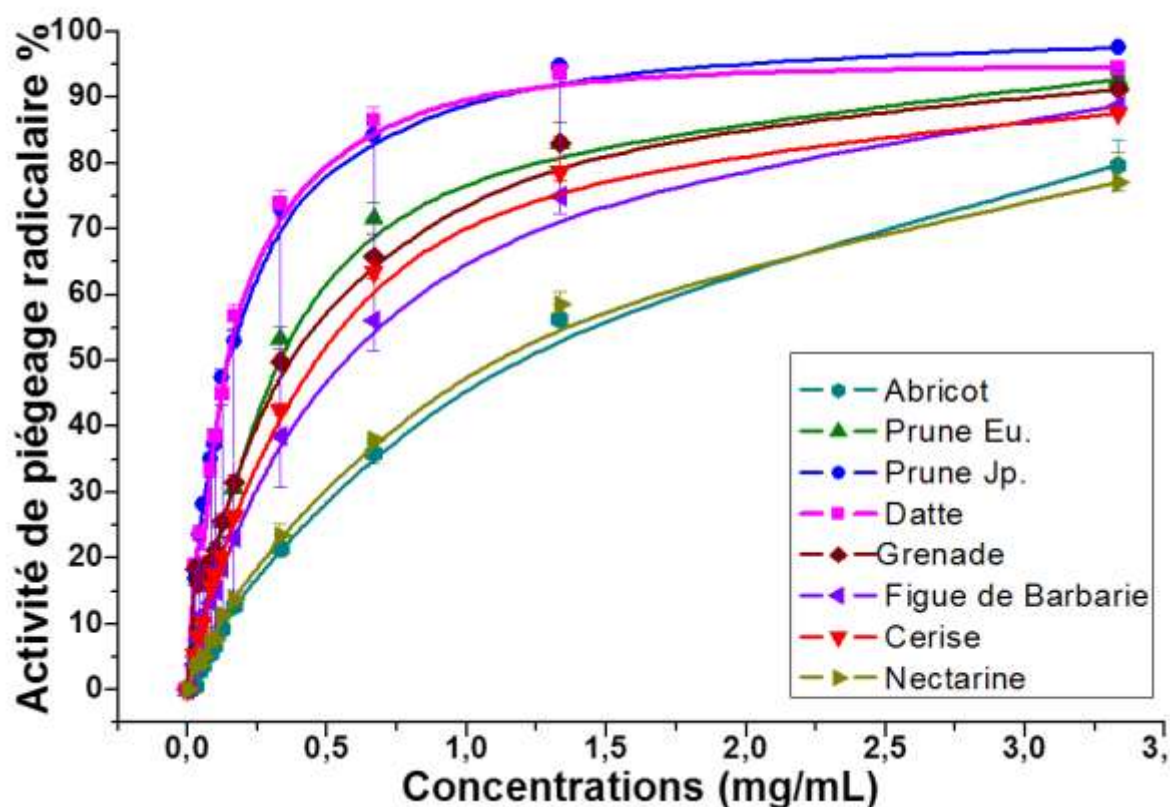


Fig.5 Activité de piégeage des radicaux DPPH (%) par rapport aux différentes concentrations des extraits de fruits lyophilisés (mg/mL).

Après l'ajout de la solution du radical dissous au méthanol, une disparition de la couleur violette a été observée, tous les extraits ont réagi positivement. (**Tableau.3**)

Douze dilutions des extraits de fruits lyophilisés dans l'intervalle 0,02 à 3,33 mg/mL, ont été testées jusqu'à l'obtention d'un plateau. Les absorbances ont été enregistrées pour chaque concentration après 30 minutes d'incubation à l'abri de la lumière; ainsi, les concentrations efficaces (EC_{50}) ont été calculées.

Tableau.3 SLOP et concentration efficace (EC₅₀) des extraits de fruits et de la Catéchine.

Echantillon	SLOP (mL/mg)	EC ₅₀ (mg/mL)	ARP	(n)	N ^{bre} DPPH réduits
Catéchine	8333.33±0.27	0.006±0.02	-	-	-
Datte	325.27±9.32	0.15±0.004	6,67	0,3	3,33
Prune Jp.	307.43±5.05	0.16±0.003	6,25	0,32	3,13
Prune Eu.	191.10±3.07	0.26±0.004	3,85	0,52	1,92
Cerise	158.97±2.45	0.31±0.005	3,23	0,62	1,61
Grenade	152.55±2.92	0.33±0.006	3,03	0,66	1,52
Figue de B.	140.60±3.20	0.35±0.008	2,86	0,7	1,43
Nectarine	82.94±1.94	0.60±0.01	1,67	1,2	0,83
Abricot	78.89±1.27	0.63±0.01	1,59	1,26	0,79

Les résultats obtenus pour les extraits ont montré un effet positif dépendant des concentrations. Les extraits de la nectarine et l'abricot ont présenté la plus grande valeur d'EC₅₀ (environ 0,6 mg/mL), ce qui correspond à la capacité antioxydante totale la plus basse.

A l'inverse, l'extrait des dattes a présenté une capacité dominante, avec le plus faible facteur EC₅₀=0,15mg/mL, suivie de près par la prune Jp. avec un EC₅₀=0,16mg/mL. (**Tableau.3**)

Le nombre des radicaux DPPH réduit, confirment le pouvoir antioxydant élevé de quelques extraits de fruits comme : la prune Jp., les dattes et la prune Eu, qui correspond à 3.13, 3.33 et 1.92 successivement, et le faible pouvoir des autres extraits tels que la figue de Barbarie, la nectarine et l'abricot qui correspond à 1.43, 0.83 et 0.79 successivement.

3. Discussion des résultats

À partir des histogrammes, on remarque que les valeurs de la concentration efficace et l'indice électrochimique présentent une corrélation inverse. En fonction de l'activité antioxydante de nos extraits, on distingue trois groupes:

- Groupe 1 : les extraits qui présentent une forte activité (le prune Eu., le prune Jp. et les dattes).
- Groupe 2 : les extraits qui présentent une activité moyenne (la grenade et les cerises).

- Groupe 3 : les extraits qui présentent une faible activité (l'abricot, la nectarine et les figes de Barbarie). (Figure.6)

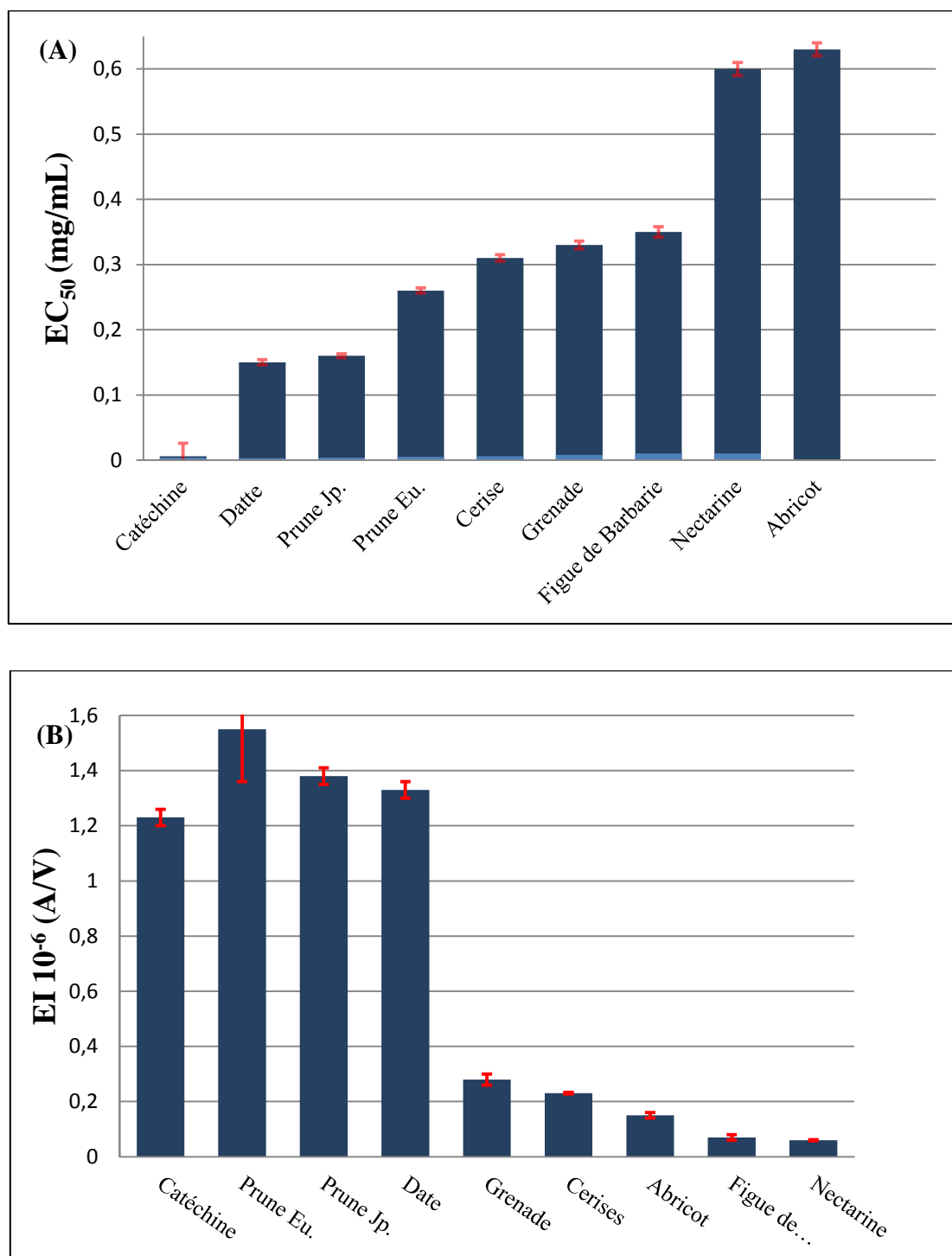
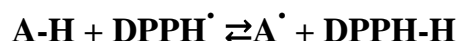


Fig.6 (A) Histogramme des concentrations efficaces (EC₅₀) des extraits de fruits.

(B) Histogramme des Indices Electrochimiques (EI) des extraits de fruits.

Les résultats d'OZCELIK et ses collaborateurs⁷, ont montré que l'absorbance d'une solution du radical DPPH dissout dans le méthanol n'a pas changé pendant 150 min, mais d'après nos essais, on constate qu'après 120 min l'absorbance a diminué de 0,944 à 0,918 a.u.

Selon MISHRA et ses collaborateurs, le mécanisme entre les deux molécules DPPH / DPPH-H est réversible, ce qui explique les différents chemins réactionnels de transfert des électrons entre les antioxydants et l'atome d'azote du radical libre. Il suggère que la capacité antioxydante de nombreux produits naturels ou synthétiques a été mal estimée⁶.



Les solvants polaires exercent une forte influence sur les taux et les mécanismes d'abstraction des atomes d'hydrogène⁸. D'après FOTI⁹, la présence d'une molécule phénol dans un solvant polaire conduit à la formation d'un complexe ArOH-PS, dont lequel les radicaux libres ne peuvent pas réagir avec ces espèces (encombrement stérique). (Schéma.4)

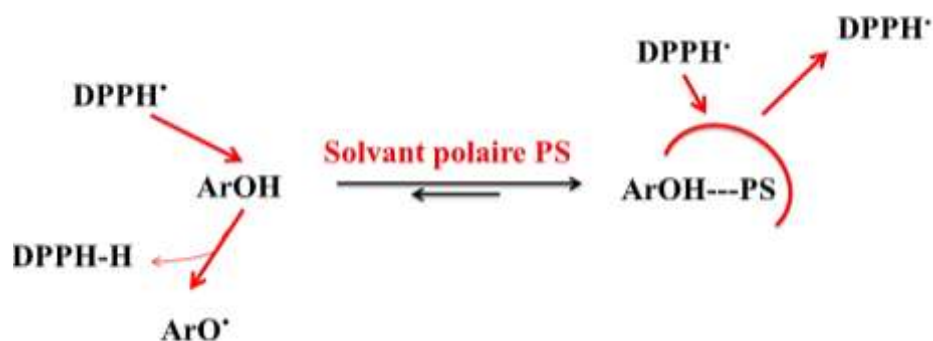


Schéma.4 Le radical libre n'arrachant un atome d'hydrogène de la molécule phénol (ArOH) qu'à partir d'une forme libre⁹.

La formation des espèces comme ArO et ArOH^{•+} par un transfert de protons (PT) ou d'électrons (ET) rend les mécanismes plus compétitifs avec celles du transfert de protons couplé d'électrons (TCEP).

Des études cinétiques ont conduit à la formulation d'un mécanisme prédominant pour les réactions ArOH + DPPH[•] dans les solvants protiques. (Schéma.5)

⁷ B. Ozcelik, J.H. Lee and D.B. Min, "Effects of Light, Oxygen and pH on the Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl", *J. Food Sci.* (2003) 68 (2) 487-490.

⁸ a) D. W. Snelgrove, J. L. uszyk, J. T. Banks, P. Mulder, K. U. Ingold, "Kinetic solvent effects on hydrogen-atom abstractions: reliable, quantitative predictions via a single empirical equation." *J. Am. Chem. Soc.* (2001) 123, 469-477. (b) G. Litwinienko, K. U. Ingold, "Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals." *Acc. Chem. Res.* (2007) 40, 222-230.

⁹ M. C. Foti, "The Use and Abuse of the DPPH[•] Radical", *J Agric Food Chem.* (2015) 63(40):8765-8776.

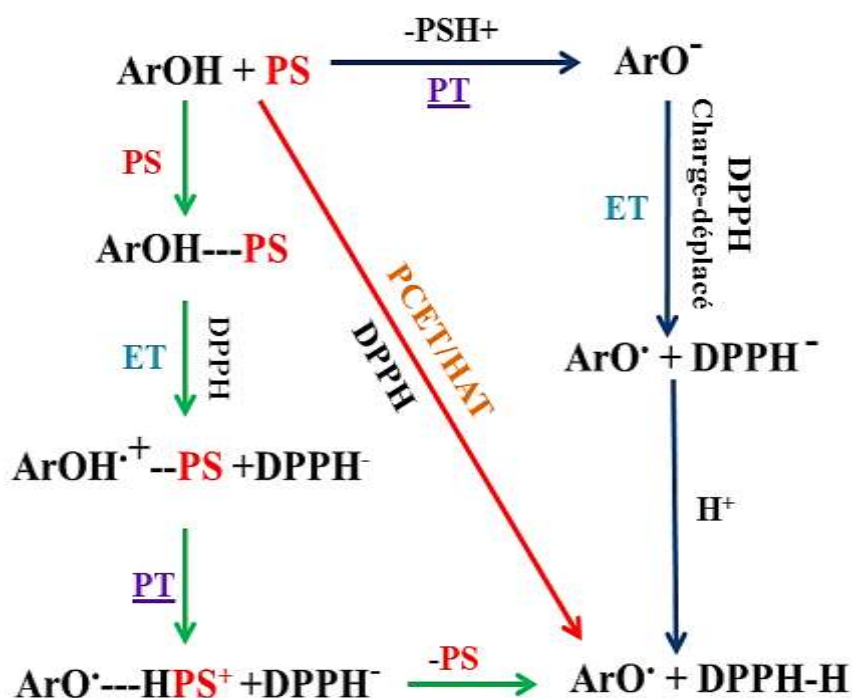


Schéma.5 Réaction du phénol avec DPPH[•] via des mécanismes PCET/HAT, ET-PT ou PT-ET⁹.

Selon FOTI et ses collaborateurs, l'avantage d'un de ces mécanismes par rapport aux autres, dépend de plusieurs facteurs : la polarité du milieu réactionnel et le potentiel d'ionisation¹⁰.

Le désordre observé dans nos résultats, nécessite de tenir compte de la cinétique de disparition du radical DPPH en présence des antioxydants, sachant que, pour une interprétation convenable des données, il faut considérer la spécificité de chaque technique. D'autres études ont rapporté une corrélation assez faible entre des essais similaires (spectroscopiques) tels que : DPPH-ORAC $r^2 = 0,51$ ¹¹ , DPPH-FRAP $r^2=0.22$ et DPPH-ABTS $r^2 = 0,1$ ¹².

¹⁰ M. C. Foti, C. Daquino, I. D. Mackie, G. A. DiLabio, K. U. Ingold, "Reaction of Phenols with the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. Kinetics and DFT Calculations Applied To Determine ArO-H Bond Dissociation Enthalpies and Reaction Mechanism." *J. Org. Chem.* (2008) 73, 9270–9282.

¹¹ B. Pfundstein, S. K. El Desouky, W. E. Hull, R. Haubner, G. Erben, R. W. Owen « Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities." *Phytochemistry* (2010) 71 (10) 1132–1148.

¹² M. S. Bhojar; G. P. Mishra, P. K. Naik, R. B. Srivastava, « Estimation of Antioxidant Activity and Total Phenolics Among Natural Populations of Caper (*Capparis spinosa*) Leaves Collected from Cold Arid Desert of Trans-Himalayas." *Aust J Crop Sci.* (2011) 5 (7) 912-919.

Un temps de 30 minutes a été estimé nécessaire pour atteindre un état d'équilibre (ArO[•]-DPPH), cependant selon BONDET et ses collaborateurs¹³, certains composés antioxydants ont besoin de plus de temps, par exemple l'hydroxyle toluène butyle (BHT) qui est considéré comme un antioxydant puissant (1 mole de BHT réduit 3 moles de DPPH[•]), atteint son état stable après 300 min (cinétique lente). Par conséquent, le travail avec des extraits de fruits rend le facteur temps plus important.

La structure moléculaire, la présence, le nombre et la position des radicaux, présentent des éléments puissants qui peuvent interférer sur le mécanisme d'action des antioxydants¹⁴.

4. Détection et identification des flavonoïdes par HPLC

L'objectif de ce travail était non seulement l'évaluation de la capacité antioxydante totale des extraits de fruits méditerranéens, mais aussi d'identifier les différents flavonoïdes existants dans les extraits via un outil électrochimique.

La méthode utilisée pour la séparation et l'identification des flavonoïdes a été optimisée par NOVAK et ses collaborateurs¹⁵.

La sensibilité de la détection et l'identification par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) couplée à un détecteur électrochimique (ED) et photodiode (PDA) ont été déterminées par la limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ).

La limite de détection (LOD) est la plus petite quantité d'analyte pouvant être détectée avec un certain niveau de certitude¹⁶.

Dans les conditions de travail détaillées dans le [chapitre 1.2](#) de la partie expérimentale, les LOD obtenues avec l'ED varient de 21,4 à 89,1 pgL⁻¹, ces valeurs étaient 1000 fois inférieures à celles obtenues avec le PDA, qui varient de 12,2 à 49,8 ngL⁻¹¹⁵.

La limite de quantification (LOQ) est la plus faible concentration d'analyte pouvant être déterminé avec incertitude acceptable¹⁶.

Le détecteur électrochimique couplée à une chromatographie RP-HPLC-ED a permis la séparation de dix-sept flavonoïdes, caractérisés par des polarités différentes, à un temps de

¹³ V. Bondet, W. Brand-Williams, C. Berset, "Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method », *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, (1997) 30, 609–615.

¹⁴ B. F. Rasuleva, N. D. Abdullaev, V. N. Syrovb, J. Leszczynskia, « A Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Study of the Antioxidant Activity of Flavonoids » *QSAR Comb. Sci.* (2005) 24, (9) 1056 – 1065.

¹⁵ I. Novak, P. Janeiro, M. Seruga, A. M. Oliveira-Brett, "Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection" *Anal. Chim. Acta* (2008) 630, 107–115.

¹⁶ CITAC/EURACHEM GUIDE, Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation, (2002).

rétenion inférieur à 50 minutes. Dans ce contexte, 17 standards et leurs temps de rétenion ont été déterminés. (ANNEXE.3 (A, B))

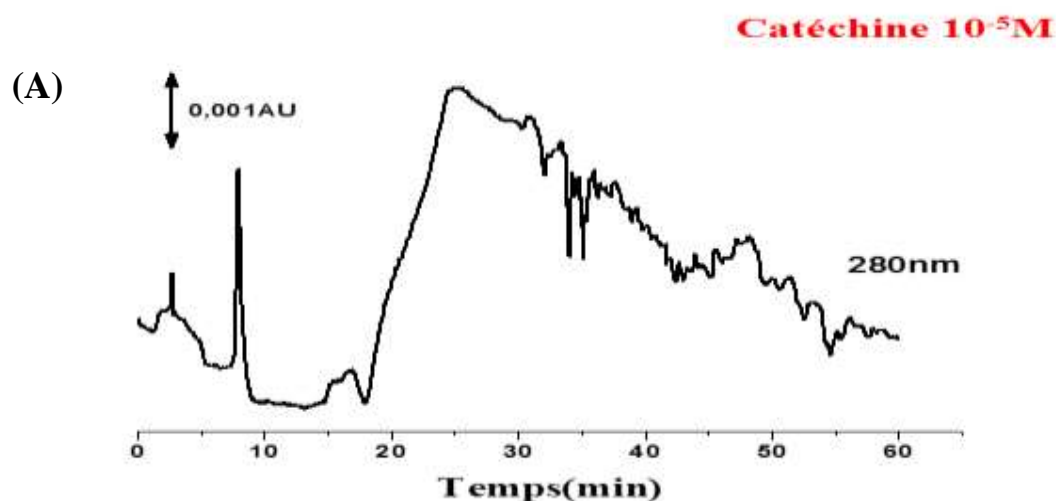
Une fois que les temps de rétenion ont été déterminés, une étude comparative avec chromatographie couplée à un détecteur PDA a été réalisée.

Le détecteur PDA a été utilisé pour confirmer l'identification des flavonoïdes détectés, en fonction de leurs spectres UV-vis enregistrés à trois longueurs d'ondes caractéristiques: 280, 360 et 490 nm (ANNEXE.3 (C, D)).

4.1. Chromatogrammes de catéchine

La catéchine a été détectée dans la plupart des extraits et elle est largement utilisée en tant que standard de référence dans les études comparatives en raison de sa stabilité¹⁷.

La catéchine a été soumise à une analyse par RP-HPLC sous les mêmes conditions d'élution et le même programme d'analyse. (Figure.7)



¹⁷ (a) A. E. İnce, S. Şahin, S. G. Şümnü, "Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound" *Turk. J. Agric. For.* (2013) 37, 69–75. (b) M. C. Gomes, I. P. G. Fernandes, N. S. Shekhawat, S. Kumbhat, A. M. Oliveira-Brett, "Calligonum polygonoides Linnaeus Extract: HPLC-EC and Total Antioxidant Capacity Evaluation" *Electroanalysis* (2015) 27(2) 293–301.

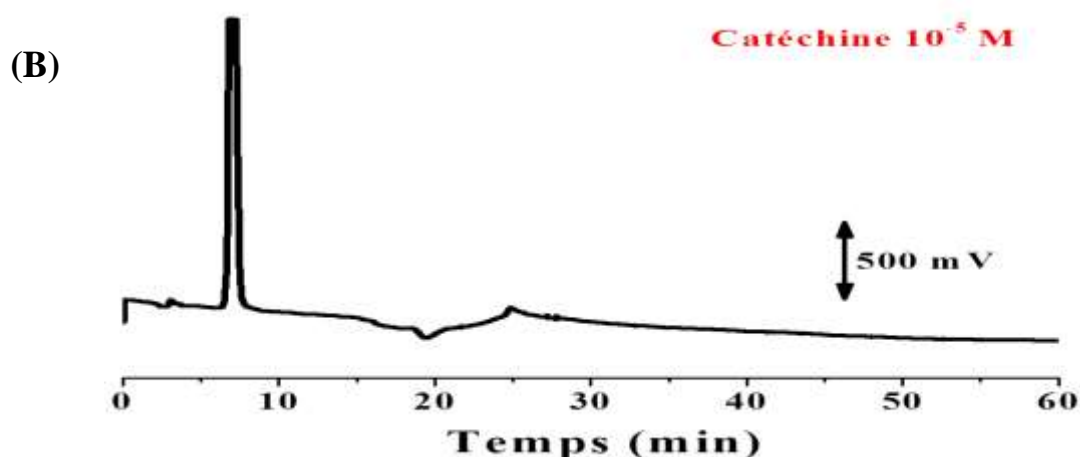


Fig.7 Chromatogrammes HPLC de la catéchine par (A) PDA et (B) ED.

4.2. Chromatogrammes des fruits lyophilisés (FD Fruits)

Les dix-sept flavonoïdes détectés sont: (1) delphinidine chloride, (2) malvidine chloride, (3) catéchine, (4) (-)épigallocatechine gallate, (5) épicatechine, (6) kuromanin chloride, (7) acide ferulique, (8) peonidin-3-*O*-glucoside chloride, (9) procyanidin A2, (10) hyperoside, (11) quercetin-3-*O*-glucopyranoside, (12) rutine, (13) resvératrole (14) fisetine (16) morine et (17) quercetine dihydrate. (Tableau.4)

La colonne de phase inverse utilisée a permis la séparation de plusieurs flavonoïdes, dont les composés les plus polaires, les anthocyanidines (délphinidine, malvidine, péonidine) et les flavanols (catéchine, gallate d'épigallocatechine) apparaitront pendant les dix premières minutes, puis les anthocyanines (kuromanin) et les flavonols (rutine, morine, quercétine), après 25 minutes.

Les flavonoïdes: délphinidine chloride, malvidine chloride, catéchine, et kuromanin chloride, ont été détectés dans tous les extraits analysés. (Figure.8)

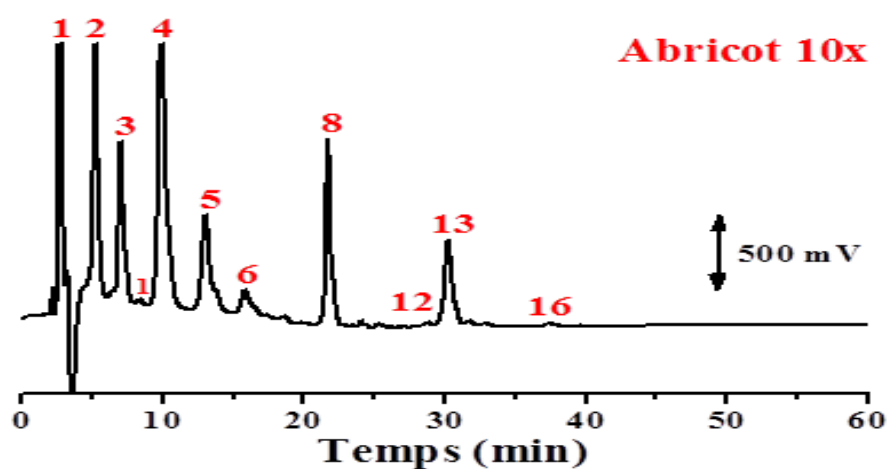
Morine et quercétine déshydratéé étaient les flavonoïdes moins détectés, seulement dans les extraits des abricots et prunes Japonaise.

