UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE PAR MICROSCOPIE ÉLECTROCHIMIQUE À BALAYAGE EN CELLULE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ COMME EXIGENCE PARTIELLE MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR MAZIAR JAFARI

OCTOBRE 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL Service des bibliothèques

<u>Avertissement</u>

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent autant aux membres du réseau académique, aux participants de mon emploi étudiant et à ma famille.

Ce fut une inspiration d'observer chaque figure autoritaire encadrant les évènements de mon cheminement scolaire. Je compte parmi eux, les professeurs de matières chimiques, biologiques et physiques. Notamment les enseignants de laboratoires, les techniciens et les étudiants auxiliaires. Mon passage des études de premier cycle n'aurait jamais été le même sans eux. D'ailleurs, mon passage n'aurait sûrement jamais eu lieu sans eux. Leurs gestes, comportements et paroles étaient exemplaires. Leurs méthodes de transmission de connaissance étaient sans égales. De toute évidence, j'exprime mes plus profonds remerciements.

Ce flux d'émotions est remporté, à la même amplitude sinon plus, à mes études des cycles supérieurs. De toute sincérité, l'atmosphère avait détendu. Tout de même, les étudiants, les professeurs et la direction faisaient preuve de bienveillance, de respect et de valorisation. Ce qui est exactement approprié pour l'apprentissage. En étant toujours étudiant, je souhaite le maintien continu de cet environnement sain jusqu'à la fin de mon parcours éducatif et les millénaires suivants, pour ceux qui suivront. Je tiens à octroyer mes véritables remerciements à tous ceux qui ont contribués au fondement de ce qu'est advenu cette jeune Université active. Une appréciation particulière est éprouvée envers mon directeur et codirecteur pour l'appui financier et pour le temps de mon passage des études du deuxième cycle.

N'étant pas tout à fait une institution d'apprentissage telle quelle, cet endroit a contribué à ma subsistance pendant ces années d'études financièrement peu rentables.

Comme tout étudiant le sait, le vit : les ressources sont chétives. Toutefois, mes collègues de travail m'ont bien fourni un sentiment de liberté tout en me laissant gagner les quelques fonds essentiels pour savourer un minimum de confort nécessaire lors de mes études. Je tiens à remercier l'emploi étudiant qui échangeait le temps de mes fins de semaine contre de la monnaie, mais surtout un remerciement bien mérité envers mes collègues de travail et clients fidèles qui ont toujours agis avec respect et diligence.

Dernièrement, mais pas le moindre, un remerciement profond envers ma conjointe pour m'avoir toujours encouragé dans les pires moments. Aussi à mon père, ma mère, ma grand-mère et ma sœur. Ils ont toujours été à l'écoute de mes sentiments et m'ont toujours conseillé du mieux qu'ils pouvaient. Un autre remerciement aux membres de ma famille qui n'ont pas pu voir ce grand jour, mes oncles aimés et mon grand-père ingénieur métallurgiste. Votre amour m'a fortifié à entreprendre tout défi et à décorer mon environnement immédiat comme je veux.

Merci

DÉDICACE

À ceux qui m'ont donné la vie

À ceux qui me permettent de la vivre

À notre avenir et à celle de ceux qui nous suivront

AVANT-PROPOS

La microscopie électrochimique est une technique scientifiquement en lien avec les sondes à balayages. Son apparition dans la fin des années 1980 a été établie fructueusement pour la première fois par Allen J. Bard (Bard et al., 1989). Ce genre de microscopie est tant versatile, qu'elle peut être adaptée virtuellement à l'étude de n'importe quel système. D'une part, cette technique a été extensivement appliquée pour l'étude des systèmes biologiques (Bartolini et al., 2018; Hirano et al., 2013; Huang et al., 2018; Matsumae et al., 2018). Les qualités de cette technique mises en évidence sont la résolution temporelle, l'imagerie, la fiabilité et la sensibilité. Comme tout microscope, le microscope électrochimique à balayage est doté d'une capacité de production d'images des surfaces, fondée sur la réponse électrochimique ou la topologie locale, avec une résolution dépendante de la petitesse de la taille de la sonde. Avec des équipements de première classe, la sensibilité d'une sonde accroîtrait proche de l'attoampère, l'ordre de 10⁻¹⁸ (Byers et al., 2015). À cette échelle, un nombre unitaire de particules échantillonnées est déchiffré. La technique principale de ce projet est la microscopie électrochimique à balayage en cellule, une catégorie de la microscopie électrochimique à balayage. À l'étude ici sont des enzymes, spécifiquement la catalase. Cette technique est utilisée comme moyen pour l'analyse enzymatique. Avec le temps, cette même technique pourra se généraliser pour étudier d'autres systèmes enzymatiques. Ne se limitant pas aux enzymes, la méthodologie pourra s'adapter à l'étude d'une variété de biomolécules. Les sujets de cette étude suivront dans les prochaines sections.

TABLES DES MATIÈRES

AVANT-PROPOSv
LISTE DES FIGURESx
LISTE DES TABLEAUXxiv
LISTE DES ÉQUATIONSxv
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMESxviii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉSxxi
RÉSUMÉxxiii
INTRODUCTION
CHAPITRE I PRINCIPES ET CONCEPTS : ÉCLAIRCISSEMENT
1.1 La voltammétrie
1.1.1Les prérequis41.1.2Les fonctions de la source51.1.3Vitesse et fenêtre de balayage101.1.4L'électrolyse de l'eau111.1.5Les pics de l'oxygène (O2) et du peroxyde d'hydrogène (H2O2)121.1.6La loi de Faraday et son implication dans cette étude141.1.7Le choix de l'électrode de travail151.1.8La théorie et les attentes16
1.2 La catalase
1.2.1Structure211.2.2Mécanisme réactionnel241.2.3Les applications expérimentales pertinentes26
1.3 Études cinétiques enzymatiques

	1.3.1 1.3.2	Le modèle de Leonor Michaelis et Maud Menten
		Lineweaver-Burk
CH	APITRI	E II LE MODÈLE EXPÉRIMENTAL42
2.1	Les n	natériels, les appareils et les préparations42
	2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4	Le matériel
2.2	Les n	nodèles étudiés
	2.2.1 2.2.2	Mesures macroscopiques
CH	APITRI	E III RÉSULTATS ET DISCUSSION
3.1	Les n	nesures macroscopiques60
	3.1.1 3.1.2	Ferricyanure
3.2	Les n	nesures microscopiques66
	3.2.2 3.2.3	Ferricyanure
3.3	Carto	graphie microscopique
CH	APITR	E IV PERSPECTIVES
CO	NCLUS	SION
AN	NEXE	A94
AN	NEXE	B95
AN	NEXE	C96
AN	NEXE	D

vii

viii
ANNEXE E
ANNEXE F
ANNEXE G
ANNEXE H
ANNEXE I
ANNEXE J
ANNEXE K
ANNEXE L
ANNEXE M
ANNEXE N
ANNEXE O
ANNEXE P
APPENDICE A112
APPENDICE B
APPENDICE C
APPENDICE D118
APPENDICE E
APPENDICE F
APPENDICE G

APPENDICE H	
BIBLIOGRAPHIE	

ix

LISTE DES FIGURES

Figure		Page	
	1.1	Types de systèmes électrochimiques utilisés dans ce projet	6
	1.2	Les fonctions d'onde des expériences voltammétriques	7
	1.3	Mesure potentiostatique par microscopie électrochimique à balayage en cellule (SECCM) d'une électrode de carbone vitreux sans (GCE) et avec (CAT GCE) modification de catalase	8
	1.4	Courbe typique d'un balayage de voltammétrie cyclique d'une réaction redox réversible	9
	1.5	La fonction d'onde triangulaire adaptée à la voltammétrie cyclique	10
	1.6	Transformation de l'énergie solaire en énergie chimique par l'intermédiaire de l'électrolyse de l'eau	12
	1.7	Voltammétrie cyclique macroscopique montrant les pics de réduction en présence de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	13
	1.8	Images comparatives entre deux systèmes d'études enzymatiques	16
	1.9	Le courant aux potentiels de réduction sur l'électrode de carbone vitreux modulé par la catalase	19
	1.10	Protéine homotétramérique de la catalase du foie bovin	21
	1.11	Stabilisation du cofacteur hème par les résidus Tyr357 et Arg353	23
	1.12	Mécanisme de la dégradation du H ₂ O ₂ par la catalase	25

