



HAL
open science

Amplification exponentielle du signal par des réactions autocatalytiques : vers une amplification électrochimiquement induite

Corentin Calvet

► **To cite this version:**

Corentin Calvet. Amplification exponentielle du signal par des réactions autocatalytiques : vers une amplification électrochimiquement induite. Chimie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP7145 . tel-04598266

HAL Id: tel-04598266

<https://theses.hal.science/tel-04598266>

Submitted on 3 Jun 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
Paris Cité

UNIVERSITÉ PARIS CITÉ

ÉCOLE DOCTORALE DE CHIMIE PHYSIQUE ET ANALYTIQUE DE PARIS CENTRE (ED 388)

LABORATOIRE D'ÉLECTROCHIMIE MOLÉCULAIRE – UMR 7591

ÉQUIPE MÉTHODOLOGIES ÉLECTROANALYTIQUES ET RÉACTIVITÉS (MER)

**AMPLIFICATION EXPONENTIELLE DU SIGNAL
PAR DES RÉACTIONS AUTOCATALYTIQUES : VERS UNE
AMPLIFICATION ÉLECTROCHIMIQUEMENT INDUITE**

Par

Corentin CALVET

THÈSE DE DOCTORAT EN ÉLECTROCHIMIE

Spécialité Chimie Analytique

Dirigée par Benoit LIMOGES

Soutenue publiquement le 19 Octobre 2023, devant un jury composé de :

Maria-Rita MEUNIER-PREST	CR	Université de Bourgogne	Rapportrice
Vincent FOURMOND	DR	Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Manon GUILLE-COLLIGNON	Pr	Sorbonne Université	Examinatrice
Guillaume GINES	CR	ESPCI Paris	Examineur
Benoit LIMOGES	DR	Université Paris Cité	Directeur de thèse

Membres invités :

François MAVRÉ	MCF	Université Paris Cité	Co-encadrant
Mathieu BRANCA	MCF	Université Paris Cité	Co-encadrant

Amplification exponentielle du signal par des réactions autocatalytiques : vers une amplification électrochimiquement induite

Résumé

L'amplification moléculaire du signal est essentielle en bioanalyse pour détecter sensiblement et rapidement des molécules d'intérêt. Les réactions autocatalytiques, comme la PCR, sont particulièrement intéressantes pour obtenir une amplification exponentielle. Dans ce manuscrit, nous présentons une nouvelle stratégie d'amplification exponentielle moléculaire par autocatalyse, qui permet la détection de quelques nanomolaires de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), analyte clé dans de nombreuses applications analytiques. Cette réaction autocatalytique repose sur la catalyse croisée entre la déprotection catalytique par H_2O_2 d'une naphthoquinone masquée et la production catalytique d' H_2O_2 via le cyclage redox de cette même naphthoquinone en présence d' O_2 et d'un agent réducteur.

Dans un premier chapitre, ce mécanisme d'autocatalyse par réaction croisée entre deux boucles catalytiques sera décrit analytiquement via une analyse formelle théorique afin de mieux comprendre les paramètres clés pouvant intervenir dans les performances analytiques de l'amplification exponentielle. Ensuite, dans un deuxième chapitre, l'analyse mécanistique détaillée du système expérimental proposé sera décrite et discutée sur la base des données cinétiques expérimentales déterminées par spectrophotométrie UV-Visible et de leurs simulations numériques à partir d'hypothèses raisonnables de schémas réactionnels. Si la réaction d'autocatalyse proposée peut être facilement suivie par spectrophotométrie UV-Visible, son suivi par voie électrochimique est également une alternative intéressante car elle peut conduire à un dispositif de détection d' H_2O_2 simple, peu coûteux, et facile à intégrer dans un système miniaturisé. Cette approche originale de suivi électrochimique de la réaction autocatalytique sera présentée dans un troisième chapitre, sous plusieurs approches, et l'impact de ce nouveau mode de lecture sera discuté. Enfin, dans un dernier chapitre, un principe d'activation électrochimique de l'autocatalyse (dans lequel c'est l'électrode elle-même qui contribue à la réduction de la quinone) avec suivi électrochimique sera démontré. Une première approche d'optimisation de cette stratégie via l'analyse du couplage entre réactions homogènes et réduction hétérogène sera d'abord présentée. L'influence de la nature du matériau de l'électrode sur la réduction catalysée ou non de la quinone ainsi que sur les performances analytiques du processus autocatalytique sera discutée. Enfin, la réactivité redox de la naphthoquinone sera analysée quantitativement via l'étude de son schéma carré à neuf membres, ainsi que de son couplage avec la réactivité redox de l'oxygène.

Mots clés : Autocatalyse ; Amplification exponentielle ; ORR (Réaction de Réduction de l'Oxygène) ; Spectroscopie UV-Visible ; Electrochimie moléculaire ; Enzymes redox ; Simulations numériques ; Réactions radicalaires redox ; Bioanalyse ; Catalyseurs.

Exponential signal amplification through autocatalytic reactions: towards electrochemically-driven amplification

Abstract

Molecular signal amplification is crucial in bioanalysis for the sensitive and rapid detection of target molecules. Autocatalytic reactions, such as PCR, are particularly interesting for achieving exponential amplification. In this manuscript, we present a novel strategy for molecular exponential amplification through autocatalysis, enabling the detection of nanomolar levels of hydrogen peroxide (H_2O_2), a key analyte in numerous analytical applications. This autocatalytic reaction is based on the cross-catalysis between the catalytic deprotection of a masked naphthoquinone by H_2O_2 and the catalytic production of H_2O_2 through the redox cycling of the same naphthoquinone in the presence of O_2 and a reducing agent.

In the first chapter, this autocatalysis mechanism through cross-reaction between two catalytic loops will be analytically described via a formal theoretical analysis to better understand the key parameters influencing the analytical performance of the exponential amplification. Then, in the second chapter, the detailed mechanistic analysis of the proposed experimental system will be described and discussed based on experimental kinetic data determined by UV-Visible spectroscopy and their numerical simulations using reasonable assumptions of reaction schemes. While the proposed autocatalytic reaction can be easily monitored by UV-Visible spectroscopy, its monitoring through electrochemical means is also an interesting alternative as it can lead to a simple, cost-effective, and easily integrable H_2O_2 detection device in a miniaturized system. This original approach of electrochemical monitoring of the autocatalytic reaction will be presented in a third chapter, using multiple approaches, and the impact of this new readout mode will be discussed. Finally, in the last chapter, a principle of electrochemical activation of autocatalysis (where the electrode itself contributes to the reduction of the quinone) with electrochemical monitoring will be demonstrated. An optimization approach of this strategy through the analysis of the coupling between homogeneous reactions and heterogeneous reduction will be presented. The influence of the electrode material on the catalyzed or non-catalyzed reduction of the quinone, as well as on the analytical performance of the autocatalytic process, will be discussed. Lastly, the redox reactivity of the naphthoquinone will be quantitatively analyzed through the study of its nine-membered square scheme, as well as its coupling with the redox reactivity of oxygen.

Key words: Autocatalysis; Exponential amplification; ORR (Oxygen Reduction Reaction); UV-Visible spectroscopy; Molecular electrochemistry; Redox enzymes; Numerical simulations; Redox radical reactions; Bioanalysis; Catalysts.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier **Maria-Rita MEUNIER-PREST** et **Vincent FOURMOND** d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit, ainsi que **Manon GUILLE-COLLIGNON** de participer au jury en tant qu'Examinatrice. Je remercie également **Guillaume GINES** de m'avoir suivi tout au long de ma thèse et d'avoir accepté d'en être Examinateur.

Mes remerciements vont également à **Elodie ANXOLABEHÈRE-MALLART**, Directrice du Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire, pour m'avoir accueilli au sein de son unité durant ces trois ans.

Je remercie mon Directeur de thèse **Benoit LIMOGES**, pour m'avoir guidé et aidé tout au long de ma thèse. Votre disponibilité pour répondre à toutes mes questions a été essentielle durant toute cette aventure. J'ai grandement apprécié nos nombreuses discussions scientifiques qui m'ont permis d'apprendre sur beaucoup de points grâce à votre sens de la pédagogie et du partage. Je tiens également à remercier mon Co-encadrant **Mathieu BRANCA**, pour son implication et son enthousiasme sur ce projet, et désolé de t'avoir peut-être assommé d'ennui avec tous ces chronoampérogrammes lors de mes meetings interminables.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à **François MAVRE**, qui m'a permis de mener à bien cette thèse grâce à son encadrement bienveillant. J'ai énormément appris à tes côtés, tant sur le plan scientifique qu'humain. Je te suis reconnaissant de m'avoir fait confiance et soutenu pour la direction que je voulais donner à cette thèse et les longs moments de réflexion devant le potentiostat à scruter mes résultats de plus en plus irréproductibles. Merci également pour les discussions en dehors de la thèse et pour ton soutien lors de mes premiers pas dans l'enseignement universitaire (et de m'avoir cédé les tant convoités TP d'électrochimie).

Un merci chaleureux aux visages du LEM, **Sihem, Esther, Julie, Rabia** et **Armand** pour leur disponibilité et leur gentillesse. Un merci spécial à **Alexandra** pour son implication dans mon projet et pour toutes les discussions et rires échangés.

Un immense merci à **Necka, Assia, Linda** et **Mathéo** qui ont contribué au cours de leur stage à ce travail et avec qui il a été un réel plaisir de travailler et d'échanger. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Je tiens à remercier **Justine** pour m'avoir transmis tout son savoir et pour ses conseils à mon arrivée au labo, avec beaucoup de gentillesse et de pédagogie malgré sa période stressante de rédaction. Ce manuscrit s'inscrit dans la suite du tien et j'espère qu'il reflètera la qualité de celui-ci.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux futurs troisièmes années **Aude**, **Sercan**, et **Francesco**. Bonne chance pour cette fin de thèse, les échanges scientifiques et les rires ont été un réel plaisir. Merci également à **Hamid** et **Jaya**, avec qui je suis arrivé au laboratoire et partagé cette aventure. Merci également à **Tom** puis sa doublure **Yashna** pour les supers moments autour de la balance de la 718 ou en dehors du labo. Plus que des collègues, j'ai rencontré ici des amis.

Merci également à toutes les personnes avec qui j'ai échangé au LEM au cours de ces trois années.

Je tiens à remercier également mes amis en dehors du laboratoire, tout d'abord **Marc** et **Elodie**, avec qui nous sommes suivis de la licence à la thèse (mais eux dans la plus jolie ville de France).

Merci également aux génies des procédés **Clémentine**, **Romain**, **Mathis**, **Rayan**, **Lucas**, **Florian** et **Laurie** pour ces deux formidables années en master et pour ce qui en a suivi.

Un très grand merci à **Baratte**, **Gautier**, **Samy** et **Tacos**, qui plus que des amis sont des frères pour moi. Merci entre autres pour tous les moments d'absurdités. Les parties d'échecs au square Albin Cachot, les tournois Smash à porte Maillot, les tennis à la Faluère et le jeu du 98 tout autour du monde sont de formidables souvenirs.

Merci de tout cœur à mes parents, mes sœurs **Marjorie** et **Charlotte** et mes grands-parents pour leur soutien infaillible. Tout ce travail est grâce à vous, et je vous suis reconnaissant d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

Pour finir, je remercie la personne la plus importante, ma moitié, **Marion**. Merci pour nos escapades, nos moments de rire, les barbecues coréens, de te droitiser en acceptant d'être ma partenaire de tennis les dimanches, des bandes dessinées que tu me prêtes, des séances cinémas dans tous les Pathé d'Ile-de-France... Merci simplement d'être là et pour tout. Tu es une inspiration pour moi. Ton soutien, ta patience et ta positivité ont été clés tout au long de la rédaction de ce manuscrit et je n'y serai jamais arrivé sans, et c'est pour tout cela que je te le dédie. J'espère qu'il te rendra fière de moi, je t'aime.

Table des matières

RESUME	3
ABSTRACT.....	4
REMERCIEMENTS	6
TABLE DES MATIERES	9
INTRODUCTION GENERALE	17
CHAPITRE 1 : AMPLIFICATION EXPONENTIELLE DU SIGNAL PAR DES REACTIONS AUTOCATALYTIQUES : GENERALITES ET ETAT DE L'ART.....	23
1. Détection de molécule d'intérêt : amplification du signal	26
1.1. Détection sans amplification : l'exemple du test antigénique à flux latéral.....	27
1.2. Détection par amplification linéaire : l'exemple du test ELISA.....	28
1.3. Détection par amplification exponentielle : l'exemple de l'EXPAR	29
2. Schémas autocatalytiques reposant sur une chimie redox inorganique	33
2.1. Réaction autocatalytique entre le permanganate et l'oxalate	33
2.2. Réactions autocatalytiques d'oxydation par Co(III).....	34
2.3. Une réaction oscillante autocatalytique : la réaction de Belousov-Zhabotinski	37
3. Schémas autocatalytiques basés sur de la chimie moléculaire	39
3.1. Amplification exponentielle du signal pour la détection de dérivés thiols	39
3.2. Amplification exponentielle du signal par des réactions dendritiques en chaîne	42
3.2.1. Détection autocatalytique de l'ion fluorure par une réaction dendritique en chaîne.....	42
3.2.2. Détection autocatalytique de l'eau oxygénée par une réaction dendritique en chaîne	45
3.3. Amplification du signal par autocatalyse photorédox.....	47
3.4. Réaction autocatalytique basée sur un mécanisme de catalyse croisée.....	48
4. Schémas autocatalytiques basés sur des réactions électrochimiques	53
4.1. Mécanisme autocatalytique lors de la réduction de Zn^{2+} en milieu non tamponné	53
4.2. Réduction autocatalytique d' H_2O_2 sur électrode d'argent en milieu acide.....	55
4.3. Etude par voltamétrie cyclique de la réduction électrochimique autocatalytique d'halogénures d'alkyles	57

5. Conclusion	60
6. Références Bibliographiques.....	61
CHAPITRE 2 : DESCRIPTION THEORIQUE D'UN MODELE AUTOCATALYTIQUE SIMPLE PAR CATALYSE CROISEE	69
1. Description du modèle et des équations différentielles adimensionnelles	70
2. Déclenchement direct de la réaction autocatalytique par un des deux catalyseurs	72
2.1. C ₁ est le déclencheur	72
2.2. C ₂ est le déclencheur	79
3. Mécanisme autocatalytique moléculaire préliminaire basée sur la catalyse croisée	80
4. Références Bibliographiques.....	86
CHAPITRE 3 : ETUDE MECANISTIQUE DE LA REACTION AUTOCATALYTIQUE IMPLIQUANT DES SONDAS DOUBLEMENT MASQUEES.	89
1. Preuve de concept de stabilisation de la sonde par double masquage et application à la réaction autocatalytique.....	91
1.1. Stabilité et réactivité de déprotection oxydative de la sonde doublement masquée	91
1.2. Réaction autocatalytique avec la sonde doublement masquée et le couple réducteur enzymatique DI/NADH	93
1.3. Etude mécanistique et cinétique de la déprotection oxydative de la sonde doublement masquée ..	95
1.4. Modélisation de la réaction autocatalytique.....	98
1.4.1. Simulation avec l'entrée numéro 2 : auto-oxydation de l'intermédiaire monoester boronique activée	105
1.4.2. Simulation avec l'entrée numéro 3 : auto-oxydation de l'intermédiaire monoboronique désactivée	106
1.4.3. Simulation avec l'entrée numéro 4 : raffinement des constantes cinétiques k ₃ et k _{red} impliquées dans le recyclage redox.	107
1.4.4. Confirmation du modèle numérique par application aux résultats de la sonde monoester boronique	111
2. Optimisation des performances analytiques par notre réaction autocatalytique.....	113
2.1. Amélioration de la cinétique globale d'autocatalyse : effet du pH	113
2.2. Inhibition de la réponse non-spécifique du système : contribution de la diaphorase	116

3. Exploration du cycleur redox 2,5-diméthoxy-1,4-benzoquinone comme alternative à la 1,4-NQ	118
3.1. Caractérisation de la boucle catalytique de recyclage redox de la 2,5-OMe-PB	119
3.1.1. Etude des propriétés d'auto-oxydation de la forme réduite de la 2,5-OMe-BQ par voltamétrie cyclique	119
3.1.2. Etude des propriétés de cyclage redox de la 2,5-OMe-BQ en présence de diaphorase et de NADH	121
3.2. Etude de la sonde diester boronique 2,5-OMe-PB	122
3.2.1. Etude de la déprotection de la sonde 2,5-OMe-PB par H ₂ O ₂	122
3.2.2. Réaction d'autocatalyse avec la sonde 2,5-OMe-PB	123
3.3. Exploration de la réaction de Dakin comme alternative de déprotection d'une sonde par H ₂ O ₂	124
3.3.1. Etude de la déprotection de la sonde 4-OH-2,5-OMe-Ald par H ₂ O ₂	124
3.3.2. Réaction d'autocatalyse avec la sonde 4-OH-2,5-OMe-Ald	125
4. Conclusion générale sur les réactions autocatalytiques impliquant des sondes doublement masquées	127
5. Références Bibliographiques.....	128

CHAPITRE 4 : SUIVI ELECTROCHIMIQUE DU SIGNAL DE LA REACTION AUTOCATALYTIQUE HOMOGENE AVEC UNE REDUCTION ENZYMATIQUE

133

1. Suivi chronoampérométrique de la réaction autocatalytique <i>via</i> la réduction électrochimique de l'oxygène médiée par la 1,4-naphthoquinone	136
1.1. Suivi électrochimique en réduction de la déprotection oxydative de la sonde 1,4-bis-DBN en présence de H ₂ O ₂	140
1.2. Suivi électrochimique en réduction du recyclage redox de la 1,4-naphthoquinone en présence du couple DI/NADH.....	141
1.3. Suivi électrochimique en réduction de la réaction autocatalytique.....	146
2. Suivi chronoampérométrique de la réaction autocatalytique <i>via</i> le suivi de l'oxydation catalytique du NADH par la diaphorase médiée par la 1,4-naphthoquinone	150
2.1. Principe de l'oxydation catalytique du NADH par la diaphorase médiée par la 1,4-naphthoquinone....	151
2.2. Suivi électrochimique en oxydation du cyclage redox de la 1,4-naphthoquinone.....	155
2.3. Suivi électrochimique en oxydation du système autocatalytique complet.....	156
2.3.1. Influence du potentiel.....	156
2.3.2. Détection de H ₂ O ₂ par lecture électrochimique oxydative.....	160
2.3.3. Simulation numérique 1D de la lecture électrochimique oxydative de la réaction autocatalytique	161

2.3.4.	Exploration des paramètres pouvant influencer sur la cinétique de la réaction autocatalytique au cours d'un suivi ampérométrique	164
2.4.	Optimisation des performances analytiques à pH 9.5.....	167
3.	Résultats préliminaires d'un suivi potentiométrique à courant nul de la réaction autocatalytique	169
4.	Conclusion générale sur le suivi électrochimique de la réaction autocatalytique homogène	171
5.	Références Bibliographiques :	173

CHAPITRE 5 : CATALYSE MOLECULAIRE D'UNE REACTION ELECTROCHIMIQUE AVEC RETROACTION POSITIVE : PREUVE DE CONCEPT DE L'AUTOCATALYSE MOLECULAIRE ELECTROCHIMIQUE

177

1.	Suivi et activation de la réaction autocatalytique <i>via</i> la réduction catalytique de l'oxygène par la 1,4-naphthoquinone sur une électrode en carbone vitreux dans une cellule électrochimique classique	178
1.1.	Première approche de la réactivité autocatalytique électrochimique avec la sonde monoboronique par voltamétrie cyclique	178
1.2.	Approche de la réactivité électrochimique autocatalytique avec la sonde diboronique par chronoampérométrie	184
2.	Etude de l'autocatalyse électrochimique dans un dispositif couche mince sur une électrode de carbone vitreux.....	190
2.1.	Simulation de l'autocatalyse électrochimique en couche mince	190
2.2.	Présentation du dispositif expérimental de formation de couche mince	192
2.3.	Preuve de concept du dispositif expérimental de formation de couche mince à partir d'une sonde électrochimique.....	194
2.4.	Autocatalyse électrochimique en couche mince.....	197
3.	Etude de la réduction directe et catalysée par la 1,4-naphthoquinone d'O₂ sur différents matériaux d'électrodes	203
3.1.	Réduction d'O ₂ sur des matériaux carbonés	204
3.2.	Réduction d'O ₂ sur des oxydes transparents conducteurs.....	205
3.3.	Réduction d'O ₂ sur des monocouches de thiols fonctionnalisées sur une électrode d'or	207
4.	Etude de l'autocatalyse électrochimique dans un dispositif couche mince sur une électrode d'or fonctionnalisée et sur ITO-PET	211
4.1.	Autocatalyse électrochimique en couche mince sur une monocouche de 6-mercapto-1-hexanol ..	211
4.2.	Autocatalyse électrochimique en couche mince sur une électrode d'ITO-PET	213

5. Références Bibliographiques.....	217
CHAPITRE 6 : ANALYSE DU MECANISME PCET DE LA 1,4-NAPHTHOQUINONE PAR LA METHODE DE LAVIRON ET APPLICATION A LA CATALYSE DE REDUCTION DE L'OXYGENE MOLECULAIRE	219
1. Description du schéma carré à 9 membres du mécanisme PCET de la 1,4-naphthoquinone.....	220
2. Détermination des constantes thermodynamiques du mécanisme PCET de la 1,4-naphthoquinone par une analyse en voltamétrie cyclique	221
3. Comportement de la 1,4-naphthoquinone dans des milieux faiblement tamponnés	227
4. Application du mécanisme PCET de la 1,4-naphthoquinone à la réduction catalytique médiée de l'oxygène moléculaire	228
5. Références Bibliographiques.....	235
CONCLUSION GENERALE	239
PARTIE EXPERIMENTALE.....	245
1. Procédure générale.....	246
1.1. Réactifs	246
1.2. Préparation des solutions mères	246
1.3. Aliquotage de la DI-3	246
2. Spectrophotométrie UV-Visible	247
2.1. Instruments	247
2.2. Suivi cinétique en microplaque	247
2.3. Protocole de préparation du suivi cinétique	248
2.3.1. Détection d'H ₂ O ₂ par réaction autocatalytique avec une sonde boronique et le couple réducteur DI/NADH	248
2.3.2. Suivi cinétique de la déprotection oxydative et du cyclage redox.....	249
3. Electrochimie	249
3.1. Matériels et mesures	249
3.2. Préparation des électrodes de travail	250
3.2.1. Electrode de carbone vitreux.....	250
3.2.2. Electrode d'or fonctionnalisée.....	250

3.2.3. Oxydes transparents conducteurs :	251
4. Simulations numériques	251
LISTES DES ABREVIATIONS.....	253

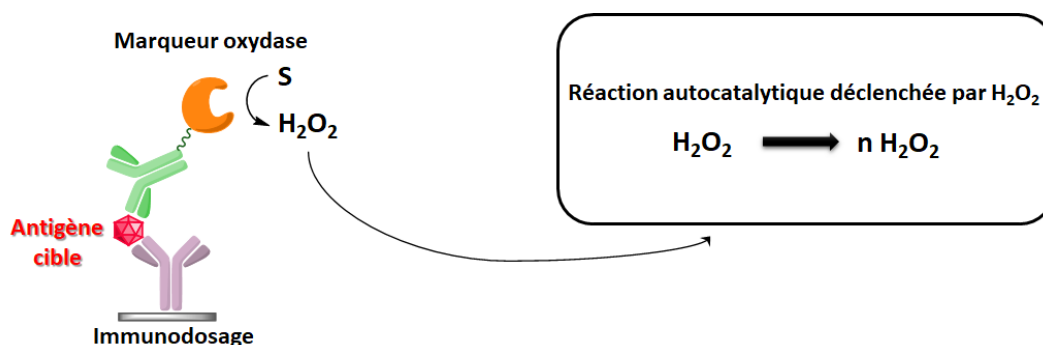
Introduction générale

L'autocatalyse est un phénomène naturel en chimie, en physique, en biologie et même en économie^{1,2}. Ce concept se définit comme une entité qui accélère sa propre production^{1,3,4}. En sciences, ce sont des réactions qui jouent un rôle fondamental dans l'évolution, et sont suspectées d'être clés dans l'apparition de la vie. Ce type de réaction est défini comme une réaction où les produits formés accélèrent la vitesse de la réaction elle-même. En d'autres termes, ce sont des réactions impliquant une espèce qui catalyse sa propre production. Un exemple d'autocatalyse en physique est la propagation auto-amplifiée de réactions en chaînes nucléaires dans l'industrie nucléaire. La croissance d'une colonie bactérienne est considérée comme une réaction autocatalytique en biologie. Dans le domaine de l'économie, le capital d'une entreprise peut également être décrit comme catalyseur de sa propre production. En chimie, les réactions autocatalytiques sont relativement rares, et la compréhension et l'utilisation de celles-ci sont au cœur de peu de recherches. Destinées à des applications très diverses, ce sous-domaine particulier de la chimie manque d'uniformisation dans les différentes études qui lui sont consacrées⁵. Comprendre et décrire fondamentalement ce type de réactivité est donc un enjeu important.

Aujourd'hui, de nombreux efforts sont faits pour développer des méthodes d'analyses d'agents chimiques ou biologiques. L'amplification moléculaire ou biomoléculaire de la cible ou du signal est une stratégie d'optimisation des performances analytiques de ces méthodes, avec pour but d'obtenir des meilleures sensibilités et limites de détection. Le développement de ces méthodes, essentiel pour être capable de détecter des traces d'analytes, peut être conduit selon plusieurs types d'amplifications, mais les méthodes d'amplification exponentielle sont les plus puissantes. Ces dernières reposent sur des réactions autocatalytiques, où soit la cible soit le signal est amplifié exponentiellement par une réaction chimique ou biochimique. C'est par exemple le cas de la *Polymerase Chain Reaction* (PCR), technique d'amplification biochimique qui permet grâce à la réplification exponentielle d'une séquence cible d'ADN de détecter quelques acides nucléiques dans quelques microlitres de solution⁶. Si ces réactions autocatalytiques sont largement répandues pour l'amplification d'acides nucléiques, des méthodes d'amplification exponentielle basée sur de la chimie moléculaire sont plus complexes à développer. Cependant, développer des réactions autocatalytiques basées sur ce type de chimie pour la détection sélective et sensible d'analytes est un enjeu intéressant pour des applications plus variées, mais également pour leur coût et leur simplicité d'utilisation.

Le contenu de ce manuscrit s'articule donc autour du développement et de la compréhension de réactions autocatalytiques moléculaires, spécifique de l'amplification exponentielle de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), agent chimique très important en analyse. L'idée globale est de développer une stratégie d'amplification suffisamment générique pour pouvoir être incorporées à des techniques d'analyse de biomolécules comme un immunodosage, pour en améliorer les performances

analytiques. Dans ce manuscrit, la description, la compréhension et l'optimisation de ces réactions autocatalytiques seront présentées.



Le premier chapitre est consacré à l'état de l'art de différentes méthodes d'amplification du signal par des réactions autocatalytiques inorganiques et organiques, afin de gagner en sensibilité de détection pour des molécules d'intérêts. Des exemples de réactions autocatalytiques en électrochimie seront également présentés. Au cours de ce chapitre, le principe de catalyse croisée au cœur du manuscrit sera introduit.

Le second chapitre décrit de manière formelle le principe de catalyse croisée induisant l'autocatalyse à partir de deux réactions catalytiques simples auto-activées. Les équations analytiques formulées seront appliquées à des résultats expérimentaux antérieurs à ce manuscrit afin de valider le modèle formel et comprendre les facteurs clés de l'autocatalyse.

Le troisième chapitre présente la réactivité de sondes moléculaires permettant d'obtenir des réactions autocatalytiques. Une analyse mécanistique et cinétique à l'aide de simulations numériques permettra de rendre compte des résultats expérimentaux. A partir de cette analyse, les performances analytiques de la réaction autocatalytique seront optimisées.

Le quatrième chapitre introduit une nouvelle méthode de suivi de la réaction autocatalytique, non plus par spectrophotométrie mais par mesures électrochimiques. Plusieurs stratégies de suivi en continu seront mises en place, et les nouvelles problématiques liées à ce mode de lecture seront discutées.

Le cinquième chapitre explore la mise en œuvre du concept d'autocatalyse électrochimique, où la réaction autocatalytique est non plus suivie mais activée par une électrode. Notamment, les problématiques de couplage d'une réaction homogène avec une réaction hétérogène avec rétroaction positive seront discutées, ainsi que la sélectivité du matériau d'électrode.

Le sixième chapitre traite de l'analyse thermodynamique des échanges de protons et d'électrons lors de la réduction ou de l'oxydation de la 1,4-naphthoquinone. Pour ce faire, des

voltamétries cycliques seront analysées et le schéma carré à neuf membres sera formellement et quantitativement discuté. A partir de cette analyse, la réduction catalytique de l'oxygène par cette même naphthoquinone sera expliquée par simulation numérique.

Références Bibliographiques :

- (1) Hanopolskyi, A. I.; Smaliak, V. A.; Novichkov, A. I.; Semenov, S. N. Autocatalysis: Kinetics, Mechanisms and Design. *ChemSystemsChem* **2021**, *3* (1), e2000026. <https://doi.org/10.1002/syst.202000026>.
- (2) Roddier, F. *13 – Le phénomène d'autocatalyse*. <https://www.francois-roddier.fr/?p=131> (accessed 2023-07-13).
- (3) Plasson, R.; Brandenburg, A.; Jullien, L.; Bersini, H. Autocatalyses. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115* (28), 8073–8085. <https://doi.org/10.1021/jp110079p>.
- (4) Bissette, A. J.; Fletcher, S. P. Mechanisms of Autocatalysis. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (49), 12800–12826. <https://doi.org/10.1002/anie.201303822>.
- (5) Blokhuis, A.; Lacoste, D.; Nghe, P. Universal Motifs and the Diversity of Autocatalytic Systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2020**, *117* (41), 25230–25236. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013527117>.
- (6) Wilhelm, J.; Pingoud, A. Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem* **2003**, *4* (11), 1120–1128. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300662>.

Chapitre 1 : AMPLIFICATION EXPONENTIELLE DU SIGNAL PAR DES REACTIONS AUTOCATALYTIQUES : GENERALITES ET ETAT DE L'ART.

L'identification et la quantification de marqueurs biologiques à l'état de traces dans des échantillons complexes est essentielle pour le diagnostic précoce de maladies, pour la compréhension de processus biologiques fondamentaux, ou encore pour la détection d'agents pathogènes dans l'environnement. Les marqueurs biologiques sont de nature extrêmement variée puisqu'ils peuvent être tout aussi bien une protéine, un acide nucléique (ARN, ADN), une vitamine, une hormone, ou encore toutes autres petites molécules d'intérêt biologique et/ou médical. Il est également nécessaire de les détecter très souvent à l'état de traces dans des milieux complexes, ce qui nécessite de développer des techniques analytiques qui soient très sensibles et sélectives. Dans le cas d'agents pathogènes biologiques, comme une bactérie, un champignon, un virus ou encore un parasite, la détection peut se faire soit de manière directe, c'est-à-dire en venant détecter l'agent ou un élément qui le constitue (comme par exemple une séquence ARN codant pour un virus), soit de manière indirecte en détectant par exemple l'anticorps issu de la réponse immunitaire que le pathogène a induite dans un organisme vivant. Les deux critères clés qu'il est nécessaire de prendre en compte lors du développement d'un outil de détection d'un marqueur biologique sont :

- **La sélectivité**, qui est la capacité d'un système de détection à cibler spécifiquement la molécule d'intérêt (les autres molécules ou interférents potentiels présents dans l'échantillon ne doivent générer aucune réponse). Cette propriété est nécessaire pour avoir un résultat précis et fiable, tout en évitant des faux positifs ou des réponses non-spécifiques du système de détection. En général, cette sélectivité repose sur une interaction de reconnaissance moléculaire entre la molécule cible et un récepteur spécifique de cette cible.
- **La sensibilité**, qui est la mesure de la variation de signal en réponse à une variation de concentration en analyte. La concentration seuil à partir de laquelle le signal se distingue du bruit ou du signal généré par la réponse non-spécifique est appelée limite de détection. L'amélioration du rapport signal/bruit par des techniques d'amplification du signal (ou éventuellement de la cible elle-même) est généralement nécessaire pour atteindre les très faibles concentrations généralement requises. Comme nous le verrons plus loin ces amplifications de signal peuvent être de natures très différentes : linéaire, multiplicative, quadratique, ou encore exponentielle.

C'est dans ce contexte d'amplification moléculaire du signal que s'inscrit ce travail, avec en particulier l'exploration d'un concept d'amplification exponentiel du signal qui met en jeu un processus d'autocatalyse redox pouvant être suivi par une simple technique de spectroscopie UV-visible ou par voie électrochimique. Dans ce premier chapitre, nous aborderons les différentes méthodes d'amplification du signal à des fins de détection biologique, avec d'abord une description assez

Amplification exponentielle du signal par des réactions autocatalytiques : généralités et état de l'art.

générale des différents modes d'amplification du signal pouvant être mis en œuvre, suivi ensuite d'un état de l'art plus spécifique sur les stratégies d'amplification exponentielle du signal *via* des réactions exploitant un principe d'autocatalyse.

1. Détection de molécule d'intérêt : amplification du signal

Les systèmes d'amplification moléculaire d'un signal ou d'une cible peuvent être catégorisés selon la nature de leur pouvoir amplificateur en fonction du temps (**Figure 1-1**) c'est-à-dire multiplicatif lorsque l'amplification du signal est le produit d'un saut quantitatif indépendant du temps, linéaire lorsque l'amplification est un facteur multiplicatif constant avec le temps, ou non-linéaire lorsque l'amplification du signal suit une loi non-linéaire avec le temps (les amplifications quadratiques et exponentielles font partie de cette catégorie).

Les systèmes que l'on dit sans amplification ne présentent aucune évolution de leur signal au cours du temps celui-ci étant directement proportionnel à l'interaction de reconnaissance biomoléculaire entre la cible et son marqueur révélateur (*i.e.* une molécule cible contribuera de manière stœchiométrique à l'intensité du signal produit par un marqueur révélateur). A l'inverse, les systèmes d'amplification linéaire de signal reposent dans de nombreux cas sur une réaction catalytique dont le produit de cette réaction s'accumule en fonction du temps avant d'être détecté. Enfin, les approches reposant sur une amplification du signal dite exponentielle est le plus souvent le résultat de réactions autocatalytiques impliquant un catalyseur capable de catalyser sa propre formation, selon un schéma réactionnel de type $X = n X$. C'est la méthode d'amplification la plus efficace pour atteindre une très grande sensibilité de détection et donc *a priori* une très faible limite de détection.

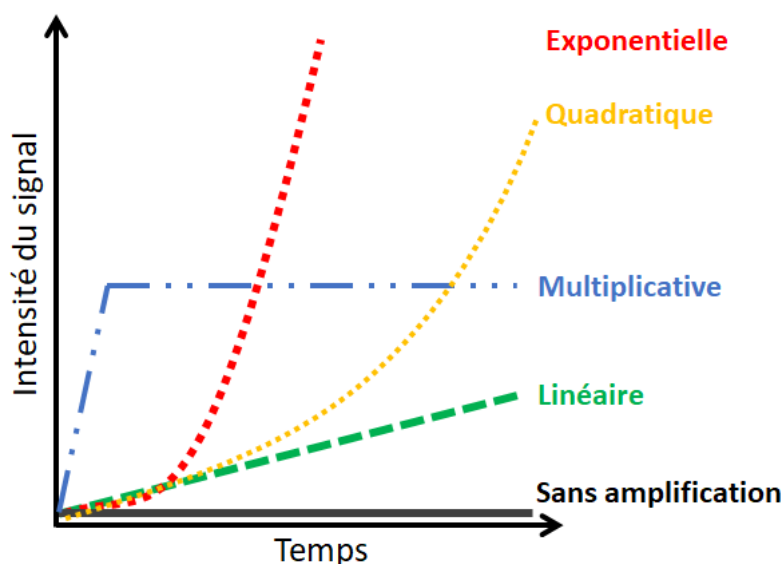


Figure 1-1 : Evolution de l'intensité d'un signal au cours du temps selon la nature de l'amplification. Sans amplification (noir), Amplification linéaire (vert), Multiplicative (bleu), Quadratique (jaune), Exponentielle (rouge).

1.1. Détection sans amplification : l'exemple du test antigénique à flux latéral

Un exemple bien connu de détection de biomolécules *via* l'apparition d'un signal directement induit par la reconnaissance biomoléculaire entre une cible X et un récepteur spécifique R est le test antigénique sur bandelettes ou à flux latéral^{1,2}. Ces derniers ont d'ailleurs été largement popularisés au cours de la pandémie du COVID 19. Le principe de cet immunodosage (**Figure 1-2**), similaire à celui d'un test de grossesse classique, repose sur la reconnaissance entre un antigène X et son anticorps R, auquel un marqueur de révélation est attaché, en l'occurrence ici des nanoparticules d'or. Lors de la reconnaissance biomoléculaire entre X et R, ce marqueur colloïdal d'or se concentre localement en se liant à un troisième anticorps fixé à un endroit bien précis sur la bandelette. Cela permet alors la visualisation d'une ligne colorée (rouge) en cas de présence de l'antigène.

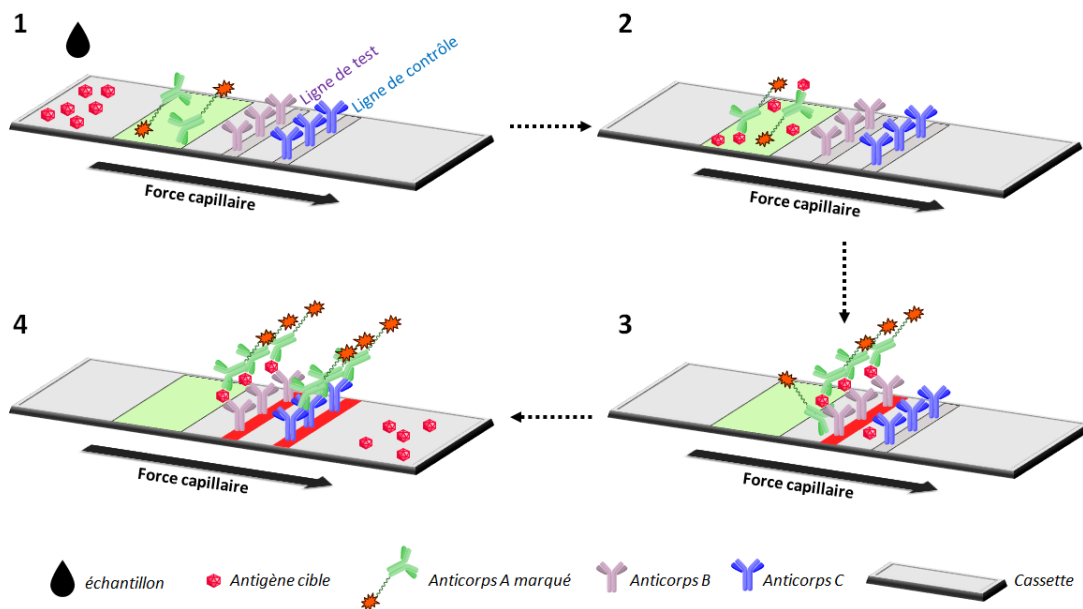


Figure 1-2 : Schéma de principe d'un test à flux latéral antigénique d'après la référence². Après dépôt d'un échantillon, celui-ci se déplace le long de la cassette de test (généralement en papier ou en nitrocellulose) par capillarité. S'il contient l'antigène cible, celui-ci se lie dans un premier temps à un premier anticorps A sur lequel est greffé le marqueur. Le couple antigène/anticorps A se déplace alors à une première ligne de test sur laquelle est fixée un anticorps B capable de reconnaître l'antigène et de former ainsi un immunosandwich B/antigène/A, qui donne lieu à l'apparition d'un trait rouge visible. Par la suite, l'excès d'anticorps A se déplace jusqu'à une ligne de contrôle où il peut se lier à un anticorps C et donner lieu à un deuxième trait rouge, permettant de vérifier la validité du test. Enfin, l'excès d'antigènes cibles potentiel qui ne serait pas lié se déplace jusqu'à la fin de la cassette.

Il est important de noter que cette détection est simplement stœchiométrique, signifiant que pour un antigène, un seul marqueur révélateur greffé à l'anticorps émettra un signal coloré. Si ces tests permettent un accès rapide au diagnostic avec une mise en œuvre simple, rapide, peu chère et portable, leur sensibilité reste cependant souvent insuffisante par rapport aux tests de références

réalisés en laboratoire car ces dernières intègrent généralement un principe d'amplification du signal comme nous allons maintenant le voir avec l'exemple des tests ELISA.

1.2. Détection par amplification linéaire : l'exemple du test ELISA

En 1971 est apparue la technique d'immunodosage enzymatique hétérogène, ou *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA)³, qui s'appuie sur l'utilisation d'un marqueur enzymatique pour générer une amplification de signal linéaire. Le principe de cette technique est rappelé **Figure 1-3**.

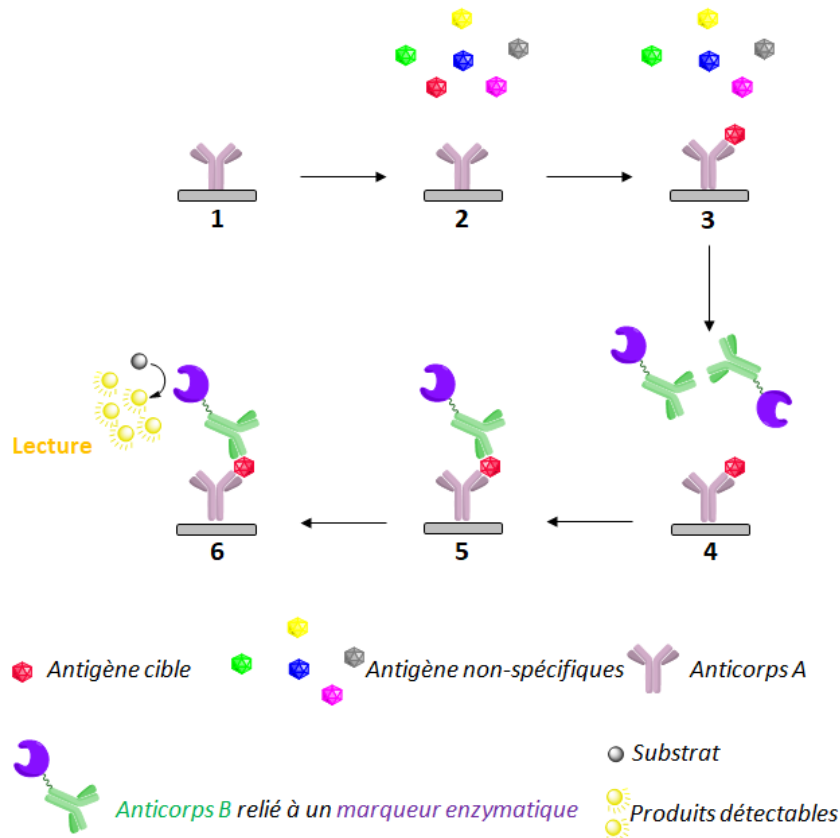


Figure 1-3 : Schéma de principe d'un test ELISA classique.

Il se déroule en 6 étapes. Dans un premier temps, un anticorps A est immobilisé sur une phase solide. Ensuite, l'échantillon à analyser est introduit et seul l'antigène cible présent dans l'échantillon est capturé par l'anticorps A immobilisé. Après capture, la phase solide est lavée ce qui permet d'éliminer tout ce qui n'a pas réagi. Ensuite, un deuxième anticorps B marqué par une enzyme est introduit. Cet anticorps se lie alors avec un autre épitope de l'antigène, formant un immunosandwich de type anticorps A/antigène/anticorps B-marqueur enzymatique. Le surplus d'anticorps B non lié est alors éliminé par lavage de la phase solide. Enfin, dans une dernière étape le substrat de l'enzyme est ajouté ce qui a pour effet de déclencher la production catalytique d'un produit P facilement détectable (par un exemple un produit P coloré ou fluorescent) et qui s'accumule linéairement avec le temps.

Cette accumulation du produit de la réaction enzymatique permet de gagner en sensibilité avec un facteur d'amplification qui dépend directement de la réactivité de l'enzyme, ou plus précisément de son turnover. Ce dernier représente en effet le nombre de molécules de substrat transformées par seconde et par unité de marqueur enzymatique (avec une valeur classiquement comprise entre 100 et 1000 s⁻¹). La technique ELISA est très couramment employée en bioanalyse. Elle permet d'atteindre des limites de détection en cible inférieures au picomolaire. De plus, il est relativement simple de concevoir des immunodosages ELISA avec un marqueur enzymatique dont le produit de catalyse est facilement détectable par des méthodes spectrophotométriques (UV-vis, chimiluminescence, fluorescence). Cependant, cette amplification linéaire peut ne pas être suffisante pour détecter les très faibles concentrations de certaines cibles. C'est aussi pour cette raison que des amplifications de signal non-linéaires peuvent être intéressantes.

1.3. Détection par amplification exponentielle : l'exemple de l'EXPAR

Les amplifications exponentielles sont généralement le fruit de réactions dites autocatalytiques. On parle d'une réaction autocatalytique quand un réactif est capable de se répliquer selon le schéma réactionnel représenté **Figure 1-4**.



Figure 1-4 : Principe d'une réaction autocatalytique où un composé X catalyse sa propre formation en réagissant avec un substrat S.

La cinétique d'une réaction autocatalytique se caractérise par une consommation exponentielle des réactifs de départ (ici S) et, concomitamment, l'accumulation exponentielle des produits (ici P). Expérimentalement, ce type de réaction produit des cinétiques sigmoïdales (**Figure 1-5**) qui s'expliquent par une première phase de latence durant laquelle la vitesse de la réaction s'accélère, suivie ensuite d'une phase mesurable d'évolution exponentielle, puis enfin d'une phase qui progressivement ralentie pour finir par s'interrompre indiquant l'arrêt de la réaction en raison de la consommation totale du réactif de départ. Ce qui caractérise aussi une réaction autocatalytique c'est une phase de latence d'autant plus longue que la concentration en cible au départ est faible. Cela permet de tracer des courbes en S telles que représentées **Figure 1-5**, dont la grandeur mesurable pour caractériser la concentration en X n'est plus l'intensité d'un signal qui dépend des performances du dispositif analytique de mesure (densité optique, intensité de fluorescence, etc...) mais d'un temps de réponse caractéristique (temps d'apparition du signal, temps de demi-réaction, ...). Ce temps varie théoriquement de manière linéaire avec le logarithme de la concentration en cible X. Ainsi, il est possible de détecter quantitativement sur plusieurs ordres de grandeurs des concentrations en cible selon ce temps caractéristique. Les réactions autocatalytiques sont donc intrinsèquement très

sensibles, ce qui potentiellement peut permettre d'atteindre des limites de détection très basses en concentration pour un analyte donné. C'est aussi pour cette raison qu'elles ont été jusqu'ici très largement exploitées pour détecter des acides nucléiques à des concentrations très faibles. C'est typiquement le cas de la technique PCR⁴ qui permet de répliquer autocatalytiquement des séquences d'acides nucléiques ou encore de nombreuses autres méthodes d'amplification isotherme d'acides nucléiques comme la technique LAMP⁵. Parmi ces méthodes d'amplifications isothermes d'acides nucléiques, la technique dite *Exponential Amplification Reaction* (EXPAR)⁵⁻⁷ est un exemple intéressant à décrire.

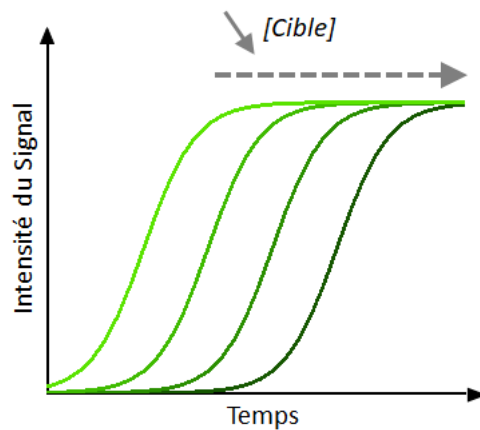


Figure 1-5 : Courbe cinétique de l'évolution d'intensité d'un signal en fonction du temps pour une réaction autocatalytique décrite en **Figure 1-4**.

Son principe de fonctionnement représenté **Figure 1-6** repose sur l'utilisation d'une sonde oligonucléotidique simple brin d'ADN composée d'une répétition de deux motifs X' (sonde palindromique) complémentaires de la cible oligonucléotidique X et séparés par un site de restriction spécifique d'une endonucléase. La réaction démarre lorsque la cible X s'hybride de manière complémentaire à la sonde sur l'un des sites X'. En présence d'une polymérase et de nucléotides triphosphorylés, le brin cible est allongé et un second motif X est répliqué en complémentaire du second motif X' de la sonde.

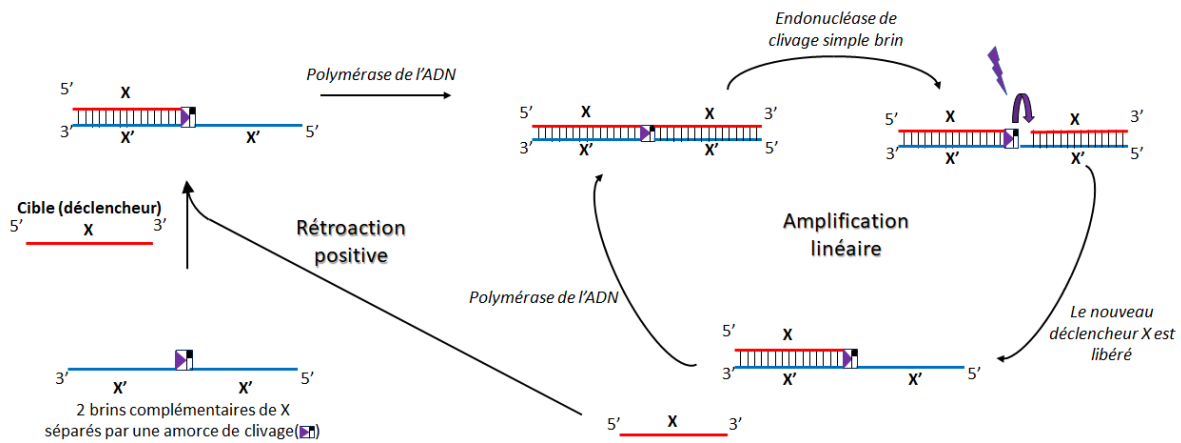


Figure 1-6 : Représentation de la technique d'amplification EXPAR d'un brin d'ADN cible X à T = 55°C, en présence d'une amorce constituée de 2 brins complémentaires X' séparés par site de restriction (représenté par un triangle violet), d'une première enzyme polymérase de l'ADN et d'une seconde enzyme endonucléase de clivage simple brin.

Ensuite, le processus se poursuit avec le clivage du nouveau brin par l'endonucléase au niveau du site de restriction, ce qui autorise alors à la fois (i) une nouvelle élongation du duplex par la polymérase (amplification linéaire), (ii) la libération d'un brin équivalent de X qui peut alors réagir avec une nouvelle sonde oligonucléotidique (réaction positive). La cible X est donc catalyseur de sa propre formation, ce qui fait de l'EXPAR est une technique d'amplification exponentielle de l'ADN. La technique EXPAR permet d'accumuler jusqu'à 10^8 fois la quantité d'oligonucléotides initiale en quelques minutes seulement. C'est également une technique qui peut être facilement couplée à différents modes de suivi comme par exemple par spectroscopie de fluorescence.

Une approche qui permet d'améliorer les performances analytiques des méthodes de diagnostic consiste à coupler la technique EXPAR à un immunodosage^{8,9}. Le principe (**Figure 1-7**) est similaire à celui d'un test ELISA, sauf que le catalyseur enzymatique est ici remplacé par un brin d'ADN que l'on réplique lors de l'étape de révélation de manière exponentielle *via* l'amplification EXPAR. L'amplification du signal est donc exponentielle dans ce cas et elle peut être suivie cinétiquement par une simple mesure d'absorbance ou de fluorescence.

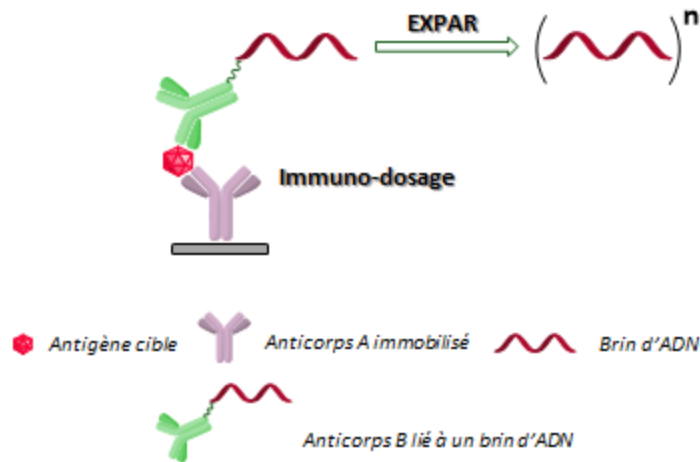


Figure 1-7 : Principe de l'immuno-EXPAR, inspiré de ^{8,9}.

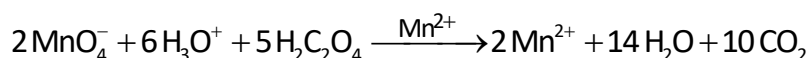
Les techniques d'amplification exponentielles s'avèrent donc particulièrement intéressantes si l'on souhaite détecter de très faibles concentrations en un analyte donnée. Cependant, ce sont des méthodes qui dans le cas de ces approches tirant parti de l'amplification d'acides nucléiques restent onéreuses et complexes à mettre en œuvre, nécessitant des techniciens hautement qualifiés. Elles peuvent également être limitées par des amplifications non-spécifiques qui généralement conduisent à des faux positifs. De plus, ces techniques d'amplification exponentielles relèvent principalement de la chimie/biochimie des acides nucléiques. Une transposition de ces concepts d'amplification autocatalytique vers une chimie plus moléculaire et aussi plus simple est une alternative intéressante mais qui jusqu'ici n'a été que peu explorée. C'est ce que nous allons maintenant aborder avec la présentation des quelques rares exemples d'amplification autocatalytique par voie chimique qui ont été développés dans un but analytique.

2. Schémas autocatalytiques reposant sur une chimie redox inorganique

Il existe dans la littérature quelques exemples de réaction autocatalytiques reposant sur une chimie redox inorganique et qui ont été exploitées dans un but analytique. Elles constituent ainsi une première approche pour appréhender la complexité de ce type de réactivité, impliquant de la chimie redox, radicalaire ou colloïdale.

2.1. Réaction autocatalytique entre le permanganate et l'oxalate

La réaction de titrage de l'ion oxalate $C_2O_4^{2-}$ et le permanganate MnO_4^- est une expérience classiquement étudiée en chimie pour comprendre le principe des dosages redox. La réaction globale est la suivante :



Son caractère autocatalytique a été décrit pour la première fois par Launer en 1932^{14,15} selon le schéma réactionnel en **Figure 1-8**.

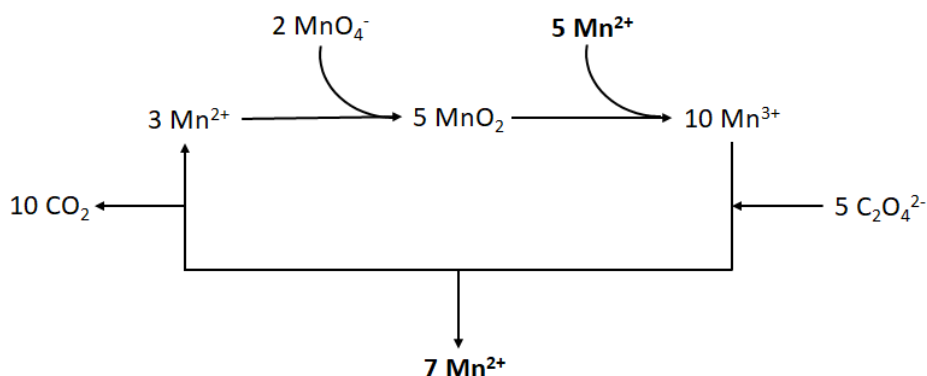
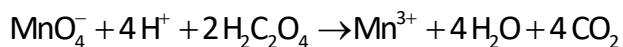


Figure 1-8 : Mécanisme de la réaction autocatalytique Permanganate-Oxalate selon la référence ^{14,15}.

Dans ce mécanisme, l'espèce Mn^{2+} facilite d'abord la réduction de MnO_4^- en MnO_2 . Ensuite, l'espèce colloïdale MnO_2 peut réagir avec Mn^{2+} pour former Mn^{3+} , qui en présence d'oxalate se réduit à nouveau en Mn^{2+} . Au bilan global, l'espèce Mn^{2+} est accumulée durant un cycle de propagation selon l'équation globale $5 Mn^{2+} \rightarrow 7 Mn^{2+}$ et elle s'accumule donc de manière exponentielle au cours des cycles. Si l'on observe l'évolution des concentrations en réactifs au cours du temps, des sigmoïdes sont donc obtenues. La **Figure 1-9** représente le suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à $\lambda = 525$ nm (longueur d'onde où l'on observe la disparition du permanganate) de la réaction en milieu acide et à plusieurs concentrations initiales en Mn^{2+} ¹¹. Une consommation exponentielle du permanganate au cours du temps est observée. Le début de cette consommation est d'autant plus rapide que la concentration en Mn^{2+} initiale est forte. Il est ainsi possible de déterminer en fonction du temps de réponse plusieurs ordres de grandeurs en concentration de Mn^{2+} . Néanmoins, il faut noter qu'en

l'absence de Mn^{2+} (**Figure 1-9**, courbe **a**), une sigmoïde est également observée. Ceci est dû à la réaction non-désirée de réduction directe du permanganate par l'oxalate en l'absence de Mn^{2+} (voir ci-dessous), qui bien que lente à lieu quand même.



Cette réaction non-désirée limite ainsi les performances analytiques de la méthode.

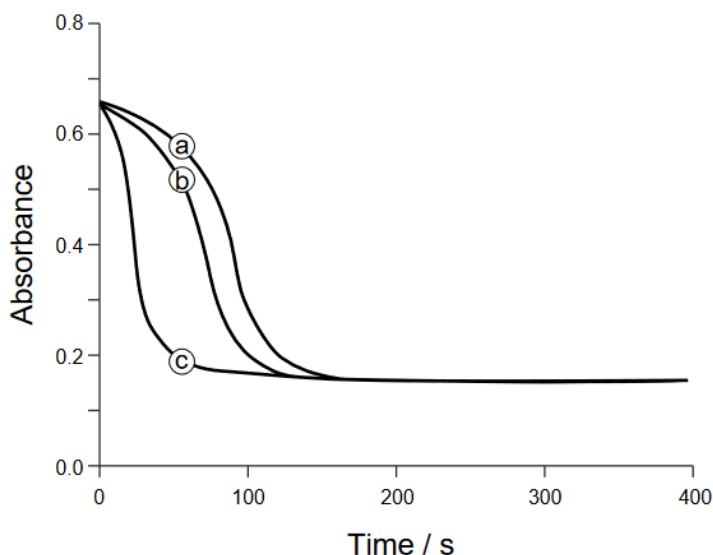


Figure 1-9 : Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à $\lambda = 525$ nm (longueur d'onde caractéristique du permanganate de potassium) de la réaction autocatalytique entre le permanganate et l'oxalate, figure extraite de la référence ¹¹. Les conditions expérimentales sont : 2 mL d'une solution de permanganate de potassium à 4×10^{-4} mol.L⁻¹ auquel est ajouté 1 mL d'une solution d'oxalate à 1.5×10^{-3} mol.L⁻¹. La réaction se déroule dans de l'acide sulfurique à 0.5 mol.L⁻¹ avec différentes concentrations finales en Mn^{2+} : **(a)** 0 mol.L⁻¹, **(b)** 1×10^{-5} mol.L⁻¹, **(c)** 1×10^{-3} mol.L⁻¹.

Différents mécanismes réactionnels entre le permanganate et l'oxalate ont été proposés dans la littérature. Kovács décrit un mécanisme plus complexe dans lequel l'oxydation de l'oxalate serait initiée par la formation des colloïdes de MnO_2 ¹³. D'autres réactions du permanganate sont également décrites comme autocatalytiques en présence de glycine¹⁶, de L-alanine¹⁷, ou bien d'acide formique¹⁸. Dans le cas de la glycine et de la L-alanine, les colloïdes de MnO_2 sont également décrits comme responsable de l'autocatalyse. La variété des mécanismes décrits souligne la complexité de ce type de réactions.

2.2. Réactions autocatalytiques d'oxydation par Co(III)

Les réactions d'oxydation de composés organiques par Co^{3+} sont parfois décrites dans la littérature comme autocatalytique, avec une amplification exponentielle du signal. Un premier

exemple est l'oxydation de l'hydrazine (N_2H_4) par des complexes de cobalt (III)¹⁹. Dans le mécanisme proposé, l'espèce Co(II) accélère fortement la réaction de décomposition de l'hydrazine. L'explication avancée par les auteurs est que le Co(II) complexé avec l'hydrazine permet un échange d'électron par sphère externe facilité avec le complexe de Co(III).

Une autre réaction autocatalytique est la réaction d'un colorant (5-Br-PAPS) en présence de Co^{3+} , Co^{2+} et d'oxone ($KHSO_5$)^{20,21}. Cette réaction représentée **Figure 1-10** met en jeu les ions Co^{2+} comme réactif autocatalytique ce qui donne lieu à des cinétiques sigmoïdales très raides lors du suivi spectrophotométrique de la consommation du colorant.

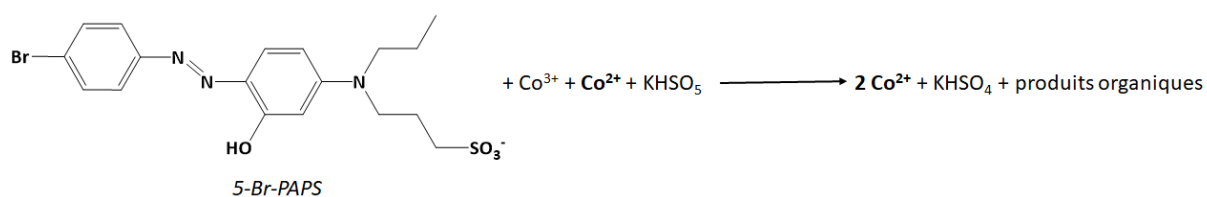


Figure 1-10 : Réaction d'oxydation autocatalytique d'un colorant 5-Br-PAPS en présence de Co^{3+} et Co^{2+} selon ²¹.

Dans le mécanisme proposé, Co^{2+} est bien une espèce autocatalytique car elle catalyse sa propre formation, entraînant ainsi une accumulation exponentielle de sa concentration. La concentration initiale de Co^{2+} est donc clé, car plus elle sera importante, plus la réaction sera accélérée. Les auteurs tirent parti de cette réactivité afin de détecter sensiblement des concentrations à l'échelle de traces en Co^{2+} . C'est ce que montre la **Figure 1-11** avec le suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à $\lambda = 590$ nm (longueur d'onde caractéristique du complexe $Co^{3+} - 5-Br-PAPS$, $\epsilon = 9.8 \times 10^4$ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$) de plusieurs concentrations en Co^{2+} initiale.

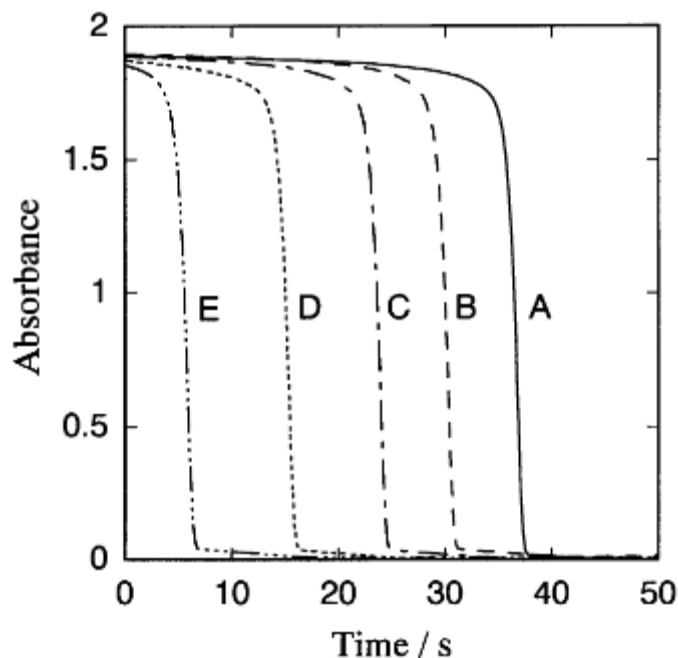
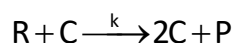


Figure 1-11 : Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à $\lambda = 590$ nm de 15 μM de 5-Br-PAPS en présence de 0.5% d'oxone en présence de plusieurs concentrations de Co^{2+} dans un tampon phosphate 0.025 M à pH 7. $[\text{Co(II)}]$ (nM) : **A**) 0, **B**) 15, **C**) 30, **D**) 75, **E**) 150. Figure extraite de la référence ²¹.

Il est ainsi possible de détecter sensiblement, en quelques dizaines de secondes, jusqu'à 15 nM de Co^{2+} dans quelques microlitres de solution. Cette réaction autocatalytique est donc un outil très puissant pour la détection de traces de Co^{2+} . Plusieurs paramètres expérimentaux influent sur les performances analytiques, notamment la concentration en oxone, la concentration en 5-Br-PAPS, la température, la concentration du tampon. Cette réaction autocatalytique²⁰ peut être décrite selon la réaction formelle simple ci-dessous, permettant de rendre compte de la nature singulière des signaux sigmoïdaux obtenus.



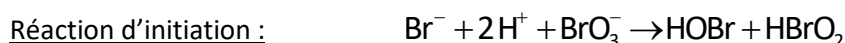
(où R est le réactif, C l'autocatalyseur, P le produit, et k la constante de vitesse)

Cette réaction autocatalytique a également été utilisée dans un dispositif microfluidique à gouttelettes par l'équipe d'Ismagilov²² avec pour ambition le couplage temporel de deux amplifications successives. Nous ne rentrerons pas ici dans le détail mais ce dispositif permet de maintenir les réactions hors-équilibre, ce résulte en un système bistable. Cela se traduit analytiquement par l'existence d'une concentration seuil nécessaire pour obtenir une décoloration totale des gouttelettes et au-delà de laquelle le temps de réponse reste le même. Un point intéressant évoqué dans ce papier est la dépendance de la vitesse de la réaction autocatalytique avec la convection. Ce type de réaction est en effet décrit comme affectée par la convection^{23,24}, et ici le temps de consommation totale du

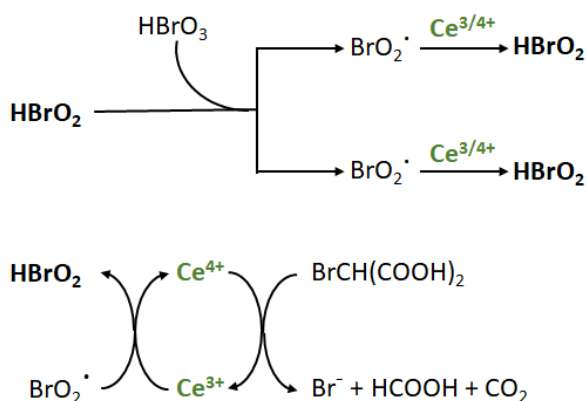
colorant est d'autant plus long que la convection est importante. Une explication à cette inhibition de la cinétique d'autocatalyse par la convection est que l'amplification locale d'une concentration en autocatalyseur (ici Co^{2+}) permet d'accélérer la cinétique globale, et que la présence de toute convection vient diluer ces « poches » d'autocatalyseur locales.

2.3. Une réaction oscillante autocatalytique : la réaction de Belousov-Zhabotinski

La réaction de Belousov-Zhabotinski (réaction BZ) est un système chimique oscillant décrit pour la première fois en 1951 par Belousov et qui a été au cœur de beaucoup de recherches du fait de son comportement singulier. L'oscillation de la réaction s'observe visuellement par des changements de couleurs périodiques spontanés. Ce système chimique est donc non linéaire et a suscité un grand intérêt en chimie théorique et en biologie car elle permet une analogie avec les systèmes naturels oscillants (par exemple l'oscillation des niveaux hormonaux, du rythme cardiaque...), ou encore parce qu'elle est une piste de réflexion pour la conception de matériaux autonomes capables de se régénérer. L'autocatalyse est au cœur du mécanisme réactionnel complexe de la réaction BZ qui comporterait plus de 80 étapes élémentaires^{25,26}. Une proposition simplifiée du mécanisme est décrite ci-dessous :



Réactions de propagation :



La réaction BZ est initiée par la très lente réduction de BrO_3^- en HBrO_2 *via* Br^- . Le HBrO_2 formé peut ensuite à nouveau réagir avec BrO_3^- pour former Br_2O_4 , qui se dissocie en deux radicaux BrO_2^\cdot . Ces deux radicaux entrent alors dans une boucle de cyclage redox du cérium et sont réduits par l'ion Ce^{3+} en deux molécules de HBrO_2 . Le cérium est alors oxydé en Ce^{4+} , puis l'acide bromomalonique permet de le réduire à nouveau en Ce^{3+} . Ainsi, HBrO_2 est l'autocatalyseur de la réaction BZ, selon la réaction globale suivante :



Il est possible de remplacer Ce par d'autres métaux (Mn, Fe, Ru, Co, Cu, Cr, Ag, Ni, et Os²⁷), tant que ces derniers permettent la réduction catalytique du BrO_2^- en HBrO_2 . L'oscillation de la réaction BZ est décrite comme dépendante des concentrations en réactifs et notamment de la concentration en ion métallique. Strizhak décrit en 1993²⁸ un modèle original tirant parti de ce caractère pour la détection de l'ion Mn(II). Les oscillations sont mesurées avec l'aide d'une électrode de platine dont le potentiel électrochimique de circuit ouvert varie avec la variation de concentration des espèces redox en solution (**Figure 1-12**).

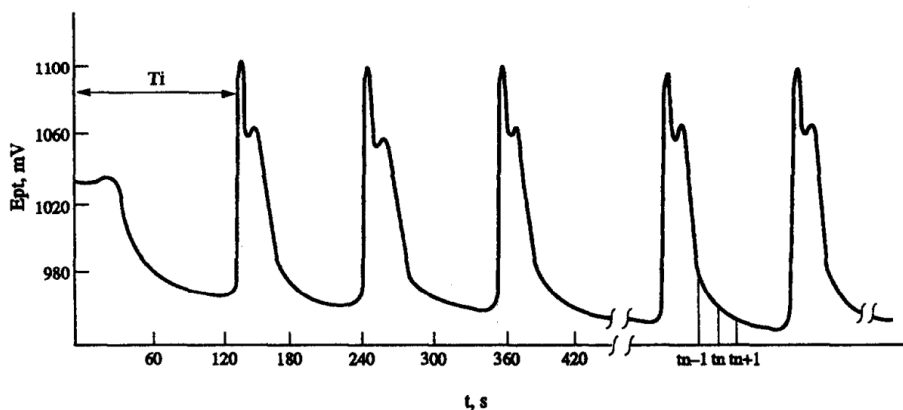


Figure 1-12 : Mesure potentiométrique à une électrode de platine du potentiel global de la solution en fonction du temps à 21°C de la réaction BZ avec les concentrations initiales suivantes : $[\text{KBrO}_3] = 0.115 \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 0.32 \text{ mol.L}^{-1}$, [acide bromomalonique] = 0.68 mol.L^{-1} , [ferroïne] (catalyseur de la réaction) = $1.7 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Ces oscillations se caractérisent par un fort saut de potentiel suivi d'une décroissance lente. Bien qu'elles soient régulières en forme, les oscillations ne le sont pas en amplitude et en période, créant ainsi des oscillations chaotiques. Néanmoins, bien que ces oscillations chaotiques ne soient pas reproductibles, les caractéristiques statistiques (densité de probabilité, dimension fractale) de ces oscillations le sont. Il est ainsi possible de calculer par traitement numérique 3D, avec un algorithme de Wolf, un paramètre caractéristique de Lyapunov λ_L en s^{-1} qui, dans un système dynamique, est caractéristique de la stabilité ou de l'instabilité de ce système. A partir des données expérimentales, λ_L est extrait et multiplié au temps T_i associé caractéristique de l'oscillation (**Figure 1-12**). Ainsi, ce nouveau paramètre $\lambda_L \cdot T_i$ permet de s'affranchir de la non-reproductibilité des temps de la réaction BZ, et en le calculant pour plusieurs concentrations en Mn(II), il est alors possible d'obtenir des courbes de calibration sur plusieurs ordres de grandeurs de concentrations en ion métallique (jusqu'au picomolaire en Mn(II)) (**Figure 1-13**). Cette approche originale, bien que complexe, est performante. Elle pourrait également être appliquée à la détection d'autres métaux.

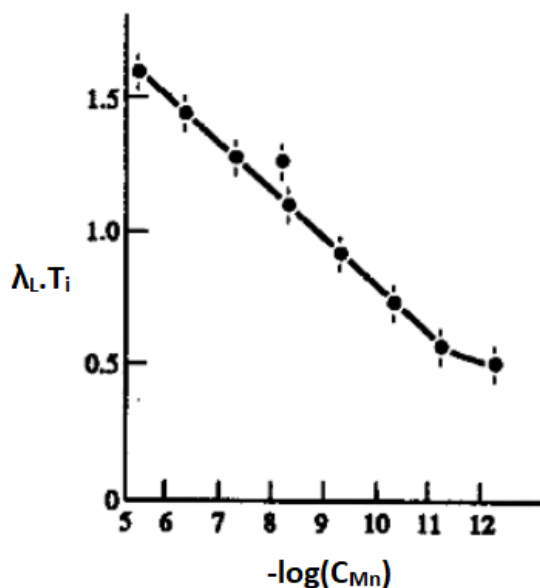


Figure 1-13 : Tracé de la dépendance de la valeur du paramètre $\lambda_L \cdot T_i$ en fonction de la concentration initiale en Mn(II). Les conditions expérimentales sont les mêmes qu'en **Figure 1-12**.

Les réactions autocatalytiques reposant sur une chimie redox inorganique, bien qu'autorisant de très fortes amplifications, restent des systèmes complexes avec un caractère cinétique hautement non linéaire. Il est donc difficile d'en prédire et maîtriser la réactivité. D'autre part, elles nécessitent généralement d'opérer en milieux très acides, ce qui les rends difficilement exploitables pour le développement d'applications bioanalytiques.

3. Schémas autocatalytiques basés sur de la chimie moléculaire

Au cours des dix dernières années plusieurs stratégies originales d'amplifications moléculaires autocatalytiques ont été proposées dans le but de détecter de petites molécules d'intérêt analytique. La force de ces nouvelles stratégies d'amplification moléculaires repose sur le fait qu'elles tirent parti de sondes moléculaires dont le design est aisément modulable grâce à la chimie de synthèse organique. La littérature comporte un panel variés de réactions autocatalytiques moléculaires, allant du domaine de l'organométallique^{29,30} à des approches enzymatiques³¹. Nous décrivons dans un premier temps quelques exemples de systèmes récemment reportés dans la littérature, puis nous présenterons ensuite celui que l'équipe du Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire a développé au cours de ces dernières années et sur lequel je me suis appuyé pour réaliser mon travail de thèse.

3.1. Amplification exponentielle du signal pour la détection de dérivés thiols

La détection d'agents neurotoxiques à de très faibles concentrations (létale à quelques ppb) est un enjeu important dans le contexte de leur utilisation comme arme chimique. En 2017, le groupe d'Anslyn propose un nouveau concept de réaction autocatalytique exploitant la chimie des dérivés

thiols³². Le concept reporté **Figure 1-14** consiste à hydrolyser un substitut d'agent nerveux, le déméthion-S-méthyl en un dérivé thiol qui enclenche un mécanisme d'amplification autocatalytique. L'autocatalyse résulte du clivage par le dérivé thiol du pont disulfure du 2-hydroxyéthyl disulfide (BMEox), libérant ainsi deux molécules de mercaptoéthanol (BME). Celles-ci peuvent alors réagir en proportion stœchiométrique avec le dérivé di-mercaptopométhyl de l'acide de Meldrum (**A**), qui libère ainsi deux molécules de méthaneéthiol et le composé **B**. Les molécules de méthaneéthiol produites peuvent alors réagir comme nouveaux déclencheurs avec le composé BMEox et ainsi assurer un fonctionnement autocatalytique de type $BME \rightarrow 2BME$ jusqu'à épuisement des réservoirs de **A** et BMEox.

Pour pouvoir suivre la cinétique de cette réaction par fluorescence, la sonde **C** est ajoutée au mélange. Cette molécule est une fluorescéine masquée par un groupement acide dinitrobenzène sulfonique, lequel peut être retiré en présence de méthaneéthiol pour libérer la fluorescéine. Le méthaneéthiol qui croît de manière exponentielle au cours de la réaction va donc ainsi induire l'apparition soudaine d'une émission de fluorescence, avec une cinétique en forme de sigmoïdale. La détection jusqu'à 2.22 μM de butaneéthiol (ici utilisée comme déclencheur initial) en moins de 40 minutes environ a pu ainsi être démontrée. Les performances analytiques de cette approche restent cependant limitées par la réponse non-spécifique obtenue en l'absence de tout déclencheur, traduisant ainsi un manque de stabilité des réactifs de départ.

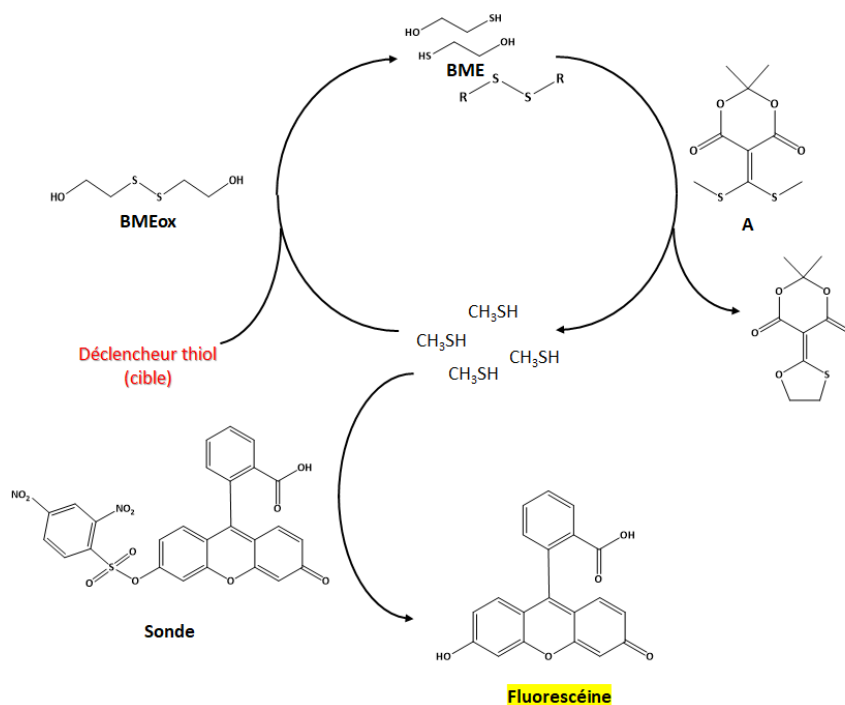


Figure 1-14 : Schéma réactionnel de la cascade autoinductive entre un dérivé de l'acide de Meldrum (**A**) et le 2-hydroxyéthyl disulfide (**BMEox**) en présence d'un déclencheur thiol et d'une sonde masquant la fluorescéine. La figure est inspirée de la référence ³².

En 2021, le même groupe a proposé un mode de suivi alternatif pour cette même réaction. Cette fois ci, l'amplification exponentielle n'est plus suivie par fluorescence mais à l'œil nu via un hydrogel qui se dégrade en présence de thiol³³.

Le groupe de Murthy propose en 2020 une autre méthode d'amplification autocatalytique pour la détection de thiols, la réaction en chaîne de la méthionase (MCR)³⁴, illustrée **Figure 1-15**. Cette méthode est basée sur la réactivation en chaîne d'une enzyme, la méthionine gamma-lyase (MGL). L'activité de cette enzyme consiste à catalyser l'hydrolyse d'un acide aminé, la méthionine, avec pour produit principal le méthanethiol CH_3SH , et repose sur un mécanisme impliquant le groupement thiol d'une cystéine, la Cys-116. Par réaction de cette cystéine avec le réactif d'Ellman (DTNB ou acide dithiobisnitrobenzoïque) formant ainsi un pont disulfure, l'enzyme perd son activité (forme MGL*). Cependant, cette désactivation est réversible et l'enzyme peut être réactivée via un échange thiolate-disulfure en présence d'une molécule cible présentant une fonction thiol R-SH. Une fois réactivée, l'enzyme MGL va alors produire en présence de son substrat du CH_3SH , qui va à son tour réactiver d'autres MGL*, initiant ainsi une réactivation en chaîne. Lors de ce processus, CH_3SH catalyse donc indirectement sa propre production, d'où la nature exponentielle de l'amplification proposée. Avec cette méthode de réactivation enzymatique autocatalytique, il est possible de venir détecter visuellement jusqu'à 50 nM de DTT.

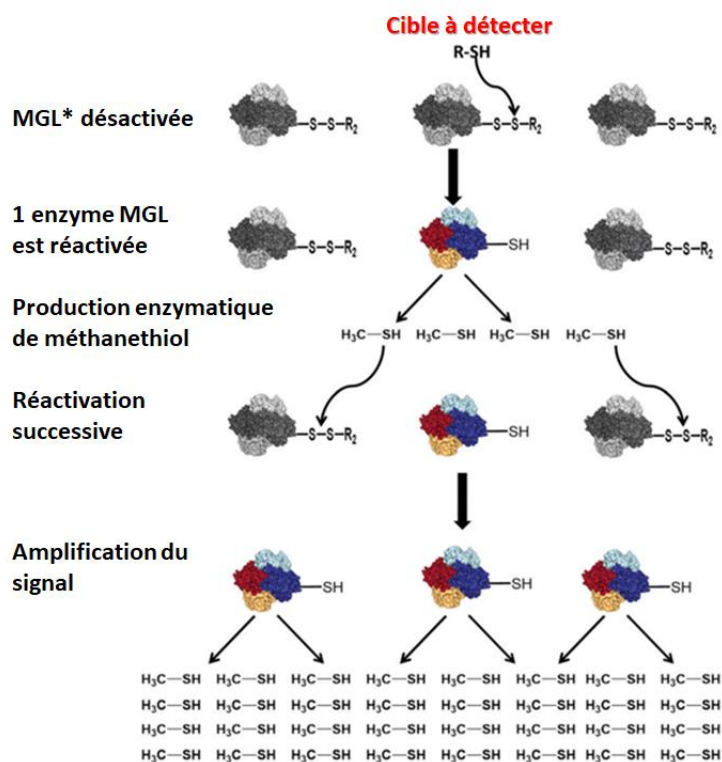


Figure 1-15 : Schéma du mécanisme autocatalytique de la réaction en chaîne de la méthionase. En gris la MGL* désactivée, en couleur la MGL activée. Figure extraite de la référence ³⁴.

3.2. Amplification exponentielle du signal par des réactions dendritiques en chaîne

Une autre stratégie élégante d'amplification exponentielle du signal repose sur l'utilisation de sondes permettant des réactions dendritiques en chaîne (DCR). Ce type de réaction autocatalytique tire parti du désassemblage d'un composé dendrimérique par autoimmolation³⁵⁻³⁶ en réponse à sa réaction avec une cible donnée comme illustré **Figure 1-16**.

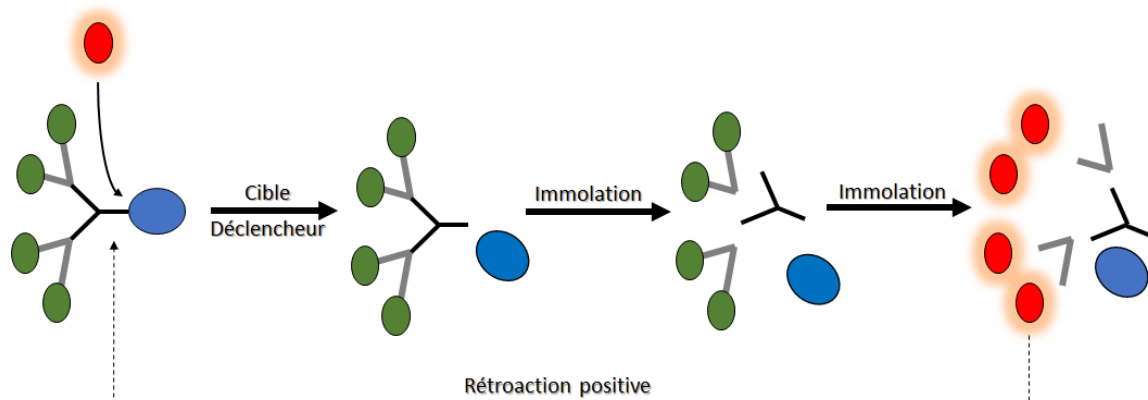


Figure 1-16 : Schéma conceptuel d'une réaction dendritique en chaîne d'une sonde dendritique autoimmolante. En bleu est représenté le groupement déclenchant, en vert les déclencheurs inactifs, et en rouge ces mêmes déclencheurs actifs après immolation complète de la sonde.

La molécule cible dans un premier temps clive la partie déclenchante de la sonde. Après ce clivage, la sonde dendrimère devient instable et par un principe d'autoimmolation libère en cascade ses groupements protecteurs. Ces groupements protecteurs sont en réalité la forme masquée de la cible. Une fois démasqués, ils deviennent eux-mêmes déclencheurs d'autres molécules sondes. Ainsi, pour une molécule cible au départ qui réagit avec une molécule sonde, ce sont plusieurs équivalents x de molécules cibles que l'on libère, avec x le nombre de groupements inactifs greffés sur la sonde. Cette méthode d'amplification exponentielle suit bien un schéma réactionnel autocatalytique. Nous allons voir ci-après deux exemples de systèmes DCR, l'un pour la détection de l'ion fluorure F^- et l'autre pour la détection de l'eau oxygénée.

3.2.1. Détection autocatalytique de l'ion fluorure par une réaction dendritique en chaîne

Le groupe de Shabat reporte en 2011 l'un des tous premiers exemples de réaction dendritique en chaîne pour la détection de l'ion fluorure F^- . Le principe est rappelé **Figure 1-17**. Il repose sur la réactivité de déprotection d'une sonde moléculaire dendritique **A** avec l'ion fluorure.

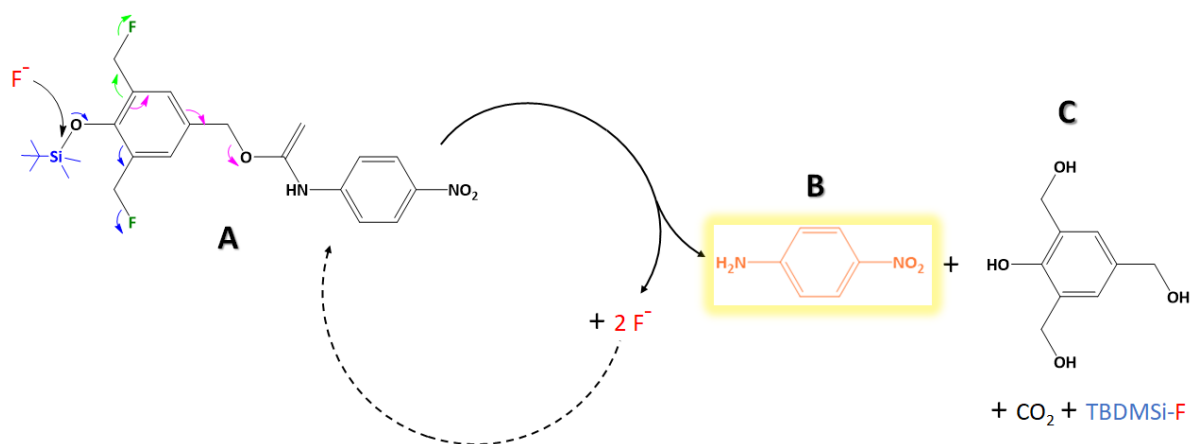


Figure 1-17 : Réaction dendritique en chaîne pour la détection d'ions fluorures par une réaction d'autoimmolation d'une sonde **A** par F^- , produisant 2 équivalents de F^- et 1 équivalent de **B** (4-nitroaniline).