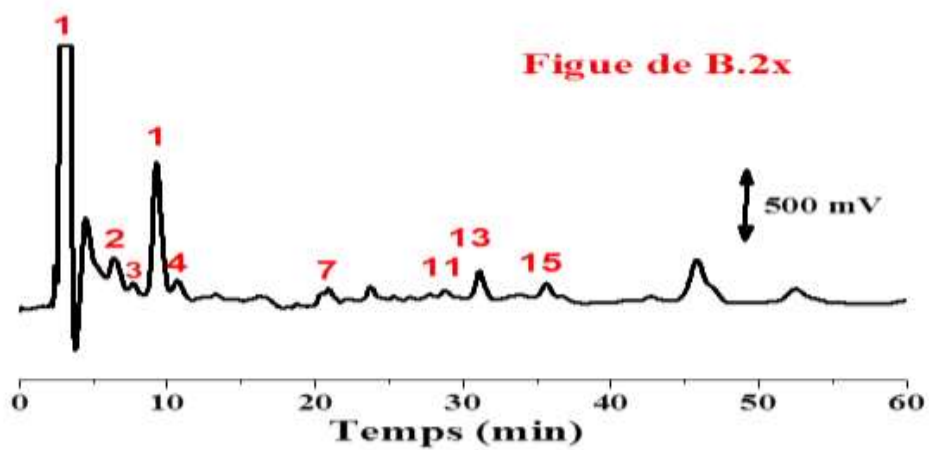
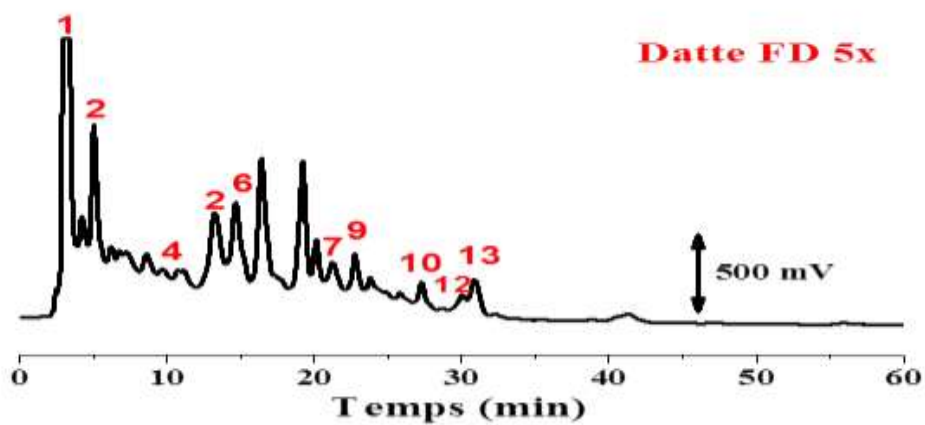
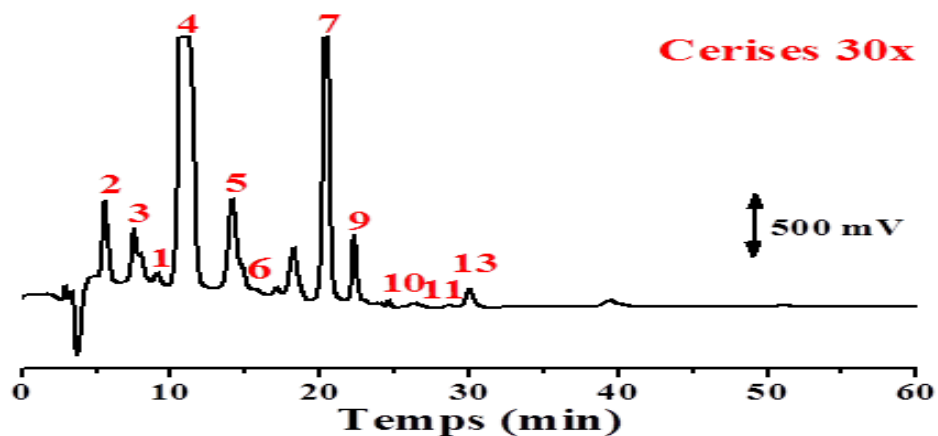
Nos résultats ont montré une excellente sensibilité de la détection électrochimique vue sa pertinence pour les faibles concentrations de composés phénoliques électroactifs.

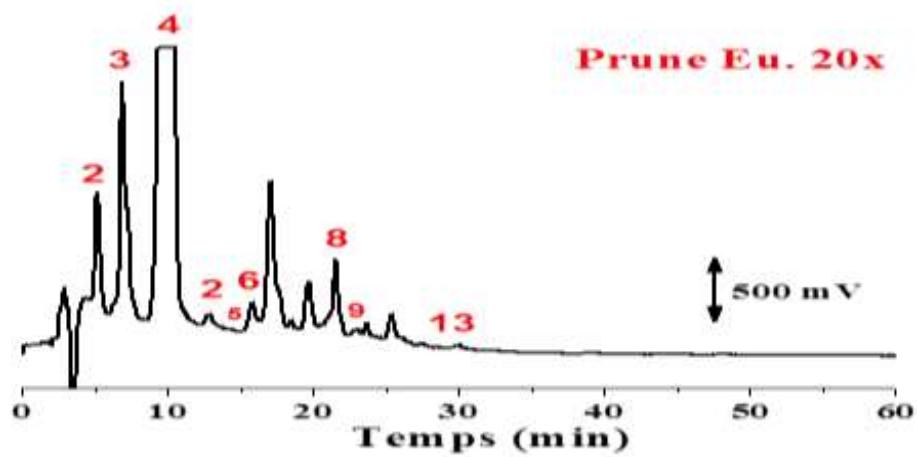
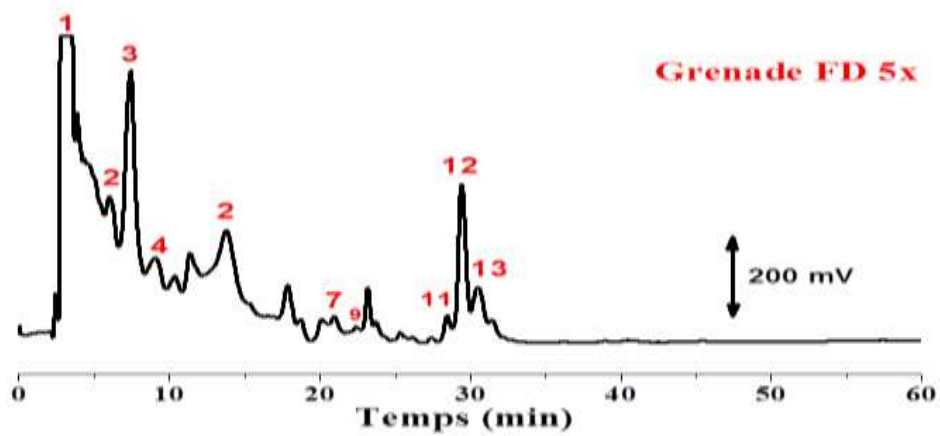
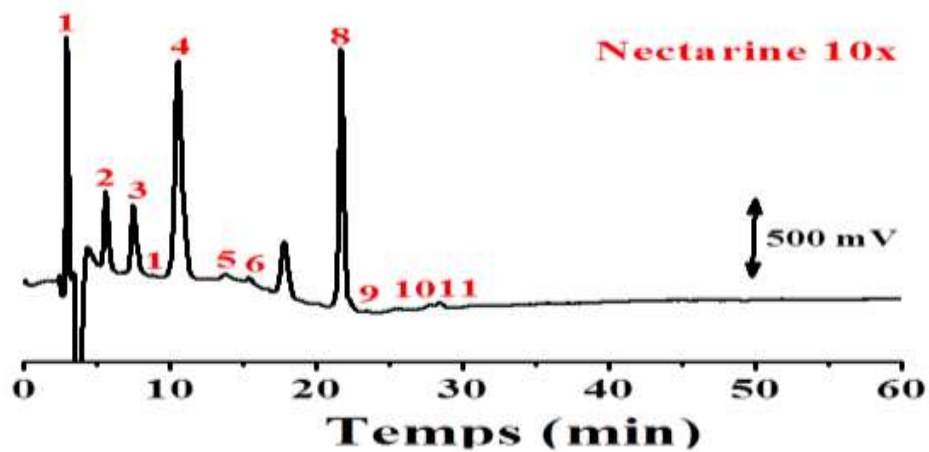
D'un autre côté, on observe des pics intenses de quelques flavonoïdes, tels que les délphinidine chloride, le (-) épigallocatechine gallate et la catéchine dans les extraits des prunes Jp et prunes Eu. Ainsi, on note la présence des pics intenses de la rutine et résveratrol dans les extraits de grenade et de figues de barbarie successivement.

Tableau.4 Temps de rétention des standards.

N°	Standards	Temps de rétention (t_r)/ min
1	Délphinidine chloride	3.8 et 8.7
2	Malvidine chloride	6.6 et 13.1
3	Catéchine	7.4
4	(-)-Epigallocatechine gallate	10.0
5	Epicatchine	13.8
6	Kuromanin chloride	15.3
7	Acide ferulique	21.3
8	Peonidin-3- <i>O</i> -glucoside chloride	21.6
9	Procyanidin A2	22.3
10	Hyperoside	28.4
11	Quercetin-3- <i>O</i> -glucopyranoside	28.6
12	Rutine	29.4
13	Résveratrol	30.1
14	Fisetine	35.6
15	Myricetine	35.8
16	Morine	36.1
17	Quercetine dihydrate	49.0







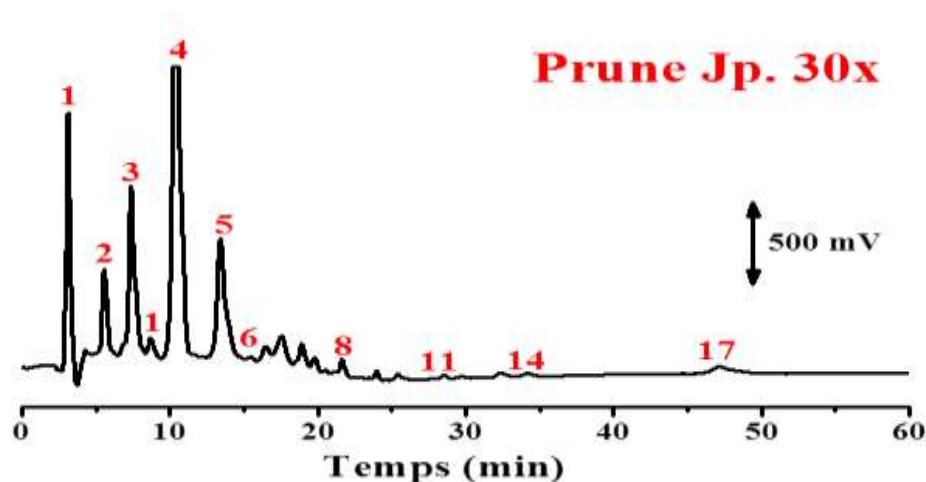


Fig.8 RP-HPLC-ED sur une électrode GCE, à + 0.50 V vs. ISAAC : Abricot 10X, Cerise 30X, Datte 5X, Figure de B. 2X, Nectarine 10X, Grenade 5X, Prune Eu. 20X, prune Jp. 30X. Pics d'identification: (1) délphinidine chloride (2) malvidine chloride (3) catéchine (4) (-)-épigalocatéchine gallate (5) épicatechine (6) kuromanin chloride (7) acide ferulique (8) peonidin-3-*O*-glucoside chloride (9) procyanidin A2 (10) hyperoside (11) quercetin-3-*O*-glucopyranoside (12) rutine (13) résveratrol (14) fisetine (16) morine (17) quercetine dihydraté.

4.3. Chromatogrammes des fruits congelés (F) et lyophilisés (FD)

ORAK et ses collaborateurs¹⁸, ont montré l'effet des techniques de conservation sur l'activité antioxydante totale des extraits, dont le but est d'éviter la dégradation des aliments et de mieux préserver le taux en polyphénols totaux.

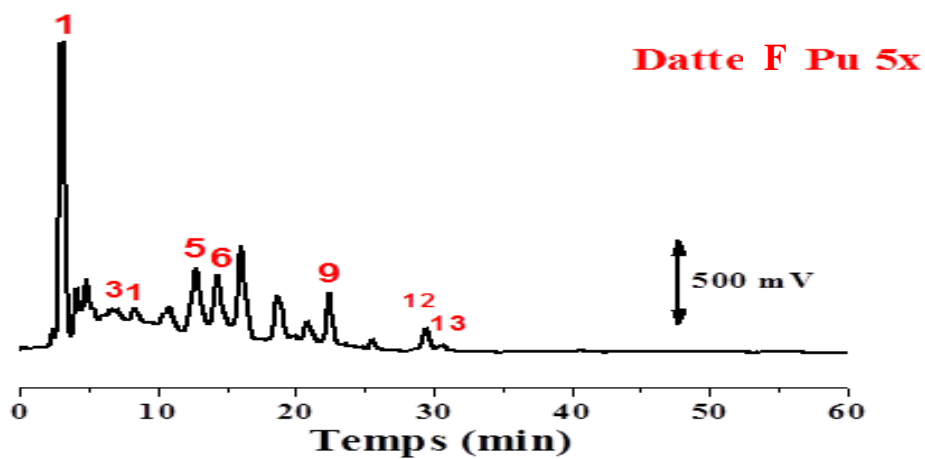
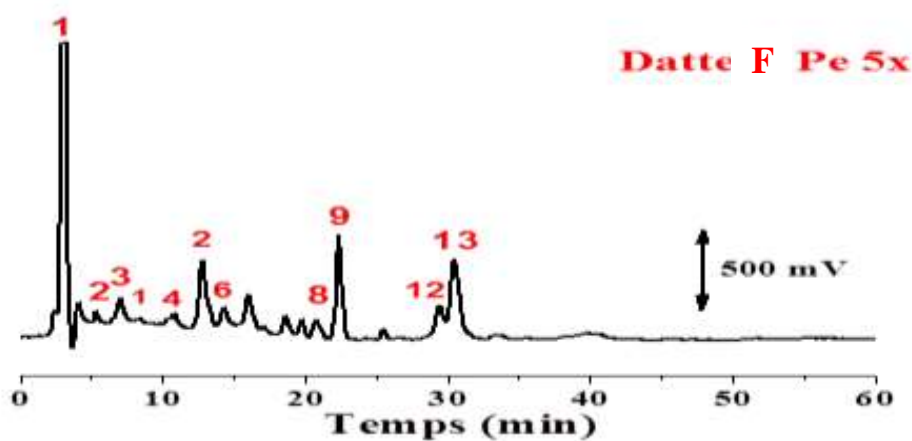
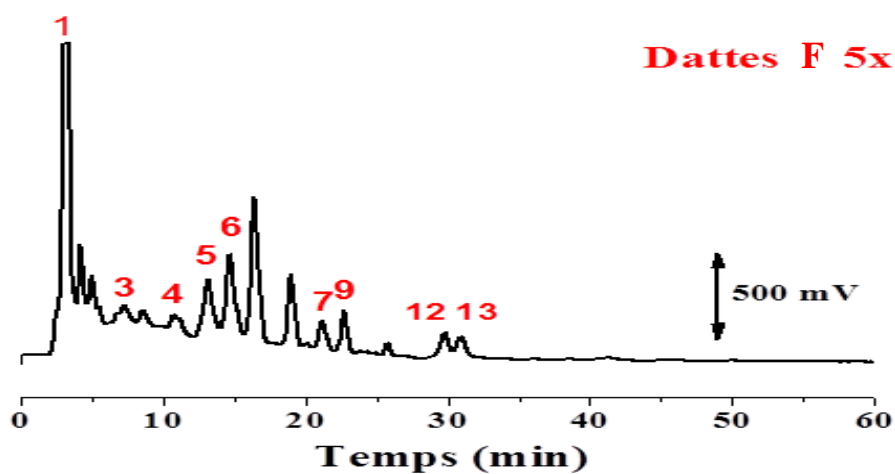
On observe que l'extrait des dattes lyophilisées présente plus d'activité antioxydante que les dattes congelées, similaire pour les extraits de grenade.

Les chromatogrammes via un détecteur ED, révèlent la disparition de quelques flavonoïdes dans les fruits congelés à titre d'exemple, les pic de malvidine et hyperoside ont disparus, ainsi que la réduction de l'intensité des autres. Le pic de malvidine apparaissant dans le spectre des pelures des dattes congelées correspond à la présence de cette molécule dans cette partie de dattes.

Ainsi on remarque, une disparition des pics de malvidine, (-)-Epigalocatéchine gallate, rutine et Quercetin-3-*O*-glucopyranoside dans les graines de grenade congelée.

Le traitement par lyophilisation présente une méthode convenable pour prolonger la durée de vie des fruits et préserver leurs activités antioxydant totale^{17,19}.

¹⁸ H. H. Orak, T. Aktas, H. Yagar, S. Selen Isbilir, N. Ekinci, F. Hasturk Sahin, "Effects of hot air and freeze drying methods on antioxidant activity, colour and some nutritional characteristics of strawberry tree (*Arbutus unedo*L) fruit." *Food Sci. Technol. Int.* (2012) 18(4) 391-402.



¹⁹ M. Keinänen, R. Julkunen-Tiitto, "Effect of sample preparation method on birch (*Betula pendula* Roth) leaf phenolics." *J. Agric. Food Chem.* (1996) 44, 2724-2727.

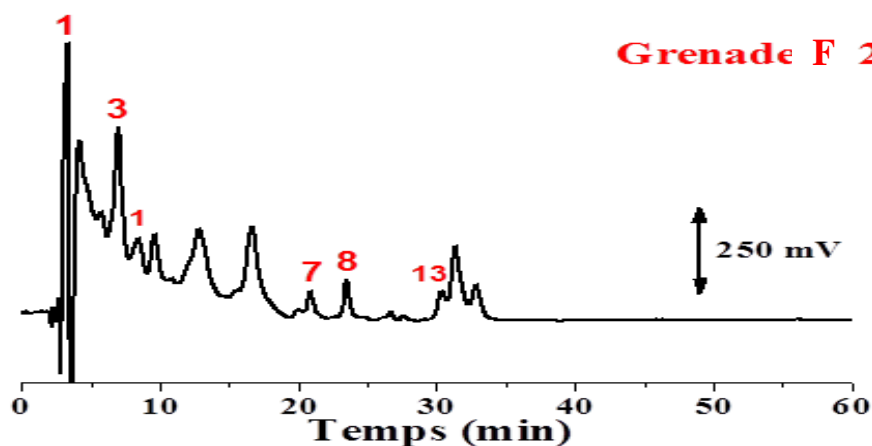


Fig.9 RP-HPLC-ED sur une électrode GCE, à + 0.50 V vs. ISAAC : Datte congelé (DaF) 5X, Pelure de datte (Pe) 5X, Pulpes de datte (Pu) 5X et Grenade congelée (GF) 2X. Pic d'identification: (1) délphinidine chloride (2) malvidine chloride (3) catéchine (4) (-)-épigallocatechine gallate (5) épicatechine (6) kuromanin chloride (7) acide ferulique (8) peonidin-3-O-glucoside chloride (9) procyanidin A2 (10) hyperoside (11) quercetin-3-O-glucopyranoside (12) rutine (13) résveratrole (14) fisétine (16) morine (17) quercétine dihydrate.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Tout au long de ces travaux, nous avons valorisé l'application des techniques électrochimiques à partir des molécules synthétisées, bio synthétisées et naturelles. Dans la première partie du travail, nous avons synthétisé des hétérocycles azotés à partir des dérivés de l'acide nitro phényl acétique par voie électrochimique sur une électrode à goutte de mercure tombante. Une étude du comportement électrochimique de produits d'arrivée a dévoilé un aspect électroactif.

Dans la deuxième partie, les techniques électrochimiques nous ont permis d'interpréter le mécanisme d'oxydation électrochimique d'un anticorps monoclonal anti-cancéreux Bavacizumab (BEVA), sur la surface d'une électrode de carbone vitreux (en solution, en forme native et dénaturée) sur une large gamme de pH. L'oxydation électrochimique d'une couche de Bevacizumab (BEVA) immobilisée sur la surface de l'électrode, a montré un seul pic correspond à l'oxydation des acides aminés tyrosines et tryptophanes. Après dénaturation avec des agents chimiques, d'autres pics d'oxydation supplémentaires des acides aminés cystéines et histidines ont été identifiés. Le comportement interfacial de la couche mince BEVA sur la surface de l'électrode de carbone vitreux a été également étudié par spectroscopie d'impédance électrochimique. L'hydrophobicité des acides aminés des chaînes lourdes et légères de BEVA via l'échelle Kyte-Doolittle, a montré un caractère hydrophile avec des séquences hydrophobes, dont la plupart des acides aminés électro-actifs sont incorporés dans la région hydrophile.

Dans la troisième partie, nous avons travaillé sur des extraits de fruits lyophilisés de la Méditerranée : nectarine, figue de Barbarie, abricot, cerise, prunes européenne et japonaise, grenade et datte. L'extraction assistée par micro-ondes et ultrasons semble la meilleure technique d'extrait des flavonoïdes, ainsi que l'analyse qualitative par une chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse couplée à un détecteur électrochimique et un détecteur photodiode, nous a permis d'identifier dix-sept flavonoïdes.

La détection électrochimique nous a permis de déterminer des concentrations beaucoup plus faibles des composés phénoliques électro-actifs.

L'évaluation de l'activité antioxydante totale de ces extraits a été rapportée par deux voies : spectroscopique et électrochimique. Les voltammogrammes à impulsion différentielle et les chronoampérogrammes, enregistrés pour chaque extrait, révèlent un mécanisme d'oxydation à une, deux ou trois étapes, correspondant à celle des espèces catéchol à un faible

potentiel, suivi par l'oxydation du résorcinol et des produits d'oxydation à des potentiels plus élevés.

L'indice électrochimique (EI), la surface des pics d'oxydation des voltammogrammes DP (P_{area}) et l'intensité des pics par chronoampérométrie (I_a), ont démontré que les extraits des prunes Européenne, prunes Japonaise et dattes, présentent l'activité la plus élevée, cependant les extraits des abricots, nectarines et figues de Barbarie présentent l'activité la plus basse.

En parallèle, les résultats obtenus par la méthode de piégeage du radical libre DPPH de l'extrait des abricots présentent une concentration efficace (EC_{50}) plus élevée, ce qui correspond à une très faible activité antioxydante, alors que les extraits des prunes Européenne, prunes Japonaise et dattes, dévoilent de faibles valeurs correspondantes à une activité plus élevée.

En ce qui concerne l'effet de la lyophilisation et la congélation sur la composition en flavonoïdes de deux variétés (dattes et grenades), les résultats montrent clairement qu'il existe des différences significatives entre les teneurs en flavonoïdes obtenus.

Les techniques électrochimiques et spectrophotométriques utilisées sont considérées comme des techniques rapides, compétentes et sensibles pour l'évaluation de l'activité antioxydante totale des extraits naturels.

Ces résultats préliminaires ouvrent la voie à plusieurs perspectives notamment pour le développement des biocapteurs électrochimiques d'intérêt médical et pharmaceutique. D'un autre côté, il serait intéressant de pouvoir comparer les résultats obtenus pour l'évaluation de l'activité antioxydante totale avec d'autres essais et de considérer les techniques électrochimiques comme des méthodes de référence.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

PARTIE I

Introduction générale

¹ C. Lefrou, P. Fabry, J.-C. Poignet, « Electrochimie - concepts fondamentaux et illustrés », EDP Sciences (2013).

² L. Galvani « De viribus electricitatis in motu musculari commentarius » Bononiae : Ex Typographia Instituti Scientiarum, (1791).

³ P. Mitchell « Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. » *Nature* (1961) 191, 144-148.

⁴ M. D. Scanlon, D. WM. Arrigan « Enhanced Electroanalytical Sensitivity via Interface Miniaturisation: Ion Transfer Voltammetry at an Array of Nanometre Liquid-Liquid Interfaces. » *Electroanalysis* (2011) 23 (4) 1023-1028.

Chapitre 1

Notions fondamentales

¹ C. Barus, « Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique - Application aux produits dermo cosmétiques » Thèse, Université de Toulouse (2008).

² D. A. Skoog, D. M. West, C. Buess-Herman, J. Dauchot, “Chimie analytique” 3^{ème} ed. De Boeck Supérieur, France (2015).

³ P. W. Atkins, « Éléments de chimie physique » De Boeck Supérieur, Belgique (1998).

⁴ C. G. Zoski, “Handbook of Electrochemistry” 1er ed. Elsevier, Oxford UK (2007).

⁵ A. M. Oliveira Brett, C. M. A. Brett, “Electroquímica: princípios, métodos, e aplicações» Oxford University Press, Coimbra (1993).

⁶ F. Scholz, «Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications” Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, USA (2010).

⁷ É. T. Gomes Cavalheiro, C. M. A. Brett, A. M. Oliveira-Brett, O.Fatibello-Filho, “Bioelectroanalysis of pharmaceutical compounds” *Bioanal Rev* (2012) 4:31 53.

⁸ J. P. Pulicani, “Etude du comportement électrochimique de composés polyfonctionnels et de dérivés comportant un groupement xanthate. » Thèse de l’Ecole polytechnique, France (2013).

⁹ B. Speiser, “Methods to Investigate Mechanisms of Electroorganic Reactions.” *Encyclopedia of Electrochemistry*, Wiley-VCH (2007).