1.13	Effet protecteur de la catalase chez les organismes aérobiques	27
1.14	Images des formes pharmaceutiques types comprimés contenant la diamine oxydase et la catalase	27
1.15	Mesures de potentiel zêta après chaque ajout de pellicule	29
1.16	Courbe Michaelis-Menten : Évolution de la vitesse catalytique d'une enzyme en fonction de la concentration du substrat	32
1.17	Essais enzymatiques par variation de concentration de substrat en vue de tracer la courbe Michaelis-Menten	33
1.18	Gradient de substrat H2O2 formé à l'extrémité de la pipette	35
1.19	Droite issue de la double réciproque de la courbe Michaelis-Menten	41
2.1	Montage du microscope électrochimique à balayage en cellule (SECCM)	44
2.2	Images obtenues par microscopie à force atomique de la surface de l'électrode de carbone vitreux après nettoyage	47
2.3	Échantillons conditionnés pour les mesures microscopiques	48
2.4	Structures de ferricyanure et de ferrocyanure	51
2.5	Image par microscopie à lumière visible d'un exemple de sonde	53
2.6	L'approche de la pipette sur la surface de l'électrode	55
3.1	Voltammétrie cyclique macroscopique du ferricyanure	61
3.2	Effet de l'oxygène sur la courbe de voltammétrie cyclique macroscopique	62
3.3	Effet du H ₂ O ₂ sur la courbe de voltammétrie cyclique et l'ampérométrie. Effet de l'ajout des aliquotes de H ₂ O ₂ sur le courant réducteur à mesure	

xi

	potentiostatique. Démonstration de la relation linéaire entre le courant et la concentration de H_2O_2 à l'échelle macroscopique	64
3.4	Effet de la catalase sur la courbe de voltammétrie cyclique macroscopique	66
3.5	Voltammétrie cyclique microscopique du ferricyanure	68
3.6	Courants transitoires des solutions H ₂ O ₂ sur l'électrode de carbone vitreux propre	70
3.7	Démonstration de la linéarité conservée à l'échelle microscopique de la densité de courant en fonction de la concentration de H_2O_2	73
3.8	Images de microscopie à force atomique de la surface de l'électrode de carbone vitreux propre et fonctionnalisée avec catalase	74
3.9	Courants transitoires des solutions H ₂ O ₂ sur l'électrode de carbone vitreux fonctionnalisée avec catalase	75
3.10	Densité de courant à l'interface électrode/gouttelette sur la surface de l'électrode de carbone vitreux modifiée avec catalase en fonction de la concentration de H_2O_2	77
3.11	Normalisation du fragment linéaire de la courbe à la Figure 3.10	78
3.12	Révision des relations entre la densité de courant et la concentration de H_2O_2 en recalculant les densités de courant avec la proposition que l'aire de la gouttelette est égale à celle de la pipette sonde utilisée	80
3.13	Images de microscopie à lumière visible des matrices cartographiques tracées par le microscope électrochimique à balayage en cellule	83
3.14	Représentations 3D de la densité de courant réducteur à 8.28 s pour chaque point de la matrice sur l'électrode avec et sans enzymes. Dans le premier cas, l'aire considérée dans le calcul des densités de courant est celle mesurée par le microscope à lumière visible. Dans le deuxième cas, l'aire considérée est celle de la pipette sonde utilisée	84

xii

3.15	Représentations 3D de la topographie relative de chaque point de la matrice sur l'électrode avec et sans enzymes	86
3.16	Images topographiques par microscopie à force atomique du point #1 de la matrice sur la surface de l'électrode de carbone modifiée avec les particules de catalase et polystyrène carboxylate 200 nm	88

xiii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page	
1.1	Enzymes ayant atteint la perfection catalytique	39	

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 1.1 (p.14) $I = Q\Delta t$

Équation 1.2 (p.14) Q = nFN

Équation 1.3 (p.17) $J = -D \times \frac{\delta c}{\delta x}$

Équation 1.4 (p.24)
$$2H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} 2H_2O + O_2$$

Équation 1.5 (p.30)
$$E + S \xrightarrow[k_{-1}]{k_{-1}} ES \xrightarrow[k_{-2}]{k_{-2}} E + P$$

Équation 1.6 (p.31)
$$E + S \xrightarrow[k_{-1}]{k_{-1}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Équation 1.7 (p.34)

$$K_m \approx K'_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

Équation 1.8 (p.36)
$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{(K'_m + [S])} = \frac{V_{max}[S]}{(K'_m + [S])}$$

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{(K'_m)}$$

Équation 1.10 (p.36)
$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S]} = V_{max}$$

Équation 1.11 (p.36)

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{(K'_m + [S])} = V_{max} \frac{[K'_m]}{[K'_m + K'_m]} V_{max} \frac{[K'_m]}{2[K'_m]} = \frac{V_{max}}{2}$$

Équation 1.12 (p.37)
$$f_{ES} = \frac{V_0}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]} ou \frac{[S]}{K'_m + [S]}$$
Équation 1.13 (p.37)

$$K_m \approx K'_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Équation 1.14 (p.37)
$$V_{max} = k_2[E_T]$$

Équation 1.15 (p.38)
$$V_o = \frac{k_{cat}}{K_m} [S][E] \approx \frac{k_{cat}}{K'_m} [S][E]$$

xvi

Equation 1.16 (p.38)
$$V_o = \frac{k_{cat}}{K_m} [S][E_T] \approx \frac{k_{cat}}{K'_m} [S][E_T]$$

$$\frac{k_{cat}}{K_m} \approx \frac{k_{cat}}{K'_m} = \frac{k_{cat}}{(k_{-1} + k_{cat})/k_1} = \frac{k_{cat}}{(k_{-1} + k_{cat})} k_1 < k_1$$

Équation 1.18 (p.40)
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K'_m + [S]}{V_{max}[S]} = \frac{K'_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{V_{max}}$$

Équation 1.19 (p.40)

y = ax + b

xvii

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

- AFM microscopie à force atomique (atomic force microscopy)
- CAT catalase
- Ch chitosan
- CMA carboxymethyl amidon
- CV voltammétrie cyclique (cyclic voltammetry)
- DAO diamine oxydase
- GCE électrode de carbone vitreux (glassy carbon electrode)
- HER réactions à évolution d'hydrogène (hydrogen evolution reactions)
- Ia, Ea courant anodique, potentiel anodique
- Ic, Ec courant cathodique, potentiel cathodique
- ID diamètre interne (inner diameter)
- K₃Fe(CN)₆ ferricyanure de potassium
- K₄Fe(CN)₆ ferrocyanure de potassium
- LBL pellicule par pellicule (layer-by-layer)
- LOD limite de détection (limit of detection)

OD diamètre externe (outer diameter)

OER réactions à évolution d'oxygène (oxygen evolution reactions)

ORR réactions de réduction d'oxygène (oxygen reduction reactions)

PAH poly(allylamine hydrochlorure)

PBS solution tampon phosphate (phosphate buffer solution)

PE polyélectrolytique

PFV voltammétrie de films protéiques (protein film voltammetry)

PSS poly(sodium 4-styrène-sulfonate)

QRCE électrode quasi référence-auxiliaire (quasi reference-counter electrode)

RPM rotation par minute

RRDEE électrode enzymatique à disque-anneau rotative (rotating ring-disk enzyme electrode)

SAM monocouche auto-assemblée (self-assembled monolayer)

SECCM microscopie électrochimique à balayage en cellule (scanning electrochemical cell microscopy)

SECM microscopie électrochimique à balayage (scanning electrochemical microscopy)

SGF simulated gastric fluid (fluide gastrique simulé)

SHE électrode standard à hydrogène (standard hydrogen electrode)

SIF simulated intestinal fluid (fluide intestinal simulé)

SMCM microscopie microcapillaire à balayage (scanning microcapillary microscopy)

SNCEC électrochimie de nanocollisions stochastique (stochastic nanocollision electrochemistry)

T₁, T₂, T₃ temps premier, second et troisième

Vo, Vs, Vf Voltage initiale, sommet et finale

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

F	constante de Faraday (96 485 C.mol ⁻¹)
n	nombre de moles (mol)
Q	charge (coulombs C)
J	flux de diffusion (mol.m ⁻² .s ⁻¹)
D	coefficient de diffusion (cm ² /s)
с	concentration (mol.dm ⁻³)
x	épaisseur de la couche diffuse (cm)
ν	vitesse de balayage (mV/s)
Kd	constante de dissociation (mol/L)
Km	constante de Michaelis (mol/L)
k2 (ou	k _{cat}) constante catalytique (substrats/s)