Sur cette sonde est installé un groupement protecteur *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMSi) qui par réaction avec l'ion F^- peut être clivé pour générer un intermédiaire phénolique. Cette intermédiaire instable se dégrade alors *via* un processus intramoléculaire d'élimination 1:2, 1:4 et 1:6, en deux équivalents d'ions F^- , un équivalent de 4-nitroaniline (de couleur jaune), et différents sous-produits. Ainsi, à partir d'un seul ion F^- , la réaction permet d'en générer 2 autres qui à leur tour peuvent réagir et ainsi enclencher un processus d'autocatalyse dont le suivi peut se faire par spectroscopie UV-Visible en suivant à $\lambda = 400$ nm l'apparition de la 4-nitroaniline. La cinétique exponentielle de cette conversion est dépendante de la concentration initiale en ions F^- , plus elle est faible et plus le temps de conversion est long comme le montre la **Figure 1-18**.

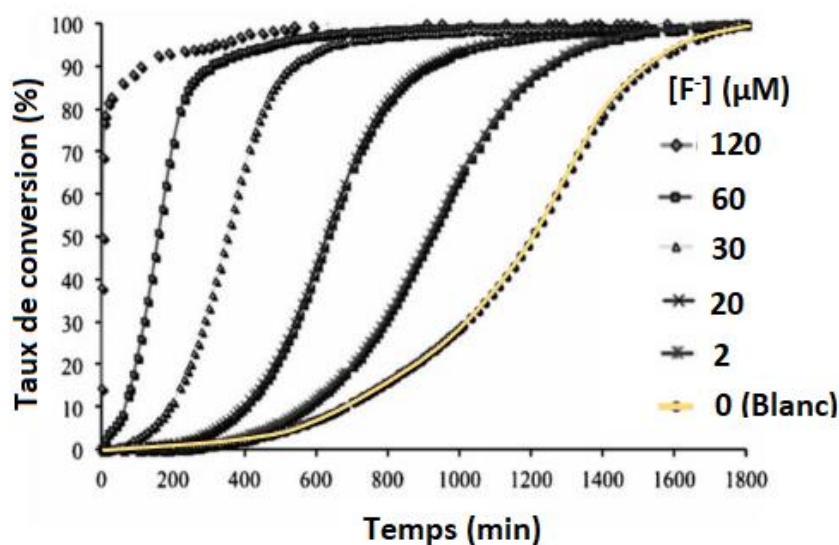


Figure 1-18 : Suivi par spectrophotométrie UV-Vis à $\lambda = 400$ nm de l'apparition du composé **B** par la DCR dans les conditions suivantes : $[A] = 500 \mu M$, solvant acétonitrile/DMSO (1:1), et addition de plusieurs concentrations en fluorure de tétrabutylammonium $[F^-]$: 120, 60, 30, 20, 2 ou $0 \mu M$.

Grâce à cette méthode, il est possible de détecter jusqu'à $2 \mu\text{M}$ d'ions F^- . Cette limite de détection est largement dictée par le signal non-spécifique que l'on obtient en l'absence d'ions F^- (blanc de la **Figure 1-18**) et qui traduit la capacité de la sonde à s'autoimmoler spontanément en l'absence d'ions F^- . Afin d'améliorer les performances analytiques de cette approche, le groupe d'Anslyn a publié en 2017 une méthode reposant sur un mélange de deux sondes dendritiques, une sonde **A** pour amplifier F^- et une sonde **B** pour détecter *via* la libération d'un composé fluorescent³⁸⁻³⁹. Le schéma réactionnel des deux DCR en cascade est présenté **Figure 1-19**. Dans un premier temps, l'amplification de F^- démarre avec la sonde **A** qui produit 6 équivalents de F^- et un indicateur colorimétrique sous forme de polymère. Puis, l'amplification se poursuit avec la sonde révélatrice **B** qui au contact des ions F^- amplifiés, libère 3 molécules fluorescentes par sonde révélatrice, suramplifiant ainsi le signal cette fois-ci fluorescent. Cependant, le système reste toujours limité par la réponse non-spécifique des sondes en l'absence d'ions fluorures, limitant donc les performances analytiques. Cette réponse non-spécifique est intrinsèque aux sondes dendritiques autoimmolantes, essentiellement liée à leur tendance à s'autoimmoler spontanément.

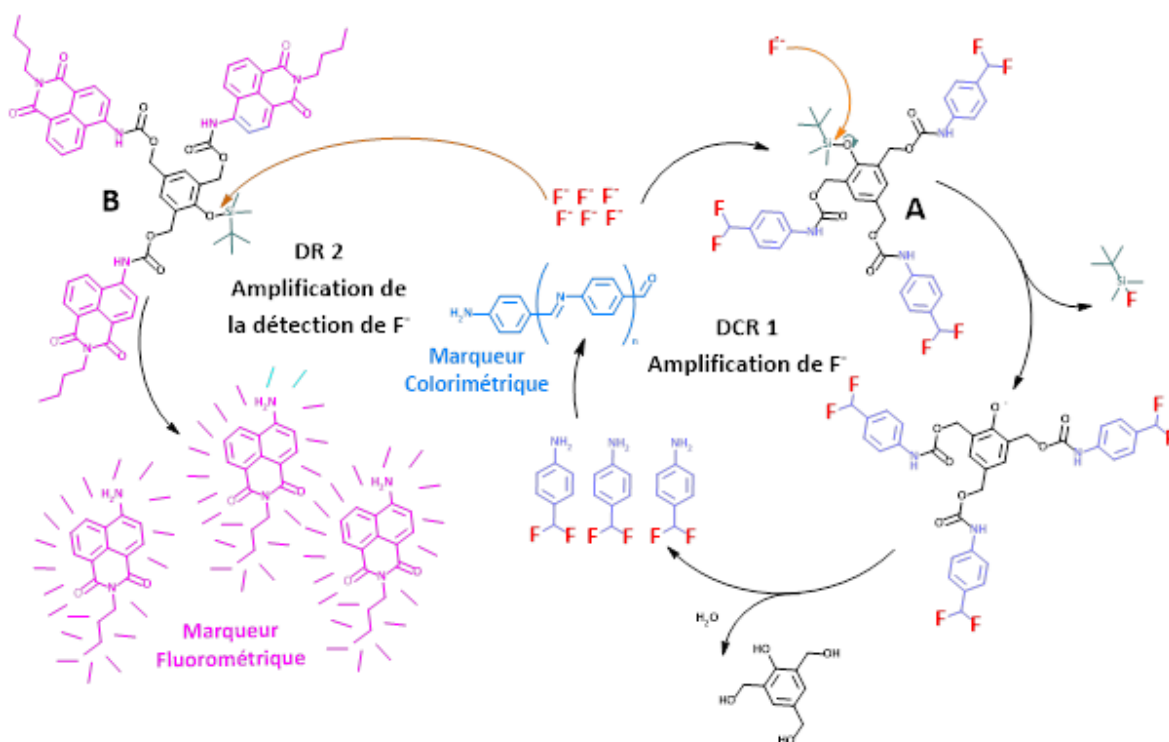


Figure 1-19 : Détection de l'ion fluorure par une réaction autocatalytique formée d'une cascade de deux réactions dendritique en chaîne, selon la référence³⁹.

3.2.2. Détection autocatalytique de l'eau oxygénée par une réaction dendritique en chaîne

En 2013, le groupe de Phillips publie une méthode autonome d'amplification exponentielle du signal en s'appuyant sur un concept DCR mettant en jeu une réaction de déprotection d'une sonde acide boronique par de l'eau oxygénée H_2O_2 ⁴⁰. Le principe de ce concept est représenté **Figure 1-20**. La sonde dendritique **A** une fois déprotégée par H_2O_2 permet la libération par élimination 1:6 et 1:4 de deux équivalents d'une 3-hydroxybenzohydroquinone, qui en présence d' O_2 dissous s'oxyde pour produire deux équivalents d' H_2O_2 . Ces derniers peuvent alors enclencher la déprotection de deux équivalents de sonde **A**, générant à leur tour quatre équivalents d' H_2O_2 , et ainsi de suite.

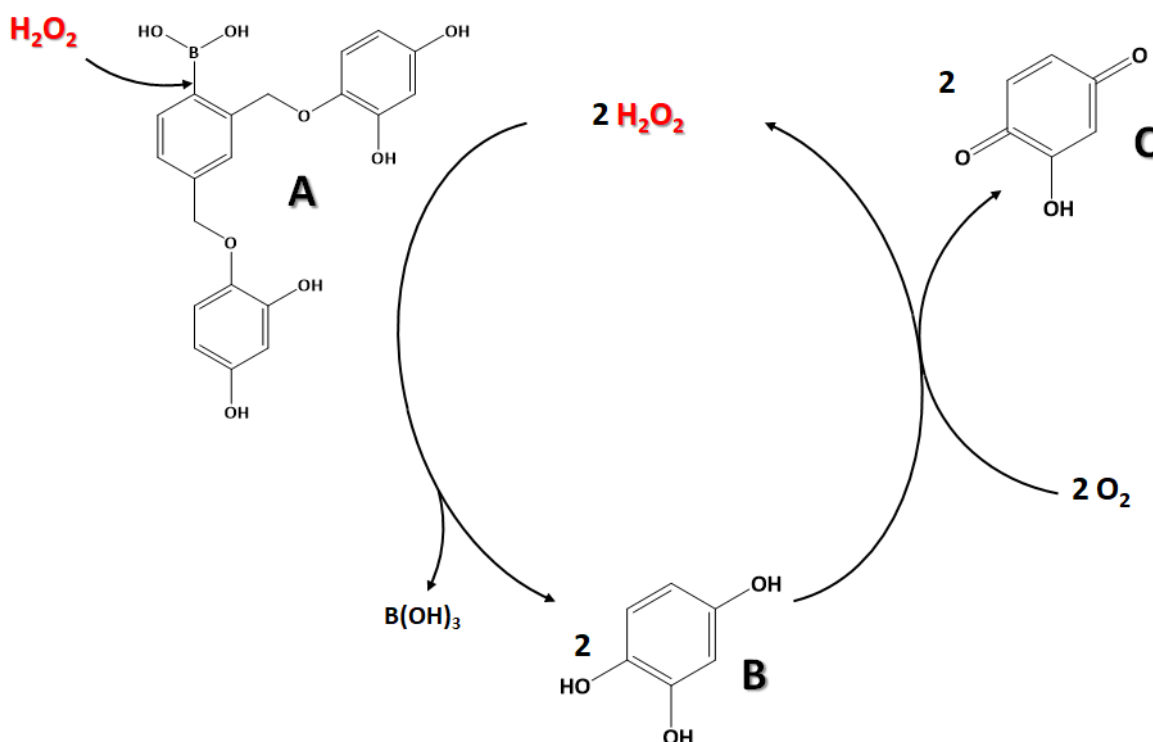


Figure 1-20 : Réaction autocatalytique induite par le clivage oxydatif d'un acide boronique d'une sonde dendrimérique **A** par H_2O_2 , entraînant le relargage par autoimmolation de deux équivalents d'un dérivé hydroquinone **B**, qui s'auto-oxyde en présence d' O_2 en la quinone correspondante **C**, formant 2 nouveaux équivalents d' H_2O_2 . Figure inspirée de la référence ⁴⁰.

A chaque cycle représenté **Figure 1-20**, pour chaque molécule d' H_2O_2 consommée deux sont produites, ce qui conduit à un mécanisme d'autocatalyse dans lequel H_2O_2 catalyse sa propre formation. La quinone **C** produite étant colorée, on peut alors suivre la cinétique de cette réaction par une simple mesure de spectroscopie UV-vis. La durée à partir de laquelle l'absorbance croît de manière exponentielle permet de quantifier H_2O_2 . Cependant, les performances analytiques de ce système ne sont pas très bonnes puisqu'elles ne permettent la détection que de 0.1 équivalent d' H_2O_2 par rapport à la sonde en environ 4 heures. Le faible facteur d'amplification (facteur environ 10), est dû à une réponse non-spécifique très importante en l'absence d' H_2O_2 .

Une alternative à cette approche a été proposée par le groupe de Shabat en 2012⁴¹. Le schéma de principe de cette DCR est rappelé **Figure 1-21**. Il repose sur la même réactivité des acides boroniques vis-à-vis d' H_2O_2 , mais cette fois-ci en catalysant la réplique d' H_2O_2 par une glucose oxydase (GOx) en présence de glucose et d' O_2 .

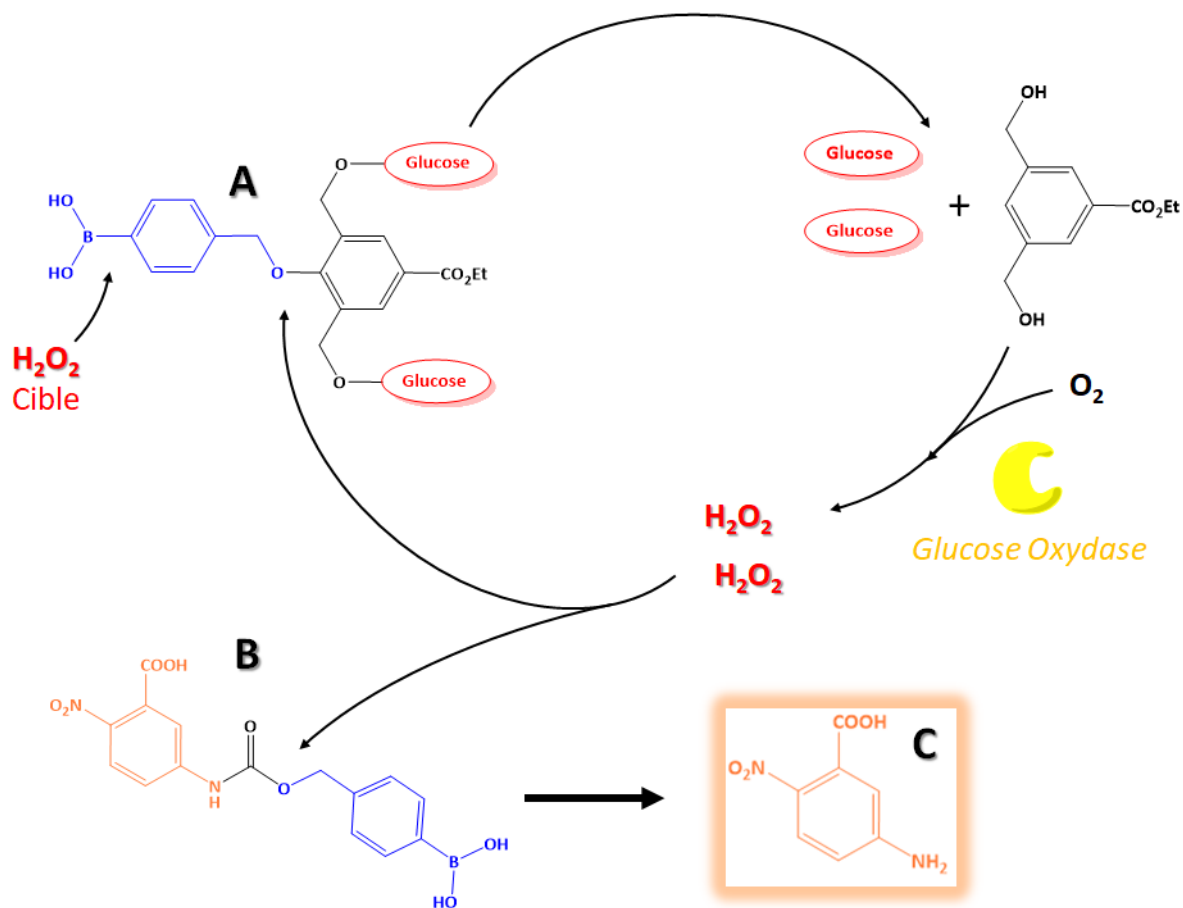


Figure 1-21 : Réaction autocatalytique induite par le clivage oxydatif d'un acide boronique d'une sonde dendrimérique **A** par H_2O_2 , entraînant le relargage par autoimmolation de deux équivalents de glucose, entraînant la réduction enzymatique d' O_2 en H_2O_2 en présence de l'enzyme glucose oxydase. Les H_2O_2 produits permettent soit la déprotection d'une nouvelle sonde **A**, soit oxyder la liaison bore de la sonde **B**, entraînant la libération par autoimmolation d'un composé coloré **C** (acide 5-amino-2-nitrobenzoïque). Figure inspirée de la référence ⁴¹.

La sonde autoimmolante **A** est constituée d'un groupement protecteur (en bleu) qui réagit sélectivement avec H_2O_2 . La sonde libère ainsi deux équivalents de glucose, lesquels sont ensuite convertis *via* la GOx en deux équivalents d' H_2O_2 . Ces deux équivalents sont alors susceptibles de réagir avec deux autres équivalents de sonde **A** (créant ainsi 4 H_2O_2 à l'issue de ce nouveau cycle) ou avec la deuxième sonde **B** révélatrice, ce qui a pour effet de libérer le composé **C** coloré. Le suivi cinétique de l'apparition du composé **C** (acide 5-amino-2-nitrobenzoïque) au cours du temps peut être aisément réalisé par spectrophotométrie UV-Vis à $\lambda = 405$ nm. Dans ces conditions, une détection jusqu'à $5 \mu M$ d' H_2O_2 est possible après environ 4 heures de réaction. Les performances

analytiques sont encore une fois limitées par l'autoimmolation spontanée de la sonde **A** en l'absence d' H_2O_2 .

Afin de tenter d'améliorer les performances analytiques, d'autres dérivés de la sonde **A** comportant jusqu'à 6 molécules de glucose par sonde ont été synthétisés par le même groupe⁴¹. Cependant, cette approche n'a pas été récompensée en termes de limite de détection, car les cinétiques spécifiques et non-spécifiques de la DCR ont été accélérées d'un même facteur.

3.3. Amplification du signal par autocatalyse photorédox

En 2021, le groupe de Sikes⁴²⁻⁴³ propose un concept original de réaction autocatalytique photorédox reposant sur l'amplification exponentielle de l'éosine Y (EY^{2-}), un photocatalyseur sensible à la lumière visible et ultraviolette, générateur d'espèces réactives de l'oxygène (O_2^- , H_2O_2 ...). Le mécanisme de cette autocatalyse photorédox est représenté **Figure 1-22**.

L'amplification de EY^{2-} est initié dans un premier temps par son excitation photochimique en un état triplet $^3[\text{EY}^{2-}]^*$ induite par une lumière verte. Cet état excité peut alors soit se relaxer en présence d' O_2 avec production concomitante d'un équivalent d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, soit réagir avec la forme réduite de l'éosine Y, EYH^{3-} , initialement présente et produire 2 équivalents du radical EY^{3-} par comproportionnement. Celui-ci peut s'oxyder en présence d' O_2 et reformer à chaque fois un équivalent d' EY^{2-} . Ainsi, si l'état excité $^3[\text{EY}^{2-}]^*$ choisit le chemin réactionnel avec EYH^{3-} , deux équivalents de EY^{2-} sont produits *in fine* au cours d'un cycle, qui peuvent être à nouveau excités par la lumière verte, entrant dans un nouveau cycle. Le composé EY^{2-} est donc un photocatalyseur de sa propre formation, rendant la réaction photorédox autocatalytique. Formellement, et même si ce n'est pas décrit comme cela par les auteurs, ce schéma réactionnel est similaire à un schéma d'auto-oxydation d'une hydroquinone dans lequel la comproportionnement serait photoactivée.

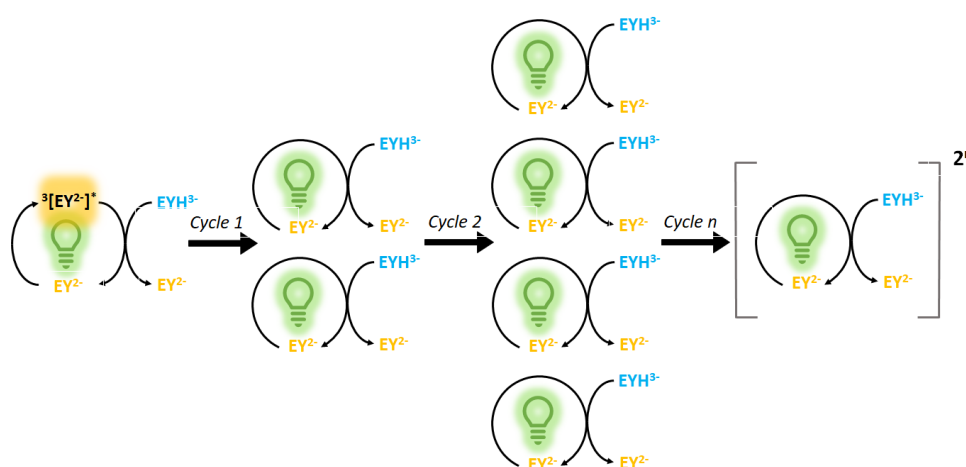


Figure 1-22 : Principe simplifié de l'amplification exponentielle de EY^{2-} par autocatalyse photorédox au cours de n cycles. Figure inspirée de la référence ⁴².

Le suivi cinétique de cette réaction autocatalytique photorédox peut se faire facilement par spectroscopie UV-Vis, en suivant notamment l'apparition exponentielle de EY^{2-} à $\lambda_{\max} = 535$ nm. Il est possible d'amplifier la concentration en EY^{2-} par un facteur 500 en seulement 900 secondes. Cela conduit à une limite de détection en EY^{2-} de seulement 10 nM. Le spectrophotomètre utilisé ne pouvant pas détecter EY^{2-} en dessous de 50 nM, cette méthode d'amplification permet donc d'améliorer significativement la sensibilité de la détection de l'éosine Y. Il est possible de coupler cette amplification exponentielle d' EY^{2-} avec la polymérisation photoinduite d'un monomère 3,3'-diaminobenzidine, permettant ainsi une visualisation à l'œil nue de l'amplification autocatalytique. Il a également été montré par le groupe de Sikes que l'on pouvait exploiter cette stratégie d'amplification du signal à des fins bioanalytiques. Cela a été notamment démontré dans le cadre d'un immunodosage dédié à la détection d'une protéine du SARS-CoV-2, conduisant alors à un gain d'amplification du signal par un facteur 30 par rapport à une approche ELISA classique⁴².

3.4. Réaction autocatalytique basée sur un mécanisme de catalyse croisée

En 2019, l'équipe du Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire a décrit un nouvel exemple de réaction autocatalytique reposant sur l'activation croisée de deux boucles redox catalytiques, chacune produisant le catalyseur de l'autre boucle.^{44,45} Ces travaux ont donné lieu jusqu'à présent à trois thèses (Charlie Rabin⁴⁶, Justine Pallu⁴⁷ et Pan Hui⁴⁸).

Le principe de cette méthode est illustré schématiquement **Figure 1-23** dans le cadre de la sonde naphthol monoester boronique 4-DBN, étudiée par Justine Pallu au cours de sa thèse.

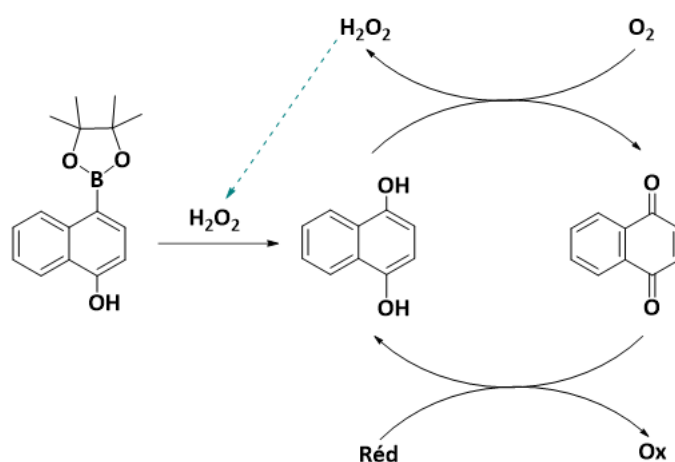
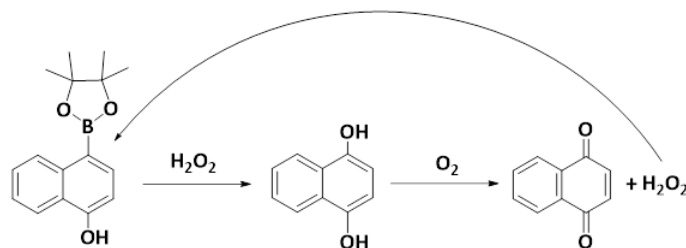


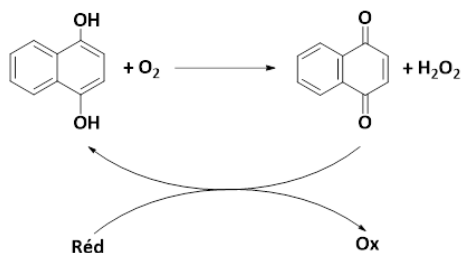
Figure 1-23 : Réaction autocatalytique par catalyse croisée déclenchée par H_2O_2 en présence de la sonde 4-DBN, d' O_2 , et d'un réducteur, d'après la référence⁴⁷.

La première boucle catalytique (boucle 1 réécrite ci-dessous) consiste en une déprotection catalytique de la sonde 4-DBN par H_2O_2 , ce qui permet de libérer la 1,4-naphthohydroquinone (1,4-

NQH₂) qui rapidement en présence d'O₂ dissous s'oxyde en 1,4-naphthoquinone (1,4-NQ) et en même temps régénère d'H₂O₂.



La deuxième boucle quant à elle (boucle 2 réécrite ci-dessous) repose sur un principe de recyclage redox dans lequel le couple 1,4-naphthoquinone/1,4-naphthohydroquinone joue un rôle de médiateur redox avec d'un côté une réaction d'oxydation de la 1,4-NQH₂ par O₂ en 1,4-NQ pour produire H₂O₂, et de l'autre une réaction de réduction de la 1,4-NQ en 1,4-NQH₂ *via* un réducteur chimique ou enzymatique.



Ainsi, la boucle 1 produit une naphthohydroquinone catalyseur de la boucle 2, tandis que la boucle 2 produit H₂O₂ catalyseur de la boucle 1. En combinant ces deux boucles (**Figure 1-23**), les deux catalyses se croisent ce qui a pour effet d'induire un processus autocatalytique.

Comme agent réducteur, l'enzyme diaphorase en présence de son substrat NADH ont été utilisés. Le graphe A de la **Figure 1-24** montre l'allure de courbes cinétiques obtenues à partir de différentes concentrations initiales en H₂O₂ et en suivant l'absorbance du NADH à une longueur d'onde de $\lambda = 340$ nm. Les courbes en S sont caractéristiques d'une réaction catalytique, avec une phase de latence d'autant plus longue que la concentration initiale en H₂O₂ est faible. Si l'on reporte le temps $t_{1/2}$ auquel l'absorbance du NADH a diminuée de moitié en fonction du logarithme de la concentration initiale en H₂O₂, on obtient une courbe de calibration en H₂O₂ qui s'étend sur un peu plus de 2 décades (**Figure 1-24B**). Il est ainsi possible de détecter jusqu'à 150 nM d'H₂O₂ pour une durée de réaction d'environ 10 minutes. Les performances analytiques de ce système restent néanmoins limitées par la réponse non-spécifique que l'on observe en l'absence d'H₂O₂ (courbe noire de la **Figure 1-24A**). Cette réponse non-spécifique a été démontrée comme étant le résultat d'un manque de stabilité de la sonde 4-DBN⁴⁷.

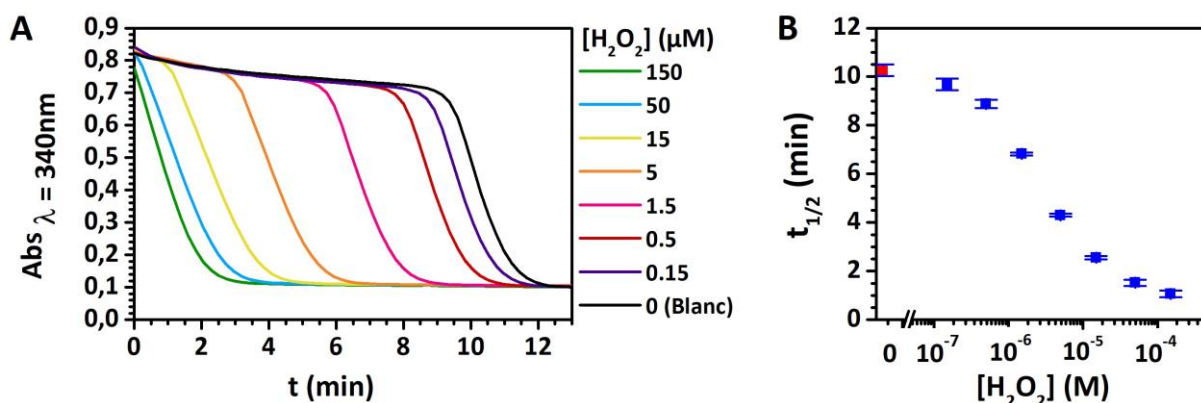
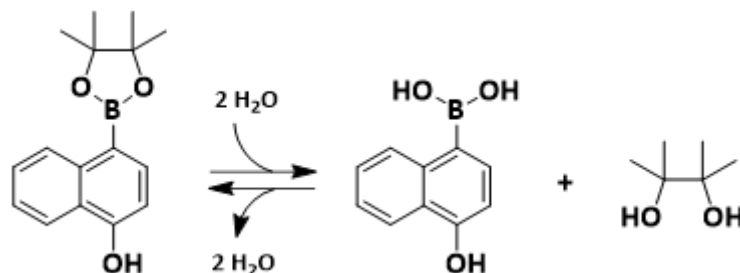


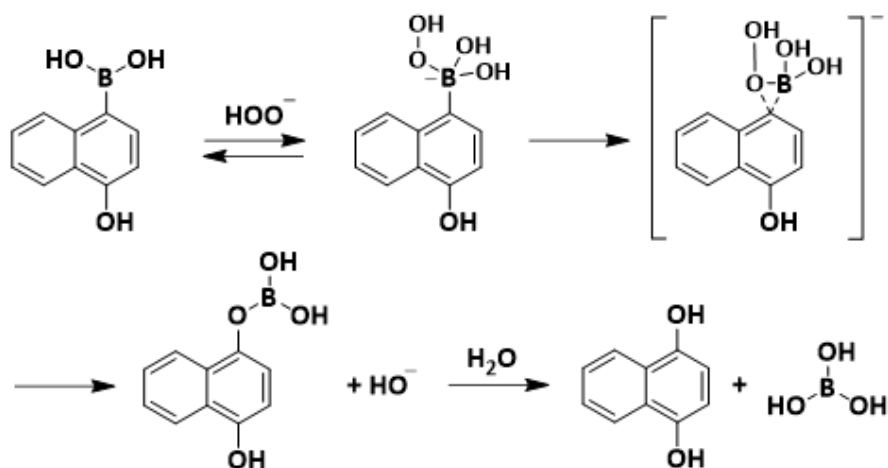
Figure 1-24 : (A) Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à 340nm de la réaction entre 50 μM de la sonde 4-DBN et une gamme de concentration de H₂O₂, en présence de 10 nM DI et 250 μM NADH dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 8.5. [H₂O₂] (μM) : en vert 150, en bleu 50, en jaune 15, en orange 5, en rose 1.5, en rouge 0.5, en violet 0.15 et en noir 0 (blanc). **(B)** Courbe de calibration semi-logarithmique obtenu en relevant les t_{1/2} en A (correspondant au temps pour atteindre 0.4 d'absorbance) en fonction du log de [H₂O₂].

Il est important de noter que plusieurs types de réactivités sont en jeu et peuvent donc plus ou moins impacter le processus d'autocatalyse :

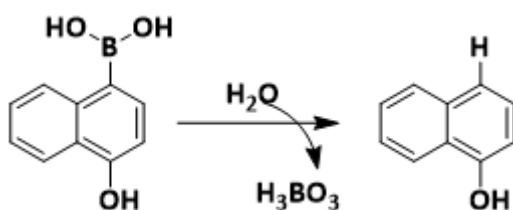
- **Hydrolyse de l'ester pinacol** : la sonde 4-DBN est initialement solubilisée dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) dans laquelle elle reste stable. En revanche, dès que l'on procède à sa dilution dans un tampon aqueux, la fonction pinacol de l'ester boronique s'hydrolyse rapidement selon la réaction suivante ⁴⁹ :



- **Clivage oxydatif de l'acide boronique par H₂O₂** : la réaction de déprotection d'un acide (ou ester) boronique par H₂O₂ est une réactivité connue depuis les années 1930⁵⁰. Le mécanisme a été décrit par Kuivila en 1954⁵¹⁻⁵⁵. Il consiste en une réaction de coupure oxydative de la liaison C-B via l'attaque nucléophile de la forme déprotonnée d'H₂O₂, soit HOO⁻. Ainsi, la cinétique de cette réaction est d'autant plus rapide que le pH est élevé. Le mécanisme de transformation de la sonde 4-DBN en 1,4-naphthohydroquinone peut donc être décrit selon le schéma réactionnel suivant :

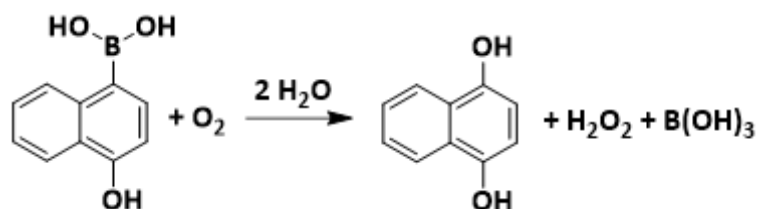


- **Réaction de protodéboronation** : une réaction secondaire bien connue des acides boroniques aromatiques est leur protodéboronation qui conduit en milieu aqueux à l'élimination de la fonction boronique par protonation du cycle aromatique⁵¹⁻⁵⁵. Dans le cas de la sonde 4-DBN on peut donc avoir la réaction secondaire suivante :



Il est important de noter que cette réactivité est plutôt lente et qu'elle n'a pas d'influence significative sur le processus autocatalytique dans la mesure où le produit qui en résulte, le 1-naphthol, ne peut s'auto-oxyder et induire la formation d' H_2O_2 .

- **Oxydation de l'acide monoboronique par O_2** : dans le travail e thèse de Justine Pallu il a été montré que la sonde 4-DBN pouvait se dégrader lentement en 1,4-NQ une fois diluée dans un tampon aqueux et que cette instabilité chimique résultait d'une réaction lente d'oxydation par l' O_2 dissous de la liaison carbone-bore selon la réaction supposée suivante :



Cette réaction de dégradation non-spécifique est bien entendu problématique car elle conduit à déclencher de manière non-souhaité la réaction d'autocatalyse.

- **Réaction d'auto-oxydation de la 1,4-naphthohydroquinone et réduction enzymatique de la 1,4-NQ** : ces deux réactivités complexes (la première impliquant une réaction radicalaire en chaîne et la seconde une réduction enzymatique de type ping-pong) mais clés du processus ont bien évidemment une influence déterminante sur l'autocatalyse. Elles seront présentées et étudiées plus en détails au chapitre 3.

Pour tenter d'améliorer les performances de ce nouveau concept de réaction autocatalytique, plusieurs types de réducteurs chimiques (acide ascorbique, DTT) et enzymatiques (couples PQQ-glucose déshydrogénase/glucose, FAD-glucose déshydrogénase/glucose, diaphorase/NADH) ont été examinés. Jusqu'à présent c'est le système de réduction enzymatique diaphorase/NADH qui s'est révélé conduire aux meilleures performances analytiques. D'autre part, différentes sondes esters boroniques ont été imaginées puis synthétisées, avec notamment comme objectif d'en concevoir des plus stables. C'est ainsi que les sondes ester boroniques doublement masquées de la **Figure 1-25** ont été conçues et étudiées^{47,48}.

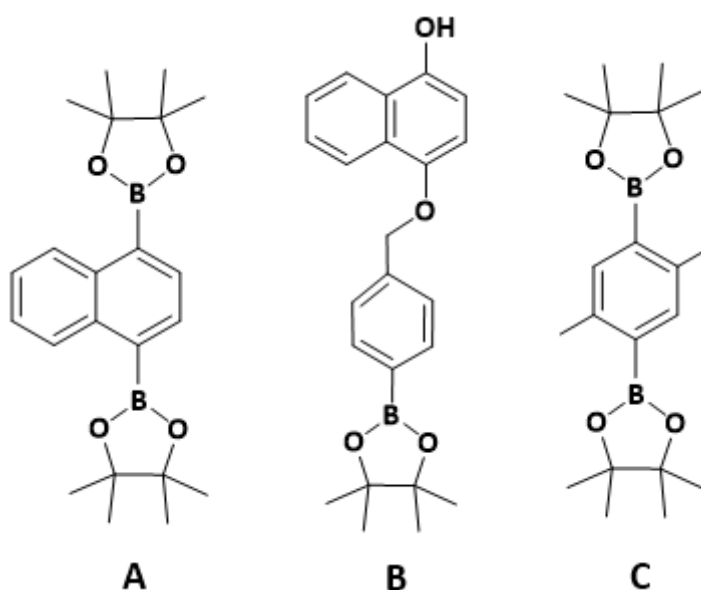


Figure 1-25 : différentes sondes utilisées pour la réaction autocatalytique

Grâce à cet ingénierie moléculaire les réactions autocatalytiques basés sur de la chimie moléculaire sont donc intrinsèquement plus modulables que les réactions autocatalytiques inorganiques.

4. Schémas autocatalytiques basés sur des réactions électrochimiques

Comme l'un des objectifs de ce travail vise à exploiter l'électrochimie comme un mode à la fois de lecture d'un processus autocatalytique mais aussi d'activation de ce processus, nous allons voir dans cette dernière partie introductive quelques-uns des rares exemples de réactions autocatalytiques mises en évidence dans un contexte d'électrochimie. Parmi ces exemples, nous pouvons citer la réduction de l'acide nitrique dont le mécanisme a fait l'objet de nombreux papiers^{56,57,58,59} et dans lequel HNO_2 agit comme catalyseur de sa propre formation, la réaction d'électro-oxydation du CO sur une électrode de platine⁶⁰, l'électrodéposition de dendrites de zinc induisant des oscillations non linéaires⁶¹, la réduction autocatalytique d' H_2O_2 sur électrode d'argent⁶², et la réduction des halogénures d'alkyles⁶³ qui donnent lieu à des voltamogrammes présentant des croisements caractéristiques de phénomènes d'autoactivation⁶⁴. Examinons plus en détails ces trois derniers exemples.

4.1. Mécanisme autocatalytique lors de la réduction de Zn^{2+} en milieu non tamponné

Lors de l'électrodépôt de certains métaux, comme le zinc, l'étain ou le cadmium, on observe parfois des oscillations de courant (pour des dépôts potentiostatiques) ou de potentiel (pour des dépôts galvanostatiques). Dans le cas du dépôt dendritique de Zn, plusieurs mécanismes à l'origine de ces oscillations ont été proposées, et certains se justifient par une réactivité autocatalytique. En 2002, l'équipe de Nakato observe des oscillations de courant lors du dépôt de zinc sur une surface conductrice rugueuse. Ce comportement est attribué à mécanisme autocatalytique, dans lequel l'augmentation de surface au cours du dépôt accélère la cinétique⁶⁵. En 1993, l'équipe de Kuhn décrit une rythmicité au cours de l'électrodépôt en couche mince de dendrites de zinc dans des conditions acides⁶¹. La réaction est réalisée dans un réacteur électrochimique à 2 électrodes de type couche mince (CM). L'évolution typique de la différence de potentiel entre l'anode et la cathode lors d'un dépôt en CM est présentée **Figure 1-26**.

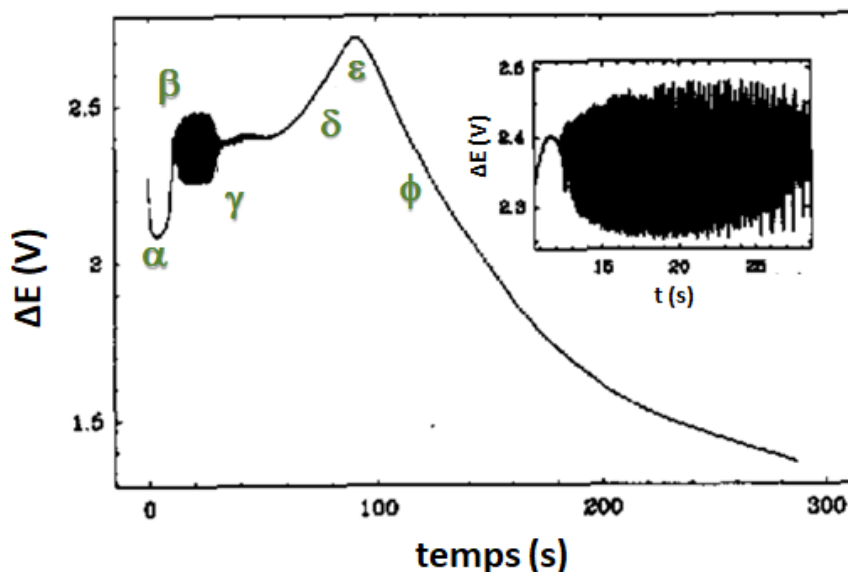


Figure 1-26 : Evolution au cours du temps de la différence de potentiel ΔE (en V) entre l'anode et la cathode au cours de l'électrodépôt de Zn en couche mince dans les conditions suivantes : $[\text{ZnSO}_4] = 0.2 \text{ mol.L}^{-1}$, $j = 60 \text{ mA.cm}^{-2}$, $L = 5.7 \text{ mm}$, $d = 0,3 \text{ mm}$, $W = 40 \text{ mm}$, à pH 5.6. Figure extraite de la référence ⁶¹.

L'évolution de ΔE en fonction du temps lors de l'électrodépôt se décline en 4 phases, c'est-à-dire une première phase d'augmentation entre α et β , suivi d'une phase d'oscillation entre β et γ d'une seconde phase d'augmentation entre γ et ϵ , et enfin d'une phase de diminution continue entre ϵ et ϕ . Pour expliquer cette rythmicité au cours de l'électrodépôt en couche mince, l'équipe de Kuhn proposent un mécanisme qui repose sur une compétition entre la consommation locale des ions Zn^{2+} et la réduction des protons qui augmente localement le pH. Cette basification locale entraîne la formation de Zn(OH)_2 qui favorise alors la réduction des protons au détriment de la réduction des ions Zn^{2+} , entraînant un boost de consommation locale des protons. Cette autoactivation par la basification peut être considérée comme le vecteur de l'autocatalyse. Ensuite, quand la concentration en H^+ n'est plus suffisante pour entretenir cette autocatalyse, Zn(OH)_2 est alors préférentiellement réduit en Zn métal puisqu'il n'y a plus de compétition avec la réduction des protons, ce qui a pour effet de réacidifier localement et donc d'entraîner la mise en place d'un nouveau cycle d'activation. C'est ce phénomène qui est à l'origine des oscillations, ces-dernières s'arrêtant lorsque la concentration des protons n'est plus suffisante pour limiter la formation de Zn(OH)_2 . Une représentation algorithmique du mécanisme est décrite en **Figure 1-27**.

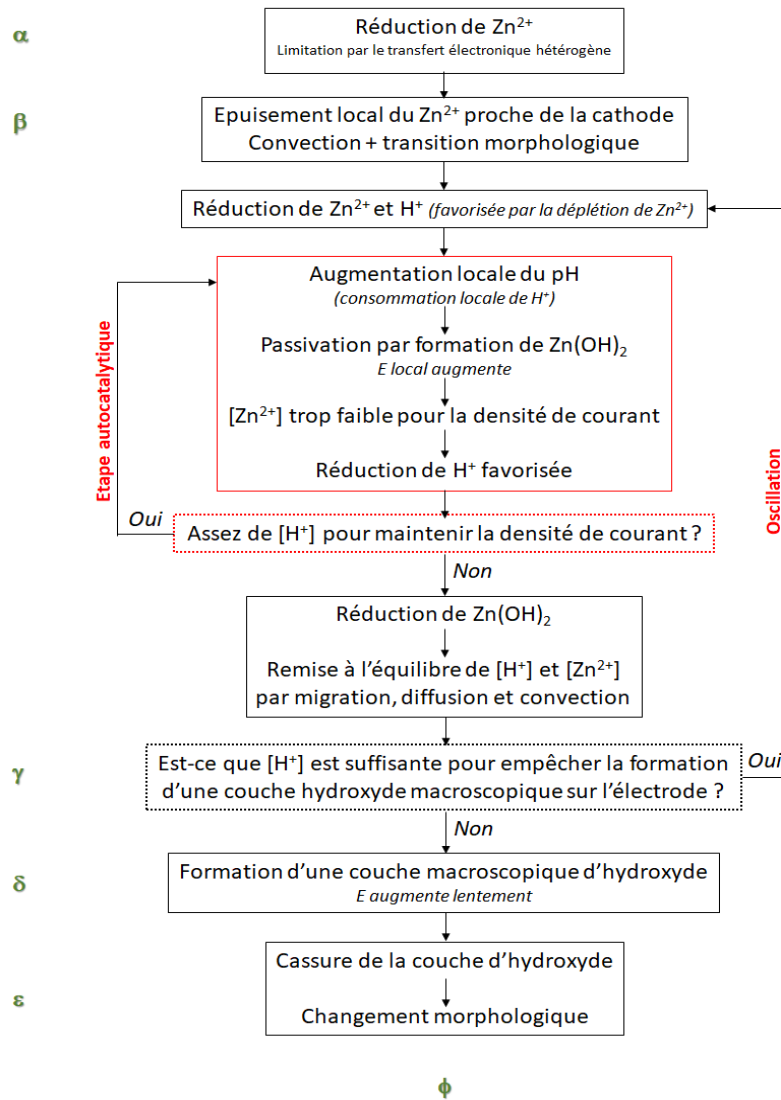


Figure 1-27 : Algorithme proposé par Kuhn pour expliquer la rythmicité observée lors de l'électrodépôt de zinc. Figure inspirée de la référence ⁶¹.

4.2. Réduction autocatalytique d'H₂O₂ sur électrode d'argent en milieu acide

En 1999, l'équipe de Doblhofer décrit le mécanisme d'un comportement singulier de la réduction d'H₂O₂ sur une électrode d'argent en milieu acide⁶². La **Figure 1-28** montre deux scans successifs en voltamétrie cyclique. Le premier scan présente un pic anodique vers 0 V correspondant à l'oxydation d'Ag en Ag⁺, puis au scan retour un pic « normal » de réduction d'H₂O₂. Sur le balayage retour du second scan, un pic de réduction à -0.1 V (vs. Hg/Hg₂SO₄) apparaît, formant un croisement avec le scan aller. Ce nouveau pic singulier, qui n'était pas présent au premier scan, est attribué par les auteurs à une activation autocatalytique de la réduction d'H₂O₂ à un potentiel plus anodique.

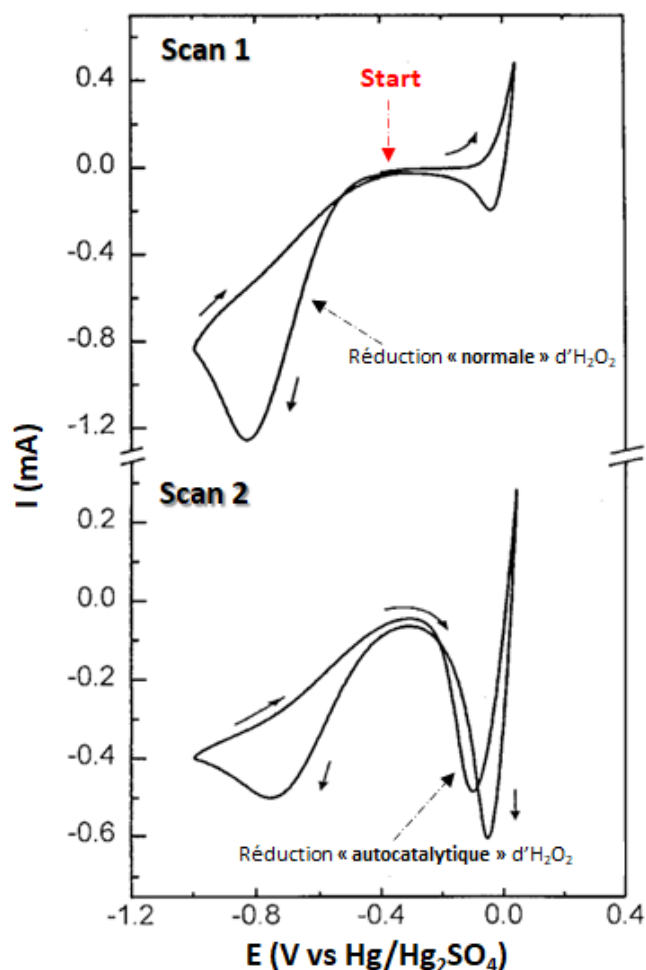
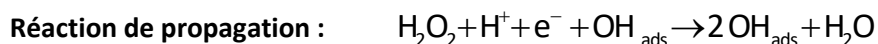
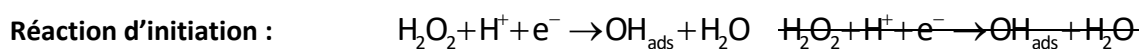


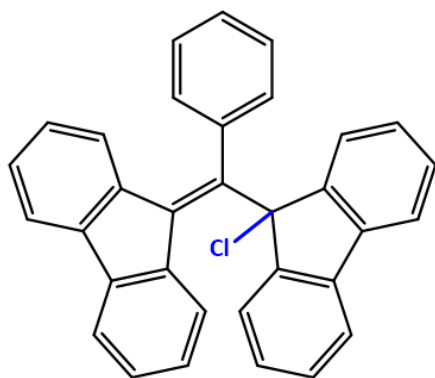
Figure 1-28 : Voltamétrie cyclique de 0.02 mol.L^{-1} d' H_2O_2 sur électrode d'argent, électrolyte support HClO_4 à 0.1 mol.L^{-1} . Vitesse de balayage de 100 mV.s^{-1} , surface de l'électrode de 0.28 cm^2 , électrode de référence $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4$ (MSE). En haut : scan numéro 1 ; en bas : scan numéro 2. Figure extraite de la référence ⁶².

Les auteurs attribuent l'origine du mécanisme autocatalytique à l'activation de la surface d'argent lors du premier scan, favorisant thermodynamiquement la réduction d' H_2O_2 à des potentiels plus anodiques. La formation d'hydroxydes à la surface de l'électrode d'Ag lors de la réduction d' H_2O_2 est suspectée d'être responsable de cette activation. En effet, les espèces chimisorbées de l'oxygène sont décrites comme affectant fortement les propriétés catalytiques de l'argent^{66,67} et d'être même aptes à catalyser la réduction d' H_2O_2 ^{68,69}. La formation d'un site OH_{ads} lors d'une réduction d' H_2O_2 devient alors catalyseur d'une prochaine réduction, créant ainsi 2 OH_{ads} , selon le schéma réactionnel autocatalytique suivant :



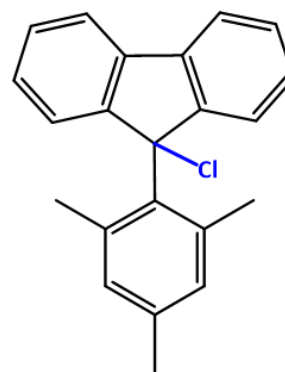
4.3. Etude par voltamétrie cyclique de la réduction électrochimique autocatalytique d'halogénures d'alkyles

En 1985, au Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire, Savéant et ses collaborateurs ont étudié par voltamétrie cyclique le clivage de la liaison carbone-halogène lors de la réduction des deux halogénures d'alkyles RX représentés ci-dessous⁶³.



(1)

9-chloro-9- $\{\alpha$ -(9-fluorenylidène)-benzyl}fluorène



(2)

9-chloro-9-mesitylfluorène

Comme le montrent les voltamogrammes de ces deux composés (**Figure 1-29**), des croisements sont observés entre le scan aller et retour. Ce comportement singulier a été démontré comme étant la signature d'une activation autoinduite de la cinétique de clivage de la liaison R-X. Cela concorde avec le fait que cette activation est d'autant plus visible (*i.e.* l'intensité de la réduction « activée » au scan retour est d'autant plus forte) que la concentration en RX est forte. Les auteurs ont également pu simuler ces données expérimentales à partir de la description cinétique d'un mécanisme mettant en jeu le radical stable R[•] et le carbanion R⁻ (voir **Figure 1-30**).

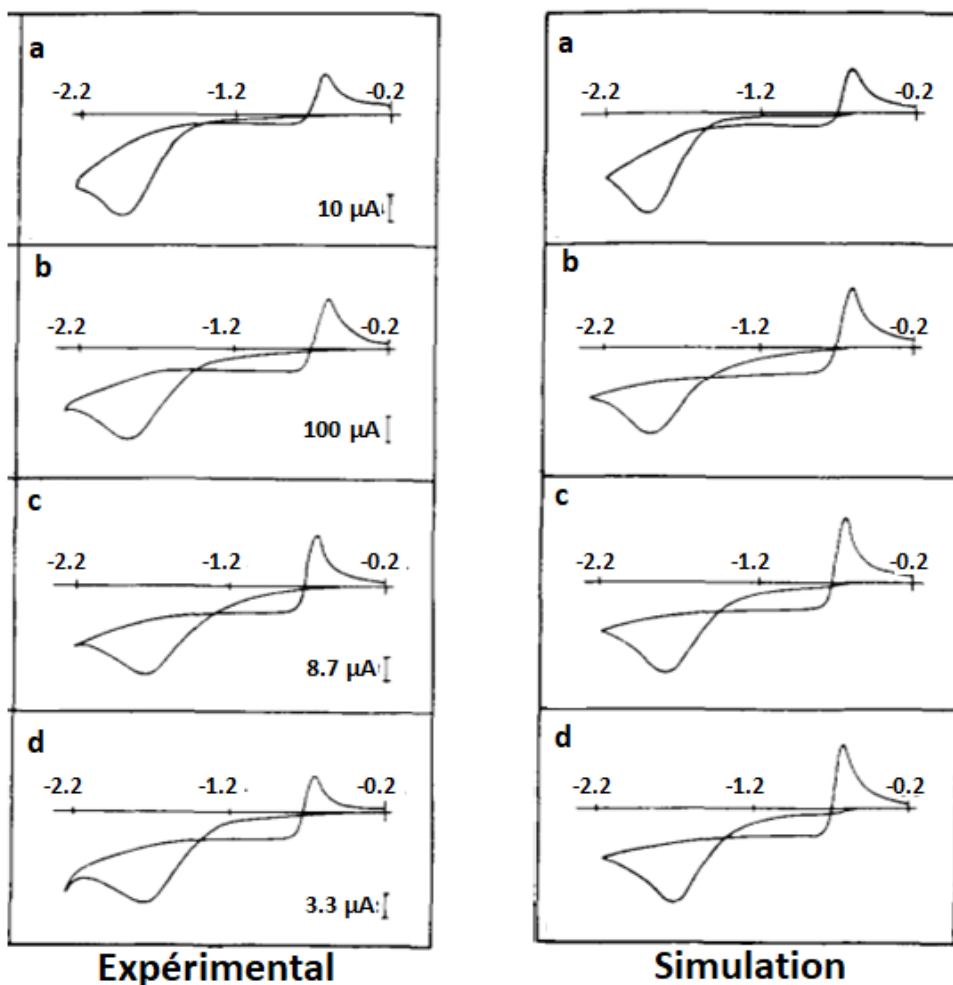


Figure 1-29 : Voltamétrie cyclique de la molécule (2) dans de l'acétonitrile, avec comme électrolyte support 0.1 M de NBu_4Cl , à 20°C. A gauche sont présentées les données expérimentales, et à droite les simulations correspondantes à partir du mécanisme présenté en **Figure 1-30**. [RX] (mM) / vitesse de balayage ($\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$) : (a) 0.5 / 0.5 ; (b) 0.5 / 5 ; (c) 0.1 / 0.9 ; (d) 0.05 ; 5.

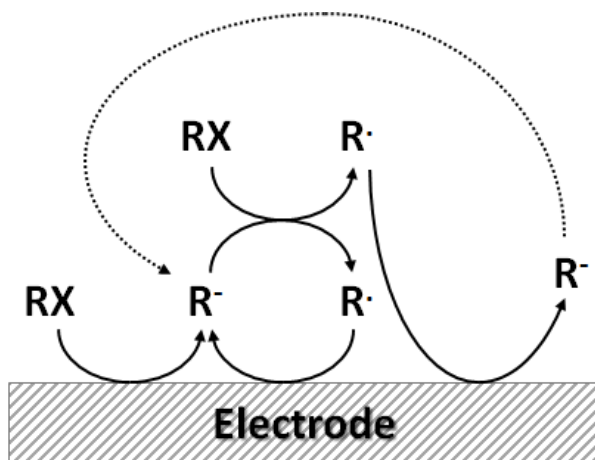


Figure 1-30 : Mécanisme électrochimique autocatalytique du clivage réductif de la liaison carbone – halogène pour (1) et (2) proposé par Savéant d'après la référence ⁶³.

Brièvement, l'halogénure d'alkyle RX peut être dissocié aux potentiels les plus cathodiques par une réduction à 2 électrons en carbanion correspondant. Ce carbanion, via son couple réversible R./R⁻, peut alors catalyser la réduction électrochimique de RX en radical R[•], ce dernier pouvant être réduit à 1 électron pour former un carbanion supplémentaire. Le carbanion est donc ainsi le catalyseur de sa propre production, ce qui correspond à un schéma autocatalytique. Au scan retour, la vitesse de réduction de RX est donc plus grande ce qui engendre un croisement avec le scan aller.

Cette réactivité de dissociation par transfert d'électron couplée à de l'autocatalyse a également été décrite pour d'autres types de liaison, comme pour les thiocyanates ou disulfides⁷⁰.

Au travers de ces quelques exemples, on voit bien que l'électrochimie peut dans certaines conditions conduire à des réactivités autocatalytiques, que ce soit *via* l'apparition d'oscillations ou des croisements entre les scans aller et retour de voltammogrammes. Ces phénomènes sont intéressants car on peut imaginer en tirer parti pour amplifier un signal dans un contexte analytique mettant en œuvre un mode de détection électrochimique.

5. Conclusion

Les méthodes d'amplifications exponentielles du signal sont une stratégie efficace pour pouvoir optimiser la détection d'espèces d'intérêts, en termes de temps de réponse et de sensibilité. La force de l'autocatalyse, est que l'observable n'est plus une valeur de mesure d'un appareil (absorbance, fluorescence, intensité du courant), mais un temps d'emballlement du système. Ainsi, cela permet de s'affranchir de la sensibilité de mesure des appareils par l'amplification exponentielle du signal. Les réactions autocatalytiques inorganiques, souvent basées sur de la chimie rédox, sont les premiers systèmes d'amplification exponentielle observés. S'ils permettent la détection d'espèces métalliques, leurs mécanismes sont souvent complexes, et il est difficile de les moduler pour une détection spécifique. Au contraire les réactions autocatalytiques basées sur de la chimie moléculaire, elles, permettent par la synthèse organique de sondes moléculaire de venir concevoir des systèmes d'amplification spécifiques. Cependant, l'instabilité de ces sondes limite les performances analytiques et il est important de concevoir des schémas autocatalytiques efficaces tant au niveau de la réactivité que de la stabilité des réactifs. Dans ce manuscrit, le cas de la catalyse croisée pour la détection amplifiée de peroxyde d'hydrogène sera exploré sous plusieurs approches. Dans un premier temps, une analyse formelle de la catalyse croisée sera présentée pour comprendre les facteurs clés des performances analytiques du système. Puis, des résultats de suivi cinétique impliquant une sonde intrinsèquement stable doublement masquée pour l'autocatalyse seront montrés et feront l'objet d'une analyse mécanistique et cinétique. Ensuite, un nouveau mode de suivi de la réaction autocatalytique électrochimique ainsi que l'influence sur la cinétique globale de sera exposé. Par la suite, la réduction enzymatique sera substituée par une réduction hétérogène à l'électrode afin d'activer et de suivre le système électrochimiquement. Enfin, une analyse thermodynamique des transferts de protons et d'électrons de la 1,4-NQ et l'application de cette analyse à la catalyse de réduction de l'oxygène sera discutée.

6. Références Bibliographiques

- (1) You, L.; Zha, D.; Anslyn, E. V. Recent Advances in Supramolecular Analytical Chemistry Using Optical Sensing. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (15), 7840–7892. <https://doi.org/10.1021/cr5005524>.
- (2) Koczula, K. M.; Gallotta, A. Lateral Flow Assays. *Essays Biochem.* **2016**, *60* (1), 111–120. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>.
- (3) Yang, X.; Tang, Y.; Alt, R. R.; Xie, X.; Li, F. Emerging Techniques for Ultrasensitive Protein Analysis. *The Analyst* **2016**, *141* (12), 3473–3481. <https://doi.org/10.1039/C6AN00059B>.
- (4) Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1986**, *51*, 263–273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>.
- (5) Zhao, Y.; Chen, F.; Li, Q.; Wang, L.; Fan, C. Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (22), 12491–12545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>.
- (6) Tan, E.; Erwin, B.; Dames, S.; Ferguson, T.; Buechel, M.; Irvine, B.; Voelkerding, K.; Niemz, A. Specific versus Nonspecific Isothermal DNA Amplification through Thermophilic Polymerase and Nicking Enzyme Activities †. *Biochemistry* **2008**, *47*, 9987–9999. <https://doi.org/10.1021/bi800746p>.
- (7) Van Ness, J.; Van Ness, L. K.; Galas, D. J. Isothermal Reactions for the Amplification of Oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (8), 4504–4509. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730811100>.
- (8) Liu, H.; Zhang, L.; Xu, Y.; Chen, J.; Wang, Y.; Huang, Q.; Chen, X.; Liu, Y.; Dai, Z.; Zou, X.; Li, Z. Sandwich Immunoassay Coupled with Isothermal Exponential Amplification Reaction: An Ultrasensitive Approach for Determination of Tumor Marker MUC1. *Talanta* **2019**, *204*, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.001>.
- (9) Mao, D.; Chen, T.; Chen, H.; Zhou, M.; Zhai, X.; Chen, G.; Zhu, X. PH-Based Immunoassay: Explosive Generation of Hydrogen Ions through an Immuno-Triggered Nucleic Acid Exponential Amplification Reaction. *Analyst* **2019**, *144* (13), 4060–4065. <https://doi.org/10.1039/C9AN00506D>.
- (10) Hanopolskyi, A. I.; Smaliak, V. A.; Novichkov, A. I.; Semenov, S. N. Autocatalysis: Kinetics, Mechanisms and Design. *ChemSystemsChem* **2021**, *3* (1), e2000026. <https://doi.org/10.1002/syst.202000026>.

- (11) Kalbus, G. E.; Lieu, V. T.; Kalbus, L. H. A Spectrophotometric Study of the Permanganate–Oxalate Reaction: An Analytical Laboratory Experiment. *J. Chem. Educ.* **2004**, *81* (1), 100. <https://doi.org/10.1021/ed081p100>.
- (12) Miles, B.; Nyarku, S. K. The Effects of Crown Ethers on the Rate of Oxidation of Oxalic Acid by the Permanganate Ion: An Integrated Senior Chemistry Experiment. *J. Chem. Educ.* **1990**, *67* (3), 269. <https://doi.org/10.1021/ed067p269>.
- (13) Kovács, K. A.; Gróf, P.; Burai, L.; Riedel, M. Revising the Mechanism of the Permanganate/Oxalate Reaction. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108* (50), 11026–11031. <https://doi.org/10.1021/jp047061u>.
- (14) Launer, H. F. THE KINETICS OF THE REACTION BETWEEN POTASSIUM PERMANGANATE AND OXALIC ACID. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54* (7), 2597–2610. <https://doi.org/10.1021/ja01346a003>.
- (15) Launer, H. F.; Yost, D. M. The Kinetics of the Reaction between Potassium Permanganate and Oxalic Acid. II. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56* (12), 2571–2577. <https://doi.org/10.1021/ja01327a013>.
- (16) Perez-Benito, J. F. Autocatalytic Reaction Pathway on Manganese Dioxide Colloidal Particles in the Permanganate Oxidation of Glycine. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (36), 15982–15991. <https://doi.org/10.1021/jp9014178>.
- (17) Andres, J. de; Brillas, E.; A. Garrido, J.; F. Perez-Benito, J. Kinetics and Mechanisms of the Oxidation by Permanganate of L -Alanine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1988**, *0* (2), 107–112. <https://doi.org/10.1039/P29880000107>.
- (18) Perez-Benito, J. F.; Arias, C.; Brillas, E. A Kinetic Study of the Autocatalytic Permanganate Oxidation of Formic Acid. *Int. J. Chem. Kinet.* **1990**, *22* (3), 261–287. <https://doi.org/10.1002/kin.550220306>.
- (19) Tanner, S. P. Autocatalysis by Cobalt(II) in the Reduction of Carbonatocobaltate(III) Complexes by Hydrazine in Aqueous Carbonate-Bicarbonate Solution. *Inorg. Chem.* **1978**, *17* (3), 600–606. <https://doi.org/10.1021/ic50181a016>.
- (20) Ishihara, M.; Endo, M.; Igarashi, S.; Yotsuyanagi, T. An Autocatalytic Constant Sensitivity Detection System for Catalysts and Infectioners. *Chem. Lett.* **1995**, *24* (5), 349–350. <https://doi.org/10.1246/cl.1995.349>.
- (21) Endo, M.; Abe, S.; Deguchi, Y.; Yotsuyanagi, T. Kinetic Determination of Trace Cobalt(II) by Visual Autocatalytic Indication. *Talanta* **1998**, *47* (2), 349–353. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00139-8](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00139-8).

- (22) Gerdts, C. J.; Sharoyan, D. E.; Ismagilov, R. F. A Synthetic Reaction Network: Chemical Amplification Using Nonequilibrium Autocatalytic Reactions Coupled in Time. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (20), 6327–6331. <https://doi.org/10.1021/ja031689l>.
- (23) Nagypal, I.; Epstein, I. R. Fluctuations and Stirring Rate Effects in the Chlorite-Thiosulfate Reaction. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90* (23), 6285–6292. <https://doi.org/10.1021/j100281a044>.
- (24) Metcalfe, G.; Ottino, J. M. Autocatalytic Processes in Mixing Flows. *Phys. Rev. Lett.* **1994**, *72* (18), 2875–2878. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.72.2875>.
- (25) Field, R. J.; Koros, E.; Noyes, R. M. Oscillations in Chemical Systems. II. Thorough Analysis of Temporal Oscillation in the Bromate-Cerium-Malonic Acid System. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (25), 8649–8664. <https://doi.org/10.1021/ja00780a001>.
- (26) Gyorgyi, Laszlo.; Turanyi, Tamas.; Field, R. J. Mechanistic Details of the Oscillatory Belousov-Zhabotinskii Reaction. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94* (18), 7162–7170. <https://doi.org/10.1021/j100381a039>.
- (27) Zhabotinsky, A. M. Belousov-Zhabotinsky Reaction. *Scholarpedia* **2007**, *2* (9), 1435. <https://doi.org/10.4249/scholarpedia.1435>.
- (28) Yatsimirskii, K. B.; Strizhak, P. E.; Ivaschenko, T. S. Potential of Chaotic Chemical Systems in Nanotrace Analysis Based on the Belousov—Zhabotinskii Reaction (BrO₃—Malonic Acid—Ferroun). Determination of Manganese(II). *Talanta* **1993**, *40* (8), 1227–1232. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(93\)80192-T](https://doi.org/10.1016/0039-9140(93)80192-T).
- (29) Gianneschi, N. C.; Nguyen, S. T.; Mirkin, C. A. Signal Amplification and Detection via a Supramolecular Allosteric Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (6), 1644–1645. <https://doi.org/10.1021/ja0437306>.
- (30) Semenov, S. N.; Belding, L.; Cafferty, B. J.; Mousavi, M. P. S.; Finogenova, A. M.; Cruz, R. S.; Skorb, E. V.; Whitesides, G. M. Autocatalytic Cycles in a Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (32), 10221–10232. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b05048>.
- (31) Goertz, J. P.; White, I. M. Peroxidyme-Amplified Radical Chain Reaction (PARCR): Visible Detection of a Catalytic Reporter. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (43), 13411–13415. <https://doi.org/10.1002/anie.201706163>.
- (32) Sun, X.; Anslyn, E. V. An Auto-Inductive Cascade for the Optical Sensing of Thiols in Aqueous Media: Application in the Detection of a VX Nerve Agent Mimic. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (32), 9522–9526. <https://doi.org/10.1002/anie.201704472>.

- (33) Lee, D.-H.; Valenzuela, S. A.; Dominguez, M. N.; Otsuka, M.; Milliron, D. J.; Anslyn, E. V. A Self-Degradable Hydrogel Sensor for a Nerve Agent Tabun Surrogate through a Self-Propagating Cascade. *Cell Rep. Phys. Sci.* **2021**, *2* (9), 100552. <https://doi.org/10.1016/j.xcrp.2021.100552>.
- (34) David Adams, J.; Justad Røise, J.; Sam Lee, D.; Murthy, N. The Methionase Chain Reaction: An Enzyme-Based Autocatalytic Amplification System for the Detection of Thiols. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (21), 3175–3178. <https://doi.org/10.1039/C9CC09136J>.
- (35) Sella, E.; Shabat, D. Dendritic Chain Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (29), 9934–9936. <https://doi.org/10.1021/ja903032t>.
- (36) Roth, M. E.; Green, O.; Gnam, S.; Shabat, D. Dendritic, Oligomeric, and Polymeric Self-Immolative Molecular Amplification. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (3), 1309–1352. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00372>.
- (37) Perry-Feigenbaum, R.; Sella, E.; Shabat, D. Autoinductive Exponential Signal Amplification: A Diagnostic Probe for Direct Detection of Fluoride. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17* (43), 12123–12128. <https://doi.org/10.1002/chem.201101796>.
- (38) Sun, X.; Dahlhauser, S. D.; Anslyn, E. V. New Autoinductive Cascade for the Optical Sensing of Fluoride: Application in the Detection of Phosphoryl Fluoride Nerve Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (13), 4635–4638. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b01008>.
- (39) Sun, X.; Reuther, J. F.; Phillips, S. T.; Anslyn, E. V. Coupling Activity-Based Detection, Target Amplification, Colorimetric and Fluorometric Signal Amplification, for Quantitative Chemosensing of Fluoride Generated from Nerve Agents. *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23* (16), 3903–3909. <https://doi.org/10.1002/chem.201604474>.
- (40) Yeung, K.; M. Schmid, K.; T. Phillips, S. A Thermally-Stable Enzyme Detection Assay That Amplifies Signal Autonomously in Water without Assistance from Biological Reagents. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (4), 394–396. <https://doi.org/10.1039/C2CC36861G>.
- (41) Karton-Lifshin, N.; Shabat, D. Exponential Diagnostic Signal Amplification via Dendritic Chain Reaction : The Dendritic Effect of a Self-Immolative Amplifier Component. *New J. Chem.* **2012**, *36* (2), 386–393. <https://doi.org/10.1039/C1NJ20486F>.
- (42) Kim, S.; Martínez Dibildox, A.; Aguirre-Soto, A.; Sikes, H. D. Exponential Amplification Using Photoredox Autocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (30), 11544–11553. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c04236>.

- (43) Kim, S.; Sikes, H. D. Dual Photoredox Catalysis Strategy for Enhanced Photopolymerization-Based Colorimetric Biodetection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (48), 57962–57970. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c17589>.
- (44) Hui, P.; Branca, M.; Limoges, B.; Mavré, F. An Autocatalytic Organic Reaction Network Based on Cross-Catalysis. *Chem. Commun.* **2021**, *57* (86), 11374–11377. <https://doi.org/10.1039/D1CC05121K>.
- (45) Pallu, J.; Rabin, C.; Creste, G.; Branca, M.; Mavré, F.; Limoges, B. Exponential Molecular Amplification by H₂O₂-Mediated Autocatalytic Deprotection of Boronic Ester Probes to Redox Cyclers. *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25* (31), 7534–7546. <https://doi.org/10.1002/chem.201900627>.
- (46) Rabin, C. Nouvelles Stratégies d'amplification Moléculaire d'un Signal Basées Sur l'activation de Dérivés pro-Quinoniques : De l'activation d'un Catalyseur Biomoléculaire Au Déclenchement d'une Réaction Auto-Catalytique. These de doctorat, Sorbonne Paris Cité, 2017. <https://www.theses.fr/2017USPCC079> (accessed 2023-06-23).
- (47) Pallu, J. Nouvelles Stratégies d'amplification Moléculaire via Des Réactions Auto-Catalytiques Impliquant Un Recyclage Redox. These en préparation, Université Paris Cité, 2017. <https://www.theses.fr/s222873> (accessed 2023-06-23).
- (48) Hui, P. Autocatalytic Molecular Amplification Strategies Based on Unmasking of Redoxactive Molecular Probes. These de doctorat, Université Paris Cité, 2021. <https://www.theses.fr/2021UNIP7285> (accessed 2023-06-23).
- (49) Achilli, C.; Ciana, A.; Fagnoni, M.; Balduini, C.; Minetti, G. Susceptibility to Hydrolysis of Phenylboronic Pinacol Esters at Physiological PH. *Cent. Eur. J. Chem.* **2013**, *11* (2), 137–139. <https://doi.org/10.2478/s11532-012-0159-2>.
- (50) Ainley, A. D.; Challenger, F. CCLXXX.—Studies of the Boron–Carbon Linkage. Part I. The Oxidation and Nitration of Phenylboric Acid. *J Chem Soc* **1930**, *0* (0), 2171–2180. <https://doi.org/10.1039/JR9300002171>.
- (51) Kuivila, H. G. Electrophilic Displacement Reactions. III. Kinetics of the Reaction between Hydrogen Peroxide and Benzeneboronic Acid¹. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76* (3), 870–874. <https://doi.org/10.1021/ja01632a070>.
- (52) Kuivila, H. G. Electrophilic Displacement Reactions. VI. Catalysis by Strong Acids in the Reaction between Hydrogen Peroxide and Benzeneboronic Acid^{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (15), 4014–4016. <https://doi.org/10.1021/ja01620a017>.

- (53) Kuivila, H. G.; Reuwer, J. F.; Mangravite, J. A. Electrophilic Displacement Reactions. XVI. Metal Ion Catalysis in the Protodeboronation of Areneboronic Acids¹⁻³. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (13), 2666–2670. <https://doi.org/10.1021/ja01067a031>.
- (54) Kuivila, H. G.; Reuwer, J. F.; Mangravite, J. A. ELECTROPHILIC DISPLACEMENT REACTIONS: XV. KINETICS AND MECHANISM OF THE BASE-CATALYZED PROTODEBORONATION OF ARENEBORONIC ACIDS. *Can. J. Chem.* **1963**, *41* (12), 3081–3090.
- (55) Kuivila, H. G.; Armour, A. G. Electrophilic Displacement Reactions. IX. Effects of Substituents on Rates of Reactions between Hydrogen Peroxide and Benzeneboronic Acid¹⁻³. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (21), 5659–5662. <https://doi.org/10.1021/ja01578a020>.
- (56) Balbaud, F.; Sanchez, G.; Santarini, G.; Picard, G. Cathodic Reactions Involved in Corrosion Processes Occurring in Concentrated Nitric Acid at 100 °C. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, *2000* (4), 665–674. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0682\(200004\)2000:4<665::AID-EJIC665>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0682(200004)2000:4<665::AID-EJIC665>3.0.CO;2-N).
- (57) Lange, R.; Maisonhaute, E.; Robin, R.; Vivier, V. On the Kinetics of the Nitrate Reduction in Concentrated Nitric Acid. *Electrochem. Commun.* **2013**, *29*, 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.01.005>.
- (58) Sicsic, D.; Balbaud-Célérier, F.; Tribollet, B. Mechanism of Nitric Acid Reduction and Kinetic Modelling. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, *2014* (36), 6174–6184. <https://doi.org/10.1002/ejic.201402708>.
- (59) de Groot, M. T.; Koper, M. T. M. The Influence of Nitrate Concentration and Acidity on the Electrocatalytic Reduction of Nitrate on Platinum. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *562* (1), 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2003.08.011>.
- (60) Bozdech, S. Comportement Coopératif de Systèmes Électrochimiques Microstructurés Lors d'une Réaction Bistable. These de doctorat, Strasbourg, 2017. <https://www.theses.fr/2017STRAF003> (accessed 2022-09-19).
- (61) Argoul, F.; Kuhn, A. Experimental Demonstration of the Origin of Interfacial Rhythmicity in Electrodeposition of Zinc Dendrites. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *359* (1), 81–96. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(93\)80401-3](https://doi.org/10.1016/0022-0728(93)80401-3).
- (62) Flätgen, G.; Wasle, S.; Lübke, M.; Eickes, C.; Radhakrishnan, G.; Doblhofer, K.; Ertl, G. Autocatalytic Mechanism of H₂O₂ Reduction on Ag Electrodes in Acidic Electrolyte: Experiments and Simulations. *Electrochimica Acta* **1999**, *44* (25), 4499–4506. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(99\)00184-X](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(99)00184-X).

- (63) Andrieux, C. P.; Merz, A.; Saveant, J. M. Dissociative Electron Transfer. Autocatalysis and Kinetic Characteristics of the Electrochemical Reductive Cleavage of the Carbon Halogen Bond in Alkyl Halides Giving Rise to Stable Radicals and Carbanions. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (21), 6097–6103. <https://doi.org/10.1021/ja00307a045>.
- (64) Dequaire, M.; Limoges, B.; Moiroux, J.; Savéant, J.-M. Mediated Electrochemistry of Horseradish Peroxidase. Catalysis and Inhibition. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (2), 240–253. <https://doi.org/10.1021/ja0170706>.
- (65) Nakanishi, S.; Fukami, K.; Sakai, S.; Nakato, Y. New Autocatalytic Mechanism for Metal Electrodeposition Leading to Oscillations and Fern-Leaf-Shaped Deposits. *Chem. Lett.* **2002**, *31* (6), 636–637. <https://doi.org/10.1246/cl.2002.636>.
- (66) Bao, X.; Barth, J. V.; Lehmpfuhl, G.; Schuster, R.; Uchida, Y.; Schlögl, R.; Ertl, G. Oxygen-Induced Restructuring of Ag(111). *Surf. Sci.* **1993**, *284* (1), 14–22. [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(93\)90522-L](https://doi.org/10.1016/0039-6028(93)90522-L).
- (67) Bao, X.; Muhler, M.; Pettinger, B.; Uchida, Y.; Lehmpfuhl, G.; Schlögl, R.; Ertl, G. The Effect of Water on the Formation of Strongly Bound Oxygen on Silver Surfaces. *Catal. Lett.* **1995**, *32* (1), 171–183. <https://doi.org/10.1007/BF00806112>.
- (68) Štrbac, S.; Adžić, R. R. The Influence of OH⁻ Chemisorption on the Catalytic Properties of Gold Single Crystal Surfaces for Oxygen Reduction in Alkaline Solutions. *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *403* (1), 169–181. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(95\)04389-6](https://doi.org/10.1016/0022-0728(95)04389-6).
- (69) Vazquez, M. V.; de Sanchez, S. R.; Calvo, E. J.; Schiffrin, D. J. The Electrochemical Reduction of Hydrogen Peroxide on Polycrystalline Copper in Borax Buffer. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *374* (1), 179–187. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(94\)03342-0](https://doi.org/10.1016/0022-0728(94)03342-0).
- (70) Houmam, A.; Hamed, E. M.; Still, I. W. J. A Unique Autocatalytic Process and Evidence for a Concerted-Stepwise Mechanism Transition in the Dissociative Electron-Transfer Reduction of Aryl Thiocyanates. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (24), 7258–7265. <https://doi.org/10.1021/ja028542z>.

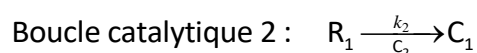
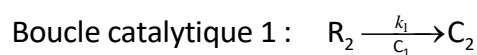
Chapitre 2 : DESCRIPTION THEORIQUE D'UN MODELE AUTOCATALYTIQUE SIMPLE PAR CATALYSE CROISEE

Dans ce chapitre 2, le principe de la catalyse croisée qui sera au cœur du manuscrit va être formellement décrit et analysé de manière analytique. Ces résultats théoriques seront ensuite appliqués aux résultats obtenus pour un premier modèle moléculaire, lequel a été précédemment étudié au cours de la thèse de Justine Pallu¹ au Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire et publiés en 2019². Le but ici est de déterminer les paramètres clés qui vont contrôler les performances analytiques d'un tel système. L'ensemble de ce chapitre a lui-même été l'objet d'une publication³.

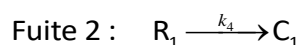
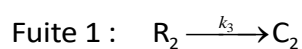
1. Description du modèle et des équations différentielles adimensionnelles

La catalyse croisée met en jeu deux boucles catalytiques, qui s'activent mutuellement : la première boucle (boucle catalytique 1) produit le catalyseur de la seconde boucle (boucle catalytique 2), et inversement. Ce mécanisme de catalyse croisée a été décrit initialement par Hinshelwood en 1952⁴, et est caractérisé par une amplification exponentielle de la concentration de chacun des catalyseurs mis en jeu.

Dans un premier temps, nous allons décrire de manière formelle un système minimal d'équations chimiques capable de rendre compte de ce mécanisme. Deux espèces dites réservoirs R_1 et R_2 représenteront respectivement le réactif de la boucle 1 et le réactif de la boucle 2. Dans la boucle 1, C_2 sera produit à partir de R_2 par catalyse de C_1 . Dans la boucle 2, C_1 lui sera produit à partir de R_1 par catalyse de C_2 . Ainsi, il est possible d'écrire les équations suivantes :



Afin de comprendre les paramètres contrôlant les performances analytiques, il est également nécessaire de définir des réactions entraînant une réponse non-spécifique, ces réactions représentant les fuites ou instabilités sur chacune des boucles. Ces réactions indésirables, sont décrites par des réactions d'ordre 1 qui traduisent la lente accumulation de C_1 et C_2 à partir de R_1 et R_2 respectivement (réactions non catalysées) :



Ainsi, à partir de ces quatre réactions, il est possible de décrire l'évolution temporelle des concentrations de chacune de nos espèces par un ensemble d'équations différentielles ordinaires (ODE). Il sera considéré pour les réactions catalytiques un ordre un à la fois sur le catalyseur et le réservoir, et pour les réactions non catalytiques un ordre un seulement sur le réservoir :

$$\begin{aligned}\frac{d[C_1]}{dt} &= k_2[R_1][C_2] + k_4[R_1] \\ \frac{d[C_2]}{dt} &= k_1[R_2][C_1] + k_3[R_2] \\ \frac{d[R_1]}{dt} &= -k_2[R_1][C_2] - k_4[R_1] \\ \frac{d[R_2]}{dt} &= -k_1[R_2][C_1] - k_3[R_2]\end{aligned}$$

Afin de simplifier la résolution de cet ensemble d'équation différentielle de manière analytique, une hypothèse est nécessaire : au début de la réaction, *i.e.* pendant la phase de latence, les concentrations des réservoirs seront considérées constantes. Ainsi, les évolutions temporelles des catalyseurs C_1 et C_2 sont solutions du jeu d'ODE simplifié suivant :

$$\begin{aligned}\frac{d[C_1]}{dt} &= k_2'[C_2] + k_4' \\ \frac{d[C_2]}{dt} &= k_1'[C_1] + k_3'\end{aligned} \quad \text{avec} \quad \begin{aligned}k_1' &= k_1[R_2]_0 \\ k_2' &= k_2[R_1]_0 \\ k_3' &= k_3[R_2]_0 \\ k_4' &= k_4[R_1]_0\end{aligned}$$

Ces deux équations peuvent être adimensionnées et réarrangées sous la forme simple :

$$\begin{aligned}\frac{d^2 c_1}{d\theta^2} - c_1 &= \alpha \\ \frac{d^2 c_2}{d\theta^2} - c_2 &= \beta\end{aligned} \quad \text{avec} \quad \theta = \sqrt{k_2' k_1'} t ; c_i = \frac{[C_i]}{[R_1]_0} ; \alpha = \frac{k_3'}{k_1 [R_1]_0} ; \beta = \frac{k_4'}{k_2 [R_1]_0}$$

Ici, θ représente le temps adimensionnel de notre système, et correspond au ratio entre le temps de réaction t et un temps caractéristique $t_s = 1/\sqrt{k_1' k_2'}$, inverse de la moyenne géométrique de la vitesse de chaque boucle. Les concentrations adimensionnelles sont définies en référence à la concentration $[R_1]_0$, concentration initiale du réservoir R_1 . Enfin, α et β sont les deux paramètres adimensionnels représentant le ratio entre la vitesse de la réaction non-catalysée sur celle de la réaction catalysée pour chacune des boucles, respectivement boucle 1 et 2. Ces paramètres traduisent l'instabilité relative de chacune des boucles.

Enfin, le facteur de symétrie adimensionnel γ , qui sera utile ultérieurement, permet de définir la cinétique de la boucle 2 vis-à-vis de la boucle 1.

$$\gamma = \frac{k_2'}{k_1'}$$

2. Déclenchement direct de la réaction autocatalytique par un des deux catalyseurs

La résolution du système ci-dessus est dépendante des conditions initiales, notamment de la concentration initiale de chacun des catalyseurs. Deux types de conditions initiales peuvent être envisagés, chacune correspondant au déclenchement de la réaction autocatalytique par un des deux catalyseurs uniquement.

- (i) C_1 est le déclencheur unique, soit à $t = 0$: $c_1^0 \neq 0$ et $c_2^0 = 0$
- (ii) C_2 est le déclencheur unique, soit à $t = 0$: $c_1^0 = 0$ et $c_2^0 \neq 0$

2.1. C_1 est le déclencheur

Dans cette partie, le système d'équation différentielle adimensionnelle sera résolu en considérant que C_1 est le seul déclencheur initial du système. La résolution analytique dans ce cas (i), i.e $c_1^0 \neq 0$ et $c_2^0 = 0$ à $t = 0$, permet la détermination des concentrations c_1 et c_2 en fonctions du temps adimensionnel θ :

$$c_1 = c_1^0 \cosh(\theta) + \alpha(\cosh(\theta) - 1) + \sqrt{\gamma}\beta \sinh(\theta) \quad (1)$$

$$c_2 = \frac{c_1^0}{\sqrt{\gamma}} \sinh(\theta) + \frac{\alpha}{\sqrt{\gamma}} \sinh(\theta) + \beta(\cosh(\theta) - 1) \quad (2)$$

Ces deux expressions reflètent l'accumulation non linéaire de chacun des catalyseurs au cours du temps ainsi que la contribution des fuites des réservoirs r_1 et r_2 . Ces expressions sont cohérentes avec celles décrites par Hinshelwood en 1952, dans le cas spécifique où α et β sont égaux à zéro⁴. De plus, il est possible de déduire également l'expression des réservoirs au cours du temps car :

$$\frac{dr_1}{d\theta} = -\frac{dc_1}{d\theta} \quad \text{et} \quad \frac{dr_2}{d\theta} = -\frac{dc_2}{d\theta}$$

Ainsi, en intégrant :

$$r_1 = 1 - (c_1 - c_1^0) \quad (3)$$

$$r_2 = r_2^0 - c_2 \quad (4)$$

Ces solutions sont représentées sur la **Figure 2-1** pour $\alpha = \beta = 10^{-5}$, $\gamma = 1$, $c_1^0 = 10^{-3}$. Afin de valider celles-ci, une simulation numérique a été réalisée à l'aide du logiciel COPASI avec comme paramètres : $k_1 = k_2 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_3 = k_4 = 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $[C_1]_0 = 10^{-3} \text{ M}$, $[R_1]_0 = [R_2]_0 = 1 \text{ M}$. La concordance entre la solution analytique ci-dessus et la simulation numérique de notre système est illustrée en **Figure 2-1**. La solution analytique calculée ici suit parfaitement la simulation numérique pour les premières valeurs de θ et permet ainsi de prédire le temps de la phase de latence. Cependant, dès que l'hypothèse d'une concentration constante des réservoirs n'est plus vérifiée (*i.e.* après la phase de latence, quand R_1 et R_2 commencent à être consommés exponentiellement), une déviation entre la solution analytique et numérique apparaît.

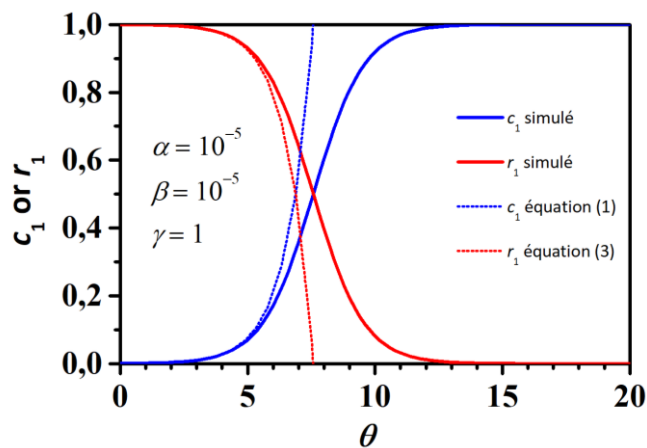


Figure 2-1 : Evolution de c_1 et r_1 en fonction de θ . **En pointillés** : tracés des équations. 1 (bleu) et 3 (rouge) avec comme paramètres : $\alpha = \beta = 10^{-5}$, $\gamma = 1$, $c_1^0 = 10^{-3}$. **En trait plein** : tracés simulés de c_1 et r_1 en utilisant le logiciel COPASI avec comme paramètres : $k_1 = k_2 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_3 = k_4 = 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $[C_1]_0 = 10^{-3} \text{ M}$, $[R_1]_0 = [R_2]_0 = 1 \text{ M}$.