- ¹ R. Tyagi, “Organic Reactions: Mechanism With Problems” Discovery Publishing House (2005).
- ² (a) E. Soazara Chan-Shing, “Réduction électrochimique des dérivés nitrocumyles sur électrodes de mercure et de métaux de raney » Thèse, Université de Sherbrooke, Canada (1999) (b) F. Haber, « Gradual Electrolytic Reduction of Nitrobenzene with Limited Cathode Potential. » *Z. Elektrochem.* (1898) 22, 506–514.
- ³ M. M. Gvozdenović, B. Z. Jugović, J. S. Stevanović, B. N. Grgur, « Electrochemical synthesis of electroconducting polymers» *Hem. Ind.* (2014) 68 (6) 673–684.
- ⁴ J. Yoshida, K. Kataoka, R. Horcajada, A. Nagaki “Modern Strategies in Electroorganic Synthesis” *Chem. Rev.* (2008) 108, 2265–2299.
- ⁵ A. J. Bard « The electrochemistry of organic compounds in aprotic solvents—methods and applications » *Pure Appl. Chem.* (1971) 25 (2) 379-393.
- ⁶ C. Moinet, “Electrochemistry of Heterocycles.” *Encyclopedia of Electrochemistry* (2007).
- ⁷ M. S. Workentin, F. Maran, K. Chiba, J. M. Savéant “Organic Electrochemistry: Proceedings of the Fifth International Manuel.” The Electrochemical Society (2002).
- ⁸ S. Kashimura, Y. Murai, M. Ishifune, H. Masuda, M. Shimomura, H. Murase, T. Shono, “Electroreductive Intramolecular Cyclization of Olefinic Esters and its Application to the Synthesis of Muscone.” *Acta.Chem.Scand.* (1999) 53, 949-951.
- ⁹ M. J. Neto, J.M.S.S. Esperança, A.P. Esteves, M.J. Medeiros, M.M. Silva “The Study of Indirect Electroreductive Cyclization of Propargyl Derivatives using [Ni(tmc)]Br₂ as Catalyst in Ionic Liquids” *ECS Trans.*(2014) 61 (30) 51-55.
- ¹⁰ A. Chibani, R. Hazard, M. Jubault, A. Tallec «Electrochemical synthesis of quinolone derivates. II. Electrochemical reduction of o-substituted nitrobenzylidenes. » *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1987) 795.
- ¹¹ T. Shono, Y. Usui, T. Mizukami, H. Hamaguchi, «A new electro reductive annellation useful in synthesis of alkaloids. » *Tetrahedron Lett.* (1980) 21 (32) 3073-3076.

- ¹ (a) G. A. Petsko, D. Ringe, C. Sanlaville, D. Charmot, «Structure et fonction des protéines », Chapitre 1 « De la séquence à la structure » Edition de Boeck Université, Bruxelles, Belgique (2004). (b) G. Barrett, « Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids. » Springer Netherlands (2012). (c) J.W. Moore, C.L. Stanitski, P.C. Jurs, “Chemistry: The Molecular Science.” 4th ed. Cengage Learning (2010).
- ² B. Malfoy, J. A. Reynaud, “Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part II. Amino acids containing no sulfur atoms: Tryptophan, tyrosine, histidine and derivatives.” *J. Electroanal. Chem* (1980) 114 (2) 213-223.
- ³ M. Chiku, K. Horisawa, N. Doi, H. Yanagawa, Y. Einaga, “Electrochemical detection of tyrosine derivatives and protein tyrosine kinase activity using boron-doped diamond electrodes.” *Biosens. Bioelectron* (2010) 26 (1) 235-240.
- ⁴ N. Spătaru, B. V. Sarada, E. Popa, D. A. Tryk, A. Fujishima, “Voltammetric determination of L-cysteine at conductive diamond electrodes.” *Anal Chem* (2001) 73 (3) 514-519.
- ⁵ V. Brabec, V. Mornstein, “Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions.” *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct* (1980) 625(1) 43-50.
- ⁶ S. Fei, J. Chen, S. Yao, G. Deng, D. He, Y. Kuang, “Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at carbon nanotube electrode modified with platinum.” *Anal. Biochem.* (2005) 339, 29-35.
- ⁷ L. Moreno, A. Merkoci, S. Alegret, S. Hernandez-Cassou, J. Saurina, “Analysis of amino acids in complex samples by using voltammetry and multivariate calibration methods.” *Anal. Chim. Acta*, (2004) 507, 247-253.
- ⁸ L. H. Wang, W. S. Huang, “Electrochemical Oxidation of Cysteine at a Film Gold Modified Carbon Fiber Microelectrode Its Application in a Flow—Through Voltammetric Sensor.” *Sensors* (2012) 12, 3562-3577.
- ⁹ T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett, “Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the anodic behaviour of cysteine and methionine.” *Bioelectrochemistry* (2011) 81, 46–52.
- ¹⁰ V. Brabec, V. Mornstein, “Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. II. Electrooxidation of amino acids.” *Biophys Chem* (1980) 12, 159-165.

Références bibliographiques

- ¹¹ T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett, "Peptide methionine sulfoxidereductase A (Msra): Direct electrochemical oxidation on carbon electrodes » *Bioelectrochemistry* (2013) 89, 11–18.
- ¹² T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, "Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways." *J. Electroanal. Chem.* (2011) 655, 9–16.
- ¹³ H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, "Analysis of yeast protein kinases using protein chips." *Nat. Genet.* (2000) 26: 283-289.
- ¹⁴ O. H. Aina, T. C. Sroka, M. L. Chen, K. S. Lam, "Therapeutic cancer targeting peptides." *Biopolymers* (2002) 66: 184-199.
- ¹⁵ S. Ameer, C. Bureau, J. Charlier, S. Palacin, "Immobilization of Biomolecules on Electrodes Modified by Electrografted Films." *J. Phys. Chem. B* (2004) 108 (34), 13042-13046.
- ¹⁶ R. S. Freire, C. A. Pessoa, L. D. Mello, L. T. Kubota, « Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity." *J. Braz. Chem. Soc.* (2003) 14 (2) 230-243.
- ¹⁷ J. E. Frew, H. A. Hill, "Direct and indirect electron transfer between electrodes and redox proteins." *Eur J Biochem.* (1988) 172 (2):261-269.
- ¹⁸ M. Wahlgren, T. Arnebrant, "Protein adsorption to solid surfaces." *Trends Biotechnol* (1991) 9 (1) 201-208.
- ¹⁹ A. Popof, "Importance des interactions faibles dans l'adsorption de molécules organiques fonctionnelles sur des surfaces atomiquement planes : approche expérimentale et théorique." Thèse, Université Paris 6, France (2007).
- ²⁰ M. Jaouen "Propriétés optiques de monocouches moléculaires auto-assemblées sur surfaces métalliques » Thèse, Université Paris-Sud, France (2014).
- ²¹ I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, K. C. Waldron, « Glutaraldehyde: behaviour in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking." *Bio Techniques* (2004) 37(5) 790–802.
- ²² B. Liberelle, "Greffage chimique de molécules et de polymères sur des substrats de mica et étude de leurs propriétés de surface. »Thèse, Université de Montréal (2007).
- ²³ W. Wang, S. Singh, D.L. Zeng, K. King, S. Nema, "Antibody structure, instability, and formulation", *J Pharm Sci* (2007) 96, (1) 1-26.

Références bibliographiques

- ²⁴ H. W. Schroeder, L. Cavacini, “Structure and function of immunoglobulins”, *J Allergy Clin Immunol* (2010) 125 (2) s S41-S52.
- ²⁵ C. Prin-Mathieu, P. Aguilar, M. C. Béné, G. Faurea, M. N. Kolopp-Sarda « Anticorps monoclonaux, anticorps thérapeutiques. » *Revue Française des Laboratoires* (2003) 2003 (357) 31-39.
- ²⁶ A. J. Scheen, « nomenclature internationale des différents types d’anticorps monoclonaux. » *Rev Med Liège* 2009; 64 : 5-6 : 244-247.
- ²⁷ <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00112>
- ²⁸ S. Faivre, E. Raymond, « Thérapeutiques anti angiogéniques en cancérologie » Springer Science & Business Media (2008).
- ²⁹ O. Cochet, M. Chartrain, « Du milligramme à la tonne d’anticorps monoclonaux - Outils et perspectives de production. » *Med Sci (Paris)* (2009) 25 (12) 1078-1084.
- ³⁰ F. Kabbinavar, J. Hambleton, R.D. Mass, H.I. Hurwitz, E. Bergsland, S. Sarkar, “Combined Analysis of Efficacy: The Addition of Bevacizumab to Fluorouracil/ Leucovorin Improves Survival for Patients with Metastatic Colorectal Cancer.” *J. Clin. Oncol.* (2005) 1; 23(16):3706-3712.
- ³¹ F. Di Costanzo, F. Mazzoni, M. Micol Mela, L. Antonuzzo, D. Checcacci, M. Saggese, F. Di Costanzo, “Bevacizumab in non-small cell lung cancer.” *Drugs.* (2008) 68(6):737-746.
- ³² H. S. Rugo, “Bevacizumab in the Treatment of Breast Cancer: Rationale and current data.” *Oncologist* (2004) 9 (1) 43-49.
- ³³ R. L. Avery, J. Pearlman, D. J. Pieramici, M. D. Rabena, A. A. Castellarini, M.A. Nasir, M. J. Giust, R. Wendel, A. Patel, “Intravitreal Bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy.” *Ophthalmology* (2006) 113 (10):1695.e1–15.
- ³⁴ B. T. Brinkerhoff, N. W. Choong, J. S. Treisman, D. M. Poetker, “Intravenous and topical intranasal bevacizumab (Avastin) in hereditary hemorrhagic telangiectasia.” *Am. J. Otolaryngology* (2012) 33(3):349-351.
- ³⁵ H. F. Jiménez-Ortiz, S.P. Martinez, N.T. Fernández, “Bevacizumab (Avastin) intracamerular en el manejo quirúrgico del glaucoma neovascular.” *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia* (2012) 87(12):396–400.
- ³⁶ I. C. Lopes, S. C. B. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett, “In situ electrochemical evaluation of anticancer drug temozolomide and its metabolites-DNA interaction.” *Anal. Bioanal. Chem.* (2013) 405(11):3783-3790.

- ³⁷ V. Ostatná, H. Cernocka, K. Kurzatowska, E. Paleček, “Native and Denatured Forms of Proteins can be Discriminated at Edge Plane Carbon Electrodes.” *Anal.Chim.Acta* (2012) 735:31-36.
- ³⁸ Éder T. G. Cavaleiro, C. M. A. Brett, A. M. Oliveira-Brett, O. Fatibello-Filho, “Bioelectroanalysis of pharmaceutical compounds.” *Bioanal Rev* (2012) 4:31-53.
- ³⁹ T. D. Pollard, W. C. Earnshaw, « Biologie cellulaire. » Elsevier Masson, (2004).
- ⁴⁰ C. David, « Mécanismes de réduction des ponts S-S dans les protéines étudiés par spectroscopie Raman et modélisation moléculaire. » Thèse, Université Franche-Comté, France (2009).
- ⁴¹ E.B. Getz, M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke, P.R. Selvin, “A comparison between the sulfhydryl reductants tris (2-carboxyethyl) phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry.” *Anal. Chem.* (1999) 71, 73–80.

Chapitre 4

Electrochimie des flavonoïdes

- ¹ (a) C. Migdal, M. Serres, “Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant.” *Med Sci (Paris)* (2011) 27(4) 405 – 412. (b) B. Uttara, A.V. Singh, P. Zamboni, R. T. Mahajan, “Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options.” *Curr Neuropharmacol.* (2009) 7(1):65-74.
- ² P. Lacolley, D. Babuty, C. Boulanger, B. Ghaleh, G. Loirand, F. Pinet, J. I. Samuel « Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. » ed. John Libbey Eurotext (Paris) (2007).
- ³ D. A. Ghareeb, E. M.E. Sarhan, “Role of Oxidative Stress in Male Fertility and Idiopathic Infertility: Causes and Treatment.» *J Diagn Tech Biomed Anal* (2014) 3(1) 1-12.
- ⁴ D. A. Pratt, K. A. Tallman, N. A. Porter, “Free Radical Oxidation of Polyunsaturated Lipids: New Mechanistic Insights and the Development of Peroxyl Radical Clocks” *Acc Chem Res.* (2011) 44 (6) 458-467.
- ⁵ L. Lyras, R. H. Perry, E. K. Perry, P. G. Ince, A. Jenner, P. Jenner, B. Halliwell, “Oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in cortical brain regions from patients with dementia with Lewy bodies” *J. Neurochem.* (1998) 71, 302–312.
- ⁶ J. Cadet, T. Douki, J.-L. Ravanat “Oxidatively generated base damage to cellular DNA.” *Free Radic. Biol. Med.* (2010) 49, 9–21.

Références bibliographiques

- ⁷ K. Krumova, G. Cosa, “*Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanoscience.*” *Volume 1.* The Royal Society of Chemistry, London, UK (2016). “Overview of Reactive Oxygen Species.” *Chapter 1*, 1-21.
- ⁸ (a) Y.Y. Lim, T.T. Lim, J.J. Tee, “Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study” *Food Chem.*(2007) 103, 3, 1003–1008, (b) M. Mueller, S. Hobiger, A. Jungbauer, “Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices” *Food Chem.*(2010) 122, 987–996.
- ⁹ WHO Fruit and Vegetable Promotion Initiative – report of the meeting, Geneva (2003).
- ¹⁰ L. H. Yao, Y.M. Jiang, J. Shi, F.A. Tomás-Barberán, N. Datta, R., Singanusong, “Flavonoids in Food and Their Health Benefits” *Plant Food Hum Nutr.*(2004) 59, 113-122.
- ¹¹ T. J. Key, “Fruit and vegetables and cancer risk” *Br. J. Cancer* (2011) 104, 6 –11.
- ¹² B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Loeliger, O. I. Aruoma, "The characterization of antioxidants" *Food Chem Toxicol.* (1995) 33, 601-617.
- ¹³ C. Vergely, L. Rochette, " Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire." *Médecine thérapeutique Cardiologie* (2003) 1 (3) 131-139.
- ¹⁴ A. Fardet, I. Souchon, D. Dupont, “Structure des aliments et effets nutritionnels.” Ed. Quae (2013).
- ¹⁵ L. R. Fukumoto, G. Mazza, “Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds.”*J. Agric. Food Chem* (2000) 48: 3597-3604.
- ¹⁶ G. Isorez, « Contribution à la chimie des flavonoïdes : Accès à des analogues de pigments du vin rouge.», Thèse, Université Louis Pasteur – Strasbourg I (2007).
- ¹⁷ L. Chen, X. Yang, H. Jiao, B. Zhao, "Tea catechins protect against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction and calcium dysregulation in PC12 cells." *Chem. Res. Toxicol.* (2003) 16 (9), 1155-1161.
- ¹⁸ C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Remesyet, L. Jimenez, "Polyphenols: Food sources and bioavailability." *Am. J. Clin. Nutr.* (2004)79(5): 727-747.
- ¹⁹ H. El Gharras, "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review" *Int J Food Sci Tech* (2009) 44 (12): 2512-2518.
- ²⁰ M. Shafiur Rahman « Handbook of Food Preservation. », 2nd Edition CRC Press Taylor & Francis Group Boca Raton (2007).
- ²¹ C. Bonnard, V. Cabos, L. Destre, D. Gonge, A. Mascart, G. Peignet, E. Sidot, « Projet interdisciplinaire, filière fruits et légumes », DESS Université Lille1 (1999-2000).

Références bibliographiques

- ²² A. Branger, M. M. Richer, S. Roustel, « Alimentation et processus technologiques » *Educagri*, Dijon (2007).
- ²³ A. P. Dionísio, R. Takassugui Gomes, M. Oetterer, “Ionizing radiation effects on food vitamins - A Review” *Braz. arch. biol. technol.* (2009) 52 (5) 1267-1278
- ²⁴ C. Ratti, “Freeze-Drying Process Design, in Handbook of Food Process Design.” (ed J. Ahmed and M. Shafiur Rahman), Wiley-Blackwell, Oxford, (2012).
- ²⁵ P. Chouvinc, S. Vessot, J. Andrieu, P. Vacus, “Optimization of the freeze-drying cycle: a new model for pressure rise analysis.” *Drying Technol.* (2004) 22, 1577-1601.
- ²⁶ C. Grosso, P. Valentão, F. Ferreres, P. B. Andrade, “Alternative and Efficient Extraction Methods for Marine-Derived Compounds.” *Mar Drugs.* (2015) 13(5): 3182–3230.
- ²⁷ R. Poirot, « méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale. »Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (2007).
- ²⁸ L. Gao, G. Mazza. "Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls." *J. Food sci.* (1996) 61(3) 600-603.
- ²⁹ C. H. Chan, R. Yusoff, G. C. Ngoh, F. Wai-Lee Kung “Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants.” *J. Chromatogr. A* (2011) 1218(37), 6213-6225.
- ³⁰ H. F. Zhang, X. H. Yang, Y. Wang « Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions.” *Trends Food Sci Tech* (2011) 22, 672-688.
- ³¹ Nguyen Di Khanh “Advances in the extraction of anthocyanin from vegetables.” *Food Nutr. Sci.* (2015) 3(1-2): 126-134.
- ³² V. Pasquet, J. R. Chérouvrier, F. Farhat, V. Thiéry, J. M. Piot, J.B. Bérard, R. Kaas, B. Serive, T. Patrice, J. P. Cadoret, L. Picot “Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction.” *Process Biochem.* (2011) 46, 59-67.
- ³³ Y. Yu, B. Chen, Y. Chen, M. Xie, H. Duan, Y. Li, G. Duan «Nitrogen-protected microwave-assisted extraction of ascorbic acid from fruit and vegetables .» *J. Sep. Sci.* (2009) 32, 4227-4233.
- ³⁴ Y. Chen, X. Gu, S. Huang, J. Li, X. Wang, J. Tang, “Optimization of Ultrasonic/Microwave Assisted Extraction (UMAE) of Polysaccharides from *Inonotus Obliquus* and Evaluation of Its Anti-Tumor Activities.” *Int. J. Biol. Macromol.* (2010) 46 (4) 429-435.
- ³⁵ (a) S. Seidi, Y. Yamini, “Analytical sonochemistry; developments, applications, and hyphenations of ultrasound in sample preparation and analytical techniques” *Cent. Eur. J. Chem.*(2012) 10(4) 938-976. (b) C.E. Banks, R.G. Compton, “Ultrasound: promoting

electroanalysis in difficult real world media.” *Analyst* (2004).129, 678. (c) A. C. Soria, M. Villamiel, “Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review.” *Trends Food Sci Technol* (2010) 21, 323-331.

³⁶ S. K. Ho, C. P. Tan, Y. Y. Thoo, F. Abas, C. W. Ho, “Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidants in Misai Kucing (*Orthosiphonstamineus*)” *Molecules* (2014) 19(8), 12640-12659.

³⁷ N. Rombaut, A. S. Tixier, A. Bily, F. Chemat, “Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery.” *Biofuels, Bioprod. Bioref.* (2014) 8: 530–544.

³⁸ M. Haddou, « Dégradation de dérivés de l'acide benzoïque par les procédés d'oxydation avancée en phase homogène et hétérogène : procédés Fenton, photo-Fenton et photocatalyse. » Thèse, Université de Toulouse (2010).

³⁹ S. Ahuja, M. Dong, “Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC.” Volume 6, Elsevier, San Diego (2005).

⁴⁰ K. Ramni, N. Kaur, A. Upadhyay, O. P. Suri, T. Arti, « High Performance Liquid Chromatography Detectors – A Review », *IRJP* (2011) 2(5) 1–7.

⁴¹ L. M.L. Nollet, F. Toldra, « Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods. » CRC Press, Boca Raton USA (2012).

⁴² P. A. Kilmartin, « Forum Method Communication Electrochemical Detection of Natural Antioxidants: Principles and Protocols. » *Antioxid. Redox Signal* (2004) 3(6): 941-955.

⁴³ S. Memon, A. H. Laghari, A. A. Kandhro, F. N. Memon, A. Nelofar, « Purification of flavonoid metal complexes from Alhagi camelorum with calix[4]arene based impregnated resin” *Anal. Methods* (2014) 6, 6332-6336.

⁴⁴ K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya, « Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity Relationships” *J Nutr. Biochem.* (2002) 13, 572–584.

⁴⁵ B. F. Rasuleva, N. D. Abdullaev, V. N. Syrovand J. Leszczynski, « A Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Study of the Antioxidant Activity of Flavonoids.” *QSAR Comb Sci.* (2005) 24, 9, 1056 – 1065.

⁴⁶ G. W. Plumb, K. R. Price, G. Williamson “Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea” *Redox Rep.* (1999) 4(1-2):13-16.

⁴⁷ H-C. Zhou, NF-y. Tam, Y-M. Lin, Z-H Ding, W-M. Chai, S-D. Wei, “Relationships between Degree of Polymerization and Antioxidant Activities: A Study on Proanthocyanidins from the Leaves of a Medicinal Mangrove Plant *Ceriops tagal*.” *PLoS One* (2014) 9 (10) e107606.

- ⁴⁸ L. G. D'Alessandro, « Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'*Aronia melanocarpa* et ses coproduits.» Thèse Université Lille 1 (2013).
- ⁴⁹ R. Salazar, M. E. Pozos, P. Cordero, J. Perez, M. C. Salinas, N. Waksman, « Determination of the Antioxidant Activity of Plants from Northeast Mexico. » *Pharm Biol* (2008) 46:3, 166-170.
- ⁵⁰ W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset “Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity” *LWT - Food sci. technol.* (1995) 28 (1) 25-30
- ⁵¹ Y. Lu, L. Y. Foo “Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace.” *Food Chem.* (2000) 68:81–85.
- ⁵² A. Wollinger, É. Perrin, J. Chahboun, V. Jeannot, D. Touraud, W.Kunz, “Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. » *C. R. Chim.* (2016) 19 (6) 754-765.
- ⁵³ E. Bendary, R.R. Francis, H.M.G. Ali, M.I. Sarwat, S. El Hady, “Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds.” *AOAS* (2013) 58 (2) 173-181.
- ⁵⁴ a) P. Molyneux, “The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity.” *Songklanakarin J. Sci. Technol.* (2004) 26 (2), 211-219. b) C. Sanchez-Moreno, A. Larrauri Jose, F. Saura-Calixto, “A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols.” *J. Sci. Food & Agric.* (1998) 76 (2), 270-276.
- ⁵⁵ E. S. Gil, R. O. Couto “Flavonoid Electrochemistry: A Review on the Electroanalytical Applications.” *Rev. Bras. Farmacogn.* (2013) 23(3): 542-558.
- ⁵⁶ T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett “Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways.” *J. Electroanal. Chem.* (2011) 655, 9–16.

PARTIE II

Chapitre 1.1

Techniques électrochimiques

- ¹ G. H. Jeffery, J. Bassett, J. Mendham, R. C. Denney, “Vogel's text book of quantitative Chemical Analysis.” 5th Ed., John Wiley & Sons. INC., New York (1989).
- ² D. A. Skoog, D. M. West, « Chimie analytique » 3^{ème} ed. De Boeck Supérieur, (2015).

Références bibliographiques

- ³ J. Wang « Analytical Electrochemistry » 3rd edition John Wiley & Sons, New Jersey (2006).
- ⁴ H. H. Girault « Electrochimie physique et analytique » 2^{ème} édition Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne (2007).
- ⁵ C. Brett, A. M. Oliveira Brett “Electroanalysis” The Bath Press Ltd UK (1998).
- ⁶ J. O’Dea, M. Wojciechowski, J. Osteryoung, K. Aoki “Square Wave Voltammetry at Electrodes Having a Small Dimension” *Anal. Chem* (1985) 57 (4) 954–955.
- ⁷ P. Chamelot, B. Lafage, P. Taxil, « Using square-wave voltammetry to monitor molten alkaline fluoride baths for electrodeposition of niobium. », *Electroch. Acta* (1997) 43 (5–6) 607–616.
- ⁸ F. Scholz, «Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications.» 2nd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York (2010).
- ⁹ H. Lund, «Organic Electrochemistry » 3 ed, édité par Marcel Dekke. M. .M., New York, 162, (1963).
- ¹⁰ R. J. Marshall, F. C. Walsh «A review of some recent electrolytic cell designs. » *Surface Technology* (1985) 24, 45-77.
- ¹¹ J. Mendham, « Analyse chimique quantitative de Vogel. » De Boeck Supérieur (2005).
- ¹² N. Perez, “Electrochemistry and Corrosion Science.” Springer Science & Business Media, (2004).
- ¹³ (a) D.V. Ribeiro, C.A.C. Souza, J.C.C. Abrantes, « Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete.” *Rev. IBRACON Estrut. Mater.* (2015) 8 (4) 529-546. (b) K.R.R. Freire, « Avaliação Do desempenho de inibidores de corrosão em armaduras de concreto. », Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná Curitiba (2005).
- ¹⁴ Generalic, Eni."Dropping mercury electrode." Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary.23 Feb. 2017. KTF-Split. 25 Feb. 2017. <<http://glossary.periodni.com>>.
- ¹⁵ M. Brun, «Electrodes nanocomposites pour applications en Micro fluidique », Thèse, Université Claude Bernard Lyon 1 France (2011).
- ¹⁶ R. L. Mc Creery, “Advanced carbone electrode materials for molecular electrochemistry.” *Chem. Rev.* (2008) 108 (7) 2646-2687.
- ¹⁷ C. M. A. Brett, A. M. Oliveira Brett, “Electrochemistry Principles, Methods, and Applications » Oxford University Press, Book craft (Bath) Ltd UK (1993).

¹⁸ C. A. Thorogood, G. G. Wildgoose, J. H. Jones, R. G. Compton, “Identifying quinone-like species on the surface of graphitic carbon and multi-walled carbon nanotubes using reactions with 2,4-dinitrophenylhydrazine to provide a voltammetric fingerprint.” *New J. Chem.* (2007) 31, 958–965.

Chapitre 1.2

Matériels & Réactifs

¹ B.S. Furniss, A.J. Hannaford, P.W.G. Smith, A. R. Tatchell, VOGEL'S "Textbook of Practical Organic Chemistry", 5 ed. , Londres, (1989).

² C. Moinet, D. Peltier, *Bull.Soc.Chim.Fr*, 690 (1969).

³ S. Pisutthanan, P. Plianbangchang, N. Pisutthanan, S. Ruanruay, O. Muanrit, « Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae.” *Naresuan Univ J.* (2004) 12(2): 13-18.

⁴ B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. Mc Laughlin « Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.” *Planta Med.* (1982) 45, 31–34.

⁵ Feuille d’information, Santé Canada, Ontario (2011). http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/notices-avis/conditions/avastin_fs_fd_130719-fra.php.

⁶ M. Alothman, R. Bhat, A.A. Karim “Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvent.” *Food Chem.* (2009) 115 785–788.

⁷ S. M. C. Gomes, I. P. G. Fernandes, N. S. Shekhawat, S. Kumbhat, A. M. Oliveira-Brett “*Calligonum polygonoides* Linnaeus Extract: HPLC-EC and Total Antioxidant Capacity Evaluation” *Electroanalysis* (2015) 27 (2) 293-301.