- V_{max} vitesse maximale (mol/s)
- V_o vitesse enzymatique (mol/s)

[S] concentration de substrats (mol/L)

- [P] concentration de produits (mol/L)
- [E] concentration d'enzymes (mol/L)
- [ES] concentration de l'intermédiaire enzyme-substrat (mol/L)

xxii

RÉSUMÉ

Des travaux préliminaires ont visé la synthèse facilitée de particules bioactives biodégradables à base de chitosan, carboxymethyl amidon et catalase pour traiter des lésions cutanées pouvant découler de certaines maladies du colon (ex. : maladie de Crohn). Des méthodes de caractérisation locales étaient toutefois manquantes. Pour avancer dans cette voie, la microscopie électrochimique à balayage en cellule a été utilisée. D'abord, une méthodologie succinctement consistante est développée. Ensuite, son application a été mise en œuvre. Avant de débuter les études microscopiques, une série de mesures macroscopiques fortifient les fondements du système à l'étude. Une transposition, du macroscopique au microscopique, du système modèle exemplaire basé sur le couple redox ferricyanure/ferrocyanure justifie la pertinence de l'instrumentation. A l'échelle macroscopique, le peroxyde d'hydrogène a augmenté le courant cathodique sur une électrode de carbone vitreux dans une solution dépourvue d'oxygène. Une analyse à différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène a montré une relation linéaire entre le courant réducteur et la concentration. En complément, l'enzyme catalase a incité un saut du courant réducteur lorsqu'introduite dans une solution de diverses concentrations de peroxyde d'hydrogène. Pour caractériser localement ces phénomènes, une approche microscopique s'est penchée sur les effets du peroxyde d'hydrogène et de la catalase. Les expériences ont montré que la relation linéaire entre la densité du courant cathodique et la concentration de peroxyde d'hydrogène est conservée à l'échelle microscopique. L'effet de l'amplification du courant par l'enzyme était moindrement intense à l'échelle microscopique par rapport à l'échelle macroscopique. L'amplification était visible seulement à de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène. Des images de microscopie à force atomique couplées aux mesures électrochimiques de l'environnement de l'électrode modifiée ont mené à des calculs spéculatifs du nombre d'enzymes sous l'aire mesurée et de leur constante catalytique. Cependant, une méthode alternative d'analyse des résultats microscopique réfute la relation linéaire entre la densité de courant et la concentration de peroxyde d'hydrogène ainsi que la hausse de la densité de courant originaire de l'effet catalytique de la catalase. Se fiant sur les analyses affirmant les observations de l'effet catalytique, une preuve de principe démontre par la technique de standardisation ajoutée que l'électrode modifiée est capable de quantifier la concentration d'oxygène dissoute en solution. La limite de détection du peroxyde d'hydrogène par l'électrode modifiée était de 22 μ M. La variable principale influencant cette limite est la qualité de l'instrumentation, notamment celle de l'amplificateur électrique. L'application de cette technique de mesure sur des

particules agencées de catalase/polystyrène-carboxylate et sur un contrôle polystyrènecarboxylate/sans catalase, a permis de topographier localement la hauteur et le profil électrochimique d'une surface de 25 points.

Mots clés : Microscopie électrochimique à balayage en cellule, systèmes enzymatiques, méthodologie, catalase, application, particules de catalase/polystyrène-carboxylate

INTRODUCTION

Le projet de maîtrise repose essentiellement sur trois fondements de la science : l'avancement d'outils techniques, le développement de méthodologies et l'étude de particules bioactives (dont les enzymes). Une branche de la microscopie électrochimique à balayage (SECM), la microscopie électrochimique à balayage en cellule (SECCM) aussi connu sous le nom de microscopie microcapillaire à balayage (SMCM), fait d'office le sujet principal technologique dans ce travail. La démarcation principale survient dans le milieu d'analyse. La technique SECM oblige un milieu liquide pour la prise de mesures, tandis que celle de SECCM (ou SMCM) prend lieu en milieu sec. La sonde du SECM renferme un fin cylindre de métal conduisant le courant depuis l'extrémité, mesurant 10 µm de diamètre typiquement, jusqu'à la source (Bard et al., 1989). Maintenant, les sondes atteignent couramment l'ordre des nanomètres. En revanche, la technique de SECCM, exige une sonde, dont le réservoir est rempli d'une solution électrolytique contenant ou non l'analyte à l'étude. À l'extrémité de cette sonde (10 μ m ± 2 dans cette étude) se forme un ménisque de la solution électrolytique, qui, lorsqu'en contact avec le substrat, émet un signal détenant nombreuses informations sur la réaction à l'étude. Avec de l'équipement avancé, la sonde pourrait atteindre des diamètres de quelques nanomètres et la sensibilité pourrait capter le signal d'une molécule individuelle (Byers et al., 2015). Puisqu'à présent, aucune méthodologie est proposée pour l'étude enzymatique avec la technique SECCM, ce travail prend la charge et propose une façon systématique d'étudier des enzymes oxydoréductrices. D'autres techniques, notamment la microscopie à lumière visible, le revêtement rotatif, la microscopie à force atomique, la microscopie électronique à balayage et l'électrochimie classique à trois cellules sont aussi

impliquées dans l'accomplissement de cet objectif. Pour autant, il y a eu aussi une comparaison entre la réponse électrochimique d'une surface recouverte de particules enzymatiques actives et celle d'une surface recouverte de particules sans enzymes. Un premier chapitre théorique servira de mise en contexte pour justifier les décisions expérimentales adoptées. Aussi, elle servira de référence pour familiariser le lecteur avec les concepts communément employés dans ce projet. Le second chapitre détaillera les pratiques expérimentales et les équipements impliqués. Finalement, un troisième chapitre présentera et discutera les résultats principaux du projet de maîtrise.

CHAPITRE I

PRINCIPES ET CONCEPTS : ÉCLAIRCISSEMENT

Cette section du document a pour but d'annoncer les thèmes majeurs du présent travail. Essentiellement, il s'agira d'introduire les principales approches des aspects théoriques et techniques. Le contenu sera limité à l'essentiel de l'information jugée suffisante pour comprendre la logique derrière le choix des paramètres configurés ainsi que d'apprécier la bonne correspondance des méthodes employées pour atteindre les objectifs ciblés. En plus des techniques expérimentales, les pages suivantes classeront et définiront les autres composants indispensables de ce projet. Concrètement, le chapitre recouvrira une section sur la voltammétrie, une sur la catalase et une sur le modèle enzymatique de Leonor Michaelis et Maud Menten. De prime abord, les notions électrochimiques utilisées dans ce contexte seront mises au clair. Ensuite, la structure, le mécanisme, l'utilité et les applications de la catalase seront des thèmes développés. Une troisième sous-catégorie portera sur un outil d'interprétation communément employé lors des mesures enzymatiques : le modèle enzymatique de Michaelis-Menten. La signification des paramètres cinétiques et la transformation de Lineweaver-Burk seront abordées.

1.1 La voltammétrie

De la fusion entre l'électrique et la chimie émerge l'électrochimie. Cette branche de la science débauche dans d'autres domaines de la chimie comme la chimie analytique, la chimie physique et la biochimie (O'Mullane, 2013; Rajeshwar et Ibanez, 1997). Au

niveau de la recherche biologique, l'électrochimie s'étend à la médecine (Milazzo, 1988). Des exemples d'applications sont l'usage d'électrodes spécifiques aux ions, la coulométrie, la fabrication de piles et des biosenseurs. La voltammétrie, n'est pas une technique facilement applicable puisqu'elle requiert plusieurs considérations. Les données qu'elle génère sont considérablement sensibles aux influences des conditions de mesures, de sorte qu'elle demande une méthode de travail systématique et rigoureuse (Elgrishi et al., 2018; Kissinger et Heineman, 1983). Les informations recueillies par ces mesures sont généralement des changements dans les états d'oxydation d'une espèce. Dès lors, l'éventail des composés étudiables est expansible. Heureusement, ce projet focalise sur une gamme d'espèces seulement, les espèces impliquées dans les réactions de réduction de l'oxygène (ORR) (Liao et al., 2017; Song et al., 2014; Sun et al., 2015). L'importance de l'oxygène comme axe de recherche est désormais évidente, en plus d'être l'élément essentiel à la vie sur terre. Plus loin dans la même direction cathodique, sont retrouvées les réactions à évolution d'hydrogène (HER) (Jaramillo et al., 2007). Elles ont un potentiel inestimable en matière de ressources énergétiques renouvelables. Les prochaines sous-sections élaboreront sur les aspects techniques, les justifications des paramètres établis et l'effet du carbone vitreux comme catalyseur sélectif à l'oxygène ou au peroxyde d'hydrogène.