Intéressons-nous maintenant à l'influence des paramètres alpha et béta. La **Figure 2-2** montre l'évolution de c_1 en fonction de θ pour différentes valeurs de c_1^0 (concentration initiale du déclencheur) et pour différentes valeurs de α et β . Pour les quatre graphes, le facteur de symétrie γ vaut 1, ce qui signifie que les deux réactions catalytiques sont cinétiquement équivalentes. Le graphe du quadrant en haut à gauche (pas d'instabilités des réservoirs, *i.e.* $\alpha = \beta = 0$) montre une augmentation exponentielle de la concentration en catalyseur quand $c_1^0 \neq 0$, avec une phase de latence d'autant plus

courte que la concentration initiale en déclencheur est importante. En l'absence de déclencheur initial ($c_1^0 = 0$), la concentration en catalyseur reste nulle au cours du temps (pas de signal non spécifique). Cependant en présence de fuites (autres quadrants), la concentration de c_1 finit par augmenter exponentiellement après une phase de latence, même en l'absence de déclencheur initial (signal non spécifique). Ceci est observé quelle que soit l'origine de la fuite (*i.e.*, soit fuite de la boucle 1 uniquement -cas $\beta = 0$ - ou fuite de la boucle 2 uniquement -cas $\alpha = 0$ -). Ici, les contributions d'une instabilité sur R_1 ou une instabilité sur R_2 sur le signal non spécifique sont équivalentes, du fait que le facteur de symétrie γ vaut 1.

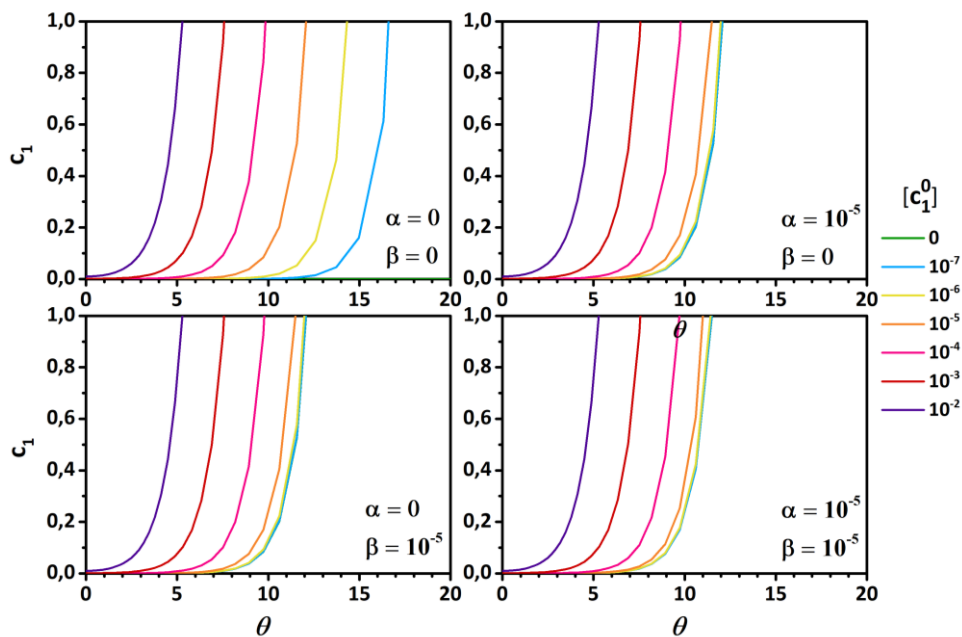


Figure 2-2 : Evolution de c_1 en fonction de θ pour différentes concentrations initiales en déclencheur : 0 (vert), 10^{-7} (cyan), 10^{-6} (jaune), 10^{-5} (orange), 10^{-4} (rose), 10^{-3} (rouge), 10^{-2} (violet). Les différentes courbes sont tracées à partir de l'eqt. 1 avec différents jeux de paramètres adimensionnels : **En haut à gauche** : $\alpha = 0$, $\beta = 0$, $\gamma = 1$; **En haut à droite** : $\alpha = 10^{-5}$, $\beta = 0$, $\gamma = 1$; **En bas à gauche** : $\alpha = 0$, $\beta = 10^{-5}$, $\gamma = 1$; **En bas à droite** : $\alpha = 10^{-5}$, $\beta = 10^{-5}$, $\gamma = 1$.

En prenant en comptes ces solutions analytiques, il est possible maintenant de prédire les performances analytiques du système en traçant une courbe de calibration. Celle-ci représente, en fonction de la concentration initiale en déclencheur c_1^0 , le temps de demi réaction θ_c (grandeur adimensionnelle définit ici comme : $r_1(\theta_c) = 1/2$ ou $c_1(\theta_c) = 1/2 + c_1^0$, c'est-à-dire le moment où le réservoir R_1 est à moitié consommé). Afin d'évaluer l'influence des différents paramètres sur le temps de demi-réaction, les expressions suivantes pour θ_c sont établies :

$$\text{si } c_1^0 + \alpha > |\sqrt{\gamma\beta}|, \quad \theta_c = \cosh^{-1} \left(\frac{1/2 + c_1^0 + \alpha}{\sqrt{(c_1^0 + \alpha)^2 - \gamma\beta^2}} \right) - \tanh^{-1} \left(\frac{\sqrt{\gamma\beta}}{c_1^0 + \alpha} \right) \quad (5)$$

$$\text{si } \sqrt{\gamma\beta} > |c_1^0 + \alpha|, \quad \theta_c = \sinh^{-1} \left(\frac{1/2 + c_1^0 + \alpha}{\sqrt{\gamma\beta^2 - (c_1^0 + \alpha)^2}} \right) - \tanh^{-1} \left(\frac{c_1^0 + \alpha}{\sqrt{\gamma\beta}} \right) \quad (6)$$

$$\text{si } c_1^0 + \alpha = \sqrt{\gamma\beta}, \quad \theta_c = \ln \left(\frac{1/2 + c_1^0 + \alpha}{(c_1^0 + \alpha)} \right) \quad (7)$$

Pour un jeu de paramètres cinétiques donné, on peut ainsi comparer en **Figure 2-3** les temps de demi-réaction θ_c calculés soit à partir des solutions analytiques (trait plein) soit simulés sur le logiciel COPASI (carrés bleus). Les deux méthodes donnent des résultats concordants, assurant ainsi une bonne fiabilité de la prédiction de la courbe de calibration par les solutions analytiques, même si ces temps sont légèrement sous-estimés du fait de l'approximation faite sur la concentration en réservoir pour simplifier le calcul.

En ce qui concerne l'allure générale de cette courbe de calibration, pour les plus fortes valeurs de c_1^0 , la courbe de calibration de θ_c est linéaire en échelle semi-log. Pour les concentrations faibles en c_1^0 , les temps de demi-réaction tendent vers une valeur limite et il est possible de définir un temps limite $\theta_{c,\text{lim}}$: cette limitation est due à la prédominance de la réponse non spécifique dans ces conditions.

$$\text{si } \alpha > |\sqrt{\gamma\beta}|, \quad \theta_{c,\text{lim}} = \cosh^{-1} \left(\frac{1/2 + \alpha}{\sqrt{\alpha^2 - \gamma\beta^2}} \right) - \tanh^{-1} \left(\frac{\sqrt{\gamma\beta}}{\alpha} \right)$$

$$\text{si } \sqrt{\gamma\beta} > |\alpha|, \quad \theta_{c,\text{lim}} = \sinh^{-1} \left(\frac{1/2 + \alpha}{\sqrt{\gamma\beta^2 - \alpha^2}} \right) - \tanh^{-1} \left(\frac{\alpha}{\sqrt{\gamma\beta}} \right)$$

$$\text{si } \alpha = \sqrt{\gamma\beta}, \quad \theta_{c,\text{lim}} = \ln \left(\frac{1/2 + \alpha}{\alpha} \right) \quad (\text{dans le cas d'un système complètement symétrique})$$

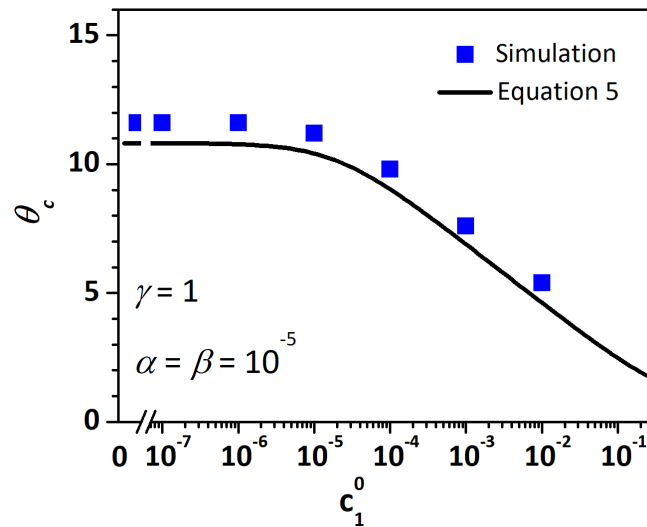


Figure 2-3 : Courbe de calibration représentant θ_c en fonction de c_1^0 . **En trait plein** : tracé de l'eqt. 5. Paramètres : $\alpha = 10^{-5}$, $\beta = 10^{-5}$, $\gamma = 1$. **Carré bleu** : θ_c extrait des simulations numériques effectuées avec le logiciel COPASI avec les paramètres suivants : $k_1 = k_2 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_3 = k_4 = 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $[C_1]_0 = 10^{-3} \text{ M}$, $[R_1]_0 = [R_2]_0 = 1 \text{ M}$.

Il est important de noter que cette valeur de $\theta_{c,\text{lim}}$ dépend uniquement de α , β et γ . Pour un même γ , une diminution de α et β entraîne une augmentation de $\theta_{c,\text{lim}}$ et ainsi une meilleure détection des faibles concentrations (**Figure 2-4**). De manière concomitante, le domaine de linéarité devient plus étendu. Cependant, cela n'entraîne pas d'amélioration de la sensibilité (*i.e.* la pente de la droite de calibration reste constante).

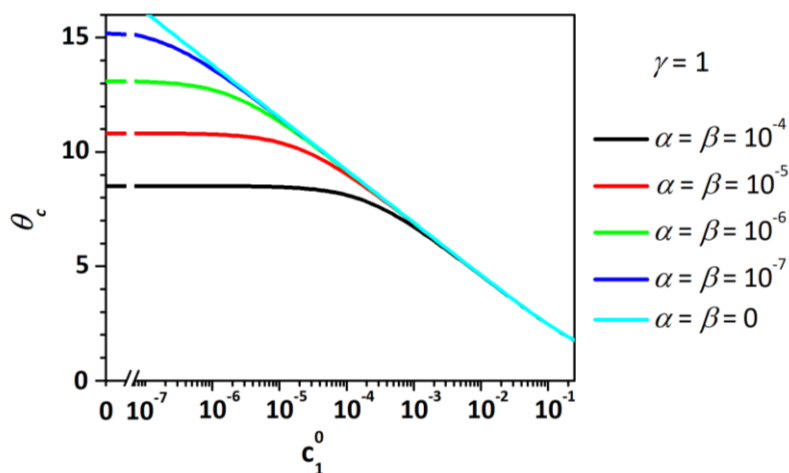


Figure 2-4 : Courbe de calibration de θ_c en fonction de c_1^0 pour différentes valeurs de α et β . Les courbes sont tracées à partir de l'eqt. 5.

Nous allons maintenant tenter d'établir une équation nous permettant de calculer a priori la limite de détection en fonction des paramètres cinétiques du système. A partir de l'équation 1 décrivant l'évolution de c_1 en fonction de θ , il est possible de séparer par identification l'amplification

spécifique de c_1 ($c_{1,s}$) induite par la concentration en déclencheur initiale c_1^0 de celle induite par la réponse non spécifique du système induite par la fuite des réservoirs ($c_{1,ns}$) :

$$c_1 = c_{1,s} + c_{1,ns}$$

avec

$$\begin{aligned} c_{1,s} &= c_1^0 \cosh(\theta) \\ c_{1,ns} &= \alpha (\cosh(\theta) - 1) + \sqrt{\gamma\beta} \sinh(\theta) \end{aligned}$$

Si on fait l'hypothèse que la discrimination d'une réponse spécifique est possible tant que sa contribution $c_{1,s}$ est supérieure à la contribution de la réponse non-spécifique $c_{1,ns}$, alors il est intéressant de les comparer en divisant l'une par l'autre :

$$\frac{c_{1,ns}}{c_{1,s}} = \frac{\alpha (\cosh(\theta) - 1)}{c_1^0 \cosh(\theta)} + \frac{\sqrt{\gamma\beta}}{c_1^0} \tanh(\theta)$$

On obtient alors, pour des temps relativement longs :

$$\left(\frac{c_{1,ns}}{c_{1,s}} \right)_{\theta \gg 1} = \frac{\alpha + \sqrt{\gamma\beta}}{c_1^0}$$

Il est alors possible de définir une concentration seuil $c_{1,min}^0$ qui respecte la condition suivante :

$$\left(\frac{c_{1,ns}}{c_{1,s}} \right)_{\theta \gg 1} = 1 = \frac{\alpha + \sqrt{\gamma\beta}}{c_{1,min}^0}$$

Soit une contribution égale de l'amplification spécifique et non spécifique. Cette concentration est en fait la concentration seuil de détection et celle-ci ne dépend que des paramètres cinétiques du système α , β et γ :

$$c_{1,min}^0 = \alpha + \sqrt{\gamma\beta} \quad (8)$$

Cette équation adimensionnelle peut être « redimensionnée » ainsi :

$$c_{1,min}^0 = \frac{k_3'}{k_1'} + \frac{k_4'}{\sqrt{k_1'k_2'}} \quad (9)$$

Les deux équations ci-dessus expriment la contribution des fuites de chacune des boucles sur la limite de détection. En fonction de l'instabilité majoritairement responsable de la réponse non spécifique, deux cas limites peuvent être distingués :

- Soit l'instabilité de R_2 est en cause, alors $\alpha \gg \sqrt{\gamma\beta}$ et $C_{1,\min}^0 = \alpha$ ou $C_{1,\min}^0 = \frac{k_3'}{k_1'}$;
- Soit c'est celle de R_1 ($\alpha \ll \sqrt{\gamma\beta}$ et $C_{1,\min}^0 = \sqrt{\gamma\beta}$ ou $C_{1,\min}^0 = \frac{k_4'}{\sqrt{k_1'k_2'}}$).

La transition d'un cas limite à l'autre peut être appréhendée en définissant un nouveau paramètre σ :

$$\sigma = \frac{\alpha}{\sqrt{\gamma\beta}} = \frac{k_3'}{k_4'} \sqrt{\frac{k_2'}{k_1'}} \quad (10)$$

- Quand $\sigma \gg 1$, c'est l'instabilité sur R_2 est responsable du signal non spécifique.
- Quand $\sigma \ll 1$ (l'instabilité sur R_1 est responsable du signal non spécifique), les deux boucles catalytiques sont mises en jeu.

Dans les cas (i) par exemple, il est possible d'apprécier la stabilité nécessaire pour être capable de détecter des traces de l'ordre du pM, par exemple. La relation simple $C_{1,\min}^0 = \frac{k_3'}{k_1'}$ impose donc que l'instabilité associée à la boucle catalytique 1 soit de l'ordre de 10^{-12} afin d'atteindre une limite de détection de 1 pM pour la cible C_1 .

Ainsi, afin de concevoir un système d'amplification moléculaire autocatalytique avec une limite de détection optimale, plusieurs solutions dépendant du cas sont envisageables. Encore dans le cas (i), soit $\sigma \gg 1$, seul l'instabilité de R_2 est responsable et la LOD est totalement indépendante des cinétiques de production de C_1 à partir de R_1 (boucle catalytique 2) ou de la stabilité de R_1 (fuite 2). Il est donc nécessaire de travailler sur la stabilisation de R_1 ainsi que sur sa réactivité vis-à-vis de C_2 . Dans

le cas (ii) ($\sigma \ll 1$) cependant, la relation $C_{1,\min}^0 = \frac{k_4'}{\sqrt{k_1'k_2'}}$ indique maintenant que plusieurs options sont possibles : soit une amélioration de la stabilité de R_1 soit une meilleure réactivité de R_1 ou R_2 .

2.2. C₂ est le déclencheur

Dans cette partie le système sera résolu en considérant que le catalyseur C₂ est le déclencheur, i.e. à t = 0 : c₁⁰ = 0 et c₂⁰ ≠ 0. Des solutions similaires sont alors établies pour c₁ et c₂ :

$$c_1 = \alpha(\cosh(\theta) - 1) + \sqrt{\gamma}(c_2^0 + \beta)\sinh(\theta) \quad (11)$$

$$c_2 = c_2^0 \cosh(\theta) + \frac{\alpha}{\sqrt{\gamma}}\sinh(\theta) + \beta(\cosh(\theta) - 1) \quad (12)$$

Les temps de demi-réaction deviennent maintenant :

$$\text{si } \alpha > |\sqrt{\gamma}(c_2^0 + \beta)|, \quad \theta_c = \cosh^{-1}\left(\frac{1/2 + \alpha}{\sqrt{\alpha^2 - \gamma(c_2^0 + \beta)^2}}\right) - \tanh^{-1}\left(\frac{\sqrt{\gamma}(c_2^0 + \beta)}{\alpha}\right) \quad (13)$$

$$\text{si } \sqrt{\gamma}(c_2^0 + \beta) > |\alpha|, \quad \theta_c = \sinh^{-1}\left(\frac{1/2 + \alpha}{\sqrt{\gamma(c_2^0 + \beta)^2 - \alpha^2}}\right) - \tanh^{-1}\left(\frac{\alpha}{\sqrt{\gamma}(c_2^0 + \beta)}\right) \quad (14)$$

Comme précédemment, la concentration minimale de déclencheur nécessaire pour être discriminée de la réponse non spécifique du système est définie :

$$c_{2,\min}^0 = \beta + \frac{\alpha}{\sqrt{\gamma}} = \frac{c_{1,\min}^0}{\sqrt{\gamma}} \quad (15)$$

ou

$$c_{2,\min}^0 = \frac{k_4'}{k_2} + \frac{k_3'}{\sqrt{k_1'k_2}} \quad (16)$$

Enfin, deux cas limites sont également décrits dans ce cas :

(i) Quand $\sigma \ll 1$, $c_{2,\min}^0 = \beta$ et $c_{2,\min}^0 = \frac{k_4'}{k_2}$. La limite de détection dans ce cas ne dépend donc de la

stabilité de R₁ et de la réactivité de celui-ci avec C₂.

(ii) Quand $\sigma \gg 1$, $c_{2,\min}^0 = \frac{\alpha}{\sqrt{\gamma}}$ et $c_{2,\min}^0 = \frac{k_3'}{\sqrt{k_1'k_2}}$. Dans ce cas, la limite de détection est contrôlée par

la stabilité de R₂ et par la réactivité de R₁ et R₂ vis-à-vis de leur catalyseurs C₂ et C₁ respectivement.

Ainsi, il est possible d'établir une relation entre les limites de détection de chacun des catalyseurs qui ne dépend que de γ :

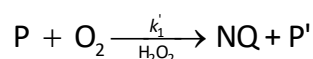
$$\frac{C_{2,\min}^0}{C_{1,\min}^0} = \frac{1}{\sqrt{\gamma}}$$

Cette dernière expression démontre que les performances analytiques de détection d'un catalyseur ou de l'autre ne seront équivalentes que lorsque le système est parfaitement symétrique, *i.e.* quand les deux boucles catalytiques fonctionnent à la même vitesse. Cependant, dans le cas où le système est hautement dissymétrique, il sera possible de détecter une concentration plus faible du catalyseur le plus efficace, soit C_1 si $\gamma \ll 1$ ou C_2 si $\gamma \gg 1$.

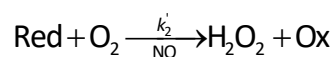
3. Mécanisme autocatalytique moléculaire préliminaire basée sur la catalyse croisée

Dans cette partie, le but est d'appliquer l'analyse théorique faite précédemment à l'exemple concret d'une réaction autocatalytique du type catalyse croisée système basé sur une sonde moléculaire décrite précédemment lors des travaux de thèse de Justine Pallu¹ et pour laquelle une analyse cinétique approfondie a été réalisée. Le principe de cette réaction autocatalytique repose sur les deux boucles catalytiques suivantes :

- (i) La déprotection catalytique médiée par H_2O_2 d'une sonde moléculaire masquant une naphthoquinone (P) en la naphthoquinone correspondante (NQ) en présence d' O_2 dissous.



- (ii) La production catalytique de H_2O_2 en présence de naphthoquinone (NQ) par le biais d'un cyclage redox en présence d'un réducteur Red et de l'oxydant O_2 .



Les deux catalyseurs C_1 et C_2 sont donc ici respectivement H_2O_2 et la NQ. Ces deux équations représentant le système autocatalytique forment donc bien une catalyse croisée et il est possible d'utiliser les équations de la partie précédente pour analyser les résultats expérimentaux de ce mécanisme aux équations exprimées dans la partie précédente.

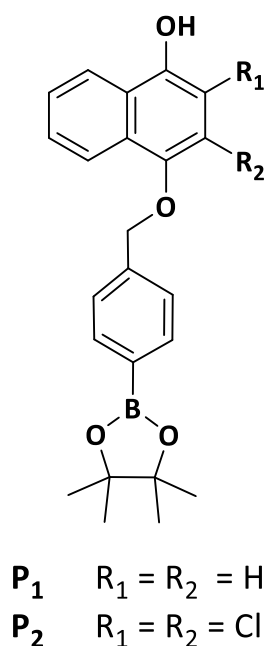


Figure 2-5 : Structure chimique des sondes à bras espaceur P₁ et P₂.

Dans un premier temps, une sonde autoimmolante P₁ a été utilisée (**Figure 2-5**). En comparaison avec la sonde 4-DBN présentée dans le chapitre 1, le groupement ester boronique dans cette sonde P₁ est ici éloigné de la fonction hydroxyle d'une 1,4-naphthoquinone par un bras espaceur, afin de stabiliser la sonde. Plusieurs réducteurs ont été envisagés, chimiques ou enzymatiques : l'acide ascorbique, l'enzyme PQQ-glucose déshydrogénase et son substrat glucose, et la diaphorase et son substrat NADH. L'avancement de cette réaction autocatalytique est suivi par spectrophotométrie UV-Vis. Avec ce type de sonde, il a été montré que la réaction autocatalytique permettait la détection de peroxyde d'hydrogène jusqu'à des concentrations sub-micromolaires. Enfin, la limitation de la détection a été montrée comme résultant de l'instabilité intrinsèque de la sonde².

La sonde P₂ (**Figure 2-5**) est basée, elle, sur un squelette naphthyl possédant un groupement Chlore, qui possède une vitesse de cyclage redox bien plus rapide. Les courbes de calibration obtenus à partir des résultats expérimentaux en utilisant la sonde P₁ et trois différents réducteurs (**A**), ou en utilisant deux sondes P₁ et P₂ et le même réducteur DI/NADH (**B**) sont reportés sur la **Figure 2-6**.

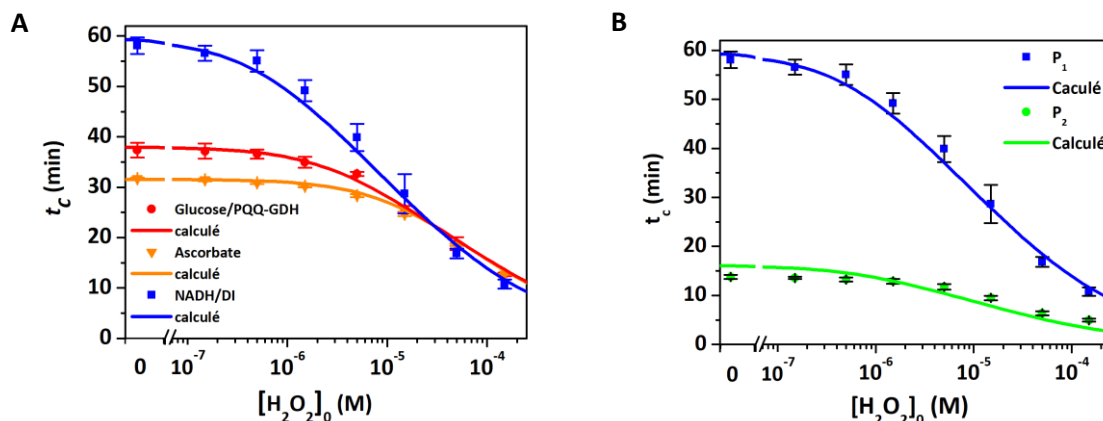


Figure 2-6 : (A, B) Courbes de calibration semi-logarithmique du report de temps de demi-réaction (t_c) extrait des données cinétiques mesurées par spectrophotométrie UV-Vis en fonction de la concentration initiale en déclencheur H_2O_2 . Toutes les expériences sont conduites dans des micro-puits dans 200 μL de tampon Tris 0,1M + 10 μM EDTA à pH 8,5. **(A)** Les conditions initiales sont 50 μM de sonde P_1 , une gamme de concentration de H_2O_2 de 0 à 150 μM et : **orange** 500 μM d'acide ascorbique ou **rouge** 10 nM de PQQ-glucose déshydrogénase + 1 mM de glucose ou **bleu** 10 nM de diaphorase + 250 μM de NADH. Les barres d'erreur représentent l'écart-type à partir des triplicatas. Les lignes solides représentent le tracé de l'équation 5 avec les paramètres en **Tableau 2-1** ci-dessous. **(B)** Mêmes conditions expérimentales qu'en (A) mais avec 50 μM de sonde P_1 (**en bleu**) ou de sonde P_2 (**en vert**), réducteur 10 nM de diaphorase et 250 μM de NADH. Les barres d'erreur représentent l'écart-type à partir des triplicatas. Les lignes solides représentent le tracé de l'équation 5 avec les paramètres en **Tableau 2-1** ci-dessous.

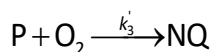
Afin de pouvoir appliquer à ces résultats expérimentaux les solutions analytiques décrites plus tôt dans ce chapitre, la vitesse respective des deux boucles catalytiques sont décrites telles que :

$$v_1 = k_1' [H_2O_2] \text{ et } v_2 = k_2' [NQ]$$

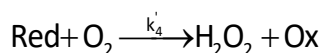
Pour la boucle 1, la vitesse de réaction V_1 est contrôlée par l'étape de déprotection de la sonde par H_2O_2 , qui est a été montrée comme l'étape la plus lente, la seconde étape d'auto-oxydation de NQH_2 étant bien plus rapide. La constante de vitesse apparente k_1' est donc telle que $k_1' = k_1 [P]_0$ tant que la concentration en sonde peut être considérée comme constante (i.e., pendant la phase de latence).

Pour la boucle 2 de cyclage redox, le mécanisme est plus complexe. Ainsi, k_2' représente une constante apparente globale du recyclage redox, dépendant des conditions expérimentales. Expérimentalement, la cinétique de cette boucle varie bien linéairement avec la concentration en catalyseur dans les conditions explorées². Enfin, pour compléter la cinétique du modèle moléculaire en tenant compte des réponses non-spécifiques du système, deux autres réactions sont à considérer. La première correspond à la dégradation de la sonde par l'instabilité intrinsèque de son bras auto-

immolant qui conduit à l'apparition de NQ en présence d'oxygène. La seconde correspond à l'auto-oxydation de l'agent réducteur, conduisant à la formation de H₂O₂ déclenchant la réaction autocatalytique. Ainsi, l'apparition fortuite d'un des deux catalyseurs (NQ ou H₂O₂) par l'une ou l'autre instabilité déclenche la réaction autocatalytique qui s'emballé de par son caractère exponentiel.



et



Aux courbes expérimentales (en points) sont ajustées les équations dimensionnelles 5 et 6 en utilisant les paramètres cinétiques décrits dans le **Tableau 2-1** :

Sonde	P ₁	P ₁	P ₁	P ₂
Réducteur	Acide Ascorbique	PQQ-GDH/Glucose	Diaphorase/NADH	Diaphorase/NADH
k_1' (s ⁻¹)	7,5x10 ^{-5[a]} /1,5x10 ^{-4[b]}	7,5x10 ^{-5[a]}	7,5x10 ^{-5[a]}	7,5x10 ^{-5[a]}
k_2' (s ⁻¹)	0,05 ^[a] /0,05 ^[b]	0,09 ^[a]	0,04 ^[a]	0,5 ^[a]
k_3' (M ⁻¹ .s ⁻¹)	6x10 ^{-10[a]} /5x10 ^{-10[b]}	2x10 ⁻¹⁰	3,5x10 ⁻¹¹	5x10 ⁻¹¹
k_4' (M ⁻¹ .s ⁻¹)	10 ^{-8[a]} /10 ^{-8[b]}	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰
σ	1,55 ^[c]	>70 ^[c]	>8 ^[c]	>33 ^[c]
[C] _{0,min} (μM)	13 ^[d]	2,7 ^[d]	0,5 ^[d]	0,5 ^[d]

Tableau 2-1 : Paramètres cinétiques et associés au modèle analytique de catalyse croisée. **[a]** : Valeurs estimées par le fit de la courbe de calibration expérimentale à la forme dimensionnelle des équations 5 et 6. **[b]** : Valeurs mesurées expérimentalement². **[c]** : Valeurs calculées à partir de l'équation 10. **[d]** : Valeurs calculées à partir de l'équation 9.

Les résultats obtenus avec la sonde P₁ (**Figure 2-6A**) et l'Acide Ascorbique comme réducteur montrent une bonne concordance entre les paramètres déterminés expérimentalement et par ajustement : cela valide ainsi le modèle mathématique présenté ci-dessus. Dans ce cas, la valeur de σ est de 1.55 (>1), et donc l'amplification non-spécifique du signal est en effet contrôlé majoritairement par l'instabilité de la sonde, même si l'instabilité de l'acide ascorbique contribue significativement. Le glucose et le NADH sont eux des réducteurs beaucoup plus stables et beaucoup moins apte à s'auto-oxyder facilement, et cela se ressent dans des valeurs de σ bien plus élevée, signe que la source

principale de réponse non-spécifique du signal est due presque uniquement à l'instabilité de la sonde. La 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone (apparaissant après déprotection de la sonde P₂) est un meilleur cycleur redox que la 1,4-naphthoquinone (apparaissant après déprotection de la sonde P₁) dans le cas où le réducteur est le DI/NADH, avec une constante k_2' de plus de 12 fois plus élevée (extrait du fit en **Figure 2-6B**). Par ailleurs, les valeurs de k_3' diffèrent selon les conditions du système : la stabilité de la sonde n'est pas la même selon la nature du réducteur. Ce comportement singulier met en avant la corrélation de la stabilité de la sonde avec la force de réduction mise en jeu, avec de la plus importante à la plus faible : DI/NADH > PQQ-GDH/Glucose > Acide Ascorbique. Plus la réduction est thermodynamiquement favorable, plus la sonde dans ce milieu est stabilisée. Nous verrons dans le chapitre 3 une autre observation expérimentale liée à ce phénomène.

Les différentes limites de détection attendues dans chaque condition calculée à partir de l'équation 9 sont données en table 1. Les résultats calculés sont proches des résultats expérimentaux confirmant ainsi la prédiction des performances du système par résolution analytique à partir d'un modèle bimoléculaire simple. De plus, il est possible de déterminer quel le meilleur réducteur est le couple DI/NADH. Il est également possible de déterminer la limite de détection si le déclencheur de la réaction autocatalytique n'est plus H₂O₂ mais la 1,4-NQ. En effet, plus haut il a été établi que

$$C_{2,\min}^0 = \frac{C_{1,\min}^0}{\sqrt{\gamma}}, \text{ donnant une limite de détection en 1,4--NQ de 20nM dans les conditions optimales,}$$

i.e. en présence du couple réducteur DI/NADH.

Les résultats précédents ont permis de valider la concordance entre le modèle analytique et les résultats expérimentaux obtenus par le modèle moléculaire de catalyse croisée. Maintenant, il est intéressant d'utiliser ce modèle pour déterminer quels sont les paramètres clés afin d'optimiser les performances analytiques du système, notamment pour sa limite de détection. Un paramètre clé dans le **Tableau 2-1** est σ , qui nous renseigne sur l'origine de l'instabilité responsable de la réponse non-spécifique du système. Ici, il est toujours supérieur à 1, et cela signifie que c'est l'instabilité du réservoir de la boucle 1 qui est responsable de l'amplification non-spécifique, soit l'instabilité de la sonde. En termes de limite de détection, les équations 9, 16 et 19 nous donnent :

$$[C_1]_{0,\min} = [H_2O_2]_{0,\min} = \frac{k_3'}{k_1'}$$

$$[C_2]_{0,\min} = [1,4 - NQ]_{0,\min} = \frac{k_3'}{\sqrt{k_1'k_2'}}$$

Ces équations mettent en évidence qu'une sonde au design plus stable (soit une diminution de k_3' alors que les autres constantes cinétiques restent les mêmes) est bénéfique dans les deux cas. De plus, une meilleure réactivité de la sonde avec H_2O_2 (cas où k_1' augmente) permet une meilleure limite de détection en ce déclencheur, mais le gain vis-à-vis de la détection de la 1,4-NQ est moindre (car sa limite de détection dépend de la racine de k_1'). Enfin, une sonde qui libérerait un meilleur cycleur redox que la 1,4-NQ (cas où k_2' augmente) n'a pas d'influence sur la limite de détection en H_2O_2 (voir en **Tableau 2-1** la comparaison entre P_1 et P_2 pour le couple réducteur DI/NADH).

Finalement, les solutions analytiques du système simple de catalyse croisée nous ont permis de déterminer les paramètres clés de la réaction autocatalytique globale. Le modèle a pu être validé en le comparant aux résultats expérimentaux obtenus précédemment dans la thèse de Justine Pallu avec des sondes à bras espaceur auto-immolant et plusieurs réducteurs. Cela nous a permis de montrer qu'avec le couple réducteur DI/NADH, les stabilités des deux réservoirs (*i.e.* le réducteur et la sonde) étaient les meilleures. Cependant, cela nous a permis de comprendre également que l'origine de l'amplification non-spécifique était majoritairement due à l'instabilité de la sonde, et qu'un design de sonde plus stable est nécessaire si nous voulons améliorer les performances analytiques du système. Ainsi, dans le chapitre suivant, un design de sonde plus stable est proposé, et une modélisation de son mécanisme lors de la réaction autocatalytique plus complexe sera étudiée en comparant les résultats expérimentaux à des simulations numériques. Cette sonde en **Figure 2-7**, la 1,4-bis-DBN, repose sur un double masque des deux fonctions hydroxyles de la 1,4-naphthoquinone par deux esters boroniques. Cette double protection va ainsi permettre une meilleure stabilité que la sonde à bras espaceur présentée dans ce chapitre 3.

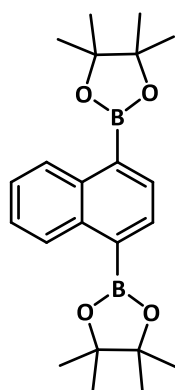


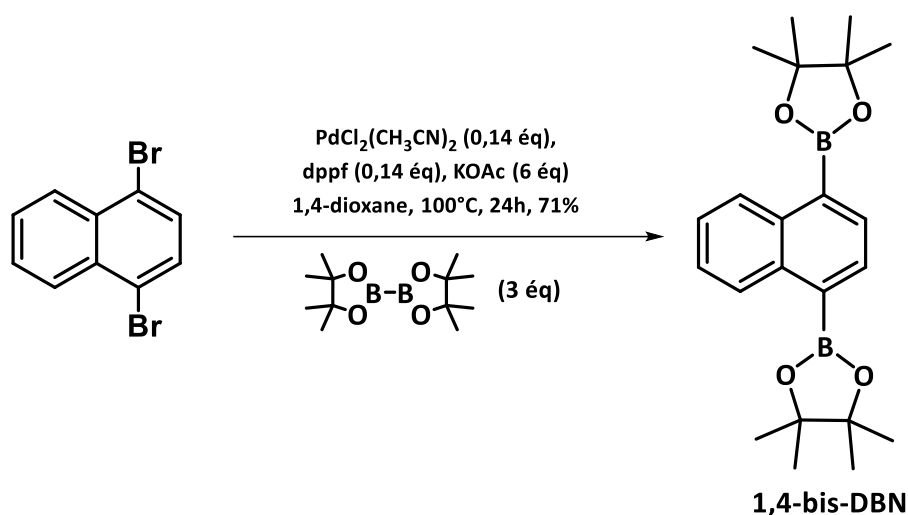
Figure 2-7 : Sonde double masquée 1,4-bis-DBN.

4. Références Bibliographiques

- (1) Pallu, J. Développement de Nouvelles Stratégies d'amplification Moléculaire Auto-Catalytique Avec Un Cyclage Redox, ED 388 Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire, Université Paris Diderot, 2020.
- (2) Pallu, J.; Rabin, C.; Creste, G.; Branca, M.; Mavré, F.; Limoges, B. Exponential Molecular Amplification by H₂O₂-Mediated Autocatalytic Deprotection of Boronic Ester Probes to Redox Cyclers. *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25* (31), 7534–7546. <https://doi.org/10.1002/chem.201900627>.
- (3) Branca, M.; Calvet, C.; Limoges, B.; Mavré, F. Specific Versus Non-Specific Response in Exponential Molecular Amplification from Cross-Catalysis: Modeling the Influence of Background Amplifications on the Analytical Performances. *ChemPhysChem* **2021**, *22* (15), 1611–1621. <https://doi.org/10.1002/cphc.202100342>.
- (4) Hinshelwood, C. N. 136. On the Chemical Kinetics of Autosynthetic Systems. *J. Chem. Soc.* **1952**, 745. <https://doi.org/10.1039/jr9520000745>.

Chapitre 3 : ETUDE MECANISTIQUE DE LA REACTION AUTOCATALYTIQUE IMPLIQUANT DES SONDES DOUBLEMENT MASQUEES.

Dans le chapitre précédent, la réaction de catalyse redox croisée a été décrite formellement sur la base d'un modèle moléculaire simple, avec une illustration qui repose sur des résultats préalablement obtenus avec une sonde monoester boronique à bras espaceur auto-immolant. Cette sonde permet la détection autocatalytique du peroxyde d'hydrogène avec des performances analytiques de l'ordre du submicromolaire. Cependant, ces performances sont limitées par la réponse non-spécifique importante en l'absence d'analyte. Cette réponse non-spécifique a été démontrée comme étant la conséquence d'un manque de stabilité des réactifs de départ, et plus particulièrement d'un manque de stabilité de la sonde monoester boronique à bras espaceur. C'est ce qui a conduit à développer de nouvelles sondes esters boroniques au cours de la thèse de Justine Pallu¹. Parmi les différentes sondes développées, celle reposant sur le double masquage par un groupement pinacol ester boronique des deux fonctions hydroxyles de la 1,4-naphthohydroquinone s'est révélée particulièrement intéressante. Cette sonde 1,4-bis(4,4,5,5-tetraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)naphthalène (ou **1,4-bis-DBN**) a été synthétisée au laboratoire par M. Branca, T. Moreira et A. Pastor selon une procédure modifiée de Miyaura² comme indiqué ci-dessous.



L'étude détaillée de la réactivité de cette sonde doublement protégée dans des conditions d'autocatalyse avait déjà été commencée par Justine Pallu¹. Lorsque j'ai démarré mon travail de thèse, Il restait un certain nombre d'expériences à faire pour finaliser l'étude mécanistique et cela a donc constitué une partie importante mon travail de début de thèse, laquelle a conduit à la publication de l'article : *Exponential amplification by redox cross-catalysis and unmasking of doubly protected molecular probes*³. Ce chapitre retranscrit donc, en grande partie, les résultats reportés dans cet article.

1. Preuve de concept de stabilisation de la sonde par double masquage et application à la réaction autocatalytique

1.1. Stabilité et réactivité de déprotection oxydative de la sonde doublement masquée

L'hypothèse qui a conduit à synthétiser la sonde **1,4-bis-DBN** est que la double substitution des groupements hydroxyles de la 1,4-naphthoquinone par un groupement pinacol ester boronique pouvait permettre de gagner en stabilité dans la mesure où nous soupçonnions que l'instabilité de la sonde monoprotégée était liée au groupement hydroxy (*i.e.*, naphthol) en para du groupement protecteur.

La stabilité de la sonde **1,4-bis-DBN** a tout d'abord été examinée dans un tampon Tris de pH 8.5 et comparée dans les mêmes conditions à la sonde monoester boronique **4-DBN** (dont la formule développée est rappelée dans l'encart de la **Figure 3-1A**). Pour cela nous avons suivi sur plusieurs heures la variation d'absorbance à $\lambda = 262$ nm (longueur d'onde permettant de suivre spécifiquement l'apparition de la 1,4-NQ) de chacune des sondes diluées dans le tampon à 50 μ M.

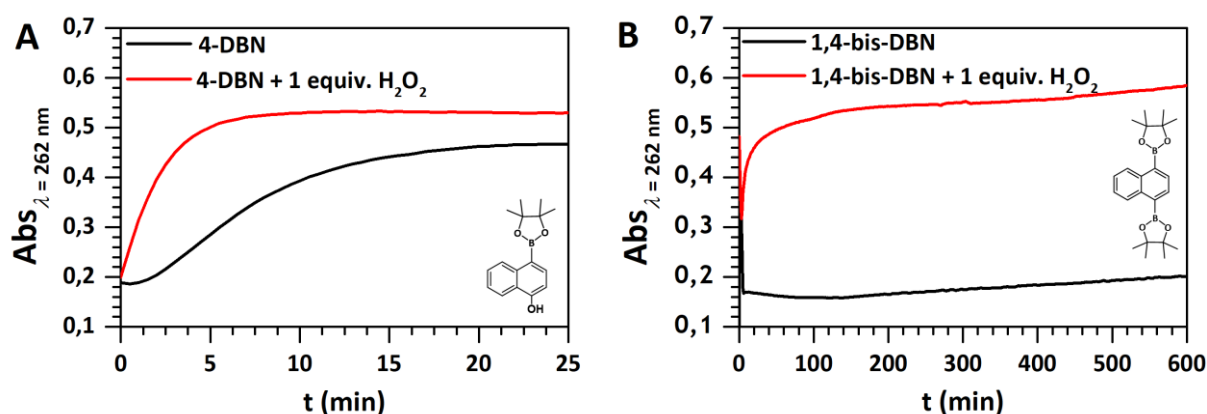


Figure 3-1 : Suivi spectrophotométrique UV-Visible à 262 nm (longueur d'onde spécifique de la 1,4-naphthoquinone) de solutions contenant 50 μ M de sonde **(A)** 4-DBN ; **(B)** 1,4-bis-DBN seule (en noir) ou en présence de 1 équivalent de H₂O₂ (en rouge), dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μ M EDTA à pH 8.5.

La comparaison du suivi cinétique des molécules **1,4-bis-DBN** et **4-DBN** (courbes en noir des graphes de la **Figure 3-1**) montre que la sonde doublement protégée est bien plus stable. En effet, l'absorbance de la sonde **1,4-bis-DBN** à $\lambda = 262$ nm reste stable ($\sim 0,18$) sur plusieurs heures contrairement à la sonde **4-DBN** qui augmente de façon non-linéaire après quelques minutes. L'hypothèse d'une stabilisation de la sonde par le double masquage des fonctions hydroxyles est donc ici bien vérifiée. Cette meilleure stabilité de la sonde **1,4-bis-DBN** doit théoriquement permettre d'améliorer les performances analytiques de détection d'H₂O₂ dans des conditions d'autocatalyse.

La réactivité des deux sondes vis-à-vis d'un équivalent d' H_2O_2 a également été examinée dans les mêmes conditions de pH et tampon (**Figure 3-1**, courbes en rouges). On remarque que dans le cas de la nouvelle sonde **1,4-bis-DBN**, la déprotection du double masquage est très efficace puisqu'elle conduit à la transformation complète de la sonde en 1,4-NQ avec un seul équivalent d' H_2O_2 en quelques dizaines de minutes. Cette cinétique de déprotection apparaît cependant comme un peu plus lente que pour la sonde monoester boronique **4-DBN**, un résultat qui peut s'expliquer en partie par le fait que la sonde **1,4-bis-DBN** nécessite deux équivalents d' H_2O_2 pour générer la 1,4-NQ (voir **Figure 3-2**). Ainsi pour seulement 0,5 équivalent d' H_2O_2 par groupement pinacol ester (*i.e.*, 0,5 équivalent par site ou 1 équivalent molaire), la transformation en 1,4-NQ est complète, ce qui peut s'expliquer par la formation du nouvel équivalent d' H_2O_2 lorsque la naphthohydroquinone générée s'oxyde en 1,4-NQ *via* O_2 . Une question qui vient donc immédiatement à l'esprit et à laquelle il va être important de répondre est dans quelle mesure l'instabilité de l'intermédiaire monoester boronique en présence d' O_2 peut permettre une déprotection complète de la sonde, et ce même en présence d'une quantité d' H_2O_2 largement sous-stœchiométrique. A noter également que l'apparition de la quinone commence dès les premiers instants de la réaction, ce qui laisse supposer que les intermédiaires monoester boronique et naphthohydroquinone ne s'accumulent pas (c'est-à-dire que les étapes de deuxième déprotection ainsi que d'auto-oxydation de la naphthohydroquinone sont probablement rapides en comparaison de la première étape de déprotection). Pour conclure, la sonde **1,4-bis-DBN** possède une très bonne stabilité en l'absence d' H_2O_2 et réagit également efficacement avec ce dernier.

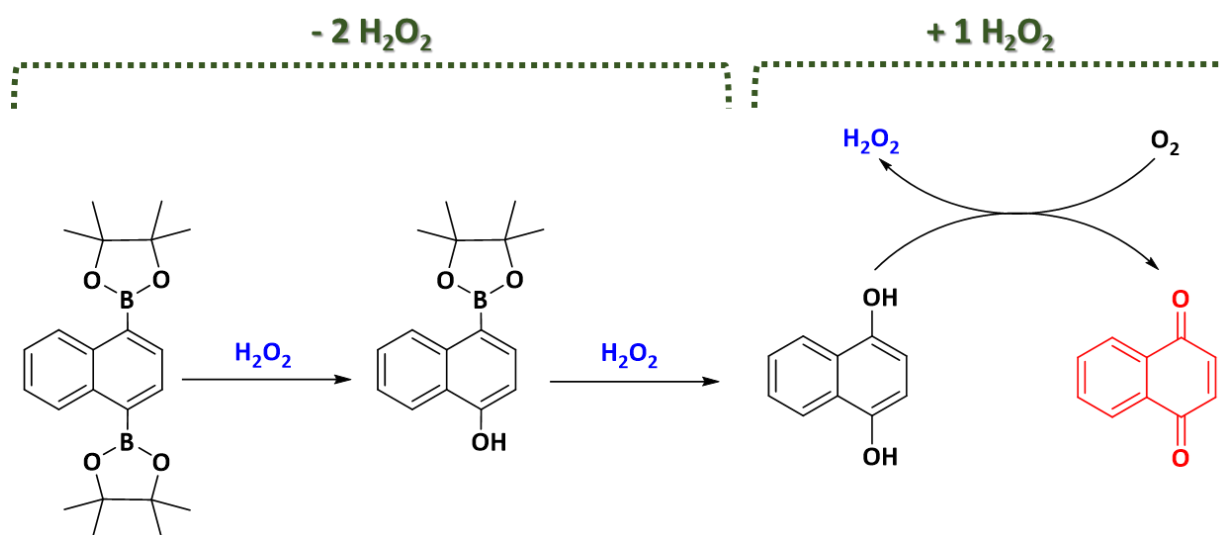


Figure 3-2 : Double coupure oxydative de la sonde 1,4-bis-DBN.

1.2. Réaction autocatalytique avec la sonde doublement masquée et le couple réducteur enzymatique DI/NADH

L'étape suivante a consisté à étudier la réactivité de la sonde **1,4-bis-DBN** dans des conditions d'autocatalyse, c'est-à-dire en présence d'un réducteur capable d'activer la seconde boucle catalytique de production d' H_2O_2 médiée par le couple 1,4-NQ/1,4-NQH₂. Pour cela nous avons utilisé le système de réduction enzymatique diaphorase/NADH qui permet de réduire efficacement la 1,4-NQ en 1,4-NQH₂, tout en limitant le déclenchement non-spécifique de l'autocatalyse en raison de la bonne stabilité du substrat NADH qui ne s'oxyde que très lentement en milieu tamponné aéré, légèrement basique. Le schéma réactionnel de base que nous pouvons aisément proposer avec cette nouvelle sonde **1,4-bis-DBN** (**Figure 3-3**) repose, comme précédemment, sur l'activation croisée de deux boucles catalytiques, dont la première implique cette fois-ci deux étapes de déprotection, avec une première qui conduit à l'intermédiaire monoester boronique (c'est-à-dire le **4-DBN**) et une deuxième qui peut se faire soit *via* H_2O_2 si la concentration est suffisante, soit *via* l'instabilité de l'intermédiaire **4-DBN** (qu'on suppose être liée à une réaction de déprotection oxydative *via* O_2).

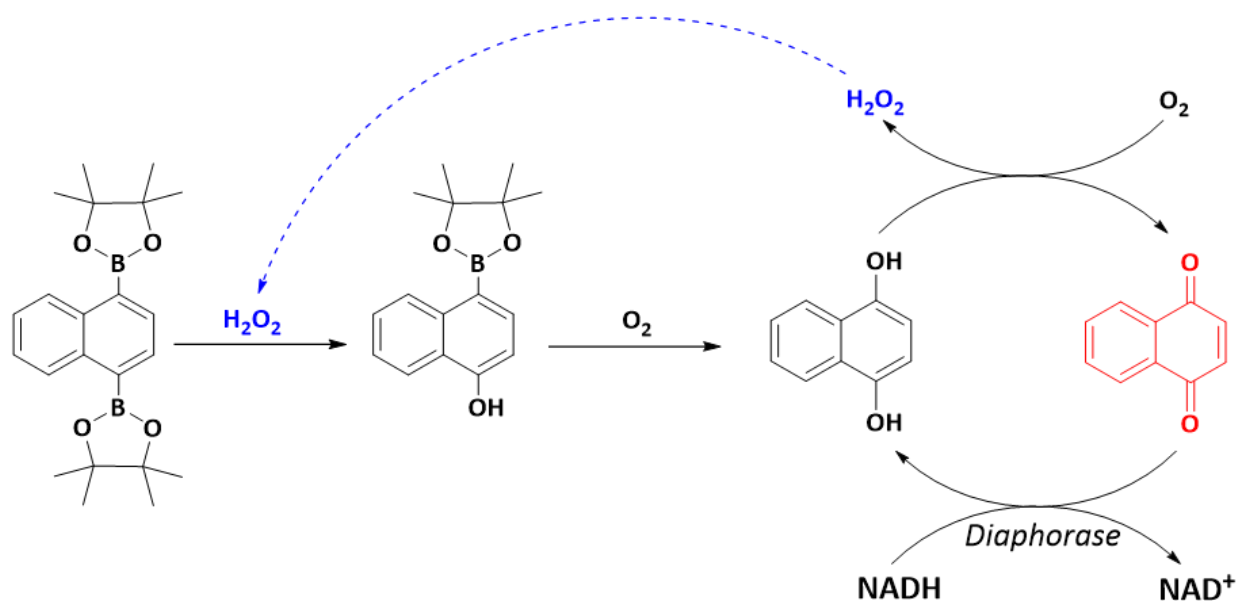


Figure 3-3 : Réaction autocatalytique avec la sonde 1,4-bis-DBN en présence de H_2O_2 , du couple réducteur DI/NADH et d'oxygène dissous. En bleu H_2O_2 agent oxydatif de la déprotection de la sonde diboronique ; En rouge le catalyseur de la boucle catalytique 2 de production d' H_2O_2 médiée par le cyclage redox de la 1,4-naphthoquinone entre le réducteur DI/NADH et l'oxydation O_2 dissous.

Les mêmes conditions expérimentales d'autocatalyse que celles qui avaient été jusqu'ici utilisées avec les autres sondes ont été appliquées, c'est-à-dire 50 μM de sonde, 10 nM de diaphorase, 250 μM de NADH, et des concentrations variables en H_2O_2 (incluant le blanc sans H_2O_2) dans un tampon Tris 0.1 M (+ 10 μM d'EDTA) de pH 8.5.

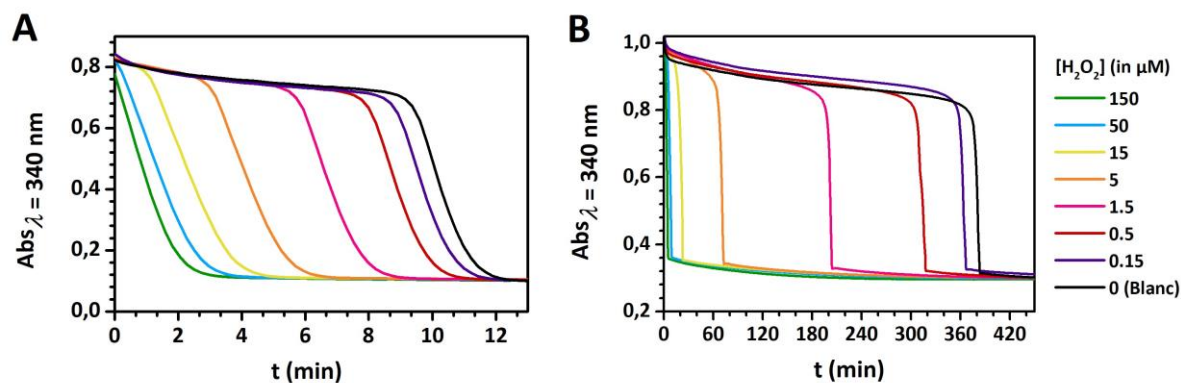


Figure 3-4 : Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à 340 nm de la réaction entre 50 μM de sonde et une gamme de concentration en H_2O_2 , en présence de 10 nM DI et 250 μM NADH dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 8.5. $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (μM) : en vert 150, en bleu 50, en jaune 15, en orange 5, en rose 1.5, en rouge 0.5, en violet 0.15 et en noir 0 (Blanc). Sonde **(A)** 4-DBN **(B)** 1,4-bis-DBN.

Le suivi cinétique de la réaction autocatalytique a également été réalisé dans les mêmes conditions que précédemment pour les autres sondes, c'est-à-dire à une longueur d'onde de $\lambda = 340$ nm qui permet de suivre l'évolution de la concentration en NADH en fonction du temps mais aussi en fonction de la concentration initiale en H_2O_2 (**Figure 3-4**). La consommation du NADH représente le degré d'avancement de la réaction autocatalytique. Le suivi de l'absorbance du NADH forme un tracé sigmoïdal en fonction du temps, avec d'abord une phase de latence durant laquelle la concentration en NADH n'évolue que très peu (DO autour de 0.9), suivi ensuite d'une décroissance exponentielle signant la consommation accélérée du NADH jusqu'à son épuisement total lorsque l'absorbance ne varie plus. Ce comportement est propre à une réaction autocatalytique, avec une phase de latence d'autant plus lente que la concentration initiale en H_2O_2 est faible. A partir des tracés cinétiques de la **Figure 3-4**, il est possible d'en extraire le demi temps de réaction, $t_{1/2}$ (le temps au bout duquel la moitié du NADH a été consommée) pour chacune des concentrations en H_2O_2 , et ce jusqu'à ce qu'on finisse par butter sur le $t_{1/2}$ de la réponse non-spécifique obtenue en l'absence d' H_2O_2 .

La comparaison des courbes sigmoïdales de la **Figure 3-4** indique que la nouvelle sonde **1,4-bis-DBN** conduit à des temps de réponse (*i.e.*, $t_{1/2}$) bien plus longs (jusqu'à 5 heures pour les concentrations les plus faibles en H_2O_2 contre une dizaine de minutes pour la sonde **4-DBN**). Cela peut s'expliquer en première approximation par une plus faible cinétique de déprotection de la sonde **1,4-bis-DBN**, mais également par le fait que cette sonde peut nécessiter deux équivalents d' H_2O_2 pour être totalement déprotégée. La **Figure 3-5** reporte la courbe de calibration que l'on peut tracer à partir des $t_{1/2}$ en fonction du logarithme de la concentration initiale en H_2O_2 . Nous obtenons ainsi une gamme dynamique de concentration en H_2O_2 sur environ deux décades (de 0,2 à 20 μM), avec une limite de détection de 0,15 μM . Ainsi, malgré une bien meilleure stabilité de la sonde, les performances analytiques de cette nouvelle sonde **1,4-bis-DBN** ne sont pas meilleures par rapport à celles de la sonde

4-DBN, avec même l'inconvénient de conduire à des temps de réponse beaucoup plus longs. Il semble donc que le gain en stabilité de la sonde est contrecarré par une cinétique d'autocatalyse moins favorable.

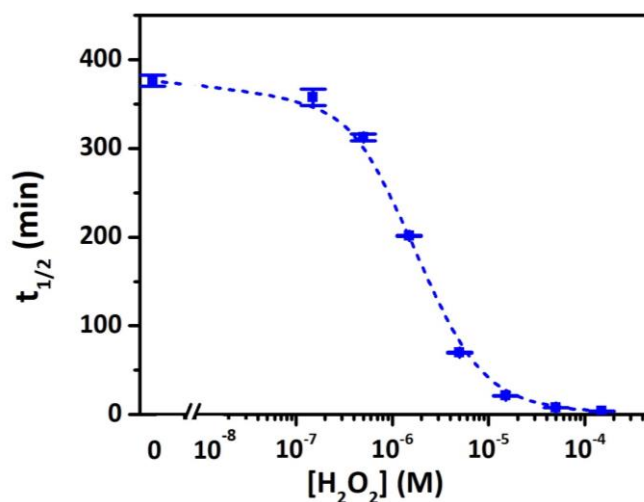


Figure 3-5 : Courbe de calibration semi-logarithmique obtenue en relevant les $t_{1/2}$ en **Figure 3-4B** en fonction du log de $[H_2O_2]$.

Afin de d'avoir une meilleure compréhension des raisons qui conduisent à cette réactivité plus lente de la sonde **1,4-bis-DBN**, nous avons entrepris de réaliser une étude mécanistique détaillée de chacune de boucles catalytiques, comme nous allons le voir maintenant avec tout d'abord l'étude de la boucle 1 caractérisant la déprotection oxydative de la sonde doublement masquée.

1.3. Etude mécanistique et cinétique de la déprotection oxydative de la sonde doublement masquée

Le suivi cinétique de la déprotection de la sonde **1,4-bis-DBN** par H_2O_2 a été réalisé sur microplaque en suivant par spectroscopie UV-vis à 262 nm l'apparition de la 1,4-NQ suite à l'ajout de concentrations sous- et sur-stœchiométriques d' H_2O_2 (allant de 5 à 150 μM) à des solutions de Tris 0.1 M (+ 10 μM EDTA) à pH 8.5, contenant 50 μM de sonde **1,4-bis-DBN** (**Figure 3-6**).

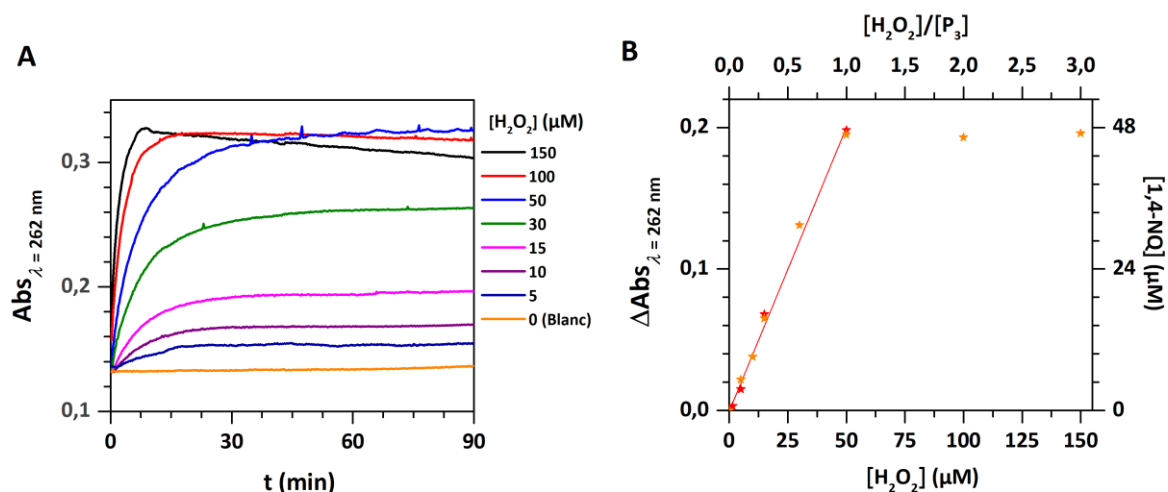


Figure 3-6 : (A) Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à $\lambda = 262$ nm de la déprotection de 50 μM la sonde 1,4-bis-DBN en présence de 0 à 150 μM d' H_2O_2 , dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA. $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (μM) : 150 (noir), 100 (rouge), 50 (bleu), 30 (vert), 15 (rose), 10 (violet), 5 (bleu marine), 0 (orange). (B) Variation maximale de la DO à $\lambda = 262$ nm entre le début et la fin de réaction en fonction de la concentration initiale de $[\text{H}_2\text{O}_2]$ en μM . En ligne pleine la régression linéaire $\Delta\text{Abs}_{262\text{nm}} = 0,00401 \times [\text{H}_2\text{O}_2] - 5 \times 10^{-4}$ ($r^2 = 0,995$). À droite correspondance en concentration de 1,4-napthoquinone en μM générée au cours de la déprotection (calculée à partir de la pente de la régression linéaire avec $\Delta\epsilon = 7010 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ entre la 1,4-NQ et la sonde).

Les cinétiques montrent que dans des conditions sur-stœchiométriques en H_2O_2 (50, 100 et 150 μM d' H_2O_2) on obtient une transformation complète de la sonde en 1,4-NQ (correspondant à une variation maximale de DO de 0.32) et ceci d'autant plus rapidement que la concentration initiale en H_2O_2 est importante. En revanche, dans des conditions sous-stœchiométriques (c'est-à-dire entre 5 et 30 μM d' H_2O_2) la valeur d'absorbance maximale de 0,32 n'est plus atteinte, ce qui indique une transformation partielle de la sonde en 1,4-NQ. Si on reporte le maximum d'absorbance atteint en fonction de la concentration sous-stœchiométrique en H_2O_2 on obtient une relation linéaire (Figure 3-6B) qui signifie que l'on a affaire à une transformation stœchiométrique de la sonde en 1,4-NQ par H_2O_2 . Ce comportement peut s'expliquer par le fait qu'il est nécessaire de consommer 2 équivalents d' H_2O_2 par sonde pour produire un équivalent de 1,4-NQH₂, et que chaque équivalent de 1,4-NQH₂ peut régénérer un équivalent d' H_2O_2 *via* l'oxydation de la quinone par O_2 . Cependant, ce comportement laisse également supposer que l'étape de deuxième déprotection par H_2O_2 est beaucoup plus rapide que la cinétique d'instabilité du monoester boronique intermédiaire pouvant conduire à la 1,4-NQH₂. Cela suggère également que la réaction d'oxydation de la 1,4-NQH₂ par O_2 est efficace avec un rendement de production en H_2O_2 proche de 100%⁴.

A partir de là, on peut envisager de proposer un mécanisme de déprotection de la sonde **1,4-bis-DBN** (Figure 3-7) qui prend en compte ce qu'on avait précédemment appris de la sonde **4-DBN**, à savoir la dégradation de cette sonde en 1,4-NQH₂ *via* O_2 , sa protodéboronation lente en 1-naphthol,

et bien entendu sa déprotection en 1,4-NQH₂ par H₂O₂. Les notations QH₂ et Q représentent ici respectivement la naphthohydroquinone et naphthoquinone.

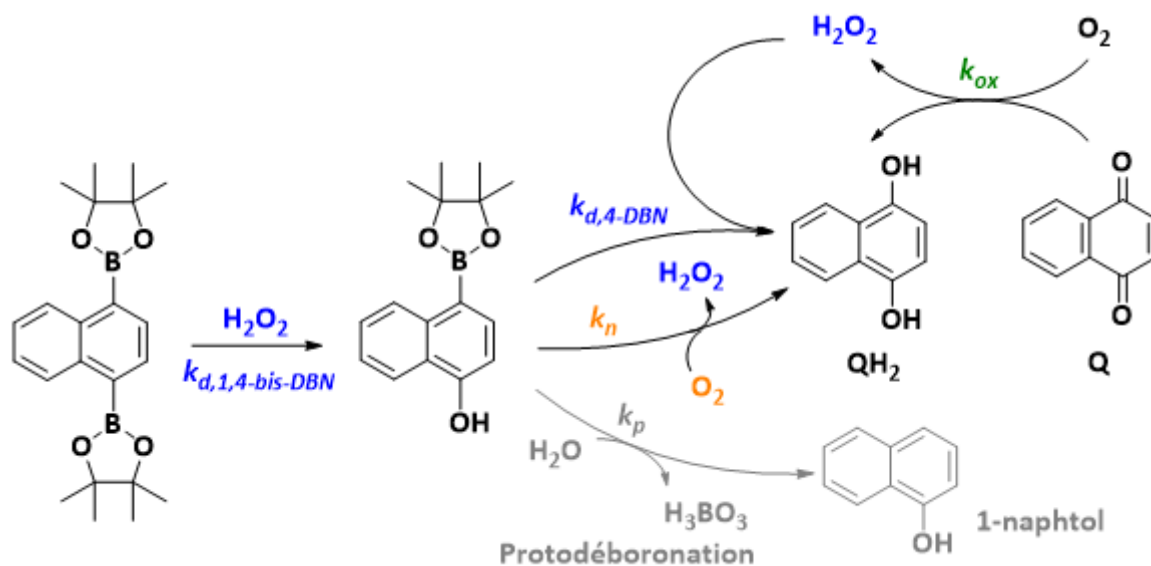
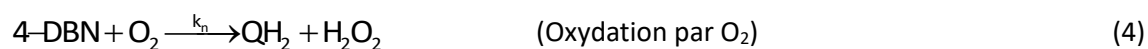


Figure 3-7 : Schéma réactionnel de double déprotection de la sonde 1,4-bis-DBN ainsi que instabilités associées. En bleu la réactivité de clivage oxydation par H₂O₂ des esters pinacols boroniques, en orange la réaction non-spécifique d'oxydation par O₂ dissous, et en gris la réactivité des esters boroniques protodéboronation en solution aqueuse.

Nous pouvons réécrire ce schéma réactionnel comme suit :



La connaissance des constantes cinétiques qui le caractérise doit permettre de prédire les cinétiques expérimentales de la **Figure 3-6**. Les valeurs de $k_{d,4\text{-DBN}} = 300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{ox} = 3300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_n = 1,2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, et $k_p = 0,0004 \text{ s}^{-1}$ ont été déterminées précédemment au cours du travail de thèse de Justine Pallu¹. Il est raisonnable de considérer que ces constantes cinétiques restent ici les mêmes. Ainsi, la seule nouvelle constante cinétique que l'on ne connaît pas est $k_{d,1,4\text{-bis-DBN}}$ (le facteur 2 devant cette constante cinétique est justifié par la stœchiométrie de 2 sites possibles d'attaque de la sonde par H₂O₂). La simulation de ce mécanisme à l'aide du logiciel libre COPASI (les données expérimentales

d'absorbance sont normalisées afin d'être comparées aux concentrations normalisées obtenues par simulation numérique) et l'ajustement de la constante $k_{d,1,4\text{-bis-DBN}}$ inconnue à une valeur de $35 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, nous a permis d'obtenir les courbes simulées de la **Figure 3-8B** (courbes en pointillés) qui globalement reproduisent assez bien les courbes expérimentales de la **Figure 3-8A** aux concentrations en H_2O_2 les plus fortes, mais en revanche un peu moins bien les concentrations en H_2O_2 les plus faibles.

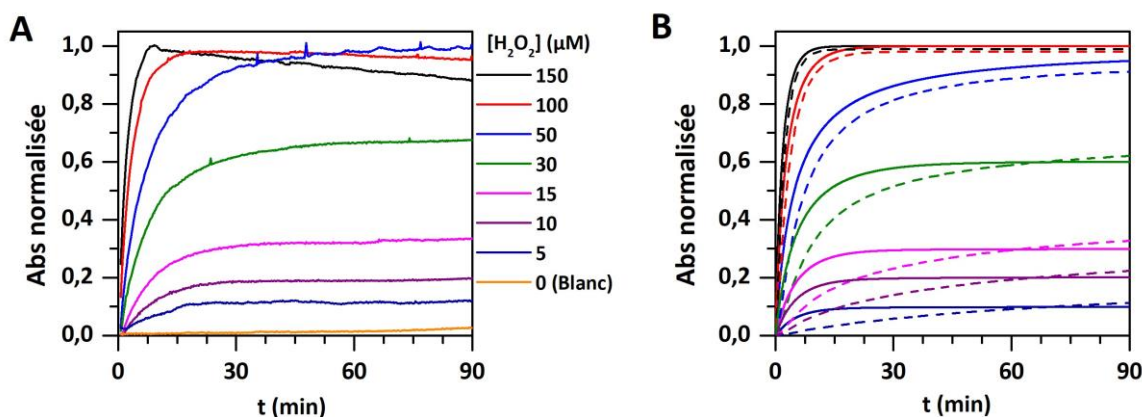


Figure 3-8 : (A) Résultats expérimentaux normalisés du suivi cinétique présentés en **Figure 3-6**. (B) Simulation numérique de l'apparition de la concentration normalisée de 1,4-NQ au cours du temps dans les mêmes conditions que (A) avec le modèle de réaction (1) à (5) ci-dessus. En pointillés : $k_{d,1,4\text{-bis-DBN}} = 35 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_{d,4\text{-DBN}} = 300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_{\text{ox}} = 3300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_n = 1,2 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, et $k_p = 0,0004 \text{ s}^{-1}$; en trait plein : $k_{d,1,4\text{-bis-DBN}} = 35 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_{d,4\text{-DBN}} > 3000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_{\text{ox}} = 3300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_n = 1,2 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, et $k_p = 0,0004 \text{ s}^{-1}$.

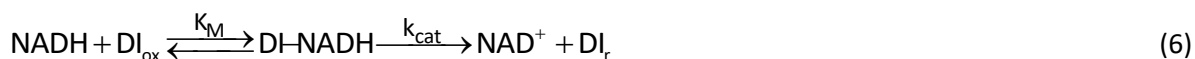
Pour pouvoir simuler un peu mieux les données expérimentales (simulations en trait plein de la **Figure 3-8B**), nous avons constaté qu'il était nécessaire de considérer une constante cinétique de deuxième déprotection plus rapide ($k_{d,4\text{-DBN}} > 3000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) que celle déterminée pour la sonde **4-DBN** ($k_{d,4\text{-DBN}} = 300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Ce résultat laisse supposer qu'en parallèle de la réaction de déprotection par H_2O_2 , d'autres réactions rapides contribuent à une accélération de cette déprotection. Une hypothèse est que la réaction d'instabilité attribuée au monoester boronique (réaction 3) repose sur un mécanisme plus complexe, non pas à 2 électrons comme supposé initialement, mais à 1 électron entre O_2 et la sonde **4-DBN**, ce qui conduirait à produire des espèces intermédiaires radicalaires (comme par exemple $\text{O}_2^{\cdot-}$) qui par un processus radicalaire en chaîne pourrait contribuer à accélérer la deuxième réaction de déprotection. Nous reviendrons sur ces aspects un peu plus tard.

1.4. Modélisation de la réaction autocatalytique

Pour pouvoir modéliser la réaction autocatalytique, nous avons dans un premier temps considéré un mécanisme simple impliquant un minimum de 7 réactions élémentaires, c'est-à-dire les réactions 1 à 5 que nous venons de discuter au paragraphe précédent et qui décrivent la boucle 1, auxquelles nous avons ajouté les réactions de réduction de la naphthoquinone en

naphthohydroquinone par le couple diaphorase / NADH. Cette réduction enzymatique relève d'un mécanisme classique de type « ping-pong », défini par les deux demi-réactions suivantes :

- Une première demi-réaction en deux étapes qui suit un mécanisme Michaelis-Menten entre le NADH et la forme oxydée de l'enzyme DI_{ox} (caractérisée par une constante de Michaelis-Menten K_M et une constante catalytique k_{cat} de turnover).



- Une deuxième demi-réaction bimoléculaire de réduction à deux électrons de la naphthoquinone (ici Q) par la forme réduite de l'enzyme DI_r (caractérisée par une constante cinétique d'ordre 2 k_{red}).



Une autre manière de représenter ce ping-pong enzymatique est reportée **Figure 3-9**. Les paramètres cinétiques de ces deux demi-réactions ont été dans un premier temps repris d'un papier publié par l'équipe⁵ (*i.e.*, $K_M = 60 \mu M$, $k_{cat} = 1200 s^{-1}$ et $k_{red} = 1.5 \times 10^9 M^{-1}.s^{-1}$) et dans lequel la naphthoquinone était la ménadione (ou 2-méthyl-1,4-naphthoquinone).

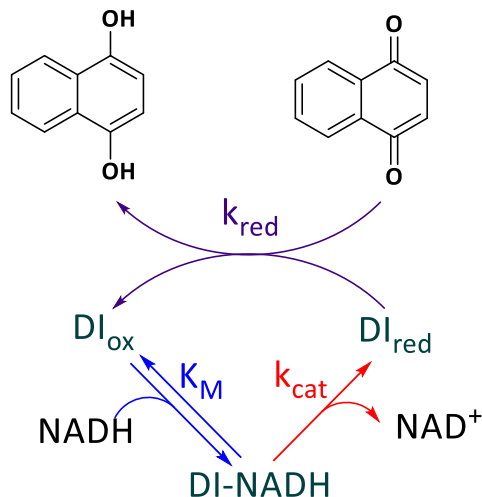


Figure 3-9 : Mécanisme de réduction de la naphthoquinone par le ping-pong enzymatique du couple diaphorase / NADH.

La simulation numérique du mécanisme autocatalytique formé des réactions 1 à 7 a été réalisé à l'aide du logiciel COPASI. Les simulations pour différentes concentrations en H_2O_2 sont rassemblées **Figure 3-10**.

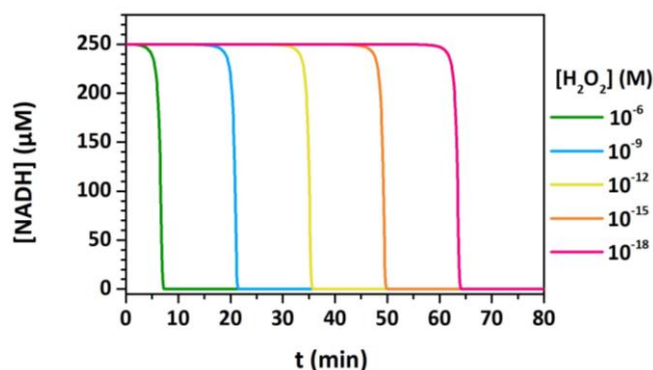
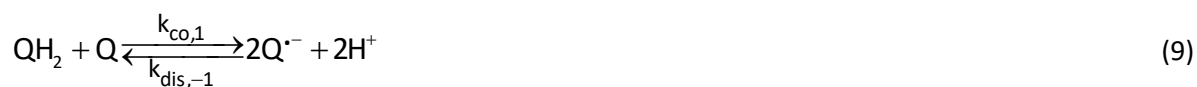


Figure 3-10 : Simulation numérique entrée 1 (voir **Tableau 3-1** plus bas) de la consommation du NADH au cours du temps avec le mécanisme réactionnel des équations 1 à 7 avec les constantes suivantes : $k_{d,1,4\text{-bis-DBN}} = 35 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{d,4\text{-DBN}} = 300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{ox} = 3300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_n = 1,2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_p = 0,0004 \text{ s}^{-1}$, : $K_M = 60 \text{ µM}$, $k_{cat} = 1200 \text{ s}^{-1}$ et $k_{red} = 1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Les valeurs des concentrations entrées dans la simulation sont les mêmes qu'expérimentalement en **Figure 3-4**, *i.e.* 50 µM de sonde 1,4-bis-DBN, 250 µM de NADH et 10 nM de diaphorase.

L'allure sigmoïdale des cinétiques de consommation du NADH correspond bien à celles obtenues expérimentalement. Cependant, les temps de réponse simulés ne sont pas du tout en accord avec l'expérience, montrant un facteur 28 d'écart en temps entre la simulation (**Figure 3-10**) et l'expérience (**Figure 3-4B**). Notre avons émis l'hypothèse que ce manque de concordance était lié à notre description mécanistique beaucoup trop simplifiée de la réaction 3 d'auto-oxydation de la 1,4-NQH₂ en 1,4-NQ. En effet, l'auto-oxydation des hydroquinones est connue pour être un mécanisme relativement complexe de réaction en chaîne radicalaire auto-induite^{4,6,7}, dans lequel les espèces semiquinone Q^{•-} et anion superoxyde O₂^{•-} jouent un rôle de propagateurs de chaînes selon le schéma réactionnel suivant :



Ce mécanisme radicalaire en chaîne est initié par la réaction 8 d'oxydation à 1 électron de QH₂ en semiquinone par l'oxygène. Cette réaction d'initiation est décrite comme étant très lente car elle implique un changement de spin interdit⁸. Elle reste néanmoins capable de créer une faible quantité de semiquinone Q^{•-}, qui peut alors se propager *via* les réactions 9, 10 et 13. Cette propagation accélère alors l'oxydation de la 1,4-NQH₂ par O₂ de manière indirecte et auto-induite. En effet, le produit Q joue le rôle de catalyseur de sa propre formation par la réaction 2 de comproportionation. Cette auto-oxydation par réaction en chaîne constitue donc en elle-même un processus autocatalytique, avec Q comme catalyseur qui s'accumule au cours du temps. Ainsi, au bilan de ce processus en chaîne, QH₂ et O₂ sont respectivement consommés par les réactions 9, 11 et 10, tandis que Q est produit par oxydation *via* les réactions 10 et 13. Cela prédit un rapport stœchiométrique 1:1 entre QH₂ et O₂, et donc un rapport de production Q/H₂O₂ 1:1.

L'incorporation de ce mécanisme d'auto-oxydation radicalaire en chaîne au mécanisme global d'autocatalyse permet donc de proposer le schéma réactionnel de la **Figure 3-11**.

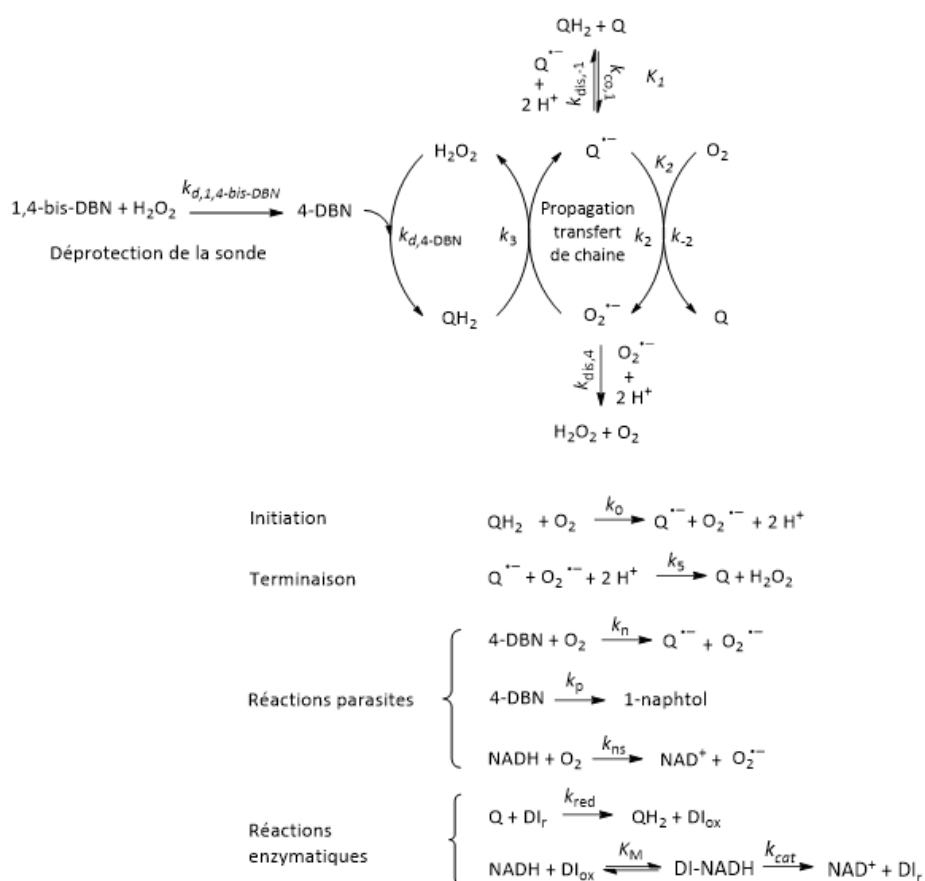


Figure 3-11 : Mécanisme global assumé pour la réaction autocatalytique par catalyse croisée avec les réactions de déprotection des sondes boroniques par H₂O₂ ainsi que leurs instabilités, les réactions du mécanisme ping-pong enzymatique de la diaphorase avec son substrat NADH pour la réduction de la naphthoquinone, et le mécanisme radicalaire en chaîne d'auto-oxydation de la naphthohydroquinone. Les constantes cinétiques sont données pour les différentes simulations dans le **Tableau 3-1**.

La sonde doublement masquée **1,4-bis-DBN** ayant été montrée comme particulièrement stable dans nos conditions expérimentales, nous avons considéré que la réponse non-spécifique ne pouvait venir que de l'instabilité du NADH, et en particulier de l'auto-oxydation du NADH en présence d' O_2 , qui bien que très lente conduit inévitablement à la production d' $O_2^{\cdot-}$ et donc d'espèces réactives de l'oxygène. Nous avons donc inclus cette réaction à la liste des « Réactions parasites » avec une constante cinétique k_{ns} . La constante cinétique de cette réaction n'étant pas connue, nous l'avons estimée via la simulation.

D'autre part, l'auto-oxydation de la naphthohydroquinone étant désormais décrite par un mécanisme radicalaire impliquant l'ion superoxyde, il est plus cohérent de décrire la réaction 4 d'auto-oxydation de l'intermédiaire monoboronique **4-DBN** par un transfert à 1 électron conduisant à la formation de $Q^{\cdot-}$ et $O_2^{\cdot-}$.

La plupart des réactions étant dépendantes du pH, il serait nécessaire de considérer la pH-dépendance des constantes cinétiques. Cependant, par souci de simplicité, nous avons opté pour ne prendre en compte que les constantes apparentes à pH 8.5 car c'est majoritairement à ce pH que nous avons réalisé nos expériences. Une grande partie des constantes cinétiques d'auto-oxydation de la 1,4-NQH₂ ont été extraites de la littérature et pour certaines corrigées de la valeur de pH, tandis que d'autres ont été ajustées afin de reproduire au mieux les données expérimentales. L'ensemble des constantes cinétiques employées pour nos simulations numériques sont regroupées dans le **Tableau 3-1**. Elles sont données pour 4 jeux de simulations différentes, avec en premier les paramètres ayant permis de simuler les courbes cinétiques de la **Figure 3-10** selon le schéma réactionnel simplifié (réactions 1 à 7), puis ensuite 3 autres séries de paramètres ayant permis de simuler le schéma réactionnel plus complet de la **Figure 3-11**.

Groupe de réaction	Entrée Constante	1	2	3	4
		Réactions spécifiques de déprotection de la sonde	$k_{d, 1,4\text{-bis-DBN}} (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	35	35
	$k_{d,4\text{-DBN}} (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	300	300	300	300
Réactions parasites non-spécifique	$k_n (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	1.2	1.2	0	0
	$k_p (\text{s}^{-1})$	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004
	$k_{ns} (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	-	10^{-4}	2.75×10^{-3}	4.1×10^{-3}
Réactions du ping-Pong Enzymatique	$K_M (\mu\text{M})$	60	60	60	60
	$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	1200	1200	1200	1200
	$k_{red} (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	1.5×10^9	1.5×10^9	1.5×10^9	10^8
Réactions d'auto-oxydation de 1,4-NQH ₂ (Propagation transfert de chaîne)	$k_{ox} (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	3300	-	-	-
	$k_0 (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	-	0.001	0.001	0.001
	$k_{co,1}; k_{dis,-1} (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	-	$66\ 000$; 10^8	$66\ 000$; 10^8	$66\ 000$; 10^8
	$k_2; k_{-2} (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	-	4.4×10^7 ; 2×10^8	4.4×10^7 ; 2×10^8	4.4×10^7 ; 2×10^8
	$k_3 (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	-	8×10^4	8×10^4	5×10^4
	$k_{dis,4} (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	-	2×10^4	2×10^4	2×10^4
	$k_5 (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	-	2×10^9	2×10^9	2×10^9

Tableau 3-1 : Constantes cinétiques des simulations 1 à 4 de la réaction autocatalytique complète. En rouge les constantes cinétiques qui sont modifiées vis-à-vis de la précédente simulation.

Justification de k_0 : la constante cinétique de la réaction 8 est importante mais sa valeur ne joue pas sur la cinétique globale pour des valeurs inférieures à ou égales à $0.001 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, valeur que nous avons donc utilisée pour chacune des simulations.

Justification de $k_{co,1}$; $k_{dis,-1}$: la constante d'équilibre $K_1 = k_{co,1}/k_{dis,-1}$ de la réaction 9 est reportée dans la littérature⁹ à pH = 0 avec une valeur de $K_1 = 6.7 \times 10^{-21}$. En considérant les deux pK_a de la 1,4-NQH₂ ($pK_{a,1} = 9.48$ et $pK_{a,2} = 11.01$ d'après¹⁰), la valeur de K_1 peut être estimée comme étant égale à 7×10^{-4} à pH 8.5. Pour plusieurs semiquinones, les constantes cinétiques de dismutation $k_{dis,-1}$ sont également rapportées dans la littérature^{6,11-14} avec des valeurs généralement proches de la limite de diffusion ($3 \times 10^7 < k_{dis,-1} < 2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH physiologiques). Une valeur moyenne de $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a donc été choisie pour nos simulations, ce qui connaissant K_1 permet d'estimer la constante de comproportionation à $k_{co,1} = 66\ 000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Il est important de noter que la réaction 9 a une forte dépendance au pH en raison des deux pK_a de la 1,4-NQH₂.

Une autre manière d'accéder à la valeur de K_1 consiste à la calculer à l'aide des potentiels standards apparents qui caractérisent chacune des réductions successives à 1 électron de la 1,4-NQ en 1,4-NQH₂, c'est-à-dire à l'aide des potentiels standards apparents des couples Q/Q* ($E^0 = -0.140$ V/ENH d'après ¹⁵⁻¹⁷) et Q*/Q²⁻ ($E^0 = -0.131$ V/ENH d'après ⁴) et de la relation de Nernst suivante :

$$\Delta E_1 = E^0_{Q/Q^*} - E^0_{Q^*/Q^{2-}} = \frac{RT}{F} \ln(K_1)$$

Ainsi, à 20°C et à pH = 0, le calcul fournit une valeur de $K_1 = 0.7$, ce qui à pH 8.5 conduit à une valeur de $K_1 = 2.2 \times 10^{-4}$, donc proche de celle reportée plus haut.

Justification de k_2 ; k_{-2} : la constante d'équilibre $K_2 = k_2 / k_{-2}$ qui caractérise la réaction de transfert d'électron réversible par sphère externe entre Q* et O₂ (réaction 10) est, selon la théorie de Marcus, uniquement dépendante de la différence de potentiel entre les couples Q/Q* ($E^0_{Q/Q^*} = -0.140$ V/ENH) et O₂/O₂* ($E^0_{O_2/O_2^*} = -0.180$ V/ENH d'après ⁶) et donc de la relation de Nernst suivante :

$$\Delta E_2 = E^0_{O_2/O_2^*} - E^0_{Q/Q^*} = \frac{RT}{F} \ln(K_2)$$

Le fait que cette différence de potentiel soit légèrement négative ($\Delta E_2 = -40$ mV) signifie que l'oxydation à un électron de la 1,4-NQ* par O₂ est thermodynamiquement légèrement défavorable, avec des cinétiques qui restent cependant très rapides dans les deux sens de la réaction. Il est ainsi possible de déterminer une valeur de $K_2 = 0.2$ à 20°C. En considérant que la constante retour est de $k_{-2} = 2 \times 10^8$ M⁻¹.s⁻¹ (déterminée par radiolyse pulsée¹⁶), on obtient une valeur de $k_2 = 4.4 \times 10^7$ M⁻¹.s⁻¹. Ces deux valeurs concordent avec celles reportées par Loeff¹⁸, *i.e.* $k_2 = 3.7 \times 10^7$ M⁻¹.s⁻¹ et $k_{-2} = 1.8 \times 10^8$ M⁻¹.s⁻¹.