⁸ I. Novak, P. Janeiro, M. Seruga, A. M. Oliveira-Brett “Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection » *Anal. Chim. Acta* (2008) 630, 107 – 115.

⁹ “Waters 2465 Electrochemical Detector” Operator’s Guide, Milford MA USA (2007).

¹⁰ (a) A. J. Blasco, M. C. Rogerio, M. C. González, A. Escarpa, ““Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal” *Anal. Chim. Acta* (2005) 539, 237–244. (b) F.M.A. Lino, L.Z. de Sá, I.M.S. Torres, M.L. Rocha, T.C.P. Dinis

P.C. Ghedini, V.S.Somerset, E.S.Gil, « Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines » *Electrochimica Acta* (2014) 128, 25–31.

Chapitre 2

Electrochimie des dérivés nitrés

¹ C. Moinet, D. Peltier, *Bull.Soc.Chim.Fr*, 690 (1969).

² D.J. Finney, “Probit Analysis.” Cambridge University Press, London (1971) 68–72.

³ P. N. Solis, C. W. Wright, M. M. Anderson, M. P. Gupta, J. D. Phillipson, “A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp).” *Planta Med.* (1993) 59 (3):250-252.

Chapitre 3

Electrochimie du Bevacizumab

¹ S. Prabhulkar, H. Tian, X. Wang, J. Zhu, C. Li “Engineered Proteins: Redox Properties and Their Applications. » *Antioxid Redox Signal* (2012) 17 (12) 1796-1822.

² E. Paleček, F. Scheller, J. Wang, “Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics.” Elsevier (2005).

³ T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett, « Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): Direct electrochemical oxidation on carbon electrodes. » *Bioelectrochemistry* (2013) 89, 11-18.

⁴ T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, “Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways.” *J. Electroanal. Chem.* (2011) 655, 9–16.

⁵ T. A. Enache, “Mecanismos redox de compostos aromáticos, aminoácidos e proteínas, em eléctrodos de carbono. » Dissertação, Universidade de Coimbra, Portugal (2011).

⁶ T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett “Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behavior of cysteine and methionine.” *Bioelectrochemistry* (2011) 81, 46–52.

⁷ <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00112>.

⁸ a) B. Malfoy, J.A. Reynaud, “Electrochemical Investigations of Amino Acids at Solid Electrodes: Part II. Amino Acids Containing no Sulfur Atoms: Tryptophan Tyrosine, Histidine and Derivatives.” *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem* (1980) 114 (2) 213-223, b) J.A. Reynaud, B. Malfoy, P. Canesson, “Electrochemical Investigations of Amino Acids at Solid Electrodes: Part I. Sulfur components: Cystine Cysteine, Methionine” *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem.* (1980) 114 (2) 195-211.

- ⁹ A. M. Oliveira-Brett, L. A. da Silva, C. M. A. Brett, « Adsorption of Guanine, Guanosine, and Adenine at Electrodes Studied by Differential Pulse Voltammetry and Electrochemical Impedance.” *Langmuir* (2002) 18, 2326-2330.
- ¹⁰ I. B. Santarino, S. C. B. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett, “Protein reducing agents dithiothreitol and tris (2-carboxyethyl) phosphine anodic oxidation.” *Electrochem. Com.* (2012) 23, 114-117.
- ¹¹ S. C. B. Oliveira, I. B. Santarino, A. M. Oliveira-Brett, « Direct Electrochemistry of Native and Denatured Anticancer Antibody Rituximab at a Glassy Carbon Electrode.” *Electroanalysis* (2013) 25 (4) 1029 – 1034.
- ¹² W. Reiner, T. Naven, *Proteomics in Practice*, Wiley-VCH, Berlin (2002).
- ¹³ J. Kyte, R. F. Doolittle, “A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.” *J. Mol. Biol* (1982) 5;157 (1):105-32.
- ¹⁴ (a) S.J. Haward, P.R. Shewry, M.J. Miles, T.J. McMaster, “Direct real-time imaging of protein adsorption onto hydrophilic and hydrophobic surfaces.” *Biopolymers* (2010) 93, 74–84. (b) M.Wahlgren, T. Arnebrant, “Protein adsorption to solid surfaces.” *Trends Biotechnol.* (1991) 9,201–208.
- ¹⁵ S. M. Jaglowski, J. C. Byrd, « Rituximab in Chronic Lymphocytic Leukemia.” *Semin. Hematol.* (2010) 47, No 2, 156–169.

Chapitre 4 *Electrochimie des flavonoïdes ‘Détection et activité AO’*

- ¹ P. Janeiro, A. M. Oliveira Brett “Catechin electrochemical oxidation mechanisms” *Anal. Chim. Acta* (2004) 518, 109–115.
- ² C. G.M. Heijnen, G. R.M.M. Haenen, R. M. Oostveen, E. M. Stalpers, A. Bast, “Protection of Flavonoids Against Lipid Peroxidation: The Structure Activity Relationship Revisited.” *Free Radic Res* (2002) 36 (5) 575–581.
- ³ C. Cren-Olivé, P. Hapiot, J. Pinson, C. Rolando, “Free Radical Chemistry of Flavan-3-ols: Determination of Thermodynamic Parameters and of Kinetic Reactivity from Short (ns) to Long (ms) Time Scale.” *J. Am. Chem. Soc.* (2002) 124(47):14027-14038.
- ⁴ (a) A. J. Blasco, M. C. Rogerio, M. C. González, A. Escarpa, ““Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal” *Anal. Chim. Acta* (2005) 539, 237–244. (b) F.M.A. Lino, L.Z. de Sá, I.M.S. Torres, M.L. Rocha, T.C.P. Dinis P.C. Ghedini, V.S.Somerset, E.S.Gil, « Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines” *Electrochimica Acta* (2014) 128, 25–31.

Références bibliographiques

- ⁵ J. Piljac-Žegarac, L. Valek, T. Stipčević, S. Martinez, “Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions.” *Food Chem.* (2010) 121 (3) 820-825.
- ⁶ K. Mishra, H. Ojha, N. K. Chaudhury “Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results » *Food Chem.* (2012) 130, 1036–1043.
- ⁷ B. Ozcelik, J.H. Lee and D.B. Min, “Effects of Light, Oxygen and pH on the Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl”, *J. Food Sci.* (2003) 68 (2) 487–490.
- ⁸ a) D. W. Snelgrove, J. L. usztyk, J. T. Banks, P. Mulder, K. U. Ingold, “Kinetic solvent effects on hydrogen-atom abstractions :reliable, quantitative predictions via a single empirical equation.” *J. Am. Chem. Soc.* (2001) 123, 469–477. (b) G. Litwinienko, K. U. Ingold, “Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals.” *Acc. Chem. Res.* (2007) 40, 222–230.
- ⁹ M. C. Foti, “The Use and Abuse of the DPPH[•] Radical”, *J Agric Food Chem.* (2015) 63(40):8765-8776.
- ¹⁰ M. C. Foti, C. Daquino, I. D. Mackie, G. A. DiLabio, K. U. Ingold, “Reaction of Phenols with the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. Kinetics and DFT Calculations Applied To Determine ArO-H Bond Dissociation Enthalpies and Reaction Mechanism.” *J. Org. Chem.* (2008) 73, 9270–9282.
- ¹¹ B. Pfundstein, S. K. El Desouky, W. E. Hull, R. Haubner, G. Erben, R. W. Owen « Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities.” *Phytochemistry* (2010) 71 (10) 1132–1148.
- ¹² M. S. Bhojar; G. P. Mishra, P. K. Naik, R. B. Srivastava, « Estimation of Antioxidant Activity and Total Phenolics Among Natural Populations of Caper (*Capparis spinosa*) Leaves Collected from Cold Arid Desert of Trans-Himalayas.” *Aust J Crop Sci.* (2011) 5 (7) 912-919.
- ¹³ V. Bondet, W. Brand-Williams, C. Berset, “Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH[•] Free Radical Method », *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, (1997) 30, 609–615.
- ¹⁴ B. F. Rasuleva, N. D. Abdullaev, V. N. Syrovb, J. Leszczynskia, « A Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Study of the Antioxidant Activity of Flavonoids » *QSAR Comb. Sci.* (2005) 24, (9) 1056 – 1065.
- ¹⁵ I. Novak, P. Janeiro, M. Seruga, A. M. Oliveira-Brett, “Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-

Références bibliographiques

performance liquid chromatography with electrochemical detection” *Anal. Chim. Acta* (2008) 630, 107–115.

¹⁶ CITAC/EURACHEM GUIDE, Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation, (2002).

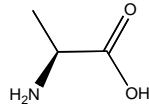
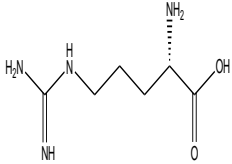
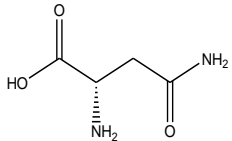
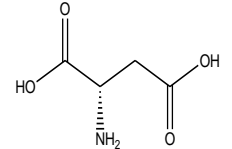
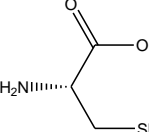
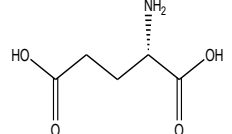
¹⁷ (a) A. E. İnce, S. Şahin, S. G. Şümmü, “Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound” *Turk. J. Agric. For.* (2013) 37, 69–75. (b) . M. C. Gomes, I. P. G. Fernandes, N. S. Shekhawat, S. Kumbhat, A. M. Oliveira-Brett, “Calligonum polygonoides Linnaeus Extract: HPLC-EC and Total Antioxidant Capacity Evaluation” *Electroanalysis* (2015) 27(2) 293–301.

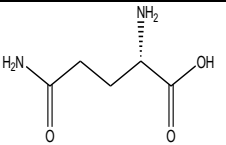
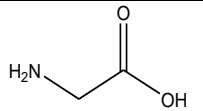
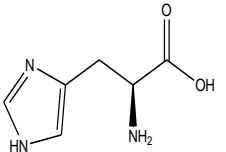
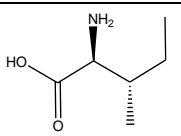
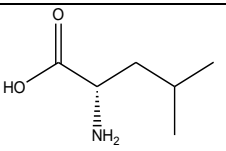
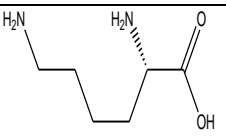
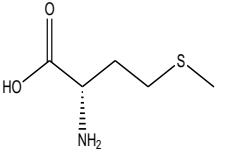
¹⁸ H. H. Orak, T. Aktas, H. Yagar, S. Selen Isbilir, N. Ekinçi, F. Hasturk Sahin, “Effects of hot air and freeze drying methods on antioxidant activity, colour and some nutritional characteristics of strawberry tree (*Arbutus unedo*L) fruit.” *Food Sci. Technol. Int.* (2012) 18(4) 391–402.

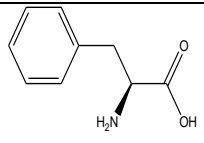
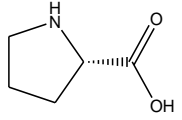
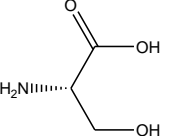
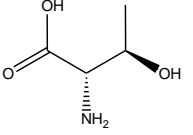
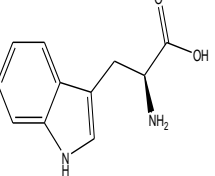
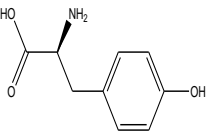
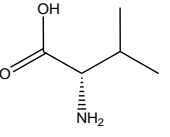
¹⁹ M. Keinänen, R. Julkunen-Tiitto, “Effect of sample preparation method on birch (*Betula pendula* Roth) leaf phenolics.” *J. Agric. Food Chem.* (1996) 44, 2724-2727.

ANNEXE

Annexe.1 Structure chimique des acides aminés et leurs propriétés¹.

Acide aminé	Code à 3 lettres	Code à un lettre	Poids (g/mole)	Indice de hydrophobicité (KYTE, 1982)	pKa (-COOH)	pKa (-NH _{es})	pKa (R groupe)	Polarité du Groupe R	Charge du groupe R
Alanine	Ala (A)		89.08	1.8	2.34	9.69	-	Aliphatique apolaire	Neutre
Arginine	Arg (R)		174.20	-4.5	2.17	9.04	12.48	Polaire	positive
Asparagine	Asn (N)		132.12	-3.5	2.02	8.80	-	Polaire	Neutre
Acide aspartique	Asp (D)		133.10	-3.5	1.88	9.60	3.65	Polaire	négative
Cystéine	Cys (C)		121.16	2.5	1.96	8.18	10.28	Polaire	Neutre
Acide glutamique	Glu (E)		147.13	-3.5	2.19	9.67	4.25	Polaire	Négative

Glutamine	Gln (Q)		146.15	-3.5	2.17	9.13	-	Polaire	neutre
Glycine	Gly (G)		75.07	-0.4	2.34	9.60	-	apolaire	Neutre
Histidine	His (H)		155.16	-3.2	1.82	9.17	6.00	Polaire	Positive
Isoleucine	Ile (I)		131.17	4.5	2.36	9.68	-	apolaire	Neutre
Leucine	Leu (L)		131.17	3.8	2.36	9.60	-	Apolaire	Neutre
Lysine	Lys (K)		146.19	-3.9	2.18	8.95	10.53	polaire	Positive
Méthionine	Met (M)		149.21	1.9	2.28	9.21	-	Polaire	neutre

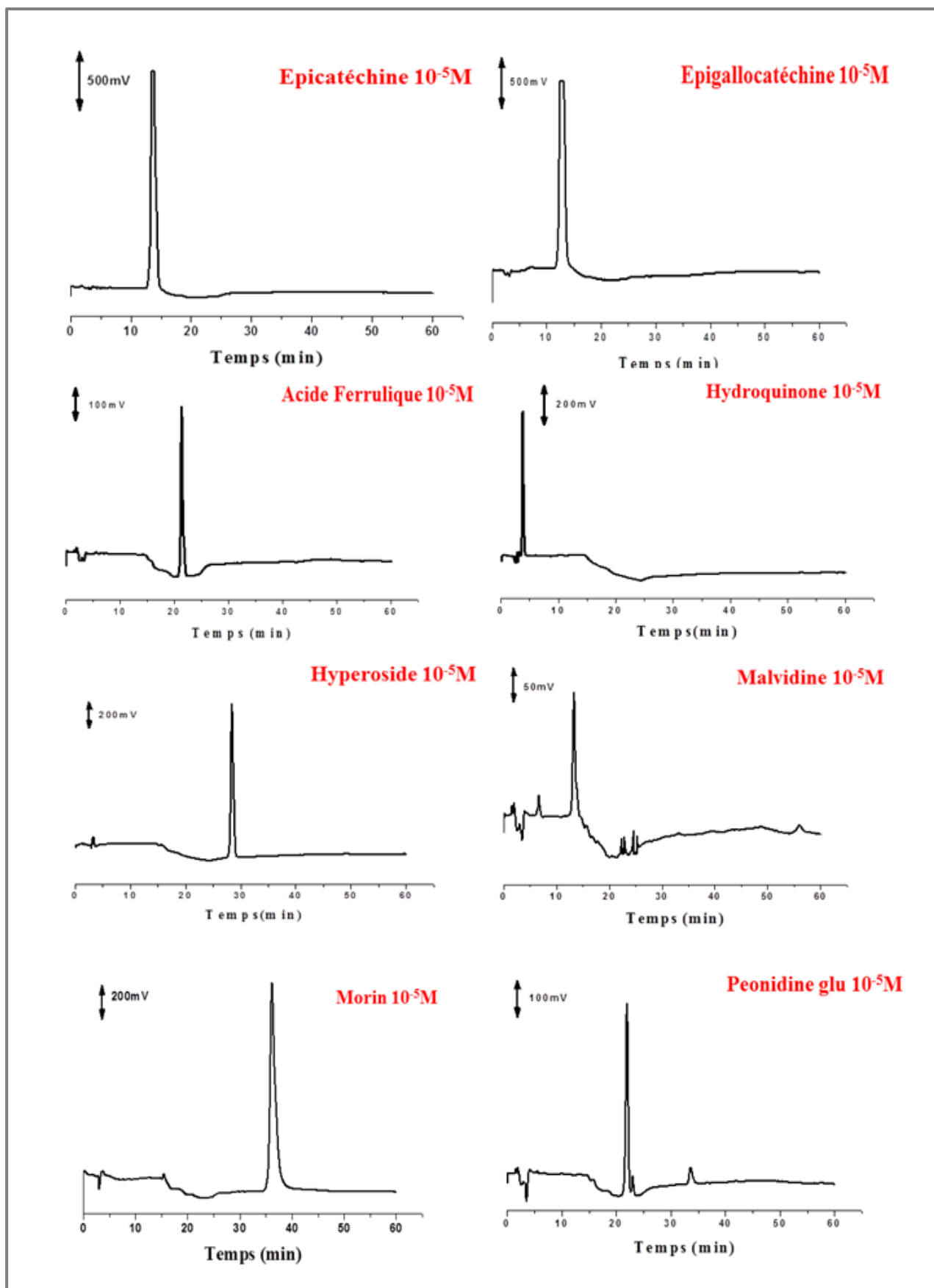
Phénylalanine	Phe (F)		165.19	2.8	1.83	9.13	-	apolaire	Neutre
Proline	Pro (P)		115.13	-1.6	1.99	10.96	-	apolaire	Neutre
Sérine	Ser (S)		105.09	-0.8	2.21	9.15	13.60	Polaire	Neutre
Thréonine	Thr (T)		119.12	-0.7	2.11	9.62	13.60	Polaire	Neutre
Tryptophane	Trp (W)		204.23	-0.9	2.38	9.39	-	Apolaire	Neutre
Tyrosine	Tyr (Y)		181.19	-1.3	2.20	9.11	10.07	polaire	Neutre
Valine	Val (V)		117.15	4.2	2.32	9.62	-	apolaire	Neutre

"Bevacizumab light chain"

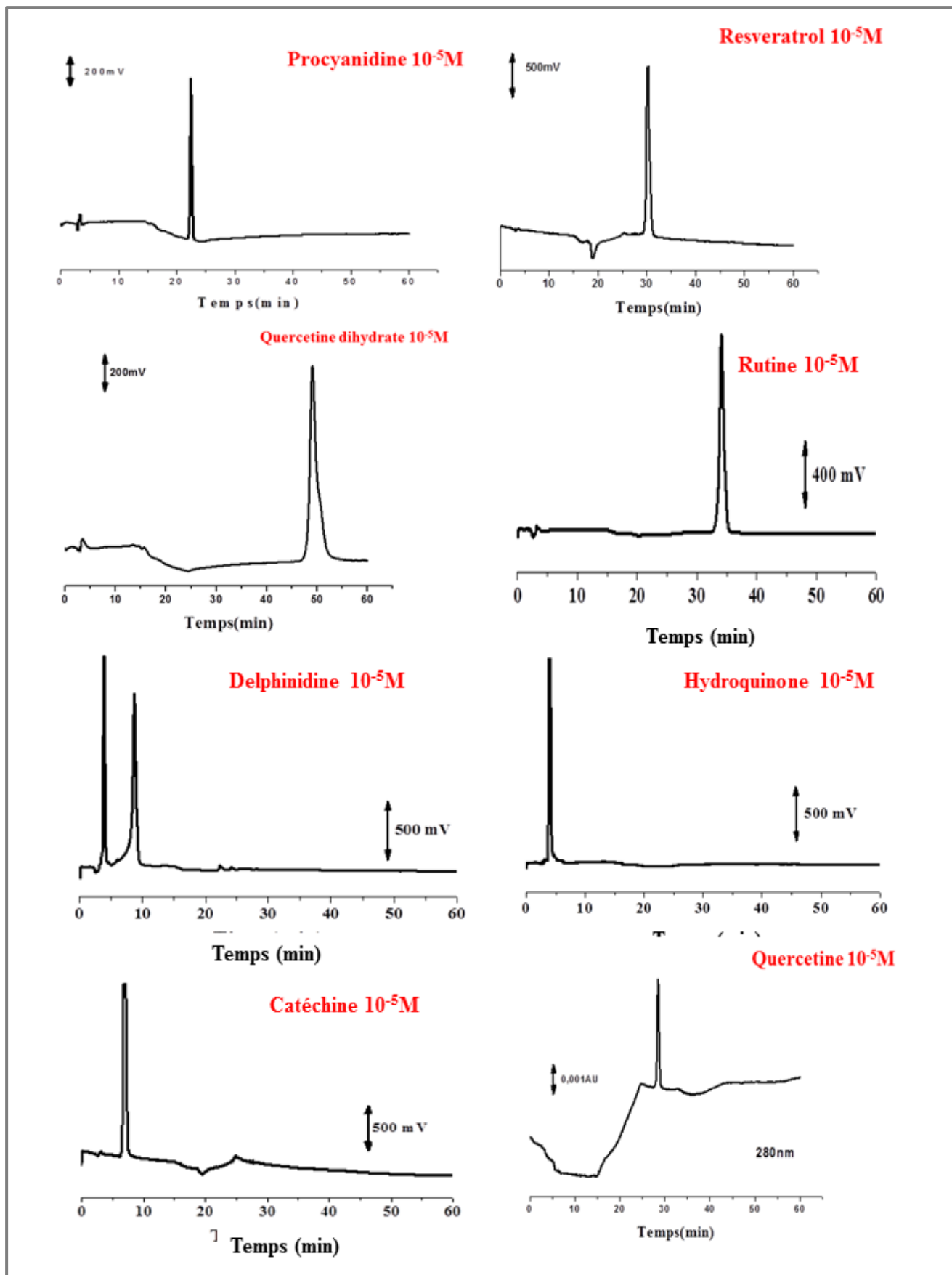
DIQMTQSPSSLSASVGRVITCSASQDISNYLNWYQQKPKAPKVLIIYFTSSLHSGVPS
RFGSGGTDFLLTISSLQPEDFATYQCQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

"Bevacizumab heavy chain"

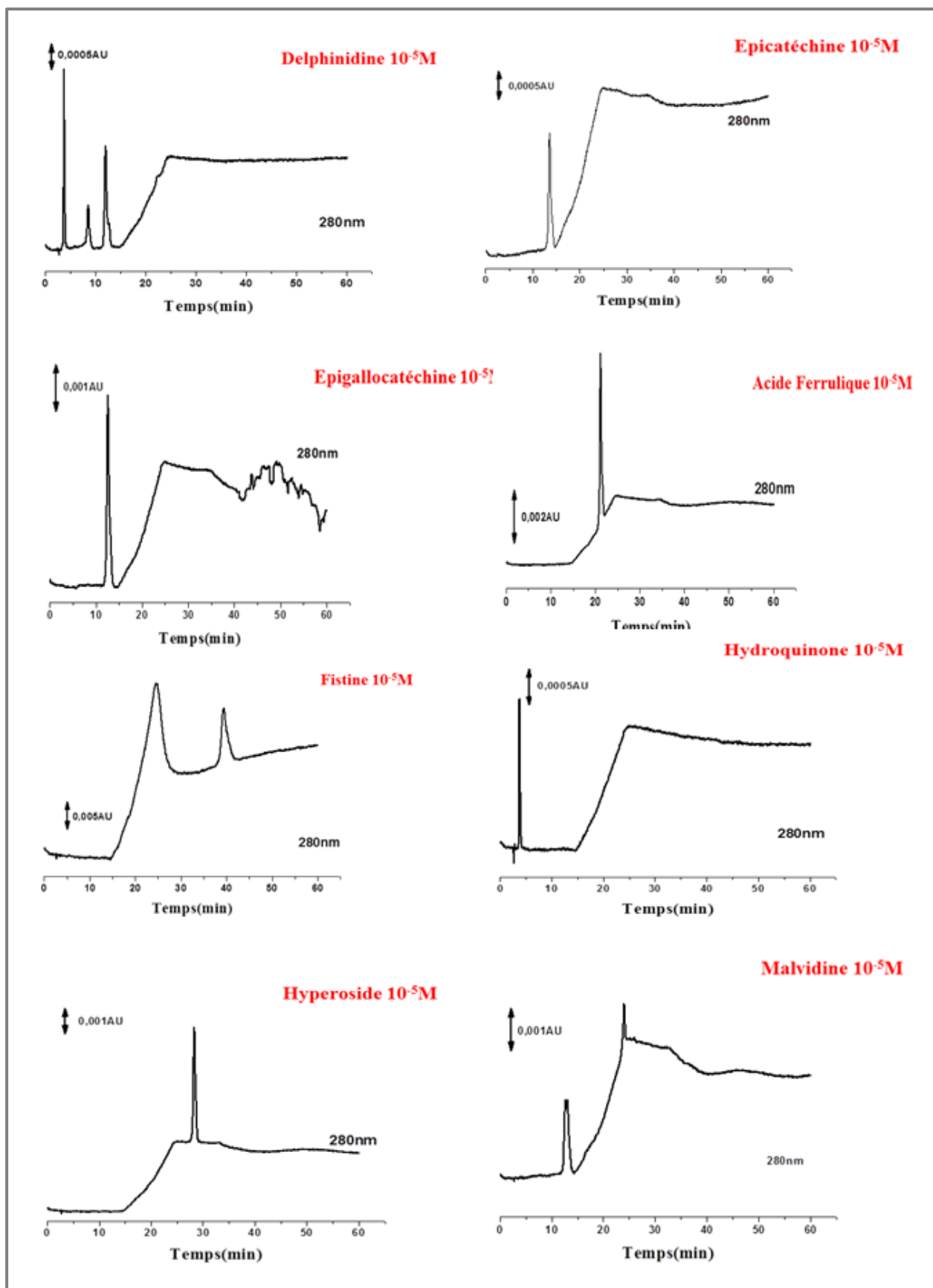
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFITNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTY
AADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGLVT
VSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHCTCPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK



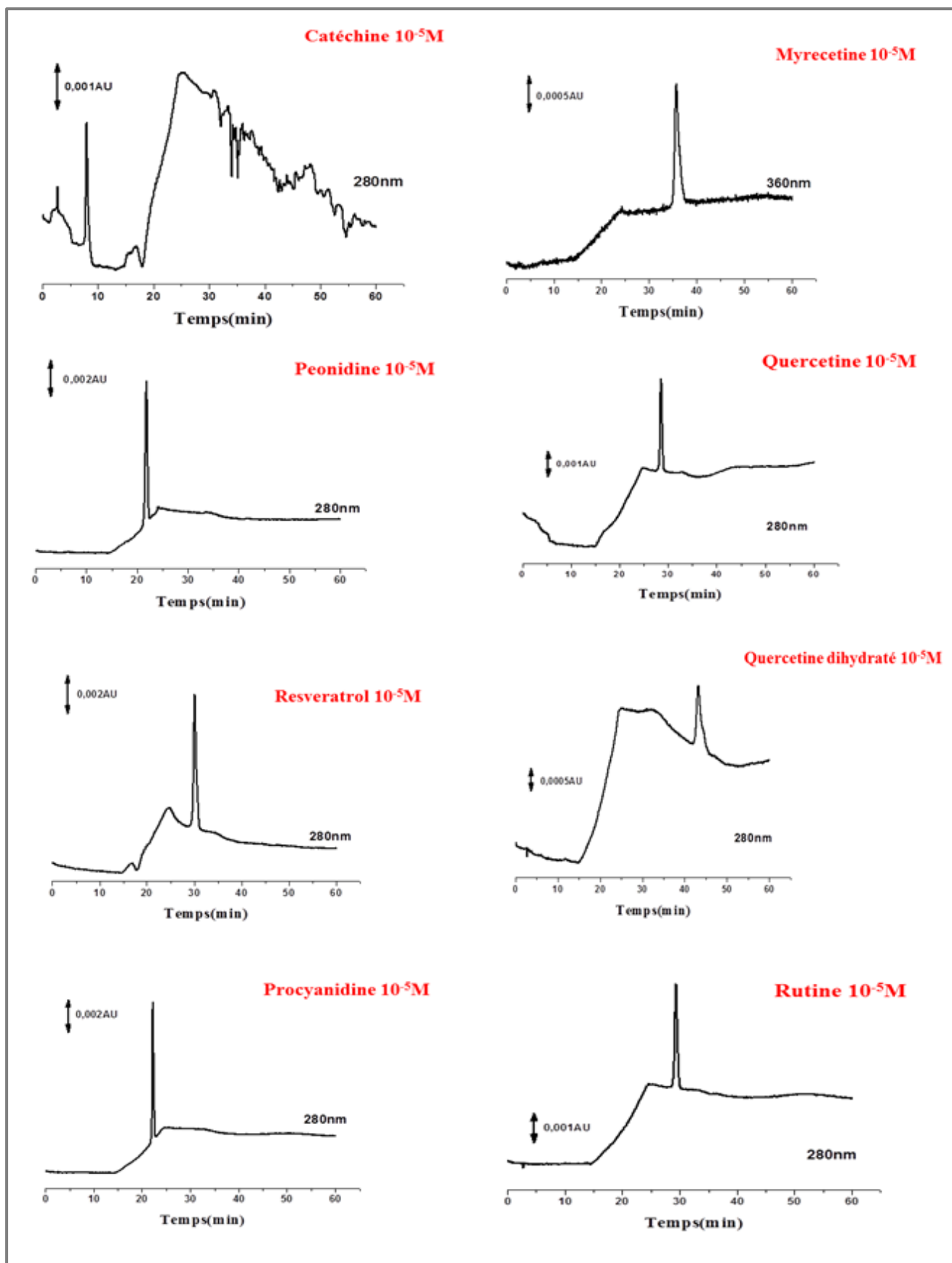
Annexe.3 (A) Chromatogrammes HPLC de la détection des standards par ED.