1.1.1 Les prérequis

Semblable à tout système électronique, sans circuit fermé aucune circulation du courant n'aura lieu. Pour former un circuit fermé, les composants (ex. électrodes, multimètres, résistances, capaciteurs, source) doivent être reliés par un intermédiaire conducteur. Généralement un fil métallique isolé par une gaine. Un émetteur d'électrons est autant important qu'un circuit fermé, quand l'objectif est d'élaborer un système électrique fonctionnel. Pour ce projet, l'émetteur d'électrons est un générateur capable d'appliquer plusieurs fonctions d'onde, et de mesurer le courant et le potentiel. Cette source se dénomme un potentiostat. Directement reliés au potentiostat, sont trois fils dont l'électrode de travail, l'électrode de référence et l'électrode auxiliaire. L'électrode de travail applique l'émission électronique de la source et l'électrode auxiliaire ferme le circuit. L'électrode de référence assure que la valeur du potentiel appliqué par la source est conforme aux standards. Une fois ces électrodes plongées dans une cellule électrochimique contenant une solution électrolytique, on parle d'un système à trois électrodes. Des systèmes à deux électrodes sont aussi communs, lorsque la référence et la contre-électrode sont court-circuitées pour former une électrode quasi référence-auxiliaire (QRCE). D'ailleurs, en microscopie électrochimique à balayage en cellule (SECCM) et en microscopie électrochimique à microcapillaire (SMCM), les systèmes à deux électrode auxiliaire/référence est formée d'un fil d'Ag/AgCl oxydé, plongé dans le réservoir de la sonde (Figure 1.1).

1.1.2 Les fonctions de la source

Un émetteur de signal peut adopter plusieurs fonctions d'émission. Le signal émis est parfois constant, intermittent, croissant, décroissant et variable. La nomenclature des fonctions émettrices est géométrique. Les plus communes sont les pouls d'onde rectangulaires, le voltage constant et les ondes triangulaires (Figure 1.2-A, -B et -C). D'autres, plus spécifiques, s'appliquent à des systèmes particuliers. Par exemple le test scellé, le test de conductance, le test du retour de l'inactivation, le test de voltage variable et la rampe de voltage (Elements, 2015). En réalité, ces tests spécifiques sont des variants des pouls d'ondes rectangulaires. Ces fonctions de signaux sont imagées dans la (Figure 1.2-D).



Figure 1.1 Types de systèmes électrochimiques utilisés dans ce projet. (A) le schéma représente une cellule électrochimique macroscopique à trois électrodes. (B) L'image illustre le circuit formé entre la sonde et la surface pendant les mesures de microscopie électrochimique à balayage en cellule (SECCM).

Dans le contexte de ce projet, les fonctions prédominantes pour exercer l'étude du système expérimental sont le voltage constant (potentiostatique) et l'onde triangulaire. L'onde triangulaire fera dorénavant allusion à la voltammétrie cyclique (CV). La fonction du voltage constant (ou potentiostatique) force la source à maintenir le potentiel appliqué à une valeur fixe pour un temps déterminé. La variation du courant en fonction du temps est d'intérêt. Ce type de mesure est idéal pour surveiller les changements dans un système. Plus reliée à l'étude en question, l'évolution de la réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène est perceptible en suivant et comparant le courant au potentiel statique associé à sa réduction par l'électrode (Figure 1.3).



Figure 1.2 Les fonctions d'onde des expériences voltammétriques. Les trois fonctions principales des études voltammétriques sont (A) les pouls d'ondes rectangulaires, (B) le voltage constant, aussi appelé potentiostatique, et (C) les ondes triangulaires. La majorité des tests applicables dérivent des pouls d'onde rectangulaires (D).



Figure 1.3 Mesure potentiostatique par microscopie électrochimique à balayage en cellule (SECCM) d'une électrode de carbone vitreux sans (GCE) et avec (CAT GCE) modification de catalase. Lorsque modifiée avec la catalase, une solution 0.5 mM de H_2O_2 et 50 mM NaCl cause présumément une augmentation d' O_2 dans l'environnement immédiat de l'électrode. Les molécules d' O_2 générées à proximité de l'électrode sont spontanément réduites par le potentiel réducteur maintenu de l'électrode, expliquant le courant haussé détecté à l'état-stationnaire du système. L'augmentation absolue du courant n'est pas flagrante sur cette figure. Quoiqu'il soit essentiel de prendre en compte l'aire recouverte par l'électrode avant d'établir des comparaisons.

L'onde triangulaire, ou la voltammétrie cyclique, effectue un balayage de potentiel à une vitesse déterminée dans un intervalle délimité par deux extrémités de voltage. Pendant ce balayage, le courant est enregistré. Cette mesure potentiodynamique assure l'examen de l'ensemble des activités électrochimiques qui se déroulent dans le système à l'étude. Cette fonction versatile est utile, particulièrement pour transformer l'état électronique d'une espèce électroactive au premier balayage et d'en conclure son sort aux balayages subséquents (Kissinger et Heineman, 1983; Rusling et Suib, 1994) (Figure 1.4). Cette phrase décrit ce que subit une molécule dans une cellule

électrochimique. Au premier balayage, la molécule subit une série d'oxydation et de réduction. Aux cycles suivants, il devient possible de tirer des conclusions sur la transformation de la molécule, à la suite de l'exposition à la série initiale d'oxydation et de réduction. Dans les deux cas, potentiostatique et potentiodynamique, le courant renseigne sur l'état redox et sur la concentration des espèces dans le système.



Figure 1.4 Courbe typique d'un balayage de voltammétrie cyclique d'une réaction redox réversible. D'après (Rusling et Suib, 1994).

L'étude de la variation du courant pour quantifier les espèces se nomme ampérométrie. L'information obtenue d'une espèce par la variation du courant en fonction du voltage se nomme voltammétrie.

1.1.3 Vitesse et fenêtre de balayage

La mise en œuvre de l'onde triangulaire exige d'établir quelques paramètres dont un potentiel de départ, un potentiel summum et un potentiel final. En plus, une vitesse de balayage entre chaque transition doit être déterminée. C'est aussi utile de configurer le nombre de cycles de balayage, ainsi que la fréquence d'échantillonnage (Figure 1.5). C'est essentiel de reconnaître qu'une vitesse de balayage plus ample encourage également un effet de charge. Automatiquement, le courant augmente globalement dans le système à l'étude quand la vitesse de balayage est accentuée (Salitra *et al.*, 2000). Pour éviter cet effet qui peut fausser la quantification, les vitesses de balayage dans ce projet sont limitées à des faibles vitesses.



Figure 1.5 La fonction d'onde triangulaire adaptée à la voltammétrie cyclique. V_o, V_{s1}, V_{s2} et V_f sont les voltages initiaux, sommets 1, sommets 2 et finaux. T_1, T_2 et T_3 sont les laps de temps entre les transitions de potentiel. T_1, T_2 et T_3 définissent par défaut la vitesse de balayage (v). La lettre *n* représente le nombre de cycle itérative. La fréquence d'échantillonnage est réglée sur le logiciel du potentiostat (pas montrée). Elle est limitée par la sensibilité du potentiostat et/ou de l'amplificateur associé.

Par exemple, pour les mesures de voltammétrie cyclique, les variations de courant en provenance des balayages à des vitesses de 20 mV/s sont davantage édifiantes que celles produites par des balayages à des vitesses de 100 mV/s.