Justification de k_3 : les rares valeurs reportées pour la réaction 11 dans la littérature varient^{4,11} de 10⁴ à 10⁵ M⁻¹.s⁻¹, ce qui est suffisamment lent pour ne pas être en compétition avec la réaction 10 beaucoup plus rapide. Cependant, la valeur de cette constante est particulièrement importante pour la boucle 2 de recyclage redox et donc de manière plus globale pour la cinétique de l'autocatalyse. Dans nos premières simulations (entrées 2 et 3 du **Tableau 3-1**), nous avons utilisé la valeur reportée par Waite⁴ ($k_3 = 8 \times 10^{-4}$ M⁻¹.s⁻¹). Par la suite, nous l'avons légèrement ajustée à $k_3 = 5 \times 10^{-4}$ M⁻¹.s⁻¹ (entrée 4 du **Tableau 3-1**) afin de mieux rendre compte des résultats expérimentaux. De plus, la valeur de k_3 est supposée augmenter quand le potentiel de réduction de $E^0_{Q^*/QH_2}$ diminue, et tout comme $k_{co,1}$, elle est censée être fortement dépendante du pH.

Justification de $k_{dis,4}$: la réaction 12 de dismutation de l'ion superoxyde en H_2O_2 et O_2 est une réaction qui a été très largement étudiée. Une valeur de $k_{dis,4} = 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 8.5 peut être extraite de la revue de Ross¹⁹.

Justification de k_5 : la réaction 13 de dismutation croisée (également la réaction de fin de propagation de chaîne) est généralement décrite comme une réaction très rapide car thermodynamiquement très favorable au vu du potentiel très réducteur du couple $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$ ²⁰ par rapport à celui de $Q/Q^{\bullet-}$, même à pH 8.5. Une valeur de $k_5 = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,⁴ proche de la limite de diffusion, a donc été utilisée dans nos simulations.

1.4.1. Simulation avec l'entrée numéro 2 : auto-oxydation de l'intermédiaire monoester boronique activée

Une première série de simulations de la réaction autocatalytique avec les valeurs cinétiques de l'entrée 2 du **Tableau 3-1** a été réalisée et les courbes cinétiques résultantes sont montrées **Figure 3-12** pour différentes concentrations initiales en H_2O_2 . De ces courbes cinétiques ont été extrait les $t_{1/2}$ de manière à tracer la courbe de calibration correspondante présentée **Figure 3-13** (trait plein en vert). Bien que cette courbe simulée ne s'ajuste pas parfaitement avec les données expérimentales (points en rouges), l'échelle des temps sur lequel elle se positionne est en bien meilleur accord que ce qui avait été obtenu précédemment (**Figure 3-10**) avec les paramètres de l'entrée 1 du **Tableau 3-1** et le schéma réactionnel simplifié. Cela démontre toute l'importance de prendre en compte la complexité du mécanisme d'auto-oxydation de la 1,4-NQH₂. Cependant, pour les plus faibles concentrations en H_2O_2 , la courbe de calibration simulée s'éloigne des données expérimentales.

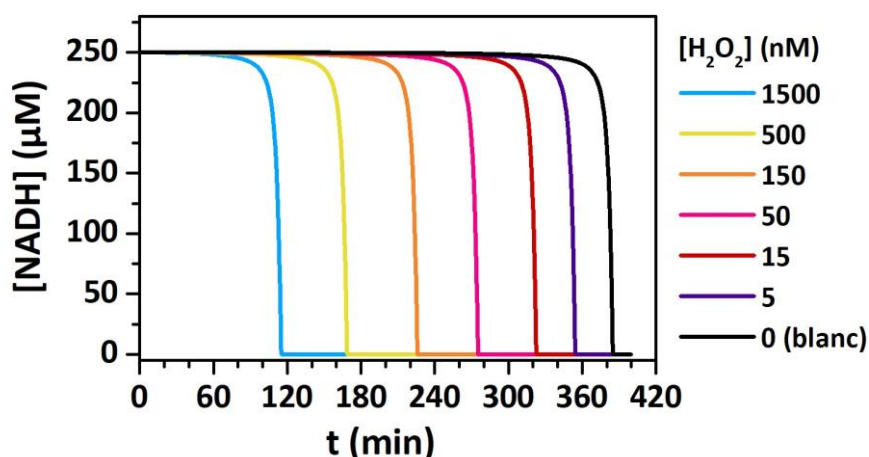


Figure 3-12 : Simulation numérique avec les valeurs des constantes cinétiques de l'entrée 2 (voir **Tableau 3-1**). La consommation du NADH au cours du temps est représentée avec le mécanisme réactionnel décrit en **Figure 3-11**. Les valeurs des concentrations entrées dans les simulations sont les mêmes qu'expérimentalement en **Figure 3-4**, *i.e.* 50 μM de sonde 1,4-bis-DBN, 250 μM de NADH et 10 nM de diaphorase.

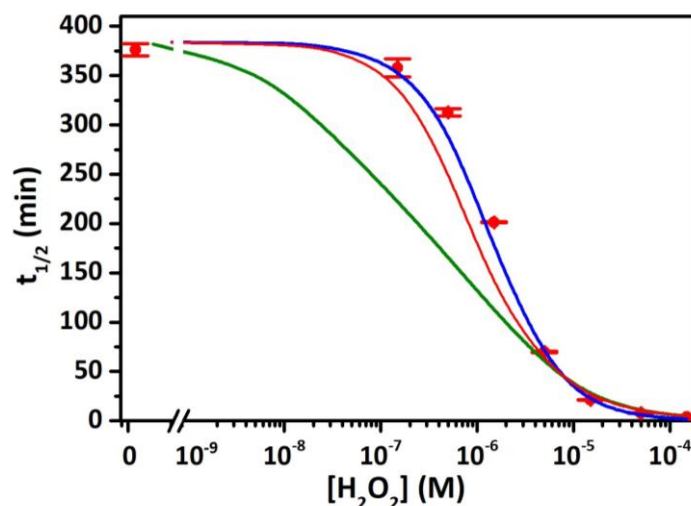


Figure 3-13 : Courbe de calibration des $t_{1/2}$ (correspondant du temps auquel la moitié du NADH a été consommé) en fonction de la concentration initiale en H_2O_2 . Les points rouges représentent les données expérimentales extraites de la **Figure 3-6**. Les traits pleins correspondent aux simulations numériques à partir du mécanisme réactionnel en **Figure 3-12**. Les constantes cinétiques utilisées dans les simulations sont extraites du **Tableau 3-1**, selon l'entrée : 2 (verte), 3 (rouge), 4 (bleu). Les valeurs des concentrations entrées dans les simulations sont les mêmes qu'expérimentalement en **Figure 3-6**, *i.e.* 50 μM de sonde 1,4-bis-DBN, 250 μM de NADH et 10 nM de diaphorase.

1.4.2. Simulation avec l'entrée numéro 3 : auto-oxydation de l'intermédiaire monoboronique désactivée

Le manque de concordance que nous venons de voir entre les données expérimentales et la simulation aux faibles concentrations en H_2O_2 suggère une inhibition de la réaction dite d'auto-oxydation de l'intermédiaire **4-DBN** par les conditions réductrices imposées par le mélange réactionnel. En effet, nous décrivons l'instabilité présumée de l'intermédiaire **4-DBN** *via* O_2 comme étant de nature radicalaire avec la production de Q^{\bullet} et O_2^{\bullet} . Ces radicaux peuvent être neutralisés par les conditions réductrices et en l'occurrence par le NADH (il a en effet été montré dans la littérature que le NADH est un *scavenger* efficace d' HO_2^{\bullet} ²¹ et de radicaux phénoxyles²²), ce qui peut donc conduire à un phénomène d'inhibition du processus d'autocatalyse.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une nouvelle série de simulations pour lesquelles la constante cinétique k_n a été désactivé (*i.e.* $k_n = 0 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, entrée 3 du **Tableau 3-1**). La courbe de calibration simulée résultante est reportée en rouge sur la **Figure 3-13**. Pour pouvoir correctement rendre compte de réponse non-spécifique la constante cinétique k_{ns} a également été ajustée à $2.75 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. La courbe de calibration simulée est cette-fois ci bien plus en accord avec les données expérimentales, ce qui tend à valider notre hypothèse d'inhibition de la réaction d'auto-oxydation de l'intermédiaire monoester boronique.

Ces simulations ont le mérite également de montrer qu'avec la sonde **1,4-bis-DBN** doublement protégée la réaction d'autocatalyse reste possible aux faibles concentrations en H_2O_2 et ceci même en l'absence d'une instabilité de l'intermédiaire **4-DBN** (nous avons en effet postulé $k_n = 0 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Cela est rendu possible par le fait que la cinétique de deuxième déprotection de la sonde est plus rapide que la cinétique de première déprotection, ce qui a pour effet d'induire une probabilité non-nulle de double déprotection de la sonde même pour des concentrations initiales en H_2O_2 fortement sous-stœchiométriques. Cette probabilité dépend en effet fortement du ratio entre les vitesses de première et deuxième déprotection, avec une probabilité qui devient d'autant plus grande que la seconde constante cinétique de déprotection est plus élevée que la première, ce qui est d'ailleurs le cas pour notre système ($k_{d,1,4\text{-bis-DBN}} = 35 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ et $k_{d,4\text{-DBN}} = 300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Le schéma simplifié de la réaction autocatalytique présenté **Figure 3-3** peut donc être corrigé comme indiqué **Figure 3-14**.

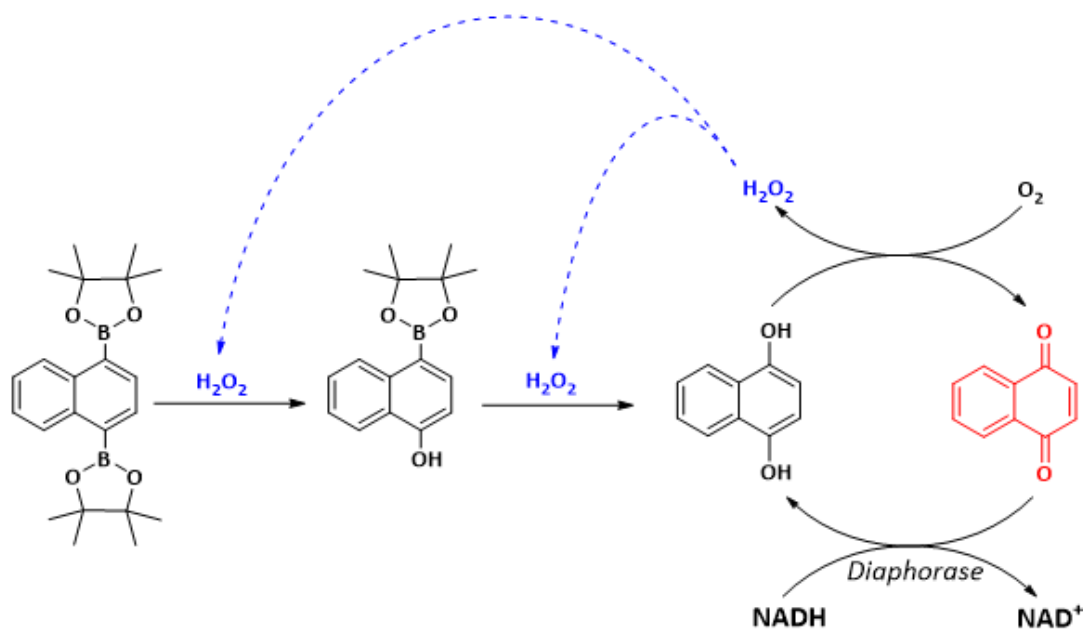


Figure 3-14 : Réaction autocatalytique avec la sonde 1,4-bis-DBN en présence de H_2O_2 , du couple réducteur DI/NADH et d'oxygène dissous.

1.4.3. Simulation avec l'entrée numéro 4 : raffinement des constantes cinétiques k_3 et k_{red} impliquées dans le recyclage redox.

Afin d'aller encore un peu plus loin dans l'analyse de l'ajustement des simulations par rapport aux données expérimentales, nous avons cherché à avoir une idée plus précise des constantes cinétiques k_3 et k_{red} qui caractérisent la cinétique de réduction enzymatique de la 1,4-NQ dans la boucle de cyclage redox (boucle catalytique 2). Nous avons en effet jusqu'ici utilisé des valeurs k_3 et k_{red} que nous avons extraites de travaux antérieurs réalisés avec la ménadione et non pas la 1,4-NQ⁵. Pour cela nous avons réalisé des expériences de cyclage redox en présence de diaphorase et de NADH dont le mécanisme simplifié est rappelé **Figure 3-15**.

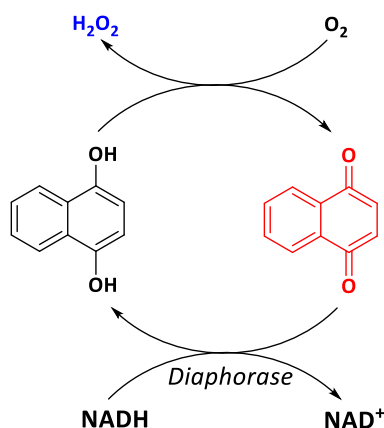


Figure 3-15 : Principe du recyclage redox de la 1,4-NQ entre l'oxydant O₂ et le réducteur enzymatique DI/NADH.

La cinétique de catalyse a été suivie par spectrophotométrie UV-vis à $\lambda = 340$ nm (suivi de la consommation du NADH en fonction du temps) et pour différentes concentrations en 1,4-NQ. Les suivis cinétiques sont rassemblés **Figure 3-16**.

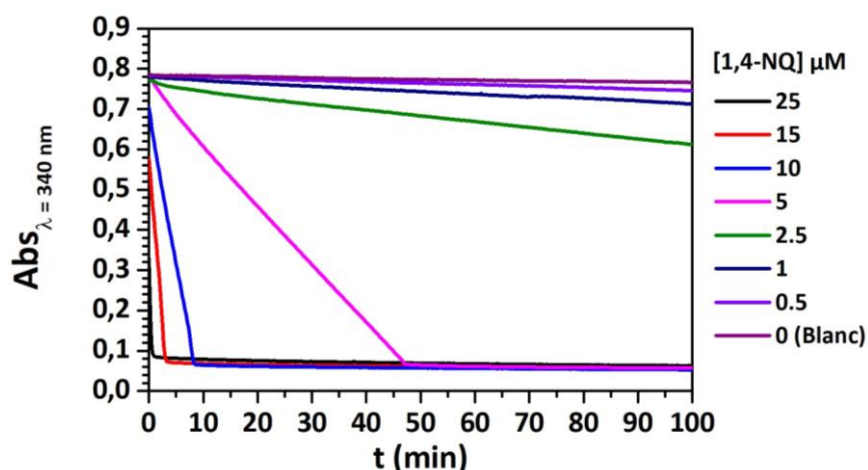


Figure 3-16 : Suivi spectrophotométrie UV-Vis à la longueur d'onde spécifique du NADH $\lambda = 340$ nm en fonction du temps de 250 μM de NADH, 10 nM de diaphorase et diverses [1,4-NQ] (en μM) : 25 (noir), 15 (rouge), 10 (bleu), 5 (magenta), 2.5 (vert), 1 (bleu marine), 0.5 (violet), 0 (mauve). Les expériences sont réalisées simultanément en triplicata dans des microplaques à 96 puits de 200 μL , les réactifs étant dilués dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA à pH 8.5.

On observe une consommation linéaire du NADH d'autant plus rapide que la concentration en 1,4-NQ (catalyseur) est importante. De la pente des droites, nous pouvons extraire une vitesse apparente de consommation du NADH et la reporter sur le graphe de la **Figure 3-17** en fonction de la concentration en 1,4-NQ (échelle semilog). Les données ainsi représentées indiquent deux régimes cinétiques en fonction de la concentration en naphthoquinone, avec un changement brusque aux concentrations intermédiaires qui met en avant le caractère non trivial de la réactivité du cyclage redox.

Pour pouvoir évaluer les deux constantes cinétiques qui nous intéressent à partir de ces données, nous avons simulé les cinétiques à partir du mécanisme de cyclage redox combinant les réactions 6 à 13. Les pentes des courbes cinétiques simulées ont ensuite été extraites afin de tracer des graphes similaires à celui de de la **Figure 3-17** et ainsi comparer aux données expérimentales. L'opération a été répétée avec plusieurs jeux de constantes cinétiques k_3 et k_{red} , en gardant identique les autres constantes cinétiques.

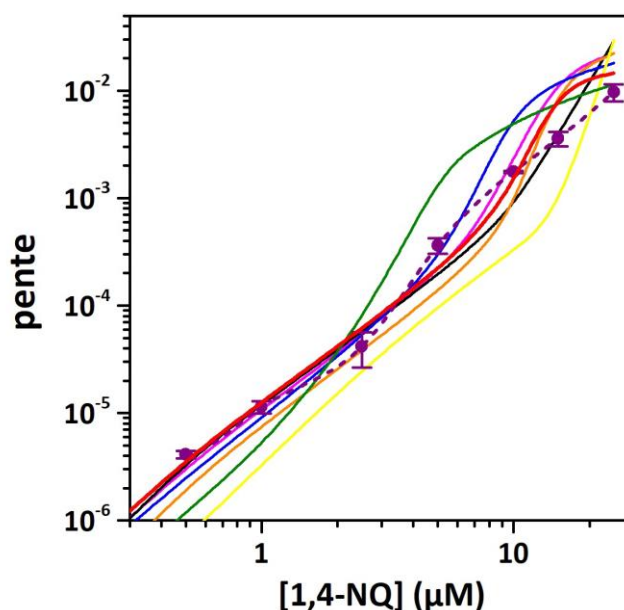


Figure 3-17 : Pente des cinétiques d'ordre 0 expérimentales (en points violets, les pointillés reliant chaque point pour une meilleure visualisation) ou obtenues par simulation numérique (en trait plein) en fonction de la concentration initiale en 1,4-naphthoquinone. Les concentrations expérimentales et simulées sont les mêmes qu'en **Figure 3-16**. Les simulations numériques sont obtenues à partir des équations 6 à 13 avec les valeurs des constantes cinétiques déjà reportées de : $k_0 = 0.001 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{co,1} = 66\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{dis,-1} = 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_2 = 4.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{-2} = 2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_4 = 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_5 = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $K_M = 60 \text{ µM}$, $k_{cat} = 1200 \text{ s}^{-1}$. Les valeurs de k_3 et k_{red} varient selon : (jaune) $k_3 = 8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{red} = 1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; (rouge) $k_3 = 8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{red} = 1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; (orange) $k_3 = 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{red} = 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; (rose) $k_3 = 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{red} = 8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; (bleu) $k_3 = 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{red} = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; (vert) $k_3 = 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{red} = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Les résultats regroupés **Figure 3-17** montrent que lorsque k_{red} diminue, la position de la concentration seuil se décale de gauche à droite vers les concentrations les plus basses. Cela peut s'expliquer par le fait que si la vitesse de réduction de Q diminue, alors ce dernier peut davantage participer à la réaction de comproportionnement et ainsi générer le propagateur de chaîne Q^{\bullet} .

Le ratio k_3/k_{red} quant à lui joue sur l'écartement vertical entre les deux régimes, c'est-à-dire sur la différence de vitesse entre les deux régimes cinétiques. Ce ratio correspond en effet à un paramètre de compétition entre la vitesse de consommation de 1,4-NQH₂ via k_3 et la vitesse d'apparition de 1,4-NQH₂ via k_{red} .

Bien que nos simulations numériques n'arrivent pas à complètement reproduire les données expérimentales pour un jeu donné de valeurs de k_3 et k_{red} , nous pouvons conclure avec un assez bon degré de confiance que les valeurs k_3 et k_{red} se situent autour de $(5 - 8) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $(0.8 - 1.5) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivement. On retrouve donc ici une valeur de k_3 similaire à celle que nous avons jusqu'ici employée, en revanche la valeur de k_{red} fixée à $1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ était surestimée. L'utilisation de ces nouvelles valeurs pour k_3 et k_{red} (entrée 4 du **Tableau 3-1**) nous permettent de simuler les cinétiques autocatalytiques de la **Figure 3-18** et de tracer la courbe de calibration en bleu de la **Figure 3-13** qui s'ajuste presque parfaitement aux données expérimentales.

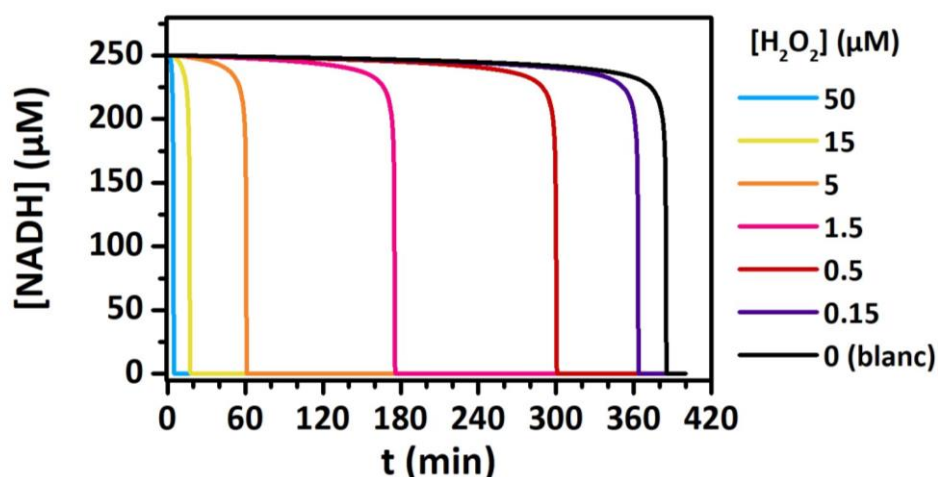


Figure 3-18 : Simulation numérique avec les valeurs des constantes cinétiques de l'entrée 4 (voir **Tableau 3-1**). La consommation du NADH au cours du temps est représentée avec le mécanisme réactionnel décrit en **Figure 3-11**. Les valeurs des concentrations entrées dans les simulations sont les mêmes qu'expérimentalement en **Figure 3-4**, *i.e.* 50 µM de sonde 1,4-bis-DBN, 250 µM de NADH et 10 nM de diaphorase.

A partir de ce résultat qui tend à conforter notre proposition mécanistique, nous avons cherché à vérifier si ce même mécanisme avec ces mêmes paramètres cinétiques pouvait être transposé à la sonde monoester boronique (en excluant bien entendu du mécanisme la première réaction de déprotection par H₂O₂ qui ne peut plus avoir lieu avec la sonde monoprotégée).

1.4.4. Confirmation du modèle numérique par application aux résultats de la sonde monoester boronique

Les simulations des courbes cinétiques réalisées avec les paramètres de l'entrée 5 du **Tableau 3-2** sont reportées **Figure 3-19B**. Bien que l'allure sigmoïdale des cinétiques ne soit pas parfaitement identique à celles des courbes expérimentales (**Figure 3-19A**), les temps de demi-réaction sont très proches.

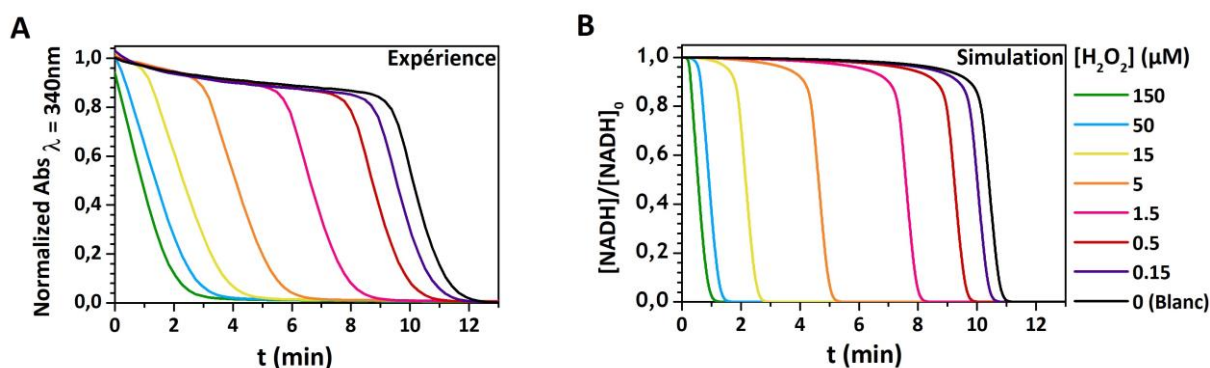


Figure 3-19 : (A) Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à 340nm de la réaction entre 50 μM de la sonde 4-DBN et une gamme de concentration de H₂O₂, en présence de 10 nM DI et 250 μM NADH dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 8.5. [H₂O₂] (μM) : en vert 150, en bleu 50, en jaune 15, en orange 5, en rose 1.5, en rouge 0.5, en violet 0.15 et en noir 0 (blanc). (B) Simulation numérique avec les valeurs des constantes cinétiques du **Tableau 3-2**. La consommation du NADH au cours du temps est représenté avec le mécanisme réactionnel décrit en **Figure 3-11** (mis-à-part que l'on part de l'espèce 4-DBN directement). Les valeurs des concentrations entrées dans les simulations sont les mêmes qu'expérimentalement en A, *i.e.* 50 μM de sonde 4-DBN, 250 μM de NADH et 10 nM de DI.

Pour obtenir ces simulations, nous avons dû ajuster la constante cinétique k_n d'auto-oxydation de la sonde **4-DBN** à une valeur de $0.25 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cet ajustement se justifie par le fait que la réponse non-spécifique du système ne peut plus être déterminé par k_{ns} qui caractérise l'auto-oxydation lente du NADH, mais plutôt par k_n qui caractérise l'auto-oxydation de la sonde monoprotégée (autrement dit son manque de stabilité). Il est donc nécessaire de faire en sorte que k_n soit non nul. Il est intéressant de noter que cette valeur de $k_n = 0.25 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ est un peu plus faible que celle déterminée par Justine Pallu¹ en l'absence de réducteur ($k_n = 1.2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ce résultat est en accord avec notre hypothèse d'une inhibition de la réaction d'auto-oxydation de la sonde monoprotégée dans des conditions réductrices.

L'ensemble de ces résultats obtenus ici avec la sonde **4-DBN** finalement nous conforte sur la validité de notre modèle ainsi que sur la consistance des valeurs de constantes cinétiques.

Avec ce modèle en main, nous avons cherché ensuite à mieux comprendre l'influence du pH sur la cinétique d'autocatalyse ainsi que sur les performances analytiques.

Groupe de réaction	Entrée		
	Constante	4 1,4-bis-DBN	5 4-DBN
Réactions spécifiques de déprotection de sonde	$k_{d,1,4\text{-bis-DBN}} (\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1})$	35	-
	$k_{d,4\text{-DBN}} (\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1})$	300	300
Réactions parasites non-spécifique	$k_n (\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1})$	0	0.25
	$k_p (\text{s}^{-1})$	0.0004	0.0004
	$k_{ns} (\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1})$	4.1×10^{-3}	4.1×10^{-3}
Réactions du ping-Pong Enzymatique	$K_M (\mu\text{M})$	60	60
	$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	1200	1200
	$k_{red} (\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1})$	10^8	10^8
	$k_0 (\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1})$	0.001	0.001
	$k_{co,1}; k_{dis,-1} (\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1})$	$66\ 000; 10^8$	$66\ 000; 10^8$
	$k_2; k_{-2} (\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1})$	$4.4 \times 10^7; 2 \times 10^8$	$4.4 \times 10^7; 2 \times 10^8$
	$k_3 (\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1})$	5×10^4	5×10^4
$k_{dis,4} (\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1})$	2×10^4	2×10^4	
$k_5 (\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1})$	2×10^9	2×10^9	

Tableau 3-2 : Constantes cinétiques des simulations 4 à 5 de la réaction autocatalytique complète. En rouge les constantes cinétiques qui sont modifiées entre de la sonde diboronique à la monoboronique.

2. Optimisation des performances analytiques par notre réaction autocatalytique

2.1. Amélioration de la cinétique globale d'autocatalyse : effet du pH

Pour accélérer la réactivité globale de la réaction autocatalytique et tenter de gagner en performance analytique, nous avons examiné l'effet du pH. L'augmentation du pH nous permet en effet d'anticiper un gain cinétique dans l'autocatalyse car les deux boucles catalytiques peuvent être accélérées avec l'augmentation du pH, notamment la boucle 2 de recyclage redox dans laquelle la catalyse de réduction d'O₂ par la 1,4-NQ est d'autant plus efficace que le pH est basique. Il faut cependant aussi prendre en considération le fait que l'activité enzymatique de la diaphorase est elle aussi pH dépendante comme représenté **Figure 3-20** (extraite des données fournies par la société NIPRO ENZYMES qui commercialise l'enzyme). Son activité tend en effet à diminuer lorsque le pH devient basique.

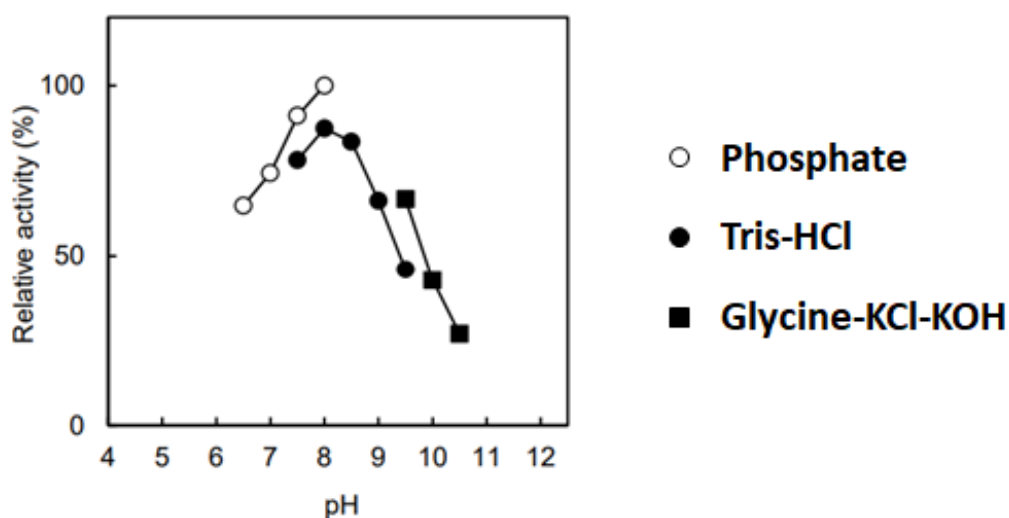


Figure 3-20 : Activité de la diaphorase en fonction du pH pour trois tampons différents.

La **Figure 3-21** montre les courbes cinétiques d'autocatalyse de la sonde **1,4-bis-DBN** obtenues dans les mêmes conditions que précédemment (**Figure 3-4**) mais pour un pH de 9.5 au lieu de 8.5.

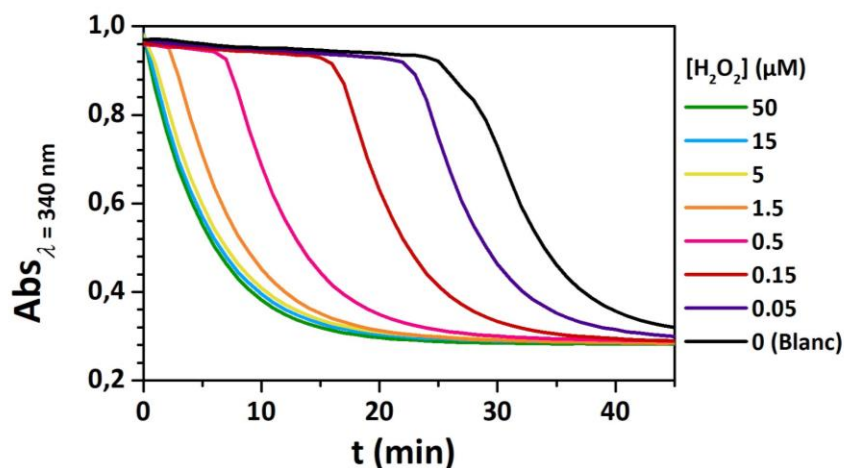


Figure 3-21 : Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à 340nm de la réaction entre 50 µM de la sonde 1.4-bis-DBN et une gamme de concentration de H₂O₂, en présence de 10 nM DI et 250 µM NADH dans un tampon Tris 0.1 M + 10 µM EDTA pH 9.5. [H₂O₂] (µM) : en vert 50, en bleu 15, en jaune 5, en orange 1.5, en rose 0.5, en rouge 0.15, en violet 0.05 et en noir 0 (blanc).

Avec une augmentation de seulement une unité en pH, on observe que la cinétique d'autocatalyse est améliorée d'un facteur 10 (le $t_{1/2}$ pour la plus faible concentration en H₂O₂ passe de 400 min à pH 8.5 à 40 min à pH 9.5). De plus, la limite de détection en H₂O₂ que l'on peut extraire de la courbe de calibration est abaissée d'un facteur 10 (200 nM à pH 8.5 *versus* 20 nM à pH 9.5) (**Figure 3-22**).

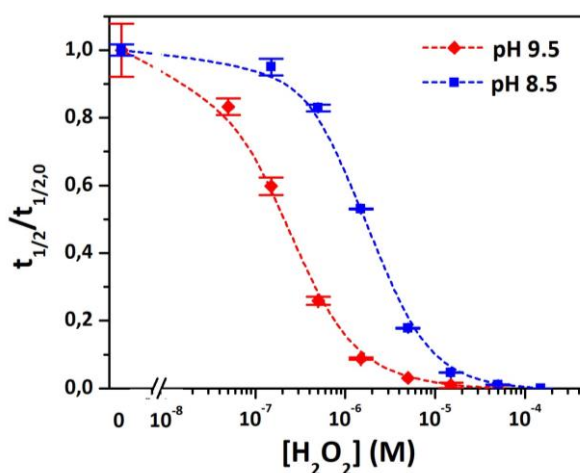


Figure 3-22 : Courbe de calibration semi-logarithmique obtenue en relevant les $t_{1/2}$ à pH 8.5 (en bleu) en **Figure 3-4** et à pH 9.5 (en rouge) en **Figure 3-21**, normalisés par rapport au $t_{1/2,0}$ du blanc, en fonction du log de [H₂O₂].

Afin de rationaliser cet effet du pH sur la cinétique, nous avons cherché à reproduire par simulation ce résultat expérimental. Pour cela, il nous a fallu d'abord identifier les réactions pouvant être les plus influentes en terme pH. Comme discuté précédemment dans ce chapitre, les réactions 9 et 11 sont fortement dépendantes du pH car elles impliquent la 1,4-NQH₂ qui possède deux pK_a

proches des pH étudiés ($pK_{a,1} = 9.48$ et $pK_{a,2} = 11.01$ d'après ¹⁰). Les réactions de déprotection de la sonde **1,4-bis-DBN** par H_2O_2 sont elles aussi fonction du pH car c'est l'espèce nucléophile HO_2^- qui est impliquée²³. Cependant, l'effet du pH sur la cinétique de ces réactions reste moindre que celles des réactions 9 et 10.

Si nous considérons que l'influence du pH sur la cinétique d'autocatalyse trouve principalement son origine dans la pH-dépendance des réactions 9 et 10, alors nous devons pouvoir le vérifier par simulation. De la même manière que nous avons fait dans ce chapitre pour estimer les valeurs de $k_{co,1}$ et k_3 à un pH de 8.5 sur la base des données de la littérature à pH 7.5, nous pouvons réestimer ces valeurs pour un pH de 9.5. Nous obtenons ainsi à pH 9.5 des valeurs de $k_{co,1} = 6.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $k_3 = 4.7 \times 10^6$, ce qui est 100 fois plus élevée qu'à pH 8.5. En injectant ces deux nouvelles constantes dans notre modèle et en gardant toutes les autres identiques, nous avons pu obtenir à partir des simulations la courbe de calibration noire de la **Figure 3-23**, laquelle reproduit finalement assez bien les données expérimentales obtenues à pH 9.5 (points en noir).

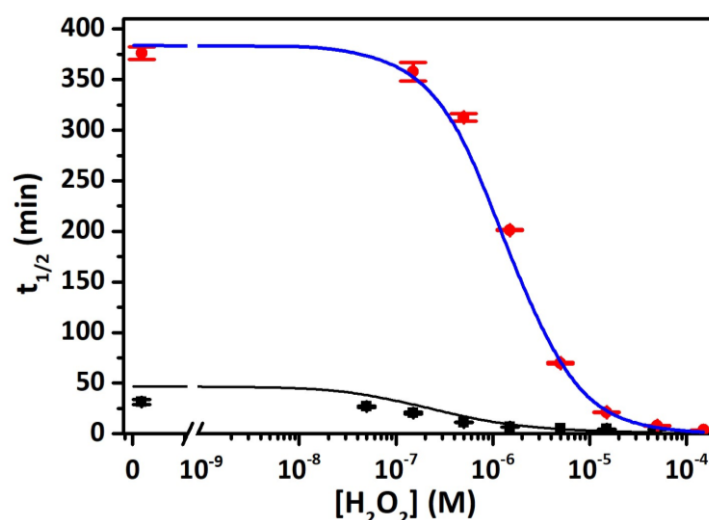


Figure 3-23 : Courbe de calibration des $t_{1/2}$ (correspondant du temps auquel la moitié du NADH a été consommé) en fonction de la concentration initiale en H_2O_2 . Les points noirs représentent les données expérimentales extraites de la **Figure 3-21**. Le trait plein noir correspond à la simulation numérique à partir du mécanisme réactionnel en **Figure 3-11** avec les constantes cinétiques discutées ci-dessus. Les points rouges ainsi que le trait plein bleu représentent respectivement les données et les simulations obtenus et discutés en **Figure 3-13**. Les valeurs des concentrations entrées dans la simulation sont les mêmes qu'expérimentalement, *i.e.* 50 μM de sonde 1,4-bis-DBN, 250 μM de NADH et 10 nM de DI.

Ce résultat confirme donc le caractère clef des réactions 9 et 10 dans la dépendance en pH de l'autocatalyse. La légère différence que l'on observe entre la simulation et l'expérience est probablement liée au fait que nous n'avons pas pris en compte les autres réactions dont les cinétiques dépendent aussi du pH.

Un autre aspect intéressant de cette analyse est qu'elle nous permet d'apporter une explication quant à l'amélioration par un facteur 10 de la limite de détection. En effet, si on admet que la limite de détection est principalement liée à la réponse non-spécifique générée par la réaction d'auto-oxydation lente du NADH et que celle-ci est beaucoup moins sensible au pH que la vitesse globale de l'autocatalyse, alors on peut facilement comprendre que le gain d'un facteur 10 résulte de ce différentiel.

2.2. Inhibition de la réponse non-spécifique du système : contribution de la diaphorase

Parmi les autres facteurs pouvant jouer un rôle important dans des performances analytiques, la concentration en diaphorase s'est révélée particulièrement critique. La **Figure 3-24** reporte les réponses non-spécifiques (c'est-à-dire sans ajout d' H_2O_2) enregistrées pour différentes concentrations en diaphorase (allant de 0.1 à 1000 nM) ainsi que les valeurs résultantes de $t_{1/2}$ en fonction de la concentration en diaphorase.

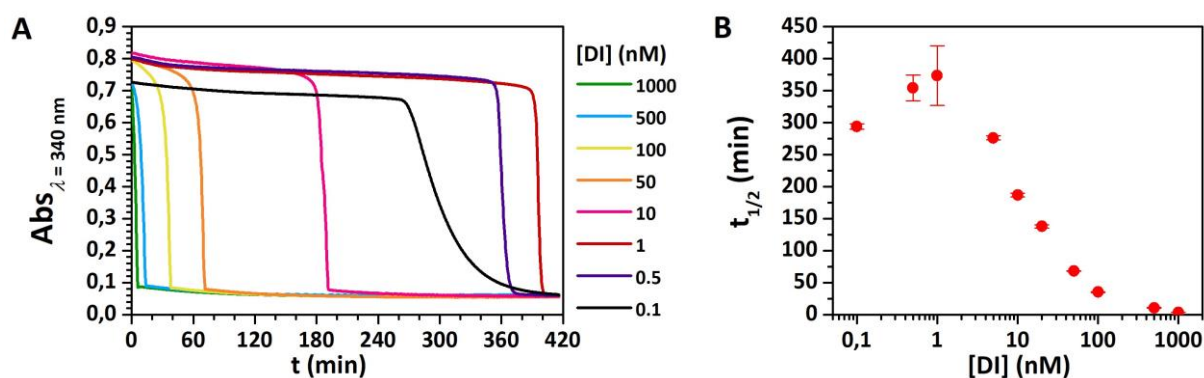


Figure 3-24 : (A) Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à 340nm de la réaction non-spécifique de 50 μM de la sonde 1.4-bis-DBN en présence de 250 μM NADH et de diverses concentrations en DI, dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 8.5. [DI] (nM) : en vert 1000, en bleu 500, en jaune 100, en orange 50, en rose 10, en rouge 1, en violet 0.5 et en noir 0.1. (B) Temps de demi-réaction extraits du suivi spectrophotométrique en fonction de la concentration en DI.

Ces résultats montrent une forte dépendance de la réaction non-spécifique à la concentration en diaphorase, ce qui suggère que l'enzyme est impliquée. Une première hypothèse émise est liée à l'activité NADH oxydase résiduelle reportée par le fournisseur de l'enzyme (<0.01%). Si cette activité peut être considérée comme négligeable dans des conditions expérimentales classiques, il est possible qu'ici ce ne soit plus le cas et que la production de traces d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ *via* cette activité résiduelle NADH oxydase soit une source importante de réponse non-spécifique. Une autre hypothèse envisageable est que la diaphorase elle-même présente une activité intrinsèque NADH oxydase (même si cette flavoenzyme est décrite dans la littérature comme n'acceptant pas O_2 comme accepteur d'électron, cela ne veut pas nécessairement dire que sa réactivité vis-à-vis d' O_2 est totalement inexistante).

Il est intéressant de noter qu'en diminuant la concentration en diaphorase (de 1 μM à 1 nM), il est possible de repousser l'apparition du signal non-spécifique à des valeurs de $t_{1/2}$ plus élevées (**Figure 3-24**). Cependant, au-delà du seuil de 1 nM, on observe un effet contraire où les valeurs de $t_{1/2}$ redeviennent plus courtes, formant ainsi un optimum à 1 nM en enzyme (**Figure 3-24B**). Cet effet peut se comprendre à travers le mécanisme de la boucle 2 pour lequel nous avons montré lors de l'analyse du cyclage redox (**Figure 3-17**) qu'une diminution de la vitesse de réduction de la 1,4-NQ permettait d'accélérer la boucle de cyclage redox en favorisant l'accumulation de cette dernière et, par conséquent, en favorisant la production de la 1,4-NQ* qui est clef dans la cinétique d'auto-oxydation de la 1,4-NQH₂. Il ne faut toutefois pas trop diminuer la concentration de diaphorase car, comme le montrent les courbes cinétique d'autocatalyse de la **Figure 3-24A**, l'allure de la sigmoïdale finie par traîner (ce qui est par exemple le cas pour la plus faible concentration en enzyme) en raison d'une cinétique de réduction de la naphthoquinone qui devient trop lente et donc cinétiquement déterminante.

Afin de montrer si l'on peut améliorer les performances analytiques en réduisant au maximum l'impact de la diaphorase sur la réponse non-spécifique, les expériences d'autocatalyse ont été répétées avec une concentration en diaphorase de seulement 0.1 nM. Les résultats regroupés **Figure 3-25**, montrent que l'on peut effectivement améliorer les performances analytiques dans ces conditions, avec une limite de détection de 15 nM en H₂O₂ contre 200 nM précédemment, soit un gain d'un facteur 10.

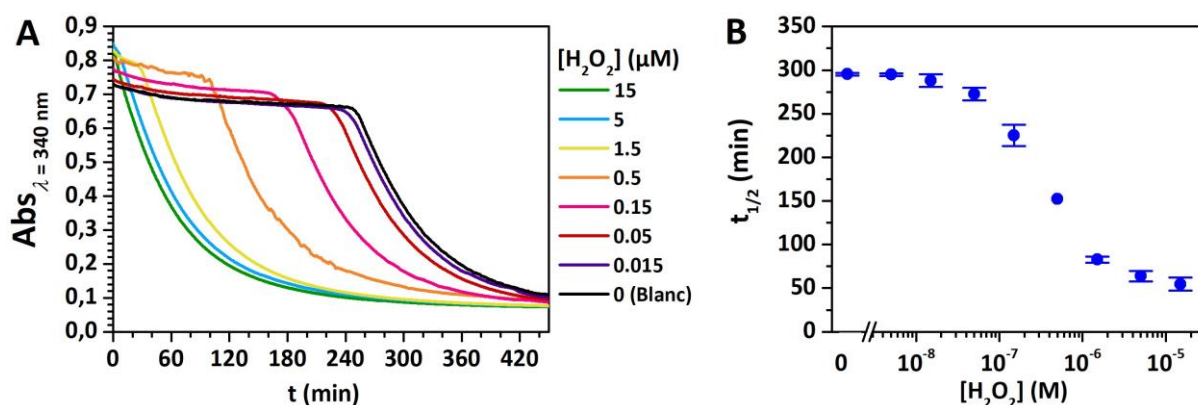
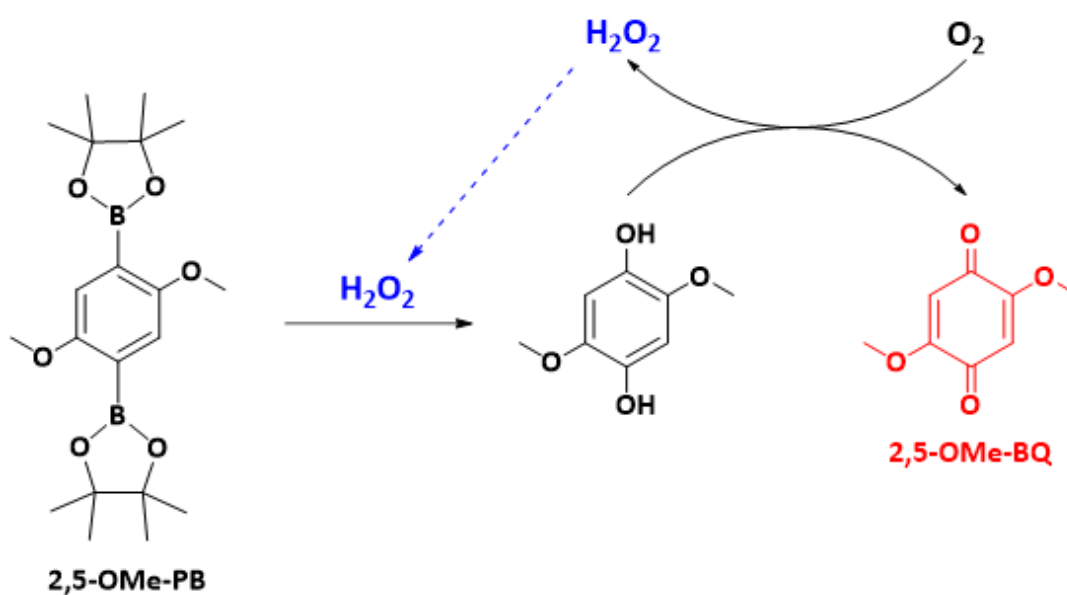


Figure 3-25 : (A) Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à 340nm de la réaction entre la sonde 50 μM 1.4-bis-DBN et une gamme de concentration de H₂O₂, en présence de 0.1 nM DI et 250 μM NADH dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 8.5. [H₂O₂] (μM) : en vert 15, en bleu 5, en jaune 1.5, en orange 0.5, en rose 0.15, en rouge 0.05, en violet 0.015 et en noir 0 (blanc). **(B)** Temps de demi-réaction $t_{1/2}$ extrait du suivi spectrophotométrique en fonction de la concentration en H₂O₂.

3. Exploration du cycleur redox 2,5-diméthoxy-1,4-benzoquinone comme alternative à la 1,4-NQ

Une autre façon d'améliorer les performances analytiques de la méthode proposée consiste à concevoir des sondes capables de libérer un cycleur redox plus efficace. Au cours des travaux antérieurs réalisés au laboratoire, plusieurs dérivés de quinones telles que la 1,2-naphthoquinone, 3,5-diméthyl-1,4-benzoquinone, ou encore 2,5-diméthoxy-1,4-benzoquinone (**2,5-OMe-BQ**) ont été identifiés pour leur capacité à cycliser rapidement dans un tampon oxygéné en présence de diaphorase et de NADH. C'est d'ailleurs ce qui a conduit à synthétiser la sonde **2,5-OMe-PB** représentée ci-après (où chacune des deux fonctions hydroxyles est masquée par un ester pinacol boronique) et que j'ai donc caractérisée.



3.1. Caractérisation de la boucle catalytique de recyclage redox de la 2,5-OMe-PB

3.1.1. Etude des propriétés d'auto-oxydation de la forme réduite de la 2,5-OMe-BQ par voltamétrie cyclique

Les propriétés d'auto-oxydation de la quinone 2,5-OMe-BQ, ont été examinées par voltamétrie cyclique en présence d'O₂ (**Figure 3-26**).

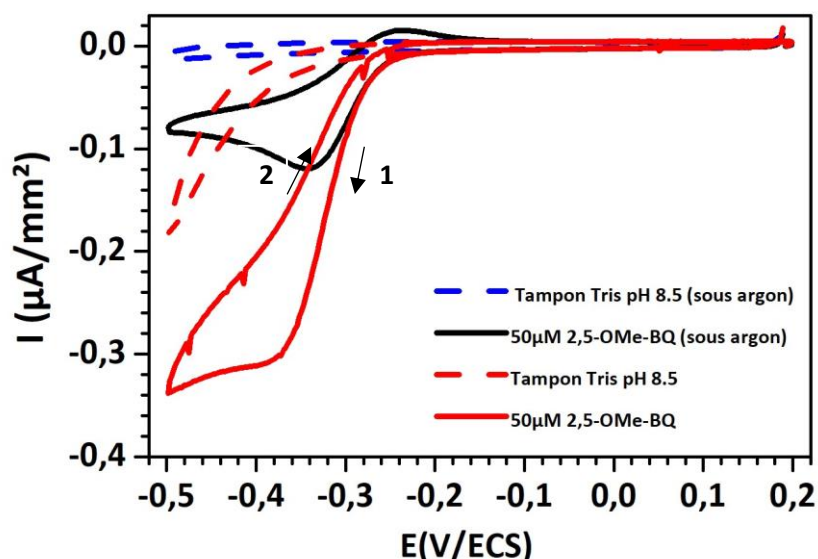


Figure 3-26 : Voltamétrie cyclique de 50 µM de 2,5-OMe-BQ en présence d'O₂ (trait plein rouge), sous argon (trait plein noir), et contrôle des blancs soit le tampon en présence d'O₂ (pointillés rouge) ou sous argon (pointillés bleu). La vitesse de balayage est de 0.01 V/s et les potentiels sont balayés au scan aller des potentiels anodiques à cathodiques, et inversement au scan retour. L'électrode de travail est une électrode en carbone vitreux préalablement polie, la contre-électrode est en platine et la référence une électrode au calomel saturée séparée de la solution électrolytique par un pont salin. L'électrolyte est un tampon Tris 0.1 M + 10 µM EDTA à pH 8.5.

Les voltammogrammes montrent une vague partiellement réversible à 2 électrons et 2 protons en l'absence d'O₂ et dont on peut déduire un potentiel standard apparent de $E^0 = -300$ mV/ECS (contre -250 mV/ECS pour la 1,4-naphthoquinone). Ce potentiel est suffisamment bas pour que la quinone réduite s'oxyde rapidement en présence d'O₂. C'est ce que montre le voltammogramme en rouge de la **Figure 3-26**, avec l'apparition d'une vague de réduction catalytique d'O₂ qui tend à former un plateau. Ce courant de plateau est caractéristique d'un processus catalytique limité par la vitesse de la réaction que l'on peut schématiquement représenter comme indiqué **Figure 3-27**. Il est important de noter que la réduction électrochimique à 2 électrons et 2 protons de la quinone est en réalité bien plus complexe ce schéma simplifié de la **Figure 3-27**. Nous verrons dans le chapitre 6 que cette réactivité nécessite de s'appuyer sur un schéma carré à 9 membres. Néanmoins avec ce schéma simplifié il reste possible de déterminer une constante cinétique apparente d'auto-oxydation comme nous allons maintenant le voir.

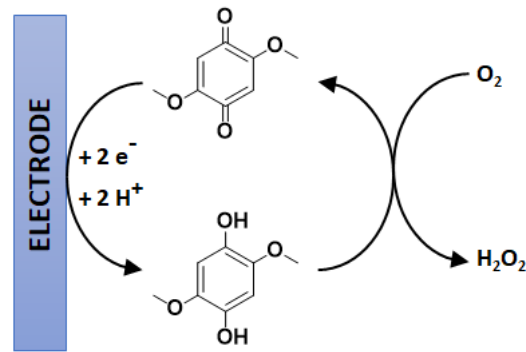


Figure 3-27 : Catalyse électrochimique de la réduction d'O₂ médiée par la 2,5-OMe-BQ.

L'équation analytique qui relie l'intensité du courant catalytique de plateau en voltamétrie cyclique en fonction de la concentration en dioxygène et en 2,5-OMeBQ est fournie par l'expression suivante :

$$I_{\text{cat,plateau}} = nF[\text{BQ}]_0 \sqrt{D} \sqrt{k_{O_2} [\text{O}_2]_0}$$

où k_{O_2} représente la constante cinétique apparente de la réaction d'auto-oxydation et D le coefficient de diffusion de la quinone.

On détermine :

$$k_{O_2} = \left(\frac{I_{\text{cat,plateau}}}{nFS[\text{BQ}]_0 \sqrt{D} \sqrt{[\text{O}_2]_0}} \right)^2$$

avec :

- $I_{\text{cat,plateau}} = -0,33 \mu\text{A} \cdot \text{mm}^2$, la densité de courant du plateau catalytique.
- $n = 2$, le nombre d'électrons mis en jeu.
- $F = 96500 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$, la constante de Faraday.
- $[\text{BQ}]_0 = 50 \mu\text{M}$, la concentration initiale de 2,5-OMe-BQ en solution.
- $D = 7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, le coefficient de diffusion de 2,5-OMe-BQ (déterminée au préalable par voltamétrie cyclique en l'absence d'O₂).
- $[\text{O}_2]_0 = 250 \mu\text{M}$, la concentration en oxygène dissous à 1 atm et 25°C.

Nous obtenons ainsi dans nos conditions de tampon Tris 0.1 M (+ 10 μM EDTA) de pH 8.5, une valeur de $k_{O_2} = 6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui est environ deux fois plus rapide que celle déterminée pour la 1,4-NQ ($3300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Cette différence cinétique peut s'expliquer par le potentiel de réduction du couple BQ/BQH₂ plus bas que celui du couple 1,4-NQ/1,4-NQH₂.

3.1.2. Etude des propriétés de cyclage redox de la 2,5-OMe-BQ en présence de diaphorase et de NADH

Afin de vérifier l'aptitude de la 2,5-OMe-BQ à redox cycler en présence de diaphorase, NADH et O₂, nous avons reproduit la même expérience de cyclage redox que celles que nous avons employée pour la 1,4-NQ (Figure 3-16). La Figure 3-28 regroupe les suivis cinétiques obtenus.

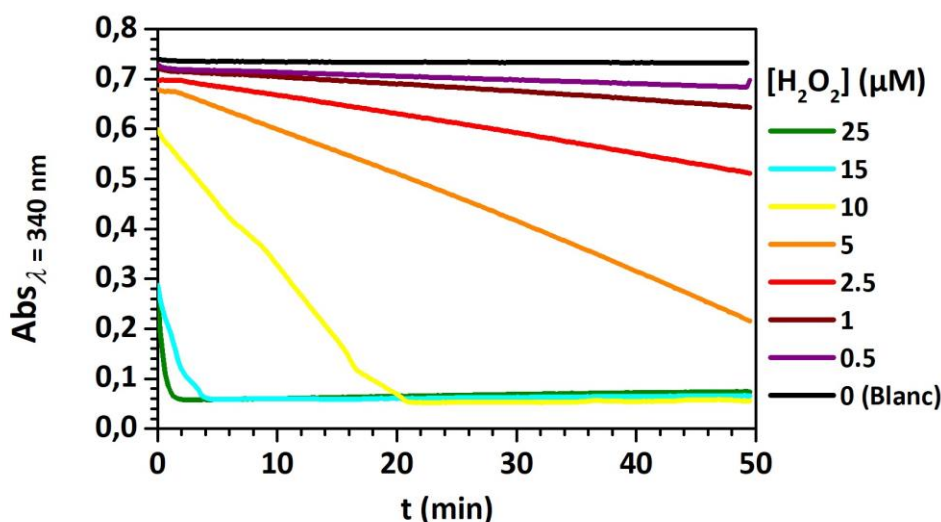


Figure 3-28 : Suivi par spectrophotométrie UV-Vis à la longueur d'onde spécifique du NADH $\lambda = 340$ nm en fonction du temps de 250 μ M de NADH, 10 nM de diaphorase et diverses [2,5-OMe-BQ] : (en μ M) : 25 (vert), 15 (bleu cyan), 10 (jaune), 5 (orange), 2.5 (rouge), 1 (marron), 0.5 (violet), 0 (noir) dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μ M EDTA à pH 8.5.

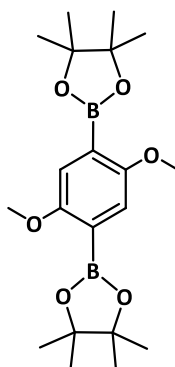
La cinétique de recyclage redox de la 2,5-OMe-BQ est en présence de DI/NADH comme agent réducteur similaire à la 1,4-naphthoquinone, très légèrement plus lente. Cependant, la décroissance linéaire de la consommation de NADH au cours du temps confirme que, similairement à la 1,4-naphthoquinone, le recyclage redox de la 2,5-OMe-BQ est contrôlée par son auto-oxydation limitante et non pas par sa réduction qui est plus rapide.

Maintenant que nous avons vérifié que la 2,5-OMe-BQ était un bon cycleur redox, deux types de sonde masquant ce motif quinone vont être brièvement étudiés dans des conditions de déprotection catalytique par H₂O₂, avant de les appliquer à notre réaction autocatalytique complète.

3.2. Etude de la sonde diester boronique 2,5-OMe-PB

3.2.1. Etude de la déprotection de la sonde 2,5-OMe-PB par H₂O₂

La sonde **2,5-OMe-PB** dont la formule développée est reportée ci-dessous a été synthétisée au laboratoire par Pan Hui au cours de sa thèse²⁴ :



La déprotection de cette sonde par H₂O₂ a été suivi par spectrophotométrie UV-vis à $\lambda = 262$ nm avec l'idée de déterminer la constante cinétique globale apparente ($k_{d,2,5\text{-OMe-PB}}$) de cette déprotection. Les courbes cinétiques sont regroupées **Figure 3-29**.

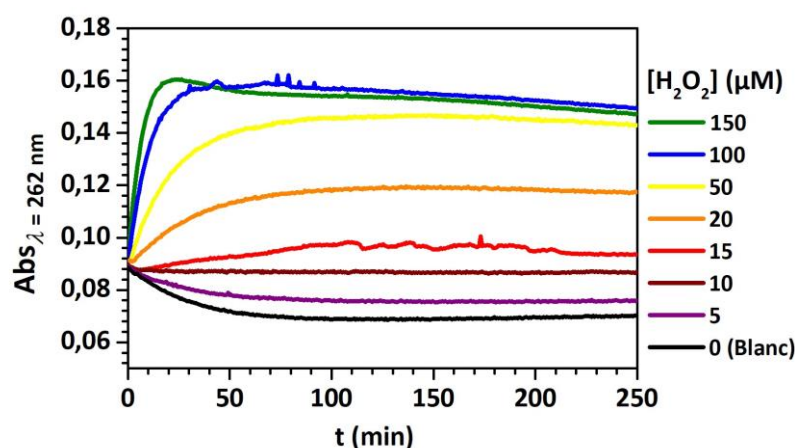


Figure 3-29 : Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à $\lambda = 262$ nm de la déprotection catalytique de 50 μM la sonde 2,5-OMe-PB en présence de 0 à 150 μM de H₂O₂, dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA. [H₂O₂] (μM) : 150 (vert), 100 (bleu), 50 (jaune), 20 (orange), 15 (rouge), 10 (marron), 5 (violet), 0 (noir).

En l'absence d'H₂O₂, la sonde **2,5-OMe-PB** montre une simple décroissance asymptotique de l'absorbance (de 0.09 à 0.07) avec le temps, caractéristique de l'hydrolyse des fonctions pinacols, puis ensuite reste très stable au cours du temps, signifiant une bonne stabilité chimique de la sonde une fois diluée dans ce tampon Tris à pH 8.5. En présence de concentrations sous-stœchiométriques en H₂O₂, nous observons un comportement similaire à celui que nous avons observé pour la sonde **1,4-bis-DBN**, à savoir une augmentation de l'absorbance jusqu'à une valeur maximale qui traduit la conversion stœchiométrique d'H₂O₂ en 1,4-NQ, et donc loin d'une conversion totale de la sonde. En

utilisant le même modèle réactionnel de déprotection que celui que nous avons employé pour la sonde **1,4-bis-DBN**, nous avons cherché à reproduire par simulation les courbes expérimentales de la **Figure 3-29** et ainsi tenter d'en extraire la première constante cinétique de déprotection de la sonde par H_2O_2 (pour cela nous avons aussi considéré une valeur de $k_{O_2} = 6000 M^{-1}.s^{-1}$). Nous avons ainsi pu obtenir une valeur de $k_{d1, 2,5-OMe-PB} = 8 M^{-1}.s^{-1}$, ce qui est environ 4 fois plus faible que la constante de première déprotection de la sonde **1,4-bis-DBN** ($k_{d1,1,4-bis-DBN} = 35 M^{-1}.s^{-1}$).

3.2.2. Réaction d'autocatalyse avec la sonde 2,5-OMe-PB

Nous avons reproduit la même expérience d'autocatalyse que celle que nous avons employée pour la sonde 1,4-bis-DBN, c'est-à-dire 250 μM de NADH, 10 nM de diaphorase, 50 μM de sonde 2,5-OMe-PB, le tout dans un tampon Tris 0.1 M (+ 10 μM EDTA) à pH 8.5. Les résultats sont présentés en **Figure 3-30**.

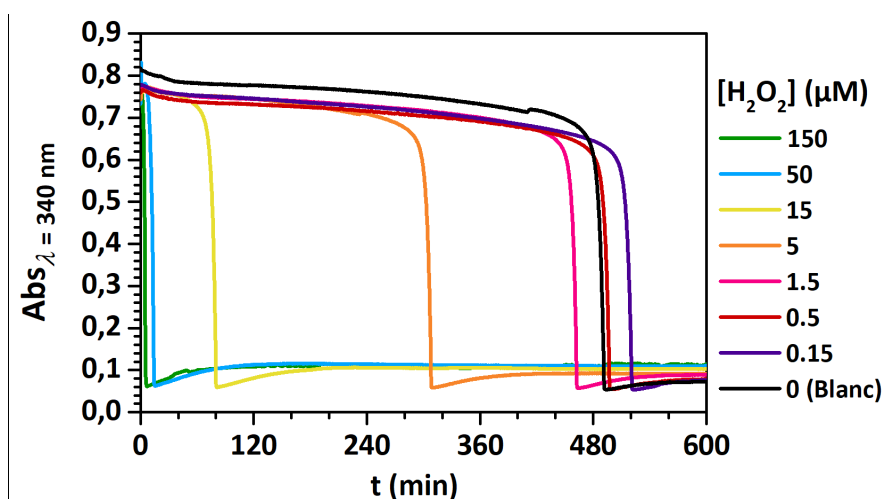
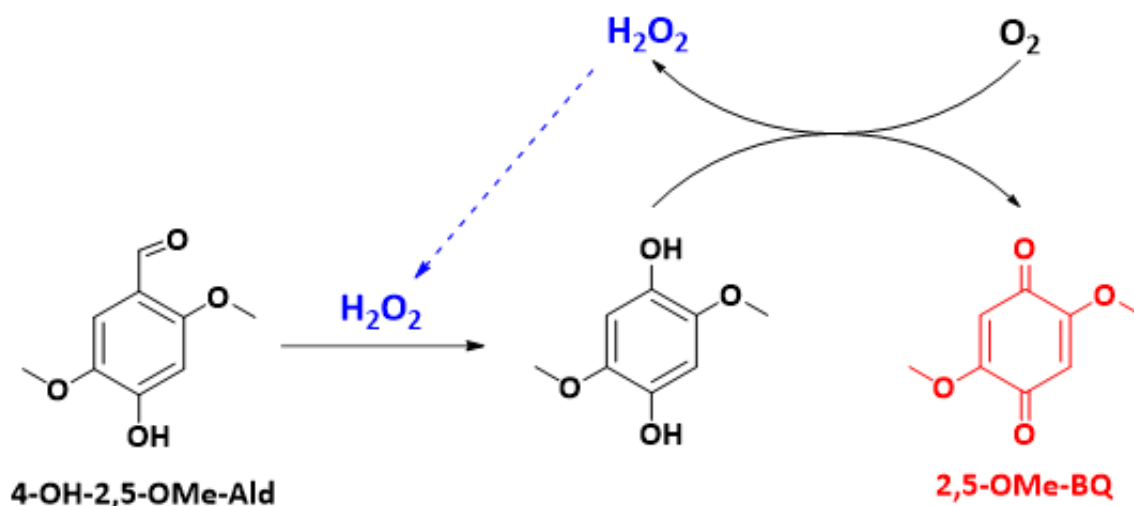


Figure 3-30 : Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à 340nm de la réaction entre 50 μM de sonde 2,5-OMe-PB et une gamme de concentration de H_2O_2 , en présence de 10 nM DI et 250 μM NADH dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 8.5. $[H_2O_2]$ (μM) : en vert 150, en bleu 50, en jaune 15, en orange 5, en rose 1.5, en rouge 0.5, en violet 0.15 et en noir 0 (blanc).

Les performances analytiques avec cette sonde diboronique masquant le cycleur redox benzoquinone (**Figure 3-30**) sont moins bonnes qu'avec le cycleur redox 1,4-NQ (**Figure 3-4**). La limite de détection est 10 fois plus élevée, et les temps de réaction sont également plus lents. Malgré un cycleur redox 2 fois plus efficace (vis-à-vis de son auto-oxydation), la réactivité 4 fois plus lente de déprotection de la sonde inhibe la réaction autocatalytique globale, tandis que la réponse non-spécifique d'auto-oxydation du NADH n'est-elle pas inhibée. De plus, la production d'ion superoxyde non-spécifique par cette auto-oxydation est accélérée par un meilleur recyclage redox dans ce cas, et cela est défavorable pour une meilleure limite de détection. Ainsi, cela se traduit par de moins bonnes performances analytiques de cette sonde **2,5-OMe-PB** vis-à-vis de la sonde **1,4-bis-DBN**.

3.3. Exploration de la réaction de Dakin comme alternative de déprotection d'une sonde par H₂O₂

Une autre stratégie d'optimisation est de concevoir des sondes moléculaires avec des groupements protecteurs plus stables et plus réactifs vis-à-vis d'H₂O₂. Au cours de mes travaux, d'autres groupements protecteurs que des esters boroniques ont été explorés, et un exemple de sonde moléculaire commerciale, le **4-OH-2,5-OMe-Ald** va être présenté. Le cycleur redox **2,5-OMe-BQ** est ici masqué par une fonction aldéhyde sur une de ses fonctions hydroxyles :



3.3.1. Etude de la déprotection de la sonde 4-OH-2,5-OMe-Ald par H₂O₂

Une autre stratégie de masquage de la benzoquinone consiste à masquer l'une des fonctions hydroxyles par une fonction aldéhyde afin de la convertir par oxydation avec H₂O₂ en une fonction phénol selon la réaction de Dakin²⁵. Il s'agit cependant d'une réaction relativement lente et c'est la raison pour laquelle, en 2018, le groupe de Yang a proposé d'améliorer sa cinétique *via* son couplage à la réaction de Payne²⁶, et qui consiste donc selon les auteurs à activer le réactif H₂O₂ par le trichloroacétonitrile en conditions basiques afin de générer un intermédiaire peroxyde plus réactif. Nous avons entrepris de tester cette approche avec la molécule commerciale 4-OH-2,5-OMe-Ald de manière à générer l'hydroquinone 2,5-OMe-BQH₂ comme indiqué **Figure 3-31**.

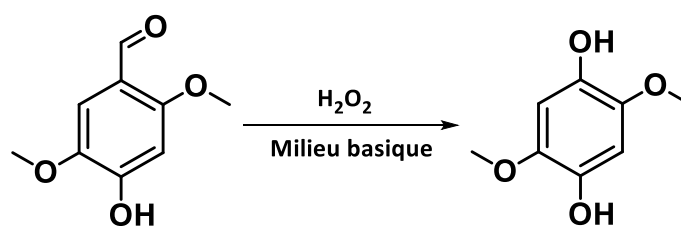


Figure 3-31 : réaction de Dakin envisagée entre la sonde 4-OH-2,5-OMe-Ald et H₂O₂ conduisant à la formation du 2,5-OMe-BQH₂.

Cependant, toutes nos tentatives visant à reproduire les expériences reportées dans la référence ²⁶ se sont révélées infructueuses, la cinétique de la réaction de Dakin n'étant pas favorisée. Nous avons donc décidé d'abandonner cette piste et d'essayer de voir, pour des conditions standards de réaction de Dakin, si l'on peut générer en présence d'H₂O₂ de manière suffisamment efficace la molécule 2,5-OMe-BQH₂ à partir du composé 4-OH-2,5-OMe-Ald.

Pour cela nous avons réalisé le suivi par spectroscopie UV-vis une solution de 50 µM de 4-OH-2,5-OMe-Ald en fonction du temps suite à l'ajout de 2 équivalents d'H₂O₂ dans un tampon Tris 0.1 M à pH 8.5 (**Figure 3-32A**).

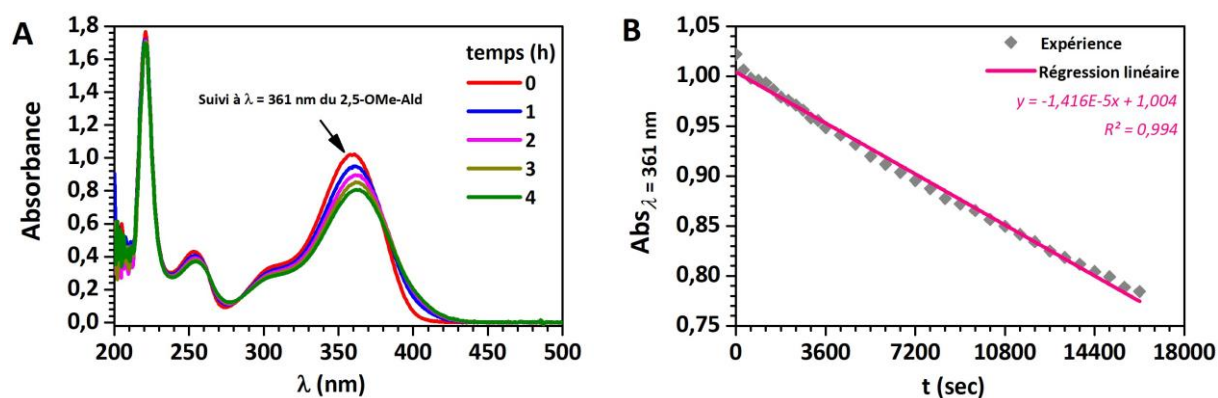


Figure 3-32 : (A) Suivi spectroscopique UV-Vis en cuve de 50 µM de 4-OH-2,5-OMe-Ald en présence de 100 µM d'H₂O₂, dans un tampon Tris 0.1 M + 10 µM EDTA à pH 8.5. Un spectre est enregistré toutes les 5 minutes, et sont représentés les spectres à 0 (rouge), 1 (bleu), 2 (rose), 3 (marron), et 4 heures (vert). (B) Points gris : extraction de la valeur d'absorbance à λ = 361 nm (caractéristique de la disparition de l'aldéhyde) en fonction du temps ; ligne pleine rose : régression linéaire des points expérimentaux ($Abs_{\lambda=361\text{ nm}} = -1.416 \times 10^{-5} \cdot \text{temps (en sec)} + 1.004$, $R^2 = 0.994$).

Des spectres enregistrés au cours du temps, nous avons pu extraire la valeur d'absorbance à λ = 361 nm, caractéristique de la transformation de l'aldéhyde en 2,5-OMe-BQ (**Figure 3-32B**). A partir du coefficient d'extinction molaire déterminé expérimentalement ($\epsilon = 20439 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et de la pente de la régression linéaire, nous avons pu en déduire une constante cinétique de $k_{d,Ald} = 0.14 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Nous avons donc ici affaire à une cinétique de déprotection par H₂O₂ qui est bien plus lente que celle de son homologue diester boronique. Bien que ce ne soit pas favorable pour l'autocatalyse, la sonde étant très stable, nous avons cherché à voir si elle pouvait conduire à une réactivité autocatalytique exploitable.

3.3.2. Réaction d'autocatalyse avec la sonde 4-OH-2,5-OMe-Ald

Nous avons également reproduit la même expérience d'autocatalyse que celle que nous avons conduite pour la sonde **2,5-OMe-PB**, c'est-à-dire 250 µM de NADH, 10 nM de diaphorase, 50 µM de sonde **4-OH-2,5-OMe-Ald**, dans un tampon Tris 0.1 M (+ 10 µM EDTA) à pH 8.5. Les résultats sont présentés en **Figure 3-33**. Il est important de noter que pour le suivi cinétique de cette sonde, la valeur

de l'absorbance à 340 nm résulte de la somme de la DO de l'aldéhyde avec celle du NADH, et ainsi nous observons une DO plus élevée à environ 1.2 au lieu de 0.8 (les 0.4 de différence étant la contribution de l'absorbance du **4-OH-2,5-OMe-Ald** à cette longueur d'onde).

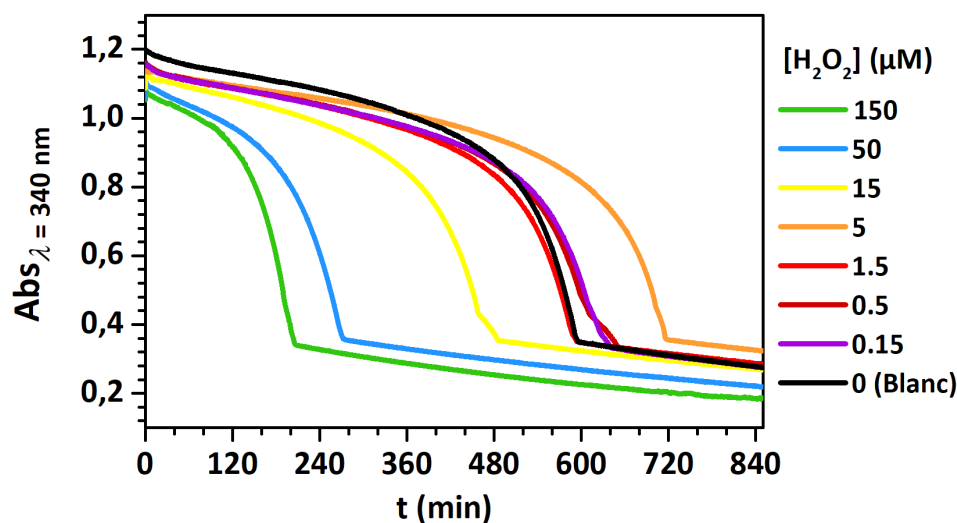


Figure 3-33 : Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à 340nm de la réaction entre 50 μM de **4-OH-2,5-OMe-Ald** et une gamme de concentration de H_2O_2 , en présence de 10 nM DI et 250 μM NADH dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 8.5. $[H_2O_2]$ (μM) : en vert 150, en bleu 50, en jaune 15, en orange 5, en rose 1.5, en rouge 0.5, en violet 0.15 et en noir 0 (blanc).

Les performances analytiques avec cette sonde **4-OH-2,5-OMe-Ald** (**Figure 3-33**) sont encore moins bonnes que pour son analogue diboronique **2,5-OMe-PB** (**Figure 3-30**), avec une limite de détection 10 fois plus élevée et des temps de réponse plus lents (jusqu'à 10 heures pour la réponse non-spécifique). Ces mauvaises performances analytiques avec la **4-OH-2,5-OMe-Ald** résultent de la plus faible réactivité de déprotection par rapport à la sonde **2,5-OMe-PB** (0.14 contre $8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, soit 57 fois moins efficace). Cependant, malgré cette faible réactivité, nous arrivons à obtenir des sigmoïdes caractéristiques d'une réaction autocatalytique. Cette expérience souligne donc la force d'amplification de notre système. Malgré une très faible réactivité de la boucle catalytique 1, l'association avec une boucle catalytique 2 efficace donne lieu à une consommation totale du NADH. Cela montre également la nécessité de concevoir des sondes stables mais également réactives vis-à-vis d' H_2O_2 pour atteindre de bonnes performances analytiques.

4. Conclusion générale sur les réactions autocatalytiques impliquant des sondes doublement masquées

Dans ce chapitre, une nouvelle stratégie de masquage de la naphthoquinone par deux groupes pinacols esters boroniques positionnés sur les groupes hydroxyles, la 1,4-bis-DBN, a été démontrée comme un excellent design de sonde pour notre réaction autocatalytique. Cette sonde, intrinsèquement stable qui ne conduit pas à l'apparition de la naphthoquinone par auto-oxydation, nous a dans un premier temps permis d'atteindre une limite de détection de 0.15 μM en H_2O_2 en environ 6 heures, limite semblable à son analogue monoboronique instable qui lui réagissait en une dizaine minute. Nous avons cherché à comprendre l'origine de cette lenteur et la raison de cette même limite de détection malgré une meilleure stabilité de la sonde. Pour cela, un mécanisme moléculaire complexe a dû être élucidé, et notamment la nécessité de décrire la réaction d'auto-oxydation par ses étapes radicalaires redox à 1 électron a été prouvée. Grâce à cette description détaillée de la cinétique de notre système autocatalytique, nous avons pu simuler numériquement avec une excellente précision nos résultats expérimentaux. Ce modèle en main, nous avons pu comprendre l'origine de cette lenteur, due à la stabilisation de l'intermédiaire monoboronique dans des conditions réductrices (*i.e.* en présence du couple réducteur DI/NADH). L'instabilité du NADH par son auto-oxydation à 1 électron en présence d' O_2 a été montrée comme responsable avec cette nouvelle sonde de la réponse non-spécifique de notre système, traduisant ainsi le non gain en performance analytique. Cependant, ce modèle en main, nous avons pu chercher des clés d'optimisation pour atteindre une meilleure limite de détection, notamment en jouant sur les différences de sensibilité des réponses spécifiques et non-spécifiques de la réaction autocatalytique. En augmentant le pH d'une unité seulement, nous avons pu atteindre une limite de détection de 50 nM en seulement quelques dizaines de minutes. Cette étude a également mis en avant l'activité NADH oxydase de la diaphorase, dont la concentration joue sur la réponse non-spécifique de notre système. Enfin, une autre piste d'optimisation a été de trouver d'autres cycleurs redox ou stratégie de masquage de ceux-ci, mais comme montré avec la 2,5-OMe-BQ et sa protection par un aldéhyde, trouver un design plus efficace est une tâche complexe.

Le mécanisme de la réaction autocatalytique par la 1,4-bis-DBN et le réducteur DI/NADH a maintenant été appréhendé en détails par suivi spectrophotométrique. Cependant, son suivi par voie électrochimique est également une alternative intéressante car elle peut conduire à un dispositif de détection d' H_2O_2 simple, peu coûteux, et facile à intégrer dans un système miniaturisé. Cette approche originale de suivi électrochimique de la réaction autocatalytique sera présentée dans le chapitre suivant, sous plusieurs approches, et l'impact de ce nouveau mode de lecture sera discuté.

5. Références Bibliographiques

- (1) Pallu, J. Développement de Nouvelles Stratégies d'amplification Moléculaire Auto-Catalytique Avec Un Cyclage Redox, ED 388 Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire, Université Paris Diderot, 2020.
- (2) Ishiyama, T.; Ishida, K.; Miyaura, N. Synthesis of Pinacol Arylboronates via Cross-Coupling Reaction of Bis(Pinacolato)Diboron with Chloroarenes Catalyzed by Palladium(0)–Tricyclohexylphosphine Complexes. *Tetrahedron* **2001**, *57* (49), 9813–9816. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00998-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00998-X).
- (3) Pallu, J.; Rabin, C.; Hui, P.; S. Moreira, T.; Creste, G.; Calvet, C.; Limoges, B.; Mavré, F.; Branca, M. Exponential Amplification by Redox Cross-Catalysis and Unmasking of Doubly Protected Molecular Probes. *Chemical Science* **2022**, *13* (9), 2764–2777. <https://doi.org/10.1039/D1SC06086D>.
- (4) Yuan, X.; Miller, C. J.; Pham, A. N.; Waite, T. D. Kinetics and Mechanism of Auto- and Copper-Catalyzed Oxidation of 1,4-Naphthohydroquinone. *Free Radical Biology and Medicine* **2014**, *71*, 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.021>.
- (5) Limoges, B.; Marchal, D.; Mavré, F.; Savéant, J.-M. Electrochemistry of Immobilized Redox Enzymes: Kinetic Characteristics of NADH Oxidation Catalysis at Diaphorase Monolayers Affinity Immobilized on Electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (6), 2084–2092. <https://doi.org/10.1021/ja0569196>.
- (6) Song, Y.; Buettner, G. R. Thermodynamic and Kinetic Considerations for the Reaction of Semiquinone Radicals to Form Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Free Radical Biology and Medicine* **2010**, *49* (6), 919–962. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.009>.
- (7) Roginsky, V.; Barsukova, T. Kinetics of Oxidation of Hydroquinones by Molecular Oxygen. Effect of Superoxide Dismutase. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, No. 7, 1575–1582. <https://doi.org/10.1039/B000538J>.
- (8) Miller, D. M.; Buettner, G. R.; Aust, S. D. Transition Metals as Catalysts of “Autoxidation” Reactions. *Free Radical Biology and Medicine* **1990**, *8* (1), 95–108. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90148-C](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90148-C).
- (9) E. Alegría, A.; López, M.; Guevara, N. Thermodynamics of Semiquinone Disproportionation in Aqueous Buffer. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1996**, *92* (24), 4965–4968. <https://doi.org/10.1039/FT9969204965>.

- (10) Baxendale, J. H.; Hardy, H. R. The Ionization Constants of Some Hydroquinones. *Trans. Faraday Soc.* **1953**, *49*, 1140. <https://doi.org/10.1039/tf9534901140>.
- (11) Roginsky, V.; Barsukova, T. Kinetics of Oxidation of Hydroquinones by Molecular Oxygen. Effect of Superoxide Dismutase. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **2000**, *0* (7), 1575–1582. <https://doi.org/10.1039/B000538J>.
- (12) Brunmark, A.; Cadenas, E. Redox and Addition Chemistry of Quinoid Compounds and Its Biological Implications. *Free Radical Biology and Medicine* **1989**, *7* (4), 435–477. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90126-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90126-3).
- (13) Roginsky, V.; Pisarenko, L.; Bors, W.; Michel, C.; Saran, M. Comparative Pulse Radiolysis Studies of Alkyl- and Methoxy-Substituted Semiquinones Formed from Quinones and Hydroquinones. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1998**, *94* (13), 1835–1840. <https://doi.org/10.1039/A801082J>.
- (14) Rao, P. S.; Hayon, E. Ionization Constants and Spectral Characteristics of Some Semiquinone Radicals in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem.* **1973**, *77* (19), 2274–2276. <https://doi.org/10.1021/j100638a003>.
- (15) Brunmark, A.; Cadenas, E.; Segura-Aguilar, J.; Lind, C.; Ernster, L. DT-Diaphorase-Catalyzed Two-Electron Reduction of Various p-Benzoquinone- and 1,4-Naphthoquinone Epoxides. *Free Radical Biology and Medicine* **1988**, *5* (3), 133–143. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90076-7](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90076-7).
- (16) Butler, J.; Hoey, B. M. The Apparent Inhibition of Superoxide Dismutase Activity by Quinones. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* **1986**, *2* (1), 77–81. [https://doi.org/10.1016/0748-5514\(86\)90127-3](https://doi.org/10.1016/0748-5514(86)90127-3).
- (17) Ilan, Y. A.; Czapski, G.; Meisel, D. The One-Electron Transfer Redox Potentials of Free Radicals. I. The Oxygen/Superoxide System. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1976**, *430* (2), 209–224. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(76\)90080-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(76)90080-3).
- (18) Loeff, I.; Goldstein, S.; Treinin, A.; Linschitz, H. Interactions of Formate Ion with Triplets of Anthraquinone-2-Sulfonate, 1,4-Naphthoquinone, Benzophenone-4-Carboxylate and Benzophenone-4-Sulfonate. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95* (11), 4423–4430. <https://doi.org/10.1021/j100164a048>.
- (19) Bielski, B. H. J.; Cabelli, D. E.; Arudi, R. L.; Ross, A. B. Reactivity of HO₂/O₂⁻ Radicals in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1985**, *14* (4), 1041–1100. <https://doi.org/10.1063/1.555739>.

- (20) Rao, P. S.; Hayon, E. Redox Potentials of Free Radicals. IV. Superoxide and Hydroperoxy Radicals . O₂- and . HO₂. *J. Phys. Chem.* **1975**, *79* (4), 397–402. <https://doi.org/10.1021/j100571a021>.
- (21) Nadezhdin, A.; Dunford, H. B. Oxidation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide by Hydroperoxyl Radical. A Flash Photolysis Study. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83* (15), 1957–1961. <https://doi.org/10.1021/j100478a007>.
- (22) Forni, L. G.; Willson, R. L. Thiyl and Phenoxy Free Radicals and NADH Direct Observation of One-Electron Oxidation. *Biochemical Journal* **1986**, *240* (3), 897–903. <https://doi.org/10.1042/bj2400897>.
- (23) Kuivila, H. G.; Armour, A. G. Electrophilic Displacement Reactions. IX. Effects of Substituents on Rates of Reactions between Hydrogen Peroxide and Benzeneboronic Acid¹⁻³. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (21), 5659–5662. <https://doi.org/10.1021/ja01578a020>.
- (24) Hui, P. Autocatalytic Molecular Amplification Strategies Based on Unmasking of Redoxactive Molecular Probes. These de doctorat, Université Paris Cité, 2021. <https://www.theses.fr/2021UNIP7285> (accessed 2023-07-28).
- (25) Dakin, H. D. Transformation of Aryl Aldehyde into Phenol Mediated by Hydrogen Peroxide under Strongly Basic Conditions. *Am. Chem. J.* **1909**, No. 42, 477–498.
- (26) Ye, S.; Hu, J. J.; Yang, D. Tandem Payne/Dakin Reaction: A New Strategy for Hydrogen Peroxide Detection and Molecular Imaging. *Angewandte Chemie* **2018**, *130* (32), 10330–10334. <https://doi.org/10.1002/ange.201805162>.

Chapitre 4 : SUIVI ELECTROCHIMIQUE DU SIGNAL DE LA REACTION AUTOCATALYTIQUE HOMOGENE AVEC UNE REDUCTION ENZYMATIQUE

S'il est possible de suivre la réaction autocatalytique par spectrophotométrie UV-Visible en suivant la consommation exponentielle du réducteur au cours du temps, venir suivre l'évolution de la réaction par des méthodes électrochimiques, notamment ampérométriques, peut être une alternative intéressante. D'une part, ces méthodes sont souvent employées pour des applications type capteur de par leur faible coût, leur rapidité et leur simplicité d'utilisation¹⁻³. D'autre part, suivre la réaction d'un point de vue électrochimique peut permettre de suivre d'autres espèces impliquées dans la réaction autocatalytique afin d'avoir une vision complémentaire au suivi par spectrophotométrie UV-Vis. Au cours de la thèse de Justine Pallu, une première approche de suivi indirect par voltamétrie cyclique de la réaction autocatalytique avait été démontré pour la sonde à bras espaceur auto-immolant **4-sis-DBN** en présence du couple réducteur enzymatique DI/NADH⁴. La réaction autocatalytique avait été réalisée séparément et un volume de quelques microlitres du mélange réactionnel avait été prélevé périodiquement et déposé sur une électrode sérigraphiée afin de déterminer par voltamétrie cyclique le contenu de la goutte *via* la mesure du courant de réduction catalytique d'O₂ (i_{cat}) en fonction du temps (**Figure 4-1A**). Grâce à cette approche, il avait été possible de tracer des cinétiques sigmoïdales similaires à celles observées par spectrophotométrie UV-Vis (**Figure 4-1B**, obtenues ici pour 15 et 0 μM d'H₂O₂).