Annexe.3 (B) Chromatogrammes HPLC de la détection des standards par ED.



Annexe.3 (C) Chromatogrammes HPLC de la détection des standards par PDA.



Annexe.3 (D) Chromatogrammes HPLC de la détection des standards par PDA.

RESUME

RESUME

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la caractérisation du comportement électrochimique de trois types de molécules : synthétiques, naturelles et biosynthétiques

Des hétérocycles dérivés à partir de l'acide nitro phényl acétique ont été synthétisés et évalués pour leur comportement électrochimique et leur cytotoxicité.

L'oxydation électrochimique de l'anticorps monoclonal Bevacizumab (BEVA) natif sur la surface d'une électrode de carbone vitreux (GCE) dans une large gamme de pH, présente un pic d'oxydation des acides aminés: tyrosine et tryptophane, d'autre part l'oxydation d'un film de BEVA dénaturé fait apparaître d'autres pics d'oxydation des acides aminés: cystéine et histidine.

La détection et l'identification des flavonoïdes dans les extraits de fruits lyophilisés de la Méditerranée: abricot, cerise, prune, grenade, datte, figue de barbarie et nectarine, ont été réalisés par la chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC), couplée à un détecteur photodiode (PDA) et un détecteur électrochimique (ED).

L'évaluation de l'activité anti-oxydante totale de ces extraits a été évaluée par la voltammétrie d'impulsion différentielle (indice électrochimique (EI) et surface des pics (P_{area})) et la chronoampérométrie (intensité des pics (I_a)). En parallèle, les concentrations efficaces (EC_{50}) des extraits de fruits lyophilisés et du catéchine ont été déterminées par le test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Mots-clés: Hétérocycles, Bevacizumab, dénaturation, flavonoïde, électrode de carbone vitreux, activité antioxydante.

ABSTRACT

This work presents the electrochemical behavior of three types of molecules: synthetic, biosynthetic and natural.

Heterocyclic compounds from nitrophenyl acetic acid were synthesized and evaluated for their electroactivities and cytotoxic properties.

The electrochemical oxidation of native and denatured Bevacizumab (BEVA) was investigated in solution over a wide pH range and using BEVA-thin film voltammetry on a glassy carbon electrode (GCE). For native BEVA, only one pH-dependent oxidation peak, corresponding to tyrosine and tryptophan amino acid residues oxidation, was observed. On the other hand, the electrochemical oxidation of denatured BEVA-thin film on GCE showed additional cysteine and histidine residues oxidation peaks.

The flavonoids, in selected Mediterranean seasonal fruits: apricot, cherry, plum, pomegranate, date, prickly pear and nectarine were detected by high-performance liquid-phase chromatography with inverse phase (RP-HPLC), coupled with photodiode array (PDA) and electrochemical detectors (ED).

The total antioxidant capacity in the lyophilized fruit extracts, by differential pulse voltammetry (electrochemical index-EI, integrated peak area- P_{area}) and chronoamperometry (peak intensity- I_a), was evaluated. In the lyophilized fruit extracts, and the catechin standard, the free radical scavenger efficient concentration (EC_{50}), using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, was determined.

Keywords: Heterocyclic compound, Bevacizumab, denaturation, flavonoid, glassy carbon electrode, antioxidant capacity.

المخلص

هذا العمل يندرج ضمن تحديد السلوك الكهروكيميائي لثلاثة أنواع من الجزيئات: الاصطناعية والطبيعية والمصنعة حيويًا.

تمت دراسة السلوك الكهروكيميائي وسُميت المركبات الناتجة من مشتقات نثرو فينيل لحمض الخليك. الأكسدة الكهروكيميائية للأجسام المضادة وحيدة النسيلة بيفاسيزوماب (BEVA) الطبيعي على قطب الكربون الزجاجي (GCE) ضمن نطاق واسع من درجات الحموضة أفضى إلى ظهور قمة أكسدة واحدة، ناتجة عن أكسدة الحمضين الأمينيين التيروسين والتربتوفان، من ناحية أخرى أكسدت بيفاسيزوماب بعد تغيير شكله أدت إلى ظهور قمم أكسدة إضافية من الحامض الأمينى السيستين و الهيسثيدين. مركبات الفلافونويد المتواجدة في مستخلصات فواكه من مناطق مناخ البحر الأبيض المتوسط: المشمش، الكرز، البرقوق، الرمان، التين الشوكي والنكتارين بواسطة تقنية الفصل الكروماتوجرافي (RP-HPLC) متصل بجهاز الكشف الضوئي (PDA) و الكهروكيمياوي (ED). إجمالي القدرة المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات درست عن طريق النبض الفولطي التفاضلي (المؤشر الكهروكيميائي EI-ومساحة القمم P_{area}) وتقنية التيار الكهربائي الميقاتي (شدة القمة I_a)، بالتوازي مع هذه التقنيات تم تحديد التركيز الفعال (EC_{50}) من خلال طريقة محاصرة الجذور الحرة 2, 2-ديفينيل-1-بيكريل هيدرازيل (DPPH).

الكلمات المفتاحية: المركبات الحلقية غير المتجانسة ، بيفاسيزوماب، تغيير شكل، الفلافونويد، قطب الكربون الزجاجي، القدرة المضادة لأكسدة.

**PUBLICATIONS
SCIENTIFIQUES**



Bevacizumab anticancer monoclonal antibody: native and denatured redox behaviour



Fatima Z. Issaad^{a,c,d}, Luciana I.N. Tomé^a, Nuno V. Marques^b, Chabane Mouats^d, Victor C. Diculescu^a, Ana Maria Oliveira-Brett^{a,*}

^a Chemistry Department, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal

^b Serviços Farmacêuticos, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE, 3000-075 Coimbra, Portugal

^c Centre de Recherche en Biotechnologie, CRBT, BPE 73, Ali Mendjeli, Nouvelle Ville, 25000 Constantine, Algeria

^d Unité de Recherche de Chimie de l'Environnement et Moléculaire Structurale, CHEMS, Faculté des Sciences Exactes, Campus Chaabet Erssas, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2016

Received in revised form 15 April 2016

Accepted 17 April 2016

Available online 26 April 2016

Keywords:

bevacizumab

antibody

voltammetry

glassy carbon electrode

denaturing agents

ABSTRACT

Bevacizumab (BEVA) is a monoclonal antibody (mAb) used in clinical oncology to treat certain types of metastatic cancers. The electrochemical oxidation of native and denatured BEVA was investigated in solution over a wide pH range and using BEVA-thin film voltammetry on a glassy carbon electrode. For native BEVA, only one pH-dependent oxidation peak, corresponding to tyrosine and tryptophan amino acid residues oxidation, was observed. The interfacial behaviour and adsorption of BEVA at the glassy carbon surface were evaluated by voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The unfolding of the protein 3D morphological structure occurred upon denaturation with chemical agents, denaturing agent sodium dodecyl sulphate, and the reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol, was electrochemically characterized. The electrochemical oxidation of denatured BEVA-thin film on GCE showed additional cysteine and histidine residues oxidation peaks.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The improved understanding of the molecular mechanisms of cancer has opened the way to a plethora of new anticancer therapies potentially more effective and with diminished adverse side effects when compared to classical chemotherapy and radiotherapy. Monoclonal antibodies (mAb) have earned special attention due to their more specific and more effective therapeutic properties and have become one of the most promising strategies for cancer treatment [1]. Several different monoclonal antibodies have recently achieved remarkable clinical success and have been approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for specific cancer therapy, and some newer types are still in clinical trials [1].

Bevacizumab (BEVA) is a recombinant humanized IgG1 monoclonal antibody (93% human, 7% murine sequences) that targets vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). By inhibiting VEGF-A molecule, BEVA blocks angiogenesis and limits the tumours' blood supply, thus slowing or interrupting its growth

[1,2]. BEVA is an intravenous drug originally approved by the FDA in 2004 to treat advanced colorectal cancer [2]. It is presently employed in the treatment of other human solid tumours such as lung, kidney, ovarian and brain cancers [1,2], and also in the treatment of proliferative diabetic retinopathy (PDR) [3], hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT) [4] and glaucoma [5].

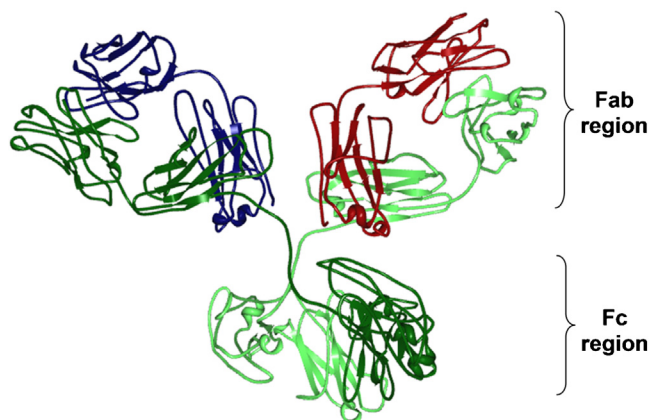
Structurally, BEVA comprises six murine sequences grafted onto a backbone of heavy chains of 452 amino acids and light chains of 214 amino acids, having a molecular weight of ~149 kDa. Each light chain is covalently linked through a disulphide bond at cysteine 214 to a heavy chain at cysteine 226. The two heavy chains are covalently bound through two interchain disulphide bonds, consistently with the structure of a human IgG1 [6], Scheme 1.

In the development and application of monoclonal antibodies, as effective anticancer drugs, the study of the reactions involved in their physiological action mechanism is of utmost importance. The electrochemical methods have proved to be a valuable tool and have enabled to obtain sound insight, as far as the *in vitro* behaviour of these, and other drugs, used in clinical oncology, is concerned [7–12].

The electrochemical behaviour of amino acids has revealed that tyrosine, tryptophan, cysteine, histidine and methionine, are the only electroactive at carbon electrodes [13–23]. Direct

* Corresponding author.

E-mail addresses: brett@ci.uc.pt, anabrett@ci.uc.pt (A.M. Oliveira-Brett).



Scheme 1. Structure of IgG1 monoclonal antibody (structure PDB ID: 1IGY [29]).

electrochemistry of native proteins on solid surfaces can represent a major challenge since the rigidity of their tertiary and quaternary structures hampers the electron transfer process between the inner electroactive amino acids and the electrode surface [24]. Direct protein electrochemistry has been largely based on the detection of tyrosine and tryptophan although the oxidation of histidine, cysteine or methionine has been reported mostly in peptides [25] and more recently in proteins [7,23,26].

Rituximab (RTX) is a human/murine chimeric monoclonal antibody (mAb) that specifically targets the transmembrane protein CD20 of B-cells. The oxidation mechanism of native and denatured RTX was investigated on glassy carbon electrode [7].

In the study of the direct electrochemistry of proteins on solid surfaces, the use of denaturing or reducing agents sodium dodecyl sulphate (SDS), dithiothreitol (DTT) and tris(5-carboxyethyl) phosphine (TCEP), to unfold the protein, and expose the electroactive amino acids to the electrode surface, has shown to be extremely advantageous [7,27]. Urea and guanidinium chloride were not used because they are a frequent cause of protein-solvent hydrogen bonds formation. Guanidinium chloride is a very strong denaturant that leads to lose of protein ordered structure which became undesirably randomly coiled. Urea is also a powerful protein denaturant which is usually applied to increase the solubility of some proteins.

The objective of this work was to investigate the charge transfer reactions of native and denatured BEVA at a glassy carbon electrode over a wide pH range, using cyclic, square wave and differential pulse voltammetry. With that aim, three approaches were followed: (i) voltammetry of native BEVA in solution, (ii) native BEVA-thin film voltammetry, and (iii) denatured BEVA-thin film voltammetry, using the denaturing and reducing agents sodium SDS, DTT and TCEP. To characterize the interfacial behaviour and adsorption of BEVA-thin film electrochemical impedance spectroscopy experiments were also carried out.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

The bevacizumab (BEVA) sample was Avastin 25 mg mL⁻¹, from Roche Pharmaceuticals, for injections, containing 25 mg mL⁻¹ bevacizumab (BEVA), trehalose dihydrate, sodium phosphate, polysorbate 20 and water. The dithiothreitol (DTT), tris(5-carboxyethyl)phosphine (TCEP) and sodium dodecyl sulphate (SDS) were from Sigma, and potassium ferrocyanide (K₄Fe(CN)₆) from Merck were used without further purification. All reagents were of high purity and analytical grade.

Stock solutions of 6 mg mL⁻¹ BEVA for solution experiments, and 10 mg mL⁻¹ BEVA to prepare the BEVA-thin film on the GCE surface, in deionised water were prepared daily. Stock solutions of 0.1 M DTT and 0.1 M SDS were prepared in deionised water, and of 0.1 M TCEP in 0.1 M acetate buffer pH = 5.4. The 10 mM K₄Fe(CN)₆ stock solutions were daily prepared in 0.1 M phosphate buffer pH = 6.9.

All the supporting electrolyte buffer solutions were prepared using analytical grade reagents and purified water from a Millipore Milli-Q system (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$): 0.1 M HAcO/NaAcO acetate buffer pH 3.4, 4.5, and 5.4; 0.1 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ phosphate buffer pH 6.08 to 8.05; and 0.1 M NaOH/Na₂B₂O₇ buffer pH = 9.25.

Microvolumes were measured using P20, P200 and P1000 microliter pipettes (Gilson S. A., Villiers-le-Bel, France). The pH measurements were performed with a Crison micropH 2001 pH-meter with an Ingold combined glass electrode.

All experiments were carried out at room temperature (25 \pm 1) °C.

2.2. Electrochemical parameters and cells

Voltammetric experiments were carried out using a μ Autolab running with GPES 4.9 software, Metrohm/Autolab, Utrecht, The Netherlands. Measurements were performed using a glassy carbon working electrode (GCE) ($d = 1.5 \text{ mm}$), a Pt wire counter electrode, and a Ag/AgCl (3 M KCl) as reference electrode, in a volume of 500 μL in an one-compartment electrochemical cell.

Cyclic voltammetry (CV) was performed at a scan rate of 100 mV s⁻¹. The experimental conditions for differential pulse (DP) voltammetry were: pulse amplitude 50 mV, pulse width 70 ms, interval time 0.4 s, and scan rate 5 mV s⁻¹. For square wave (SW) voltammetry, the experimental conditions were frequency of 50 Hz, potential increment of 2 mV and pulse amplitude of 50 mV, effective scan rate of 100 mV s⁻¹.

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was performed using an Autolab 10 running the FRA software version 4.9. The voltage perturbation was 5 mV r.m.s. over a frequency range from 60 kHz to 0.1 Hz, with six frequencies per decade. The EIS spectra were recorded at the midpoint potentials. From CV experiments, in solutions of 1 mM K₄Fe(CN)₆, in 0.1 M phosphate buffer pH 6.9, the midpoint potentials, of +0.45 V for clean GCE and of +0.52 V for BEVA-thin film on GCE, were determined

The GCE was polished using diamond spray (particle size 1 μm , Kement, Kent, UK) before each electrochemical experiment. After polishing, the electrode was rinsed thoroughly with Milli-Q water for 30 seconds. After this mechanical treatment, the GCE was placed in buffer supporting electrolyte and DP voltammograms were recorded. The procedure was repeated as many times as necessary until reproducible baseline voltammograms were obtained.

All voltammograms were always recorded immediately after the immersion of the electrode into the electrochemical cell containing the sample solution.

2.3. Procedures

Procedure 1—Solutions of 5 mg mL⁻¹ BEVA in 0.1 M buffer electrolyte with $3.4 \leq \text{pH} \leq 9.25$, were prepared. The GCE was placed in the electrochemical cell containing the BEVA solution where CV, DP and SW voltammetry were performed.

Procedure 2—BEVA-thin film modified GCE—The immobilization of BEVA at the GCE surface was carried out by successively covering the GCE surface with 3 drops each of 5 μL from a 10 mg mL⁻¹ BEVA stock solution. After placing each drop the electrode surface was dried under a constant flux of N₂. The GCE with immobilized BEVA

was then placed in the electrochemical cell containing only the buffer supporting electrolyte and allowed to hydrate for 5 minutes before DP voltammograms were recorded.

Procedure 3—denatured BEVA-thin film modified GCE—The GCE with immobilized BEVA, Procedure 2, was incubated in 33.33 mM SDS, 10 mM TCEP or 10 mM DTT, during different time periods, ranging from 30 to 300 minutes. Then, the electrode was removed from the solution, washed with deionised water to remove the excess of SDS, TCEP or DTT, and placed in the electrochemical cell containing only the 0.1 M phosphate buffer pH=6.9 supporting electrolyte, where DP voltammograms were recorded. Each experiment was carried out with a newly prepared BEVA-thin film modified GCE. For control experiments, newly prepared BEVA-thin film modified GCE were incubated in 0.1 M phosphate buffer pH=6.9 for the same periods of time.

2.4. Acquisition and presentation of voltammetric data

All the DP voltammograms presented were baseline-corrected using the moving average application with a step window of 5 mV, included in GPES version 4.9 software. This mathematical treatment improves the visualization and identification of peaks over the baseline without introducing artefacts, although the peak current intensity is in some cases reduced (10%) relative to that of the untreated curve. Nevertheless, this mathematical treatment of the original voltammograms was used in the presentation of all experimental voltammograms for a better and clearer identification of the peaks. The values for peak current presented in all graphs were determined from the original untreated voltammograms after subtraction of the baseline.

The hydrophobicity plots [28] of BEVA, sequence DB00112 provided by DrugBank database [29], were obtained using the online tool ProtScale from ExPASy—Bioinformatic Resource Portal [30] with a window size of 9 amino acids.

The antibody structure was obtained using the Protein Workshop 4.2.0 [31] software from Protein Data Bank RCSB PDB [32,33].

3. Results

3.1. Native BEVA in solution

The redox behaviour of native BEVA was studied by CV, DP and SW voltammetry in buffer supporting electrolytes with $3.4 \leq \text{pH} \leq 9.25$.

3.1.1. Cyclic voltammetry

CVs were recorded in solutions of 5 mg mL^{-1} BEVA in electrolytes with different pHs between the potential limits of +0.0 V and +1.4 V, Fig. 1. One main oxidation peak was observed on the positive-going scan of the first CV, corresponding to tyrosine (Tyr) and tryptophan (Trp) amino acid residues electrochemical oxidation, Table 1. No peak occurred after changing the scan direction, indicating the irreversibility of BEVA electron transfer process. A second CV in the same conditions, without cleaning the GCE surface, was recorded, but no peaks were observed due to the electrode surface blockage with adsorbed non-electroactive products.

Increasing the supporting electrolyte pH the oxidation peak was shifted to less positive potentials, corresponding to the BEVA pH-dependent oxidation mechanism, Fig. 1.

3.1.2. Differential pulse voltammetry

DP voltammetry allows lower detection limits and a better visualization of all redox processes. DP voltammograms were

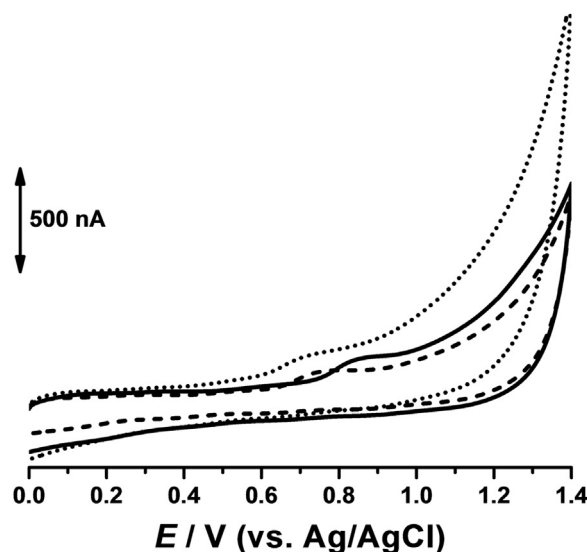


Fig. 1. CVs with GCE in 5 mg mL^{-1} BEVA: (—) pH 4.5, (---) pH 6.9 and (···) pH 9.3 buffer supporting electrolyte; $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Table 1

Electroactive amino acids oxidation potentials, recorded in individual solutions of free amino acid in 0.1 M phosphate buffer pH=7.0 [18–21].

Amino acid	E_{p1a}/V	E_{p2a}/V	E_{p3a}/V
Tyrosine (Tyr)	0.63	—	—
Tryptophan (Trp)	0.63	1.08	—
Histidine (His)	1.15	—	—
Cysteine (Cys)	0.52	0.88	1.27
Methionine (Met)	1.12	—	—

recorded in solutions of 5 mg mL^{-1} BEVA in electrolytes with different pH.

The DP voltammograms, Fig. 2A, presented only one oxidation peak, in all electrolytes. The peak potential variation with pH was linear, following the equation, $E_{pa} = 1.091 - 0.060 \text{ pH}$. The slope of the line $-60 \text{ mV per pH unit}$ and the width at half height of the oxidation peak, $W_{1/2} \sim 90 \text{ mV}$, indicated that the oxidation involves one electron and one proton transfer, Fig. 2B. BEVA oxidation peak currents were also pH-dependent, Fig. 2B. The highest peak current was observed in pH = 6.08 and the lowest in pH = 4.5.

3.1.3. Square wave voltammetry

The electrochemical behaviour of native BEVA was also studied using SW voltammetry in buffer electrolytes with $3.4 \leq \text{pH} \leq 9.25$. The SW voltammogram, in 0.1 M phosphate buffer pH = 6.9, Fig. 3, showed the BEVA oxidation peak. The irreversibility of BEVA oxidation was confirmed by plotting the forward and the backward components of the total current, and only the anodic reaction occurred. A second SW voltammogram was recorded in the same conditions and without cleaning the GEC surface, but no peak was detected.

3.2. BEVA-thin film modified GCE

The electrochemical oxidation of a BEVA-thin film modified GCE was investigated in $3.4 \leq \text{pH} \leq 9.25$ electrolytes, using DP voltammetry, following BEVA immobilization Procedure 2, and BEVA immobilized denaturation using Procedure 3.

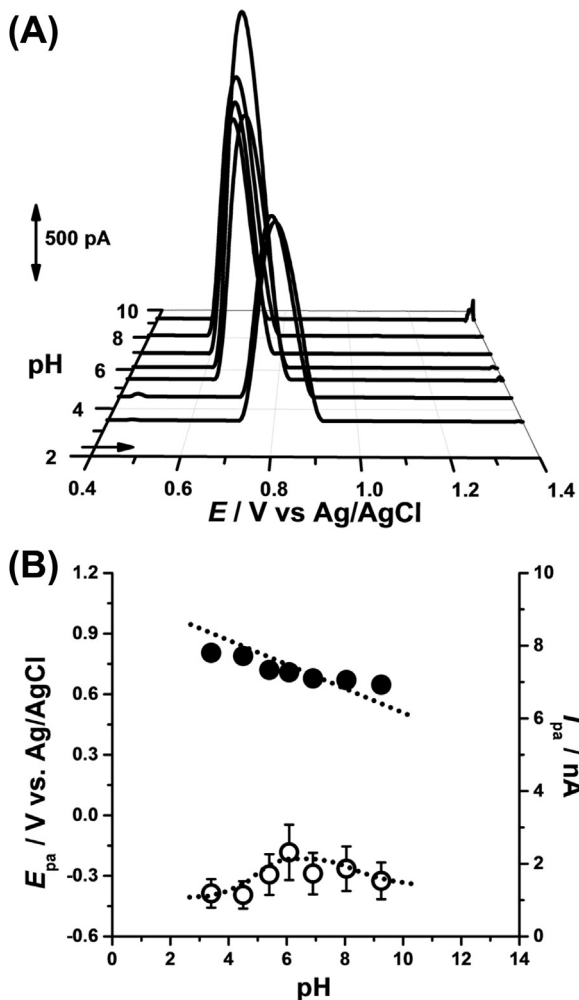


Fig. 2. (A) DP voltammograms base-line corrected with GCE in 5 mg mL⁻¹ BEVA as function of pH of the supporting electrolyte. (B) Plot of BEVA (○) I_{pa} and (●) E_{pa} of vs. pH. The slope of the dotted line is -60 mV per pH unit.