1.1.4 L'électrolyse de l'eau

Aux deux extrêmes d'un voltammogramme régissent deux réactions. Ce sont les pics de la réduction (borne négative) et de l'oxydation (borne positive) de l'eau. Ces réactions sont connues par les acronymes HER (réactions à évolution d'hydrogène) et OER (réactions à évolution d'oxygène) respectivement. Ultimement, ce sont les produits de l'électrolyse de l'eau. Elles sont largement étudiées à des fins de production d'énergie renouvelable et non-polluante (Figure 1.6) (Cheng et Jiang, 2015). Les meilleurs catalyseurs naturels pour la réduction et l'oxydation de l'eau sont les métaux nobles, dont le platine, le palladium, le ruthénium, le rhodium, l'osmium et l'iridium. Certains oxydes de métaux, hydroxydes de métaux et pérovskites sont aussi capables d'effectuer l'électrolyse de l'eau avec un rendement appréciable, lorsqu'optimisés (Chang et al., 2016; Mefford et al., 2016). Avant d'atteindre la réaction d'évolution d'hydrogène, l'eau subit une transformation intermédiaire électrochimique. Elle est réduite en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). C'est ensuite le produit intermédiaire qui est réduit en hydrogène gazeux (H2). Également, quand l'oxygène (O2) présent dans le milieu est électrochimiquement réduit, le produit de sa réduction est aussi H₂O₂. Cette réaction intermédiaire est catégorique de la réduction d'oxygène (ORR). Récemment, une modification biologique de l'électrode de carbone a montré un avancement majeur dans la réaction ORR. Le travail démontre qu'en modifiant la surface de l'électrode de carbone vitreux avec la catalase, une enzyme oxydoréductrice qui sera discutée à la prochaine section, il y a accroissement du courant associé à la quantité d'oxygène en solution (Sepunaru et al., 2016). Pour mieux visualiser l'effet de la catalase sur le système, la Figure 1.7 montre les potentiels importants à prendre en compte.


Figure 1.6 Transformation de l'énergie solaire en énergie chimique par l'intermédiaire de l'électrolyse de l'eau. Cette alternative de ressource énergétique est virtuellement inépuisable et dépourvue de séquelles environnementales. D'après (Cheng et Jiang, 2015).

1.1.5 Les pics de l'oxygène (O_2) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Les signaux utiles pour le suivi de ce projet sont ceux de l'oxygène (O_2) et possiblement celui du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), dépendamment du point de vue adopté pour aborder l'étude. Puisque la catalase, comme expliquée dans la prochaine section, permute la concentration de ces deux espèces en solution. La surveillance des fluctuations en concentration d'un de ces composés achemine à la compréhension des traits cinétiques de l'enzyme. Le début du pic de réduction de l'oxygène est percevable avec une électrode macroscopique à environ – 0.4 V (vs. Ag/AgCl) et le début du pic de réduction du peroxyde d'hydrogène est présent autour de – 0.8 V (vs. Ag/AgCl) (Figure 1.7). Le point de vue adopté dans ce projet est celui de l'évolution du produit issu de la catalyse enzymatique, donc le suivi de la production d'oxygène (O_2) découlant de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la catalase. Pour être certain de ne pas prendre en compte des artéfacts lors des mesures potentiostatiques, le potentiel maintenu dépasse légèrement le potentiel auquel le courant de réduction de l'oxygène est maximal. Car il pourrait y avoir des effets cinétiques de la réduction de l'oxygène à la surface de l'électrode de carbone, faussant ainsi les valeurs obtenues par la catalyse enzymatique. En conséquence, le potentiel statique est maintenu à -0.75 V (vs. Ag/AgCl).



Figure 1.7 Voltammétrie cyclique macroscopique montrant les pics de réduction en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les voltammogrammes ont été obtenus à une vitesse de balayage de 20 mV/s. L'électrode de travail est une macroélectrode de carbone, l'électrode de référence est une électrode Ag/AgCl et la contre électrode est une maille de platine. La fenêtre de balayage est de + 0.25 à -1.25 V (vs. Ag/AgCl) pour la voltammétrie de solution dégazée. La solution comprend 5 mM H₂O₂ dans de l'eau saline 100 mM KCl. Le potentiel du début de réduction d'O₂ est environ à -0.4 V (vs. Ag/AgCl) et celui de H₂O₂ est environ à -0.8 V (vs. Ag/AgCl). De façon beaucoup moins prononcée que la platine, sur l'électrode de carbone, il est important à noter que lorsque H₂O₂ est en solution oxygénée, la grandeur du courant réducteur n'est pas purement celui de la réduction du O₂, une part provient aussi de l'H₂O₂ dissout en solution. Si la platine était l'électrode de travail, les deux signaux seraient confondus.

1.1.6 La loi de Faraday et son implication dans cette étude

En électrochimie, le courant est un indicateur de la concentration d'une espèce électroactive en solution.

$$I = Q\Delta t$$
 (Equation 1.1)

Où I est le courant mesuré, Q est la charge et t est le temps.

L'équation de Faraday relie strictement la charge avec le nombre de moles d'espèces électroactives participant aux réactions de transferts de charges redox (Skoog *et al.*, 2015).

Q = nFN (Équation 1.2)

Où Q est la charge, n est le nombre d'électrons anticipés dans le processus, F est la constante de Faraday et N est le nombre de moles d'espèces avant subi une transformation oxydative ou réductrice, tout dépendamment du processus étudié. Avec cette formule, le nombre de molécules d'oxygène réduit à la surface de l'électrode peut être extrait par analyse de la valeur du courant de réduction à un temps, ou pendant un temps, donné. Cette relation est indispensable pour illustrer l'effet de l'enzyme lorsqu'elle fonctionnalise la surface de l'électrode de carbone. Du point de vue de la cinétique enzymatique, le courant est donc, à tout moment, un indicateur de la vitesse catalytique à la surface de l'électrode (Lin et al., 2017). Cette approche n'est pas nouvelle (Kamin et Wilson, 1980; Shu et Wilson, 1976). Ces études fondatrices ont montré que, lors des études ampérométriques, le courant à l'état-stationnaire est révélateur de la vitesse catalytique des enzymes immobilisées à la surface d'une électrode. Avec cette loi, deux suppositions sont accessibles. Soit i) connaissant la charge et le nombre d'enzymes impliquées dans la région électroactive, cette formule permet de déduire le taux de production du produit, donc la constante catalytique enzymatique. Soit ii) connaissant le taux de production du produit théorique, donc la constante catalytique, et ayant mesuré le courant associé à la réduction de l'oxygène, il est possible d'en déduire une approximation du total des enzymes actives dans la région

électroactive mesurée par la sonde. Ces deux voies seront abordées dans la discussion et les approximations seront proposées.

1.1.7 Le choix de l'électrode de travail

Plusieurs électrodes de travail peuvent être utilisées pour des études voltampérométriques. Cependant, chacune possède des propriétés uniques pouvant influencer le système à l'étude. Autre que la dimension de l'électrode, qui sera discutée à la prochaine section, le matériau le constituant est aussi important. Les plus populaires sont la platine, l'or, le carbone et le mercure. Les critères de sélection prennent en compte le domaine de stabilité et les interactions avec les composants à l'étude (Pletcher, 2009). La facilité de régénération d'une surface neuve et le coût sont aussi des aspects pratiques à prendre en réflexion. Une électrode populaire en électrochimie est la platine. Sa convenance est liée à son caractère inerte, quoique son coût la rend désavantageuse. En plus de son coût élevé, le matériel de cette électrode interfère avec les substances étudiées. Plus particulièrement, la platine catalyse la dégradation de H_2O_2 . Cette caractéristique est indésirable dans ce contexte, puisque la réduction facilitée du H_2O_2 sur la platine réduit le potentiel de sa réduction jusqu'à celui de O₂. Il en résulte un camouflage du signal réducteur de O₂ par celui de H₂O₂. Une autre électrode coûteuse est celle de l'or. L'or est semblable à la platine, mais elle est plus utile lorsqu'une fonctionnalisation avec une monocouche auto-assemblée (SAM) de l'électrode de travail est nécessaire. Le mercure est toxique et liquide faisant de lui incompatible avec ce système, malgré qu'il soit un très bon conducteur électrique. Finalement, le carbone se présente comme l'électrode idéale. L'électrode de carbone peut atteindre des potentiels de balayage plus négatifs que la platine et l'or, avant de déclencher les réactions de réduction de l'oxygène et de l'eau, car elle possède un domaine de stabilité plus étendu par rapport aux électrodes métalliques (Van Benschoten et al., 1983). En plus, son prix est beaucoup plus abordable que celui des métaux discutés, ce qui permet de la disposer quand elle est trop usé. Pour ces raisons, l'électrode de carbone vitreux devient l'électrode de travail de choix pour ce projet.

1.1.8 La théorie et les attentes

Les chercheurs des années 80 connaissaient déjà les systèmes d'études enzymatiques par électrochimie. Leurs travaux impliquaient des électrodes enzymatiques à disquesanneaux rotatives (RRDEE). Ils ont montré que la vitesse de rotation de leurs électrodes influençait en effet la réponse ampérométrique. Premièrement, le taux de transport du substrat était contrôlé par la vitesse de rotation. Deuxièmement, une force de convexion induite par la rotation de l'électrode assurait une homogénéité des espèces à la couche diffuse. Troisièmement, les paramètres dimensionnels du RRDEE étaient bien établis, ce qui faisaient d'elle un outil de mesure puissant (Figure 1.8-A).