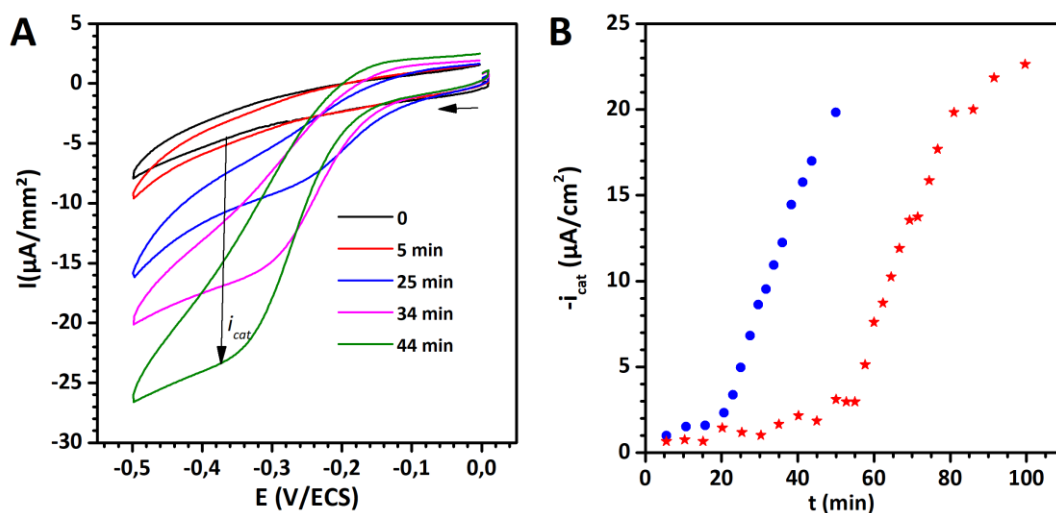


Figure 4-1 : (A) Suivi indirect de la réaction autocatalytique par voltamétrie cyclique ($50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) sur une électrode sérigraphiée en présence de $50 \mu\text{M}$ de sonde **4-sis-DBN**, $15 \mu\text{M}$ d'H₂O₂, 10 nM de DI et $250 \mu\text{M}$ de NADH dans un tampon Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA à pH 8.5. (B) Tracé du suivi cinétique de l'autocatalyse en reportant l'intensité de plateau i_{cat} relevé en A en fonction du temps pour 15 (points bleus) et 0 (étoiles rouges) μM d'H₂O₂ initial. Extrait de la référence⁴.

Cependant, ce type de suivi indirect par échantillonnage est laborieux à mettre en œuvre et il ne permet pas un suivi en temps réel de l'information. Dans ce chapitre, nous avons cherché à réaliser un suivi continu de la réaction autocatalytique par voie électrochimique. Nous allons voir que plusieurs approches sont possibles, notamment par chronoampérométrie selon deux modes de lecture :

- (i) Un mode chronoampérométrique pour lequel le potentiel appliqué (E_{app}) est tel que $E_{app} < E_{Q/QH_2}^{0'}$. Dans ce cas, c'est l'accumulation de la forme Q que l'on suivra en solution *via* sa réduction à l'électrode en QH_2 , mais qui en présence d' O_2 en solution conduira à la mesure d'un courant de réduction catalytique d' O_2 . Le suivi de la quantité de Q sera donc de nature indirecte.
- (ii) Un mode chronoampérométrique pour lequel $E_{app} > E_{Q/QH_2}^{0'}$. Dans ce cas, c'est l'accumulation de la forme QH_2 en solution qui sera suivie à l'électrode *via* son oxydation. Cependant en raison de la présence du couple réducteur DI/NADH, ce courant d'oxydation de QH_2 sera lui aussi de nature catalytique. Le suivi de la quantité de QH_2 se fera donc également de manière indirecte *via* son rôle de médiateur redox pour la catalyse d'oxydation enzymatique du NADH en NAD^+ .

Le potentiel standard apparent de la 1,4-NQ à pH 8.5 peut être facilement déterminé expérimentalement par voltamétrie cyclique en l'absence d' O_2 comme le montre la **Figure 4-2**. On obtient ainsi à partir de la moyenne du pic cathodique et anodique une valeur de $E_{Q/QH_2}^{0'} = -0.28$ V/ECS.

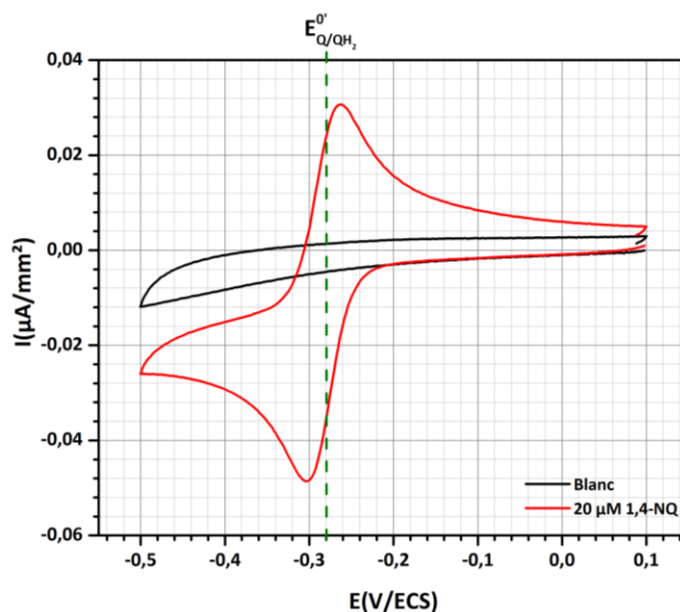


Figure 4-2 : Voltamétrie cyclique sur une électrode de carbone vitreux à 0.01 V.s^{-1} de 20 (en rouge) ou 0 µM de 1,4-naphthoquinone dans un tampon Tris 0.1 M + 10 µM EDTA à pH 8.5 sous argon.

Indépendamment d'une mesure ampérométrique, nous verrons également qu'il est possible de suivre l'autocatalyse *via* une mesure potentiométrique, un mode de lecture non invasif.

Dans le début de ce chapitre 4, les chronoampérométries seront réalisées dans une cellule électrochimique classique à 4 entrées (voir **Figure 4-3**), nécessitant de travailler dans quelques

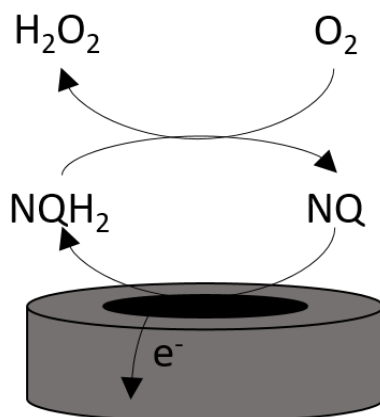
millilitres. L'électrode de référence est une électrode au calomel saturé, séparée de la solution électrolytique par un pont salin contenant le même électrolyte, tandis que la contre-électrode est un fil de platine plongeant directement dans la solution.



Figure 4-3 : Cellule électrochimique à 4 entrées

1. Suivi chronoampérométrique de la réaction autocatalytique *via* la réduction électrochimique de l'oxygène médiée par la 1,4-naphthoquinone

Comme représenté sur le schéma ci-après, en présence d'O₂ et d'un potentiel constant appliqué à l'électrode tel que $E_{app} < E_{Q/QH_2}^0$, la 1,4-NQ joue un rôle de catalyseur dans la réduction électrochimique d'O₂ en H₂O₂. Cette catalyse se manifeste par l'apparition d'un courant de catalyse aux potentiels de réduction de la 1,4-NQ en 1,4-NQH₂, et ce courant catalytique peut donc être exploité pour indirectement suivre en continu l'augmentation exponentielle de la concentration en quinone produite en solution au cours d'une réaction autocatalytique. Cela doit donc se traduire par une évolution exponentielle de l'intensité du courant mesuré au cours du temps.



Pour pouvoir démontrer cela, nous avons dans un premier temps réalisé, dans des conditions hydrodynamiques (sur électrode tournante), une chronoampérométrie à un potentiel contrôlé de $E_{app} = -0.3$ V (donc inférieure au $E_{Q/QH_2}^{0'}$ de -0.28 V/ECS) dans un tampon Tris de pH 8.5 dans lequel nous avons injecté des ajouts croissants de 1,4-NQ. Comme le montre la **Figure 4-4**, on observe une densité de courant de réduction (courant stationnaire) qui augmente (par saut) proportionnellement à la concentration en 1,4-NQ ajoutée. Nous avons choisi de travailler sur électrode tournante afin d'avoir un courant stationnaire qui ne dépend pas de l'épuisement en O_2 dans la couche de réaction-diffusion. En effet, l'électrode ne doit être qu'un moyen de lecture de ce qui se déroule au cœur de la solution.

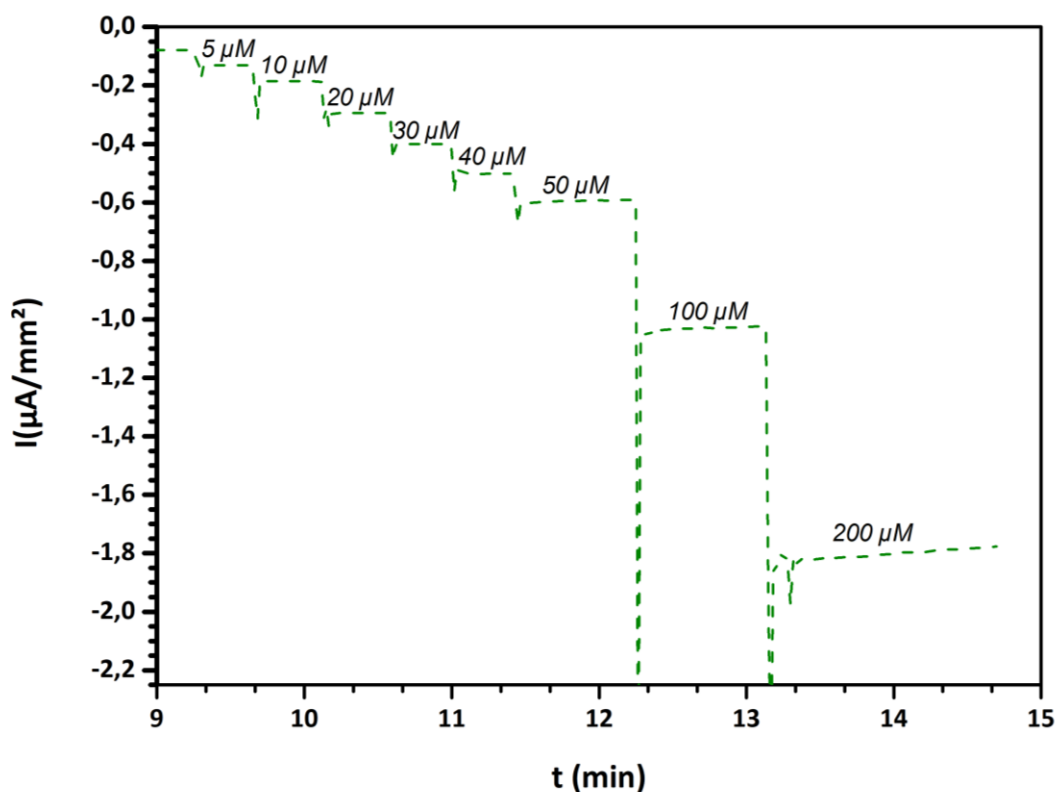


Figure 4-4 : Chronoampérogramme à $E_{app} = -0.3V/ECS$ sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500$ RPM) de différents ajouts dosés de 1,4-NQ (la concentration en médiateur est indiquée au-dessus de chaque courant de plateau catalytique). Electrolyte Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 8.5, non désaéré. Les ajouts sont effectués après stabilisation du courant à environ 9 minutes.

Les valeurs absolues des densités de courant stationnaire pour chaque concentration en 1,4-NQ (5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 et 200 μM) sont relevées et, après soustraction du courant résiduel enregistré en l'absence de 1,4-NQ, sont reportées **Figure 4-5** (étoile rouge). La régression linéaire obtenue atteste que la densité de courant évolue linéairement avec la concentration en 1,4-NQ.

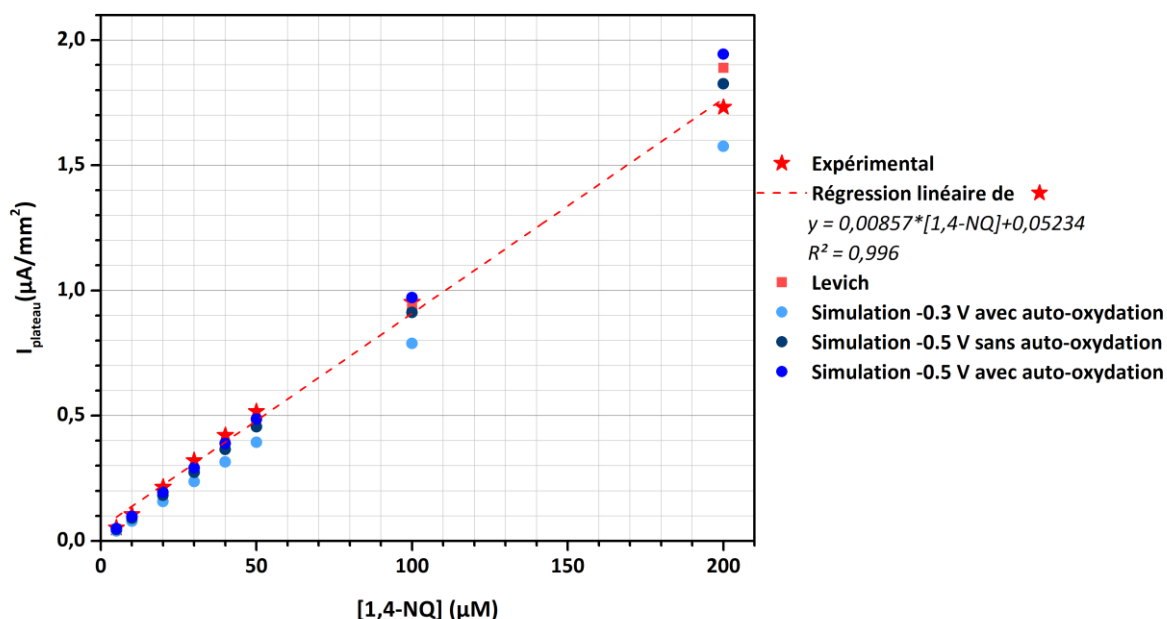


Figure 4-5 : Densité de courant de plateau ($\mu\text{A}/\text{mm}^2$) en fonction de la concentration en 1,4-NQ (μM) extrait de la **Figure 4-4** (étoile rouge). En pointillés rouges, la régression linéaire obtenue avec pour équation $y = 0.00857 * x + 0.05234$, $R^2 = 0.996$. En carré rose les densités de courant obtenues par l'équation de Levich. En rond les densités obtenues par simulation sur DigiElch : -0.3 V avec auto-oxydation (cyan), -0.5 V sans auto-oxydation (bleu foncé), et -0.5 V avec auto-oxydation (bleu).

Il est intéressant de comparer ces résultats avec les densités de courant attendues lors d'une simple réduction de la 1,4-NQ en l'absence d' O_2 . Cela peut être calculé grâce à l'équation de Levich ci après⁵ (donnée ici pour $T = 25^\circ\text{C}$) :

$$I_L = \alpha n F A D^{\frac{2}{3}} \omega^{\frac{1}{2}} \nu^{\frac{-1}{6}} [\text{NQ}]_0$$

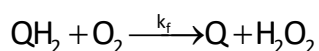
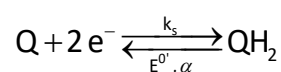
avec :

- $\alpha = 0.620$, un terme du profil de vitesse près de la surface de l'électrode à 25°C en $\text{rad}^{-0.5}$
- $n = 2$, le nombre d'électrons échangés
- $F = 96500 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$, la constante de Faraday
- $A = 0.07 \text{ cm}^2$, la surface de l'électrode
- $D = 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$, le coefficient de diffusion de la 1,4-NQ⁶
- $\omega = 157.1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$, la vitesse de rotation de l'électrode
- $\nu = 0.01 \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$, la viscosité cinématique de l'eau à 25°C
- $[\text{NQ}]_0$, la concentration de 1,4-NQ en $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$

Les densités de courant théoriques calculées à partir de l'équation de Levich s'avèrent être légèrement plus élevées que celles déterminées expérimentalement. Cela indique tout d'abord que le gain de courant lié à la catalyse de réduction d' O_2 par la 1,4-NQH₂ est faible. Ensuite, l'équation de

Levich ne s'applique que pour un potentiel où la cinétique de transfert électronique hétérogène est négligeable devant le transport de masse par diffusion-convection de la quinone. Or, à $E_{app} = -0.3$ V/ECS, le transfert électronique hétérogène est encore limitant car le potentiel appliqué est proche du potentiel standard apparent de la 1,4-NQ ($E^0 = -0.28$ V/ECS).

Afin d'essayer de mieux rendre compte des densités de courant mesurées, plusieurs simulations numériques prenant en compte le transport de masse dans des conditions hydrodynamiques (électrode tournante), la catalyse de réduction d' O_2 par la quinone, ainsi que les cinétiques de transfert électronique hétérogène (*via* les équations de Butler-Volmer) ont été réalisées avec l'aide du logiciel DigiElch. Pour cela nous avons considéré le schéma réactionnel simplifié suivant :



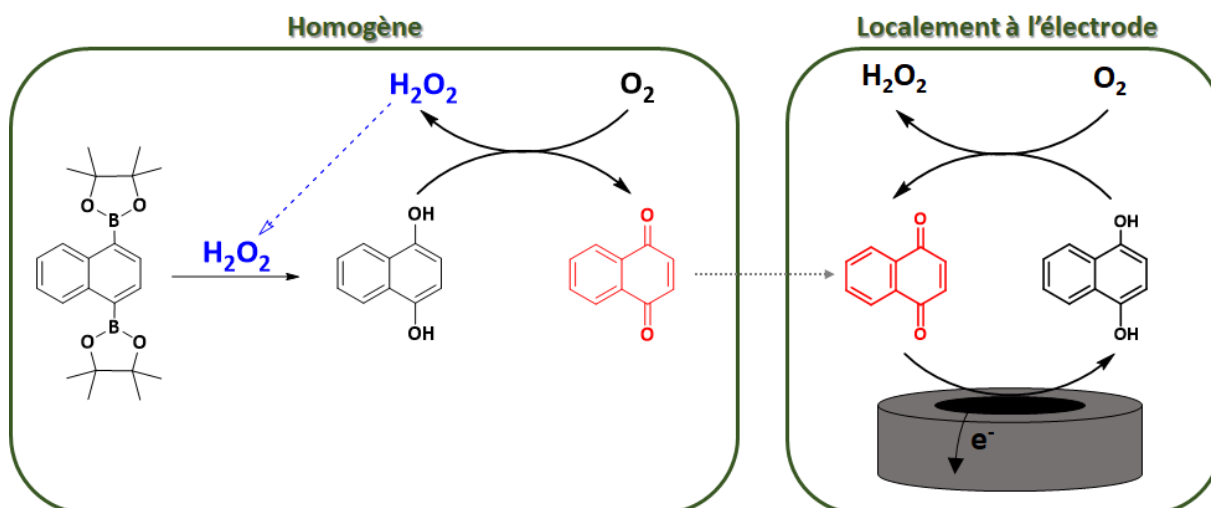
avec $E^0 = -0.28$ V/ECS, $\alpha = 0.5$ (coefficient de transfert), $k_s = 0.1$ cm.s⁻¹ (constante cinétique de transfert électronique hétérogène), $k_f = 3300$ M⁻¹.s⁻¹ ($k_f = 0$ M⁻¹.s⁻¹ en l'absence d' O_2 , cf. **Figure 4-5** points bleu foncé).

Les simulations de chronoampérométrie ont donc été réalisées pour trois cas différents : (i) à -0.3 V en présence d' O_2 (c'est-à-dire des conditions identiques à l'expérience, prenant donc en compte la contribution catalytique liée à la réaction d'auto-oxydation de l'hydroquinone) ; (ii) à -0.5 V avec la réaction d'auto-oxydation désactivée (soit $k_f = 0$ M⁻¹.s⁻¹, ce qui correspond à des conditions où le courant est intégralement contrôlé par le transport en solution, ce qui doit permettre de retrouver l'équation de Levich) ; (iii) à -0.5 V avec la réaction d'auto-oxydation activée (ce qui permet d'évaluer la contribution de la catalyse dans des conditions où la cinétique de transfert électronique n'interfère pas). Dans le premier cas à -0.3 V/ECS (rond bleu clair), les simulations donnent des intensités de courant légèrement inférieures à celles obtenues expérimentalement, les points s'écartant de plus en plus avec l'augmentation de la concentration en catalyseur. Cependant c'est une représentation simplifiée de l'auto-oxydation, et l'allure reste satisfaisante pour confirmer les résultats expérimentaux. Dans les deux autres cas à -0.5 V/ECS, les données déterminées par simulation sont proches de celles calculées à partir de l'équation de Levich. Quand l'auto-oxydation est activée (rond bleu), les densités de courant sont légèrement plus importantes que lorsqu'elle est désactivée (rond bleu foncé). Ce qu'il est important de retenir ici est que la contribution de la catalyse au courant stationnaire global est faible, voire négligeable au regard du courant de réduction de la 1,4-NQ. Ce résultat est la conséquence d'une cinétique d'auto-oxydation de l'hydroquinone beaucoup trop lente, ce qui fait que la majeure partie de la 1,4-NQH₂ produite à l'électrode quitte la couche

hydrodynamique de diffusion avant d'avoir eu le temps de réagir avec O_2 . Ainsi, le courant que nous observons est principalement dû à la réduction de la 1,4-NQ en 1,4-NQH₂. Au final, cette méthode ampérométrique permet de suivre de façon analytique et en temps réel la concentration de Q en solution, ce qui est tout à fait opportun pour pouvoir suivre en temps réel l'évolution de la concentration en Q au cours de la réaction autocatalytique, tout comme d'ailleurs au cours de la réaction de déprotection par H_2O_2 de la sonde comme nous allons maintenant le voir.

1.1. Suivi électrochimique en réduction de la déprotection oxydative de la sonde 1,4-bis-DBN en présence de H_2O_2

La sonde diprotégée 1,4-bis-DBN ne présente pas d'activité électrochimique dans nos conditions, il est donc possible de suivre sa cinétique de déprotection oxydative par H_2O_2 *via* une mesure ampérométrique à -0.3 V, tel que schématisé ci-dessous.



La **Figure 4-6A** présente les résultats du suivi ampérométrique de la cinétique d'apparition de la 1,4-NQH₂ au cours de la déprotection par H_2O_2 de la sonde diboronique. Chacune des deux concentrations en H_2O_2 testées (150 et 15 μ M) donnent lieu à l'apparition croissante d'un courant cathodique qui se stabilise après un certain temps. Une fois normalisés (**Figure 4-6B**) ces suivis cinétiques par chronoampérométrie (traits pleins) s'avèrent très proches des cinétiques précédemment obtenues par suivi UV-Vis (traits pointillés). Cela démontre que le mode de lecture ampérométrique est tout à fait approprié pour suivre en temps réel la cinétique de déprotection par H_2O_2 de la sonde 1,4-bis-DBN, ce qui laisse également supposer que cette approche doit être extrapolable au suivi cinétique de la réaction autocatalytique.

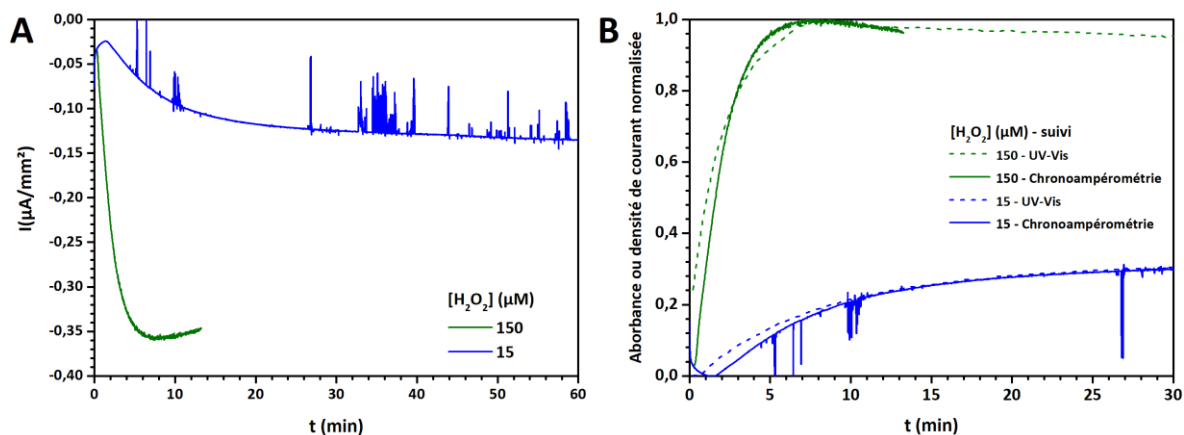
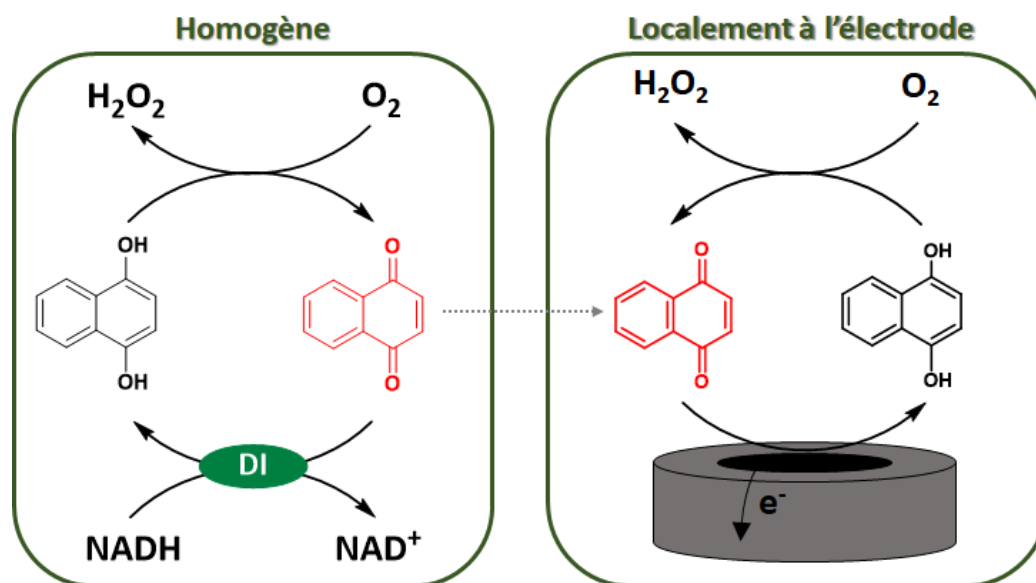


Figure 4-6 : (A) Chronoampéromogrammes à $E_{\text{app}} = -0.3\text{V}/\text{ECS}$ sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500\text{ RPM}$) de 50 μM 1,4-bis-DBN avec deux concentrations initiales de H_2O_2 . Electrolyte Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 8.5, non désaéré. (B) Données A normalisées (traits pleins), et normalisation du suivi de la même réaction dans les mêmes conditions par spectrophotométrie UV-Vis (traits pointillés).

1.2. Suivi électrochimique en réduction du recyclage redox de la 1,4-naphthoquinone en présence du couple DI/NADH

Le cyclage redox du médiateur peut également être suivi par voie ampérométrique sur électrode tournante comme représenté sur le schéma ci-dessous. De même que pour la déprotection oxydative de la sonde, la convection forcée due à la rotation de l'électrode permet de sonder localement à l'électrode ce qui se passe en phase homogène.



Un exemple de suivi cinétique du cyclage de 10 μM de 1,4-NQ en présence du couple réducteur DI/NADH et d'oxygène dissous est présenté **Figure 4-7**.

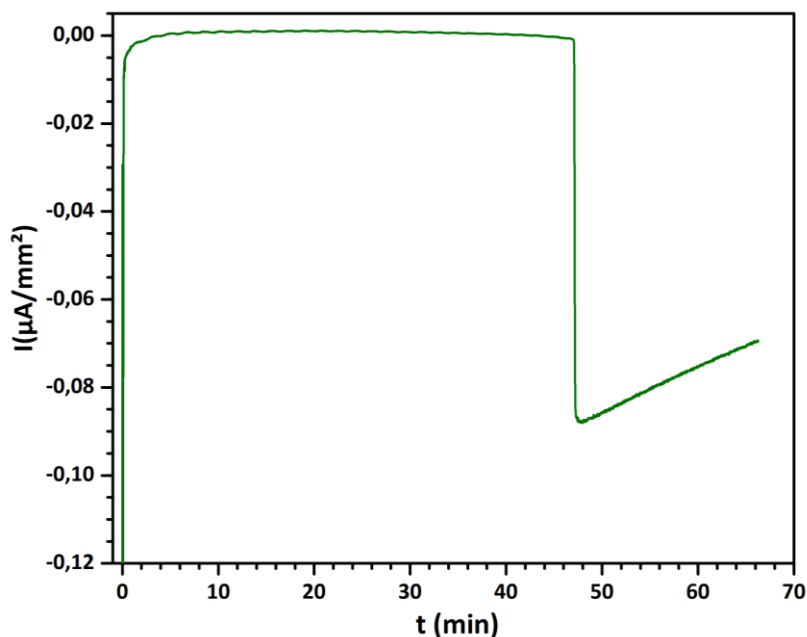


Figure 4-7 : Chronoampérogramme à $E_{app} = -0.3$ V/ECS sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500$ RPM) de $10 \mu\text{M}$ 1,4-NQ, $250 \mu\text{M}$ NADH et 10 nM DI. Electrolyte : Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5, non désaéré.

La forme du chronoampérogramme présente trois phases distinctes. Dans les premières secondes de polarisation de l'électrode, le courant (de nature essentiellement capacitive) décroît très rapidement pour se stabiliser vers une intensité constante proche de zéro, puis après une quarantaine de minutes le courant se met à croître brutalement jusqu'à atteindre une valeur maximale d'environ $-0.09 \mu\text{A}/\text{mm}^2$, pour ensuite décroître à nouveau mais lentement et presque linéairement avec le temps. Le faible courant de réduction que l'on mesure au cours de la phase stationnaire de ~ 40 min s'explique par le fait que la quinone se retrouve en solution majoritairement dans son état réduit sous l'action réductrice de l'enzyme ainsi que du large excès de NADH. Ce n'est donc que lorsque le réservoir de NADH est épuisé que la 1,4-NQH₂ peut alors s'auto-oxyder en 1,4-NQ, ce qui conduit à l'augmentation soudaine du courant de réduction de la 1,4-NQ. Si on ajoute alors du NADH à la solution (**Figure 4-8**), la 1,4-NQ est à nouveau rapidement reconvertie en 1,4-NQH₂, ce qui conduit à faire redécroître le courant de réduction vers une valeur proche de zéro. Il est intéressant de faire remarquer que ce courant stationnaire proche de zéro qui démontre que la quinone se retrouve majoritairement dans son état réduit est en bon accord avec la cinétique d'ordre zéro que nous avons observé lors du suivi du NADH par spectroscopie UV-Vis dans des conditions similaires, ce qui d'ailleurs nous avait permis de conclure que la forme 1,4-NQH₂ était majoritairement accumulée en solution en raison d'une cinétique de réduction non cinétiquement déterminante.

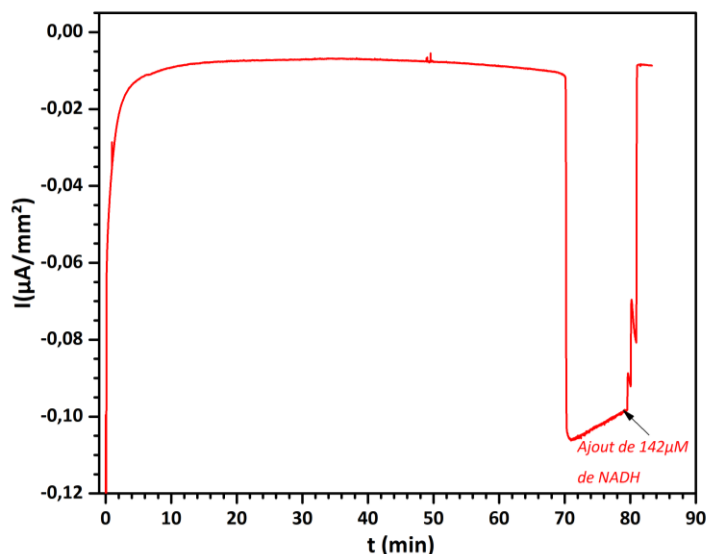


Figure 4-8 : Chronoampéromètre à $E = -0.3\text{V}/\text{ECS}$ sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500$ RPM) de $10 \mu\text{M}$ 1,4-NQ, $250 \mu\text{M}$ NADH et 10 nM DI. Electrolyte : Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5, non désaéré. A 80 min, $142 \mu\text{M}$ de NADH sont ajoutées dans la solution.

Cependant, le temps observé ici pour que le NADH soit totalement consommé est bien plus long que celui que nous avons déterminé par spectroscopie UV-Vis. L'expérience a donc été renouvelée plusieurs fois et les résultats se sont révélés être très variables d'une expérience à l'autre comme le montre la **Figure 4-9** ainsi que les différents temps de pics (t_{pic} , temps auquel le courant apparait soudainement après épuisement du NADH) obtenus et rassemblés dans le tableau ci-dessous :

Expérience n°	1	2	3	4	5	6	Moyenne
t_{pic} (min)	47	7	6	65	71	8	34 ± 31

Il ressort de ces données que le temps d'apparition du courant de réduction peut se diviser en deux familles : une première famille d'expériences qui présente des temps de réponse très courts autour de 7 ± 1 min (donc assez proche des temps mesurés par spectroscopie UV-vis au chapitre 3 pour avoir la disparition complète du NADH) et, de manière plus surprenante, une seconde famille présentant des temps de réponse beaucoup plus longs, proche de l'heure (61 ± 12 min). Sur la **Figure 4-9**, il est également intéressant de noter que les expériences conduisant à un temps de réponse longs semblent être corrélées à un courant stationnaire qui ne tend pas vers zéro après les premières minutes d'application du potentiel (courbes en bleu de la **Figure 4-9**), alors que expériences qui présentent des temps de réponse plus courts (courbes en vert) indiquent toutes un courant stationnaire beaucoup plus proche de zéro.

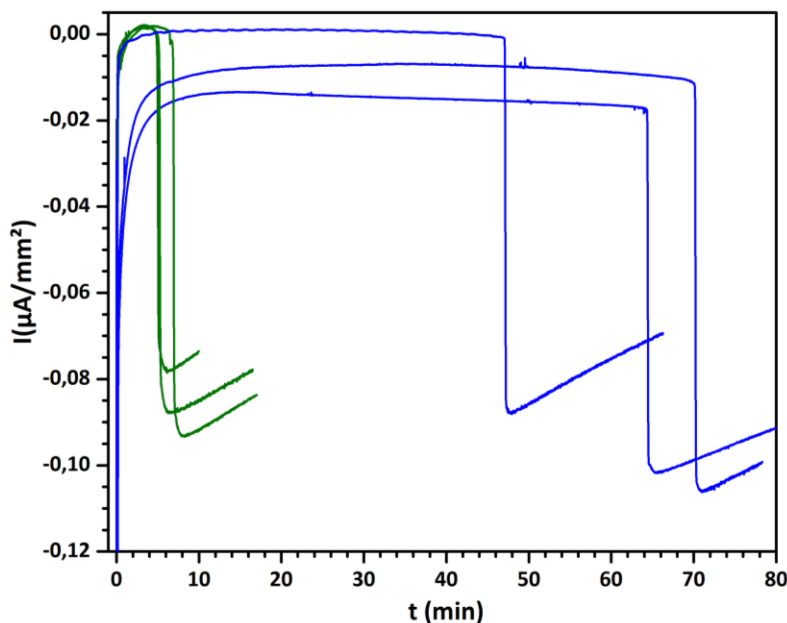


Figure 4-9 : Chronoampérogrammes à $E_{app} = -0.3V/ECS$ sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500$ RPM) de $10 \mu M$ 1,4-NQ, $250 \mu M$ NADH et 10 nM DI. Electrolyte : Tris 0.1 M + $10 \mu M$ EDTA pH 8.5, non désaéré. En vert les expériences 2,3, 6 et en bleu les expériences 1,4 et 5.

Ces résultats semblent être la conséquence des deux régimes de catalyse que nous avons identifié au chapitre 3 lors de l'analyse du cyclage redox par spectroscopie UV-vis (**Figure 3-16**), et pour lesquels il est possible de basculer de l'un à l'autre à partir d'un seuil de concentration relativement étroit. En effet, selon que l'on se trouve dans un régime où l'autre, le temps nécessaire à la consommation totale du NADH peut différer considérablement. La simulation des cinétiques de recyclage redox (**Figure 3-17**) avaient montré que les constantes k_{red} et k_3 étaient clés dans l'établissement de la concentration seuil en 1,4-NQ, mais aussi pour déterminer la vitesse de chacun des deux régimes cinétiques. Il est donc probable que le problème de reproductibilité que nous observons ici soit le reflet de ce basculement entre chacun des deux régimes cinétiques, et qui est donc très sensible à une fluctuation de la concentration initiale en quinone.

Enfin, il est intéressant de noter qu'après l'apparition soudaine du courant (c'est-à-dire lorsque tout le NADH est consommé) le courant ne se stabilise pas mais diminue systématiquement de manière lente et continue pour l'ensemble des expériences. Cette diminution peut s'expliquer par la dégradation lente de la NQ en présence d' H_2O_2 , comme cela a été montré par Justine Pallu au cours de sa thèse⁶.

Une autre observation présentée **Figure 4-10** est que l'allure des chronoampérogrammes varie énormément avec la quantité initiale de 1,4-NQ. En effet, lorsque l'on fait passer la concentration initiale en 1,4-NQ de 10 à $15 \mu M$, la phase de latence pendant laquelle le courant stationnaire reste proche de zéro n'apparaît plus. A la place, on observe une phase de décroissance plus lente du courant

qui au bout d'une minute finit par se stabiliser à une valeur de $-0.1 \mu\text{A}/\text{mm}^2$, caractéristique de la réduction des $15 \mu\text{M}$ de 1,4-NQ. Ces observations reproductibles montrent qu'à partir d'une concentration $\geq 15 \mu\text{M}$ en 1,4-NQ, il n'est plus possible d'accumuler la quinone majoritairement sous sa forme réduite, une part importante restant donc sous la forme oxydée avec pour conséquence de produire un courant de réduction qui devient très vite dominant.

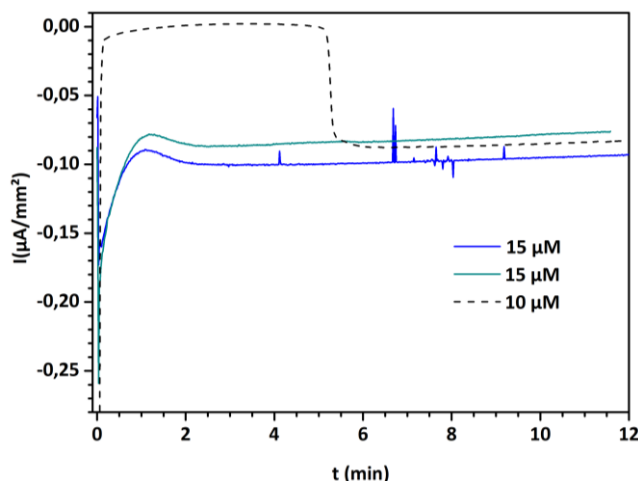


Figure 4-10 : Chronoampérogrammes à $E_{\text{app}} = -0.3\text{V}/\text{ECS}$ sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500 \text{ RPM}$) de $15 \mu\text{M}$ (ligne pleine) ou $10 \mu\text{M}$ 1,4-NQ (en pointillés), $250 \mu\text{M}$ NADH et 10 nM DI. Electrolyte : Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5, non désaéré.

Pour pouvoir confirmer cette analyse, les variations des concentrations des espèces au cours du cyclage redox ont été simulées numériquement (avec l'aide du logiciel COPASI) en prenant en compte le mécanisme réactionnel ainsi que les constantes cinétiques décrits au chapitre 3 (**Figure 3-11** et **Tableau 3-1**). Les simulations obtenues pour chacune des concentrations de 10 et $15 \mu\text{M}$ en 1,4-NQ, sont présentées **Figure 4-11**.

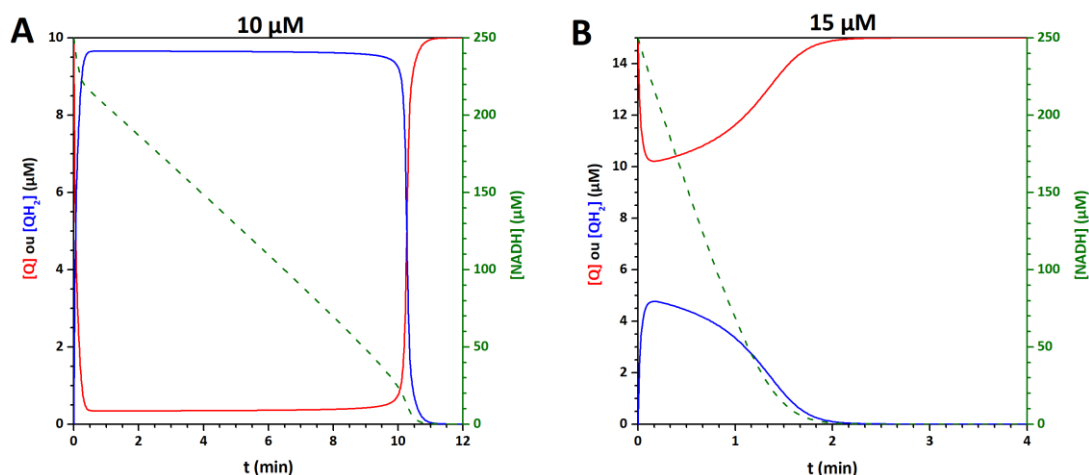


Figure 4-11 : Simulation numérique sur le logiciel COPASI de l'évolution des concentrations en : (*axe de gauche*) 1,4-NQ (bleu), en 1,4-NQH₂ (rouge) et (*axe de droite*) NADH (pointillés verts) en fonction du temps. **(A)** $[1,4\text{-NQ}]_0 = 10 \mu\text{M}$, **(B)** $[1,4\text{-NQ}]_0 = 15 \mu\text{M}$.

Lorsque la concentration initiale du catalyseur est de 10 μM , la simulation (**Figure 4-11A**) montre que tant qu'il y a du NADH en solution, le catalyseur s'accumule majoritairement sous sa forme réduite 1,4-NQH₂ (en bleu). Cela signifie que la vitesse globale de cyclage redox est gouvernée par la cinétique d'oxydation de la 1,4-NQH₂ par O₂ car celle-ci est plus lente que la vitesse de réduction de la 1,4-NQ par l'enzyme. Lorsque presque tout le NADH est consommé (au bout d'environ 10 min), la forme 1,4-NQH₂ s'auto-oxyde alors rapidement en 1,4-NQ. La simulation montre que la consommation de NADH suit une décroissance linéaire avec le temps au cours de la majeure partie du cyclage redox.

Dans le cas où la concentration initiale de catalyseur est de 15 μM , la simulation (**Figure 4-11B**) montre un comportement différent. Bien que la 1,4-NQ (en rouge) soit réduite en 1,4-NQH₂ au cours des premières minutes, la forme oxydée reste majoritaire en solution. Cela signifie que la vitesse de réduction enzymatique n'est plus aussi rapide devant la vitesse d'auto-oxydation que précédemment. Cette différence marquée que l'on observe en passant de 10 à 15 μM en quinone pointe la complexité de la réactivité du cyclage redox qui peut basculer rapidement d'un régime cinétique à un autre avec la concentration en catalyseur. C'est un aspect important à retenir pour la suite du travail, car dans des conditions d'autocatalyse la concentration en quinone s'accumule de manière exponentielle avec le temps, et nous verrons que le passage d'un régime à l'autre se produit environ au même moment que la consommation totale du NADH.

1.3. Suivi électrochimique en réduction de la réaction autocatalytique

Avant d'entreprendre le suivi électrochimique, nous avons commencé par reproduire les expériences d'autocatalyse dites standards, c'est-à-dire sur microplaque avec suivi par spectrophotométrie UV-Vis, afin de vérifier la reproductibilité de notre système ainsi que le niveau de qualité de l'ensemble des réactifs. Pour rappel, les conditions standards sont les suivantes : dans un tampon Tris 0.1 M à pH 8.5 non désaéré avec 10 μM d'EDTA sont mélangés 50 μM de sonde 1,4-bis-DBN, 10 nM de DI, 250 μM de NADH, et des concentrations variables en H₂O₂ (entre 5 et 150 μM) plus un contrôle à blanc pour évaluer la réponse non-spécifique du système.

Les résultats obtenus sont regroupés **Figure 4-12**. On peut noter que les cinétiques d'autocatalyse sont systématiquement plus rapides que celles qui ont été reportées au chapitre précédent. Nous pensons que cela est lié au fait que les expériences ont été réalisées avec plusieurs mois d'intervalles et, qu'entre temps, nous avons été amené à renouveler le stock de diaphorase et dont la qualité peut différer significativement d'un lot à l'autre. Nous en avons conclu qu'il était donc important de reproduire périodiquement les expériences d'autocatalyse dites standards afin de pouvoir les utiliser comme référence pour nos études comparatives de suivi électrochimique dans des conditions similaires.

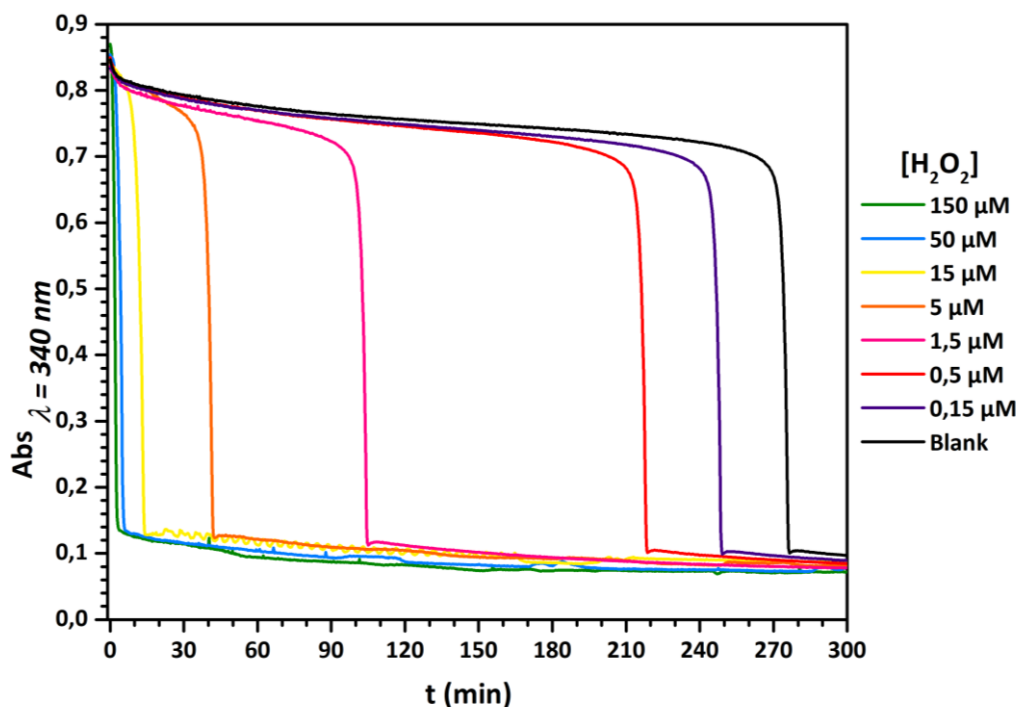
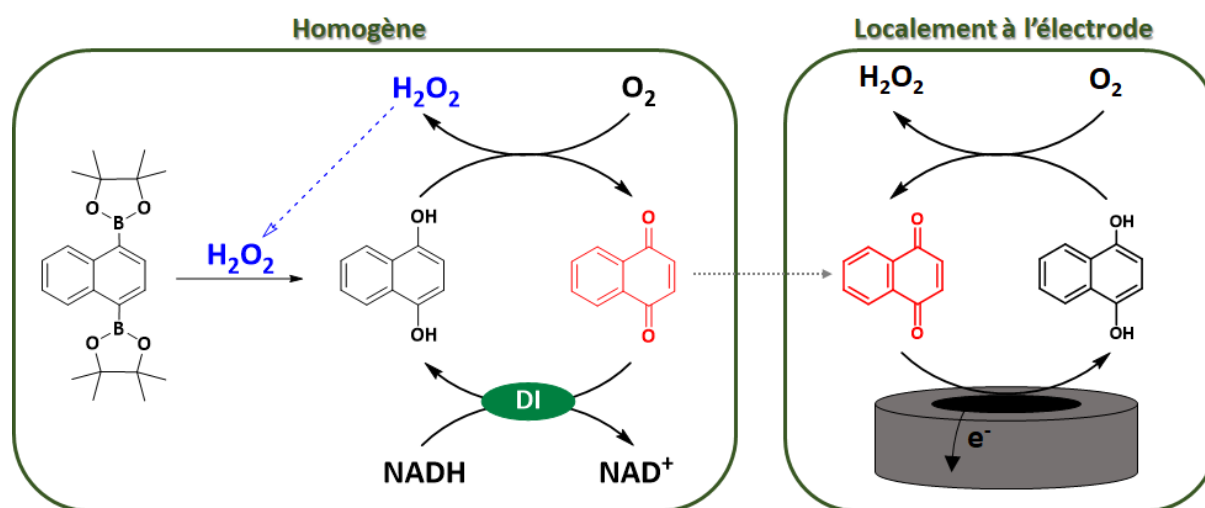


Figure 4-12 : Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à 340 nm de la réaction entre la sonde 1.4-bis-DBN et une gamme de concentration de H_2O_2 , en présence de 10 nM DI et 250 μM NADH dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 8.5. $[H_2O_2]$ (μM) : en vert 150, en bleu 50, en jaune 15, en orange 5, en rose 1.5, en rouge 0.5, en violet 0.15 et en noir 0 (blanc).

Les suivis ampérométriques à -0.3 V de la réaction autocatalytique ont été réalisés avec la même cellule que celle employée pour le suivi électrochimique du cyclage redox. Le principe de ce suivi ampérométrique est rappelé ci-dessous.



Les cinétiques ampérométriques obtenues pour différentes concentrations en H_2O_2 sont regroupées **Figure 4-13A**.

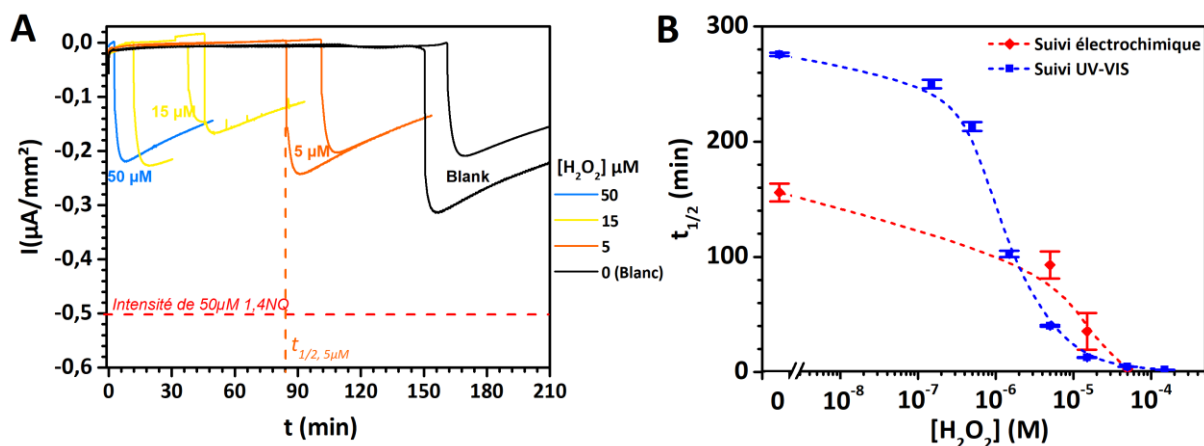


Figure 4-13 : (A) Chronoampérométries à $E_{app} = -0.3V/ECS$ sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500$ RPM) de 50 μM 1,4-bis-DBN, 250 μM NADH, 10 nM DI et différentes concentrations en H_2O_2 . Electrolyte 7 mL Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 8.5, non désaéré. **(B)** En rouge, courbe de calibration des temps de pics (temps auquel un courant cathodique apparaît soudainement) en fonction de la concentration en H_2O_2 initial. En bleu courbe de calibration des $t_{1/2}$ en fonction de la concentration en H_2O_2 initiale extrait de la **Figure 4-12**.

A travers la mesure du courant stationnaire proche de zéro, les courbes cinétiques montrent une phase de latence d'autant plus longue que la concentration en H_2O_2 est faible. Puis, à l'issue de cette latence, on observe comme attendu l'apparition soudaine d'un courant de réduction avec une intensité qui augmente jusqu'à des valeurs maximales comprises entre -0.15 et -0.3 $\mu A/mm^2$, pour ensuite décroître lentement. Cette apparition soudaine du courant indique que tout le NADH en solution a été consommé par la réaction autocatalytique et que la 1,4-NQH₂ produite à partir de la sonde peut alors s'auto-oxyder. Curieusement, l'intensité n'atteint pas la valeur de courant que l'on mesure lorsque l'on ajoute simplement 50 μM de 1,4-NQ en présence d'oxygène dans un même tampon. On pourrait en effet s'attendre à retrouver une intensité équivalente à celle de 50 μM en 1,4-NQ si on considère que les 50 μM de sonde 1,4-bis-DBN peuvent être intégralement déprotégés à l'issue de la réaction (les pertes par protodéboronation de la sonde et même de dégradation de la quinone peuvent être considérées comme négligeables). Il semblerait donc que la conversion de la sonde en 1,4-NQH₂ s'effectue avec un faible rendement pour des raisons non-élucidées. Après avoir atteint un maximum, le courant de réduction décroît comme observé lors de l'étude du cyclage redox. Nous pouvons donc, comme précédemment, l'attribuer à la dégradation de la quinone en présence d' H_2O_2 .

Si on compare les temps de réponse à ceux obtenus précédemment par spectrophotométrie UV-Vis, le système est ici plus lent. En effet, le temps de réponse moyen pour 5 μM d' H_2O_2 est d'environ 93 min avec lecture électrochimique contre 40 min avec lecture spectrophotométrique. Ainsi, le fait de procéder à une mesure électrochimique semble inhiber la réaction autocatalytique. De plus la

reproductibilité des expériences s'avère moins bonne que par lecture spectrophotométrique (pour laquelle les cinétiques sont mesurées en triplicatas avec des temps de réponse souvent très proches).

Le contrôle à blanc, c'est-à-dire en absence d' H_2O_2 , se comporte également différemment dans ces conditions électrochimiques. En effet, il apparaît beaucoup plus tôt que sur microplaques (160 min vs. 280 min). Cela peut s'expliquer par une contribution de la réduction directe d' O_2 en H_2O_2 à l'électrode, qui potentiellement représente une source non négligeable dans la réponse non-spécifique, et ce malgré un ratio surface d'électrode/volume de solution faible. Il ressort donc qu'avec une mesure électrochimique, on obtient une courbe de calibration en H_2O_2 fortement limitée en limite de détection par la réponse non-spécifique, avec également une sensibilité de détection moins bonne comme en atteste la comparaison des courbes de calibration de la **Figure 4-13B**. En conclusion, les performances analytiques avec ce mode de lecture électrochimique sont beaucoup moins bonnes qu'avec un mode de lecture spectrophotométrique.

Pour tenter de comprendre l'origine de cette différence de performance analytique, nous avons étudié l'influence de l'agitation induite par la rotation de l'électrode sur la cinétique d'autocatalyse. En effet, il est reporté dans la littérature qu'une convection forcée peut ralentir la vitesse d'une réaction autocatalytique⁷. Nous avons donc réalisé la même expérience à une vitesse de rotation de l'électrode tournante plus élevée (3000 au lieu de 1500 RPM). Les résultats rassemblés **Figure 4-14** indiquent l'absence d'une influence significative de la vitesse de rotation sur les temps de réponse.

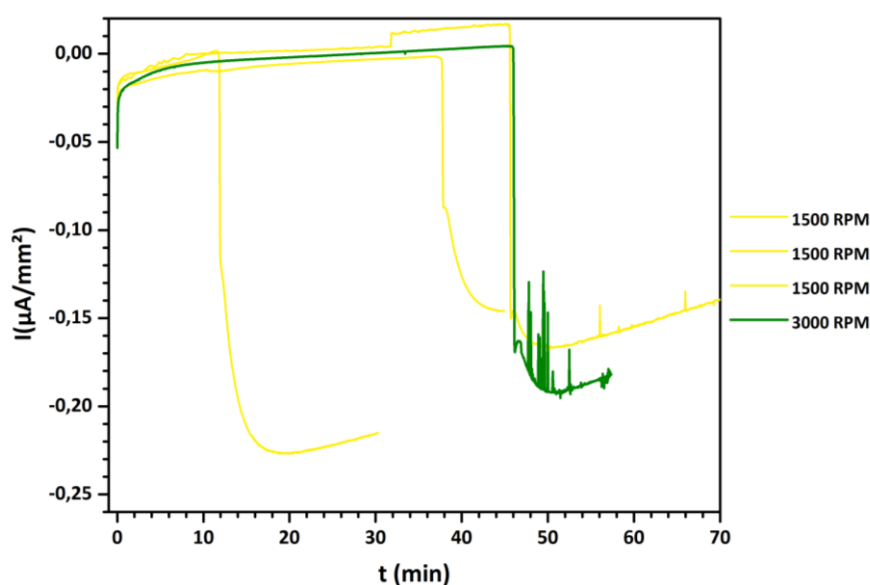


Figure 4-14 : Chronoampérogrammes à $E_{app} = -0.3$ V/ECS sur électrode tournante en carbone vitreux de $50 \mu\text{M}$ 1,4-bis-DBN, $250 \mu\text{M}$ NADH, 10 nM DI et $15 \mu\text{M}$ H_2O_2 . Electrolyte : 7 mL Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5, non désaéré. En jaune, vitesse de rotation de l'électrode est $\omega = 1500 \text{ RPM}$, en vert, vitesse de rotation de l'électrode est $\omega = 3000 \text{ RPM}$

Enfin, une autre observation expérimentale est à noter. Lorsque que l'on « zoome » sur la zone de phase de latence pour les résultats de la **Figure 4-13A**, on observe de faibles courants d'oxydation malgré le potentiel de -0.3V/ECS (**Figure 4-15**). Cela est attribué à la forme réduite 1,4-NQH₂ qui s'accumule en solution durant la phase de latence, et qui, étant donné le potentiel relativement proche du potentiel standard apparent, peut ainsi être légèrement oxydée électrochimiquement.

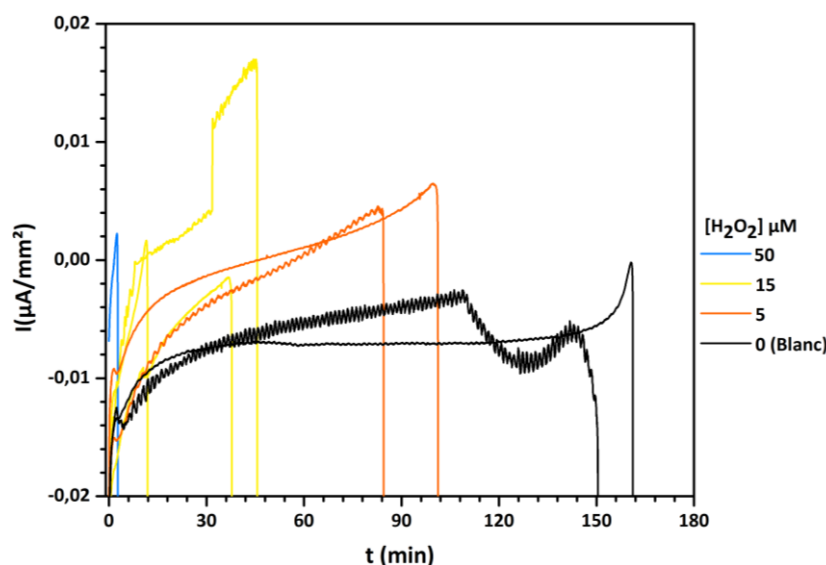


Figure 4-15 : Chronoampérogrammes à $E_{app} = -0.3$ V/ECS sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500$ RPM) de $50 \mu\text{M}$ 1,4-bis-DBN, $250 \mu\text{M}$ NADH, 10 nM DI et différentes concentrations en H_2O_2 . Electrolyte 7 mL Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5, non désaéré. (Zoom sur les faibles intensités de la **Figure 4-13**)

Ce phénomène, certes négligeable ici, permet d'envisager d'aller non plus suivre à des potentiels cathodiques l'apparition de la 1,4-NQ, mais plutôt d'aller suivre l'apparition de la forme réduite 1,4-NQH₂. Un des avantages envisagés est que la contribution non-spécifique de production de H_2O_2 par réduction directe d' O_2 à l'électrode devrait être négligeable à ces potentiels plus anodiques. C'est ce que nous allons explorer dans la partie suivante.

2. Suivi chronoampérométrique de la réaction autocatalytique *via* le suivi de l'oxydation catalytique du NADH par la diaphorase médiée par la 1,4-naphthoquinone

Comme annoncé au début de ce chapitre, une autre approche permettant de suivre électrochimiquement la réaction autocatalytique consiste à se positionner à un potentiel anodique contrôlé afin de suivre en temps réel le courant d'oxydation enzymatique du NADH *via* la médiation redox du couple 1,4-NQ/1,4-NQH₂ à l'électrode, et dont la concentration en solution croît de façon exponentielle au cours du processus d'autocatalyse.

2.1. Principe de l'oxydation catalytique du NADH par la diaphorase médiée par la 1,4-naphthoquinone

La catalyse d'oxydation enzymatique du NADH médiée à une électrode par un couple redox avait déjà fait l'objet de travaux et publications au sein de l'équipe MER du Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire⁸⁻¹². Le schéma de principe est rappelé **Figure 4-16**. Ici, le couple redox 1,4-NQ/1,4-NQH₂ sert de médiateur pour transporter les électrons entre le site actif de l'enzyme et l'électrode.

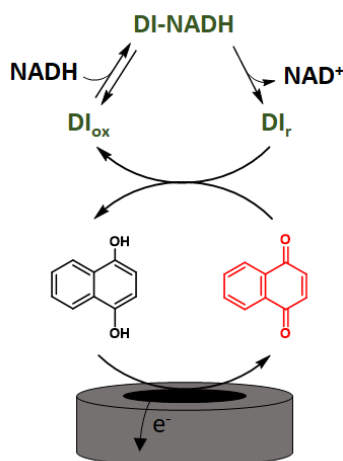


Figure 4-16 : Oxydation catalytique du NADH par la DI médiée par la 1,4-NQ.

L'étude par voltamétrie cyclique d'un tel système permet d'accéder aux constantes cinétiques qui le caractérisent. Pour cela il est nécessaire de jouer sur plusieurs paramètres clés tels que la concentration de chacun des réactifs (substrat, médiateur, enzyme), le transport de matière par convection forcée ou non, la présence ou non d'O₂ dissous (car le médiateur peut ici s'auto-oxyder spontanément), la vitesse de balayage, ou encore le pH.

Afin d'avoir une idée relativement quantitative du courant catalytique que l'on est censé enregistrer lors du suivi ampérométrique anodique de notre réaction autocatalytique, nous avons choisi d'examiner par voltamétrie cyclique le mélange réactionnel constitué de 10 nM de DI + 250 μM NADH + quelques dizaine de μM en 1,4-NQ, le tout dans un tampon Tris 0.1 M de pH 8.5, c'est-à-dire des conditions assez semblables à celles employées pour l'autocatalyse. Nous avons également choisi de travailler dans un premier temps en l'absence d'O₂ (la solution est dégazée à l'argon) et d'agitation. Les voltamogrammes présentées **Figure 4-17** montrent qu'en présence de la quinone seule (20 μM) en solution, on obtient bien la vague réversible à 2 électrons à un potentiel formel de -0.28 V/ECS. Ensuite, quand l'enzyme DI et son substrat NADH sont ajoutés, on observe la formation d'une vague sigmoïdale anodique caractérisée par un courant catalytique stationnaire d'oxydation (courant catalytique de plateau) entre -0.3 et 0.1 V/ECS. L'intensité de ce courant de plateau est directement

proportionnelle à la cinétique de la catalyse enzymatique médiée par la naphthoquinone (**Figure 4-16**). Il est important de noter qu'au début de ce plateau, vers -0.24 V/ECS, une légère bosse est observée, reflétant une contribution purement diffusivité dans l'oxydation de la 1,4-NQ (c'est-à-dire qu'une faible fraction de la 1,4-NQ n'est pas impliquée dans la catalyse enzymatique).

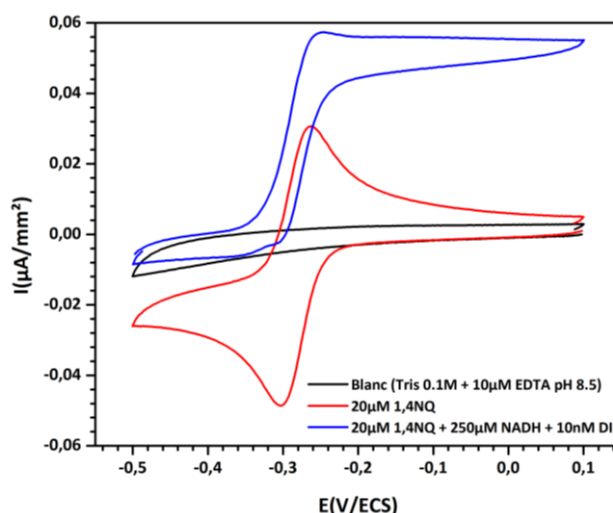


Figure 4-17 : Voltamétries Cycliques ($v = 0.01$ V/s) sur électrode en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 0$ RPM) de l'oxydation catalytique de NADH médiée par la 1,4-NQ, Tris 0.1 M + 10 μ M EDTA pH 8.5 sous argon. En noir : blanc ; En rouge : 20 μ M 1,4-NQ ; En bleu : 20 μ M 1,4-NQ + 250 μ M NADH + 10 nM DI.

De ce courant de plateau catalytique, il est possible d'extraire la constante cinétique k_{cat} de la diaphorase. En effet, l'intensité du plateau s'exprime pour une concentration forte en cosubstrat naphthoquinone par l'expression suivante⁸ :

$$\frac{i_{pl}}{FSC_p^0} = 2\sqrt{\frac{2}{\gamma}} \sqrt{\frac{k_{cat} C_E^0 D_p}{C_p^0}}$$

avec :

- i_{pl} , l'intensité du plateau en ampères
- S , la surface de l'électrode en cm^2
- C_p^0 , la concentration du cosubstrat, ici la 1,4-NQ, en mol/cm^3
- D_p , le coefficient de diffusion du cosubstrat en cm^2/s
- C_E^0 , la concentration de l'enzyme, ici la diaphorase, en mol/cm^3
- γ , un facteur stœchiométrique, égal à 2 pour un cosubstrat qui échange un électron et égal à 1 pour un cosubstrat qui échange deux électrons
- k_{cat} , la constante catalytique de turnover de l'enzyme diaphorase en s^{-1}

Ainsi, une valeur de $k_{\text{cat}} = 301 \text{ s}^{-1}$ peut être calculée.

Nous avons ensuite répété la même expérience mais dans des conditions hydrodynamiques (*i.e.*, sur électrode tournante) afin de se rapprocher des conditions expérimentales envisagées pour suivre la réaction autocatalytique (**Figure 4-18**).

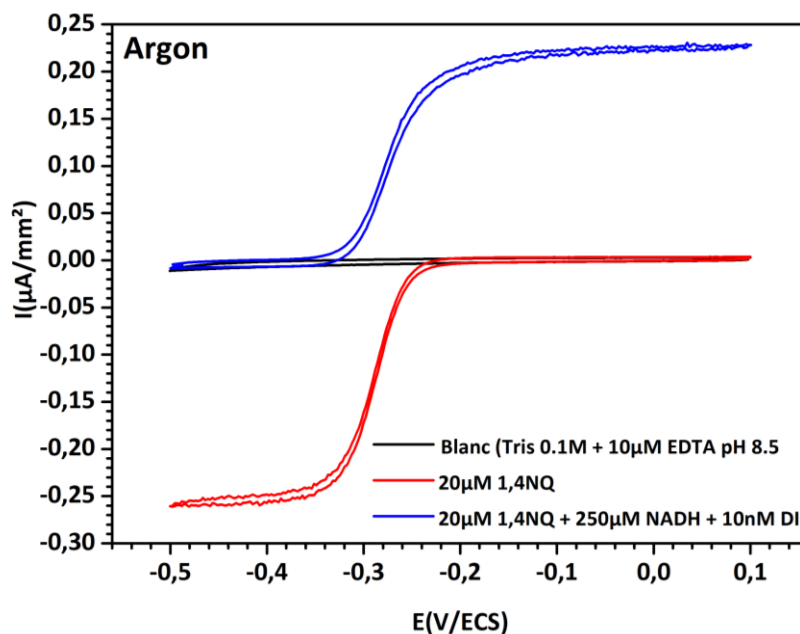


Figure 4-18 : Voltammétries Cycliques ($v = 0.01 \text{ V/s}$) sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500 \text{ RPM}$) de l'oxydation catalytique de NADH médiée par la 1,4-NQ, Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5 sous argon. En noir : blanc ; En rouge : $20 \mu\text{M}$ 1,4-NQ ; En bleu : $20 \mu\text{M}$ 1,4-NQ + $250 \mu\text{M}$ NADH + 10 nM DI.

Dans ces conditions de convection forcée, en présence uniquement de $20 \mu\text{M}$ en 1,4-NQ, on observe une vague sigmoïdale caractéristique de la réduction hydrodynamique de la 1,4-NQ en 1,4-NQH₂ et dont le courant de plateau d'environ $-0.25 \mu\text{A/mm}^2$ est directement proportionnel à la concentration en 1,4-NQ en solution. Après ajout de l'enzyme DI ainsi que de son substrat NADH, une même vague sigmoïdale mais verticalement décalée vers les potentiels anodiques est enregistrée, avec un courant de plateau anodique de même intensité que précédemment mais de signe contraire. Ce résultat démontre que l'intégralité des $20 \mu\text{M}$ de 1,4-NQ en solution sont convertis *via* la réaction enzymatique en 1,4-NQH₂ et que la contribution du courant catalytique (observée précédemment dans des conditions non-hydrodynamiques) dans le courant totale d'oxydation n'est que partielle. Cela est confirmé avec l'augmentation de la vitesse de rotation de l'électrode qui conduit à une augmentation du plateau d'oxydation proportionnellement à $\omega^{1/2}$ (**Figure 4-19**). Cette augmentation du courant avec la vitesse de rotation confirme la part diffusive importante dans le courant de plateau.

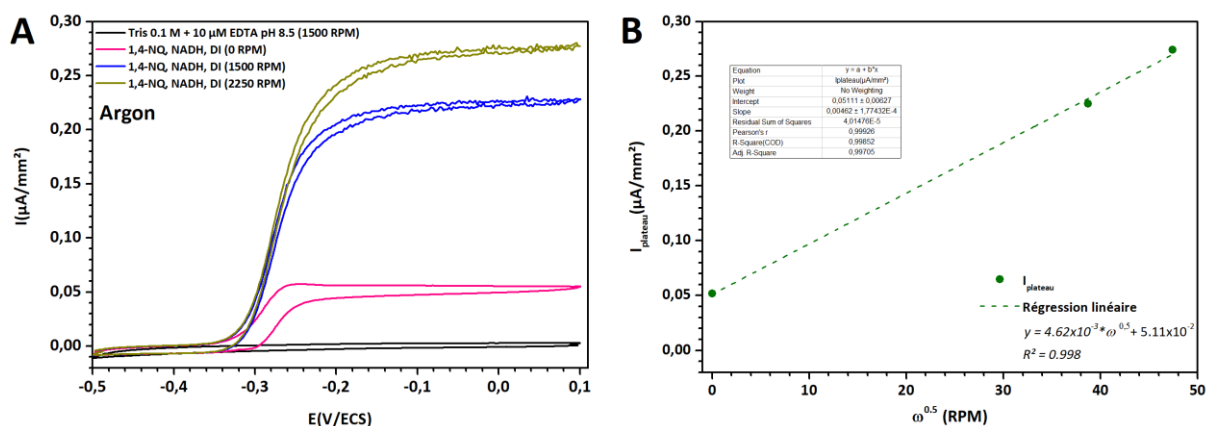


Figure 4-19 : (A) Voltamétries Cycliques ($v = 0.01$ V/s) sur électrode tournante en carbone de $20 \mu\text{M}$ 1,4-NQ, $250 \mu\text{M}$ NADH et 10 nM DI, dans du Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5 sous argon. En noir : blanc à 1500 RPM (seulement du tampon) ; En rose $\omega = 0 \text{ RPM}$; En bleu : $\omega = 1500 \text{ RPM}$; En olive : $\omega = 2250 \text{ RPM}$. (B) Tracé des densités de courant de plateau en A en fonction de ω (points verts) ; régression linéaire $y = 4.62 \times 10^{-3} \cdot \omega^{0.5} + 5.11 \times 10^{-2}$ (pointillés verts).

Nous avons ensuite répété encore une fois l'expérience mais cette fois-ci en présence de l'oxygène dissous car ce sont les conditions requises pour l'autocatalyse. Les CV ainsi enregistrées sont présentées **Figure 4-20** pour deux concentrations différentes en 1,4-NQ et aussi un peu plus faibles que précédemment (*i.e.*, 3 et $10 \mu\text{M}$).

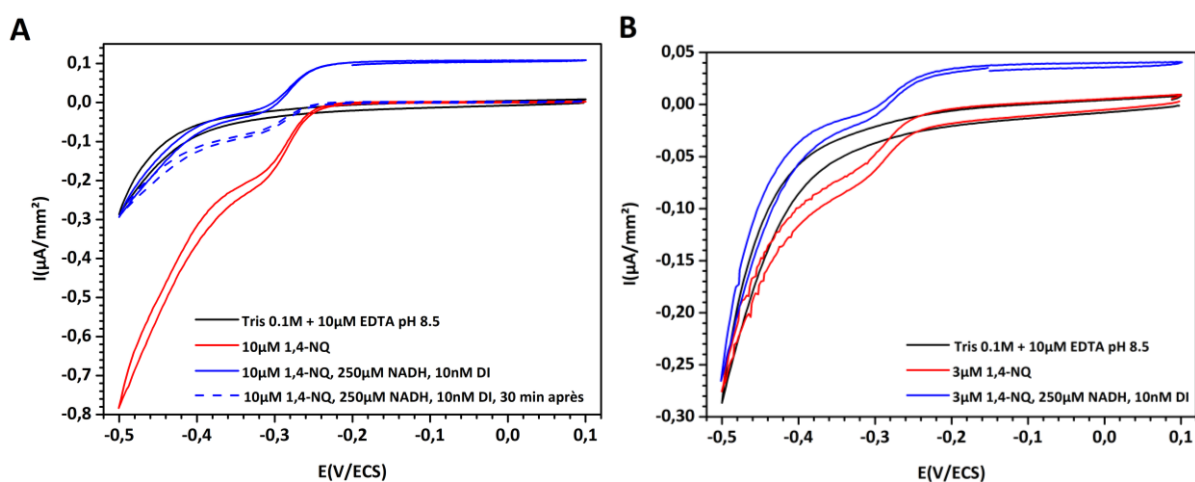


Figure 4-20 : Voltamétries Cycliques ($v = 0.01$ V/s) sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500 \text{ RPM}$) de l'oxydation catalytique de NADH médiée par **A)** $10 \mu\text{M}$ 1,4-NQ **B)** $3 \mu\text{M}$ 1,4-NQ, Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5 non désaéré. En noir : blanc ; En rouge : 1,4-NQ ; En bleu : 1,4-NQ + $250 \mu\text{M}$ NADH + 10 nM DI ; En pointillés bleu : CV après 30 min de recyclage redox.

Lorsque la quinone est seule en solution, on observe une vague de réduction sigmoïdale de la 1,4-NQ en 1,4-NQH₂, avec un courant de plateau (entre -0.3 et -0.4 V/ECS) dont une partie résulte de la réduction catalytique d'O₂ par la 1,4-NQH₂ générée à l'électrode. Ensuite, aux potentiels plus négatifs, le courant augmente en raison de la réduction directe d'O₂. Après ajout du couple réducteur DI/NADH, le courant de plateau cathodique disparaît très largement au profit d'un courant d'oxydation

de la 1,4-NQH₂ dont l'intensité de plateau résulte d'une contribution diffusive ainsi que d'une contribution plus ou moins importante de courant catalytique lié à l'oxydation enzymatique du NADH médiée par la 1,4-NQ, comme cela a été discuté précédemment dans les conditions anaérobiques. Pour la concentration en naphthoquinone de 10 μM, il est intéressant de noter qu'après 30 min de réaction, le courant d'oxydation du NADH disparaît complètement, ce qui suggère que le NADH a été totalement consommé *via* le cyclage redox. Ce résultat intéressant indique que ce courant de plateau anodique peut être exploité pour suivre ampérométriquement et en temps réel la réaction d'autocatalyse mais aussi la réaction de cyclage redox. C'est ce que nous allons donc voir maintenant.

2.2. Suivi électrochimique en oxydation du cyclage redox de la 1,4-naphthoquinone

Afin de vérifier dans quelle mesure on peut suivre la réaction de cyclage redox par ampérométrie à des potentiels anodiques, nous avons réalisé des expériences à deux potentiels contrôlés, l'un de -0.1 V, donc relativement proche du potentiel formel de la 1,4-NQ, et l'autre à +0.1 V/ECS, beaucoup plus positif. Les tracés ampérométriques obtenus sont présentés **Figure 4-21**. Après quelques secondes de polarisation de l'électrode, on observe comme attendu la mise en place d'un courant d'oxydation stationnaire, caractéristique de la présence du NADH et qui dure tant que la concentration du NADH en solution est suffisante. Puis après un laps de temps donné, on observe une extinction rapide de ce courant d'oxydation qui signe la consommation totale du NADH en solution et en même temps l'auto-oxydation de la 1,4-NQH₂ en 1,4-NQ. Le temps nécessaire à l'extinction complète du courant est similaire à celui déterminé par suivi UV-vis, soit environ 6 min à partir de 10 μM en 1,4-NQ dans les conditions standards. La répétition de l'expérience nous a permis de montrer une bonne reproductibilité des mesures. Les intensités du courant stationnaire sont également cohérentes avec celles obtenues au cours de l'étude précédente par voltamétrie cyclique. La **Figure 4-21** montre également qu'un suivi à un potentiel plus positif de +0.1 V ECS conduit à un résultat analogue.

Un autre aspect avantageux de l'approche ampérométrique anodique par rapport à celle précédente d'un suivi ampérométrique à des potentiels réducteurs est que la polarisation en continu de l'électrode ne semble pas interférer sur le processus de cyclage redox.

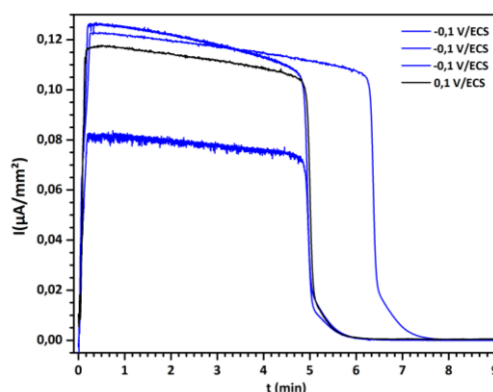


Figure 4-21 : Chronoampérogrammes à $E_{app} = -0.1$ V/ECS (en bleu) ou $E_{app} = 0.1$ V/ECS (en noir) sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500$ RPM) de $10 \mu\text{M}$ 1,4-NQ, $250 \mu\text{M}$ NADH et 10 nM DI. Electrolyte : Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5, non désaéré.

2.3. Suivi électrochimique en oxydation du système autocatalytique complet

2.3.1. Influence du potentiel

Les premières expériences de suivi ampérométrique anodique de la réaction autocatalytique ont été réalisées à un potentiel de -0.1 V/ECS dans les conditions standards. Il est important pour la suite de rappeler ici qu'une cellule électrochimique à 4 entrées (voir **Figure 4-3**) a été utilisée (volume de travail de 7 mL) avec une électrode au calomel saturé séparée de la solution électrolytique par un pont contenant le même électrolyte, et une contre-électrode constituée d'un fil de platine plongeant directement dans le mélange. Les chronoampérogrammes obtenus pour différentes concentrations initiales en H_2O_2 sont présentés **Figure 4-22**.

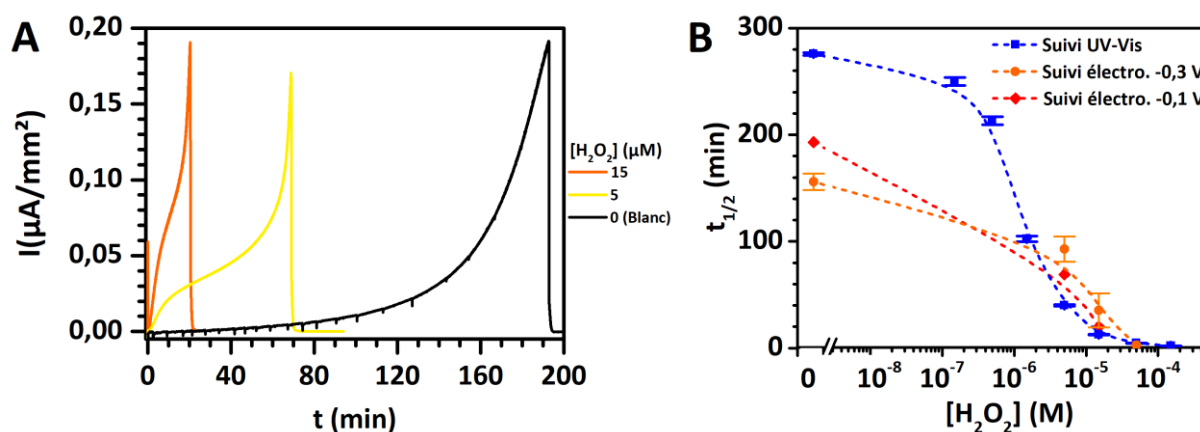


Figure 4-22 : **(A)** Chronoampérogrammes à $E_{app} = -0.1$ V/ECS sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500$ RPM) de $50 \mu\text{M}$ 1,4-bis-DBN, $250 \mu\text{M}$ NADH, 10 nM DI et différentes concentrations en H_2O_2 . Electrolyte 7 mL Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5, non désaéré. En jaune : $15 \mu\text{M}$ H_2O_2 ; en orange : $5 \mu\text{M}$ H_2O_2 ; en noir : $0 \mu\text{M}$ H_2O_2 . **(B)** En rouge, courbe de calibration par suivi électrochimique à -0.1 V/ECS des temps de pics (temps auquel le courant anodique disparaît soudainement) en fonction de la concentration en H_2O_2 initial. En orange, courbe de calibration des temps de pics obtenus par suivi électrochimique à -0.3 V/ECS en **Figure 4-13**. En bleu courbe de calibration des $t_{1/2}$ en fonction de la concentration en H_2O_2 initiale extrait de la **Figure 4-12**.

Tout d'abord, la forme des chronoampérogrammes traduit bien la nature exponentielle de l'amplification avec une dépendance à la concentration initiale en H_2O_2 . En l'absence d' H_2O_2 (courbe en noir), après une phase de latence, le courant d'oxydation fini par augmenter de façon exponentielle pour ensuite s'éteindre brutalement. Cette évolution traduit l'accumulation exponentielle de la 1,4-NQH₂ en solution *via* le déclenchement non-spécifique de la réaction autocatalytique et qui se termine par la consommation complète du NADH après plus de 3 heures. Cela permet de définir pour ce contrôle à blanc un temps de pic, caractérisant donc la réponse non-spécifique du système. Pour les chronoampérogrammes réalisés avec une concentration initiale de 15 et 5 μM en H_2O_2 , la même forme d'évolution exponentielle du courant est obtenue avec cependant des durées de réaction d'autant plus courtes que la concentration initiale en H_2O_2 est élevée. Il est également intéressant de noter qu'une augmentation linéaire du courant est observée au temps courts et qui, comme nous le verrons plus tard, correspond à la phase de déprotection de la sonde par l' H_2O_2 injecté en solution. Le report sur un graphe semi-logarithmique des temps de pics en fonction de la concentration en H_2O_2 permet de tracer la courbe de calibration de la **Figure 4-22B**. La comparaison de cette courbe avec celle obtenue précédemment par suivi ampérométrique cathodique (**Figure 4-22B**) montre que les temps de réponse vis-à-vis des différentes concentrations en H_2O_2 sont plus courts et qu'ils se rapprochent des temps obtenus pour un suivi par spectrophotométrie UV-vis. Cependant, malgré cette amélioration, la réponse non-spécifique apparaît bien plus tôt que dans le cas d'un suivi UV-Vis, ce limite très fortement la détection d' H_2O_2 vers les faibles concentrations. Cette forte réponse non-spécifique suggère que la polarisation de l'électrode à -0.1 V/ECS continue d'être une source de production résiduelle d' H_2O_2 *via* la réduction directe d' O_2 et que cela contribue à favoriser la réponse non-spécifique en dépit d'un faible rapport surface de l'électrode/volume de solution. C'est la raison pour laquelle, nous avons envisagé d'examiner plus en détail l'influence du potentiel appliqué sur la réponse non-spécifique. La **Figure 4-23** montre les chronoampérogrammes obtenus en l'absence d' H_2O_2 à trois potentiels contrôlés différents (-0.3, -0.1, et +0.1 V).

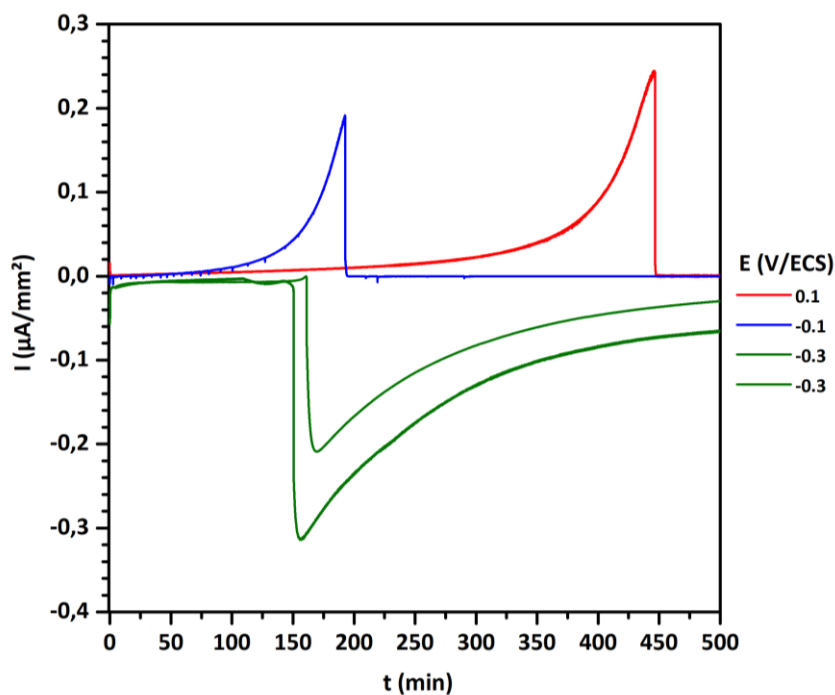


Figure 4-23 : Chronoampérogrammes obtenus à différents potentiels appliqués sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500$ RPM) avec $50 \mu\text{M}$ 1,4-bis-DBN, $250 \mu\text{M}$ NADH et 10 nM DI et $0 \mu\text{M}$ de H_2O_2 . Electrolyte : Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5, non désaéré. En vert : $E_{\text{app}} = -0.3 \text{ V/ECS}$; en bleu : $E_{\text{app}} = -0.1 \text{ V/ECS}$; en rouge $E_{\text{app}} = 0.1 \text{ V/ECS}$.