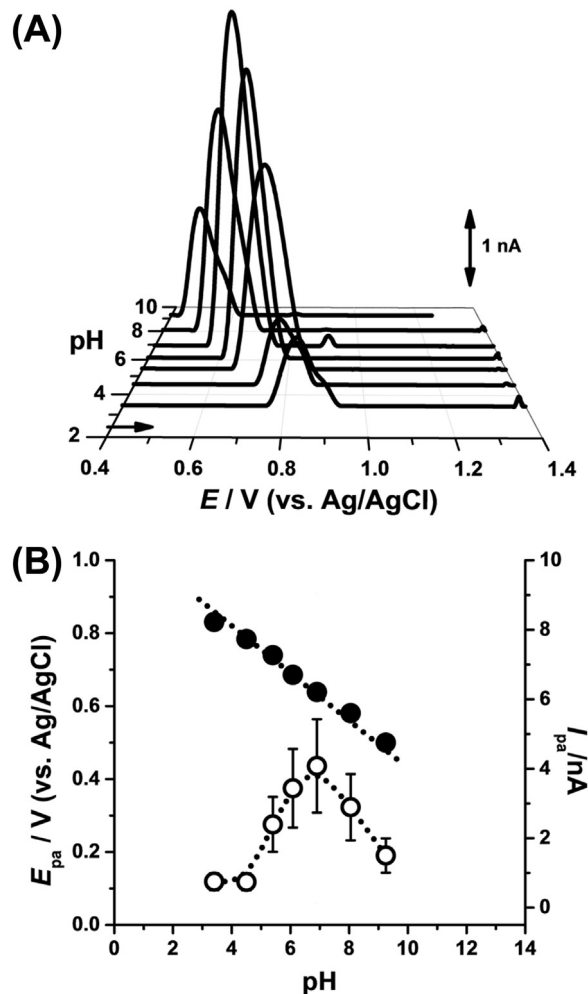


Fig. 4. (A) DP voltammograms base-line corrected of BEVA-thin film on GCE as function of pH of the supporting electrolyte. (B) Plot of BEVA-thin film (○) I_{pa} and (●) E_{pa} vs. pH. The slope of the dotted line is -60 mV per pH unit.

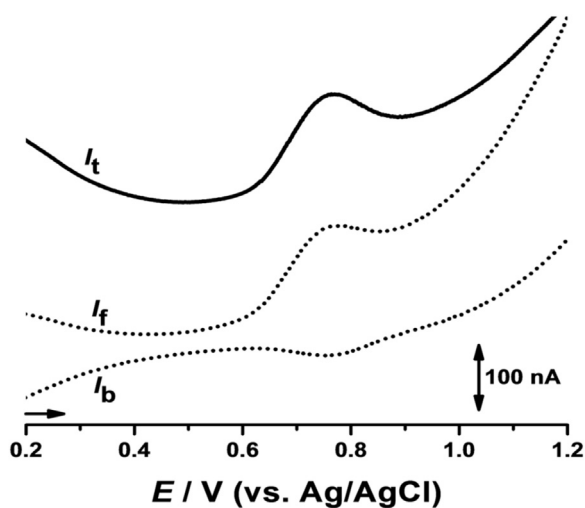


Fig. 3. SW voltammograms with GCE in 5 mg mL⁻¹ BEVA, in 0.1 M phosphate buffer pH=6.9; I_t total current, I_f forward current, I_b backward current; $f=50$ Hz, $\Delta E_s=2$ mV, $v_{eff}=100$ mV s⁻¹.

3.2.1. Native BEVA-thin film modified GCE

The DP voltammograms of native BEVA-thin film modified GCE, Fig. 4A, presented one oxidation peak, in all electrolytes, corresponding to tyrosine (Tyr) and tryptophan (Trp) amino acid residues electrochemical oxidation, Table 1 [18–21].

The native BEVA-thin film oxidation peaks were better visualized when compared with the experiments in solution, presenting higher peak currents which increased until reaching a maximum in 0.1 M phosphate buffer pH=6.9.

The oxidation peak potential showed a linear pH-dependence, according to the relationship $E_{pa}=1.054-0.060$ pH, with the supporting electrolyte pH for the whole range studied, Fig. 4B. The slope of -60 mV per pH unit and $W_{1/2} \sim 90$ mV, confirm that the immobilized BEVA oxidation involves as well the transfer of one electron and one proton.

The interfacial behaviour and adsorption of native BEVA-thin film on GCE surface was characterized by CV and EIS in solutions of 1 mM K₄Fe(CN)₆, in 0.1 M phosphate buffer pH 6.9, Fig. 5.

The CVs recorded in 1 mM K₄Fe(CN)₆, in 0.1 M phosphate buffer pH 6.9, with BEVA-thin film on GCE showed that the K₄Fe(CN)₆ oxidation and reduction become irreversible and the peaks potential were shifted to more positive and more negative when compared with the CVs recorded with the clean GCE, Fig. 5A. For recording the EIS spectra the midpoint potentials of +0.45 V for

clean GCE, and of +0.52 V for BEVA-thin film on GCE, were determined and applied.

The EIS experiments were then carried out with a clean GCE and with BEVA-thin film on GCE, in 1, 3 and 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ in 0.1 M phosphate buffer pH 6.9. The complex plan impedance plots at the midpoint potentials of +0.45 V for the GCE and of +0.52 V for the BEVA-thin film are shown in Fig. 5B and 5C. For the GCE a semicircle corresponding to the charge transfer reaction was observed. Whereas, the EIS at BEVA-thin film on GCE was essentially capacitive probing the adsorption of BEVA at the GCE surface.

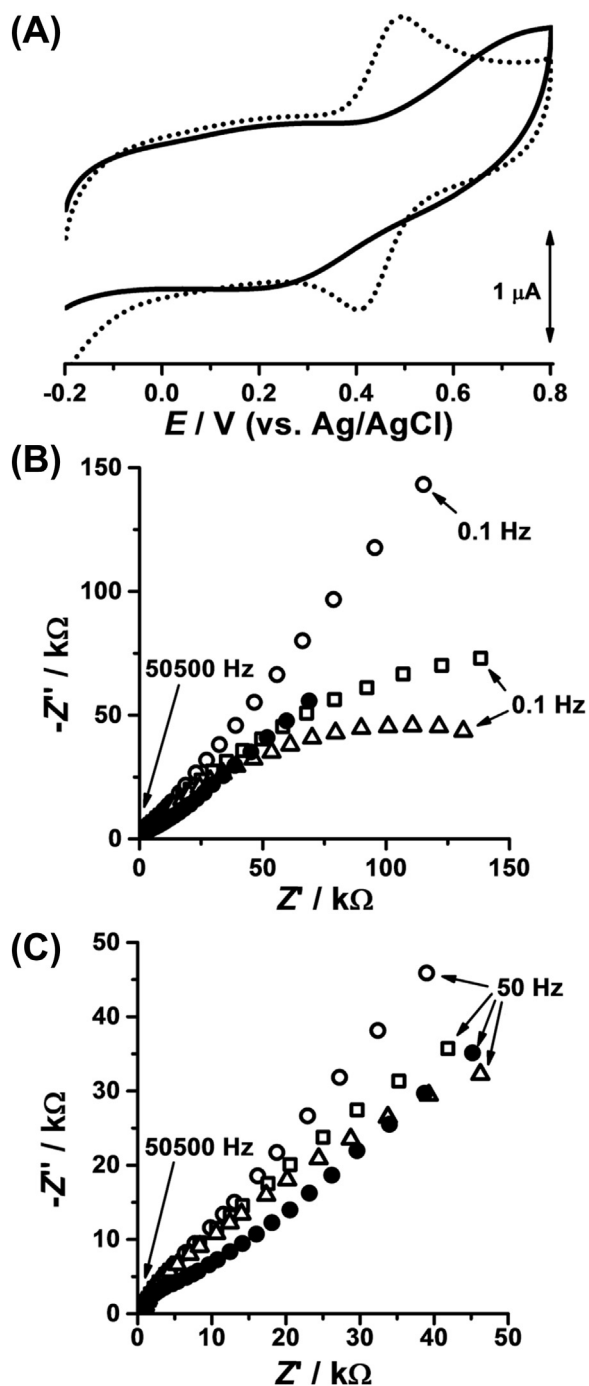


Fig. 5. In 0.1 M phosphate buffer pH = 6.9: (A) CVs in 1 mM $K_4Fe(CN)_6$, with: (···) clean GCE and (—) BEVA-thin film on GCE, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; (B, C) Complex plan EIS: (●) clean GCE and BEVA-thin film on GCE: (○) 1 mM, (□) 3 mM and (△) 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ between (B) 50500 and 0.100 Hz, and (C) 50500 and 50 Hz.

3.2.2. Denatured BEVA-thin film modified GCE

The native BEVA-thin film at the GCE surface was denatured, Procedure 3, after incubation in 33.33 mM SDS, 10 mM TCEP or 10 mM DTT, in 0.1 M phosphate buffer pH 6.9, during different time periods. The concentrations of the denaturing agents were chosen based on protocols for electrophoretic procedures commonly applied to destabilize and unfold protein structure [34]. Additional experiments were performed incubating the BEVA-thin film at the

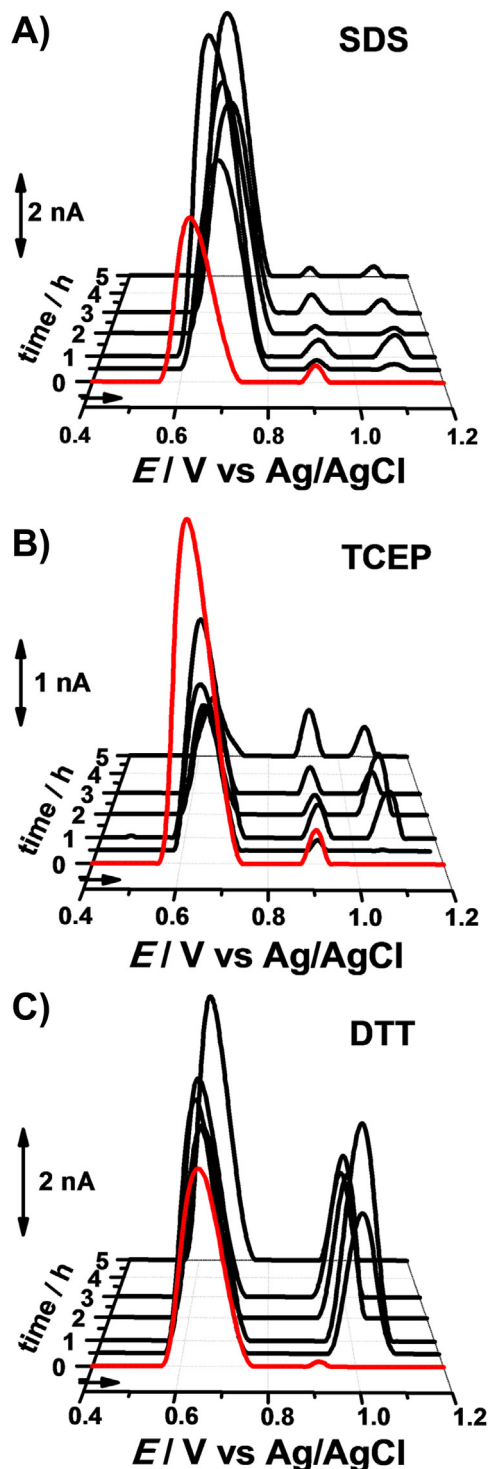


Fig. 6. DP voltammograms base-line corrected in 0.1 M phosphate buffer pH = 6.9 of (—) BEVA-thin film on GCE; and (---) after incubation in: (A) 33.33 mM SDS, (B) 10 mM TCEP and (C) 10 mM DTT.

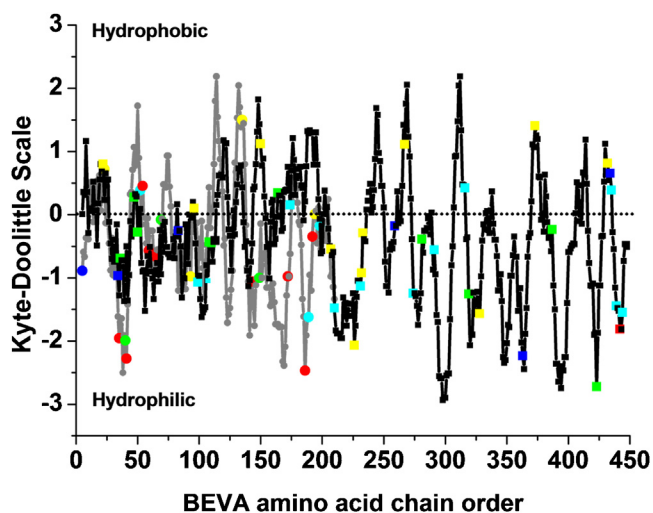


Fig. 7. Hydropathicity plot of the BEVA antibody amino acid sequence: (—) light chain and (---) heavy chain. Electroactive amino acids: (red) Tyr, (green) Trp, (blue) Met, (cyan) His, (yellow) Cys.

GCE in 0.1 M phosphate buffer pH 6.9, for the same periods of time, and used as a control to allow an unambiguous identification of the oxidation peaks occurring after the interaction of BEVA-thin film at the GCE surface with the different denaturing compounds.

The redox behaviour of DTT, TCEP and SDS, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, was previously investigated [7], showing only one oxidation peak DTT, at $E_{pa} = +1.2$ V, and TCEP, at $E_{pa} = +1.1$ V, while SDS was not electroactive, and this was taken into account in the identification of the denatured BEVA-thin film modified GCE occurring peaks [27].

The effect of the denaturing agents on the electrochemical behaviour of BEVA-thin film at the GCE surface was followed by DP voltammetry. The results obtained for the control experiments, BEVA-thin film at the GCE surface incubated in buffer, were compared with the changes observed after incubation of BEVA-thin film at the GCE surface in solutions of the denaturing agents.

The DP voltammograms of the BEVA-thin film at the GCE surface after incubation in SDS solutions, Fig. 6A, showed three oxidation peaks, at $E_{pa} = +0.65$ V, $E_{pa} = +0.90$ V and $E_{pa} = +1.10$ V. The control experiment showed two oxidation peaks, at $E_{pa} = +0.65$ V and $E_{pa} = +0.90$ V. The first oxidation peak current, at $E_{pa} = +0.65$ V, increased when compared to the control.

Similar results were found for the BEVA-thin film on GCE surface after incubation in TCEP solutions, Fig. 6B, but the oxidation peak current of the first peak, at $E_{pa} = +0.65$ V, decreased, when compared to control, and higher currents for the second and third oxidation peaks were observed.

The DP voltammograms for BEVA-thin film on GCE surface after incubation in the DTT solutions, Fig. 6C, showed two oxidation peaks with significantly enhanced currents, at $E_{pa} = +0.65$ V and $E_{pa} = +1.00$ V. No time dependency was observed for the DTT-BEVA interaction.

4. Discussion

Among the 20 amino acids composing the protein chains has been previously shown that only tyrosine (Tyr), tryptophan (Trp), histidine (His), cysteine (Cys) and methionine (Met) residues are electroactive and undergo oxidation on carbon electrodes, Table 1, according to pH-dependent electron transfer mechanisms [18–21]. Direct protein electrochemistry has been largely based on the

detection of tyrosine and tryptophan although the oxidation of histidine, cysteine or methionine has been reported mostly in peptides [25] and more recently in proteins [7,23,26].

In order to identify the BEVA oxidation peaks, the primary structure of the antibody has been analysed [29]. BEVA has 452 amino acids on the heavy chain and 214 amino acids on the light chain, of this 80: 33 Tyr, 12 Trp, 16Cys, 14His and 5 Met, electroactive amino acid residues were identified. All these amino acids are randomly distributed along the polypeptide chain. Most electroactive amino acids are contained in the Fab region of BEVA, Scheme 1 and Fig. 7.

The heavy chains of BEVA contain one N-linked glycosylation site at asparagine 303. The oligosaccharides are of complex biantennary structures with a core fucose and with the two branches terminating mainly with zero (G0), one (G1) or two (G2) galactose residues. The G0 glycoform predominates at approximately 80% relative abundance. Variants such as oxidised, glycosylated and deglycosylated BEVA are fully active. Although the polysaccharides influence BEVA structure, they are not electroactive.

The interaction of proteins with electrode surfaces is directly influenced by surface properties. The GCE surface is hydrophobic favouring interaction with hydrophobic protein domains. The Kyte–Doolittle hydropathy scale was used for the identification of the hydrophobicity and/or polarity of a protein or protein sequence

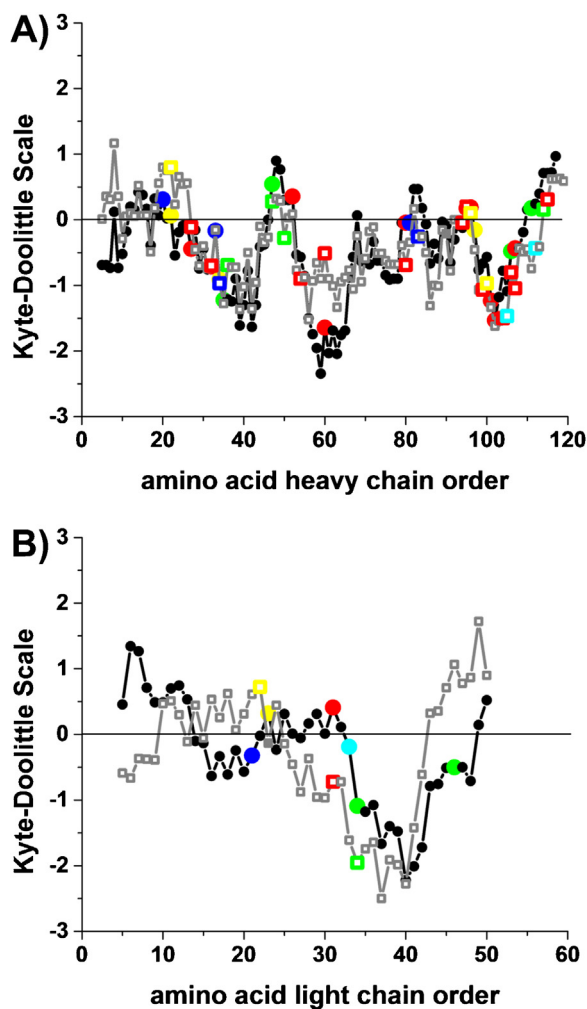


Fig. 8. Hydropathicity plot of the (—) RTx and (---) BEVA antibodies amino acid sequences: variable (A) light and (B) heavy chain. Electroactive amino acids: (red) Tyr, (green) Trp, (blue) Met, (cyan) His, (yellow) Cys.

[28,29]. The Kyte–Doolittle plot for both light and heavy chains of BEVA, Fig. 7, showed a general hydrophilic character with intercalated hydrophobic sequences. Most of the electroactive amino acids are incorporated into the hydrophilic regions located at, or in close proximity, to the protein surface and mostly contained at the Fab region of BEVA, Scheme 1 and Fig. 7.

The electrochemical oxidation of BEVA in solution or immobilized at the GCE surface showed only one small pH-dependent anodic peak. These results clearly reflect the difficulty of the electron transfer process arising from the organization of the amino acids in the tertiary and quaternary structures of the antibody, which difficult the contact between the protein electroactive amino acids and the GCE surface. Considering the oxidation potentials, Table 1, and the peak potential pH-dependence, the native BEVA oxidation peak corresponded to charge transfer reactions of Tyr and Trp amino acid residues oxidation located at the Fab region.

A methodology employing denaturants that unfold the protein 3D morphological structure, enabling the exposure of more electroactive amino acids residues to the electrode surface was followed. SDS, a detergent that dissolves hydrophobic proteins by disrupting non-covalent bonds, and the reductants DTT or TCEP, that disrupt disulphide bonds, were used to investigate the direct electron transfer oxidation of denatured BEVA-thin film on GCE surface, Fig. 6.

After denaturation, three consecutive charge transfer reactions were observed, Fig. 6. The first oxidation peak at $E_{pa} = +0.65$ V, corresponds to the Tyr and Trp residues as previously observed in the native BEVA. The second peak at $E_{pa} = +0.93$ V is due to Cys residues which oxidation at GCE involves three consecutive charge transfer reactions, Table 1. The third oxidation peak, at $E_{pa} \sim +1.10$ V, is attributed to His residues, Table 1, Fig. 6.

SDS is an anionic surfactant that changes the overall protein charge to negative, enhancing its interaction with the positive electrode surface, and increasing the number of amino acid residues exposed to the electrode surface. In agreement, the DP voltammograms, recorded after different denaturation times, showed the occurrence of the three consecutive charge transfer reactions, and the increase of the Tyr/Trp oxidation peak, Fig. 6A.

The DP voltammograms recorded after denaturation of BEVA-thin film on GCE with TCEP showed also three consecutive charge transfer reactions, Fig. 6B. However, the incubation of the BEVA-thin film on GCE surface in DTT enabled the identification of two oxidation peaks with enhanced currents, Fig. 6C. The differences observed in BEVA electrochemistry after denaturation with TCEP and DTT is explained considering a higher reducing power of TCEP and that DTT cannot reduce solvent inaccessible or buried disulphide bonds.

The electrochemical oxidation of BEVA was also compared with the electrochemistry of rituximab (RTX) [7]. The monoclonal antibody RTX contains 76 electroactive amino acid residues: 31 Tyr, 13 Trp, 16Cys, 13His and 3 Met. All these amino acids are randomly distributed along the polypeptide chain. The denaturation of RTX with SDS and TCEP only caused the Tyr/Trp oxidation peak time-dependent increase while with DTT three consecutive charge transfer reactions occurred [7]. The changes between RTX and BEVA electrochemistry after denaturation are related to the differences on the primary structure of these antibodies.

Both BEVA and RTX are IgG1 type immunoglobulins sharing constant domains on both heavy and light chains. The analysis of their primary structures revealed that the variable domain of the heavy chains extends up to 120 amino acids while of the light chains extends up to 60 amino acids. The analysis of the hydrophobicity graphs showed similar profiles of the heavy chains and large differences in hydrophobicity/hydrophilicity of the light chains, Fig. 8. However, most of the electroactive amino acids, responsible

for the anodic peaks observed after denaturation, are contained into the heavy chain Fig. 8(B). Thus, the differences observed on the voltammograms recorded after RTX and BEVA denaturation with different agents are due to differences in the amino acid sequences of the variable domains of the heavy and light chains that form the Fab region of the antibody and which are actually responsible for their different functions.

5. Conclusions

Bevacizumab is a recombinant humanized monoclonal antibody used in the treatment of certain types of metastatic cancers. The charge transfer reactions of the native and denatured BEVA-thin film on GCE surface, over a wide pH range, were investigated. The interfacial behaviour and adsorption of BEVA-thin film on GCE surface was also probed by electrochemical impedance spectroscopy.

The electrochemical oxidation of native BEVA-thin film on GCE surface showed only one pH-dependent oxidation peak, corresponding to tyrosine and tryptophan amino acid residues oxidation. The unfolding of BEVA-thin film on GCE surface after denaturation with chemical agents enabled the exposure of more electroactive amino acid residues to the electrode surface, and additional peaks, due to cysteine and histidine amino acid residues oxidation peaks, were identified.

Acknowledgements

Financial support from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Grants SFRH/BPD/92726/2013 (A.-M. Chiorcea-Paquim), SFRH/BPD/80195/2011 (T.A. Enache) projects PTDC/SAU-BMA/118531/2010, PTDC/QEQ-MED/0586/2012, UID/EMS/00285/2013, CEMUC-R (Research Unit 285), (co-financed by the European Community Fund FEDER), FEDER funds through the program COMPETE—Programa Operacional Factores de Competitividade, are gratefully acknowledged.

References

- [1] R.K. Oldham, R.O. Dillman, *Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy: 25 Years of Progress*, *J. Clinical Oncology* 26 (2008) 1774.
- [2] F. Kabbinafar, J. Hambleton, R.D. Mass, H.I. Hurwitz, E. Bergsland, S. Sarkar, *Combined Analysis of Efficacy: The Addition of Bevacizumab to Fluorouracil/Leucovorin Improves Survival for Patients with Metastatic Colorectal Cancer*, *J. Clinical Oncology* 23 (2005) 3706.
- [3] R.L. Avery, J. Pearlman, D.J. Pieramici, M.D. Rabena, A.A. Castellari, M.A. Nasir, M. J. Giust, R. Wendel, A. Patel, *Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy*, *Ophthalmology* 113 (2006) 1695.
- [4] B.T. Brinkerhoff, N.W. Choong, J.S. Treisman, D.M. Poetker, *Intravenous and topical intranasal bevacizumab (Avastin) in hereditary hemorrhagic telangiectasia*, *Am. J. Otolaryngology* 33 (2012) 349.
- [5] H.F. Jiménez-Ortiz, S.P. Martínez, N.T. Fernández, *Bevacizumab (Avastin) intracamerular en el manejo quirúrgico del glaucoma neovascular*, *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* 87 (2012) 396.
- [6] L.G. Presta, H. Chen, S.J. O'Connor, V. Chisholm, Y. Gloria Meng, L. Krummen, M. Winkler, N. Ferrara, *Humanization of an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibody for the Therapy of Solid Tumors and other Disorders*, *Cancer Res.* 57 (1997) 4593.
- [7] S.C.B. Oliveira, I.B. Santarino, A.M. Oliveira-Brett, *Direct Electrochemistry of Native and Denatured Anticancer Antibody Rituximab at a Glassy Carbon Electrode*, *Electroanalysis* 25 (2013) 1029.
- [8] I.C. Lopes, S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, *In situ electrochemical evaluation of anticancer drug temozolomide and its metabolites-DNA interaction*, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3783.
- [9] A.D.R. Pontinha, S.M.A. Jorge, V.C. Diculescu, M. Vivan, A.M. Oliveira-Brett, *Antineoplastic Drug Methotrexate Redox Mechanism Using a Glassy Carbon Electrode*, *Electroanalysis* 24 (2012) 917.
- [10] D.A. Golea, V.C. Diculescu, L. Tugulea, A.M. Oliveira-Brett, *Proteasome Inhibitor Anticancer Drug Bortezomib Redox Behavior at a Glassy Carbon Electrode*, *Electroanalysis* 24 (2012) 1915.
- [11] A. Shah, V.C. Diculescu, R. Qureshi, A.M. Oliveira-Brett, *Electrochemical Reduction Mechanism of Camptothecin at a Glassy Carbon Electrode*, *Bioelectrochemistry* 79 (2010) 173.