Figure 1.8 Images comparatives entre deux systèmes d'études enzymatiques. (A) le montage repose sur l'étude de l'activité enzymatique par l'électrode enzymatique à disque-anneau rotative (RRDEE). (B) Pour ce, nous utilisions la microscopie électrochimique à balayage en cellule (SECCM). Il est connu qu'un gradient de concentration se forme au bout de la sonde SECCM. L'effet de consommation du substrat par l'enzyme risquerait d'accentuer ce gradient. Plus de détails sur ce phénomène sont données dans les pages qui suivent en employant la loi de Fick.

Toutefois, la technique du RRDEE n'est pas celle utilisée dans ce projet. Il s'agissait ici d'explorer une technique électrochimique locale potentiellement de haute résolution latérale, temporelle et topographique. À ces fins, la microscopie électrochimique à balavage en cellule (SECCM) est adaptée, pour la première fois, à l'étude enzymatique (Figure 1.8-B). La mise au point de cette technique pourrait s'étendre jusqu'aux limites de la science actuelle, c'est-à-dire à l'échelle d'une molécule près, ou autrement dit, à une entité enzymatique active près. Pour se faire, il y a plusieurs perfectionnements à apporter au sein de la méthodologie et de l'instrumentation. Par exemple : la taille de la sonde, le revêtement enzymatique sur l'électrode, la sensibilité du potentiostat et l'isolation du bruit électrique et mécanique. Pour la taille de la sonde, on idéalise le diamètre de la pipette qui est dans les quelques centaines de nanomètres. Pour le revêtement enzymatique sur le support, on vise une distribution dense uniforme et monomoléculaire. Pour la portée du potentiostat, on considère un amplificateur de sensibilité attométrique (10⁻¹⁸) muni d'une fréquence d'échantillonnage de l'ordre des nanosecondes. Sous pression atmosphérique et à température ambiante, pour l'isolation du bruit électrique et mécanique, on utilise une cage Faraday aussi capable d'amortir des chocs mécaniques et des vibrations dans l'environnement immédiat. Dans ce travail, la taille de la sonde est optimisée autour de 10 µm car à des diamètres inférieurs, plusieurs défauts techniques apparaissent en raison de la fonctionnalisation hydrophobe, du transport fluide de l'électrolyte et de la sensibilité de l'appareillage. Avec le temps et l'expérience, ces obstacles seront facilement contournés. Pour mieux comprendre le passage fluidique du réservoir de la pipette sonde jusqu'à la gouttelette sur la surface enzymatique examinée, on fait référence à la loi qu'Adolf Fick a proposé en 1855. Il s'agit de l'explication du comportement des molécules en suspension. Globalement, la loi de Fick stipule que les molécules confinées dans un espace défini auront tendance à diffuser pour occuper uniformément tout le volume (Atkins et De Paula, 2013). L'expression mathématique de ce phénomène est décrite ci-dessous.

$$J = -D \times \frac{\delta c}{\delta x}$$
 (Équation 1.3)

Où J est le flux des espèces, D est le coefficient de diffusion, c est la concentration et x est la distance questionnée. En bref, au fur et à mesure que le substrat contenu dans la gouttelette est consommé par l'enzyme, un flux de substrat provenant du réservoir de la sonde se déplacera pour compenser la consommation. L'effet de ce déplacement entraîne un gradient à l'extrémité de la sonde (Figure 1.8-B et 1.18). Les travaux d'un groupe de chercheurs ont élaboré sur ce phénomène considérant l'électrode de travail, et non l'enzyme, comme agent consommant l'espèce à l'étude (Williams et al., 2009). La distribution enzymatique sur la surface est densement pactée et basse en hauteur. Il a été découvert qu'avec une solution tampon, l'enzyme se condensait en des structures cristallines ramifiées lors du revêtement, par rapport à une déposition amorphe quand en provenance d'une solution dans de l'eau désionisée. Conséquence probable des interactions électrostatiques encouragées par les sels dans le tampon (Rink et al., 2017). Les résultats suggèrent possiblement un entassement de niveau bi- à octa- moléculaire. L'optimisation de l'amplificateur, ainsi que les méthodes d'isolement électrique, demandent désormais une amélioration pour atteindre une sensibilité accrue d'au moins 6 ordres de grandeurs (10⁻⁶) de plus que les mesures présentes. Les travaux de Lai (2000,2002) et Compton (2016) sont de bonnes pistes pour la direction qu'a prise ce travail. Le premier travail utilise une électrode macroscopique et le deuxième une ultramicroélectrode. Dans le cas de la macroélectrode, un fragment du voltammogramme est montré, c'est le fragment d'importance de ce projet. Le scénario proposé correspond à l'ajout de catalase dans la solution électrolytique contenant déjà du peroxyde d'hydrogène, non dégazée et dégazée (Figure 1.9-A). La courbe de voltammétrie cyclique quasiment sigmoïdale est attribuable à l'ultramicroélectrode fonctionnalisée avec catalase (Figure 1.9-B). Évidemment, le courant associé au potentiel de réduction de l'oxygène accroît lorsque la microélectrode fonctionnalisée est mise en contact avec une solution de peroxyde d'hydrogène. Si l'on implémente ces scénarios dans les prévisions de nos projets en simulant un montage SECCM, l'aire de la surface de la gouttelette en contact avec la superficie recouverte de catalase peut équivaloir celle électroactive d'une microélectrode. Bien entendu, elle peut potentiellement atteindre des aires nettement inférieures si la taille de la sonde est réduite à l'échelle nanométrique.



Figure 1.9 Le courant aux potentiels de réduction sur l'électrode de carbone vitreux modulé par la catalase. (A) Les deux courbes montrent que l'ajout de catalase dans une solution de H_2O_2 accroît visiblement le courant associé à la réduction de l' O_2 en H_2O_2 par l'électrode de carbone vitreux, autant dans une solution désoxygénée ou non. D'après (Lai et Bergel, 2000, 2002). (B) Ces courbes prouvent que l'ultramicroélectrode de carbone vitreux modifiée par la catalase, en incubant à différents temps, hausse proportionnellement la réponse du courant de réduction de l' O_2 . La voltammétrie est lancée dans une solution contenant du H_2O_2 , le substrat de l'enzyme à l'étude. D'après (Sepunaru *et al.*, 2016). Ces images appuient une ressemblance entre l'échelle macroscopique et microscopique de ce système enzymatique.

Dans cette étude, elle se rapprocherait de celle d'une microélectrode, soit d'environ 8 à 12 μ m de rayon. Sachant que la valeur du courant est proportionnelle à l'aire électroactive de l'électrode de travail, la réponse du système SECCM à l'étude pourrait générer des réponses du même ordre de grandeur que celui de l'ultramicroélectrode du SECM (Figure 1.9-B).

1.2 La catalase

Cette section couvre sur une molécule biologique fonctionnelle impliquée dans le cadre du projet. Naturellement, les organismes vivants et parasites non-vivants possèdent le matériel pour transcrire et traduire le codage génétique donnant lieu aux protéines correspondantes. Uniquement les organismes vivants possèdent toute la machinerie essentielle pour l'assemblage des protéines (Lodish, 2000). Les protéines remplissent une multitude de fonctions physiologiques. Une des catégories est celle des catalyseurs. D'une façon semblable à des matériaux en présence d'une énergie externe, certaines protéines rendent spontanément possible des réactions qui normalement ne pourraient pas prendre place à notre échelle temporelle. Fondamentalement, elles diffèrent des matériaux car elles découlent du vivant et ne requièrent pas toujours une source d'énergie externe. Cette classe de protéines s'appelle enzymes. Six classes d'enzymes existent dans le monde des vivants. La classification suit un ordre spécifique selon l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB): Les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases (McDonald et al., 2009). Pour l'intérêt de l'électrochimie, la classe qui se distingue en particulier est celle des oxydoréductases. Telles que le dévoile leur nom, les oxydoréductases parviennent à effectuer leur réaction respective en échangeant des électrons avec le substrat et les cofacteurs ou en consommant et produisant des espèces électroactives. La catalase s'apparie à cette classe d'enzymes. Elle sera discutée plus amplement dans les sections qui suivent.