Au potentiel de $+0.1 \text{ V/ECS}$, on observe un temps de réponse de la réaction non-spécifique bien plus long que celui à -0.1 V , qui lui-même est également légèrement plus long qu'à -0.3 V/ECS (**Figure 4-23**). Cette augmentation du temps de la réponse non-spécifique à $+0.1 \text{ V/ECS}$ semble donc valider l'hypothèse d'une diminution de la production non-spécifique d' H_2O_2 par réduction directe d' O_2 à l'électrode à ce potentiel plus positif. Cependant, pour l'ensemble de ces résultats présentés jusqu'ici, une autre source possible de production non-spécifique d' H_2O_2 a été négligée. En effet, lorsque qu'un courant d'oxydation passe à travers l'électrode de travail, un courant de réduction de même intensité se met en place à la contre-électrode de Pt, et dès lors que l'on travaille dans une solution non-dégazée, la réduction directe d' O_2 doit se produire à la contre-électrode. La solution électrolytique étant en permanence agitée sous l'action de la rotation de l'électrode de travail, la faible quantité d' H_2O_2 produite par réduction d' O_2 à la contre-électrode peut alors se propager dans toute la solution et ainsi déclencher de manière non-spécifique la réaction autocatalytique. Il est important de noter que quand on suit le processus à -0.3 V/ECS , la présence de la contre-électrode en solution n'est pas un problème puisque dans ce cas c'est une réaction d'oxydation qui se déroule à la contre-électrode, soit probablement l'oxydation de l'eau. Nous en avons conclu qu'il pouvait être utile de compartimenter la contre-électrode de Pt dans un pont salin pour tenter de résoudre ce problème.

Nous avons donc réalisé à nouveau l'expérience à +0.1 V/ECS, mais cette fois-ci en séparant la contre-électrode de la solution électrolytique par un pont salin. Les résultats sont rassemblés **Figure 4-24**.

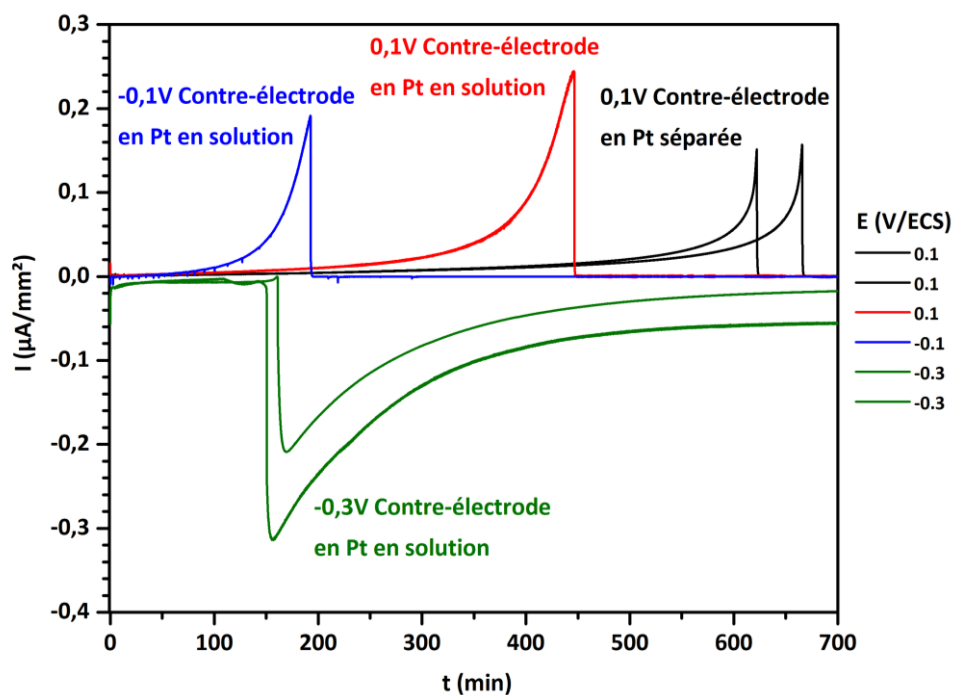


Figure 4-24 : Chronoampérogrammes à différents potentiels appliqués sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500 \text{ RPM}$) de $10 \mu\text{M}$ 1,4-NQ, $250 \mu\text{M}$ NADH et 10 nM DI et $0 \mu\text{M}$ de H_2O_2 . Electrolyte Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5, non désaéré. En vert : $E_{\text{app}} = -0.3 \text{ V/ECS}$, CE en Pt en solution ; en bleu : $E_{\text{app}} = -0.1 \text{ V/ECS}$ CE en Pt en solution ; en rouge $E_{\text{app}} = 0.1 \text{ V/ECS}$ CE en Pt en solution ; en noir $E_{\text{app}} = 0.1 \text{ V/ECS}$ CE en Pt séparée par un pont salin.

Dans ces conditions, le temps nécessaire à l'apparition de la réponse non-spécifique est bien retardé (on passe de 450 min pour la courbe en rouge à plus de 630 min pour les deux courbes en noir). Cet allongement de la réponse non-spécifique doit donc nous permettre de mieux discriminer de faibles concentrations initiales en H_2O_2 et donc, potentiellement, d'améliorer les performances analytiques. Cependant, il reste à élucider pourquoi le temps de cette réponse non-spécifique est augmenté d'un facteur 2 par rapport à celui obtenu par suivi spectrophotométrique UV-Vis sur microplaque.

2.3.2. Détection de H_2O_2 par lecture électrochimique oxydative

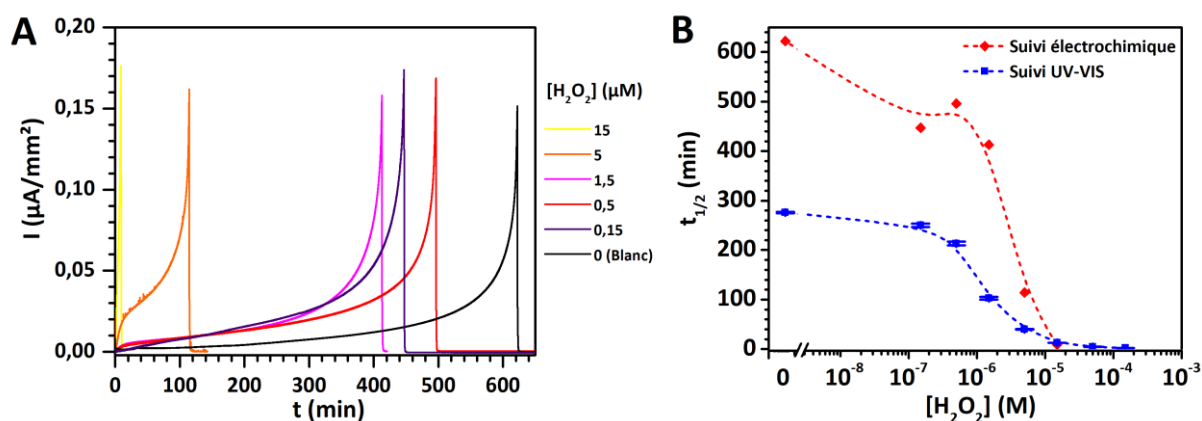


Figure 4-25 : (A) Chronoampérommes à $E_{app} = 0.1V/ECS$ sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500$ RPM) de $50 \mu M$ 1,4-bis-DBN, $250 \mu M$ NADH, 10 nM DI et différentes concentrations en H_2O_2 . Electrolyte 15 mL Tris 0.1 M + $10 \mu M$ EDTA pH 8.5 , non désaéré, contre-électrode en platine séparée par un pont salin. Concentrations initiales en H_2O_2 (μM) : 15 (jaune), 5 (orange), 1.5 (rose), 0.5 (rouge), 0.15 (violet), 0 (noir). (B) En rouge, courbe de calibration des temps de pics (temps auquel le courant anodique disparaît soudainement) en fonction de la concentration en H_2O_2 initial. En bleu courbe de calibration des $t_{1/2}$ en fonction de la concentration en H_2O_2 initiale extrait de la **Figure 4-12**.

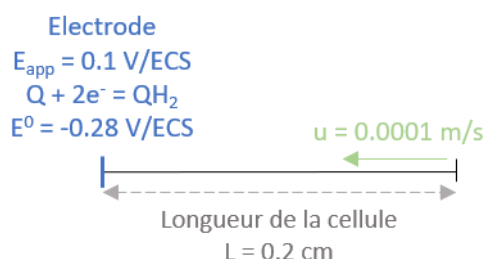
A partir de nos conditions expérimentales améliorées (électrodes de référence et auxiliaire isolées dans un compartiment de type allonge en verre, et électrode de travail en carbone vitreux en rotation à 1500 RPM, potentiel appliqué de $+0.1$ V/ECS), des mesures à différentes concentrations en H_2O_2 ont été réalisées (**Figure 4-25A**). La courbe de calibration résultante (**Figure 4-25B**) a une allure assez similaire à celle précédemment établie sur microplaque mais avec cependant des temps de réaction globalement plus longs. Il est à noter que le mode de lecture électrochimique par rapport au mode UV-vis sur microplaque reste beaucoup plus contraignant à mettre en œuvre, nous empêchant :

- de suivre en simultané toutes les concentrations testées au cours d'une même expérience. Cela est problématique car les réactions autocatalytiques sont très sensibles aux conditions initiales et le fait de ne pas pouvoir les réaliser simultanément entraîne davantage de problèmes de reproductibilité.
- de réaliser des triplicatas pour chacune des concentrations en H_2O_2 pour s'assurer de la reproductibilité.

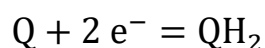
Enfin, ce ralentissement global des temps de réponse suggère que le mode de lecture électrochimique n'est pas totalement neutre vis-à-vis de la réaction autocatalytique. Il est donc important d'essayer de comprendre son origine et c'est ce que nous allons maintenant aborder.

2.3.3. Simulation numérique 1D de la lecture électrochimique oxydative de la réaction autocatalytique

Afin de comprendre comment la réaction autocatalytique peut être perturbée par la mesure électrochimique, nous avons voulu simuler numériquement ce processus, et les premières modélisations ont été tentées sur le logiciel DigiElch. Cependant, dans ce logiciel classiquement utilisé pour simuler des phénomènes chimiques – électrochimiques, nous nous sommes retrouvés limités pour simuler notre système. En effet, dans les conditions de mesures avec régime hydrodynamique forcé, ce logiciel ne permet pas de définir une quantité de matière initiale ou un volume fini de solution. Ainsi, les concentrations loin de l'électrode sont toujours constantes et égales à la valeur initiale et il n'est pas possible de rendre compte de l'épuisement des réactifs/produits loin de l'électrode. Pour pallier à ce manque de prise en compte des aspects géométriques et hydrodynamiques, nous nous sommes appuyés sur l'utilisation d'un logiciel de simulation plus généraliste, COMSOL Multiphysics. Afin de rendre le plus simple possible la simulation, nous avons fait le choix de simuler une géométrie 1D (voir schéma ci-après) avec comme conditions aux limites d'un côté la surface de l'électrode et de l'autre la paroi de la cellule. Pour mimer la convection hydrodynamique du fluide induite par l'électrode tournante, nous avons appliqué un vecteur de vitesse u (m/s) en solution, orienté perpendiculairement à la surface de l'électrode, et dont nous avons fixé la valeur de manière à ce que la couche stationnaire de diffusion/convection qui s'établit à l'interface électrode/solution soit de dimension similaire à celle que l'on a expérimentalement sur électrode tournante.



Pour ce qui concerne le mécanisme autocatalytique en solution, nous avons utilisé le même que celui établi au chapitre 3, qui inclut donc la double déprotection de la sonde, la réactivité d'auto-oxydation radicalaire en chaîne de la 1,4-NQH₂, et le mécanisme ping-pong de réduction enzymatique. La longueur L de 0.2 cm de notre modèle 1D a été choisie pour être largement supérieure à la couche stationnaire de diffusion/convection. Enfin, à l'électrode, nous avons fait le choix d'appliquer l'expression générale de Butler-Volmer pour le processus suivant de réduction réversible à 2 électrons de la 1,4-NQ :



Pour les simulations numériques, nous avons également employé les paramètres suivants :

- Le potentiel standard apparent à pH 8.5 du couple Q/QH₂ : $E^0 = -0.28$ V/ECS
- Expression cinétique selon Butler-Volmer :
 - Densité de courant d'échange de référence : $i^0 = 9.6 \times 10^{10}$ A/m²
 - Le coefficient de transfert anodique : $\alpha = 0.5$
- Les coefficients de diffusion des espèces :
 - Type Naphthoquinone : $D_Q = 7 \times 10^{-6}$ cm²/s
 - Type Oxygène : $D_O = 2 \times 10^{-5}$ cm²/s
 - Type Diaphorase : $D_E = 1 \times 10^{-9}$ cm²/s
- Le potentiel appliqué à l'électrode est de 0.1 V/ECS
- La longueur de la cellule : $L = 0.2$ cm
- Le champ de vitesse : $u = 1 \times 10^{-4}$ m/s

Avec l'aide d'un maillage dégressif, resserré à proximité de la surface de l'électrode nous avons pu obtenir pour un jeu de 4 concentrations différentes en H₂O₂ ainsi que le contrôle à blanc les courbes simulées de la **Figure 4-26**.

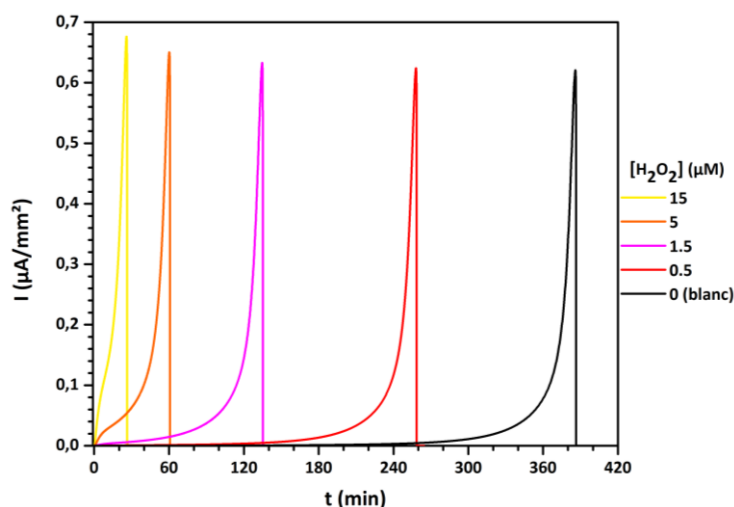


Figure 4-26 : Chronoampérogrammes simulés à $E_{app} = 0.1$ V/ECS sur une électrode ($d = 3$ mm) de 50 µM 1,4-bis-DBN, 250 µM NADH, 10 nM DI et différentes concentrations en H₂O₂. Concentrations initiales en H₂O₂ (µM) : 15 (jaune), 5 (orange), 1.5 (rose), 0.5 (rouge), 0 (noir). Paramètres de simulation décrits ci-dessus.

Les chronoampérogrammes simulés reproduisent assez bien l'allure des courbes expérimentales de la **Figure 4-25**. On retrouve bien l'augmentation exponentielle du courant après une phase de latence, cette dernière étant d'autant plus longue que la concentration initiale en H₂O₂ est faible. On reproduit également parfaitement bien l'extinction de courant une fois le NADH totalement consommé. L'extraction des profils de concentrations (**Figure 4-27**) montre que le

maximum de courant correspond bien au moment où tout le NADH mais aussi toute la sonde (BB) sont consommés, et aussi simultanément au moment où la 1,4-NQH₂ s'auto-oxyde en 1,4-NQ. A noter également que la protodéboronation dans ces conditions a un impact non négligeable sur le rendement de production de la quinone, puisque l'on obtient en fin d'autocatalyse 41 μM de 1,4-NQ et 9 μM de naphthol. Cependant, les temps de réaction simulés ne sont pas tout à fait comparables à ceux obtenus expérimentalement, avec un facteur 2 environ d'écart. Cela est cohérent avec le fait que les constantes cinétiques employées pour simuler la réaction autocatalytique sont les mêmes que celles qui ont permis de reproduire les courbes expérimentales d'autocatalyse du chapitre 3 (enregistrées donc avec un suivi spectrophotométrique UV-Vis). Cela nous permet également de conclure en la validité de notre modèle.

Une hypothèse qui pourrait expliquer l'obtention de temps de réaction plus lents dans le cas d'un suivi électrochimique est que le mécanisme d'oxydation électrochimique à 2 électrons et 2 protons de la 1,4-NQH₂ est un processus qui passe par des intermédiaires de type semi-quinone, les quels peuvent alors facilement réagir avec les espèces réactives de l'oxygène. Il faudrait donc pouvoir incorporer dans la simulation un mécanisme d'oxydation électrochimique de la 1,4-NQH₂ qui soit plus complet en prenant notamment en compte son schéma carré à 9 membres qui la caractérise. Nous aborderons cela un peu plus en détail au chapitre 6.

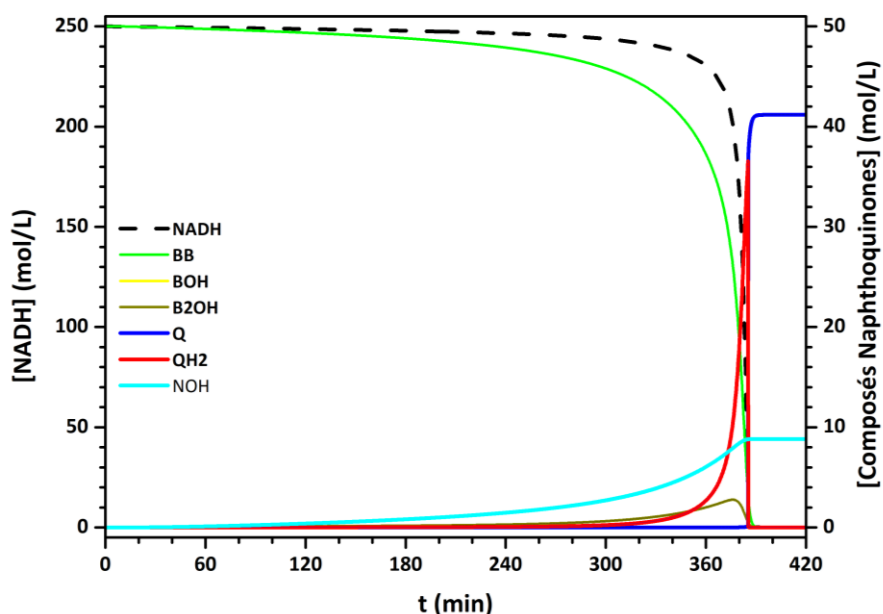


Figure 4-27 : Profil de concentration des différentes espèces extraits du chronoampéromètre noir de la **Figure 4-26** (0 μM H₂O₂). Axe des ordonnées à gauche : en pointillés noirs, [NADH]. Axe des ordonnées à droite : en vert sonde 1,4-bis-DBN (BB), en jaune sonde déprotégée sur un des deux sites (BOH), en marron sonde déprotégée sur l'autre des deux sites (B₂OH), en bleu 1,4-naphthoquinone (Q), en rouge 1,4-naphthohydroquinone (QH₂), en cyan naphthol (NOH).

2.3.4. Exploration des paramètres pouvant influencer sur la cinétique de la réaction autocatalytique au cours d'un suivi ampérométrique

Ce qui distingue le mode de lecture ampérométrique du mode de lecture spectrophotométrique c'est l'agitation constante de la solution *via* la rotation de l'électrode. Dans la littérature, il est reporté que des réactions autocatalytiques peuvent inhiber dans des conditions hydrodynamiques de convection forcée⁷. Nous avons donc essayé de voir quelle influence peut avoir la convection forcée sur la cinétique du système. Pour cela nous avons exploité la possibilité de faire tourner ou non l'électrode pendant la réaction. Les résultats présentés **Figure 4-28** montrent que la cinétique de la réaction n'est pas affecté par le fait de faire tourner ou pas l'électrode (et donc d'agiter ou pas la solution).

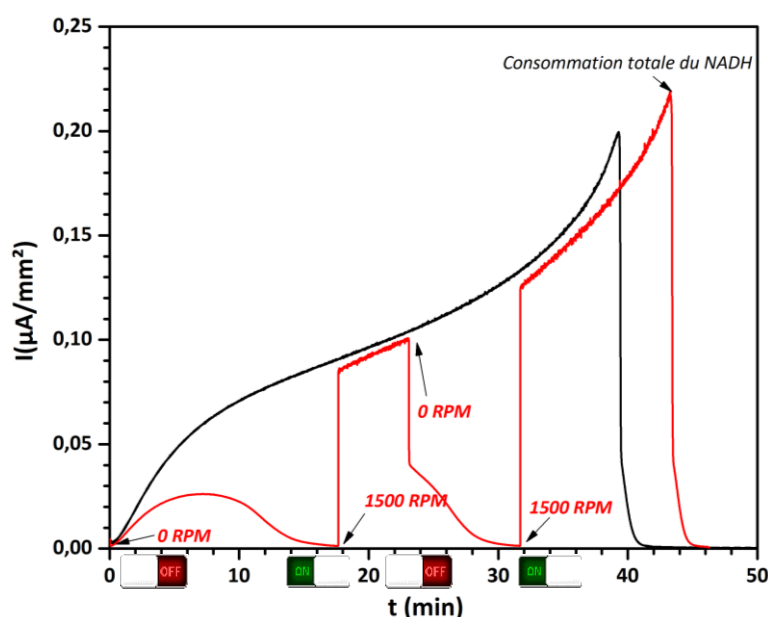


Figure 4-28 : Chronoampérogrammes à $E_{\text{app}} = 0.1\text{V}/\text{ECS}$ sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500$ RPM) de $50 \mu\text{M}$ 1,4-bis-DBN, $250 \mu\text{M}$ NADH, 10 nM DI et $15 \mu\text{M}$ H_2O_2 . Electrolyte : 7 mL Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5, non désaéré, contre-électrode en platine en solution. En noir : la vitesse de rotation $\omega = 1500$ RPM est constante ; en rouge : la rotation de $\omega = 1500$ RPM est allumée à 18 min, puis éteinte à 23 min, puis rallumée à 32 min.

Un autre aspect qui distingue le mode de lecture spectrophotométrique de celui ampérométrique est la polarisation en continu d'une électrode dans le mélange réactionnel. Bien que le rapport surface d'électrode/volume de solution (S/V) soit relativement faible (avec $S = 0,07 \text{ cm}^2$ et $V = 7 \text{ cm}^3$, soit un rapport 1/100), le fait de polariser l'électrode en continu pendant plusieurs dizaines de minutes pourrait contribuer à affecter le processus d'autocatalyse. Afin de tester cette hypothèse, une expérience de suivi ampérométrique de la réaction autocatalytique a été réalisée en démarrant la lecture ampérométrique du mélange réactionnel 6 min après que la réaction ait été initiée avec l'injection de $15 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 (la rotation de l'électrode non polarisée étant également mise en route au

moment de l'injection). Le chronoampérogramme (courbe en bleu) reporté **Figure 4-29**, montre que le temps de réponse obtenu dans ces conditions est plus rapide que lorsque l'électrode est polarisée dès l'injection d' H_2O_2 (courbe en noir). On retrouve même un temps de réponse qui est similaire à celui obtenu par spectrophotométrie UV-Vis. Ce résultat démontre que la polarisation de l'électrode affecte la cinétique de la réaction autocatalytique.

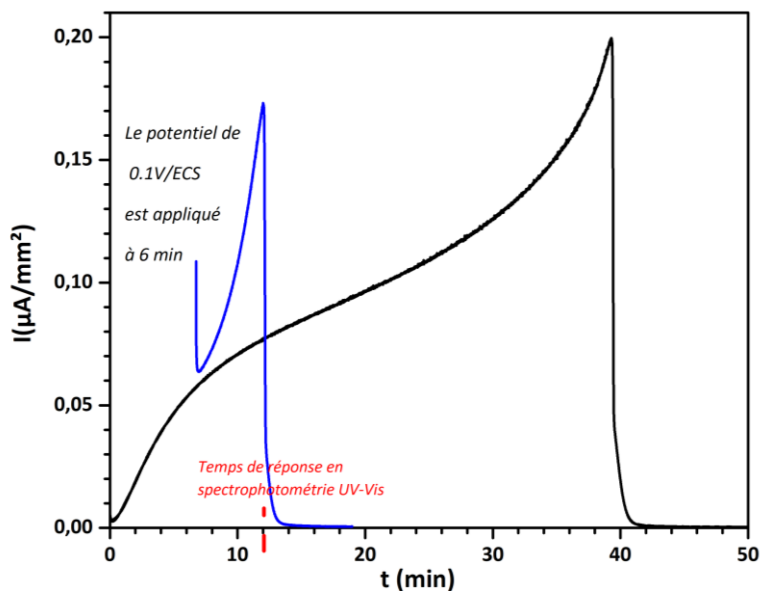


Figure 4-29 : Chronoampérogrammes à $E_{\text{app}} = 0.1 \text{ V/ECS}$ sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500 \text{ RPM}$) de $50 \mu\text{M}$ 1,4-bis-DBN, $250 \mu\text{M}$ NADH, 10 nM DI et $15 \mu\text{M}$ H_2O_2 . Electrolyte : 7 mL Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5, non désaéré, contre-électrode en platine en solution. En noir : le potentiel de 0.1 V/ECS est appliqué dès le début de l'expérience ; en bleu : le potentiel $E_{\text{app}} = 0.1 \text{ V/ECS}$ est appliqué à partir de 6 min seulement.

A partir de là nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition de la réaction autocatalytique provoquée par la polarisation de l'électrode pouvait être réduite en modifiant le rapport S/V de la cellule. L'expérience a donc été renouvelée avec différents volumes de solution (3.5 ; 7 ; 15 et 30 mL), ce qui permet de faire varier le rapport S/V de la cellule. La cellule électrochimique classiquement utilisée étant trop petite pour contenir plus de 10 mL de solution, nous avons employé la cellule de la **Figure 4-30** qui permet de travailler avec des volumes de 15 à 30 mL . Les chronoampérogrammes dans 7 mL ont été enregistrés dans les deux types de cellule afin de vérifier l'absence d'influence de la géométrie de ces dernières.



Figure 4-30 : Grande cellule électrochimique : à gauche électrode de référence ECS séparée par un pont salin, au milieu électrode tournante en carbone vitreux de 3 mm de diamètre, à droite contre-électrode en platine séparée par un pont salin.

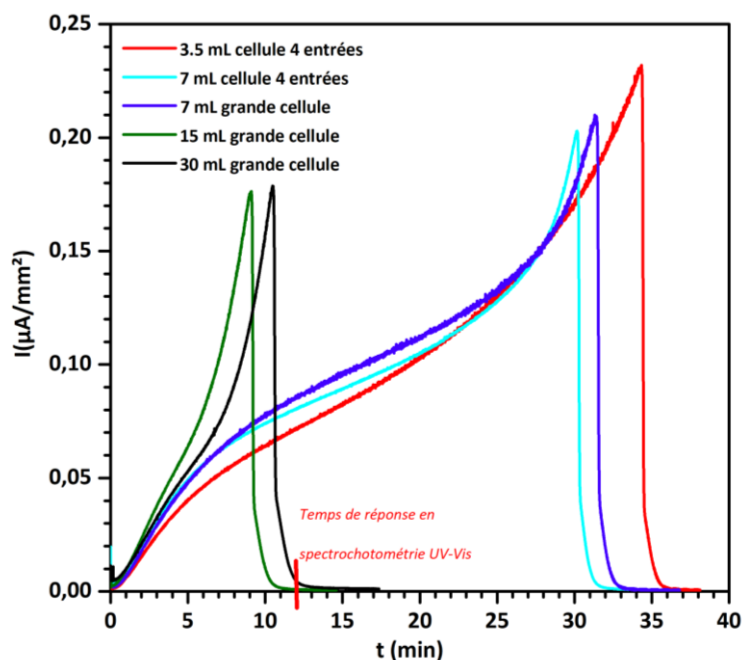


Figure 4-31 : Chronoampérogrammes à $E_{app} = 0.1$ V/ECS sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500$ RPM) de $50 \mu\text{M}$ 1,4-bis-DBN, $250 \mu\text{M}$ NADH, 10 nM DI et $15 \mu\text{M}$ H_2O_2 . Electrolyte : Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 8.5, non désaéré, contre-électrode en platine en solution. Volume de tampon/cellule utilisée : en rouge : 3.5 mL/cellule 4 entrées ; en cyan : 7 mL/cellule 4 entrées ; en bleu 7 mL/grande cellule ; en olive : 15 mL/grande cellule ; en noir : 30 mL/grande cellule.

Les résultats présentés **Figure 4-31** montrent que le volume de solution dans lequel est réalisée la mesure influe bien sur le temps de réponse. Pour un rapport S/V de 1/200, le temps de réponse de la réaction autocatalytique avec $15 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 est en bonne correspondance avec le temps de réponse obtenu par suivi spectrophotométrique. La géométrie de la cellule quant à elle ne montre pas d'influence.

A travers cette série d'expérience, nous confirmons que la polarisation de l'électrode est bien responsable d'une inhibition de la cinétique d'autocatalyse dès lors que le rapport S/V devient suffisamment important. Cependant, l'influence de ce rapport S/V ne semble pas si triviale puisqu'il semble y avoir un rapport seuil, compris entre 1/100 et 1/200, où l'on passe d'un comportement à un autre.

La question qui reste maintenant en suspens mais que nous n'avons malheureusement pas pu élucider est d'identifier le phénomène électrochimique qui conduit à inhiber la cinétique d'autocatalyse. Pour la suite des expériences, nous avons finalement opté pour travailler avec 15 mL de mélange réactionnel puisque dans ces conditions cela nous permet de nous affranchir au mieux de l'inhibition sans pour autant consommer trop de réactifs.

2.4. Optimisation des performances analytiques à pH 9.5

Comme nous l'avons déjà vu au chapitre 3, la réaction autocatalytique est accélérée aux pH basiques, ce qui nous a permis d'améliorer les performances analytiques de détection d' H_2O_2 et en particulier sa limite de détection (détection au nanomolaire) du fait d'une meilleure discrimination entre la réponse non-spécifique et spécifique aux faibles concentrations en H_2O_2 . Nous avons donc réalisé des expériences de suivi ampérométrique à pH 9.5 pour vérifier que l'on peut améliorer les performances de détection d' H_2O_2 dans ces conditions. Les chronoampérogrammes obtenus pour la gamme de concentration en H_2O_2 allant de 0 à 5 μM sont présentés **Figure 4-33**. Pour pouvoir comparer au suivi spectrophotométrique UV-Vis dans les mêmes conditions, les expériences ont été répétées avec ce mode de lecture. Les résultats sont reportés **Figure 4-32**. Comme attendu, les temps de réponse sont tous accélérés d'environ un facteur 10 par rapport à pH 8.5, et cela quel que soit le mode de lecture. Le tracé des courbes de calibration (**Figure 4-33B**) montre qu'elles sont comparables quel que soit le mode de lecture et que l'on peut atteindre dans chaque cas une limite de détection en H_2O_2 de ~ 50 nM en moins de 30 minutes.

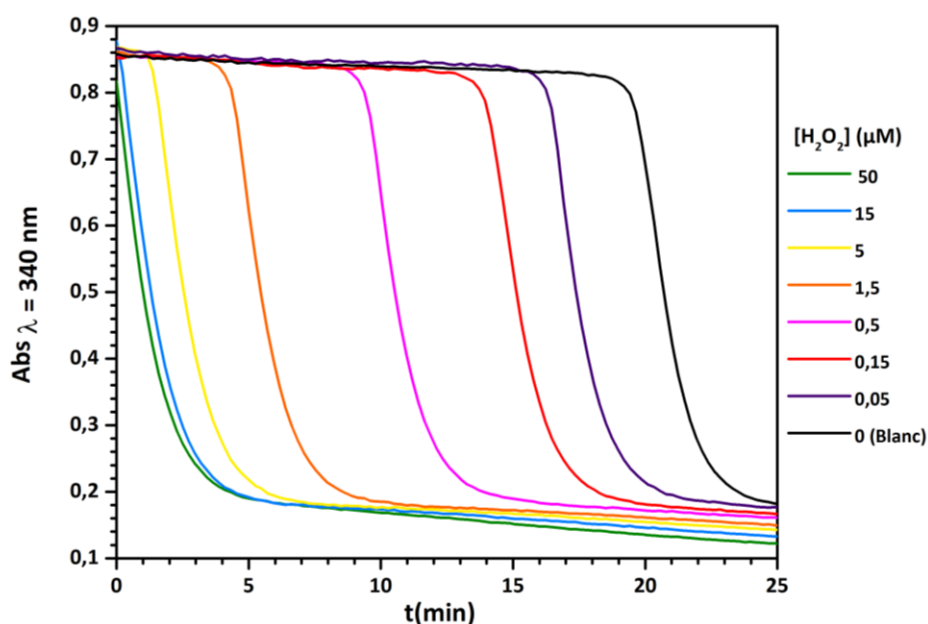


Figure 4-32 : Suivi cinétique par spectrophotométrie UV-Vis à 340nm de la réaction entre la sonde 1,4-bis-DBN et une gamme de concentration de H₂O₂, en présence de 10 nM DI et 250 μM NADH dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 9.5. [H₂O₂] (μM) : en vert 50, en bleu 15, en jaune 5, en orange 1.5, en rose 0.5, en rouge 0.15, en violet 0.05 et en noir 0 (blanc).

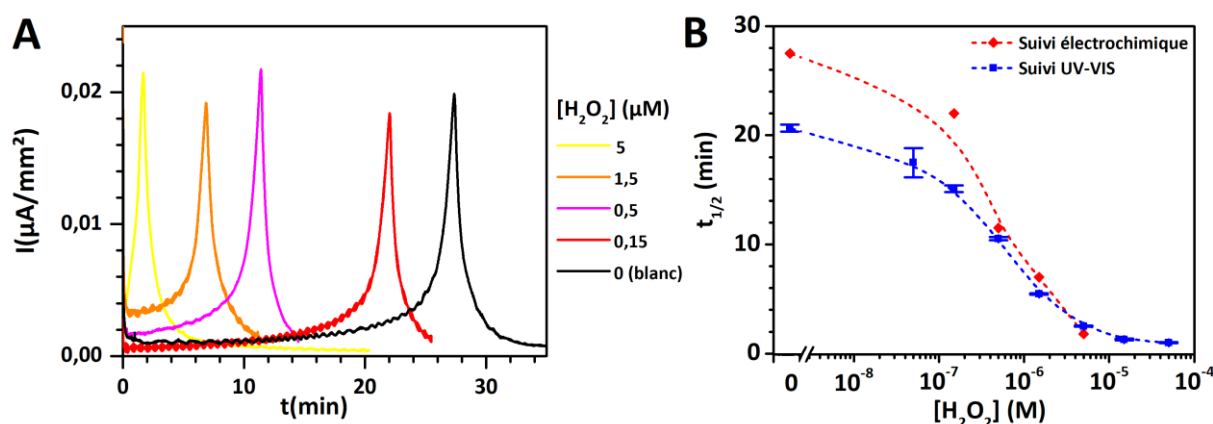


Figure 4-33 : (A) Chronoampérogrammes à $E_{app} = 0.1$ V/ECS sur électrode tournante en carbone vitreux (RDE GC à $\omega = 1500$ RPM) de 50 μM 1,4-bis-DBN, 250 μM NADH, 10 nM DI et différentes concentrations en H₂O₂. Electrolyte 15 mL Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 9.5, non désaéré, contre-électrode en platine séparée par un pont salin. Concentrations initiales en H₂O₂ (μM) : 5 (jaune), 1.5 (orange), 0.5 (rose), 0.15 (rouge), 0 (noir). **(B)** En rouge, courbe de calibration des temps de pics (temps auquel le courant anodique disparaît soudainement) en fonction de la concentration en H₂O₂ initial. En bleu, courbe de calibration des $t_{1/2}$ en fonction de la concentration en H₂O₂ initiale extrait de la **Figure 4-32**.

Il est intéressant de noter que la quasi superposition des deux courbes de calibration indique que l'inhibition de la cinétique observée à pH 8.5 dans le mode de lecture ampérométrique n'a plus lieu à pH 9.5. C'est aussi ce qui permet d'obtenir des performances analytiques comparables à celles obtenues avec le mode de lecture spectrophotométrique UV-Vis.

Un autre point intéressant que mérite d'être relevé est que l'intensité des pics que l'on peut extraire des cinétiques ampérométriques est beaucoup plus faible (d'un facteur 10 environ) à ce pH de 9.5 que précédemment à pH 8.5 (notons également que la forme est différente, avec ici une forme plus symétrique). Cette intensité plus faible est la conséquence d'une cinétique de cyclage redox différente comme le montre les courbes cinétiques de cyclage redox de la **Figure 4-34** enregistrées à pH 9.5 (à comparer avec la **Figure 3-16** du chapitre 3). En augmentant le pH, la cinétique d'auto-oxydation de la quinone au cours du cyclage redox est accélérée par rapport à sa cinétique de réduction enzymatique, et il en résulte alors une moindre accumulation de la 1,4-NQH₂, ce qui explique qu'en fin d'autocatalyse on obtienne un courant d'oxydation moins important.

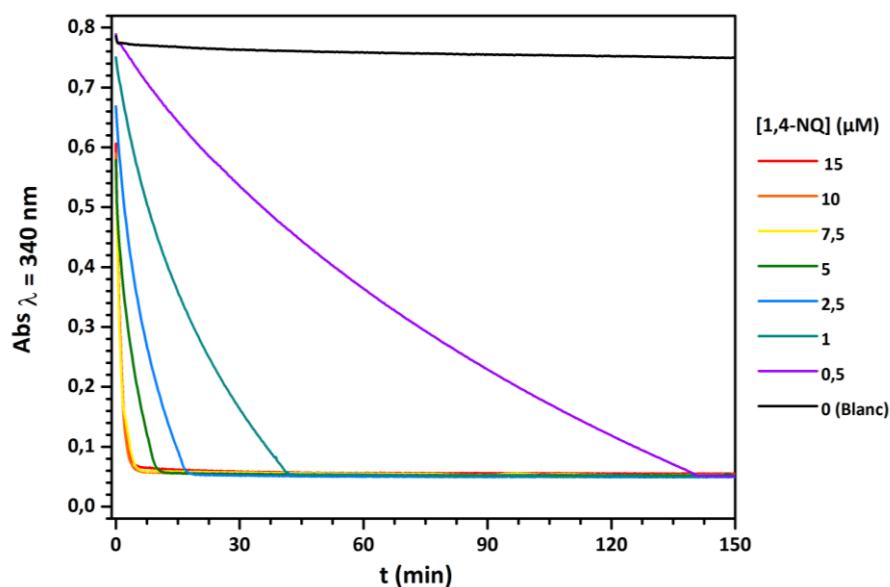


Figure 4-34 : Suivi cinétique à $\lambda = 340$ nm du recyclage redox entre plusieurs concentrations en 1,4-naphthoquinone et 250 μM de NADH avec 10 nM de DI, dans du tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA pH 9.5. [1,4-NQ] (μM) : en rouge 15, en orange 10, en jaune 7.5, en vert 5, en bleu 2.5, en vert clair 1, en violet 0.5 et en noir 0 (Blanc).

3. Résultats préliminaires d'un suivi potentiométrique à courant nul de la réaction autocatalytique

Les changements de concentrations des différentes espèces redox qui se produisent durant la réaction d'autocatalyse suggèrent que le potentiel redox du mélange réactionnel évolue au cours du temps. Sa mesure en continu doit donc pouvoir être exploitée pour suivre en temps réel la réaction autocatalytique. L'intérêt d'une telle mesure dite de potentiométrie à courant nul est qu'il s'agit d'un mode de lecture non-invasif et que, d'un point de vue expérimental, elle est relativement simple à mettre en œuvre avec un montage à deux électrodes. D'autre part, avec une telle approche, il n'y a plus de risque de venir perturber le mélange réactionnel car il n'y a plus de réaction d'oxydation ou de réduction se produisant à l'électrode.

Afin de valider cette idée, nous avons réalisé des expériences préliminaires en utilisant la même cellule électrochimique que précédemment, c'est-à-dire avec l'électrode tournante de carbone vitreux mais cette fois non-polarisée de façon à suivre l'évolution de son potentiel de circuit ouvert pendant toute la durée de la réaction autocatalytique. Les résultats présentés **Figure 4-35** montrent pour deux concentrations différentes en H_2O_2 (*i.e.*, 0 et $1.5 \mu\text{M}$) qu'au cours des premières minutes de la réaction, le potentiel de circuit ouvert décroît rapidement pour se stabiliser à une valeur d'environ -0.50 V/ECS , puis après une phase de latence dont la durée dépend de la concentration initiale en H_2O_2 , le potentiel ré-augmente soudainement pour se stabiliser à une valeur de -0.28 V/ECS . Ce changement soudain est caractéristique de la fin de la réaction autocatalytique, c'est-à-dire du temps nécessaire pour que tout le NADH soit entièrement consommé. Les temps pour lesquels le potentiel de circuit ouvert varie soudainement sont similaires à ceux obtenus par suivi spectrophotométrique UV-Vis. Nous avons ensuite répété l'expérience sur une électrode de carbone sérigraphiée (commercialisée par Metrohm avec une référence Ag/AgCl) sur laquelle nous avons déposé $50 \mu\text{L}$ du mélange réactionnel sans ajout d' H_2O_2 . L'évolution du potentiel de circuit ouvert montre (**Figure 4-35**), même si il est moins bien défini, un changement de potentiel après environ 25 min qui correspond à celui observé précédemment sur électrode tournante. Ces résultats préliminaires sont très encourageants. On peut en effet facilement imaginer de fabriquer par sérigraphie des réseaux multiplexés de cellules électrochimiques à deux électrodes pour suivre simultanément par potentiométrie plusieurs mélanges réactionnels au cours d'une même expérience (de manière analogue à ce que nous pouvons faire sur microplaques). Faute de temps, il n'a malheureusement pas été possible d'aller plus loin dans l'évaluation de cette approche prometteuse.

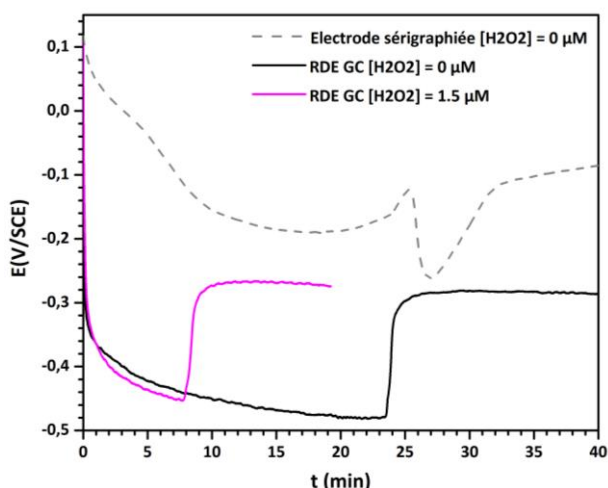


Figure 4-35 : Suivi potentiométrique à courant nul de la réaction autocatalytique de $50 \mu\text{M}$ 1,4-bis-DBN, $250 \mu\text{M}$ NADH, 10 nM DI et 1.5 ou $0 \mu\text{M}$ H_2O_2 . En trait plein, électrode tournante de travail RDE GC à $\omega = 1500 \text{ RPM}$, dans 15 mL Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 9.5, non désaéré, référence ECS séparé par un pont salin. En pointillés, électrode sérigraphiée Metrohm DropSens DRP-110 en carbone, référence Ag/AgCl, $50 \mu\text{L}$ volume de tampon Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA pH 9.5 en goutte.

4. Conclusion générale sur le suivi électrochimique de la réaction autocatalytique homogène

Dans ce chapitre, nous avons pu tout d'abord passer d'un suivi spectrophotométrique UV-Visible de notre réaction autocatalytique avec un réducteur enzymatique à un suivi électrochimique. Le premier axe de suivi électrochimique exploré a été le suivi chronoampérométrique par apparition soudaine en fin de réaction de la réduction médiée par la naphthoquinone du dioxygène dissous. Ce suivi nous a permis d'appréhender plus finement la réactivité singulière du recyclage redox impliqué dans la boucle 2 de notre processus autocatalytique, tout en donnant des chronoampérogrammes originaux, présentant une activation soudaine singulière du courant après une période d'induction fonction d'une concentration initiale en H_2O_2 . Cependant, nous nous sommes retrouvés limités en termes de performance analytique par ce mode de lecture, car la réponse non-spécifique de notre système se trouvait enrichie par la production de H_2O_2 par réduction directe du dioxygène dissous à l'électrode. Ainsi, il n'était pas possible de discriminer les faibles concentrations en H_2O_2 par ce mode de lecture, qui étaient encore atteignables par spectrophotométrie UV-Vis.

Cependant, cela nous a permis de réfléchir à une autre approche de suivi électrochimique, le suivi chronoampérométrique par l'oxydation catalytique du NADH par la diaphorase médiée par la 1,4-naphthoquinone. Après une étude de cette oxydation catalytique par voltamétrie cyclique, la réaction autocatalytique a pu être suivie et optimisée, et une discrimination des temps de réponse en fonction des concentrations de H_2O_2 similaire à celle établie par spectrophotométrie UV-Visible a été atteinte. En effet, à un potentiel suffisamment anodique pour ne pas générer de H_2O_2 par réduction directe de l'oxygène à l'électrode, la seule source de non-spécifique déclenchant l'apparition du signal du blanc reste l'instabilité du réducteur. Cela nous a permis de mieux appréhender la réactivité du recyclage redox, et de pouvoir suivre non plus la disparition d'un des réactifs mais l'apparition d'un des deux catalyseurs au cours de la réaction autocatalytique. Il a également été possible de prédire la forme des chronoampérogrammes obtenus par simulation numérique, même s'il reste à intégrer à celle-ci le schéma carré de la 1,4-naphthoquinone. Cependant, une inhibition de la réaction autocatalytique due à la polarisation de l'électrode est observée par ce mode de lecture invasif, et l'origine du phénomène électrochimique associé reste à élucider. Il a également été possible d'atteindre des performances analytiques très intéressantes à un pH plus élevé de 9.5, compétitif de ce qui disponible commercialement.

De manière générale, contrairement à un suivi du signal par spectrophotométrie UV-Vis, les méthodes électrochimiques ampérométriques viennent perturber le système global via des transformations électrochimiques opérées à l'électrode. Faire le suivi d'une réaction en solution par des méthodes électrochimiques est une méthode de suivi invasif qui vient alors perturber le système, malgré le faible rapport surface/volume.

Enfin, des premiers résultats d'un mode de lecture électrochimique non invasif, la potentiométrie à courant nul, ont été investigués, s'appuyant sur le changement de forme redox de la naphthoquinone impliquée apparaissant exponentiellement durant la réaction autocatalytique. Ce montage simple à deux électrodes, qui a besoin d'être plus étudié, est prometteur en termes de performances analytiques et laisse place à de nombreux développements de micro-dispositifs de mesure simple de trace de H_2O_2 .

En conclusion, il est donc possible de venir suivre la réaction autocatalytique par électrochimie, et cela nous donne accès à des informations importantes quant à la réactivité de notre médiateur redox. Cependant, une nouvelle approche électrochimique plus approfondie, où le système est suivi par des méthodes électrochimiques mais également activé grâce à la réduction par l'électrode la naphthoquinone va être présentée dans le chapitre suivant.

5. Références Bibliographiques :

- (1) Bakker, E.; Telting-Diaz, M. Electrochemical Sensors. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (12), 2781–2800. <https://doi.org/10.1021/ac0202278>.
- (2) Privett, B. J.; Shin, J. H.; Schoenfisch, M. H. Electrochemical Sensors. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (12), 4723–4741. <https://doi.org/10.1021/ac101075n>.
- (3) Heller, A.; Feldman, B. Electrochemical Glucose Sensors and Their Applications in Diabetes Management. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (7), 2482–2505. <https://doi.org/10.1021/cr068069y>.
- (4) Pallu, J.; Rabin, C.; Creste, G.; Branca, M.; Mavré, F.; Limoges, B. Exponential Molecular Amplification by H₂O₂-Mediated Autocatalytic Deprotection of Boronic Ester Probes to Redox Cyclers. *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25* (31), 7534–7546. <https://doi.org/10.1002/chem.201900627>.
- (5) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods : Fundamentals and Applications*; New York : Wiley, 2001.
- (6) Pallu, J. Développement de Nouvelles Stratégies d’amplification Moléculaire Auto-Catalytique Avec Un Cyclage Redox, ED 388 Laboratoire d’Electrochimie Moléculaire, Université Paris Diderot, 2020.
- (7) Gerdts, C. J.; Sharoyan, D. E.; Ismagilov, R. F. A Synthetic Reaction Network: Chemical Amplification Using Nonequilibrium Autocatalytic Reactions Coupled in Time. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (20), 6327–6331. <https://doi.org/10.1021/ja031689l>.
- (8) Limoges, B.; Marchal, D.; Mavré, F.; Savéant, J.-M. Electrochemistry of Immobilized Redox Enzymes: Kinetic Characteristics of NADH Oxidation Catalysis at Diaphorase Monolayers Affinity Immobilized on Electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (6), 2084–2092. <https://doi.org/10.1021/ja0569196>.
- (9) Mavré, F.; Bontemps, M.; Ammar-Merah, S.; Marchal, D.; Limoges, B. Electrode Surface Confinement of Self-Assembled Enzyme Aggregates Using Magnetic Nanoparticles and Its Application in Bioelectrocatalysis. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (1), 187–194. <https://doi.org/10.1021/ac061367a>.
- (10) Limoges, B.; Marchal, D.; Mavré, F.; Savéant, J.-M. High Amplification Rates from the Association of Two Enzymes Confined within a Nanometric Layer Immobilized on an Electrode: Modeling and Illustrating Example. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (18), 6014–6015. <https://doi.org/10.1021/ja060801n>.

- (11) Limoges, B.; Marchal, D.; Mavré, F.; Savéant, J.-M. Theory and Practice of Enzyme Bioaffinity Electrodes. Chemical, Enzymatic, and Electrochemical Amplification of in Situ Product Detection. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (23), 7276–7285. <https://doi.org/10.1021/ja7102873>.
- (12) Limoges, B.; Marchal, D.; Mavré, F.; Savéant, J.-M.; Schöllhorn, B. Theory and Practice of Enzyme Bioaffinity Electrodes. Direct Electrochemical Product Detection. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (23), 7259–7275. <https://doi.org/10.1021/ja7102845>.

**Chapitre 5 : CATALYSE MOLECULAIRE D'UNE REACTION
ELECTROCHIMIQUE AVEC RETROACTION POSITIVE : PREUVE
DE CONCEPT DE L'AUTOCATALYSE MOLECULAIRE
ELECTROCHIMIQUE**

1. Suivi et activation de la réaction autocatalytique *via* la réduction catalytique de l'oxygène par la 1,4-naphthoquinone sur une électrode en carbone vitreux dans une cellule électrochimique classique

1.1. Première approche de la réactivité autocatalytique électrochimique avec la sonde monoboronique par voltamétrie cyclique

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'il était possible de suivre électrochimiquement la réaction autocatalytique, notamment à un potentiel suffisamment réducteur pour détecter l'accumulation soudaine de quinone en solution. Dans ce nouveau chapitre, une nouvelle approche de la réaction autocatalytique est envisagée en substituant le couple réducteur enzymatique (DI/NADH) par une électrode pour réaliser la réduction de la 1,4-naphthoquinone de manière électrochimique uniquement. Il s'agit donc de répondre à la question suivante : est-il possible de se passer du couple réducteur DI/NADH et de compter uniquement sur l'électrode pour réduire la quinone et permettre une déprotection autocatalytique de la sonde, au moins à proximité de l'électrode dans la couche de diffusion-réaction ? Et si oui, peut-on, grâce à une réduction électrochimique, améliorer les performances analytiques ? Dans un premier temps, une étude par voltamétrie cyclique de la sonde monoboronique 4-DBN, dont le mécanisme a été décrit dans le chapitre 1, va être présentée, selon le schéma en **Figure 5-1**.

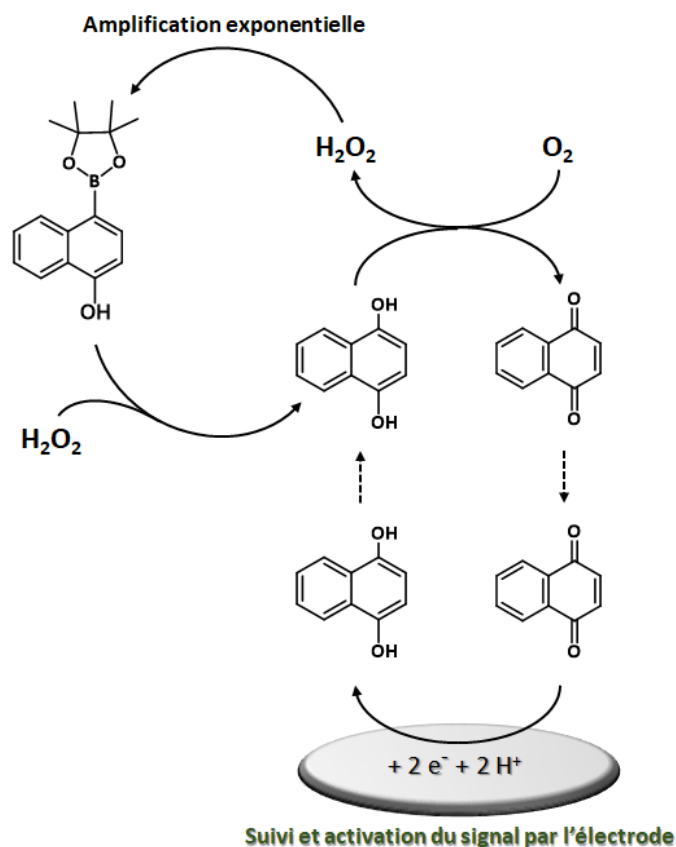


Figure 5-1 : Réaction autocatalytique activée et suivie par réduction catalytique d'O₂ médiée par la 1,4-naphthoquinone, cette-dernière apparaissant exponentiellement au cours du temps par la déprotection de la sonde 4-DBN.

Le mécanisme réactionnel repose sur la dialectique suivante : dans un premier temps, un équivalent de 4-DBN va être déprotégée en présence d'un équivalent de H₂O₂, libérant un équivalent de 1,4-NQH₂ sous sa forme réduite. Cette-dernière va s'auto-oxyder en présence d'oxygène dissous, produisant un équivalent de 1,4-NQ et un équivalent de H₂O₂. Ceci constitue le cycle catalytique de déprotection classique de la sonde. Ensuite, si la 1,4-NQ ainsi produite est proche de la surface d'une électrode polarisée suffisamment négativement, celle-ci peut alors être réduite en 1,4-NQH₂, ce qui permet alors de former un second cycle catalytique, localisé cette fois-ci, de réduction électrochimique d'O₂ médiée par le couple quinonique. Cette catalyse de la réduction d'O₂ par la 1,4-NQ est alors couplée à la catalyse de déprotection oxydative de la sonde 4-DBN, et peut donc générer localement la déprotection autocatalytique de la sonde. Dans la suite de ce manuscrit, le terme d'autocatalyse électrochimique sera utilisé pour décrire ce type de réactivité, qui couple une réaction moléculaire homogène à une réduction électrochimique localisée à proximité de l'électrode.

Cependant, deux chemins d'initiation non-spécifique de la réaction peuvent également intervenir, comme représenté en **Figure 5-2** :

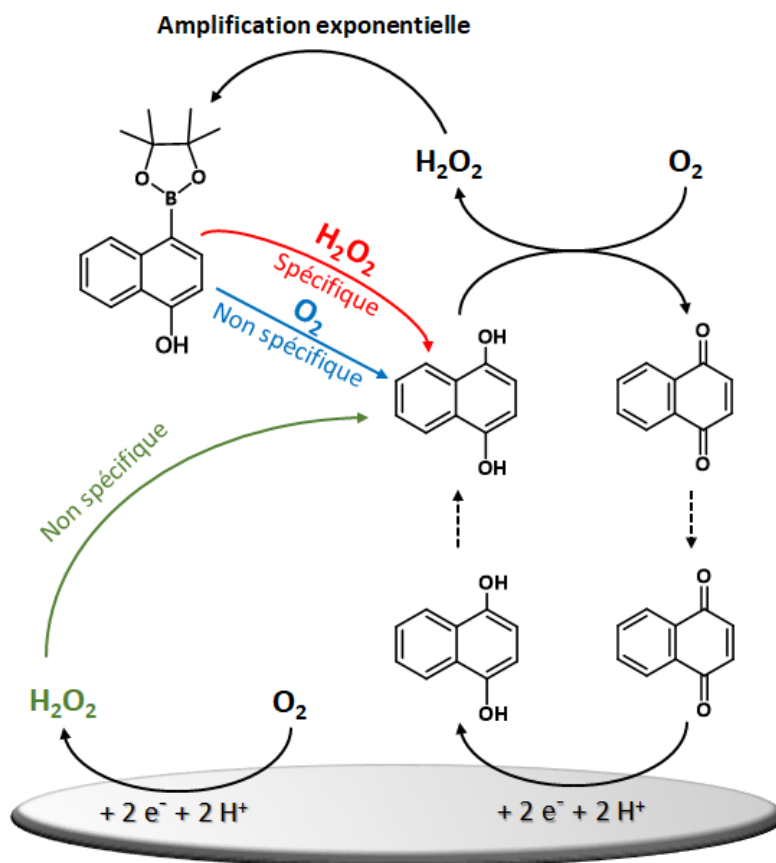


Figure 5-2 : Autocatalyse électrochimique de la sonde 4-DBN avec les instabilités associées sources de signal non-spécifique.

La première, représentée en bleu et préalablement décrite, est due à l'instabilité de la sonde 4-DBN, qui en présence d'O₂ peut se déprotéger en 1,4-NQH₂ et ainsi déclencher l'amplification exponentielle de manière non-spécifique. La cinétique de cette instabilité est rapide, et donne lieu en présence de DI/NADH à une apparition de l'amplification exponentielle en l'absence de déclencheur initial en environ 10 minutes. La seconde source, représentée en vert et propre à l'utilisation de l'électrochimie, est la production de H₂O₂ par la réduction directe à l'électrode de l'oxygène à 2 électrons et 2 protons. Celle-ci peut déclencher non-spécifiquement le système, en produisant un flux de H₂O₂ à l'électrode. Cette seconde source est donc dépendante du potentiel appliqué à cette électrode : dans le cas où l'on se place à un potentiel suffisamment réducteur pour réduire la 1,4-NQ mais pas suffisant pour réduire directement O₂, celle-ci doit être négligeable.

Dans un premier temps, afin de déterminer les potentiels auxquels interviennent les réductions directe et catalytique (médiée par 50 μM de 1,4-NQ), des voltammogrammes en présence et absence de 1,4-NQ ont été réalisés et sont présentés sur la **Figure 5-3**. Celui en absence de quinone se caractérise par une lente vague irréversible de réduction d'O₂ qui démarre après -0.3 V, et forme un pic vers -0.6 V. L'attribution de ce pic à la réduction d'O₂ est confirmée par l'absence de tout pic après

dégazage par de l'Argon (pointillés noirs). Le voltamogramme en présence de quinone donne lui un pic catalytique qui démarre vers -0.2 et forme un pic -0,32 V. Ce pic catalytique est suivi ensuite par la réduction directe d'O₂ avec un pic à -0.7 V, signe que la catalyse n'est pas totale dans ces conditions expérimentales puisque du O₂ est toujours présent à proximité de l'électrode pour y être réduit directement. En l'absence d'O₂ (courbe bleue), la 1,4-NQ donne lieu à un pic réversible à 2 protons et 2 électrons (E_{p,c} = -0.3 V et E_{p,a} = -0,26 V), ce qui confirme que la catalyse apparaît à un potentiel où l'on commence à réduire la 1,4-NQ. Il apparaît ainsi que dans ces conditions que la réduction directe et la réduction catalytique sont relativement proches en termes de potentiel et donc qu'il est difficile de réduire la quinone sans simultanément, même si beaucoup plus lentement, réduire O₂ directement.

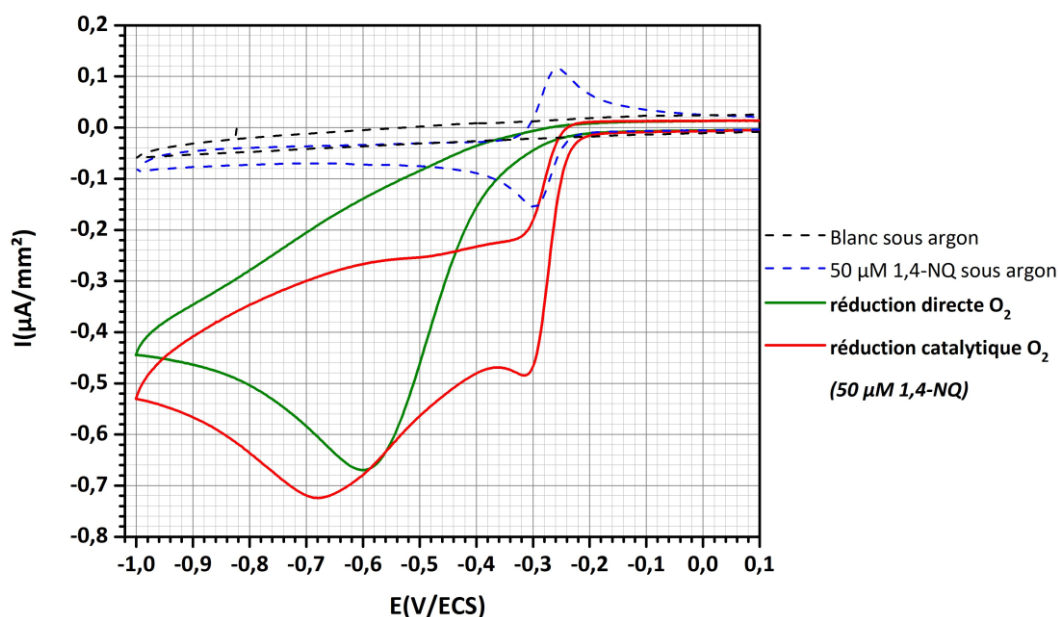


Figure 5-3 : CVs à 0.01 V.s⁻¹ de 0 (vert) ou 50 µM de 1,4-naphthoquinone (rouge) sur une électrode de carbone vitreux, dans un tampon Tris 0.1 M + 10 µM EDTA à pH 8.5, non désaéré, sans convection. En pointillés noirs le contrôle du blanc sous argon, en pointillés bleus le contrôle de la 1,4-NQ sous argon.

Dans un second temps, afin de valider le mécanisme d'autocatalyse électrochimique, un voltamogramme mesuré en présence de 50 µM de la sonde 4-DBN à faible vitesse de balayage, en l'absence de H₂O₂ initial, a été mesuré sur une même électrode en carbone vitreux dans une cellule électrochimique classique avec 7 mL de tampon Tris 0.1 M + 10 µM EDTA à pH 8.5. Les solutions ne sont pas désaérées et aucune convection forcée n'est utilisée durant l'expérience. Trois scans sont réalisés, et pour une meilleure visibilité, seuls les scans 1 et 3 sont représentés en **Figure 5-4**. Le premier scan aller, en rouge (*i.e.* de -0.1 à -0.45 V/ECS), ne permet d'observer qu'un pied de vague de réduction, démarrant aux alentours de -0.25 V, qui est attribuée à la réduction directe d'O₂ en H₂O₂ à la surface de l'électrode. Cependant, au scan retour, un croisement est observé à -0.37 V et un second croisement apparaît ensuite à -0.28 V. Ce comportement d'hystérésis traduit une accélération de la

vitesse de réduction d'O₂ entre l'aller et le retour, probablement lié à la production locale de 1,4-NQ à proximité de l'électrode. Au troisième scan en vert, on retrouve un plateau catalytique de réduction d'O₂ par la 1,4-naphthoquinone à -0.3 V.

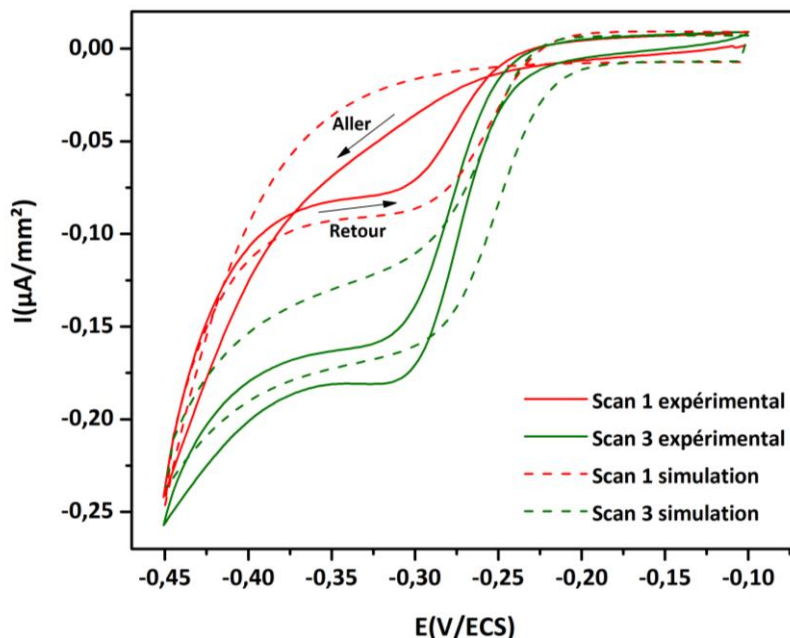


Figure 5-4 : CVs à 5 mV.s⁻¹ de la 50 μM de sonde 4-DBN dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA à pH 8.5. Les potentiels sont balayés de -0.1 à -0.45 V/ECS au scan aller, et de -0.45 à -0.1 V/ECS au scan retour. En traits pleins les résultats expérimentaux, en pointillés les simulations obtenues sur DigiElch. Le scan 1 (rouge) et 3 (vert) sont représentés, le scan 2 est omis pour une meilleure lecture du graphe.

Ce phénomène de croisement puis d'apparition de la vague catalytique complète au troisième scan sont le signe de la déprotection de la sonde en quinone avec le temps (et le potentiel) et donc la signature de l'autocatalyse électrochimique. Ces croisements rappellent en effet ceux observés dans les phénomènes électrochimiques autocatalytiques évoqués dans le Chapitre 1 partie 4 de ce manuscrit, comme la réduction de H₂O₂ sur une électrode d'argent (**Figure 1-28**) ou encore la réduction électrochimique d'halogénures d'alkyles (**Figure 1-29**). Ils signent l'autocatalyse qui se met en route, de par l'instabilité de la sonde mais également la production non-spécifique d'H₂O₂ par réduction directe d'O₂ à l'électrode lors du scan aller. Ainsi au scan retour, le H₂O₂ produit localement réagit avec la sonde 4-DBN et la catalyse de réduction d'O₂ par la 1,4-NQ commence à apparaître. Au cours des scans, l'intensité de ce plateau de catalyse augmente de manière exponentielle, car la 1,4-NQ apparaît par la réaction autocatalytique globale.

Sur ce même graphe sont représentées des simulations, effectuées sur le logiciel DigiElch, à partir des réactions homogènes et hétérogènes qui sont détaillés dans le **Tableau 5-1**. Nous avons ici utilisé un modèle simplifié de la réaction, en s'affranchissant à la fois (i) de la complexité du mécanisme de réduction de la 1,4-NQ et d'O₂ à 2 électrons et 2 protons en milieu tamponné (voir chapitre suivant),

ainsi que du mécanisme radicalaire d'auto-oxydation de la 1,4-NQH₂ (discuté dans le chapitre 3 et résumé en **Figure 3-11**). Ce dernier est ici représenté par une seule réaction bimoléculaire et sa constante apparente associée $k_{ox} = 3300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Ce modèle simplifié permet de rendre compte grossièrement du comportement d'hystérésis observé expérimentalement et confirme le mécanisme proposé même s'il devrait être affiné.

Famille de réaction	Réaction	Constantes
Electrochimique	$Q + e^- = Q^-$	$E^0 = -0.4\text{V/ECS} ; \alpha = 0.5 ;$ $k_s = 0.1 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$
	$Q^- + e^- = QH_2$	$E^0 = -0.1\text{V/ECS} ; \alpha = 0.5 ;$ $k_s = 0.1 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$
	$O_2 + 2e^- = H_2O_2$	$E^0 = 0.15\text{V/ECS} ; \alpha = 0.3 ;$ $k_s = 4.5 \times 10^{-10} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$
Réactivité de la sonde 4-DBN	$4\text{-DBN} + H_2O_2 \rightarrow QH_2$	$k_d = 300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
	$4\text{-DBN} + O_2 \rightarrow QH_2 + H_2O_2$	$k_n = 0.25 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
	$4\text{-DBN} \rightarrow 1\text{-naphtol}$	$k_p = 0.0004 \text{ s}^{-1}$
Auto-oxydation de la 1,4-NQH ₂	$QH_2 + O_2 \rightarrow Q + H_2O_2$	$k_{ox} = 3300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Tableau 5-1 : Réactions et constantes des réactions rentrées dans DigiElch pour la simulation de la CV représentée en **Figure 5-4**.

De cette étude en voltamétrie cyclique, deux autres points sont à souligner. D'une part, la réactivité de la sonde monoboronique nous a permis de mettre en évidence le schéma d'autocatalyse électrochimique avec auto-activation de la réduction d'O₂ mais elle est trop rapide, notamment son instabilité, pour mettre en œuvre, d'un point de vue analytique, une méthode de détection d'H₂O₂. Nous allons donc étudier par la suite la réaction autocatalytique électrochimique avec la sonde doublement protégée 1,4-bis-DBN étudiée jusque-là, bien plus stable et à la réactivité modérée. Une autre conclusion est que, dans une même optique de développer une méthode de détection, la voltamétrie cyclique n'est pas la méthode électrochimique adaptée. En effet, il serait plus simple de réaliser ces expériences à potentiel constant ce qui permettrait de polariser l'électrode à un potentiel

suffisamment réducteur en permanence. Par un choix rationnel de ce potentiel, cela devrait également permettre de minimiser la réduction directe d'O₂ à la surface de l'électrode. A un potentiel de -0.3 V/ECS par exemple, on observe sur la **Figure 5-3** une large différence entre la réduction catalytique d'O₂ avec une intensité de l'ordre de -0.5 µA/mm² et sa réduction directe, avec une intensité quasi-nulle. Ce potentiel sera choisi par la suite pour étudier la réactivité de la réaction autocatalytique avec la sonde 1,4-bis-DBN.

1.2. Approche de la réactivité électrochimique autocatalytique avec la sonde diboronique par chronoampérométrie

Comme montré précédemment, pour obtenir les meilleures performances analytiques pour la détection de H₂O₂ avec la réaction autocatalytique, il est nécessaire que les réactifs (*i.e.* la sonde, la réduction et l'oxydant) soient le plus stables possible, pour ne pas générer d'espèces pouvant déclencher l'amplification de manière non-spécifique. Ainsi, la sonde monoboronique est remplacée par la sonde diboronique que nous avons décrite précédemment comme étant d'une très grande stabilité. Le schéma en **Figure 5-5** représente le mécanisme de couplage entre la réduction catalytique hétérogène d'O₂ et la déprotection oxydative de la sonde 1,4-bis-DBN par H₂O₂.

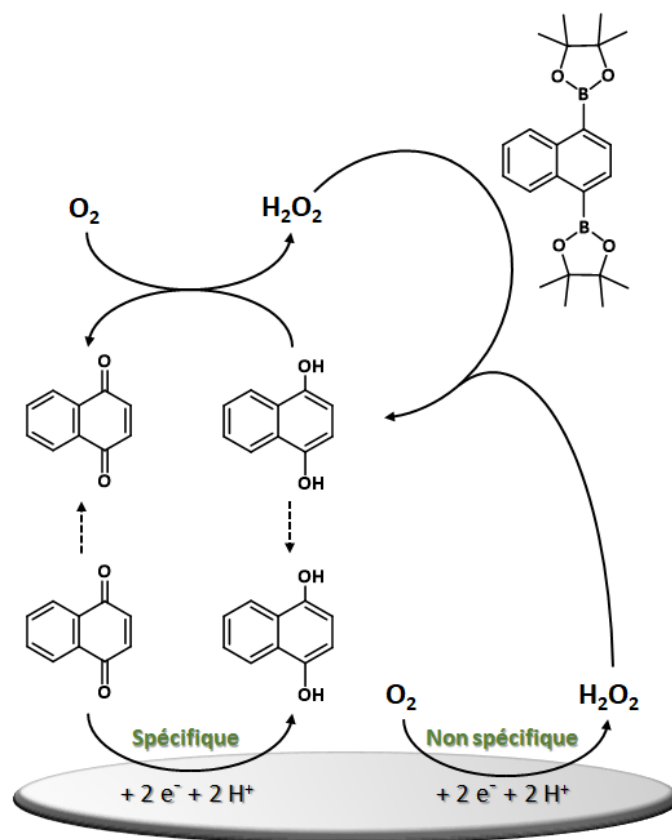


Figure 5-5 : réaction autocatalytique électrochimique avec la sonde doublement protégée 1,4-bis-DBN.

La réaction autocatalytique sera ici activée et suivie par chronoampérométrie à un potentiel sélectif de -0.3 V/ECS, comme évoqué précédemment. En effet, à ce potentiel on s'attend à être sélectif de la réduction catalytique vis-à-vis de la réduction directe d'O₂ et obtenir ainsi les meilleures performances analytiques. Dans un premier temps, des simulations sur DigiElch sont montrées ci-dessous, à partir du même modèle que celui évoqué pour la CV du monoboronique dans la partie précédente. Seule une première étape de déprotection de la sonde 1,4-bis-DBN en 4-DBN (clivage oxydatif d'un site pinacol ester boronique par un équivalent d'H₂O₂) a été rajoutée, et la constante cinétique d'oxydation par O₂ de l'intermédiaire monoboronique 4-DBN a été définie comme nulle, comme discutée dans le chapitre 3 (1.4.2) en milieu réducteur. Enfin, la constante de transfert électronique hétérogène a été légèrement ajustée pour représenter au mieux la réduction directe d'O₂ dans les conditions expérimentales. L'ensemble des réactions et leurs constantes thermodynamiques et cinétiques sont résumées dans le **Tableau 5-2**.

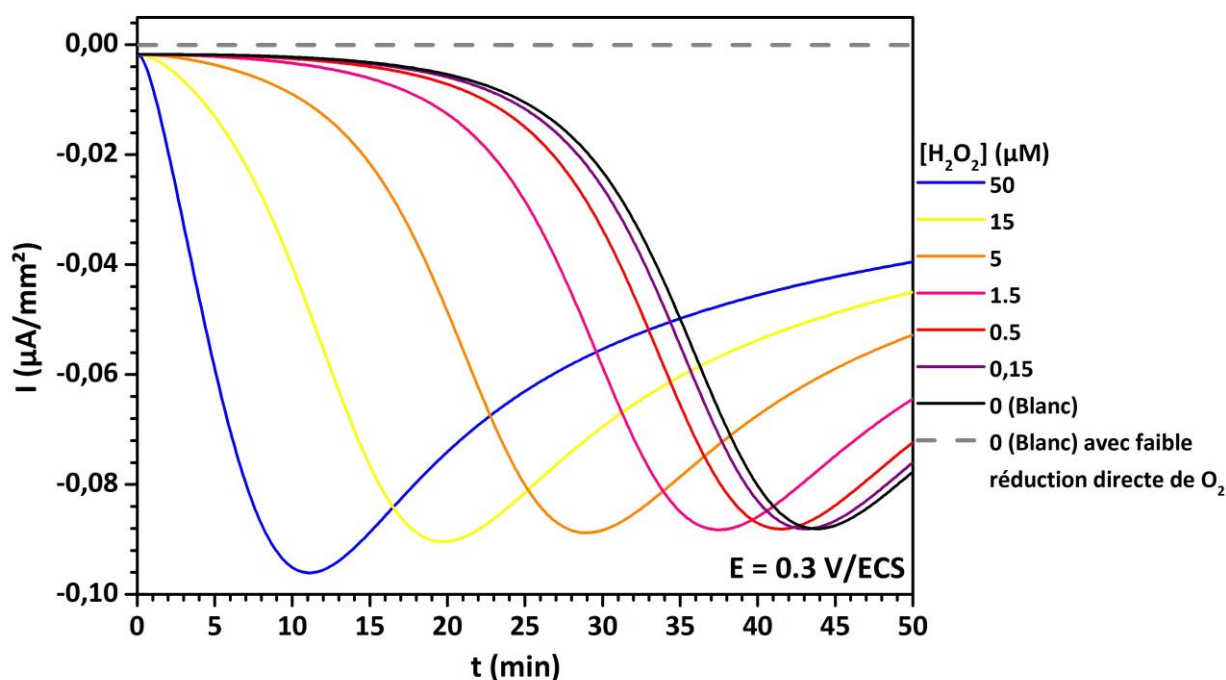


Figure 5-6 : Simulation numérique sur le logiciel DigiElch de l'autocatalyse électrochimique avec 50 µM de 1,4-bis-DBN à -0.3 V/ECS sur une électrode de 0.07 cm² en présence de : [H₂O₂] (µM) : 50 (bleu), 15 (jaune), 5 (orange), 1.5 (rose), 0.5 (rouge), 0.15 (violet), 0 Blanc (noir), et 0 avec une très faible constante de transfert électronique hétérogène pour la réduction directe d'O₂ (gris pointillés). Les réactions électrochimiques et chimiques, ainsi que leurs constantes thermodynamiques et cinétiques sont données dans le **Tableau 5-2**.

Famille de réaction	Réaction	Constantes
Electrochimique	$Q + e^- = Q^-$	$E^0 = -0.4V/ECS ; \alpha = 0.5 ;$ $k_s = 0.1 \text{ cm.s}^{-1}$
	$Q^- + e^- = QH_2$	$E^0 = -0.1V/ECS ; \alpha = 0.5 ;$ $k_s = 0.1 \text{ cm.s}^{-1}$
	$O_2 + 2e^- = H_2O_2$	$E^0 = 0.15V/ECS ; \alpha = 0.3 ;$ $k_s = 1 \times 10^{-10} \text{ cm.s}^{-1}$
Réactivité de la sonde 4-DBN	$1,4\text{-bis-DBN} + H_2O_2 \rightarrow 4\text{-DBN}$	$k_{d,1} = 35 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
	$4\text{-DBN} + H_2O_2 \rightarrow QH_2$	$k_{d,2} = 300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
	$4\text{-DBN} + O_2 \rightarrow QH_2 + H_2O_2$	$k_n = 0 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
	$4\text{-DBN} \rightarrow 1\text{-naphtol}$	$k_p = 0.0004 \text{ s}^{-1}$
Auto-oxydation de la 1,4-NQH ₂	$QH_2 + O_2 \rightarrow Q + H_2O_2$	$k_{ox} = 3300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Tableau 5-2 : Réactions et constantes des réactions rentrées dans DigiElch pour la simulation de la CV représentée en **Figure 5-6**.

Plusieurs chronoampérogrammes simulés sont présentés en **Figure 5-6**. En pointillés gris, on observe la réponse électrochimique attendue dans le cas où il n'y a pas de déclencheur initial et où la réduction directe d'O₂ à l'électrode est fortement inhibée ($k_{teh,O_2} = 1 \times 10^{-12} \text{ cm.s}^{-1}$). Celui-ci ne présente aucune évolution du courant au cours du temps. En effet, la sonde étant extrêmement stable et ne présentant aucune réactivité redox sous sa forme diboronique, rien ne peut déclencher l'amplification exponentielle au cours du temps, le flux de production de H₂O₂ par réduction directe d'O₂ étant trop faible. Cependant, dans le cas où l'on réactive la réduction directe d'O₂ à l'électrode ($k_{teh,O_2} = 1 \times 10^{-10} \text{ cm.s}^{-1}$), l'intensité évolue sous la forme d'une sigmoïde : dans un premier temps, le courant n'évolue pas, signant la phase de latence de la réaction autocatalytique. Cette première phase est ensuite suivie par une phase de croissance non-linéaire du courant en valeur absolue, avant de rediminuer progressivement avec une allure diffusionnelle (en $\frac{1}{\sqrt{t}}$). La même allure est observée si la concentration en déclencheur n'est pas nulle : plus la concentration est élevée, plus le temps de la phase de latence est court. Théoriquement, il semble donc possible d'utiliser l'autocatalyse électrochimique pour la

détection d' H_2O_2 , en reportant par exemple le temps du pic (*i.e.* le maximum d'intensité cathodique) en fonction de la concentration initiale en déclencheur, de 50 à 0.15 μM de concentration en H_2O_2 .

Cette forme de chronoampérogramme originale peut s'expliquer comme suit : durant la phase de latence, la production de 1,4-NQ par déprotection de la sonde est très lente, et on n'observe quasiment pas d'évolution de courant. Après cette phase, l'amplification exponentielle s'accélère via la catalyse croisée, *i.e.* au voisinage de l'électrode de plus en plus de sonde se déprotège en 1,4-NQH₂ qui par auto-oxydation reforme le H_2O_2 et accélère à nouveau la déprotection. Les 50 μM de 1,4-bis-DBN se transforment alors en 50 μM de 1,4-NQ avec une cinétique exponentielle induite par l'autocatalyse, donnant lieu à une augmentation de l'intensité de catalyse de réduction d' O_2 . Après cette phase d'amplification proche de la surface de l'électrode, la quinone produite diffuse de l'électrode vers le cœur de la solution et O_2 est également déplété à la surface, donnant lieu à une diminution du courant de catalyse par combinaison de ces deux phénomènes. Il est important de noter que la seule source de réponse non-spécifique du système est ici la production de H_2O_2 par réduction directe d' O_2 à l'électrode, puisque qu'aucune réaction ne produit une espèce déclencheuse *via* une instabilité de la sonde. Voyons maintenant ce qu'il en est expérimentalement.

Trois chronoampérogrammes réalisés pour une concentration initiale nulle en H_2O_2 sont présentées en **Figure 5-7**. Un potentiel $E_{\text{app}} = -0.3 \text{ V/ECS}$ est appliqué à l'électrode de travail en carbone vitreux, et le courant sera mesurée entre celle-ci et une contre-électrode de platine, le tout dans une cellule électrochimique classique d'environ 7 mL de volume, sans convection et sans désaération. La simulation préalablement discutée est également représentée en pointillés noirs sur le graphe.

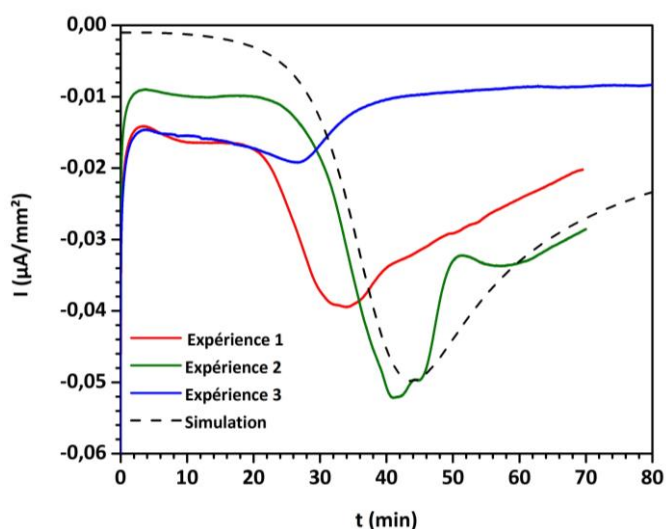


Figure 5-7 : Chronoampérogrammes à $E_{\text{app}} = -0.3 \text{ V/ECS}$ de 50 μM de 1,4-bis-DBN sur une électrode de carbone vitreux, dans 7 mL de tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA à pH 8.5, non désaéré, sans convection. En trait plein rouge, vert et bleu sont représentées trois fois la même expérience. En pointillés noirs, la simulation discutée précédemment.

Dans le cas de l'expérience 1, on retrouve bien la forme prédite par la simulation numérique du chronoampérogramme sur DigiElch. Dans un premier temps, après diminution rapide du courant lié à la fois à la décharge du courant capacitif sur les premières secondes de l'expérience et à un courant de réduction résiduel probablement dû à la réduction directe d'O₂, on a une phase de latence, de 0 à 22 min à -0,016 μA/mm². Après la phase de latence, une augmentation exponentielle en valeur absolue de 25 μA/mm² de l'intensité de réduction se déroule entre 22 et 34 min. Puis, de 34 min à la fin de l'expérience, l'intensité décroît lentement. Cependant, la réponse obtenue dans le cas de l'expérience 2 et 3 n'est pas reproductible en termes de temps et d'intensité, et l'allure, notamment lors de la dernière phase de chute du courant, est parfois fluctuant (présence de saut de courant sur l'expérience 2 et 3). De par ces premiers résultats montrant une faible reproductibilité, l'autocatalyse électrochimique dans ces conditions ne semble donc pas assez robuste et reproductible pour permettre d'être utilisée comme méthodologie de détection d'H₂O₂. De ce fait, la détection de concentrations en déclencheur H₂O₂ n'a pas été jugée pertinente dans cette configuration sur une électrode de carbone vitreux. Cependant, un temps moyen de la réponse non-spécifique de l'autocatalyse électrochimique à partir des temps de pics est extraite : $t_{pic,0 \mu M (Blanc)} = 34 \pm 6.5$ min. Ce temps de réponse est bien plus rapide que celui observée avec un le couple réducteur enzymatique DI/NADH (environ 5 heures par suivi spectrophotométrique et 10 heures par suivi électrochimique, dans les mêmes conditions). Cela peut suggérer que la production non-spécifique de H₂O₂ est beaucoup plus importante par réduction directe d'O₂ au voisinage de l'électrode et contrôle la réponse non-spécifique.

Pour comprendre l'origine de ces fluctuations du signal, une CV est enregistrée à la fin de l'expérience 2 (**Figure 5-7** courbe verte, à 70 min). Puis une seconde CV est enregistrée après mélange de la solution. Les résultats sont représentés sur la **Figure 5-8**. Ainsi, en toute fin de chronoampérométrie, sans toucher à la solution, on observe bien une faible vague catalytique vers -0.3 V correspondant à la 1,4-NQ qui catalyse la réduction d'O₂, puis la réduction directe d'O₂ dont on voit le pied de vague à -0.4 V (**Figure 5-8**, courbe en bleu). Cependant, si la solution est mélangée, la vague catalytique disparaît et seule la réduction directe d'O₂ est observée (**Figure 5-8**, courbe en noir). Le signal de réduction catalysée par la 1,4-NQ a maintenant complètement disparu, suggérant qu'après mélange la concentration en catalyseur à proximité de l'électrode est très faible.

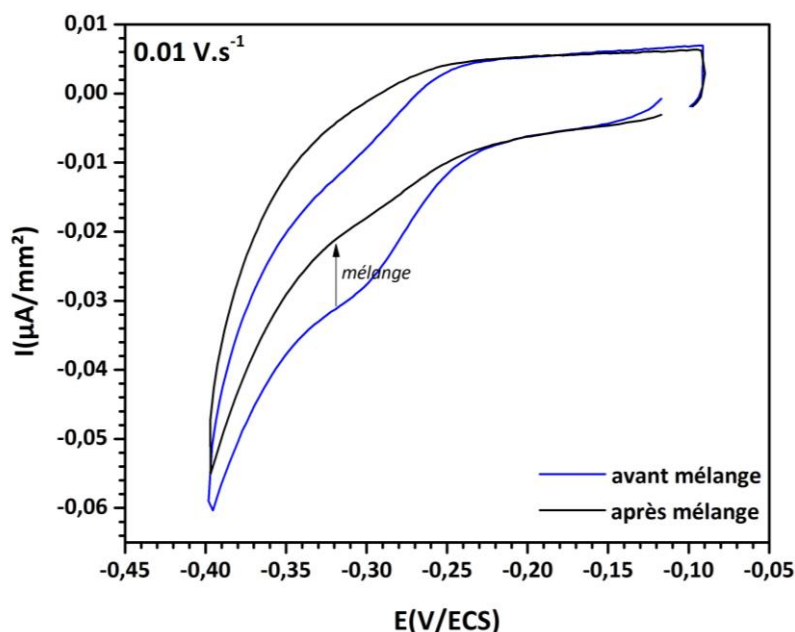


Figure 5-8 : CV à 0.01 V.s^{-1} à la toute fin de l'expérience 2 de la **Figure 5-7**. En bleu : la solution et la cellule électrochimique ne sont pas touchées entre la fin de la chronoampérométrie et la CV. En noir : la solution est mélangée dans la cellule électrochimique à l'aide d'une pipette.

Cette expérience montre qu'au cours de la chronoampérométrie, la 1,4-NQ est accumulée uniquement à proximité de l'électrode (dans la couche de diffusion-réaction) et que la convection forcée due au mélange entraîne sa dilution dans tout le volume. On peut dès lors penser que ce processus survient tout au long de la mesure et que, dans cette configuration de cellule électrochimique classique le système est alors ultra-sensible à toute convection naturelle, qui ne peut être contrôlée et donc qui est susceptible de varier d'une expérience à l'autre ou avec le temps, les expériences durant en effet plus d'une dizaine de minutes. Ceci suggère que l'efficacité de l'autocatalyse est très dépendante des conditions hydrodynamiques. Cette dépendance aux conditions hydrodynamiques du couplage de la réaction homogène de la sonde avec la réaction hétérogène de réduction catalytique d' O_2 permet de donner une première explication à la non-reproductibilité observée lors des expériences. Face à cette problématique, venir confiner la réaction autocatalytique électrochimique dans une couche mince de liquide au-dessus de l'électrode semble une option intéressante. En effet, travailler dans une couche mince permettrait d'accélérer la réaction (vide infra) mais également de s'affranchir des problèmes liés aux perturbations hydrodynamiques dans la cellule électrochimique.