- [12] R. Hajian, T.G. Huat, Electrochemical Study on the Interaction of Irinotecan with Calf Thymus Double Stranded DNA, *Chin. J. Chem.* 30 (2012) 783.
- [13] S. Arnold, Z.Q. Feng, T. Kakiuchi, W. Knoll, K. Niki, Investigation of the Electrode Reaction of Cytochrome c through Mixed Self-assembled Monolayers of Alkanethiols on Gold(111) Surfaces, *J. Electroanal. Chem.* 438 (1997) 91.
- [14] A. Avila, B.W. Gregory, K. Niki, T.M. Cotton, An Electrochemical Approach to Investigate Gated Electron Transfer Using a Physiological Model System: Cytochrome c Immobilized on Carboxylic Acid-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Gold Electrodes, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 2759.
- [15] H. Wackerbarth, P. Hildebrandt, Redox and Conformational Equilibria and Dynamics of Cytochrome c at High Electric Fields, *Chem. Phys. Chem.* 4 (2003) 714.
- [16] D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Electron-Transfer Processes of Cytochrome c at Interfaces. New Insights by Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy, *Acc. Chem. Res.* 37 (2004) 854.
- [17] V. Ostatná, H. Cernocka, K. Kurzatowska, E. Paleček, Native and Denatured Forms of Proteins can be Discriminated at Edge Plane Carbon Electrodes, *Anal. Chim. Acta* 735 (2012) 31.
- [18] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Peptide Methionine Sulfoxide Reductase A (MsrA): Direct Electrochemical Oxidation on Carbon Electrodes, *Bioelectrochemistry* 89 (2013) 11.
- [19] B. Malfoy, J.A. Reynaud, Electrochemical Investigations of Amino Acids at Solid Electrodes: Part II. Amino Acids Containing no Sulfur Atoms: Tryptophan Tyrosine, Histidine and Derivatives, *J. Electroanal. Chem.* 114 (1980) 213.
- [20] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Boron Doped Diamond and Glassy Carbon Electrodes Comparative Study of the Oxidation Behavior of Cysteine and Methionine, *Bioelectrochemistry* 281 (2011) 46.
- [21] J.A. Reynaud, B. Malfoy, P. Canesson, Electrochemical Investigations of Amino Acids at Solid Electrodes: Part I. Sulfur components: Cystine Cysteine, Methionine, *J. Electroanal. Chem.* 114 (1980) 195.
- [22] V.C. Diculescu, T.A. Enache, Electrochemical evaluation of Abelson tyrosine-protein kinase 1 activity and inhibition by imatinib mesylate and danusertib, *Anal. Chim. Acta* 845 (2014) 23.
- [23] O.M. Popa, V.C. Diculescu, Direct electrochemical oxidation of Abelson tyrosine-protein kinase 1 and evaluation of its interaction with synthetic substrate ATP and inhibitors, *J. Electroanal. Chem.* 742 (2015) 54.
- [24] E. Paleček, Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins, in: E. Paleček, F. Scheller, J. Wang (Eds.), *Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics*, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [25] E. Paleček, J. Tkač, M. Bartošik, T. Bertók, V. Ostatná, J. Paleček, Electrochemistry of Nonconjugated Proteins and Glycoproteins, Toward Sensors for Biomedicine and Glycomics, *Chem. Rev.* 115 (2015) 2045.
- [26] V. Ostatná, V. Vargová, R. Hrstka, M. Ďurech, B. Vojtěšek, E. Paleček, Effect of His6-tagging of anterior gradient 2 protein on its electro-oxidation, *Electrochim. Acta* 150 (2014) 218.
- [27] I.B. Santarino, S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Protein reducing agents dithiothreitol and tris (2-carboxyethyl) phosphine anodic oxidation, *Electrochem. Com.* 23 (2012) 114.
- [28] J. Kyte, R. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105.
- [29] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00112>.
- [30] <http://web.expasy.org/protscale/>.
- [31] J.L. Moreland, A. Gramada, O.V. Buzko, Q. Zhang, P.E. Bourne, The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications, *BMC Bioinformatics* 6–21 (2005).
- [32] www.rcsb.org.
- [33] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 235.
- [34] W. Reiner, T. Naven, *Proteomics in Practice*, Wiley-VCH, Berlin, 2002.

Flavonoids in Selected Mediterranean Fruits: Extraction, Electrochemical Detection and Total Antioxidant Capacity Evaluation

Fatima Zohra Issaad,^[a, b, c] Isabel P. G. Fernandes,^[a] Teodor A. Enache,^[a] Chabane Mouats,^[b] Isaide A. Rodrigues,^[a, d] and Ana Maria Oliveira-Brett^{*[a]}

Abstract: Flavonoids are natural phenolic derivatives that, in low concentration, can provide health benefits by preventing biomolecules (proteins, nucleic acids, lipids, sugars) oxidative damage through free radical mediated reactions. The flavonoids, in selected Mediterranean seasonal fruits: apricot, sour cherry, plum, pomegranate, date, prickly pear (cactus fruit), and nectarine, by RP-HPLC, coupled with photodiode array and electrochemical detectors, after microwave-ultrasound

assisted extraction, using flavonoid standards, were detected. The total antioxidant capacity in the lyophilized fruit extracts, by differential pulse voltammetry, (electrochemical index-EI), integrated peak area, and chronoamperometry, was evaluated. In the lyophilized fruit extracts, and the catechin standard, the free radical scavenger efficient concentration (EC₅₀), using DPPH[•] assay, was determined.

Keywords: Fruits antioxidant capacity • Flavonoid identification • HPLC-ED • Electrochemical index • DPPH radical • EC₅₀

1 Introduction

The fruits and vegetables consumption benefits have been known since ancient times; as they are natural antioxidants, they prevent or delay cellular damage following several mechanisms, such as electron transfer to free radicals or metal chelate catalysts, reduce the risk of cardiovascular diseases, and the harmful effects of radiation [1–3]. The fruits antibacterial, antiviral and anti-inflammatory activity, have been associated with their antioxidant power [4–6]. This is due to a widely distributed concentration, in seeds, peels, pulp and flowers, of non-enzymatic antioxidants such as vitamin C, vitamin E, polyphenols and anthocyanins.

The flavonoids are the main antioxidants in natural products. Their basic skeleton contains the benzene A-ring connected to the benzene B-ring via a heterocyclic pyrane C-ring, Scheme 1. They are classified [7], into flavones, flavonols, flavan-3-ols, isoflavones, flavanones, anthocyanidins, dihydroflavonols, flavan-3,4-diols, coumarins, chalcones, dihydrochalcones and aurones, based on the B-ring relative position to the C-ring, as well as the functional groups (ketones, hydroxyls), and the presence or not of a double bond in the C-ring, Scheme 1.

Seasonal availability and short postharvest life may limit consumption of fresh fruits, hence a large range of industrial techniques are commonly employed to preserve fruits: solar drying, microwave drying, osmotic dehydration, spray-drying, freezing and freeze-drying [8,9]. These processes induce to the fruits physical, chemical, and biochemical changes. Therefore, it is important to consider the effect of the preserving process on the fruits antioxidant capacity [10].

Polyphenols extraction using modern environmentally techniques are recommended, because of their effectiveness and relatively low cost for obtaining natural antioxidants from fruits.

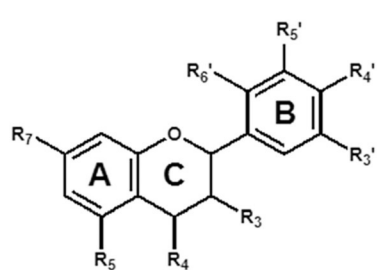
Microwave assisted extraction (MAE) [11], ultrasound assisted extraction (bath and probe) (UAE) [12], ultrasound-microwave-assisted extraction (UMAE) [13], supercritical fluid extraction (SFE) [14] and pressurized solvent extraction (PSE) [15], were used. Although the

[a] F. Z. Issaad, I. P. G. Fernandes, T. A. Enache, I. A. Rodrigues, A. M. Oliveira-Brett
Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Technology
University of Coimbra
3004-535 Coimbra
Portugal
*e-mail: brett@ci.uc.pt

[b] F. Z. Issaad, C. Mouats
Unité de Recherche de Chimie de l'Environnement et Moléculaire Structurale, CHEMS
Faculté des Sciences Exactes
Campus Chaabet Erssas, Université Constantine 1
25000 Constantine
Algeria

[c] F. Z. Issaad
Centre de Recherche en Biotechnologie, CRBt, BPE 73
Ali Mendjeli, Nouvelle Ville
25000 Constantine
Algeria

[d] I. A. Rodrigues
Departamento de Química
Universidade Federal do Maranhão
São Luís, Maranhão
12 CEP: 65080-040
Brazil



Flavonoid	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₃	R ₄	R ₅	R ₇	C2-C3
(+)-Catechin	OH	OH	—	—	OH	—	OH	OH	—
Epigallo catechin gallate	OH	OH	—	—	gallate	—	OH	OH	—
Rutin	OH	OH	—	—	O	rutinose	OH	OH	+
Quercetin	OH	OH	—	—	OH	O	OH	OH	+
Fisetin	OH	OH	—	—	OH	O	—	OH	+
Morin	OH	—	—	OH	H	O	OH	H	+
Cyanidin	OH	OH	—	—	OH	—	OH	OH	—
Malvidin	OCH ₃	OH	OCH ₃	—	OH	—	OH	OH	—
Narigenin	—	OH	—	—	—	O	OH	OH	—
Luteonin	OH	OH	—	—	O	—	OH	OH	+
Myricetin	OH	OH	OH	—	OH	O	OH	OH	+

Scheme 1. Flavonoid structures.

antioxidant capacity can be influenced by the temperature, duration of extraction, number of steps, and solvent-to-sample ratio, most studies ignore the thermal decomposition of flavonoids during the extraction process [16,17].

Reverse phase high-performance liquid chromatographic (RP-HPLC) methods, using photodiode array (PDA), MS or electrochemical (amperometric or coulometric) detectors (ED), are commonly applied to quantify flavonoid compounds [18].

RP-HPLC-ED offers the best selectivity and sensitivity, at nanomolar or even picomolar level detection limit, of electroactive compounds in complex matrices [19,20].

For the determination of the total antioxidant capacity of phenolics, the spectrophotometric methods have used different compounds, such as DPPH[•] (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and DMPD (N,N-dimethyl-p-phenyldiamine), and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assays, [21,22].

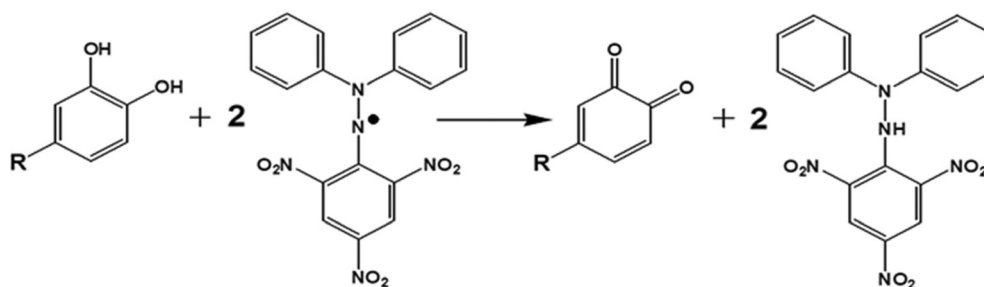
The antioxidant capacity of selected Mediterranean lyophilized fruits extracts was determined using the DPPH free radical scavenger assay. This method was developed by Marsden Blois (1958) using cysteine as antioxidant [23]. It is a rapid, simple and inexpensive assay and was used to measure and evaluate the antioxidant capacity of fruits and vegetables.

The DPPH[•] is a stable free radical due to the fact that the delocalization of electron is disperse all over the molecule as a whole. Therefore, the DPPH[•] molecules do not dimerize, like most other free radicals. The freshly prepared DPPH[•] solution presented a deep violet colour, with an absorption in methanol solution at around $\lambda = 516$ nm. The DPPH[•] reaction with a molecule that can donate a hydrogen, i.e. an antioxidant molecule, causes the loss of the violet colour, and absorption decrease. A representation of radical neutralization, in a 1:2 reaction stoichiometry, is presented in Scheme 2.

The "EC₅₀" (efficient concentration) corresponds to the concentration of antioxidant necessary to neutralize 50% of the DPPH[•] concentration. However, the efficiency of this method may be influenced by low concentration of antioxidants in the samples or by the presence of active biomolecules which can interfere with radical absorption, i.e. if the analyte components absorb at the same wavelength of the radical [24,25].

The electrochemical methods enabled complementary assays with high sensitivity, simplicity, rapidity and low cost, using amperometry or differential pulse voltammetry, for the quantification of the total antioxidant capacity of the selected Mediterranean lyophilized fruit extracts.

The antioxidant properties of phenolic compounds are related to their ability to donate electrons. Therefore, the simplicity, low cost and effectiveness presented by the



Scheme 2. DPPH radical neutralization by a catechol-type species.

electroanalytical techniques for the antioxidant evaluation of many antioxidant products [26–30]. Furthermore cyclic voltammetry, differential pulse and flow injection analysis, used in natural samples, may offer information about the number of redox state, qualitative assessment and the electron transfer kinetics [31,32].

The electrochemical total antioxidant capacity is based on the ability of the antioxidant to exchange electrons with the electrode surface, whereas in the DPPH[•] method the chemical reaction is based on proton transfer.

The total antioxidant capacity will take into account the current contribution of all electrode reactions, which can take place at different potentials. Depending on the supporting electrolyte pH, the polyphenols oxidation potential is between +0.2 V (di- and tri-phenols) and +1.2 V (mono-phenols) [33].

The electrochemical index (EI) was defined as a screening method to determine total phenolics concentration, and can be obtained using electrochemical techniques, e.g. differential pulse voltammetry, taking into account the sample, eg. fruit extract, peak potential (E_p) and peak current (I_p) using the following equation [34]:

$$EI = (I_{p1}/E_{p1}) + (I_{p2}/E_{p2}) + \dots + (I_{pn}/E_{pn}) \quad (1)$$

defining the antioxidant capacity corresponding to the electrochemical properties of the sample [34–36].

The aim of this study was to detect and identify the flavonoids content, and the total antioxidant capacity, of selected lyophilized Mediterranean fruit extracts: apricot, sour cherry, plum, pomegranate, date, prickly pear (cactus fruit), and nectarine. The electrochemical index (EI) was determined by differential pulse voltammetry and chrono-amperometry, and compared with the total antioxidant capacity expressed as “efficient concentration” or EC_{50} , evaluated by spectrophotometry, analyzing the DPPH[•] free radical maximum adsorption decrease. The fruits flavonoids content were detected, and identified, by RP-HPLC-ED, using a glassy carbon electrode, in a wall-jet flow cell detector.

2 Experimental

2.1 Materials and Reagents

Prunus armeniaca L. (apricot), *Prunus domestica* L. (European plum), *Prunus salicina* (Japanese plum), *Prunus persica nuspersica* L. (nectarine), *Prunus cerasus* L. (sour cherry), *Phoenix dactylifera* (date), *Opuntia ficus indica* (prickly pear (cactus fruit)) and *Punica granatum* (pomegranate), were purchased at a local market (Constantine, Algeria), from May to September 2015. Catechin hydrate and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) were obtained from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain. Epigallocatechingallate, rutin, quercetin dehydrate, resveratrol, morin, delphinidin chloride, malvidin chloride, peonidin-3-o-glucoside chloride, kuromanin chloride, ferrulic acid, procyanidin A2, hyperoside, fisetin and

myricetin, were purchased from Extrasynthese, Genay, France.

Each phenolic compound 10 mM stock standard solution, in pH=2.2, in the HPLC mobile phase, 83% purified water, 16% methanol and 1% formic acid, was prepared.

All stock solution flasks were protected from light with aluminium foil, and kept in a refrigerator. These solutions were appropriately diluted to the concentration for direct injection into the HPLC system. Working solutions were freshly prepared when needed.

All solutions were prepared using analytical grade reagents and purified water from a Millipore Milli-Q system (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{Scm}^{-1}$).

2.2 Samples Preparation

All fruits: apricot, sour cherry, Jp and Eu plums, pomegranate, date, prickly pear, and nectarine, were lyophilized. The prickly pear and pomegranate were used without peels. For apricot, sour cherry, Jp and Eu plums, date, and nectarine, the pulp and the peel were used. For each fruit ~1 kg were cut into ~3 cm² pieces and frozen at -20 °C. The frozen fruits lyophilisation, at 0.12 mBar, -40 °C, using an Alpha 1-4 LD Plus Freeze Dryer (Christ, Germany), at the Biotechnology Research Center, CRBt, Constantine (Algeria), was performed. The final lyophilized fruit powders (35 mesh) were kept at +4 °C.

The optimized extraction procedure, a mixture of 99% aqueous methanol and 1% hydrochloric acid, and an efficient combination of microwave (MAE) and ultrasound (UAE) assisted extraction [30] was used.

For phenolic fraction extraction, 1 g of the lyophilized dried powders have been mixed with 4 mL of the extraction solvent, containing methanol and hydrochloric acid 99:1 (v/v), and then placed in a microwave, at 450 W during 15 seconds.

Afterwards each mixture was placed in a vial protected from light, and sonicated in an ultrasound bath at 25 °C, constant frequency of 35 kHz, during 15 min. After sonication, the solutions of lyophilized fruits were left at room temperature for 1 h, centrifuged at 3500 rpm during 20 min, and then each fruit extract was collected in a laboratory flask and stored in the freezer, protected from light.

The remaining solid sample was submitted to the same procedure, consisting in a mixture with 3 mL extraction solvent, microwave, sonication for 30 min then 15 min centrifugation.

This step was repeated two more times. Before the analysis, the extracts were filtered using the 0.45 μm syringe filter (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The resulting methanolic fruit extracts obtained represent the stock solutions of the lyophilized fruits.

2.3 Voltammetric Parameters and Electrochemical Cells

Differential pulse (DP) voltammetry and chronoamperometry experiments were carried out using an IVIUM potentiostat in combination with IviumSoft program version 2.219 (Ivium Technologies, Eindhoven, The Netherlands). Measurements were carried out using a glassy carbon (GCE) working ($d=1$ mm) (Edaq, Poland), a Pt wire counter and an Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrodes, in a one-compartment 2 mL electrochemical cell.

The specificity of each technique should be considered. In DP voltammetry the scan rate cannot be higher than 10 mVs^{-1} . All theoretical aspects were considered when the parameters were chosen [37].

The DP voltammetry experimental conditions used were: pulse amplitude 50 mV, pulse width 100 ms, and scan rate 5 mVs^{-1} . All chronoamperometric measurements were carried out at an applied potential, $E_{\text{ap}} = +0.6 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Prior to each DP voltammetry or chronoamperometry experiment; the GCE was polished using diamond spray particle size 1 mm (Kement, Kent, UK). After polishing, the electrode was rinsed thoroughly with Milli-Q water, placed into supporting electrolyte and various DP voltammograms were recorded until a steady state baseline voltammogram was obtained. This procedure ensured very reproducible experimental results.

All electrochemical data presented were replicated three times. The standard deviation (S.D.) was less than 0.05%.

2.4 UV-Vis Spectrophotometry and DPPH[•] Assay

Absorbance measurements were recorded on a U-2810 Spectrophotometer Digilab Hitachi with UV Solutions Program. The absorption spectra experimental conditions were: scan speed 400 nm/min, sampling interval 1.50 nm, and path length 1 cm.

The molar mass of DPPH[•] is 394.32 g/mol and the molar extinction coefficient (in methanol or ethanol at $\lambda=516$ nm) is 1.1×10^4 , meaning that for the path length of 1 cm a concentration of 100 μM gave ~ 1 maximum absorbance.

The DPPH[•] stock solution was prepared daily, and a concentration of 80 μM , corresponding to 0.8 absorbance at $\lambda=516$ nm, was used. Twelve different concentrations, of each extract, have been assayed in order to check the response linearity, and to establish the antioxidant capacity, in the adequate linear range. All samples (80 μM DPPH[•] and lyophilized fruit extract) were incubated in the dark for 30 min, and the absorbance at $\lambda=516$ nm was measured. The antioxidant capacity was expressed as EC_{50} , defined as the amount of antioxidant necessary to decrease the absorbance of the DPPH radical by 50% of the initial absorbance.

All experiments were done in triplicate ($n=3$), at room temperature.

2.5 HPLC Experimental Conditions

HPLC experiments, using a Waters 2690 liquid chromatograph, with a Waters 996 photodiode array detector (PDA) and a Concorde wall-jet electrochemical (ED) detector from Waters, Milford, MA, USA, were carried out. Data acquisition and remote control of the system were done by the Empower Workstation Chromatography Manager, from Waters Corporation. The chromatographic column, used for the separation of the phenolic compounds, was a 150 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm reverse-phase Inertsil[®] ODS-C18 steel column, with a guard column of the same type, from GL Sciences Inc., Tokyo, Japan.

The Concorde electrochemical wall-jet flow cell detector was a VT-03 flow cell, from Antec Leyden, Zoetewoude, Netherlands, in a three-electrode configuration: a glassy carbon-working electrode (GCE) with 2 mm diameter, an in situ Ag/AgCl reference electrode and a stainless steel auxiliary electrode. The in situ Ag/AgCl reference electrode, ISAAC (in situ Ag/AgCl), is in direct contact with the mobile phase that contains 2 mM KCl. There is a difference of +0.2 V between the potential of the Ag/AgCl (saturated KCl) reference electrode and the ISAAC reference electrode in contact with 2 mM KCl. All measurements were performed at the applied cell potential of $E_{\text{ap}} = +0.5 \text{ V vs. ISAAC}$ ($E_{\text{ap}} \sim +0.7 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ (saturated KCl) reference electrode).

There are several studies related to flavonoids chromatographic separations, with different mobile phases, using a reverse phase column [38–41]. In the present study, the organic solvent selected was methanol due to the anthocyanins solubility [34] and to acidify the mobile phase, at a low pH=2.2, necessary for flavonoids stability, formic acid was added [20].

The HPLC experimental conditions followed a programmed sequence of gradient elution between the mobile phases: solvent A (water-methanol-formic acid 83:16:1 by volume) and solvent B (water-methanol-formic acid 68.5:30:1.5 by volume) [38,20]. The programmed sequence consisted in isocratic elution 100% solution A, for the first 11 minutes, followed by linear gradient elution from 100% solvent A to 100% solvent B, between minutes 11 and 21, and finally an isocratic elution 100% solvent B, from 21 to 40 minutes, to complete the extracts elution.

The HPLC conditions were: range=5 nA, fit=0.1 s, offs=10%. The mobile phase flow rate was 1.0 mL/min, and the injected volume was 25 μL . The guard column and the analytical column were kept in a Faraday cage with the thermostatic oven at 40 °C, together with the electrochemical wall-jet flow cell GCE detector.

3 Results and Discussion

3.1 Electrochemical Characterization of Lyophilized Fruit Extracts

In order to evaluate the total antioxidant capacity, the oxidation behaviour of each lyophilized fruit extract was investigated by DP voltammetry, at a GCE, in pH=2.2, and the results were compared with those obtained for 10 μ M catechin, a very common flavonoid standard, used in polyphenol analysis, Figure 1 and 2.

Generally, depending on the chemical structure, polyphenolic compounds are oxidized in one, two or three steps, corresponding to the electroactive moieties: catechol/gallate, phenol and resorcinol.

In acid media (pH=2), the oxidation of catechol and/or gallate group occurred at a low oxidation potential ($E_p < +0.5$ V) and is characteristic of strong antioxidant activity. At a more positive potential ($E_p \sim +0.8$ V) occurred the oxidation of phenol and/or resorcinol, while

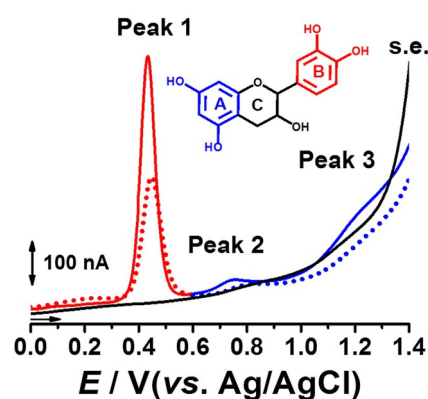


Fig. 1. DP voltammograms in 10 μ M catechin, at GCE, in pH=2.2: (— and —) first scan, (••• and •••) second scan, and (—) supporting electrolyte (s.e.), Scan rate 5 mV s^{-1} .

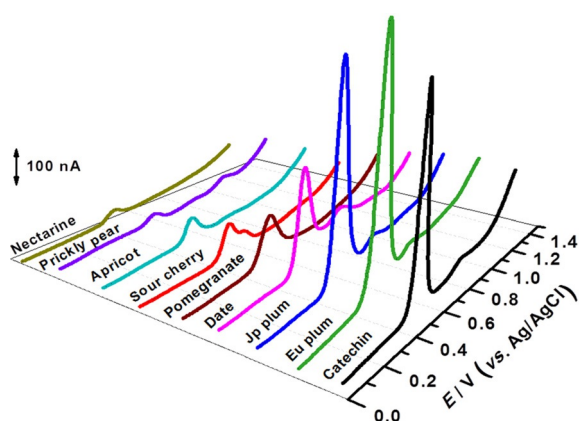


Fig. 2. DP voltammograms, at GCE, in pH=2.2: lyophilized fruit extracts, diluted 200 times, and 10 μ M catechin. Scan rate 5 mV s^{-1} .

at a higher potential ($E_p > +1.0$ V) the resorcinol oxidation products, are oxidized [42].

Structurally, catechin presents two electroactive moieties: a catechol and a resorcinol. The DP voltammogram recorded in 10 μ M catechin, at GCE, in pH=2.2, showed three oxidation peaks, Figure 1. The first oxidation peak, at $E_p \sim +0.5$ V, corresponding to the catechol moiety oxidation, in the B-ring, while the last two peaks corresponded to the oxidation of the resorcinol group, in the A-ring, and the resorcinol oxidation products [42].