1.2.1 Structure

Composée de 4 sous-unités identiques (Yonekura et Maki-Yonekura, 2016) (Figure 1.10), la catalase possède un poids moléculaire total d'environ 240 000 kDa. Le numéro identifiant la catalase, aussi connu par commission enzymatique (EC), est 1.11.1.6 et son numéro de CAS est 9001-05-2 (McDonald *et al.*, 2009). Son diamètre est d'environ 10 nm (Kätelhön *et al.*, 2016). Le nombre total de résidus la composant est de 2024 (Schroeder *et al.*, 1982).



Figure 1.10 Structure homotétramérique de la catalase du foie bovin. Les liens peptidiques et les chaînes latérales sont montrés sous forme de bâtonnets mauves. Les groupements prosthétiques sont visibles sous forme de sphères jaunes. Chaque sous-unité comprend deux ligands, celui plus au centre est la molécule de porphyrine coordonnant un atome de fer (hème) et l'autre à la périphérie est la nicotinamide dinucléotide phosphate réduite (NADPH). D'après (Yonekura et Maki-Yonekura, 2016).

Elle est reconnue pour avoir une des plus grandes constante catalytique parmi les enzymes existantes, soit de 16 à 44 millions de molécules de substrat H2O2 dégradées par seconde, par entité tétramérique (Heck et al., 2010). Les cofacteurs de cette biomolécule sont localisés dans le cœur hydrophobe de l'enzyme (Zámocký et Koller, 1999). Le groupement hème est localisé dans une crevasse à environ 20 Å de la surface (Heck et al., 2010; Lai et Bergel, 2002; Sepunaru et al., 2016). Cette distance est trop lointaine pour effectuer un transfert d'électron directement avec l'électrode, lorsque l'enzyme y est fixée (Sepunaru et al., 2016). Si c'était possible, de nombreuses autres avenues se seraient ouvertes dans les études de voltammétrie de films protéiques (PFV) (Gulaboski et al., 2012; Léger et al., 2003). L'autre cofacteur la composant est NADPH, qui frôle la surface de l'enzyme. Son rôle est, jusqu'à présent, peu connu, quoiqu'un possible effet stabilisateur de l'espèce catalytique intermédiaire formée et protecteur de la fonction catalytique sont hypothétisés (Heck et al., 2010; Kirkman et al., 1999). La molécule d'hème est nécessaire pour la transformation des substrats en produits. Elle est étroitement impliquée dans le mécanisme de la réaction, qui sera schématisé à la section suivante. Cette molécule importante est située dans la poche catalytique. Elle est stabilisée par de nombreux résidus faisant une variété d'interactions. Principalement, un résidu tyrosine357 qui retient l'atome de fer par un lien organométallique. Soutenant tyrosine357 sont le résidu arginine353 et le contour hydrophobe porphyrique de l'hème qui établissent des ponts hydrogènes et des liaisons hydrophobes respectivement (Figure 1.11).



Figure 1.11 Stabilisation du cofacteur hème par les résidus Tyr357 et Arg353. Les interactions organométalliques et les ponts hydrogènes qu'impliquent cette stabilisation sont encerclés en jaune. Les résidus Tyr357 et Arg353 sont encadrés en jaune. L'oxygène de la chaîne latérale de tyrosine effectue deux liaisons hydrogènes avec deux des trois groupements amine de l'arginine. En plus, il stabilise l'atome métallique de fer. Deux liaisons hydrophobes sont aussi visibles dont l'une entre le cycle aromatique de la tyrosine avec le carbone β de la chaîne latérale d'arginine et l'autre encore avec le cycle aromatique de la tyrosine et le contour hydrophobe porphyrique de l'hème. D'après (Yonekura et Maki-Yonekura, 2016).

1.2.2 Mécanisme réactionnel

La réaction catalysée par l'enzyme est :

$$2H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} 2H_2O + O_2$$
 (Équation 1.4)

L'action catalytique de la catalase ne se limite pas au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Elle peut coupler la dégradation d'une molécule de H_2O_2 à l'oxydation des alcools de faibles poids moléculaires (éthanol, méthanol, mercure élémentaire) et même à quelques molécules organiques plus larges, manifestant ainsi une activité peroxydase (Heck et al., 2010; Lardinois et al., 1996; Sichak et Dounce, 1986). Les protéines homologues de catalase dotées de l'activité peroxydase sont classifiés EC 1.11.1.21 selon IUBMB (McDonald et al., 2009). Pour ce projet, le seul substrat d'intérêt est le H₂O₂. Malgré la constante catalytique parmi les plus élevées de toutes les enzymes, l'affinité de la catalase envers H2O2 est très basse. Des études cinétiques ont évalué que le K_m de la catalase du foie bovin pour le H_2O_2 est autour de 10 à 30 mM (Heck et al., 2010). L'explication de la faible affinité réside dans l'effet délétère oxydant du H2O2 à des hautes concentrations, sur l'enzyme. La constante catalytique extrêmement élevée de l'enzyme complémente sa basse affinité envers le substrat toxique rendant la dégradation du substrat rapide (Lardinois et al., 1996). Deux molécules sont connues pour encombrer le site d'entré du substrat dans la poche catalytique : le cyanure et le 3-amine-1,2,3-triazole (3-AT). Des études morphologiques ont démontré une altération de la route empruntée par le substrat pour atteindre la cavité catalytique. De ce fait, une image cristallographique a souligné la présence de molécules d'eau dans la cavité catalytique, où en temps normal il n'y en aurait pas (Heck et al., 2010). L'oxydation du NADPH a aussi engendré une inactivité semblable. L'inaction de la catalase a pour effet l'accroissement d'espèces oxydatives et ultimement, l'apport d'un danger pour la survie de l'organisme concerné. Le mécanisme catalytique est constitué de 2 étapes. La première est la réduction de la molécule H₂O₂ avec l'atome Fe³⁺ pour former une molécule d'eau et un intermédiaire oxoferrique FeO4+. Une seconde molécule d'H2O2 s'apparie à l'intermédiaire et donne lieu à l'oxygène moléculaire et une autre molécule d'eau (Figure 1.12). Un sous-produit est parfois formé entre l'atome de Fer et le résidu tyrosine à proximité.



Figure 1.12 Mécanisme de la dégradation du H_2O_2 par la catalase (A) Une première molécule de H_2O_2 est immédiatement oxydée pour libérer de l'eau. (B) Un intermédiaire oxoferryl (FeO(IV)) est formé entre l'oxygène restant et le noyau métallique. (C) Une deuxième molécule de H_2O_2 clôt le cycle en s'exposant au site actif pour expulser une deuxième molécule d'eau et de l'oxygène moléculaire, rassemblant ainsi l'atome d'oxygène résiduel du premier H_2O_2 transformé. (D) Le noyau métallique de la molécule de l'hème en état Fe(III) est stabilisé par l'oxygène du Tyrosine357 avoisinant. Ce complexe survient lors de la décomposition de l'intermédiaire oxoferrique FeO⁴⁺. Une des spéculations du rôle du NADPH est la stabilisation afin d'empêcher la formation de ce complexe indésirable. Lorsque formé, NADPH le réduirait via un réseau tunnel de relais de chaînes latérales porteuses de charges.

1.2.3 Les applications expérimentales pertinentes

Les champs d'applications de l'enzyme catalase sont divers. Étant une enzyme antioxydante, sa fonction protectrice vis-à-vis des dommages oxydatifs est primordiale. Aussi, étant une enzyme oxydoréductrice, les applications bioélectrochimiques sont copieuses. La stabilité thermique de cette enzyme lui accorde une robustesse allégeant les complications de dénaturation thermique lié à sa manipulation. Cette stabilité provient de sa structure quaternaire. Les quatre sous-unités se chevauchent ce qui stabilise le tétramère (Sepasi Tehrani et Moosavi-Movahedi, 2018). Les organismes vivants aérobiques expriment les gènes codants pour cette enzyme à des fins de protection oxydative (Hentges, 1996) (Figure 1.13). Un groupe de chercheurs souhaitant soulager les complications gastroentériques a mis au point une formulation délivrant la diamine oxydase et la catalase au niveau du colon (Calinescu et al., 2012) (Figure 1.14). De pair, la catalase s'assure d'éliminer le H₂O₂ provenant du produit secondaire de la dégradation de l'histamine par la DAO. L'excipient permet de transloquer par voie orale les agents bioactifs jusqu'à l'endroit cible du tractus intestinal. Le choix de l'excipient est : Un mélange de carboxymethyl amidon (CMA) et de chitosan (Ch). CMA s'était établi comme un excipient hors pair pour la résistance au pH de l'acide gastrique. Une fois l'estomac franchi, l'excipient composé de CMA se retrouve dans l'intestin où il se dégrade graduellement tout en libérant doucement l'ingrédient thérapeutique (Calinescu et al., 2012). La combinaison de CMA et Ch accentue la résistance dans le milieu intestinal. Par cet agencement, l'excipient formé de CMA et Ch, non seulement franchit l'acidité gastrique, mais aussi augmente son temps de résidence dans l'intestin (Assaad et al., 2012). L'effet global est une libération



Figure 1.13 Effet protecteur de la catalase chez les organismes aérobiques. Les organismes aérobiques expriment la catalase comme moyen de défense contre les effets toxiques de l'oxygène. D'après (Hentges, 1996).