2. Etude de l'autocatalyse électrochimique dans un dispositif couche mince sur une électrode de carbone vitreux

Afin de pallier aux problèmes observés précédemment lors du couplage « homogène / hétérogène » de la réaction autocatalytique électrochimique, un système de cellule électrochimique couche mince a été élaborée au laboratoire. Cela permet d'une part de venir concentrer localement le produit de la réaction homogène au niveau de l'électrode où se déroule la réaction de réduction hétérogène, et ainsi potentiellement accélérer les temps de réponse du système. D'autre part, cela pourrait permettre également de limiter les effets de la convection naturelle sur le couplage réactionnel grâce à une épaisseur de liquide suffisamment faible.

2.1. Simulation de l'autocatalyse électrochimique en couche mince

Dans un premier temps, les mêmes simulations présentées pour la réaction autocatalytique électrochimique sur DigiElch, jusque-là étudié en diffusion semi-infinie (signifiant que les espèces chimiques peuvent diffuser infiniment jusqu'à l'électrode), ont été réalisées dans des conditions de volume fini. Ces conditions nous permettent de mimer une couche mince, avec un volume V en contact avec la surface de l'électrode, qui correspond au produit de la surface de l'électrode par la hauteur h de liquide que celle-ci voit. Dans le cas d'une électrode en forme de disque de diamètre d , le volume de la couche mince est défini comme :

$$V = S_{\text{électrode}} \times h = \pi \frac{d^2}{4} h$$

Dans des conditions couche mince, le rapport surface/volume est suffisamment important pour venir réduire ou oxyder électrochimiquement l'intégralité de quantité de matière comprise dans le volume. Les espèces sont confinées dans un volume de solution fini et ne peuvent donc en théorie pas être renouvelée par diffusion. Le même modèle que celui décrit en **Tableau 5-2** avec 50 μM de sonde 1,4-bis-DBN et en l'absence d' H_2O_2 a été repris dans des conditions où la réaction se déroule dans une couche de liquide au-dessus de l'électrode d'une hauteur de 75 μm . Les résultats sont présentés en rose sur la **Figure 5-9**, et sont comparés aux résultats obtenus précédemment en diffusion semi-infinie :

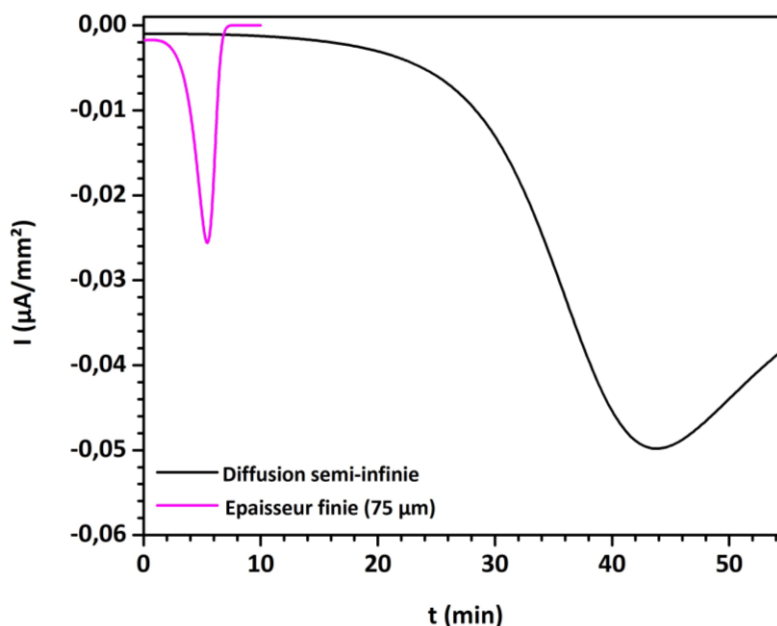


Figure 5-9 : Simulation numérique sur le logiciel DigiElch de l'autocatalyse électrochimique avec 50 μM de 1,4-bis-DBN en absence de H_2O_2 à -0.3 V/ECS sur une électrode de 0.07 cm^2 . Les réactions électrochimiques et chimiques, ainsi que leurs constantes thermodynamiques et cinétiques sont données dans le **Tableau 5-2**. En noir : la simulation est réalisée dans des conditions semi-infinies. En rose : la simulation est réalisée dans un volume fini au-dessus de l'électrode d'une hauteur de 75 μm .

Tout d'abord, la diminution de temps de latence montre comme attendu une accélération de la réaction autocatalytique électrochimique dans le cas où elle se déroule dans une couche mince. Tout paramètres égaux par ailleurs, le temps de pic par simulation passe de 44 min en diffusion semi-infinie à seulement 5.5 minutes dans une configuration couche mince. Cette accélération de la réponse électrochimique s'explique par le fait que la quinone et le H_2O_2 produits restent confinés proche de l'électrode, sans perte par diffusion, ce qui favorise les cinétiques réactionnelles. Autrement dit, les deux boucles catalytiques se produisant dans une couche mince finie, leur couplage est ainsi favorisé et la cinétique globale de la réaction autocatalytique est accélérée. Ensuite, l'intensité du pic diminue également dans la configuration couche mince (-0.025 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ en rose contre -0.05 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ en noir). Cette diminution de l'intensité s'explique par une quantité finie d' O_2 dans la couche mince. L'oxygène dissous est en effet consommé par la catalyse ; or, dans une couche de volume finie, la quantité est plus faible, celui-ci s'épuise donc plus rapidement. Enfin, cette observation corrèle avec le comportement de l'évolution de l'intensité après le pic, qui en diffusion semi-infinie décroissait en $\frac{1}{\sqrt{t}}$ avant de se stabiliser à un courant de diffusion non nul. Dans le cas de la couche mince, la décroissance est très rapide, et le courant atteint une valeur nulle en quelques secondes. Cette décroissance rapide vers un courant nul est la conséquence de l'épuisement total d' O_2 dans la couche mince, qui ne peut pas être renouvelé par diffusion. La même simulation, mais en faisant varier la hauteur h de la couche mince a été réalisée et est présentée en **Figure 5-10** pour quatre hauteurs (10, 25, 50 et 75 μm). On

observe ainsi une diminution simultanée de l'intensité et du temps de pic avec une diminution de la hauteur de la couche mince. En effet, l'effet de confinement est d'autant plus important que le rapport surface/volume est grand, et de plus, la quantité d'O₂ disponible est également plus faible. Pour assurer une bonne reproductibilité des résultats, un système expérimental robuste nous permettant d'obtenir une hauteur de couche mince similaire d'une mesure à l'autre est alors nécessaire.

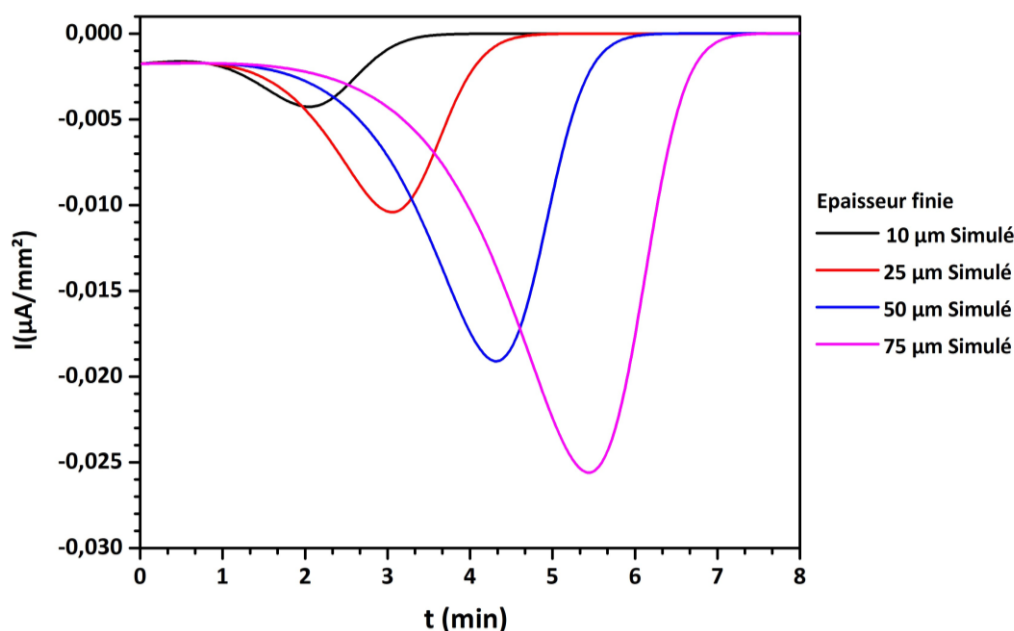


Figure 5-10 : Simulation numérique sur le logiciel DigiElch de l'autocatalyse électrochimique avec 50 µM de 1,4-bis-DBN en absence de H₂O₂ à -0.3 V/ECS sur une électrode de 0.07 cm², pour plusieurs hauteurs de couche mince (µm) : 10 (noir), 25 (rouge), 50 (bleu), 75 (rose). Les réactions électrochimiques et chimiques, ainsi que leurs constantes thermodynamiques et cinétiques sont données dans le **Tableau 5-2**.

2.2. Présentation du dispositif expérimental de formation de couche mince

Un premier dispositif de couche mince à partir d'une cellule en verre et d'un micromanipulateur va être présenté. L'idée est de venir, après introduction de tous les réactifs dans une solution de 5 mL, plaquer une électrode en carbone vitreux à l'aide d'un micromanipulateur, contre une plateforme en verre, et mesurer le courant par chronoampérométrie. La surface de l'électrode de travail ne verra donc que le volume de liquide contenu entre elle et la plateforme de verre, où se déroulera la réaction autocatalytique électrochimique. Le système est présenté en **Figure 5-11**.

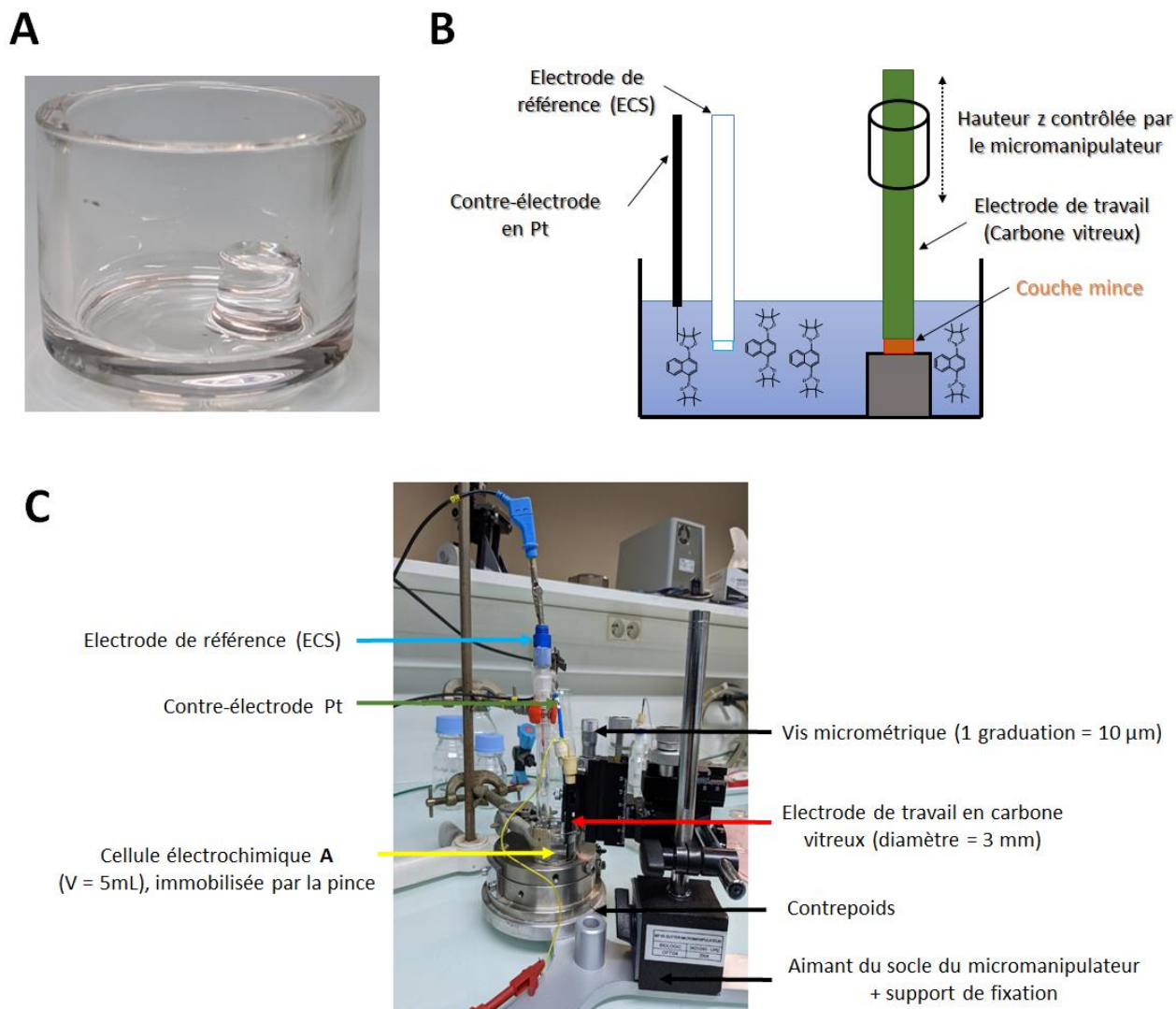


Figure 5-11 : Montage expérimental pour l'autocatalyse électrochimique en couche mince. **(A)** Cellule électrochimique utilisée, V = 5 mL, à droite de la cellule une plateforme en verre plane permet de venir poser l'électrode. **(B)** Schéma représentatif de la configuration couche mince de l'électrode de travail en carbone vitreux. **(C)** Montage expérimental réel de la configuration couche mince pour l'autocatalyse électrochimique.

La cellule électrochimique en **Figure 5-11A**, fabriquée par le verrier à l'Université Paris Cité, permet de déposer sur une plateforme de surface plane l'électrode en carbone vitreux, et de travailler dans un volume de 5 mL au total. L'idée est de venir déposer l'électrode en carbone vitreux contre cette plateforme à l'aide d'un micromanipulateur, et les deux autres électrodes sont immergées dans la solution. Cette configuration permet de travailler en couche mince sans interférence des produits des contre-réactions à la contre-électrode. La **Figure 5-11C** illustre le dispositif expérimental utilisé. Sur un support de fixation en forme de tripode est aimantée le socle du micromanipulateur, et de l'autre côté la cellule **A**, tenue par une pince, est déposée sur un contrepoids. Le tripode est fixé à la paillasse par deux serre-joints. Ces précautions permettent, lors de l'approche verticale de l'électrode (vissée au micromanipulateur) vers la plateforme, une stabilité du système et ainsi une meilleure

reproductibilité de l'épaisseur de la couche mince formée. Les autres électrodes sont immergées dans la solution.

2.3. Preuve de concept du dispositif expérimental de formation de couche mince à partir d'une sonde électrochimique

Pour étudier le phénomène d'autocatalyse électrochimique avec une épaisseur de couche mince la plus reproductible possible, le protocole est toujours appliqué de la manière suivante : les réactifs sont introduits dans le tampon électrolyte, l'électrode est approchée de la plateforme en verre, et la vis micrométrique du micromanipulateur « serre » l'électrode contre la plateforme, avec toujours le même nombre de tours de vis. Dans un premier temps, l'efficacité de ce système a été étudiée à partir de la reproductibilité de la réponse en voltamétrie cyclique du ferrocène-méthanol. Cette sonde électrochimique représentée en **Figure 5-12**, qui s'oxyde puis se réduit réversiblement à 1 électron, nous permet d'observer par notre dispositif expérimental une bonne reproductibilité des CVs comme illustré en **Figure 5-13**.

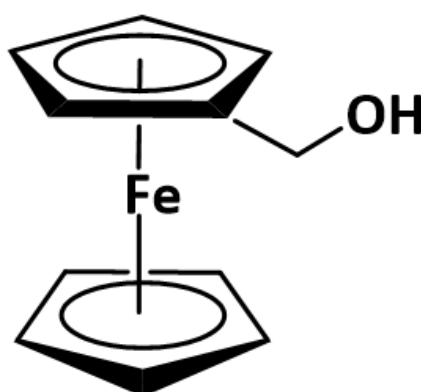


Figure 5-12 : Structure du ferrocène-méthanol

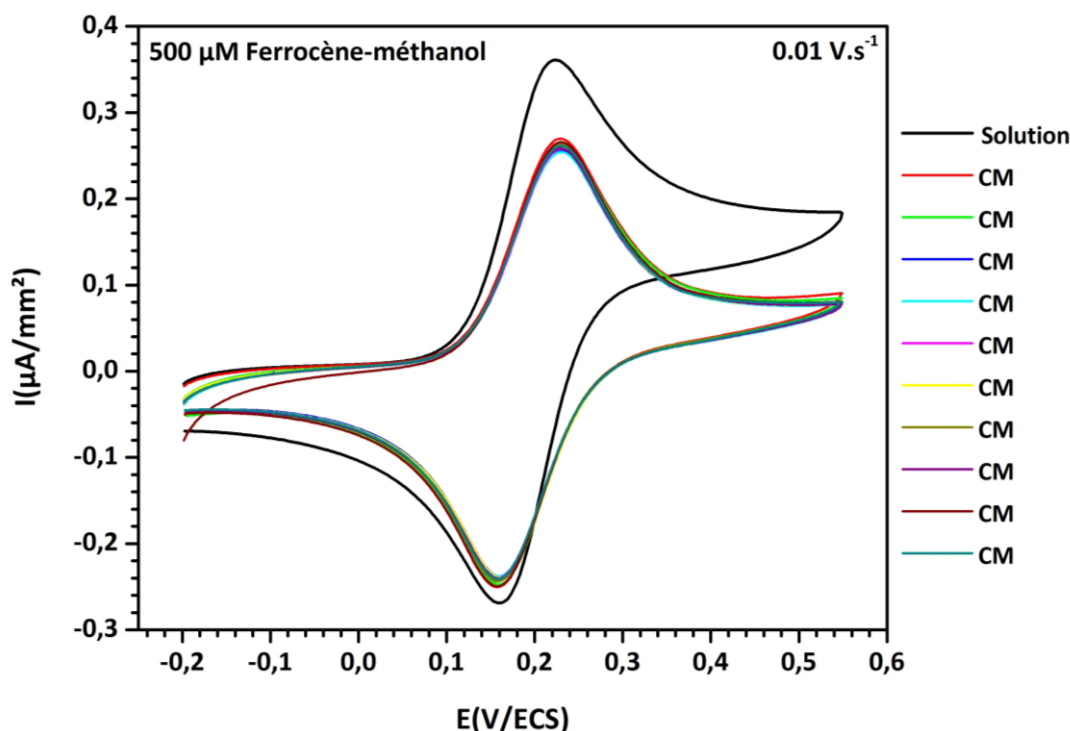


Figure 5-13 : CV à 0.01 V.s^{-1} sur électrode en carbone vitreux (diamètre = 3 mm) de $500 \mu\text{M}$ de ferrocène-méthanol dans un tampon Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA à pH 8.5. En noir : l'électrode est placée dans le volume de la solution. En couleurs : l'électrode est placée dans la configuration couche mince décrite sur la **Figure 5-11**, avec le même serrage initial de la vis micrométrique.

La forme des CVs obtenues est caractéristique d'une configuration de cellule électrochimique en couche mince. En effet, sur la CV en cellule classique (**Figure 5-13**, en noir), après le maximum du pic d'oxydation à $E_{p,a} = 0.23 \text{ V}$, le courant décroît du fait de l'épuisement local de la sonde redox près de l'électrode, et la diffusion devient limitante. Cependant, dans la configuration couche mince, le pic d'intensité plus faible est quasiment symétrique de chaque côté et l'intensité en fin de vague atteint une valeur quasi-nulle. Cette allure est caractéristique d'une CV en couche mince, car la quantité de matière de sonde disponible est limitée dans le volume V de la couche mince. C'est donc un phénomène de micro-électrolyse, contrairement au phénomène observé lors d'une CV classique en volume, où seule une partie négligeable de la quantité de matière disponible est transformée. Par ailleurs, la hauteur de la couche mince est un facteur clé de l'intensité des pics d'oxydation et de réduction : plus la couche mince est fine, moins il y aura de quantité de matière disponible et donc moins le pic sera intense. La forte reproductibilité sur une dizaine de mesures de l'intensité des pics (avec une intensité de pic anodique moyenne $i_{p,a} = 0.260 \pm 0.005 \mu\text{A/mm}^2$) nous permet d'affirmer qu'il est possible d'obtenir une couche mince de hauteur reproductible à partir de notre dispositif expérimental.

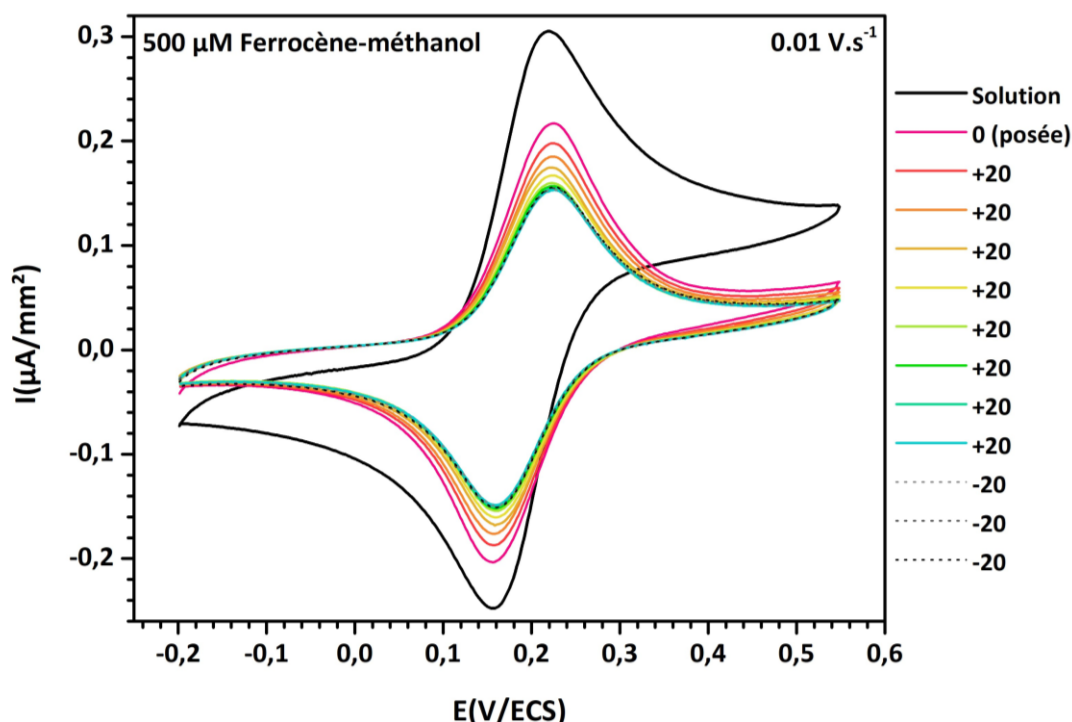


Figure 5-14 : CV à 0.01 V.s^{-1} sur électrode en carbone vitreux (diamètre = 3 mm) de $500 \mu\text{M}$ de ferrocène-méthanol dans un tampon Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA à pH 8.5. En noir : l'électrode est placée dans le volume de la solution. En rose : l'électrode est serrée de manière classique sur la plateforme en verre. A chaque « +20 », la vis micrométrique est serrée de 20 petites graduations (en ligne pleine). Après 8 serrages successifs, la vis micrométrique est desserrée de « -20 » successivement trois fois (en pointillés).

Une seconde expérience de couche mince avec la sonde ferrocène avec variation du serrage est présentée en **Figure 5-14**. Dans cette expérience, les mêmes conditions que précédemment sont appliquées pour obtenir une CV en couche mince de $500 \mu\text{M}$ de la sonde ferrocène-méthanol. Puis, la vis micrométrique qui supporte l'électrode de carbone vitreux est serrée successivement 8 fois avec le même pas « +20 » (correspondant à 20 petites graduations de la vis micrométrique). On observe alors une diminution des intensités de pics anodiques et cathodiques à chaque serrage. Cette observation montre qu'avec le dispositif expérimental utilisé, différents serrages mènent à différentes intensités de pics. La diminution des intensités de pics en augmentant le serrage de la vis s'explique par une diminution de la hauteur de la couche mince. Cette configuration permet donc bien d'obtenir des couches minces de différentes hauteurs. Dans un second temps, en pointillés, la vis est desserrée avec le même pas trois fois d'affilée, et les intensités de pics réaugmentent pour atteindre des valeurs proches des précédentes : le processus de serrage de la couche mince est donc réversible.

A partir de ces expériences, nous pouvons déterminer la hauteur de la couche mince lors des différentes CVs. En effet, à partir de la loi de Faraday $Q = nF * N$ (avec Q en coulomb (C) la quantité charge consommée par une réaction électrochimique, $n = 1$ le nombre d'électron échangé, $F = 96500$

$C \cdot \text{mol}^{-1}$ la constante de Faraday, N la quantité de matière consommée), il est possible de déterminer la quantité de matière consommée. La totalité du ferrocène-méthanol contenu dans la couche mince étant consommé lors de la CV, en rapportant la quantité de matière consommée à la concentration initiale ($500 \mu\text{M}$), il est possible de déterminer le volume de solution. La quantité de charge est déterminée en divisant l'aire sous le pic anodique ou cathodique (déterminée numériquement à partir du logiciel Nova) par la vitesse de balayage. En **Figure 5-14**, l'intégration du pic anodique de la CV en rose (0, posée, correspondant au premier serrage classique du système couche mince), donne une hauteur de la couche mince de $52 \mu\text{m}$. L'intégration de la CV en cyan (correspondant au plus fort serrage et donc à la plus faible intensité et aire de pic) donne une hauteur de la couche mince de $34 \mu\text{m}$. Il est alors important de constater à quel point une faible variation de la hauteur peut faire varier l'intensité des pics d'une CV en couche mince. Cependant, cela nous permet de nous rassurer sur une valeur d'un peu plus de $50 \mu\text{m}$ reproductible pour la réaction autocatalytique en couche mince si nous adaptons le serrage classique.

Ces deux expériences permettent donc de nous rassurer sur la possibilité de former une couche mince à partir du dispositif expérimental ainsi que sur la reproductibilité de sa hauteur. A partir de cette configuration de cellule électrochimique fiable, une étude de l'autocatalyse électrochimique va alors pouvoir être réalisée pour être comparée aux simulations.

2.4. Autocatalyse électrochimique en couche mince

La réaction autocatalytique électrochimique pour une réponse non-spécifique du blanc a été réalisée dans les conditions classiques ($E_{\text{app}} = -0.3 \text{ V/ECS}$, $[1,4\text{-bis-DBN}] = 50 \mu\text{M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0 \mu\text{M}$, dans un tampon Tris $0.1 \text{ M} + 10 \mu\text{M}$ EDTA à pH 8.5), avec le nouveau dispositif expérimental de couche mince décrit précédemment. Un serrage classique de l'électrode contre la plateforme de verre est appliqué, et une hauteur de couche mince $h = 52 \mu\text{m}$ environ est alors attendue d'après les estimations déterminées *via* la sonde ferrocène. La sonde est introduite, puis rapidement l'électrode est serrée dans la configuration couche mince et la chronoampérométrie est lancée. Le chronoampérogramme obtenu est représenté en **Figure 5-15** en trait vert, et en pointillés sont rappelés les simulations numériques obtenues à une hauteur de couche mince de 50 et $75 \mu\text{m}$.

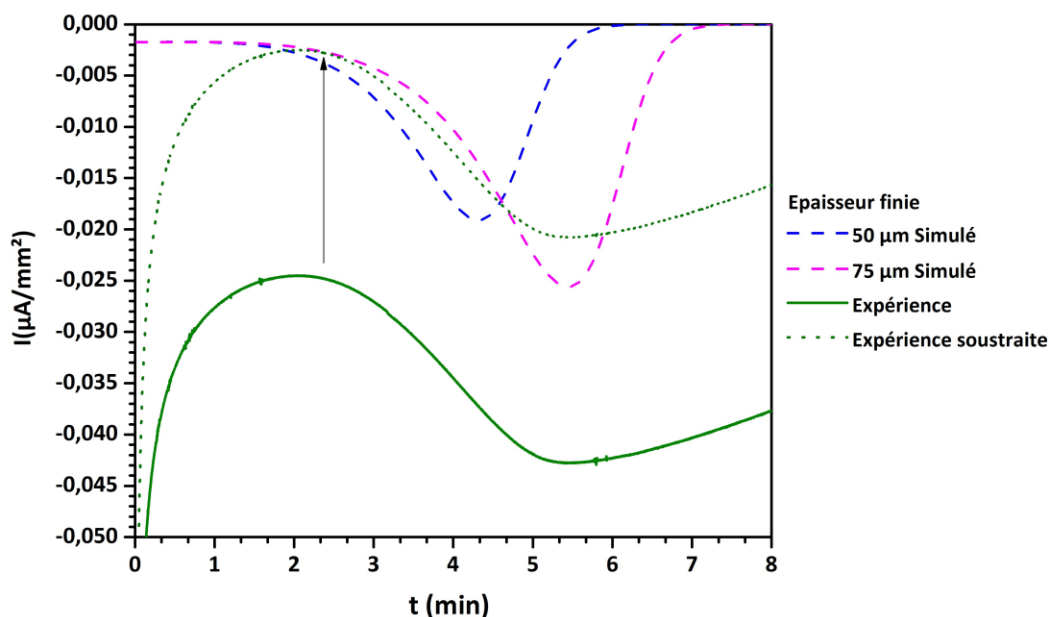


Figure 5-15 : Trait plein vert : chronoampérométrie de l'autocatalyse électrochimique avec 50 μM de 1,4-bis-DBN en l'absence de H_2O_2 à -0.3 V/ECS sur une électrode de 0.07 cm^2 dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA à pH 8.5. Pointillés verts : soustraction du courant résiduel lors de la chronoampérométrie pour ajuster la courbe expérimentale au courant résiduel des simulations. En tirets les simulations obtenues en **Figure 5-10** pour 50 (bleu) et 75 (rose) μm de hauteur de couche mince.

La forme du chronoampérométrie expérimental diffère par plusieurs aspects de la forme attendue par simulation. En effet, on observe expérimentalement un fort courant initial qui diminue au cours de la première minute de l'expérience. Il correspond en partie à la décharge du courant capacitif classiquement observé sur une électrode en carbone vitreux, et n'est pas pris en compte dans la simulation. Cependant, le courant résiduel atteint après cette décharge, (ici de $-0.025 \mu\text{A}/\text{mm}^2$ au bout de 2 minutes, sur la **Figure 5-15** en trait plein vert) est bien plus important. De plus, celui-ci varie d'une expérience à l'autre (non montré ici), car il est très sensible à l'état de surface de l'électrode : ce point sera détaillé par la suite dans ce chapitre. Si l'on retranche ce courant résiduel (pointillé vert), l'évolution du courant ainsi que l'ordre de grandeur du courant observée expérimentalement sont très similaires aux simulations : cette phase correspond à l'accumulation exponentielle de la naphthoquinone dans la couche mince par la réaction autocatalytique, qui engendre un courant catalytique la réduction d' O_2 . La redescende du courant après le pic, due à l'épuisement d' O_2 dans la couche mince, n'est cependant pas de même allure lorsque l'on compare simulation et expérience. Comme évoqué précédemment dans les simulations, on s'attend à une déplétion rapide d' O_2 dans la couche mince, entraînant une chute rapide du courant à une valeur nulle. Cependant expérimentalement, cette chute est lente et tend vers un courant non nul, indiquant que l'oxygène arrive à pénétrer dans la couche mince et continuer de diffuser à l'électrode. Une diffusion radiale d' O_2 est suspectée : en effet, le plastique entourant la surface de carbone vitreux n'étant pas de la même

exacte hauteur, l'oxygène peut pénétrer radialement et atteindre la surface électro-active par diffusion. Un schéma de cette diffusion radiale d' O_2 lors de l'autocatalyse électrochimique en couche mince est représenté en **Figure 5-16**. Cependant, si on se fie à la détermination de la hauteur de 52 μm de la couche mince évoquée précédemment, et compte tenu de la simplicité du modèle moléculaire rentré dans la simulation, le temps et l'intensité du pic de l'autocatalyse électrochimique est très proche des valeurs attendues.

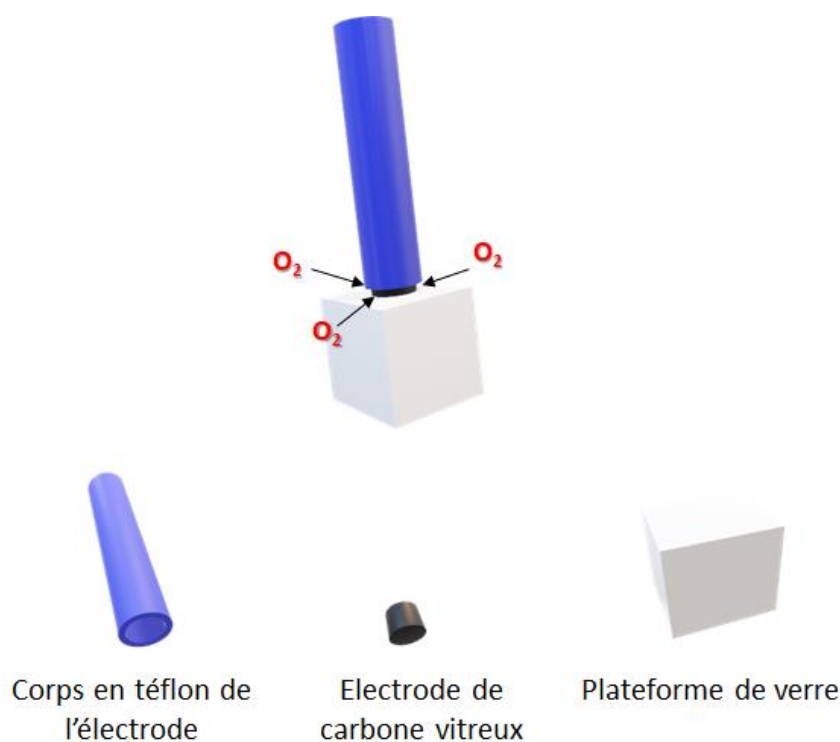


Figure 5-16 : représentation schématique de la diffusion radiale d' O_2 vers la surface de l'électrode en carbone vitreux sertie dans un corps en téflon lorsque l'électrode est déposée sur la plateforme de verre en configuration couche mince.

Pour pouvoir s'assurer que la réaction autocatalytique électrochimique était bien due au couplage de la réaction homogène de déprotection avec la réduction électrochimique catalytique de l' O_2 médiée par la 1,4-NQ, deux autres types de sondes conçues au laboratoire ont été testés dans les mêmes conditions. Une est la sonde 2,5-OMe-PB, étudiée préalablement dans le chapitre 3 (3.2), qui libère une 2,5-OMe-benzoquinone dont la cinétique globale de recyclage redox est efficace dans le cas d'une réduction à 2 électrons et 2 protons (avec le couple réducteur enzymatique DI/NADH par exemple). La seconde est la sonde 2,5-Me-PB, qui a été étudiée au cours de la thèse de Pan HUI au Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire¹, qui libère une 2,5-Me-benzoquinone. Cette dernière ne présente pas d'activité de catalyse de la réduction électrochimique d' O_2 , et de ce fait constitue un bon contrôle car aucune autocatalyse électrochimique n'est attendue.

Les chronoampérogrammes dans les mêmes conditions pour les trois sondes différentes (1,4-bis-DBN, 2,5-OMe-PB et 2,5-Me-PB) sont présentés en **Figure 5-17**, ainsi que la même expérience sans sonde pour le contrôle du blanc.

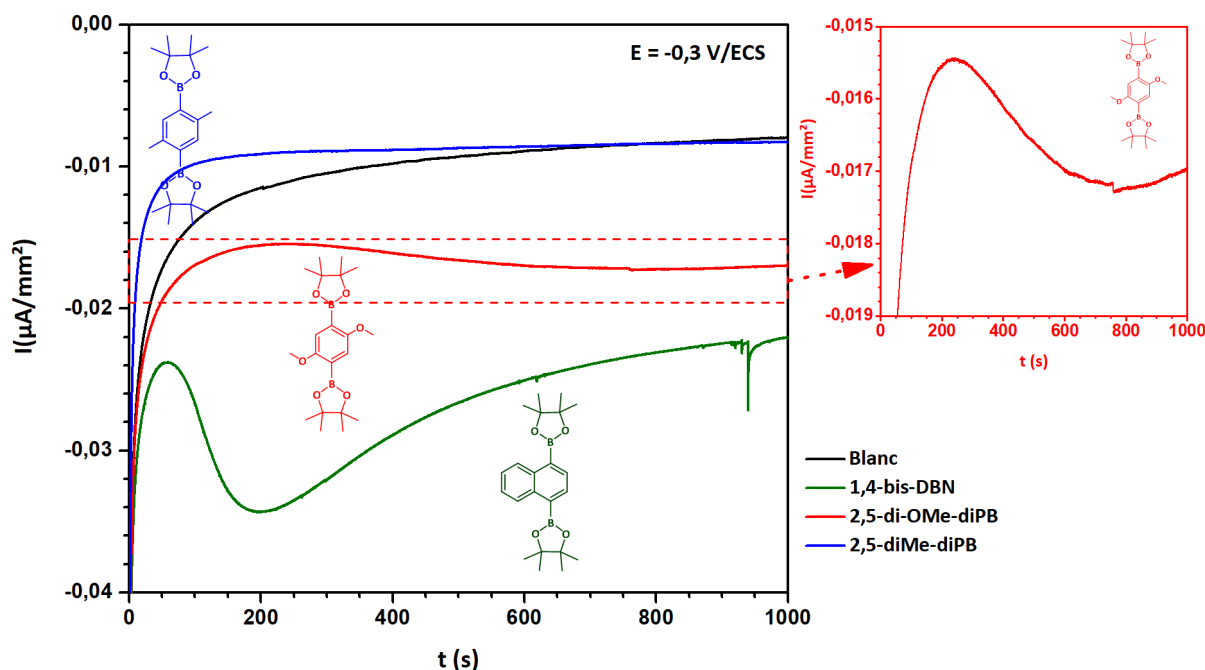


Figure 5-17 : Chronoampérogrammes de l'autocatalyse électrochimique à -0.3 V/ECS sur une électrode de carbone vitreux ($d = 3 \text{ mm}$) pour 50 μM de sonde dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA à pH 8.5. Sonde : aucune (noir), 1,4-bis-DBN (vert), 2,5-OMe-PB (rouge), 2,5-Me-PB (bleu). Les structures moléculaires de chaque sonde sont représentées dans la même couleur et à côté de leur chronoampérogramme associé.

Pour la courbe noire qui correspond au contrôle du blanc (*i.e.*, sans sonde boronique), on observe dans un premier temps la chute du courant capacitif évoquée précédemment, puis la réduction directe d' O_2 avec une très faible diminution du courant sur plus de 3 heures. L'oxygène arrive cependant à être transportée jusqu'à l'électrode car le courant atteint un état stationnaire non nul rapidement, par diffusion radiale. Ce contrôle du blanc sans sonde permet de s'assurer que l'apparition du pic observé expérimentalement en **Figure 5-15** est bien due à la réaction autocatalytique engendrée par la sonde 1,4-bis-DBN. Dans le cas de la sonde 2,5-OMe-PB (**Figure 5-17**, encart), dont la benzoquinone une fois libérée après oxydation par H_2O_2 des deux groupes pinacols esters boroniques entraîne une catalyse électrochimique de réduction d' O_2 , un pic plus faible apparaît également après une dizaine de minutes. Cependant dans le cas de la sonde 2,5-Me-PB, dont la benzoquinone ne permet pas de catalyser électrochimiquement la réduction d' O_2 , aucun pic n'apparaît sur trois heures. Cette expérience nous permet donc de confirmer la preuve de concept de la réaction autocatalytique électrochimique en couche mince, dans le cas où le médiateur redox libérée par une sonde permet la réduction électrochimique d' O_2 .

La preuve de concept de la réaction autocatalytique électrochimique en couche mince ayant été établie, la reproductibilité de la réponse non-spécifique (*i.e.* en l'absence d' H_2O_2) a été étudiée sur plusieurs expériences. Cinq chronoampérogrammes sont représentés en **Figure 5-18**. Malgré la haute reproductibilité de la hauteur de la couche mince, les temps de réponse varient sensiblement d'une expérience à l'autre. Un temps de réponse pour la réponse-non spécifique de la sonde 1,4-bis-DBN (la réaction est déclenchée par la production non-spécifique de H_2O_2 à l'électrode par réduction directe d' O_2) de $5,1 \pm 0,95$ minutes est extrait, soit une variabilité du temps de réponse d'environ 20%. De plus, le courant résiduel de la phase de latence varie également entre $-0,025$ et $-0,03 \mu\text{A}/\text{mm}^2$.

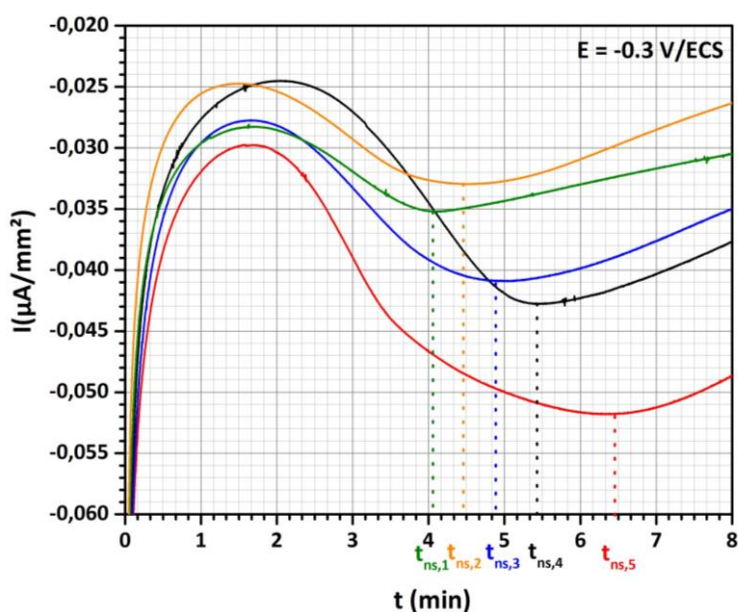


Figure 5-18 : Chronoampérogrammes de l'autocatalyse électrochimique avec $50 \mu\text{M}$ de 1,4-bis-DBN en l'absence de H_2O_2 à $-0,3 \text{ V/ECS}$ sur une électrode de $0,07 \text{ cm}^2$ dans un tampon Tris $0,1 \text{ M}$ + $10 \mu\text{M}$ EDTA à pH 8,5. L'expérience est répétée 5 fois (en rouge, bleu, vert, orange, et noir). Les temps de pics sont reportés sur l'axe des abscisses.

La variabilité de l'intensité résiduelle observée est suspectée être due à la variabilité de l'état de surface de l'électrode de carbone vitreux. Si l'électrode est toujours polie de la même manière, ce matériau reste très sensible à la présence de groupements fonctionnels due à l'oxydation rapide du carbone qui peuvent affecter notamment l'ORR. La réduction d' O_2 sur une électrode de carbone vitreux, qui est une réaction électrochimique irréversible très lente (avec des constantes de transferts électroniques hétérogènes très faibles et une vague qui apparaît loin de son potentiel thermodynamique), peut alors être grandement affectée par la présence ou non de ces groupements fonctionnels, qui varient d'un polissage à l'autre. En **Figure 5-19**, après un polissage classique de l'électrode, une première CV est enregistrée, puis l'électrode est repolie de même manière et une seconde CV est enregistrée. Le processus est répété une troisième fois. Les CVs sont enregistrées dans

le même tampon dans la même configuration de cellule électrochimique (même volume, mêmes électrodes...).

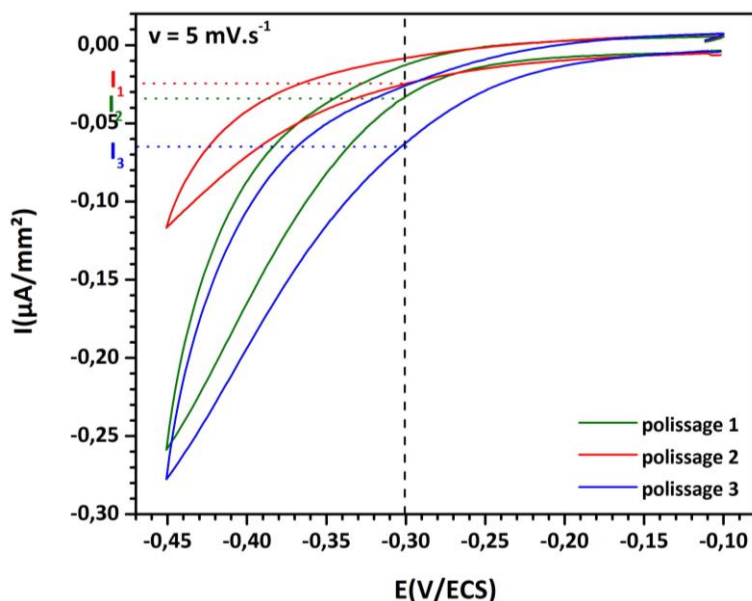


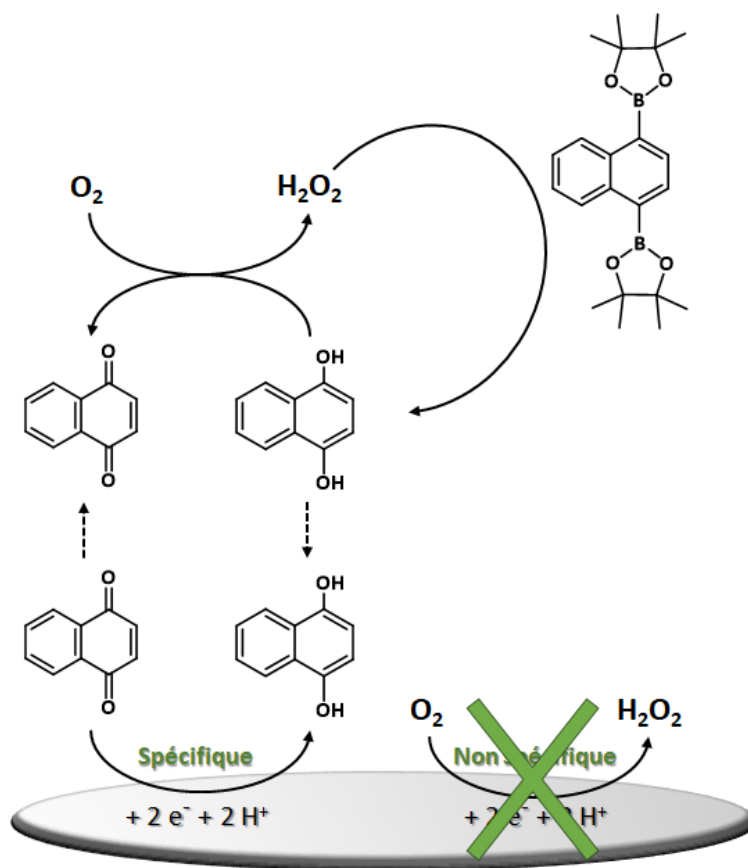
Figure 5-19 : CV de la réduction du O₂ dissous dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA à pH 8.5 à 5 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Les voltamogrammes obtenus indépendamment après chaque polissage sont montrés en vert, rouge et bleu. Les intensités de réduction à $E = -0.3 \text{ V/ECS}$ sont reportés sur l'axe des ordonnées par des pointillés.

On remarque que si dans l'allure globale les trois CV sont de même forme, les intensités sont très différentes d'un polissage à un autre, confirmant que l'état de surface diffère. Cela entraîne une variabilité dans les intensités de réduction directe de l'oxygène dont on observe le pied de vague ici. Si on relève les intensités obtenues pour les trois polissages au potentiel $E_{\text{app}} = -0.3 \text{ V/ECS}$ qui est appliquée lors des chronoampérométries autocatalytiques (**Figure 5-18**), une valeur moyenne de $I_{\text{red.O}_2} = -0.042 \pm 0.021 \mu\text{A}/\text{mm}^2$ peut être extraite. L'intensité de réduction directe d'O₂ est donc très peu reproductible d'un polissage à un autre, avec une variation de 50% par voltamétrie cyclique. Cela permet donc d'expliquer dans un premier temps l'irreproductibilité du courant résiduel observée lors des autocatalyses électrochimiques. De plus, cette différence d'intensité induit que le flux de réduction directe d'O₂ à l'électrode diffère d'une expérience à une autre, et donc que le flux de H₂O₂ non-spécifique n'est pas reproductible avec ce matériau d'électrode lors de la réaction autocatalytique électrochimique. « L'instabilité de l'électrode », c'est-à-dire la production non-spécifique du déclencheur de la réaction variant d'une expérience à l'autre, les temps de réponse obtenus ne sont donc pas reproductibles. Il est important de noter que cette conclusion sur carbone vitreux vaut également lorsque la réaction autocatalytique électrochimique est réalisée en solution dans une cellule électrochimique classique, et que cet effet s'ajoute à l'irreproductibilité induite par les perturbations hydrodynamiques discutées dans ce cas-là. De ce fait, utiliser une électrode en carbone

vitreux n'est pas optimal pour la réaction autocatalytique électrochimique. Par la suite, une discussion autour de la réduction directe et catalytique d'O₂ sur plusieurs matériaux d'électrodes va être présentée.

3. Etude de la réduction directe et catalysée par la 1,4-naphthoquinone d'O₂ sur différents matériaux d'électrodes

L'électrode en carbone vitreux n'est donc pas adaptée à l'application analytique de notre réaction autocatalytique électrochimique, car la réduction directe d'O₂ est d'une part trop dépendante de l'état de surface, et d'autre part est trop importante. Le flux de production de H₂O₂ par réduction directe, qui est non-spécifique de la détection souhaitée, génère un temps de réponse du blanc de la réaction autocatalytique électrochimique beaucoup trop avancé pour espérer discriminer des concentrations de H₂O₂. Un matériau d'électrode idéal serait alors une surface électrochimique où au potentiel de catalyse de réduction d'O₂ par la 1,4-naphthoquinone, la réduction directe d'O₂, elle, serait nulle. En d'autres termes pour un potentiel donné, le flux de H₂O₂ à l'électrode serait produit uniquement par la réduction catalytique d'O₂ médiée par la 1,4-NQ, comme sur le schéma ci-dessous :



Il n'existe que très peu d'articles dans la littérature qui évoquent ce type de comportement de matériaux d'électrodes, par l'utilisation d'électrodes de diamants dopées au bore (BDD) ou

d'électrodes d'or fonctionnalisées par une monocouche auto-assemblée (SAM) de thiol². Trouver un tel matériau est donc un challenge, et dans cette optique, la réduction directe et catalysée (par la 1,4-NQ) d'O₂ a été réalisée sur une large variété d'électrodes disponibles au laboratoire.

3.1. Réduction d'O₂ sur des matériaux carbonés

Dans un premier temps, deux nouveaux matériaux carbonés ont été utilisés pour observer la réduction d'O₂ (catalytique et directe), l'électrode de diamant au bore (**BDD**), et l'électrode Highly Oriented Pyrolytic Graphite (**HOPG**). Ces matériaux ont été choisis car la réduction directe d'O₂ dans des milieux alcalins est décrite comme fortement inhibée dans un papier publié par Yano *et al* en 1998³. Les CVs obtenues sont comparées à celles déjà présentées sur carbone vitreux (**GC**) sur la **Figure 5-20**, avec en **A** l'électrode GC, **B** l'électrode HOPG, et **C** l'électrode BDD.

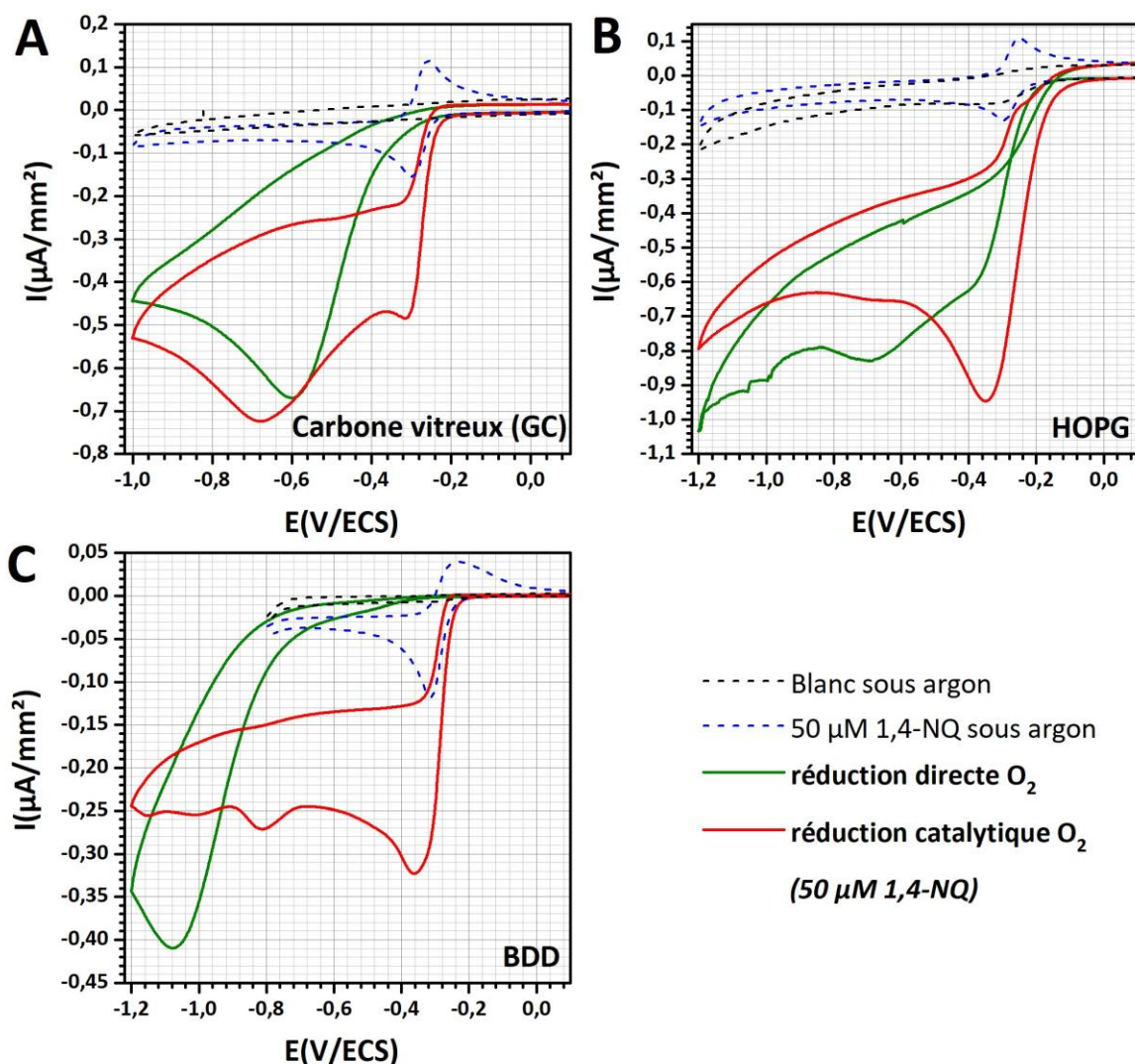


Figure 5-20 : CV obtenues à $0.01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ dans un tampon Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA à pH 8.5 pour : contrôle du blanc sous argon (pointillés noirs), $50 \mu\text{M}$ de 1,4-NQ sous argon (pointillés bleus), la réduction directe d'O₂ dissous (trait plein vert), la réduction catalysée d'O₂ par $50 \mu\text{M}$ de 1,4-NQ (trait plein rouge) sur : **(A)** GC, **(B)** HOPG, **(C)** BDD.

La réponse de la 1,4-NQ en l'absence d'oxygène, qui se réduit et s'oxyde successivement à 2 électrons et 2 protons puisqu'elle n'a pas d'O₂ à disposition pour s'auto-oxyder, est également représentée en pointillés bleus. Cette réponse permet d'avoir une idée du transfert électronique hétérogène de la 1,4-NQ sur le matériau d'électrode, qui lui a besoin d'être suffisamment rapide pour pouvoir assurer la catalyse par la suite. Dans les trois cas, une vague réversible rapide est observée, signifiant que les trois matériaux d'électrodes carbonés sont aptes à réduire efficacement la 1,4-NQ.

Dans le cas de l'électrode HOPG, on observe que les deux réductions directe (en vert) et catalysée (en rouge) d'O₂ sont plus efficaces que sur GC. En effet, les potentiels sont moins cathodiques (la vague catalytique démarre à -0.1 V) et les densités de courant plus importantes.

Dans le cas de l'électrode BDD cependant, une inhibition de la réduction directe d'O₂ est observée : le début de vague de réduction faible commence à -0.4 V sur BDD contre -0.3 V sur GC, et les densités de courant sur l'électrode de diamant sont beaucoup plus faibles. La catalyse de réduction d'O₂ par 50 µM de 1,4-NQ est un peu moins intense sur BDD que sur GC, mais une catalyse efficace au même potentiel est observée. En effet, le transfert électronique de la 1,4-NQ (en pointillés bleus) est rapide et réversible sur BDD, et donc la catalyse peut s'opérer. L'électrode de BDD semble donc un bon candidat pour la réaction autocatalytique électrochimique, mais reste complexe à utiliser. En effet, pour de la détection, l'électrode utilisée doit toujours être propre et ne pas contenir la moindre trace de naphthoquinone ou d'H₂O₂ sur son état de surface. L'électrode en diamant n'étant pas polissable, le nettoyage de l'état de surface se fait par voltamétrie cyclique dans un sel de lithium, ne garantissant pas l'élimination totale des traces de déclencheur de la réaction autocatalytique d'une expérience à une autre. Cependant, l'exemple du BDD démontre qu'il est possible de discriminer la réduction directe et catalysée d'O₂ par le choix d'un matériau d'électrode sélectif. Dans cette optique, d'autres types de matériaux ont été explorés.

3.2. Réduction d'O₂ sur des oxydes transparents conducteurs

Les oxydes transparents conducteurs (OTC) sont des matériaux d'électrodes déposés sur un substrat transparent (habituellement du verre ou du plastique). Ce type d'électrode repose sur un matériau transparent qui est dopé afin d'assurer la conductivité électrique. Ils sont utilisés pour leurs propriétés à la fois conductrices et optiques, comme dans le cas de fenêtres électrochromes, dans les panneaux solaires, les capteurs optiques... Deux types d'OTC ont été utilisés pour observer la réduction d'O₂. Le premier est un fluorure d'étain SnF₂ dopé à l'étain Sn (**FTO**), qui est déposé sur un substrat verre. Le second est l'oxyde d'indium-étain (**ITO**) qui est un alliage d'oxyde d'indium In₂O₃ avec un oxyde d'étain SnO₂, qui est déposé soit sur un substrat verre (**ITO-Glass**), soit sur un polymère

plastique, le polytéréphtalate d'éthylène PET (ITO-PET). Les CVs obtenues pour la réduction directe et catalysée d'O₂ sur ces trois électrodes sont représentées en **Figure 5-21**.

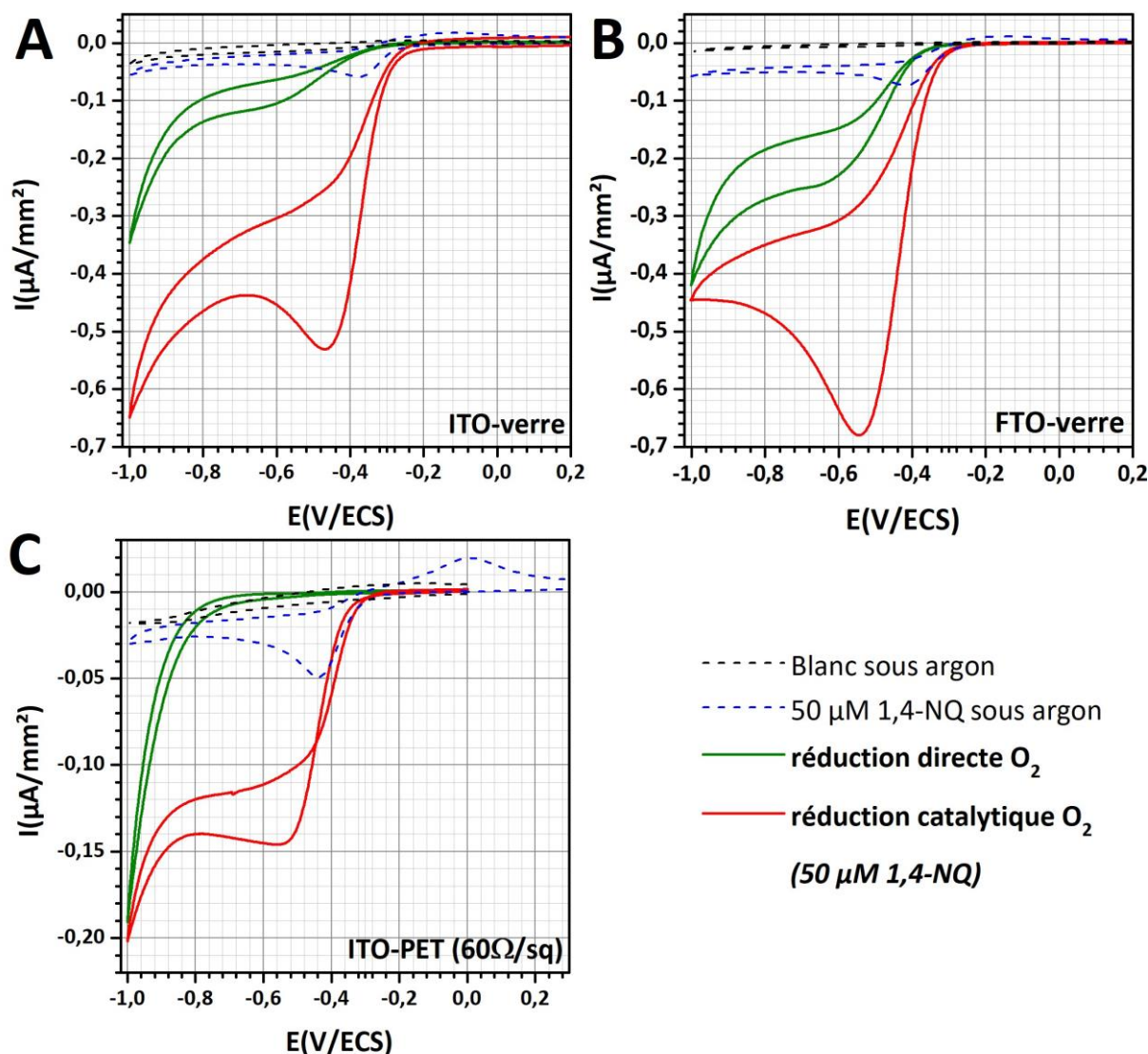


Figure 5-21 : CV obtenues à $0.01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ dans un tampon Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA à pH 8.5 pour : contrôle du blanc sous argon (pointillés noirs), $50 \mu\text{M}$ de 1,4-NQ sous argon (pointillés bleus), la réduction directe d'O₂ dissous (trait plein vert), la réduction catalysée d'O₂ par $50 \mu\text{M}$ de 1,4-NQ (trait plein rouge) sur : **(A)** ITO-verre, **(B)** FTO-verre, **(C)** ITO-PET.

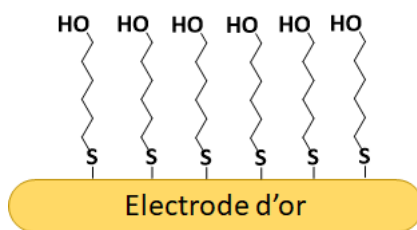
Dans un premier temps, le transfert d'électrons de la 1,4-NQ en absence d'O₂ sur ces trois OTC donne lieu à des vagues de réduction et d'oxydation beaucoup plus écartées, larges, et moins intenses que sur les électrodes carbonées discutées précédemment. Cette lenteur apparente du transfert d'électron s'explique par la nature même de ces matériaux d'électrodes, qui sont des matériaux initialement non-conducteurs dopés pour assurer la conductivité. La disponibilité électronique à la surface de l'électrode est donc moindre en rapport à une électrode de type carbone vitreux, réduisant ainsi la cinétique du transfert électronique hétérogène. Cependant, une catalyse de réduction d'O₂

efficace se produit à la surface de ces OCT, notamment sur les substrats en verre (**A** et **B**). La densité de courant sur ITO-PET (**C**) est, elle, un peu plus faible, mais un plateau catalytique de réduction est tout de même observé. Il est également notable de constater la présence d'un croisement lors de la vague retour de la catalyse de réduction d'O₂ sur l'ITO-PET, qui montre que la catalyse est activée lors de ce scan retour. Le mécanisme derrière ce croisement qui signe sûrement une évolution de l'état de surface de l'électrode n'a dès lors pas été élucidé.

De plus sur ces OCT, la réduction directe d'O₂ est repoussée à des potentiels plus cathodiques et avec des plus faibles densités de courant. Ces électrodes sont donc de bons candidats pour la réaction autocatalytique électrochimique, puisque leur réduction catalytique et directe d'O₂ sont séparées par plusieurs centaines de mV. Particulièrement sur l'électrode en ITO-PET, une séparation de près de 400 mV est observée entre la réduction directe et catalytique. De plus, avec ce matériau d'électrode peu onéreux, il sera possible d'utiliser une électrode neuve entre chaque autocatalyse électrochimique, et ainsi de ne pas se soucier de la présence d'H₂O₂ ou de 1,4-NQ à la surface de l'électrode. Cependant, afin de couvrir plus de candidats de matériau d'électrodes susceptible d'améliorer les performances analytiques de notre réaction autocatalytique électrochimique, une dernière famille d'électrodes, cette-fois ci fonctionnalisée va être présentée.

3.3. Réduction d'O₂ sur des monocouches de thiols fonctionnalisées sur une électrode d'or

La modification de surface d'électrode d'or, par formation de monocouches auto-assemblées (SAM) de thiols est un domaine clé de la modification de surface pour l'électrochimie⁴⁻⁶. Beaucoup de papiers présentent différentes fonctionnalisations avec différents thiols, dans le but d'obtenir des propriétés électroniques et chimiques adaptées à une application. La formation de SAM sur une électrode d'or est assez simple expérimentalement. Une électrode d'or préalablement polie (pour que la surface soit plane et sans défauts) et activée par voltamétrie cyclique dans un acide (afin de réarranger les oxydes d'or en surface), est immergée dans une solution contenant le thiol. Le protocole du polissage et de l'activation électrochimique est détaillé dans la partie expérimentale. La liaison SH du thiol forme alors une liaison S-Au avec l'électrode d'or spontanément par un équilibre chimique, et s'auto-assemble en une monocouche verticale par interaction entre les chaînes carbonées. La cinétique de la formation de la SAM est en général de plusieurs heures. Afin d'assurer la formation de monocouches reproductibles, nous les laissons dans une solution de 5 mM du thiol toute une nuit. Un schéma de la formation d'une SAM à partir de 6-mercapto-1-hexanol est présenté ci-dessous :



La réduction directe et catalytique d'O₂ sur une électrode d'or nue et sur cinq électrodes fonctionnalisées par cinq thiols différents va être étudiée par voltamétrie cyclique. Les différents thiols utilisés sont détaillés dans le **Tableau 5-3**:

Figure 5-22	Nom du thiol	Structure moléculaire
B	6-mercapto-1-hexanol	<chem>HS(CH2)5OH</chem>
C	Hexane-thiol	<chem>HS(CH2)5</chem>
D	Octane-thiol	<chem>HS(CH2)7</chem>
E	Acide carboxylique-thiol	<chem>HS(CH2)5C(=O)OH</chem>
F	Amine-thiol	<chem>HS(CH2)5NH2</chem>

Tableau 5-3 : Structure des thiols utilisés pour la formation de SAMs.

Les CVs obtenues sur ces 6 électrodes (or nu et les 5 SAMs) sont présentés en **Figure 5-22**. Dans ce cas particulier d'électrode fonctionnalisée par des thiols, la fenêtre de potentiel a été réduite par rapport aux autres matériaux d'électrodes présentés précédemment. En effet, un potentiel trop cathodique (< -0.7 V/ECS) peut favoriser la désorption de la monocouche et un potentiel trop anodique (> 0.3 V/ECS) peut oxyder la liaison S-Au, entraînant dans les deux cas la disparition de la monocouche de thiols.

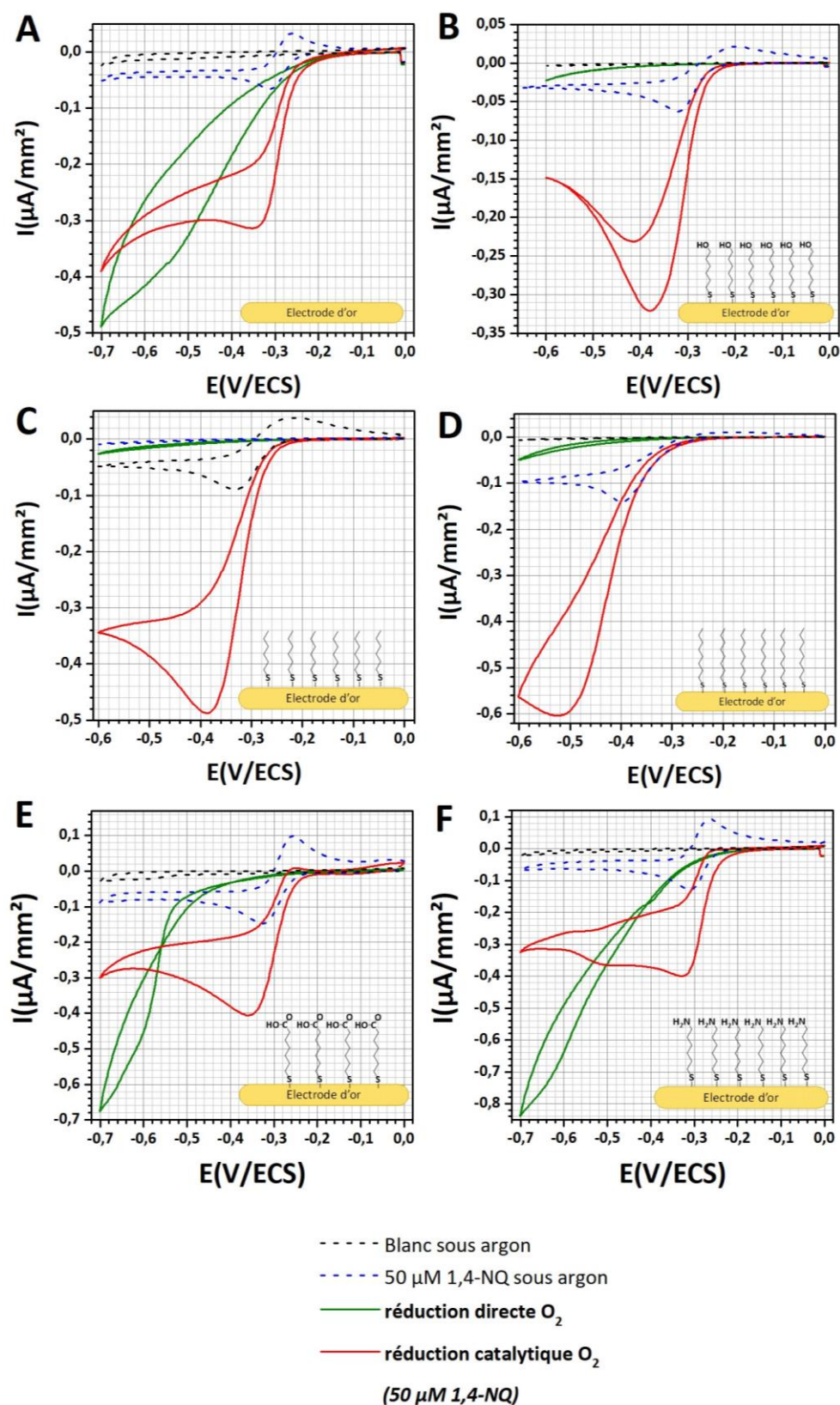


Figure 5-22 : CV obtenues à $0.01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ dans un tampon Tris 0.1 M + $10 \mu\text{M}$ EDTA à pH 8.5 pour : contrôle du blanc sous argon (pointillés noirs), $50 \mu\text{M}$ de 1,4-NQ sous argon (pointillés bleus), la réduction directe d' O_2 dissous (trait plein vert), la réduction catalysée d' O_2 par $50 \mu\text{M}$ de 1,4-NQ (trait plein rouge) sur : **(A)** Or nu, **(B)** SAM 6-mercapto-1-hexanol, **(C)** SAM Hexane-thiol, **(D)** SAM Octane-thiol, **(E)** SAM Acide carboxylique-thiol, **(F)** SAM Amine-thiol.

Sur l'électrode d'or nu non fonctionnalisée, le transfert électronique de la 1,4-NQ (en bleu pointillés) est rapide, mais cependant la catalyse de réduction d'O₂ par cette naphthoquinone est un peu moins efficace que sur carbone vitreux. De plus, la réduction directe d'O₂ est à *contrario* très efficace, rendant la discrimination entre les deux quasi-nulles. Elles démarrent d'ailleurs simultanément à un potentiel de -0.1 V/ECS. L'électrode d'or nu n'est donc pas un bon candidat pour la réaction autocatalytique électrochimique.

Cependant, si on la recouvre d'une monocouche de thiols, une forte séparation de la réduction directe et catalysée apparaît. Cette séparation est principalement due à l'inhibition quasi-totale de la réduction directe d'O₂ (en vert) en présence d'une SAM, notamment dans les cas où le thiol se termine par une fonction hydroxyle ou un méthyl (**Figure 5-22B, C, et D**). Dans le cas où le thiol se termine par une fonction amine ou acide carboxylique (**Figure 5-22E, ou F**), la réduction directe d'O₂ est certes atténuée mais dans de bien moindres proportions. Cependant, dans ce cas-là, la réduction catalysée d'O₂ par la 1,4-NQ est un peu plus efficace que dans le cas d'une fonction hydroxyle. La différence de comportement de la réduction directe d'O₂ à l'électrode semble être corrélée à la charge de la fonction en bout de chaîne thiol. Dans les cas **B, C et D**, le groupe terminal de la monocouche n'est pas chargée (*i.e.*, -CH₃ ou -OH ne se déprotonnent pas), et la monocouche de thiols se forme alors de manière dense et uniforme. La monocouche de thiols recouvre alors la totalité de la surface d'or, empêchant par effet stérique l'oxygène d'y accéder pour échanger son électron et y être réduit. A *contrario*, dans les cas **E et F**, le groupe terminal est chargé négativement (*i.e.*, -COO⁻ et NH⁻). La formation de la monocouche est alors altérée par les interactions électrostatiques répulsives des groupements chargés en bout de la chaîne carbonée. La monocouche est alors moins dense, et l'oxygène peut plus facilement pénétrer la monocouche pour y être réduit.

La 1,4-NQ semble elle capable d'échanger son électron à travers la monocouche, puisque les transferts électroniques hétérogènes restent rapides et réversibles, et que la catalyse de réduction d'O₂ a toujours lieu. Cependant, cette catalyse de réduction présente une forme particulière, surtout visible dans le cas **B**. Après le pic de catalyse, en continuant de balayer vers les potentiels cathodiques lors du scan aller, la densité de courant diminue. Cependant au scan retour, quand les potentiels sont balayés vers les potentiels anodiques (de -0.6 à -0.4 V/ECS), la densité de courant augmente, signifiant que la catalyse de réduction d'O₂ par la 1,4-NQ est activée. Cette réactivation semble indiquer une inhibition de la catalyse à des potentiels trop anodiques sur ces électrodes SAM.

La monocouche cas **B** avec le 6-mercapto-1-hexanol est particulièrement intéressante pour la réaction autocatalytique électrochimique, puisque c'est celle qui présente la réduction catalytique la plus discriminante de la réduction directe d'O₂. De plus, cette monocouche est stable dans le tampon

Tris 0.1 M à pH 8.5 utilisé et sous un potentiel constant de -0.4 V/ECS (que nous comptons appliquer en chronoampérométrie pour l'autocatalyse électrochimique). En effet, aucune évolution du courant capacitif dans le tampon avec ou sans polarisation de l'électrode à -0.4 V/ECS n'est observée sur plus de 4 heures. Le courant capacitif, qui est très faible sur une SAM du fait de la présence de la couche isolante de thiols, est un bon moyen de contrôler sa stabilité.

Trois matériaux d'électrodes permettant une forte discrimination de la réduction directe et catalysée par la 1,4-NQ d'O₂ ont donc été déterminés : le BDD, l'ITO-PET et l'électrode d'or fonctionnalisée par une monocouche de 6-mercapto-1-hexanol. Ces-deux derniers vont être utilisés par la suite en configuration couche mince pour étudier la réaction autocatalytique électrochimique.

4. Etude de l'autocatalyse électrochimique dans un dispositif couche mince sur une électrode d'or fonctionnalisée et sur ITO-PET

4.1. Autocatalyse électrochimique en couche mince sur une monocouche de 6-mercapto-1-hexanol

Dans un premier temps, l'électrode d'or fonctionnalisée par une monocouche de 6-mercapto-1-hexanol a été étudiée avec le dispositif expérimental de couche mince décrit précédemment, les électrodes étant de même structure que l'électrode en carbone vitreux (le corps en téflon est le même, seul le matériau du disque de surface active change). Le dispositif expérimental est alors parfaitement adapté pour étudier la réponse autocatalytique électrochimique sur cette SAM. Deux chronoampérogrammes obtenus avec un potentiel $E_{app} = -0.3$ V/ECS sont représentés en **Figure 5-23**.

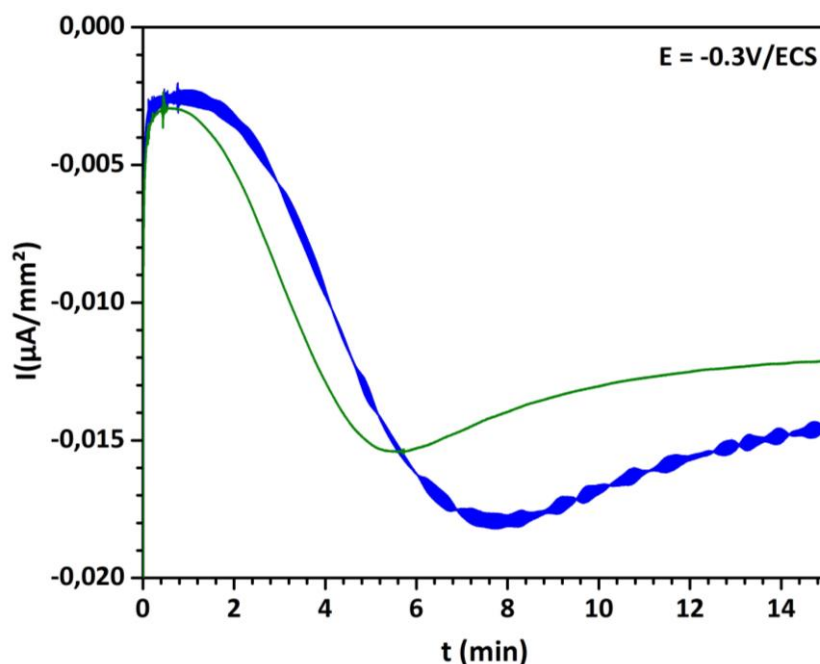


Figure 5-23 : Chronoampérogrammes de l'autocatalyse électrochimique avec 50 μM de 1,4-bis-DBN en l'absence de H_2O_2 à -0.3 V/ECS sur une électrode d'or de 0.034 cm^2 fonctionnalisée par une SAM 6-mercapto-1-hexanol dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA à pH 8.5. L'expérience est répétée 2 fois (en bleu et vert).

La forme des chronoampérogrammes obtenus ressemble à ceux obtenus sur une électrode de carbone vitreux, à la seule différence que la décharge du courant capacitif est beaucoup plus rapide sur les électrodes d'or fonctionnalisées. A noter également que la valeur du courant résiduel de la période de latence est diminuée d'un ordre de grandeur par rapport au carbone vitreux, confirmant ainsi l'inhibition d'ORR sur cette couche. Cependant, les temps d'apparition du pic de la réponse non-spécifique sont similaires à ceux obtenus sur carbone vitreux (6 min sur SAM contre 5 min sur GC) malgré l'apparente beaucoup plus faible réduction directe d' O_2 à l'électrode. Un autre résultat étonnant est que, malgré la bonne reproductibilité de la réduction directe d' O_2 à ce potentiel de -0.3 V sur la SAM, la reproductibilité des temps de réponse n'est pas plus satisfaisante que sur carbone vitreux. Une hypothèse est l'irreproductibilité de la couche de thiols d'une expérience à une autre. En effet, fonctionnaliser une électrode ajoute une incertitude sur la reproductibilité des résultats, et cette stratégie semble alors trop contraignante pour la détection de H_2O_2 par la réaction autocatalytique.

4.2. Autocatalyse électrochimique en couche mince sur une électrode d'ITO-PET

Le deuxième matériau d'électrode envisagé est l'ITO-PET qui présente deux avantages par rapport à la SAM. Le premier est qu'il est peu onéreux, et qu'il est possible de réaliser chaque expérience avec une électrode neuve qui n'a jamais vu de naphthoquinone ou d' H_2O_2 au préalable. Le second avantage est qu'il ne nécessite pas de fonctionnalisation, ce qui, nous espérons, facilitera la reproductibilité de nos résultats. Cependant, cette électrode en plastique souple ne peut pas être utilisée dans le dispositif couche mince présentée précédemment. Dès lors, un nouveau dispositif a été conçu au laboratoire à partir d'une électrode d'ITO-PET d'un diamètre $d = 3 \text{ mm}$ délimité par un adhésif double-face préalablement percé. L'électrode est alors fixée au fond d'un puits, et une baguette de verre plane contrôlée par le micromanipulateur est plaquée contre l'ITO-PET. La couche mince est donc créée entre la baguette et l'électrode : le principe est fondamentalement le même que le dispositif précédent, une surface de verre vient piéger un fin volume de liquide ici au-dessus de l'électrode. Les électrodes de référence et auxiliaire (un fil d'argent recouvert d'AgCl et un fil de platine) sont insérées à côté de la baguette en verre. En effet, ces électrodes ont besoin d'être fines pour pouvoir être insérées entre la baguette et le bord du puits. Afin de stabiliser l'électrode de référence qui doit se comporter comme une électrode de deuxième espèce, 1 M de KCl est ajoutée au tampon Tris 0.1 M afin d'apporter l'ion Cl^- . Cette configuration de couche mince a également l'avantage de permettre de travailler dans de très faibles volumes de solution (200 μL). Le **Figure 5-24** ci-dessous représente le système expérimental :

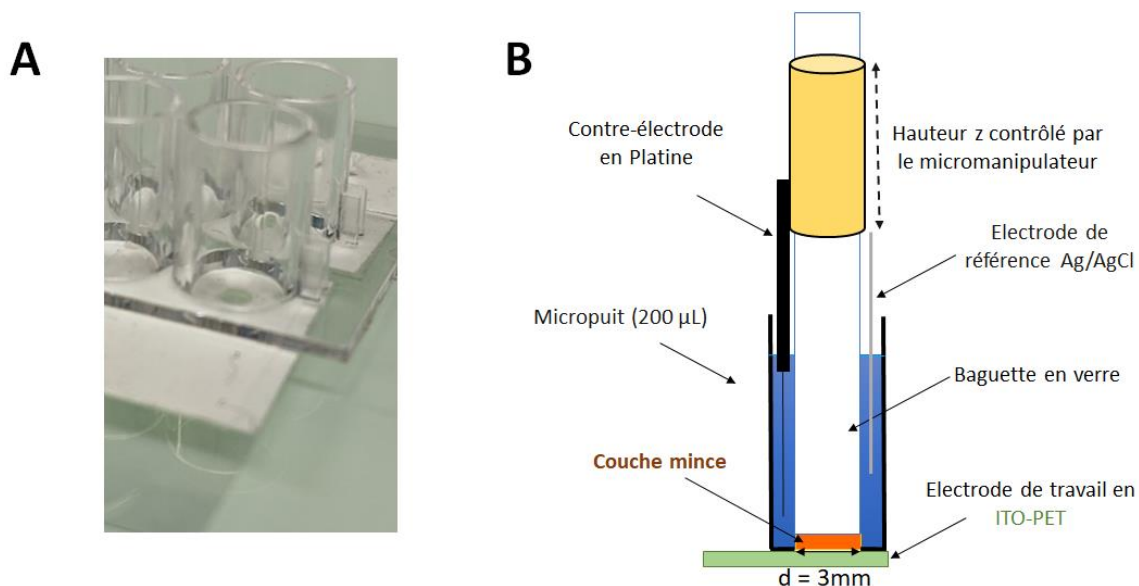


Figure 5-24 : Montage expérimental pour l'autocatalyse électrochimique en couche mince. **(A)** Micropuits servant de cellule électrochimique utilisé ($V = 200 \mu\text{L}$, diamètre = 6 mm). Sous le micropuits qui est creux, est scotché une électrode d'ITO-PET d'un diamètre $d = 3 \text{ mm}$ délimité par du scotch. **(B)** Schéma représentatif de la configuration couche mince de l'électrode de travail en ITO-PET.

La catalyse de réduction d'O₂ par la 1,4-NQ sur une électrode d'ITO-PET a été montrée par voltamétrie cyclique plus lente que sur les autres matériaux d'électrodes. En effet, sur la **Figure 5-21C** en rouge, la moitié du pic de catalyse se situe aux alentours de -0.4 V/ECS, contre -0.3 V/ECS pour l'électrode en carbone vitreux par exemple. De ce fait, lors des chronoampérométries un potentiel de -0.3 V vs. Ag/AgCl est appliqué, afin de se situer aux environs de la moitié de ce pic de catalyse, tout en restant éloigné de la réduction directe d'O₂ (**Figure 5-21C** en vert). Le même protocole que précédemment pour le suivi de la réaction autocatalytique électrochimique est appliqué : 50 μM de sonde 1,4-bis-DBN sont introduits dans la cellule, puis rapidement la baguette de verre est ajustée pour former la couche mince, et la chronoampérométrie démarre. Les réponses obtenues pour la réponse non-spécifique dans cette configuration pour trois électrodes d'ITO-PET différentes sont représentés en **Figure 5-25**.

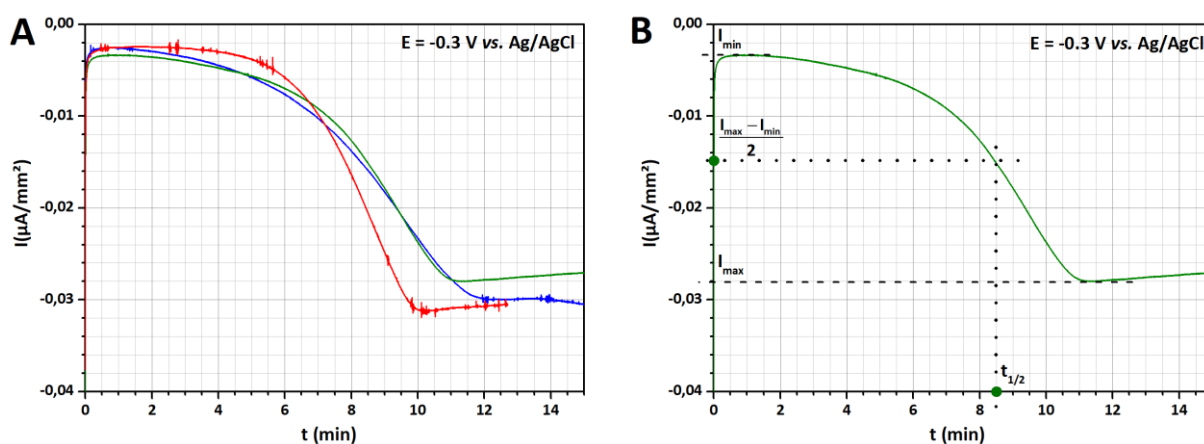


Figure 5-25 : (A) Chronoampérométries de l'autocatalyse électrochimique avec 50 μM de 1,4-bis-DBN en l'absence de H₂O₂ à -0.3 V/Ag/AgCl sur une électrode de 0.0314 cm² dans un tampon Tris 0.1 M + 10 μM EDTA + 1 M KCl à pH 8.5. L'expérience est répétée 3 fois (en rouge, bleu, et vert). (B) Détermination du t_{1/2} à partir d'un chronoampérométrie.

La forme des chronoampérométries obtenus est semblable à ceux obtenus sur carbone vitreux et sur l'électrode d'or fonctionnalisée par une SAM. Seule la décharge du courant capacitif est ici extrêmement rapide (de l'ordre de la seconde), et la densité de courant n'évolue ici quasiment pas après le pic. Ce dernier point suggère qu'avec ce système couche-mince, la diffusion d'O₂ est beaucoup plus importante.