Recording a new DP voltammogram in the same solution, without cleaning the electrode surface, the first two oxidation peaks decreased, whereas the last one disappeared meaning that the oxidation products adsorbed at the electrode surface, and reduced the electrode surface area.

DP voltammograms for each lyophilized fruit extract solution, diluted 200 times, were recorded at the same experimental conditions as for catechin. As it can be observed in Figure 2, the DP voltammograms of different extracts presented a similar profile to catechin. The first anodic reaction of all lyophilized fruit extracts occurred around $E_p \sim +0.5$ V, as a result of the oxidation of different catechol-containing species, followed by no (nectarine, pomegranate), one (Eu. plum, Jp plum, sour cherry, apricot and date) or two (prickly pear) oxidation peaks, corresponding to the oxidation of phenol and/or resorcinol moieties.

The total antioxidant capacity of a molecule is given by the ability of that molecule to donate electrons and protons. The EI obtained for all extracts (diluted 200 times) and 10 μ M catechin showed that Eu. plum has the highest total antioxidant capacity ($\text{EI} = 1.55 \times 10^{-6}$ A/V), followed by Jp. plum ($\text{EI} = 1.38 \times 10^{-6}$ A/V), and nectarine presented the lowest antioxidant capacity ($\text{EI} \sim 0.06 \times 10^{-6}$ A/V), Table 1. The date extract, diluted 200 times, presented the closest value ($\text{EI} = 1.33 \times 10^{-6}$ A/V) to 10 μ M catechin ($\text{EI} = 1.23 \times 10^{-6}$ A/V).

Since in voltammetry the electron transfer from a molecule to an electrode may be quantified as total charge transfer, using the integrated peak area (P_{area}) of the DP voltammogram oxidation peaks, the antioxidant capacity of extracts has also been evaluated. Similar to EI, the lowest antioxidant capacity for nectarine, corresponding to $P_{\text{area}} = 2.33 \times 10^{-9}$ VA, the highest for Eu. plum, $P_{\text{area}} = 67.39 \times 10^{-9}$ VA, and for 10 μ M catechin, $P_{\text{area}} = 37.2 \times 10^{-9}$ VA, were obtained. The results for all lyophilized fruit extracts, expressed in VA (volt ampere), were summarized in Table 1.

Nevertheless, the total antioxidant capacity of each extract was also evaluated by chronoamperometry, after a dilution 1:100, using a GCE, at an applied potential, $E_{\text{ap}} = +0.6$ V vs. Ag/AgCl.

The chronoamperometric current (I_{ap}) of each diluted extract was read after 400 sec (time period necessary to obtain a steady state and linearity). The highest total antioxidant capacity was obtained for Jp. plum (116 nA)

Table 1. Oxidation potential (E_p), and current (I_p), electrochemical index (EI), and integrated peak area (P_{area}), calculated from DP voltammetry, for lyophilized fruit extracts (dilution factor 1:200), and 10 μ M catechin.

Samples	Botanic name	E_p (V)			$I_p \times 10^{-9}$			$EI \times 10^{-6}$	$P_{area} \times 10^{-9}$
					(A)			(A/V)	(VA)
Catechin	–	0.43	0.74	1.20	505.68	25.78	7.63	1.23 ± 0.03	37.2 ± 4.9
Eu. plum	<i>Prunus domestica</i> L.	0.45	0.67	–	684.93	15.77	–	1.55 ± 0.19	67.4 ± 5.9
Jp. plum	<i>Prunus salicina</i> Lindl.	0.44	0.66	–	599.78	21.07	–	1.38 ± 0.03	56.6 ± 4.3
Date	<i>Phoenix dactylifera</i>	0.45	0.68	–	579.89	30.99	–	1.33 ± 0.03	43.4 ± 1.8
Pomegranate	<i>Punica granatum</i> L.	0.45	–	–	129.81	–	–	0.28 ± 0.02	16.9 ± 0.3
Sour cherry	<i>Prunus cerusua</i> L.	0.46	0.55	–	98.06	9.12	–	0.23 ± 0.003	11.8 ± 2.8
Apricot	<i>Prunus armeniaca</i> L.	0.45	0.67	–	64.01	3.08	–	0.15 ± 0.01	6.3 ± 0.9
Prickly pear	<i>Opuntia ficus indica</i> L.	0.47	0.70	0.90	24.73	3.57	17.66	0.07 ± 0.01	3.9 ± 0.5
Nectarine	<i>Prunus persica nuspersica</i> L.	0.46	–	–	25.76	–	–	0.06 ± 0.002	2.3 ± 0.03

Table 2. Chronoamperometric currents (I_{ap}), at $E_{ap} = +0.6$ V (vs. Ag/AgCl), for lyophilized fruit extracts (dilution factor 1:100), and 10 μ M catechin

Sample	I_{ap} (nA)
Jp. plum	116
Date	110
Sour cherry	102
Eu. plum	95
Pomegranate	79
Apricot	24
Nectarine	21
Prickly pear	18
Catechin	12.67 (10 μ M)

while prickly pear presented the lowest activity (18 nA), Table 2.

The differences between the antioxidant capacity classification obtained by chronoamperometry, when compared with that obtained by DP voltammetry, can be explained by the unspecific adsorption of flavonoid molecules and the oxidation products and/or another matrix components at the electrode surface.

This adsorption leads to the electrode blocking. However, in the case of DP voltammetry, the effect of the electrode blocking on the results was negligible. In DP voltammetry the potential window was 0 V till +1.2 V, whereas in chronoamperometry only $E_{ap} = +0.6$ V was applied.

3.2 Spectrophotometric Characterization of Lyophilized Fruit Extracts

The total antioxidant capacity, using the DPPH \cdot assay of the phenolic lyophilized fruit extracts of the different families: nectarine, prickly pear, apricot, sour cherry, Eu. and Jp. plums, pomegranate and date, was investigated. The results were compared with the catechin standard. Varying the concentrations of lyophilized fruit extracts (0.02–3.33 mg/mL) and measuring the DPPH \cdot absorbance decrease after 30 min incubation, for each extract concentration, the EC_{50} was calculated.

The EC_{50} of catechin was found to be 20.5 μ M, corresponding to a stoichiometric reaction of 1:2 (one

molecule of catechin scavenged two molecules of DPPH \cdot), meaning that only the catechol moiety acted as radical scavenger.

The results obtained for the lyophilized fruit extracts showed that an increase in concentration of antioxidant led to a decrease in the radical absorbance till completion, Figure 3.

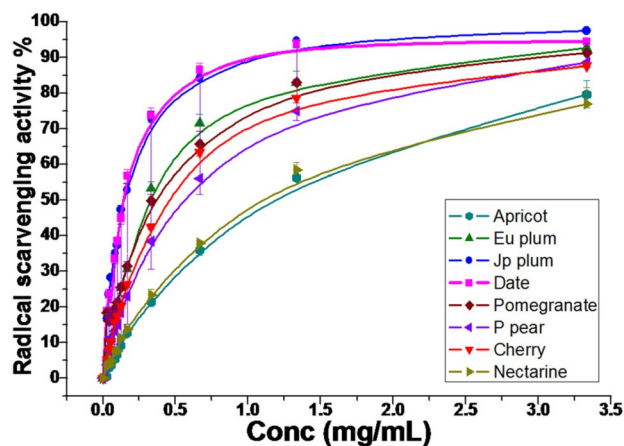


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity (%) versus lyophilized fruit extracts different concentrations (mg/mL).

The nectarine and apricot presented the highest radical scavenging ability with an $EC_{50} \sim 0.6$ mg/mL, corresponding to the lowest total antioxidant capacity. The date also presented a high radical scavenging ability, with the lowest $EC_{50} = 0.15$ mg/mL, followed closely by the Jp. plum with an $EC_{50} = 0.16$ mg/mL, Table 3.

Although, the DPPH \cdot assay gave information about the stoichiometry, the kinetic process of the DPPH \cdot colour disappearing in the presence of the antioxidant is also important.

For a correct interpretation of the data and a comparison between the results obtained by DPPH \cdot assay with those obtained by electrochemistry, it should be considered the specificity of each technique.

In the case of DPPH \cdot assay the results represented a concentration of lyophilized fruit which contained the

Table 3. SLOP and efficient concentration (EC_{50}) obtained for lyophilized fruit extracts and catechin by the DPPH radical assay.

Sample	SLOP (Activity mL/mg)	EC_{50} (mg/mL)
Catechin	8333.33 ± 92.49	0.006 ± 0.00
Date	325.27 ± 9.32	0.15 ± 0.00
Jp. plum	307.43 ± 5.05	0.16 ± 0.00
Eu. plum	191.10 ± 3.07	0.26 ± 0.00
Sour cherry	158.97 ± 2.45	0.31 ± 0.00
Pomegranate	152.55 ± 2.92	0.33 ± 0.01
Prickly pear	140.60 ± 3.20	0.35 ± 0.01
Nectarine	82.94 ± 1.94	0.60 ± 0.01
Apricot	78.89 ± 1.27	0.63 ± 0.01

amount of antioxidants necessary for neutralization of 50% of DPPH. The electrochemical results gave information about the total antioxidant capacity.

3 Flavonoids HPLC Identification and Detection

The objective of the research on antioxidants on fruit extracts was not only to determine the total antioxidant capacity but also to identify the different flavonoids in the fruit extracts.

While two flavonoids with the same functional groups (hydroxyl groups at the same position) may present the same antioxidant capacity, the interaction with other biomolecules can be very different, *e.g.* flavonoid-protein interaction. Therefore, the identification of the different flavonoid species present in each is an important goal.

The method used in the separation and identification of the selected Mediterranean flavonoid lyophilized fruit extracts has already been optimized [20]. The detection by RP-HPLC separation coupled with electrochemical (ED) and photodiode array (PDA) detectors, enabled a comparative study using flavonoid standards, before the determination of the flavonoids in the extracts, was carried out, Figure 4.

The PDA detector was used to confirm the identification of the flavonoid standards, based on their UV-Vis spectra recorded at $\lambda = 280, 360$ and 490 nm.

The detection by RP-HPLC-EC of the phenolic standards was performed to identify their presence in the fruit extracts and to determine their elution order, *e.g.* their retention time (t_r), was performed, Table 4.

The reverse phase column used enabled the separation, in all extracts, of the most polar compounds, anthocyanidins (delphinidin, malvidin, peonidin) and flavanols (catechin, epigallocatechingallate) during the first 10 minutes, followed by anthocyanins (kuromanin), and the flavonols (rutin, morin, quercetin), after 25 minutes, were the slowest.

In all lyophilized fruit extracts analyzed, the flavonoids: chloride, malvidin chloride, catechin, and kuromanin chloride, were detected, Figure 4. The most abundant flavonoid, found in 8 extracts, Eu. plum, Jp. plum, sour cherry, apricot, nectarine, prickly pear, and

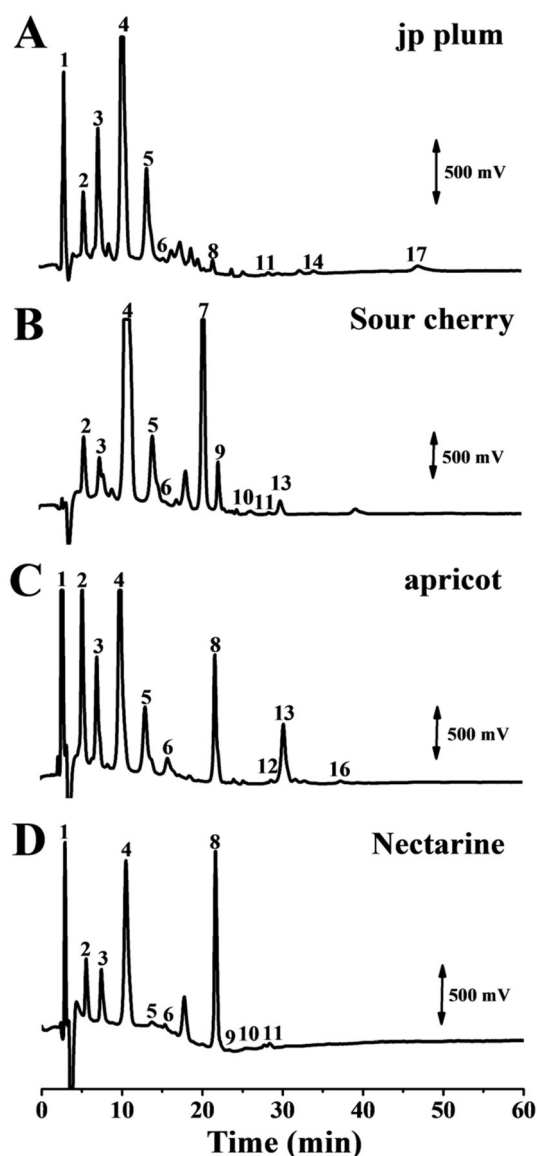


Fig. 4. RP-HPLC-EC, at GCE, at $+0.50$ V vs. ISAAC with gradient elution: (A) Jp. plum and (B) sour cherry, diluted 30 times; (C) apricot and (D) nectarine, diluted 10 times. **Peak identification:** (1) delphinidin chloride, (2) malvidin chloride, (3) catechin, (4) (-)-epigallocatechingallate, (5) epicatechin, (6) kuromanin chloride, (7) ferulic acid, (8) peonidin-3-O-glucoside chloride, (9) procyanidin A2, (10) hyperoside, (11) quercetin-3-O-glucopyranoside, (12) rutin, (13) resveratrol, (14) fisetin, (16) morin and (17) quercetindihydrate.

pomegranate, was (-)-epigallocatechingallate, Figure 4. Epicatechin was also a predominant flavonoid, found in Eu. plum, Jp. plum, apricot, nectarine, date and pomegranate, Figure 4. Morin and quercetin dehydrate were the less frequent flavonoids, detected only in apricot and Jp. plum. Resveratrol, a stilbene derivative, was also founded but in a low concentration.

Catechin is widely used as a reference standard in antioxidant comparative studies [37,41], due to its stability. Catechin also appeared in all analyzed extracts which is in agreement with previous reports [38,42].

Table 4. Phenolic standards retention times

Phenolic standards	Retention time (tr)/ min
1 – delphinidin chloride	3.8
2 – malvidin chloride	6.6
3 – catechin	7.4
4 – (–)-epigallocatechingallate	10.0
5 – epicatechin	13.8
6 – kuromanin chloride	15.3
7 – ferulic acid	21.3
8 – peonidin-3-O-glucoside chloride	21.6
9 – procyanidin A2	22.3
10 – hyperoside	28.4
11 – quercetin-3-O-glucopyranoside	28.6
12 – rutin	29.4
13 – resveratrol	30.1
14 – fisetin	35.6
15 – myricetin	35.8
16 – morin	36.1
17 – quercetindihydrate	49.0

Using the same experimental conditions chromatograms of the catechin standard, the prickly pear extract, and the prickly pear extract spiked with 100 μL of 10^{-5} M catechin standard, were compared. As expected, at $t_r=7.4$ min, the retention time of catechin, an increase of the catechin peak current was observed in the prickly pear extract, so the catechin presence was confirmed.

The separation and detection of flavonoids in selected Mediterranean lyophilized fruit extracts by RP-HPLC-ED showed a very good electrochemical resolution, some small but well separated peaks, enabling the phenolic compounds identification even when they were presented in low levels.

4 Conclusions

The lyophilized fruit extracts from Mediterranean, nectarine, prickly pear (cactus fruit), apricot, sour cherry, European and Japanese plums, pomegranate, and date, using a microwave-ultrasound assisted extraction method, were investigated. The identification of seventeen flavonoids in the extracts by RP-HPLC coupled with electrochemical (ED) and photodiode array (PDA) detection, following programmed sequences of isocratic or gradient elution, was carried out. Flavonoid standards were used to identify the flavonoids content in the extracts.

In order to evaluate the total antioxidant capacity, using a GCE, DP voltammograms and chronoamperograms, for each extract, were recorded. Depending on the lyophilized fruit extract, the DP voltammetry showed that the oxidation mechanism occurred in one, two or three steps, corresponding to the electroactive phenolic groups. The oxidation of catechol-containing species occurred at low potentials, followed at higher potentials by phenol and resorcinol moieties.

The electrochemical index (EI), from DP voltammograms, integrated peak area, and chronoamperometry, showed that Eu. plum, Jp. plum and date, presented the highest, while nectarine and prickly pear presented lowest, total antioxidant capacity.

The efficient concentration (EC_{50}) for free radical scavenger of extracts using the DPPH radical assay was evaluated. The lowest EC_{50} , for date, which means the higher radical scavenging, and for apricot, the highest EC_{50} , corresponding to the lowest antioxidant capacity, were found the Eu. and Jp. plums, and date, presented the highest antioxidant capacity, followed by pomegranate and sour cherry, while apricot and prickly pear (cactus fruit), presented the lowest antioxidant capacity.

Both electrochemical and spectrophotometrical approaches agreed and proved to be rapid, proficient and sensitive analytical techniques for the evaluation of the total antioxidant capacity in natural samples.

Acknowledgements

Financial support from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), grants SFRH/BPD/80195/2011 (T. A. Enache) and SFRH/BD/87334/2012 (I. P. G. Fernandes), project UID/EMS/00285/2013, FEDER funds through the program COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade, the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria for the Programme Nationale Exceptionnelle (P. N. E) fellowship (F. Z. Issaad), FAPEMA, CAPES, and UFMA (I. A. Rodrigues), are gratefully acknowledged.

References

- [1] WHO Fruit and Vegetable Promotion Initiative – report of the meeting, Geneva, **2003**.
- [2] L. H. Yao, Y. M. Jiang, J. Shi, F. A. Tomás-Barberán, N. Datta, R. Singanusong, *Plant Food Hum Nutr.* **2004**, *59*, 113–122.
- [3] T. J. Key, *Brit J Cancer* **2011**, *104*, 6–11.
- [4] Y. Y. Lim, T. T. Lim, J. J. Tee, *Food Chem* **2007**, *103*, 3, 1003–1008.
- [5] M. Mueller, S. Hobiger, A. Jungbauer, *Food Chem.* **2010**, *122*, 987–996.
- [6] M. Puri, M. Lal Verma, K. Mahale, Processing of Citrus Peel for the Extraction of Flavonoids for Biotechnological Applications, Chapter XIII in Handbook on flavonoids : dietary sources, properties, and health benefits, Nova Science Publishers, Hauppauge, New York, **2012**, pp. 443–459.
- [7] A. Crozier, M. N. Clifford, H. Ashihara, *Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Blackwell Publishing Ltd, **2006**.
- [8] A. Wojdyło, A. Figiel, J. Oszmian'ski, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1337–1343.
- [9] M. Henríquez, S. Almonacid, M. Lutz, R. Simpson, M. Valdenegro, *CYTA J Food* **2013**, *11*, No. 2, 127–135.
- [10] J. Vuthijumnok, A. L. Molan, J. A. Heyes, *IOSR-JPBS* **2013**, *8*, 1, 42–48.

- [11] P. C. Veggi, J. Martinez, M. Angela, A. Meireles, Chapter 2: *Fundamentals of Microwave Extraction*, (F. Chemat and G. Cravotto eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, Food Engineering Series 4, **2013**.
- [12] T. Jerman, P. Trebše, B. Mozetič Vodopivec, *Food Chem* **2010**, *123*, 175–182.
- [13] X. L. Cheng, J. Y. Wan, P. Li, L. W. Qi, *J Chromatogr A* **2011**, *26*, 1218(34), 5774–5786.
- [14] A. Capuzzo, M. E. Maffei, A. Occhipinti, *Molecules* **2013**, *18*, 7194–7238.
- [15] B. Kaufmann, *P. Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 105–113.
- [16] H. Yaqiang, L. Qian, L. Giurgiulescu, *CYTA J Food* **2015**, *13*, 4, 603–606.
- [17] A. E. Ince, S. Şahin, S. G. Şümnü, *Turk. J. Agric. For.* **2013**, *37*, 69–75.
- [18] S. Pacifico, A. D. Maro, M. Petriccione, S. Galasso, S. Piccollella, A. M. A. Di Giuseppe, M. Scortichini, P. Monaco, *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 188–199.
- [19] K. C. Honeychurch, G. M. Davidson, E. Brown, J. P. Hart, *Anal. Chim. Acta* **2015**, *853*, 222–227.
- [20] H. M. Merken, G. R. Beecher, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 577–599.
- [21] K. Thaipong, U. Boonprakob, K. Crosby, L. C. Zevallos, D. H. Byrnes, *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 669–675.
- [22] R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek, K. Güçlü, *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 5, 957–998.
- [23] M. S. Blois, *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200.
- [24] M. B. Arnao, *Trends Food Sci Tech* **2000**, *11*, 419–421.
- [25] R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302.
- [26] D. Galato, K. Ckless, M. F. Susin, C. Giacomelli, R. M. Ribeiro-do-Valle, A. Spinelli, *RedoxRep* **2001**, *6*(4), 243–50.
- [27] G. Ziyatdinova, I. Salikhova, H. Budnikov, *Talanta* **2014**, *125*, 378–384.
- [28] G. Ziyatdinova, H. Budnikov, *Monatsh Chem.* **2015**, *146*, 5, 741–753.
- [29] G. K. Ziyatdinova, H. C. Budnikov, Pogorel'tzev VI., *Anal Bioanal Chem.* **2005**, *381*(8), 1546–51.
- [30] G. Ziyatdinova, E. Kozlova, H. Budnikov, *Food Chemistry* **2016**, *196*, 405–41.
- [31] G. Ziyatdinova, I. N. Salikhova, M. Skorobogatova, H. Chibisova, Budnikov, *Food anal. Methods* **2015**, *8*, 7, 1794–1803.
- [32] A. J. Blasco, A. G. Crevillén, M. C. González, A. Escarpa, *Electroanalysis* **2007**, *19* (22), 2275–2286.
- [33] T. A. Enache, A. Amine, C. M. A. Brett, A. M. Oliveira-Brett, *Talanta* **2013**, *105*, 179–186.
- [34] A. J. Blasco, M. C. Rogerio, M. C. González, A. Escarpa, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *539*, 237–244.
- [35] J. R. Oliveira-Neto, S. G. Rezende, C. d. F. Reis, S. R. Benjamin, M. L. Rocha, E. S. Gil, *Food Chem.* **2016**, *190*, 506–512.
- [36] F. M. A. Lino, L. Z. de Sá, I. M. S. Torres, M. L. Rocha, T. C. P. Dinis, P. C. Ghedini, V. S. Somerset, E. S. Gil, *Electrochim. Acta* **2014**, *128*, 25–31.
- [37] J. Osteryoung, M. M. Schreiner, *CRC Cit. Rev. Anal. Chem.* **1988**, *19*, S1.
- [38] S. M. C. Gomes, I. P. G. Fernandes, N. S. Shekhawat, S. Kumbhat, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2015**, *27*, 1–10.
- [39] I. Hamad, H. Abdelgawad, S. Al Jaouni, G. Zinta, H. Asard, S. Hassan, M. Hegab, N. Hagagy, S. Selim, *Molecules* **2015**, *20*, 13620–13641.
- [40] M. Vizzotto, W. Porter, D. Byrne, L. Cisneros-Zevallos, *Food Chem.* **2014**, *164*, 363–370.
- [41] P. A. Roussos, V. Sefferou, N. K. Denaxa, E. Tsantili, *Sci. Hortic* **2011**, *129*, 472–478.
- [42] T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett, *J. Electroanal Chem.* **2011**, *655*(1), 9–16.

Received: May 30, 2016

Accepted: July 16, 2016

Published online: August 1, 2016

RESUME

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la caractérisation du comportement électrochimique de trois types de molécules : synthétiques, naturelles et biosynthétiques. Des hétérocycles dérivés à partir de l'acide nitro phényl acétique ont été synthétisés et évalués pour leur comportement électrochimique et leur cytotoxicité.

L'oxydation électrochimique de l'anticorps monoclonal Bevacizumab (BEVA) natif sur la surface d'une électrode de carbone vitreux (GCE) dans une large gamme de pH, présente un pic d'oxydation des acides aminés: tyrosine et tryptophane, d'autre part l'oxydation d'un film de BEVA dénaturé fait apparaître d'autres pics d'oxydation des acides aminés: cystéine et histidine.

La détection et l'identification des flavonoïdes dans les extraits de fruits lyophilisés de la Méditerranée: abricot, cerise, prune, grenade, datte, figue de barbarie et nectarine, ont été réalisés par la chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC), couplée à un détecteur photodiode (PDA) et un détecteur électrochimique (ED).

L'évaluation de l'activité anti-oxydante totale de ces extraits a été évaluée par la voltammétrie d'impulsion différentielle (indice électrochimique (EI) et surface des pics (P_{area})) et la chronoamperométrie (intensité des pics (I_a)). En parallèle, les concentrations efficaces (EC_{50}) des extraits des fruits lyophilisés et du catéchine ont été déterminées par le test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Mots-clés: Hétérocycles, Bevacizumab, dénaturation, flavonoïde, électrode de carbone vitreux, activité antioxydante.

ABSTRACT

This work presents the electrochemical behavior of three types of molecules: synthetic, biosynthetic and natural.

Heterocyclic compounds from nitrophenyl acetic acid were synthesized and evaluated for their electroactivities and cytotoxic properties.

The electrochemical oxidation of native and denatured Bevacizumab (BEVA) was investigated in solution over a wide pH range and using BEVA-thin film voltammetry on a glassy carbon electrode (GCE). For native BEVA, only one pH-dependent oxidation peak, corresponding to tyrosine and tryptophan amino acid residues oxidation, was observed. On the other hand, the electrochemical oxidation of denatured BEVA-thin film on GCE showed additional cysteine and histidine residues oxidation peaks.

The flavonoids, in selected Mediterranean seasonal fruits: apricot, cherry, plum, pomegranate, date, prickly pear and nectarine were detected by high-performance liquid-phase chromatography with inverse phase (RP-HPLC), coupled with photodiode array (PDA) and electrochemical detectors (ED).

The total antioxidant capacity in the lyophilized fruit extracts, by differential pulse voltammetry (electrochemical index-EI, integrated peak area- P_{area}) and chronoamperometry (peak intensity- I_a), was evaluated. In the lyophilized fruit extracts, and the catechin standard, the free radical scavenger efficient concentration (EC_{50}), using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, was determined.

Keywords: Heterocyclic compound, Bevacizumab, denaturation, flavonoid, glassy carbon electrode, antioxidant capacity.