Pour déterminer le temps de réponse de la réaction autocatalytique à partir de ces chronoampérométries, un temps de demi-réaction t_{1/2} est utilisé. Il correspond au temps auquel la moitié de l'intensité totale du chronoampérométrie est atteinte. Il est déterminé à partir de

l'intersection de la droite orthogonale à l'axe des ordonnées à $I_{\min} + \frac{I_{\max} - I_{\min}}{2}$ avec la courbe expérimentale, comme représenté en **Figure 5-25B**. Un temps moyen de réponse non-spécifique de

l'autocatalyse avec l'électrode d'ITO-PET en couche mince de $t_{1/2} = 8.63 \pm 0.29$ minutes est extrait. La variation du temps de réponse est alors de 3%, confirmant la meilleure reproductibilité de ce système. Cette dernière s'explique par la réduction directe d' O_2 qui est semblable d'une électrode à une autre, et par le fait que les électrodes sont neuves et n'ont en principe pas de trace de H_2O_2 ou de 1,4-NQ précédemment. De plus, le temps de réponse non-spécifique sur ITO-PET est bien plus lent que sur carbone vitreux, ce qui découle de la meilleure sélectivité de ce matériau d'électrode envers la réduction directe et catalytique d' O_2 . Fort de cette amélioration de la réaction électrochimique autocatalytique, la même expérience mais avec des concentrations initiales en H_2O_2 a été mesurée. Les chronoampérogrammes ainsi que la courbe de calibration obtenue sont représentés en **Figure 5-26**.

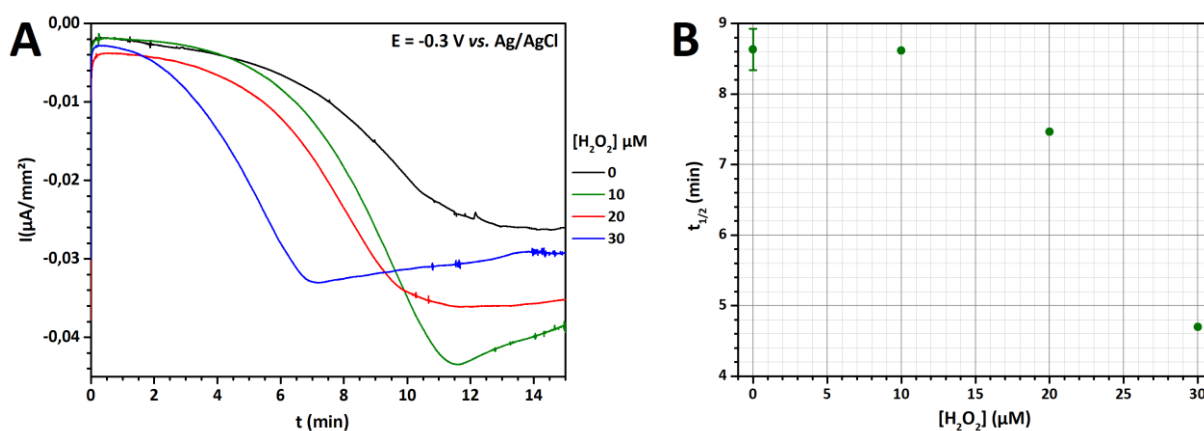


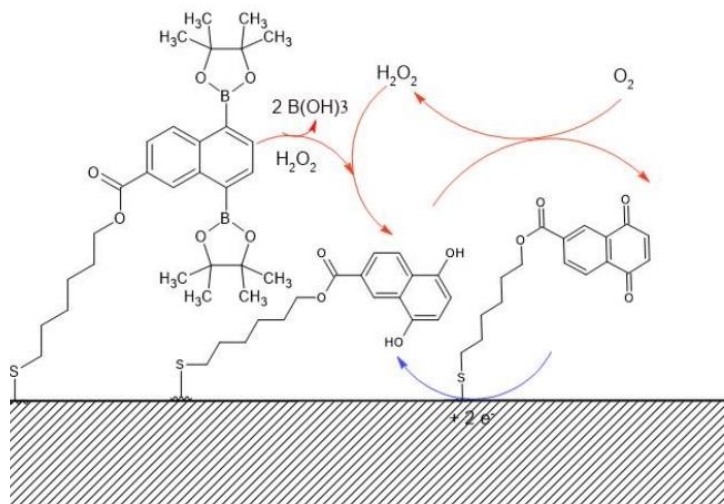
Figure 5-26 : (A) Chronoampérogrammes de l'autocatalyse électrochimique avec 50 µM de 1,4-bis-DBN pour plusieurs concentrations de H_2O_2 à -0.3 V/Ag/AgCl sur une électrode de 0.07 cm² dans un tampon Tris 0.1 M + 10 µM EDTA + 1 M KCl à pH 8.5. $[H_2O_2]$ (µM) : 30 (bleu), 20 (rouge), 10 (vert), 0 (noir). Les temps de pics sont reportés sur l'axe des abscisses. (B) Courbe de calibration des $t_{1/2}$ relevés en A (en minutes) en fonction de la concentration initiale en $[H_2O_2]$ (en µM).

Sur la **Figure 5-26A**, quand une concentration initiale de H_2O_2 est ajoutée, par exemple 30 µM, une sigmoïde apparaît comme pour une réponse du blanc, sous une même forme mais plus tôt dans le temps. Il est donc possible de relever les $t_{1/2}$ (en **Figure 5-26B**), et ceux des concentrations de 20 et 30 µM de H_2O_2 sont discriminables de celui de la réponse non-spécifique obtenue. D'un point de vue analytique, cette courbe de calibration de la réaction autocatalytique électrochimique sur ITO-PET est extrêmement moins performante que celles obtenues avec une réduction du couple enzymatique DI/NADH en homogène, que ce soit par suivi spectrophotométrie UV-Vis ou par suivi électrochimique (chapitre 3 et 4). Cependant, cela nous permet d'établir la preuve de concept de notre réaction autocatalytique électrochimique sélective d'une concentration en déclencheur. Également, cela montre que cette surface d'électrode en ITO-PET est plus sélective de la réduction catalytique que de la réduction directe d' O_2 . Il est donc possible de ralentir la production non-spécifique de H_2O_2 à

l'électrode par un choix adapté de matériau d'électrode, en venant inhiber la cinétique de réduction directe d'O₂ par des couches bloquantes (SAM, matériaux dopées). Néanmoins, ce travail montre bien les limites d'une réduction électrochimique vis-à-vis d'une réduction enzymatique pour notre système : la non-spécificité de la réduction électrochimique est beaucoup plus importante que la production non-spécifique de ROS par oxydation du NADH où par l'activité oxydase de l'enzyme. Cela montre également le pouvoir amplificateur exponentiel de l'autocatalyse, puisque la réduction directe d'O₂ qui semble nulle en voltamétrie cyclique (**Figure 5-21**, **Figure 5-22**) est suffisante pour déclencher très rapidement la réaction.

De plus, la forme des chronoampérogrammes obtenus quel que soit le matériau d'électrode dans des configurations couches minces en **Figure 5-18**, **Figure 5-23** et **Figure 5-26**, montre que ce type de configuration de cellule électrochimique n'est pas optimale pour une bonne reproductibilité de la réaction autocatalytique électrochimique, notamment due à la diffusion radiale d'O₂. Pour une reproductibilité excellente, le flux des réactifs d'une réaction autocatalytique doit être exactement le même, afin que la cinétique ne soit impactée seulement par une concentration d'H₂O₂ initiale. Cette variation minimale de la diffusion d'O₂ sur les bords de la couche mince impacte significativement l'allure des chronoampérogrammes. Appliquer une réactivité si sensible à un système expérimental si artisanal est donc trop complexe pour espérer de bonnes performances analytiques.

Face à ces problématiques, une stratégie de greffage de la sonde sur une surface d'électrode en or fonctionnalisée SAM semble adaptée pour d'une part bloquer la réduction directe d'O₂ et discriminer ainsi la réduction catalytique, et d'autre part venir confiner le système pour s'affranchir des perturbations hydrodynamiques et concentrer le catalyseur à la surface. Le couplage de la réaction homogène avec la réaction hétérogène serait dès lors favorisé. Le schéma ci-dessous représente le principe de la réaction autocatalytique avec un greffage de la sonde 1,4-bis-DBN sur laquelle un acide carboxylique est ajouté afin de la greffer au groupe hydroxyle du 6-mercapto-1-hexanol :



5. Références Bibliographiques

- (1) Hui, P. Autocatalytic Molecular Amplification Strategies Based on Unmasking of Redoxactive Molecular Probes. These de doctorat, Université Paris Cité, 2021. <https://www.theses.fr/2021UNIP7285> (accessed 2023-06-23).
- (2) Mason, J.; Batchelor-McAuley, C.; G. Compton, R. Surface Modification Imparts Selectivity, Facilitating Redox Catalytic Studies: Quinone Mediated Oxygen Reduction. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15* (21), 8362–8366. <https://doi.org/10.1039/C3CP50607J>.
- (3) Yano, T.; Tryk, D. A.; Hashimoto, K.; Fujishima, A. Electrochemical Behavior of Highly Conductive Boron-Doped Diamond Electrodes for Oxygen Reduction in Alkaline Solution. *J. Electrochem. Soc.* **1998**, *145* (6), 1870. <https://doi.org/10.1149/1.1838569>.
- (4) Schreiber, F. Structure and Growth of Self-Assembling Monolayers. *Progress in Surface Science* **2000**, *65* (5), 151–257. [https://doi.org/10.1016/S0079-6816\(00\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6816(00)00024-1).
- (5) Eckermann, A. L.; Feld, D. J.; Shaw, J. A.; Meade, T. J. Electrochemistry of Redox-Active Self-Assembled Monolayers. *Coordination Chemistry Reviews* **2010**, *254* (15), 1769–1802. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.023>.
- (6) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (4), 1103–1170. <https://doi.org/10.1021/cr0300789>.

Chapitre 6 : ANALYSE DU MECANISME PCET DE LA 1,4-NAPHTHOQUINONE PAR LA METHODE DE LAVIRON ET APPLICATION A LA CATALYSE DE REDUCTION DE L'OXYGENE MOLECULAIRE

1. Description du schéma carré à 9 membres du mécanisme PCET de la 1,4-naphthoquinone

Afin de mieux appréhender la catalyse de réduction de l'oxygène moléculaire par la 1,4-naphthoquinone, nous nous sommes intéressés dans un premier temps au mécanisme de transferts d'électrons couplés aux protons (PCET). Ce type de réactivité a été largement étudié dans la littérature¹⁻³ en raison de l'enjeu important des quinones dans de nombreux domaines (processus biologiques, stress oxydatif, cosmétiques, synthèse). Le mécanisme PCET des quinones peut être décrit selon le schéma carré à 9 membres de la **Figure 6-1** (représenté ici dans le cas de la 1,4-naphthoquinone) dans lequel les réactions horizontales correspondent aux échanges d'électrons et les réactions verticales aux échanges de protons. A gauche se trouve les espèces les plus oxydées et en haut les espèces les moins protonées. Les potentiels standards ainsi que les constantes d'acidités propres à chacune des réactions sont également indiqués.

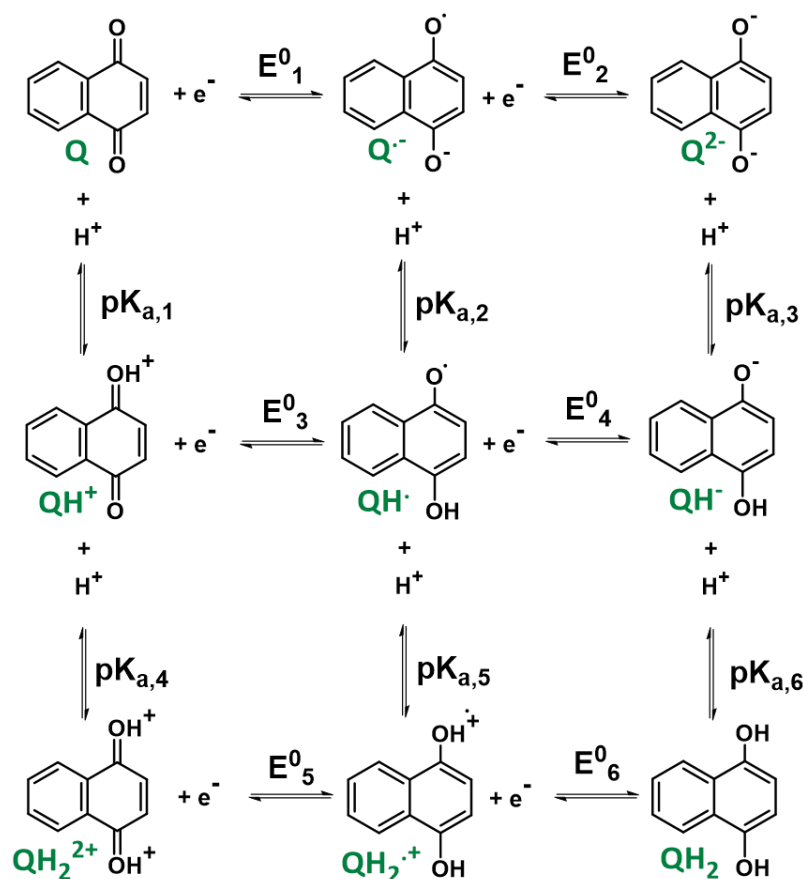


Figure 6-1 : Schéma carré à 9 membres de la 1,4-naphthoquinone.

A travers ce schéma carré, les chemins réactionnels dépendent très fortement des valeurs des pK_a mais aussi des potentiels formels des réactions, ainsi que du pH de la solution. Dans son papier de

1983, Laviron a démontré qu'il était possible de ramener ce mécanisme à une réaction impliquant deux échanges d'électrons consécutifs (voir **Figure 6-2**) si l'on considère les approximations suivantes :

- les réactions de protonation sont à l'équilibre,
- le coefficient de transfert α de chaque réaction est égal à 0.5,
- les réactions de disproportionation et dimérisation n'interviennent pas.

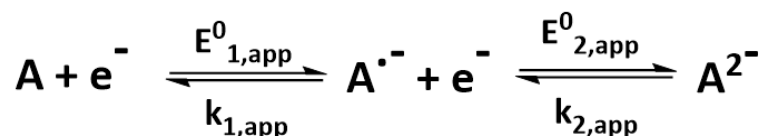


Figure 6-2 : Version simplifiée du schéma carré à 9 membres dans laquelle $E_{1,app}^0$, $E_{2,app}^0$, $k_{1,app}$ et $k_{2,app}$ sont, respectivement, les potentiels standards apparents et constantes cinétiques apparentes de chacune des réactions de transfert d'électron.

Les potentiels standards apparents de ces deux réactions de transfert d'électron peuvent être obtenus à partir des expressions suivantes :

$$E_{1,app}^0 = E_3^0 + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\frac{K_{a,2}}{[H^+]} + 1 + \frac{[H^+]}{K_{a,5}}}{\frac{K_{a,1}}{[H^+]} + 1 + \frac{[H^+]}{K_{a,4}}} \right) \quad (1)$$

$$E_{2,app}^0 = E_4^0 + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\frac{K_{a,3}}{[H^+]} + 1 + \frac{[H^+]}{K_{a,6}}}{\frac{K_{a,2}}{[H^+]} + 1 + \frac{[H^+]}{K_{a,5}}} \right) \quad (2)$$

Tandis que le potentiel standard apparent moyen correspond à la moyenne des deux potentiels standards apparents :

$$E_{app}^0 = \frac{E_{1,app}^0 + E_{2,app}^0}{2} \quad (3)$$

2. Détermination des constantes thermodynamiques du mécanisme PCET de la 1,4-naphthoquinone par une analyse en voltamétrie cyclique

Afin d'élucider les paramètres caractérisant le mécanisme PCET de la 1,4-naphthoquinone, une série de voltamogrammes cycliques (CV) à 1 mM en 1,4-NQ ont été enregistrés dans différents

tampons (0.1 M) et à différents pH (allant de pH = 9.5 à H₀ = -4.9). Les solutions très acides (pH < 0) que nous avons utilisé sont des acides forts concentrés tels que l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique. La **Figure 6-3** regroupe un panel des CV enregistrés.

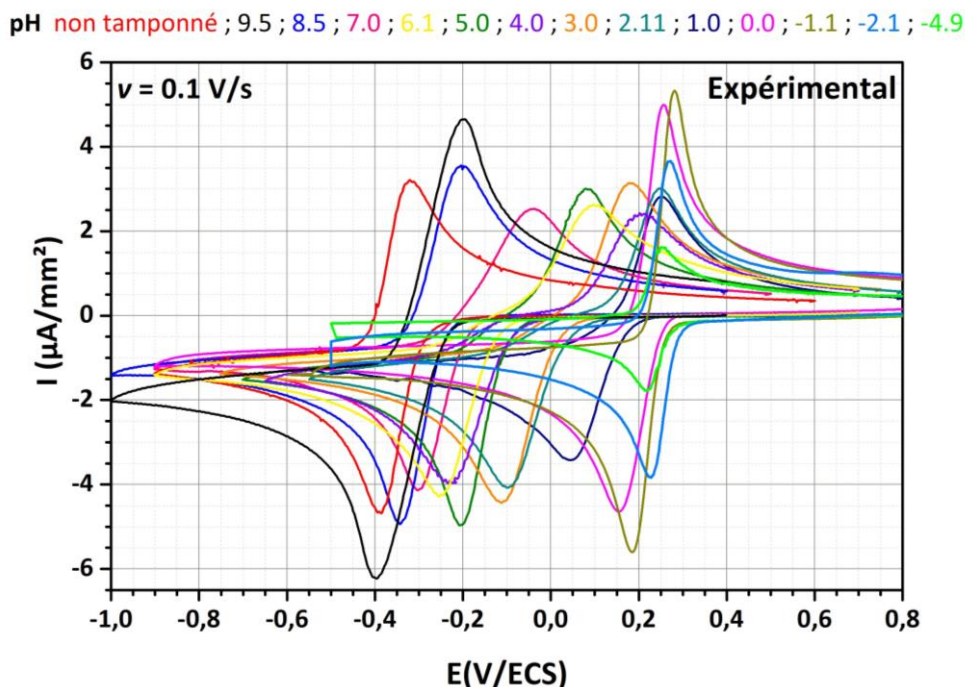


Figure 6-3 : Voltamétries cycliques (0.1 V.s^{-1}) de 1 mM de 1,4-naphthoquinone sur une électrode de carbone vitreux ($\phi = 3 \text{ mm}$). pH (couleur) : non tamponné (rouge), 9.5 (noir), 8.5 (bleu), 7.0 (rose), 6.1 (jaune), 5.0 (vert foncé), 4.0 (violet), 3.0 (orange), 2.11 (bleu-vert), 1.0 (violet), 0 (rose), -1.1 (marron), -2.1 (bleu clair), -4.9 (vert clair).

Les voltamogrammes montrent une vague faradique réversible à 2 électrons centrée sur un potentiel standard apparent moyen, E^0_{app} (moyenne du pic cathodique et du pic anodique), qui varie d'environ -59 mV par unité de pH sur la gamme de pH allant de 9.5 à -1.1, en accord donc avec un échange de 2 électrons et 2 protons. De façon inattendue, pour des pH < -1.1 la valeur de E^0_{app} , tend à devenir indépendante de l'augmentation de l'acidité du milieu, ce qui suggère qu'en milieu très acide le mécanisme PCET n'est plus valable pour des raisons que nous n'avons pour le moment pas pu élucider. Pour ce qui concerne les pH basiques, il n'a pas été possible d'aller au-delà de pH 9.5 en raison de l'instabilité de la 1,4-naphthoquinone à ces pH.

Le CV de la 1,4-NQ a également été enregistré dans un milieu non-tamponné, contenant juste du KCl comme électrolyte support. Dans ses conditions, une vague réversible à 2 électrons est toujours observée avec un potentiel de pic de réduction aux alentours de -0.4 V/ECS. Ce comportement suggère une stabilisation de la forme semiquinone anionique par liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau, ce qui a pour effet que le potentiel standard du premier transfert d'électron est plus négatif que le potentiel standard du deuxième transfert d'électron. En effet, en l'absence d'un donneur de protons

(l'eau ne pouvant pas donner son proton du fait de son pK_a de 14 beaucoup trop basique), la réaction de réduction ne peut se faire que *via* le chemin réactionnel du haut dans le schéma carré, c'est-à-dire $Q + e^- \rightleftharpoons Q^{\bullet-}$ puis $Q^{\bullet-} + e^- \rightleftharpoons Q^{2-}$. C'est aussi ce que nous avons à pH 9.5, en milieu tamponné, et c'est ce qui explique que la vague réversible enregistrée dans KCl se positionne à un potentiel proche de celui obtenu à pH 9.5 en milieu tamponné.

A partir des potentiels de pics anodiques et cathodiques, ainsi que la moyenne, extraits de chacun des voltammogrammes en fonction du pH nous avons pu établir le diagramme de Pourbaix de la **Figure 6-4**, auquel nous avons ensuite cherché à ajuster les équations théoriques 1 à 3 de manière à en déduire le jeu des paramètres thermodynamiques qui permet de rendre compte de la réactivité PCET de la 1,4-NQ. Pour cela nous nous sommes également appuyés sur les données de la littérature⁴⁻⁶ fournissant certaines des valeurs de pK_a et de E^0 de la 1,4-NQ.

Nous avons ainsi pu établir un premier jeu de courbes théoriques, telles que reportées sur la **Figure 6-4** (courbes rouge, verte et bleu), à partir des considérations suivantes :

- Pour la première et seconde constante d'acidité de la forme totalement réduite de la 1,4-NQ (*i.e.* QH_2), nous avons utilisé les valeurs suivantes extraites de la littérature⁴:

$$pK_{a,3} = 11.2 \text{ et } pK_{a,6} = 9.3$$

- Le pK_a de première protonation de la 1,4-NQ ($Q + H^+ \rightleftharpoons QH^+$) est également une donnée issue de la littérature⁵ avec une valeur de $pK_{a,1} = -7.2$. Cela implique que le pK_a de deuxième protonation est forcément encore plus acide (probablement > -15) et c'est la raison pour laquelle nous avons considéré que la contribution de l'espèce QH_2^{2+} pouvait être négligée (ce qui revient à prendre en compte un schéma carré à 8 membres).
- Le pK_a de première protonation de la semiquinone ($Q^{\bullet-} + H^+ \rightleftharpoons QH^{\bullet}$) est reportée dans un papier de 1972 (détermination par radiolyse pulsée)⁶ comme étant de $pK_{a,2} = 4.1$, ce qui suppose que le pK_a de seconde protonation de la semiquinone ($QH^{\bullet} + H^+ \rightleftharpoons QH_2^{\bullet+}$) est plus acide (nous avons considéré en première approximation une valeur de $pK_{a,5} = -1$). Nous verrons en réalité que la valeur de $pK_{a,2}$ n'est pas compatible avec nos données expérimentales et qu'il est nécessaire de considérer une valeur beaucoup moins acide de 8.0, ce qui nous a alors permis d'estimer la valeur de $pK_{a,5}$.

Avec ces valeurs de pK_a et la connaissance du potentiel standard $E^0_1 = -0.384$ V/ECS de la 1,4-NQ ainsi que de la constante d'équilibre de dismutation de la forme semiquinone, *i.e.* $K_1 = 0.54$ ⁷⁻¹⁰ (constante d'équilibre qui permet de déterminer la valeur de $E^0_2 = -0,369$ V/ECS à partir de la relation

$\Delta E = E_1^0 - E_2^0 = \frac{RT}{F} \ln(K_1)$, nous avons pu tracer les courbes théoriques de $E_{1,app}^0$, $E_{2,app}^0$ et E_{app}^0 en

fonction du pH de la **Figure 6-4** avec l'aide des équations théoriques 1 à 3 ainsi que des relations thermodynamiques suivantes (les paramètres thermodynamiques employés sont rassemblés dans le

Tableau 6-1) :

$$E_3^0 - E_1^0 = \left(\frac{2.3 \times RT}{F}\right)(pK_{a,2} - pK_{a,1})$$

$$E_4^0 - E_2^0 = \left(\frac{2.3 \times RT}{F}\right)(pK_{a,3} - pK_{a,2})$$

$$E_5^0 - E_3^0 = \left(\frac{2.3 \times RT}{F}\right)(pK_{a,5} - pK_{a,4})$$

$$E_6^0 - E_4^0 = \left(\frac{2.3 \times RT}{F}\right)(pK_{a,6} - pK_{a,5})$$

E ⁰ (V/ECS)		pK _a	
E ₁ ⁰	-0.384	pK _{a,1}	-7.2
E ₂ ⁰	-0.369	pK _{a,2}	4.1
E ₃ ⁰	0.273	pK _{a,3}	11.2
E ₄ ⁰	0.045	pK _{a,4}	-15
E ₅ ⁰	1.088	pK _{a,5}	-1
E ₆ ⁰	0.644	pK _{a,6}	9.3

Tableau 6-1 : Valeur des potentiels standards et des constantes d'acidités du schéma carré à 9 membres de la 1,4-naphthoquinone pour le tracé du diagramme de Pourbaix d'après Laviron. En vert les valeurs extraites de la littérature, en rouge les valeurs calculées à partir des équations de Laviron, et en noir les valeurs ajustées.

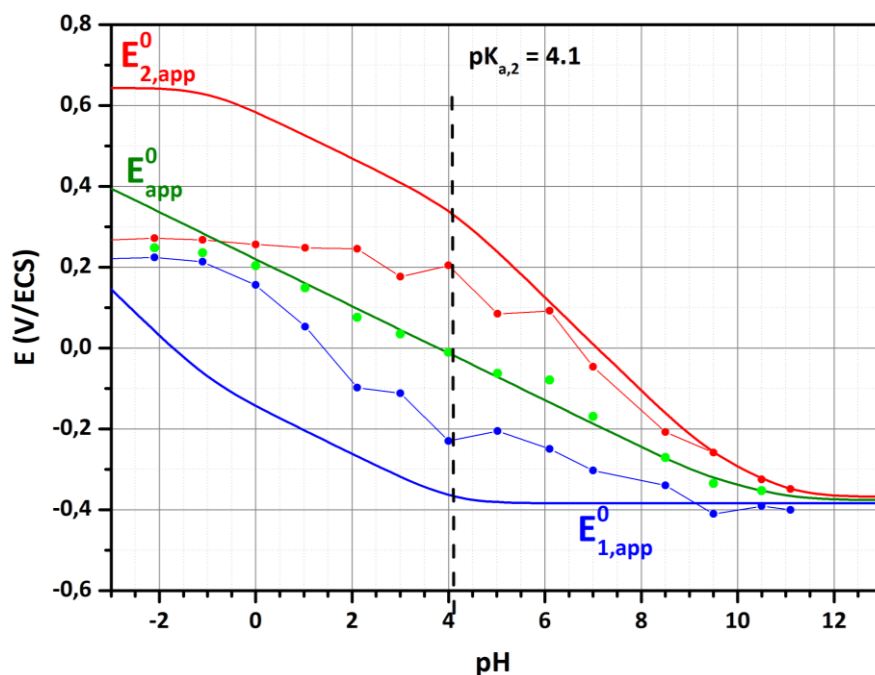


Figure 6-4 : Diagramme de Pourbaix de la 1,4-naphthoquinone expérimental et d'après le modèle de Laviron tracé à partir des valeurs du **Tableau 6-1**. En trait plein : $E_{1,app}^0$ à partir de l'équation (1) (bleu), $E_{2,app}^0$ à partir de l'équation (2) (rouge), E_{app}^0 à partir de l'équation (3) (vert). En points les potentiels de pics relevés sur la **Figure 6-3** : cathodique (bleu), anodique (rouge), potentiel moyen (vert).

Avec ce jeu de constantes thermodynamiques, on arrive bien à rendre compte du E_{app}^0 expérimental en fonction du pH, mais en revanche pas de l'écart relativement faible que l'on observe en voltamétrie cyclique entre le pic anodique et cathodique (c'est d'autant plus vrai que cet écart n'est probablement pas que d'origine thermodynamique puisque les cinétiques de transferts d'électron peuvent elles aussi contribuer à cet écart). Nous avons émis l'hypothèse que la valeur de $pK_{a,2}$ pouvait ne pas être la bonne. Un article de 1952¹¹, reposant sur des études polarographiques, montre en effet que le $pK_{a,2}$ des seminaphthoquinones et semianthraquinones se situerait autour de 8, ce qui est beaucoup moins acide que les pK_a déterminés par radiolyse pulsée dans les années 70 (pK_a autour de 4-5). Nous avons donc retracé le diagramme de Pourbaix avec cette nouvelle valeur de $pK_{a,2} = 8.0$, et ainsi obtenu le graphe de la **Figure 6-5** qui montre une meilleure concordance avec les données expérimentales. Afin de rendre compte de la diminution de l'écart des pics que l'on observe lorsque le pH devient très acide, nous avons ajusté la deuxième constante de protonation de la semiquinone, ce qui nous a conduit à définir une valeur de $pK_{a,5} = 1.6$.

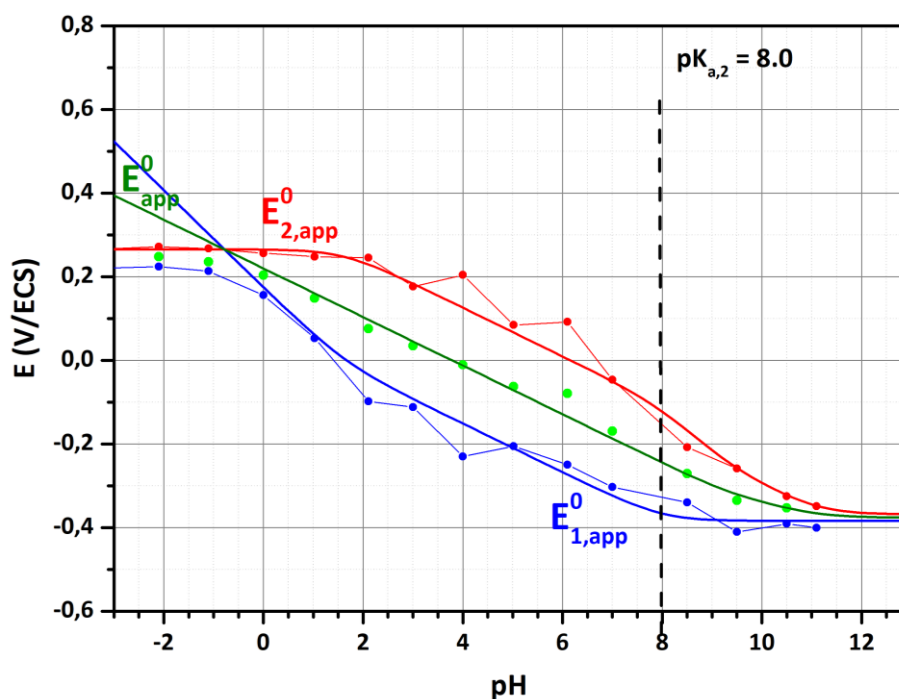


Figure 6-5 : Diagramme de Pourbaix de la 1,4-naphthoquinone expérimental et d'après le modèle de Laviron tracé à partir des valeurs du **Tableau 6-2**. En trait plein : $E^0_{1,app}$ à partir de l'équation (1) (bleu), $E^0_{2,app}$ à partir de l'équation (2) (rouge), E^0_{app} à partir de l'équation (3) (vert). En points les potentiels de pics relevés sur la **Figure 6-3** : cathodique (bleu), anodique (rouge), potentiel moyen (vert).

E^0 (V/ECS)		pK_a	
E^0_1	-0.384	$pK_{a,1}$	-7.2
E^0_2	-0.369	$pK_{a,2}$	8.0
E^0_3	0.500	$pK_{a,3}$	11.2
E^0_4	-0.182	$pK_{a,4}$	-15
E^0_5	1.466	$pK_{a,5}$	1.6
E^0_6	0.266	$pK_{a,6}$	9.3

Tableau 6-2 : Valeur des potentiels standards et des constantes d'acidités du schéma carré à 9 membres de la 1,4-naphthoquinone pour le tracé du diagramme de Pourbaix d'après Laviron. En vert les valeurs extraites de la littérature, en orange les nouvelles valeurs calculées à partir des équations de Laviron, et en noir les valeurs ajustées.

Indépendamment de la thermodynamique, il convient comme indiqué plus haut de considérer la cinétique de transfert d'électron si l'on veut pouvoir intégralement interpréter la réactivité électrochimique de la 1,4-NQ. Pour cela, il est nécessaire d'enregistrer des voltammogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage et à différents pH. C'est un travail qui a été entamé mais qui n'a pas

pu être terminé faute de temps. Nous avons néanmoins pu mettre en évidence que les constantes cinétiques de transfert d'électron pour une électrode de carbone vitreux dépendent du pH, ce qui rend leur détermination relativement délicate. Cette dépendance avec le pH pourrait être liée à la nature de l'électrode de carbone dont l'état de charge en surface est connu pour varier avec le pH¹². En effet, en fonction du caractère chargé positivement ou chargé négativement des différentes espèces redox de la 1,4-NQ on peut comprendre que les constantes cinétiques de transfert d'électron hétérogènes peuvent varier avec l'état de charge de la surface de l'électrode de carbone, et donc avec le pH.

3. Comportement de la 1,4-naphthoquinone dans des milieux faiblement tamponnés

Pour tenter d'aller un peu plus loin dans la compréhension de la réactivité PCET de la 1,4-NQ, nous avons examiné par voltamétrie cyclique le comportement de la 1,4-NQ dans des milieux faiblement tamponnés, c'est-à-dire en présence de concentrations en tampon du même ordre de grandeur que la concentration en 1,4-NQ (soit autour du mM). Dans ces conditions, les CV présentent un comportement très différent de celui obtenu en milieu tamponné, montrant deux vagues réversibles bien distinctes dont les intensités relatives varient avec la concentration en tampon (**Figure 6-6**).

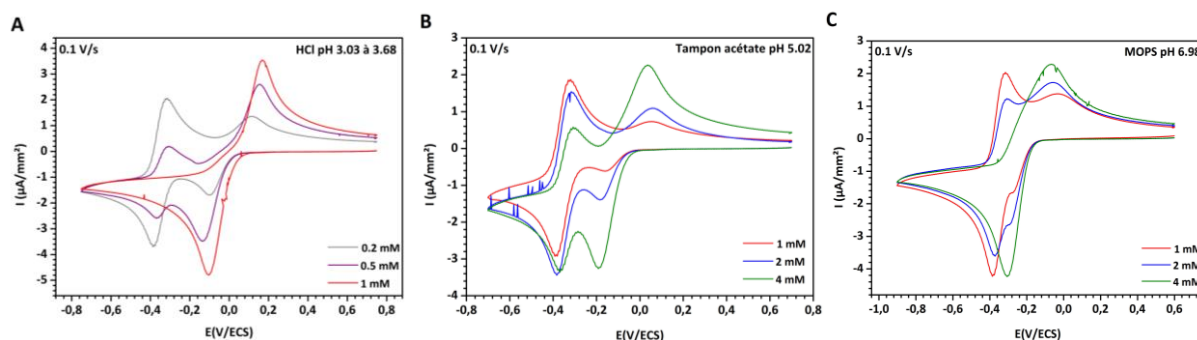


Figure 6-6 : Voltammogrammes cycliques ($0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) de la 1,4-NQ à 1 mM dans une solution contenant : (A) 0.2 (gris), 0.5 (violet) et 1 mM (rouge) d'HCl ; (B) 1 (rouge), 2 (bleu) et 4 mM (vert) de tampon acétate pH 5.02 ; et (C) 1 (rouge), 2 (bleu) et 4 mM (vert) de tampon MOPS à pH 6.98.

La présence de ces deux vagues est la conséquence du changement de chemin réactionnel au cours du balayage cyclique en raison de la concentration locale en donneur de protons qui varie et devient même insuffisante pour répondre aux besoins en protons de la 1,4-NQ. La première vague réversible que l'on observe lors de la réduction de la 1,4-NQ correspond donc à la réduction à 2 électrons et 2 protons de la quinone conformément aux chemins réactionnels du schéma carré conduisant de Q à QH₂ et passant par les intermédiaires Q[•] ou QH[•], le tout étant dicté par la thermodynamique du système ainsi que le pH local au cours du balayage. Cependant, cette réduction consomme assez rapidement la quantité locale disponible du ou des donneurs de protons, ce qui a

pour effet de conduire à un moment donné à un basculement vers le chemin réactionnel sans protons, c'est-à-dire $Q + e^- \rightleftharpoons Q^{\bullet -}$ et $Q^{\bullet -} + e^- \rightleftharpoons Q^{2-}$ (haut du schéma carré), et donc à l'apparition de la seconde vague de réduction réversible à 2 électrons à un potentiel plus cathodique, indépendante du pH. Ainsi, le potentiel formel de réduction de cette deuxième vague (environ -0.4 V/ECS) est assez proche du potentiel standard E^0_{app} de la 1,4-NQ en milieu basique tamponné (courbe noire de la **Figure 6-3**), et aussi similaire à celui obtenu en l'absence de tampon (courbe rouge de la **Figure 6-3**). L'intérêt de ces voltamogrammes enregistrés à faibles concentrations en tampon est que leur allure nous renseigne sur la thermodynamique et la cinétique du schéma carré, ce qui suggère que si l'on arrive à connaître l'ensemble des paramètres thermodynamiques et cinétiques qui le gouverne, il doit être possible de rendre compte quantitativement, par simulation numérique, de l'allure de l'ensemble des voltamogrammes obtenus. Faute de temps, il n'a malheureusement pas été possible de faire ce travail mais c'est une piste qui mériterait d'être approfondie.

4. Application du mécanisme PCET de la 1,4-naphthoquinone à la réduction catalytique médiée de l'oxygène moléculaire

Si l'on veut mieux comprendre la réactivité de catalyse médiée de la réduction d' O_2 par la 1,4-naphthohydroquinone à une électrode (dont le schéma de principe global est rappelé **Figure 6-7**), il est nécessaire de combiner la réactivité PCET de la 1,4-NQ telle que nous venons de le voir avec celle de l'oxygène dissous.

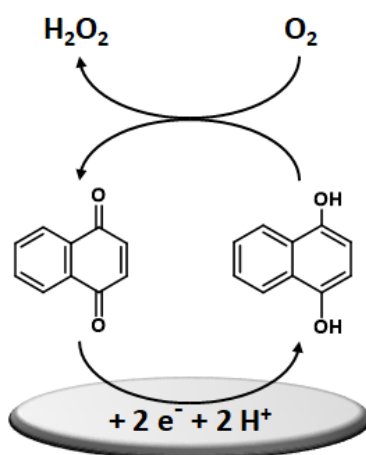


Figure 6-7 : Schéma simplifié de la catalyse de réduction d' O_2 par la 1,4-NQ.

Le mécanisme de réduction de l'oxygène moléculaire en peroxyde d'hydrogène a été très étudié en raison de son importance dans de nombreux domaines. Tout comme pour la réduction des quinones, il s'agit d'un mécanisme protons-électrons couplés qui peut être décrit selon un schéma

carré (**Figure 6-8**) et dont les paramètres thermodynamiques peuvent être facilement extraits de la littérature¹³⁻¹⁵. Ceux-ci sont listés dans le **Tableau 6-3**.

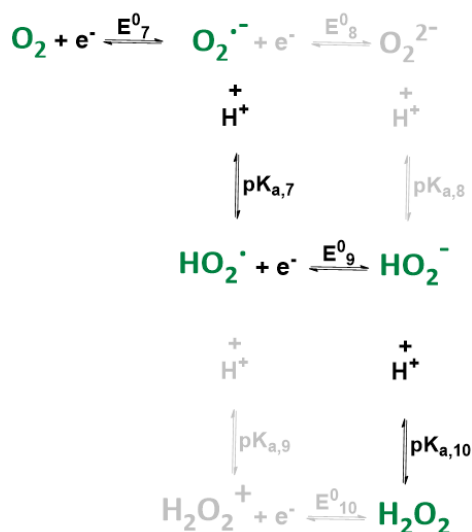


Figure 6-8 : Schéma carré PCET de la réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène

E ⁰ (V/ECS)		pK _a	
E ⁰ ₇	-0.424	pK _{a,7}	4.88
E ⁰ ₉	0.528	pK _{a,10}	11.62

Tableau 6-3 : Valeurs des constantes des constantes d'acidités et des potentiels standards associés à la réduction selon le mécanisme PCET d'O₂ en H₂O₂.

Si l'on veut pouvoir prédire l'allure du voltamogramme cyclique du Chapitre 5 (**Figure 5-3**), montrant la réponse de réduction médiée d'O₂ en H₂O₂ *via* la 1,4-NQH₂ générée à une électrode, il est nécessaire de résoudre numériquement (avec l'aide d'un logiciel tel que DigiElch ou Comsol Multiphysics) l'ensemble des équations de transport-réaction associées au couplage entre le schéma carré de la réduction électrochimique réversible de la 1,4-NQ avec celui de la réduction médiée et irréversible de l'oxygène moléculaire dissous en H₂O₂ *via* la 1,4-NQH₂. Si l'on veut également prédire la réponse électrochimique quel que soit le pH, il est également nécessaire d'y incorporer tous les équilibres acides-bases. Le **Tableau 6-4** regroupe donc l'ensemble des réactions à prendre en compte.

Tableau 6-4 : Résumé des différentes réactions à prendre en compte dans le modèle numérique permettant de simuler le voltammogrammes cycliques de la réduction électrochimique d'O₂ médiée par la 1,4-NQ.

Famille de réaction	Type de réaction	Réaction
Tampon	Réactions acido-basiques du tampon	$A^- + H^+ \rightleftharpoons AH$ $OH^- + H^+ \rightleftharpoons H_2O$
Réactivité des espèces types quinones	Réactions acido-basiques des espèces types quinone avec le tampon	$QH^- + AH \rightleftharpoons QH_2 + A^-$ $QH^- + OH^- \rightleftharpoons Q^{2-} + H_2O$ $Q^{2-} + AH \rightleftharpoons QH^- + A^-$ $QH_2 + OH^- \rightleftharpoons QH^- + H_2O$ $QH + A^- \rightleftharpoons Q^- + AH$ $QH + OH^- \rightleftharpoons Q^- + H_2O$ $QH^+ + A^- \rightleftharpoons Q + AH$ $QH^+ + OH^- \rightleftharpoons Q + H_2O$
	Réactions acido-basiques entre les espèces types quinones	$QH + QH^- \rightleftharpoons Q^- + QH_2$ $QH^+ + QH^- \rightleftharpoons Q + QH_2$ $QH^+ + Q^{2-} \rightleftharpoons Q + QH^-$ $QH_2^+ + Q^{2-} \rightleftharpoons QH + QH^-$
	Réactions de dismutation-comproportionation des espèces types quinones	$2Q^- \rightleftharpoons Q + Q^{2-}$ $Q^- + QH \rightleftharpoons Q + QH^-$ $2QH \rightleftharpoons QH^+ + QH^-$ $Q^- + QH_2^+ \rightleftharpoons Q + QH_2$ $QH + QH_2^+ \rightleftharpoons QH^+ + QH_2$
	Réactions redox de self-exchange des espèces types quinones	$Q + Q^- \rightleftharpoons Q^- + Q$ $Q^- + Q^{2-} \rightleftharpoons Q^{2-} + Q^-$ $QH^+ + QH \rightleftharpoons QH + QH^+$ $QH + QH^- \rightleftharpoons QH^- + QH$ $QH_2^+ + QH_2 \rightleftharpoons QH_2 + QH_2^+$
	Réactions redox de cross-exchange des espèces types quinones	$QH + Q \rightleftharpoons QH^+ + Q^-$ $Q^- + QH^- \rightleftharpoons QH + Q^{2-}$ $QH + QH_2 \rightleftharpoons QH^- + QH_2^+$ $Q^- + QH_2 \rightleftharpoons QH_2^+ + Q^{2-}$

Réactivité des espèces types oxygènes	Réactions des espèces types oxygènes avec le tampon	$\text{HO}_2^- + \text{AH} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_2 + \text{A}^-$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{HO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$ $\text{O}_2^- + \text{AH} \rightleftharpoons \text{HO}_2 + \text{A}^-$ $\text{HO}_2 + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}$
	Réactions de dismutation-comproportionation des espèces types oxygènes	$\text{O}_2^- + \text{HO}_2 \rightleftharpoons \text{O}_2 + \text{HO}_2^-$ $2\text{HO}_2 \rightleftharpoons \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
Réactivité croisée d'auto-oxydation	Réactions d'initiation	$\text{Q}^- + \text{O}_2^- \rightleftharpoons \text{Q}^{2-} + \text{O}_2$ $\text{QH}^- + \text{O}_2^- \rightleftharpoons \text{QH} + \text{O}_2$ $\text{QH}_2^+ + \text{O}_2^- \rightleftharpoons \text{QH}_2 + \text{O}_2$
	Réactions d'auto-oxydations	$\text{Q}^- + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Q} + \text{O}_2^-$ $\text{Q}^{2-} + \text{HO}_2 \rightleftharpoons \text{O}_2^- + \text{HO}_2^-$ $\text{QH}^- + \text{HO}_2 \rightleftharpoons \text{QH} + \text{HO}_2^-$ $\text{QH}_2 + \text{HO}_2 \rightleftharpoons \text{QH}_2^+ + \text{HO}_2^-$

Pour la simulation numérique d'un tel mécanisme plusieurs hypothèses et approximations doivent être faites :

- La contribution de l'espèce QH_2^{2+} a été considéré comme négligeable au regard des pH simulés. Le schéma carré de la 1,4-naphthoquinone que nous avons employé pour nos simulations n'impliquait donc que 8 membres.
- Pour ce qui concerne les constantes cinétiques de transfert d'électron hétérogène k_s de chacune des réactions électrochimiques impliquant la quinone nous avons considéré qu'elles étaient toutes relativement rapides avec un $k_s = 1 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, et leur valeur de coefficients de transfert α également identique et égal à 0.5.
- Concernant les constantes cinétiques de transfert d'électron hétérogène de première et deuxième réduction directe d' O_2 à l'électrode, nous avons utilisé une même valeur ajustée de $0.0004 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ avec des coefficients de transfert, respectivement, de $\alpha = 0.3$ et $\alpha = 0.6$. Ces valeurs permettent de reproduire qualitativement la vague de réduction directe (c'est-à-dire en l'absence de quinone), relativement lente et irréversible, d' O_2 à l'électrode de carbone vitreux.
- En plus des équilibres acido-basiques mettant en jeu le couple $\text{H}_3\text{O}^+/\text{H}_2\text{O}$ (représentées par H^+ sur les deux schémas carrés), tous les autres équilibres acido-basiques possibles

entre les différentes espèces ont été pris en compte tel que reporté dans le **Tableau 6-4**.

- Les cinétiques de protonation des équilibres acido-basiques faisant intervenir H_3O^+ ont été considérées comme étant identiques avec une constante de vitesse de $k_{dif,1} = 10^{10} M^{-1}.s^{-1}$, proche de la limite de diffusion. Pour celles qui font intervenir des donneurs de protons autres qu' H_3O^+ , une valeur un peu plus lente de $k_{dif,2} = 5 \times 10^9 M^{-1}.s^{-1}$ a été appliquée.
- Les réactions de dismutation/comproportionation des espèces quinoniques ou oxygénées, mais aussi les réactions croisées de dismutation/comproportionation entre ces espèces ont été prises en compte, leur thermodynamique étant reliée aux constantes d'équilibre et de potentiel *via* la relation générique suivante :
$$\Delta E = E_x^0 - E_y^0 = \frac{RT}{F} \ln(K_z)$$
. Les cinétiques de dismutation ou de comproportionation de ces réactions ont été considérées lorsqu'elles sont dans le sens favorable de la réaction comme étant contrôlées par la diffusion et donc égale à $10^8 M^{-1}.s^{-1}$, la constante inverse de la réaction étant alors calculée à partir de constante d'équilibre de chacune des réactions.
- En plus des réactions d'auto-oxydation préalablement décrites au chapitre 3 (**Figure 3-11**), quatre autres réactions d'auto-oxydation faisant intervenir les différents intermédiaires plus ou moins protonées sont intégrées au modèle. Leur description thermodynamique *via* l'équation de Nernst et cinétique sont similaires à celle du chapitre 3.
- Les réactions d'échanges d'électrons par « cross-exchange » ou « self-exchange » (décrites dans le **Tableau 6-4**) sont considérées comme négligeables dans nos conditions expérimentales.
- Les coefficients de diffusion des espèces de types quinones sont tous fixés à une même valeur de $D_Q = 5 \times 10^{-6} cm^2.s^{-1}$.
- La vitesse de balayage employée pour l'enregistrement des voltamogrammes étant relativement lente, il est apparu utile de prendre en compte la convection naturelle dans les simulations. Pour cela, un vecteur de vitesse de $u = 0.000003 m.s^{-1}$ en direction de l'électrode a été implémenté dans le logiciel Comsol Multiphysics.

A partir de ce modèle numérique implémenté dans le logiciel Comsol Multiphysics, nous avons pu réaliser la simulation des voltamogrammes de catalyse de réduction d' O_2 par $50 \mu M$ de 1,4-naphthoquinone à différents pH et les comparer à ceux obtenus expérimentalement (**Figure 6-9**).

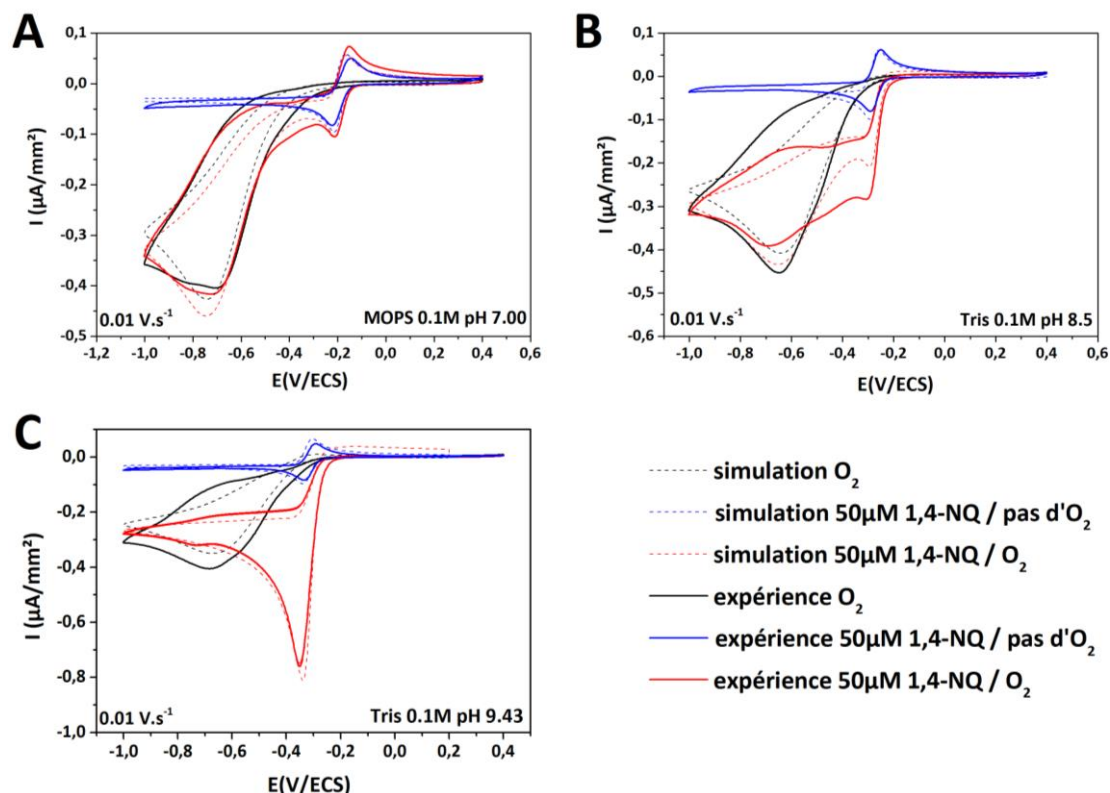


Figure 6-9 : Trait plein : CVs (0.01V.s^{-1}) sur électrode de carbone vitreux de la réduction directe d' O_2 (en noir), la réduction de $50 \mu\text{M}$ de 1,4-NQ sous argon (en bleu), et la réduction catalytique d' O_2 par $50 \mu\text{M}$ de 1,4-NQ (en rouge) à pH : (A) 7.00, (B) 8.5, et (C) 9.5. En pointillés : simulations numériques correspondantes des CVs.

Sur les CVs expérimentaux en rouge, on peut observer que le courant de réduction catalytique d' O_2 par la 1,4-NQ croit de manière importante lorsque le pH augmente. Au-delà de pH 9.5, on observe même un comportement de catalyse totale, c'est-à-dire un courant de pic irréversible très pointu qui n'évolue plus en intensité avec l'augmentation du pH, et qui indique que tout l'oxygène qui arrive par diffusion à l'électrode est réduit en H_2O_2 . En revanche, au-dessous de pH 7, on observe juste la vague réversible à deux électrons de la 1,4-NQ qui signe l'absence de catalyse de réduction d' O_2 .

Les voltamogrammes simulés (traits pointillés de la **Figure 6-9**) reproduisent finalement assez bien, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif, les courbes expérimentales, et en particulier l'augmentation abrupte du courant catalytique entre pH 7.0 et 9.5, avec une intensité de pic catalytique multipliée par un facteur 3.

Ce qui est intéressant à travers ce résultat, c'est que nous pouvons désormais apporter une explication quant à l'origine de l'augmentation abrupte de la catalyse dans cette zone de pH étroite. *Via* la simulation, il est en effet possible de montrer que c'est la valeur du $\text{pK}_{a,2}$ de première protonation de la seminaphthoquinone ($\text{pK}_{a,2} = 8.0$) qui est déterminante dans la réactivité catalytique. A un pH supérieur à 8, la semiquinone majoritairement déprotonée est sous une forme

Analyse du mécanisme PCET de la 1,4-naphthoquinone par la méthode de Laviron et application à la catalyse de réduction de l'oxygène moléculaire

thermodynamiquement favorable pour réagir rapidement avec les espèces réactives de l'oxygène, alors qu'à pH inférieur à 8, la seminaiphthoquinone se protone pour conduire à une espèce thermodynamiquement moins réactive. La valeur de $pK_{a,2} = 8.0$ déduite de l'analyse PCET de la 1,4-NQ est donc un paramètre clef de la réactivité pH-dépendante d'oxydation des naphthohydroquinones par l'oxygène moléculaire. Cela nous indique également que si l'on veut mieux rendre compte des effets du pH sur la réactivité autocatalytique de nos systèmes, il est indispensable de prendre en compte l'intégralité du schéma carré PCET des quinones pour mieux décrire leur autocatalyse.

5. Références Bibliographiques

- (1) Silverstein, T. P.; Rosé, J. R. Dependence of Quinone Electrochemistry on Solvent Polarity and PH. *J. Electrochem. Soc.* **2022**, *169* (4), 045502. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac5efe>.
- (2) Costentin, C. Electrochemical Approach to the Mechanistic Study of Proton-Coupled Electron Transfer. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (7), 2145–2179. <https://doi.org/10.1021/cr068065t>.
- (3) Chambers, J. Q. Electrochemistry of Quinones. In *The Quinonoid Compounds (1988)*; John Wiley & Sons, Ltd, 1988; pp 719–757. <https://doi.org/10.1002/9780470772119.ch12>.
- (4) Baxendale, J. H.; Hardy, H. R. The Ionization Constants of Some Hydroquinones. *Trans. Faraday Soc.* **1953**, *49*, 1140. <https://doi.org/10.1039/tf9534901140>.
- (5) Handa, T. On the Color-Reactions of the Condensed Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Related Quinones in the Solutions of the Concentrated Sulfuric Acid. *BCSJ* **1955**, *28* (7), 483–489. <https://doi.org/10.1246/bcsj.28.483>.
- (6) Patel, K. B.; Willson, R. L. Semiquinone Free Radicals and Oxygen. Pulse Radiolysis Study of One Electron Transfer Equilibria. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1973**, *69* (0), 814. <https://doi.org/10.1039/f19736900814>.
- (7) Yuan, X.; Miller, C. J.; Pham, A. N.; Waite, T. D. Kinetics and Mechanism of Auto- and Copper-Catalyzed Oxidation of 1,4-Naphthohydroquinone. *Free Radical Biology and Medicine* **2014**, *71*, 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.021>.
- (8) Brunmark, A.; Cadenas, E.; Segura-Aguilar, J.; Lind, C.; Ernster, L. DT-Diaphorase-Catalyzed Two-Electron Reduction of Various p-Benzoquinone- and 1,4-Naphthoquinone Epoxides. *Free Radical Biology and Medicine* **1988**, *5* (3), 133–143. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90076-7](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90076-7).
- (9) Butler, J.; Hoey, B. M. The Apparent Inhibition of Superoxide Dismutase Activity by Quinones. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* **1986**, *2* (1), 77–81. [https://doi.org/10.1016/0748-5514\(86\)90127-3](https://doi.org/10.1016/0748-5514(86)90127-3).
- (10) Ilan, Y. A.; Czapski, G.; Meisel, D. The One-Electron Transfer Redox Potentials of Free Radicals. I. The Oxygen/Superoxide System. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1976**, *430* (2), 209–224. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(76\)90080-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(76)90080-3).
- (11) Gill, R.; Stonehill, H. I. 340. A Polarographic Investigation of the Redox Behaviour of Certain Hydroxy- and Sulphonic Acid Derivatives of Anthraquinone. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1952**, 1845–1857.

- (12) Deakin, M. R.; Stutts, K. J.; Wightman, R. M. The Effect of PH on Some Outer-Sphere Electrode Reactions at Carbon Electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1985**, *182* (1), 113–122. [https://doi.org/10.1016/0368-1874\(85\)85444-7](https://doi.org/10.1016/0368-1874(85)85444-7).
- (13) Wood, P. M. The Potential Diagram for Oxygen at PH 7. *Biochem J* **1988**, *253* (1), 287–289.
- (14) Rao, P. S.; Hayon, E. Redox Potentials of Free Radicals. IV. Superoxide and Hydroperoxy Radicals . O₂⁻ and . HO₂. *J. Phys. Chem.* **1975**, *79* (4), 397–402. <https://doi.org/10.1021/j100571a021>.
- (15) Bielski, B. H. J.; Allen, A. O. Mechanism of the Disproportionation of Superoxide Radicals. *J. Phys. Chem.* **1977**, *81* (11), 1048–1050. <https://doi.org/10.1021/j100526a005>.

Conclusion Générale

Ce travail exploratoire inscrit dans une démarche de développement et de compréhension de méthodes d'amplification du signal résultantes de réactions autocatalytiques moléculaires, à des fins analytiques. Il a permis de souligner les facteurs clés qui gouvernent ce type de réactivité, et a pu démontrer la versatilité de ces réactions au travers de différents modes de lecture et d'activation. Le concept de catalyse croisée, au cœur de l'autocatalyse, a en effet été étudié sous plusieurs aspects. Il a consisté en l'association de deux boucles catalytiques auto-activées : la déprotection catalytique médiée par H_2O_2 d'une sonde moléculaire masquant une naphthoquinone, avec la production catalytique d' H_2O_2 par cyclage redox de cette même naphthoquinone en présence d' O_2 et d'un réducteur enzymatique ou électrochimique.

Tout d'abord, la description théorique du modèle autocatalytique simple par catalyse croisée a permis de mettre en évidence les paramètres clés des performances analytiques du système. A partir d'un ensemble de quatre équations différentielles ordinaires, il a été possible d'établir des solutions analytiques pour décrire la cinétique du système. Ce modèle simplifié de la réaction autocatalytique a pu être validé à partir des résultats expérimentaux obtenus dans la thèse de Justine Pallu à partir de la sonde 4-sis-DBN et de différents réducteurs chimiques et enzymatiques. La cinétique globale de la réaction à partir de constantes apparentes a alors été analysée. Notamment, la limite de détection a pu être rationalisée et montré comme résultante ici d'une réponse non-spécifique due à l'instabilité de la sonde, ce qui nous a conduit dans la suite du manuscrit à étudier une sonde plus stable, la 1,4-bis-DBN. Il a également été montré que le couple enzymatique DI/NADH était le plus intéressant pour obtenir les meilleures performances analytiques, de par sa grande stabilité.

Par la suite, il a été montré qu'avec la sonde doublement masquée 1,4-bis-DBN il était possible de détecter par un suivi spectrophotométrique UV-Visible jusqu'à $0.15 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 en quelques heures. Cependant, malgré une meilleure stabilité intrinsèque de la sonde, ces performances analytiques en termes de limite de détection étaient similaires à celles des autres sondes beaucoup plus instables. De plus, la cinétique globale de l'autocatalyse était fortement ralentie. Ces observations nous ont conduites à élucider un mécanisme moléculaire complexe, à travers des simulations numériques. Notamment, nous avons démontré la nécessité de décrire l'auto-oxydation de la 1,4-NQH₂ par un mécanisme radicalaire en chaîne, afin de rendre compte avec une grande précision des temps de réponses observés dans les suivis cinétiques expérimentaux. A partir de ce modèle, nous avons pu expliquer l'origine de la lenteur observée par la nécessité d'une double déprotection par 2 équivalents de H_2O_2 due à la stabilisation de l'intermédiaire monoboronique dans des conditions réductrices. En conséquence, malgré la stabilité intrinsèque de la sonde, les performances analytiques n'ont pu être améliorées à pH 8,5. Cependant, la sensibilité au pH de certains facteurs clés (cinétique, stabilité du NADH) a permis d'optimiser les performances analytiques de la réaction autocatalytique. En

augmentant le pH de seulement une unité, une limite de détection de 50 nM en H_2O_2 a été obtenue en seulement quelques dizaines de minutes. Par ailleurs, la surprenante implication de la concentration en diaphorase sur le temps de réponse non-spécifique a montré l'existence d'une activité résiduelle NADH oxydase de cette enzyme. Nous avons également montré au travers d'autres sondes qu'il était délicat d'optimiser les performances analytiques à partir d'autres cycleurs redox ou d'autres stratégies de masquage.

Après que le mécanisme de la réaction autocatalytique par la sonde 1,4-bis-DBN et le réducteur enzymatique DI/NADH a été discuté en détail à partir de résultats obtenus par spectrophotométrie UV-Visible, un nouveau mode de lecture de la réaction par électrochimie a été étudié. Si un suivi électrochimique indirect avait déjà été exploré au laboratoire précédemment, la possibilité de suivre la réaction en continu était un challenge intéressant en termes d'informations cinétiques et d'applications. La première stratégie a consisté à venir suivre la réaction autocatalytique par chronoampérométrie à un potentiel réducteur permettant la réduction de la forme 1,4-NQ s'accumulant en solution. Ces expériences ont donné lieu à des chronoampérogrammes originaux, où un courant de réduction est soudainement mesuré après une période d'induction. Cependant, les performances analytiques sont limitées par la production non-spécifique d' H_2O_2 par réduction directe d' O_2 . Une nouvelle approche de suivi à un potentiel d'oxydation, permettant d'observer l'accumulation de la forme réduite 1,4-NQH₂, a alors été explorée. Il a été possible de prédire par simulation numérique les réponses attendues, et d'atteindre les mêmes performances analytiques que par le suivi spectrophotométrique UV-Visible. Cependant, une surprenante inhibition des temps de réponse a été observée, et attribuée à la polarisation de l'électrode. Si nous n'avons pas pu élucider l'origine du phénomène électrochimique associé à cette lenteur, ces résultats mettent en avant le caractère perturbateur d'un suivi réactionnel électrochimique par rapport à un suivi UV-Vis. Enfin, des résultats préliminaires de suivi de la réaction autocatalytique par potentiométrie à courant nul ont également été montrés et sont prometteurs. Il sera intéressant par la suite de développer et rationaliser ce type de suivi, qui peut s'intégrer simplement dans des micro-dispositifs pour la détection de traces d' H_2O_2 .

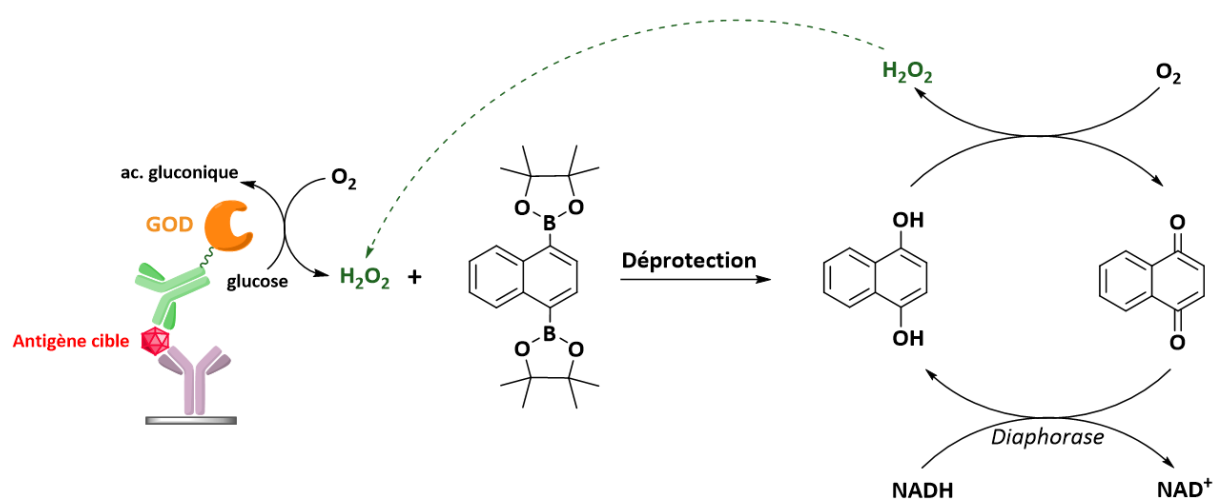
Ensuite, une approche de substitution de l'étape de réduction enzymatique DI/NADH par une réduction électrochimique a été explorée, dans l'idée de pouvoir activer et suivre la réaction autocatalytique par une électrode. La stratégie proposée a été de venir suivre l'évolution du courant au cours du temps en appliquant un potentiel où la catalyse de réduction d' O_2 opérait au maximum tout en ayant un minimum de réduction directe d' O_2 . Les chronoampérogrammes singuliers obtenus ont pu être rationalisés par simulation numérique, et la réaction autocatalytique électrochimique se trouve extrêmement affectée par les perturbations hydrodynamiques naturelles. Une stratégie de confinement du système par la création d'une cellule électrochimique en couche mince a donc été

élaborée, permettant de s'affranchir au maximum des perturbations hydrodynamiques tout en accélérant la cinétique globale de la réaction. Cependant, le matériau d'électrode (carbone vitreux) utilisé jusque-là n'étant pas assez sélectif de la réduction catalysée d' O_2 , la réponse non-spécifique de la réaction est trop importante pour espérer de bonnes performances analytiques. Une étude de la réduction directe et catalytique d' O_2 sur différents matériaux d'électrodes a alors été menée, et nous avons montré que le BDD, les monocouches auto-assemblées de thiols sur or et certains oxydes transparents conducteurs étaient bien plus sélectifs de la réduction catalytique par la 1,4-NQ. Malgré cette meilleure sélectivité, il n'a pas été possible d'aller au-delà de la détection de $20 \mu M$ d' H_2O_2 , ce qui est très en dessous des performances analytiques avec un réducteur enzymatique. Ce résultat met en avant la plus grande spécificité pour la réduction d' O_2 de réducteurs chimiques et enzymatiques par rapport à une réduction électrochimique. De plus, malgré les décevantes performances analytiques, c'est une preuve de concept d'un système d'amplification moléculaire activée localement par une électrode, qui peut être intéressant pour d'autres applications. Par exemple, utiliser ce système pour mettre en avant *via* l'amplification non-spécifique la différence de réactivités de différents matériaux peut être envisagé, pour révéler la présence de nano-objets. D'autre part, substituer le confinement de la réaction en couche mince par une immobilisation en surface de la sonde 1,4-bis-DBN est une stratégie intéressante à explorer. Cela permettrait de s'affranchir des perturbations hydrodynamiques tout en concentrant le catalyseur à la surface de l'électrode, et faciliter le couplage de la réaction homogène avec la réaction hétérogène. Une approche intéressante serait de déposer la sonde sur des couches de thiols, en profitant de leur blocage de la réduction d' O_2 .

Finalement, le mécanisme PCET de la 1,4-NQ a été analysé afin de rendre compte en détails de sa réactivité, dans la perspective de l'incorporer aux simulations numériques précédemment discutées. Pour essayer de rendre compte de l'ensemble des paramètres thermodynamiques et cinétiques impliqués dans le schéma carré à 9 membres de la 1,4-NQ, une étude des voltamogrammes cycliques à différents pH a été conduite et analysé par la méthode de Laviron. Notamment, nous avons pu mettre en avant que le $pK_{a,2}$ de première protonation de la seminaaphthoquinone était de 8 et non de 4.1 comme déterminé par radiolyse pulsée dans la littérature. Ce résultat met en avant la force d'une analyse d'un mécanisme PCET par des méthodes électrochimiques. Cependant, faute de temps, nous n'avons pas pu élucider les cinétiques de transfert hétérogènes impliquées dans la réactivité électrochimique de la 1,4-NQ. Nous avons pu néanmoins mettre en évidence que ces constantes étaient dépendantes du pH. Une étude, qui est en cours, consistant à rendre compte par simulation numérique de voltamogrammes cycliques expérimentaux à différentes vitesses de balayage et différents pH est alors intéressante afin de décrire la réactivité complète (thermodynamique et cinétique). Enfin, à partir de ces observations thermodynamiques, nous avons pu apporter une

explication au pH seuil à partir duquel une catalyse de réduction d' O_2 par la 1,4-NQ est observée. C'est en effet le $pK_{a,2} = 8$ qui est clé dans cette réactivité catalytique. La semiquinone majoritairement déprotonnée à un pH de 8,5 est sous une forme majoritairement stable pour réagir avec les espèces réactives de l'oxygène.

Grâce à toutes ces observations, la réactivité autocatalytique est désormais mieux comprise. Les performances analytiques avec la sonde 1,4-bis-DBN et un réducteur enzymatique DI/NADH à pH 9.5 étant satisfaisantes, il serait intéressant de venir incorporer ce système à un immunodosage pour la détection d'un antigène cible, dans l'espoir d'améliorer les performances analytiques de ce-dernier. Un travail sur un couplage de la réaction autocatalytique avec un immunodosage enzymatique associant une glucose oxydase doit être mené comme sur le schéma ci-dessous :



Partie expérimentale

1. Procédure générale

1.1. Réactifs

Tampons : Sodium Chloroacetate 98%, Lactic Acid 98%, Sodium Acetate 99%, MES Hydrate 99.5%, MOPS 98.5%, Sodium Phosphate dibasic dodecahydrate 99%, Sodium Phosphate monobasic dihydrate 99%, Trizma® Base, minimum 99.9% titration, CAPS 98% proviennent de chez Sigma-Aldrich.

Solvants : Dimethyl sulfoxide anhydrous $\geq 99\%$; N-N-Diméthylformamide 99.8%, Ethanol gradient grade for liquid chromatography ; sodium hydroxyde 99% ; Sulfuric acid 99% ; Chlorhydric acid 37%.

L'**EDTA** 99.4-100.6% et la β -Nicotinamide-adénine-dinucléotide, réduit disodium salt hydrate (**NADH**) ont été achetés chez Sigma Aldrich. La 1,4-naphthoquinone 97% provient de chez JANSSEN et a été recristallisée. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 30% (w/w) provient de chez Sigma-Aldrich.

Les **sondes boroniques** sont synthétisées au laboratoire (par Mathieu Branca, Thamires Moreira, Alexandra Pastor, ou Pan Hui), à l'exception de la sonde monoboronique **4-DBN** (4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)naphthalen-1-ol) qui provient de chez Sigma-Aldrich.

Les **thiols** utilisés pour la formation de SAM : 6-mercapto-1-hexanol 97%, 1-hexane-thiol 95%, 1-Octane-thiol 98.5% proviennent de chez Sigma-Aldrich. Les thiols amine et acide carboxyliques sont synthétisés au laboratoire par Mathieu Branca.

1.2. Préparation des solutions mères

Le tampon Tris (0.1 M) est préparé à partir de Trizma® base (**2-Amino-2 (hydroxyméthyl)-1,3-propanediol**) et d'EDTA (10 μ M) en poudres, dilués dans l'eau milliQ. Le pH est ajusté à 8,5 directement par ajout d'acide chlorhydrique concentré. Les autres tampons sont préparés de manière analogue.

Les dérivés quinoniques en poudre sont mis en solution dans le DMSO ou le DMF selon les différentes solubilités, puis dilués aux concentrations voulues dans le tampon ; ces solutions mères ne sont pas conservées plus de trois jours. Les solutions d' H_2O_2 et de NADH sont préparées à partir d'une solution mère commerciale de peroxyde d'hydrogène de concentration à 30% en masse diluée dans le tampon. Elles sont préparées fraîchement avant chaque expérience du fait de leur instabilité.

1.3. Aliquotage de la DI-3

L'enzyme **Diaphorase III** (DI-3) lyophilisée provient de chez Nipro. Pour la préparation et l'analyses des caractéristiques des solutions enzymatiques, la procédure du fabricant a été suivie.

Succinctement, l'enzyme lyophilisée est préalablement dissoute dans de l'eau distillée puis diluée à 1 mg/mL avec un tampon Phosphate pH 7,5 (50 mM de potassium). Afin de s'affranchir au mieux de traces d'impuretés (NADH oxydase, Cofacteur flavinique libre en solution) une étape de

purification par centrifugation a été ajoutée, correspondant à 3 lavages dans le tampon PBS pH 7,5 et centrifugation (11 000 x g, 30 min, 4°C) à l'aide de « Nanostep® centrifugation Filter » avec une membrane de 10 kDA MWCO ; avant d'être re-dispersée dans le tampon PBS.

Enfin par un suivi cinétique par spectroscopie UV-Visible a $\lambda = 600$ nm, de la réaction de l'enzyme avec le 2,6-Dichlorophenolindophenol et le NADH permet de déterminer l'activité spécifique de l'enzyme¹. Pour finir, l'enzyme a été séparée en aliquots de 50 μ L et conservée au congélateur à -20°C.

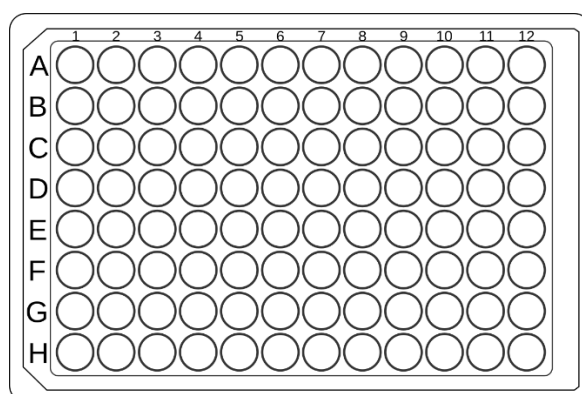
2. Spectrophotométrie UV-Visible

2.1. Instruments

Les mesures UV-Vis dans des cuves en quartz ($l = 1$ cm) sont menées grâce à un spectrophotomètre Cary 60 UV-Vis de chez Agilent Technologies, relié au logiciel Cary WinUV. Les expériences UV-Vis en plaque à 96 micro-puits (*UV-transparent Corning® 96 micro Wells plate*) sont menées grâce à un lecteur de plaques à micro-puits TECAN Spark™, relié au logiciel SparkControl™.

2.2. Suivi cinétique en microplaque

Les expériences de suivi cinétique des réactions (déprotection oxydative, cyclage redox et autocatalyse principalement) sont mesurées à partir du lecteur de plaques TECAN Spark™ sur des plaques à 96 micro-puits, qui possèdent 8 lignes (notées de A à H) et 12 colonnes (notées de 1 à 12) comme représenté ci-dessous :



Il est ainsi possible de venir suivre la cinétique pour chaque jeu de paramètre expérimental en triplicatas, *i.e.* une même condition expérimentale est répétée sur 3 puits différents avec un suivi cinétique indépendant. Les triplicatas sont généralement disposés selon les colonnes (1 à 3, 4 à 6, 7 à 9 ou 10 à 12).

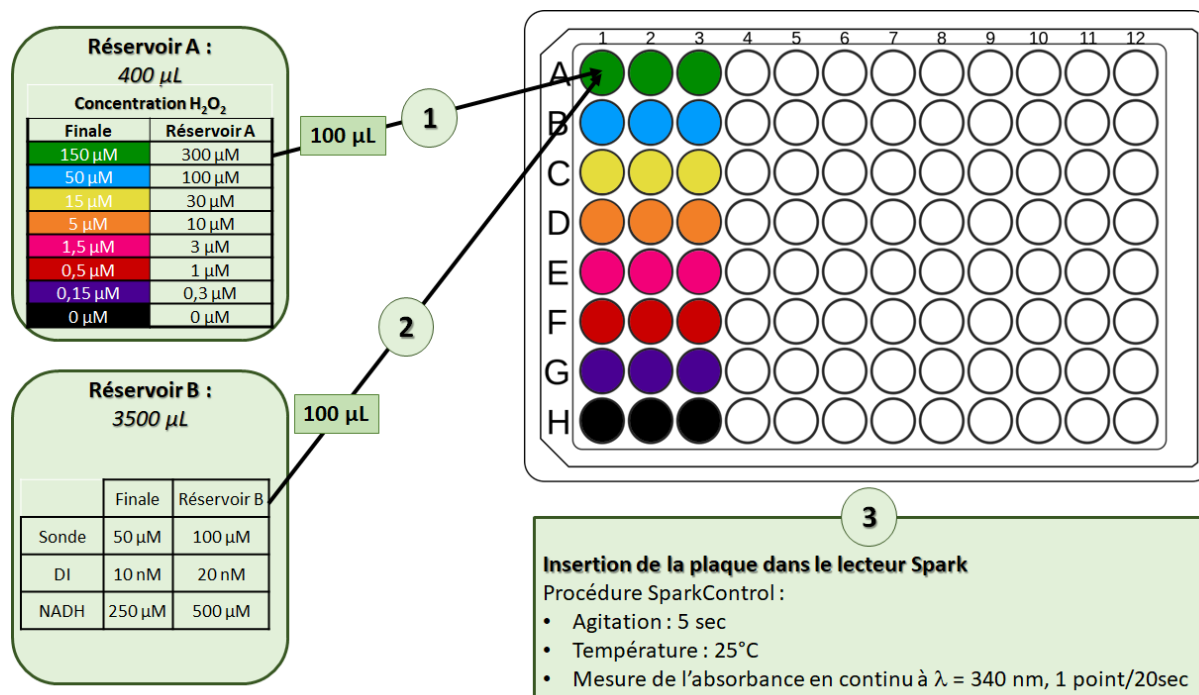
2.3. Protocole de préparation du suivi cinétique

2.3.1. Détection d' H_2O_2 par réaction autocatalytique avec une sonde boronique et le couple réducteur DI/NADH

Un protocole précis pour la préparation des expériences de suivi cinétique a été établi afin de minimiser les temps d'interactions entre les différents réactifs et ainsi diminuer la possibilité de déclenchement préalable non-spécifique des réactions étudiées. Deux réservoirs sont préparées de manière indépendante, un premier réservoir A contenant les différentes concentrations en H_2O_2 , et un second réservoir B contenant la sonde et le couple réducteur. Les deux réservoirs sont préparés dans le tampon. Dans chacun des réservoirs, la concentration des réactifs est doublée vis-à-vis de la concentration finale voulue (par exemple si l'expérience est réalisée avec $50 \mu\text{M}$ de sonde, alors le réservoir B en contiendra $100 \mu\text{M}$). Ensuite, $100 \mu\text{L}$ du réservoir A est introduit dans la plaque à micro-puits à l'aide d'une micropipette multicanaux (de marque Sartorius®), puis $100 \mu\text{L}$ du réservoir B sont ajoutés pour un volume final de $200 \mu\text{L}$: les réactifs sont alors dilués par un facteur 2 et donc aux bonnes concentrations finales voulues. La plaque est directement introduite dans le lecteur et la mesure cinétique commence. Les paramètres de mesure suivants sont programmés sur le logiciel SparkControl :

- Agitation : 5 secondes
- Température : 25°C
- Mesure de l'absorbance en continu à une longueur d'onde spécifique ($\lambda = 340 \text{ nm}$ dans le cas d'un suivi du NADH) : 1 point toutes les 20 secondes environ.
- Flash : 25
- Settle time : 250 ms

Le schéma ci-dessous résume les différentes étapes de préparation d'un suivi cinétique classique :



2.3.2. Suivi cinétique de la déprotection oxydative et du cyclage redox

Pour le suivi cinétique de déprotection oxydative, le même protocole est appliqué, excepté que le réservoir B ne contient pas de réducteur. Pour le suivi cinétique du cyclage redox, le réservoir A contient les différentes concentrations en 1,4-NQ, tandis que le réservoir B ne contient que le couple réducteur.

3. Electrochimie

3.1. Matériels et mesures

Les mesures électrochimiques ampérométriques (Voltamétrie Cyclique, Chronoampérométrie) ont été conduites avec un montage à trois électrodes classique (**électrode de travail**, **électrode de référence**, **électrode auxiliaire**) à température ambiante ; les mesures électrochimiques potentiométriques à courant nul (Chronopotentiométrie) ont été conduites avec un montage à deux électrodes (**électrode de travail**, **électrode de référence**) à température ambiante. Dans les deux cas, les électrodes sont reliées à un potentiostat PGSTAT302N (Metrohm Autolab) piloté par le logiciel NOVA 2.1.

Les électrodes de référence utilisées sont des électrodes au calomel saturé de chez Radiometer Analytical (REF451) ou Orignalys (XR110) séparée de la solution par une allonge en verre avec un embout en verre fritté. Dans le cas des mesures en couche mince sur ITO-PET (Chapitre 5, **Figure 5-24**), un fil d'argent préalablement poli est recouvert d'AgCl par électrolyse dans du KCl 1M. Les électrodes auxiliaires utilisées sont des fils de platine.

Les cellules électrochimiques utilisées (hors cellule électrochimique de couche mince) sont soit des cellules à 4 entrées pouvant contenir un volume d'environ 7 ou 3 mL, soit des cellules électrochimiques classiques d'un volume d'environ 15 ou 30 mL. Les expériences sous argon sont réalisées après 10 minutes de bullage. Un fin flux d'argon est ensuite maintenu au-dessus de la solution durant la mesure.

3.2. Préparation des électrodes de travail

3.2.1. Electrode de carbone vitreux

Les électrodes de carbone vitreux utilisées sont des disques en carbone vitreux de diamètre $\phi = 3$ mm. Ce sont soit des embouts d'électrodes classique de chez Sigma-Aldrich, soit des RDE de chez Metrohm ($\phi = 3$ mm) qui se fixe sur un rotateur Autolab. Ce-dernier est contrôlé par un Autolab Motor Controller et la vitesse de rotation ω peut varier de 100 à 10.000 RPM avec une résolution de 1 RPM. Le contrôleur est relié au potentiostat et est contrôlé depuis l'interface NOVA.

Avant chaque expérience, les électrodes en carbone vitreux sont préalablement polies trois fois sur un tapis de polissage recouvert d'une suspension diamantée de 9, 3 et 1 μ , pendant 3 min à $\omega = 200$ RPM sur une polisseuse. Les électrodes sont ensuite rincées deux fois dans un bain à ultrasons pendant 3 min, une première fois dans de l'acétone et une seconde fois dans de l'éthanol pour enlever toute impuretés ou résidus.

3.2.2. Electrode d'or fonctionnalisée

Polissage : Les électrodes d'or utilisées sont des embouts d'or de chez Sigma-Aldrich de diamètre $\phi = 1.6$ ou 2 mm. Elles sont polies préalablement avant chaque expérience sur des tapis de polissage avec une suspension d'alumine de 3, 0.5 et 0.05 μ , pendant 3 min à $\omega = 200$ RPM sur une polisseuse. Les électrodes sont ensuite rincées deux fois dans un bain à ultrasons pendant 3 min, une première fois dans de l'acétone et une seconde fois dans de l'éthanol pour enlever toute impuretés ou résidus.

Activation : Avant toute utilisation, l'or, quelle que soit sa forme, doit être activé. Cette activation permet de réorganiser les plans cristallographiques des atomes d'or pour homogénéiser la surface de l'électrode, et améliorer la réactivité de l'électrode. Elle consiste à réduire les oxydes d'or (aux alentours de 0.85 V/ECS) préalablement formés en oxydation. Cette étape permet également d'assurer un nettoyage des impuretés supplémentaires, et une meilleure reproductibilité des manipulations. L'activation est réalisée ici par voie électrochimique, par voltamétrie cyclique selon les conditions :

Electrolyte support	H ₂ SO ₄ à 0.5 mol.L ⁻¹
Vitesse de balayage (V.s⁻¹)	0.1
Bornes de potentiel (V/ECS)	Scan aller : 0 à 1.5 ; Scan retour : de 1.5 à 0
Nombre de scans	20

Si les voltamogrammes cycliques obtenus sont reproductibles au bout de 20 scans, alors l'électrode est considérée comme apte à être fonctionnalisée.

Formation des monocouches de thiols : les différents thiols utilisés (voir Chapitre 5, **Tableau 5-3**) sont dilués à 5 mM dans de l'éthanol. 400 µL de cette solution est introduit dans un tube à hémolyse fermé, et l'électrode y est plongée toute une nuit. L'électrode est ensuite rincée à l'éthanol puis à l'eau distillée avant chaque expérience.

3.2.3. Oxydes transparents conducteurs :

Sur verre : Les électrodes d'ITO et de FTO déposés sur un substrat verre proviennent de chez Solems. L'électrode d'ITO sur verre est un rectangle de 1 x 2.5 mm avec une résistivité de 12 Ω/sq. L'électrode de FTO sur verre est un carré de 2.5 x 2.5 mm avec une résistivité de 10 Ω/sq. Les électrodes sont préalablement rincées avec de l'acétone puis de l'éthanol dans un bain à ultrasons pendant 3 minutes pour chaque solvant. Afin de délimiter une surface d'électrode de 5 x 5 mm, le reste de la surface est isolé en appliquant du vernis du côté conducteur.

Sur PET : les électrodes d'ITO déposées sur ITO-PET sont découpées sous forme de bandelette dans des feuilles de 30 x 30 cm provenant de chez Sigma-Aldrich. La résistivité est de 60 Ω/sq.

4. Simulations numériques

Les simulations cinétiques présentées dans le chapitre 2 et 3 sont réalisées à partir du logiciel Copasi. Les simulations des voltamogrammes cycliques ainsi que des chronoampérogrammes présentées dans le chapitre 5 sont réalisées à partir du logiciel DigiElch. Les simulations des chronoampérogrammes présentées dans le chapitre 4 ainsi que des voltamogrammes cycliques présentés dans le chapitre 6 sont réalisées à partir du logiciel Comsol Multiphysics, avec les modules : Chimie (*chem*), Electroanalysis (*tcd*).

Listes des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

BDD : Boron-Doped Diamond

BME : 2-Mercaptoéthanol

BZ : Belousov-Zhabotinsky

CV : Voltamétrie Cyclique

DCR : Dendritic Chain Reaction

DI : Diaphorase

DMF : N,N-DiMéthylFormamide

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

E : Potentiel électrochimique

ECS : Electrode au Calomel Saturé

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ENH : Electrode Normale à Hydrogène

EXPAR : Exponential Amplification Reaction

EY : Eosine Y

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FTO : Fluorine doped Tin Oxide

GC : Glassy Carbon

GOx : Glucose Oxydase

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène, eau oxygénée

HOPG : Highly Oriented Pyrolytic Graphite

ITO : Indium Tin Oxide

LAMP : Loop-mediated isothermal Amplification

LOD : Limit of Detection

MCR : Réaction en Chaîne de la Méthionase

MGL : Méthionine Gamma-Lyase

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

ODE : Ordinary Differential Equation

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : Potentiel Hydrogène

ppb : Partie par milliard

PQQ : PyrroloQuinoléine Quinone

RPM : Rotation par minute

SAM : Self-Assembled Monolayer

Tris : Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane

UV-Vis : Ultra-Violet Visible

1,4-bis-DBN : 1,4-bis(4,4,5,5-tetraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)naphthalène

1,4-NQ : 1,4-Naphthoquinone

1,4-NQH₂ : 1,4-Naphthohydroquinone

2,5-Me-PB : 1,4-bis(4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-2,5-diméthylbenzène

2,5-OMe-BQ : 2,5-diméthoxy-1,4-Benzoquinone

2,5-OMe-BQH₂ : 2,5-diméthoxy-1,4-Benzohydroquinone

2,5-OMe-diPB : 1,4-bis(4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-2,5-diméthoxybenzène

4-DBN : 4-(4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-bioxaborolan-2-yl) naphthalèn-1-ol

4-OH-2,5-OMe-Ald : 4-hydroxy-2,5-diméthoxybenzaldéhyde

4-sis-DBN : 4-((4-(4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl) benzyl)oxy)naphthalèn-1-ol