Figure 1.14 Images des formes pharmaceutiques types comprimées contenant la diamine oxydase et la catalase. SGF et SIF sont les fluides gastriques et intestinales simulés respectivement. D'après (Calinescu *et al.*, 2012).

prolongée de l'agent thérapeutique. En bref, le ratio de CMA et Ch constituant l'excipient influence le temps de libération de l'agent thérapeutique. Une autre expérience s'est basée sur le principe d'addition pellicule-par-pellicule (LBL) (Yu et Caruso, 2003). L'expérience visait la formation de pellicules consécutives de poly(allylamine hydrochloride) (PAH), poly(sodium 4-styrene-sulfonate) (PSS) et de catalase (Figure 1.15). Les conclusions de ce travail étaient que la formation de pellicules polyélectrolytiques (PE) évitait la perte des enzymes dans la solution, protégeait les enzymes contre les conditions défavorables (pH et température élevés) et accroissait la densité de molécules bioactives. De plus, le contact direct entre l'électrode et l'enzyme était contourné. Ces observations étaient importantes pour la conceptualisation de biosenseurs prospectifs. En électrochimie, plusieurs travaux ont suscité de l'intérêt en employant cette enzyme. Parmi les plus pertinents, il y avait la synthèse de nanoparticules de silice enrobées de catalase et détectées uniquement lorsqu'à proximité de l'électrode (Chan et al., 2017). Des plans pour étudier l'activité enzymatique par électrochimie de nanocollisions stochastiques (SNCEC) sont aussi en vigueur (Kätelhön et al., 2016). Il y avait la modification d'une électrode de carbone avec la catalase pour souligner l'effet favorable dans la direction des réactions de réduction de l'oxygène (ORR) (Lai et Bergel, 2000; Sepunaru et al., 2016). Ces mêmes études ont tenté de fixer la catalase directement sur l'électrode et d'effectuer des transferts directs d'électrons avec le fer du groupement prosthétique, telles que mentionnées précédemment. Cette technique est applicable seulement aux enzymes oxydoréductrices dont les centres conducteurs ne sont pas trop enfouis dans le cœur hydrophobe de la protéine (Kalinowska et al., 2017).



Figure 1.15 Mesures de potentiel zêta après chaque ajout de pellicule. Les valeurs négatives correspondent au PSS et les valeurs positives au PAH renfermant la catalase. D'après (Yu et Caruso, 2003).

1.3 Études cinétiques enzymatiques

Les enzymes sont des agents bioactifs assurant les réactions menant à la vie. Dans l'organisme humain, une étude computationnelle estime qu'au moins 2 709 enzymes participent aux bioréactions (Romero *et al.*, 2005). L'isolement et l'étude d'une de ces enzymes révèle de l'information précieuse autant sur les paramètres cinétiques que sur le plan structural, mécanistique et chimique. Les paramètres cinétiques souvent déterminés lors d'études cinétiques enzymatiques sont ceux du modèle Leonor Michaelis-Maud Menten. La transformation de Hans Lineweaver-Dean Burk est un processus utile pour traiter les données respectant le modèle de Michaelis-Menten. Le traitement des données provenant des mesures d'activités enzymatiques donne lieu à l'obtention des valeurs de la constante de Michaelis (K_m) et la vitesse maximale (V_{max}). Des études calorimétriques peuvent aussi mener à ces constantes. Cependant, elles

façonnent en associant la chaleur de réaction avec l'énergie d'activation (E_a) (ou l'enthalpie apparente de la réaction enzymatique ΔH_{app}). Par cette voie, il est toutefois aussi requis de connaître l'ordre de la réaction de l'enzyme étudiée (Todd et Gomez, 2001; van Schie *et al.*, 2018). Sans compter que l'imagerie n'est pas encore possible par calorimétrie, tandis que c'est un des atouts de la microscopie électrochimique à balayage en cellule (SECCM).

1.3.1 Le modèle de Leonor Michaelis et Maud Menten

Afin de se familiariser cinétiquement avec l'enzyme d'intérêt, une série de mesure est nécessaire. Dans cette approche, il faut reconnaître que les enzymes, à concentration constante, catalysent une réaction dont la vitesse dépend seulement de la quantité d'enzymes, de substrats et de produits. Ce postulat simple est soutenu par un raisonnement logique décrit ci-dessous (Berg *et al.*, 2002). Visualisant les évènements se produisant, plusieurs étapes sont concevables. La première étape est la collision immédiate des molécules de substrats avec les enzymes. Les enzymes convertissent les substrats en intermédiaires enzymes-substrats, ensuite en produits. Cette réaction est décrite par :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\longmapsto}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\longmapsto}} E + P \qquad (Équation 1.5)$$

Les variables *E*, *S*, *ES* et *P* sont respectivement l'enzyme, le substrat, le complexe intermédiaire enzyme-substrat et le produit. Les constantes de vitesse $(k_1, k_{-1}, k_2 \text{ et } k_{-2})$ sont relatives à la conversion d'enzymes et de substrats en complexes enzymessubstrats, au retour des complexes enzymes-substrats en enzymes et substrats, à la conversion des complexes enzymes-substrats en produits et la réaction inverse. Pour beaucoup d'enzymes, l'étape limitante de cette réaction se situe au niveau de k₂. Pour d'autres, comme la catalase, ce n'est pas forcément le cas. Cette distinction en lien avec l'efficacité catalytique sera abordée dans quelques sections. La catalase a une faible constante d'affinité pour son substrat, H₂O₂, puisqu'elle possède une constante catalytique hors-pairs (16 000 000 à 44 000 000 s⁻¹) et puisqu'à de hautes concentrations de H_2O_2 des effets délétères oxydatives font changer ses propriétés cinétiques (Heck *et al.*, 2010; Lardinois *et al.*, 1996). Les enzymes, en condition physiologique, forment le produit de la réaction irréversiblement (Gready, 1980). Pour catalase, la constante k₋₂ est nulle aussi. Ce qui introduit :

$$E + S \xrightarrow[k_{-1}]{k_{-1}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$
 (Équation 1.6)

Subitement après la libération du site actif de l'enzyme, un second substrat prend place et poursuit la réaction. C'est à cette étape, et celles subséquentes, que débutent les changements de l'activité enzymatique proportionnelle à l'adaptation de l'enzyme face à la concentration de substrat H₂O₂ lui étant présentée (Figure 1.16). Le tracé d'une courbe de Michaelis-Menten se fait en maintenant une concentration constante d'enzymes exposées à différentes concentrations de substrat. Pour chaque concentration de substrat, le suivi peut se faire par différentes techniques instrumentales (Figure 1.17). Ces méthodes d'analyses ne s'appliquent pas exactement à ce projet. Puisque l'information obtenue par électrochimie pour un temps donné (s) est indicatrice d'un taux de consommation, exprimé en concentration par unité de temps, à la portion de la solution environnant l'électrode. Autrement dit, chaque point de mesure du courant est une vitesse enzymatique. Il suffit de sélectionner un des points au stade stationnaire de la progression enzymatique. Ceci est dissimilaire aux cas où ces figures s'appliquent (ex. spectrophotométrie) qui informent pour un temps donné (s) la concentration actuelle de produits ou de substrats en solution (Beers Jr et Sizer, 1952). Là, il est requis de tracer la tangente à la partie linéaire et d'en extraire la pente, correspondant à la vitesse enzymatique. Des techniques également applicables, comme la calorimétrie (Johansson et al., 1976; Todd et Gomez, 2001; van Schie et al., 2018), ou des techniques électrochimiques combinées à la pneumatique (Han et al., 2009), font aussi allusion à de la théorie plus complexe. Chaque technique à ses avantages.



Figure 1.16 Courbe Michaelis-Menten : Évolution de la vitesse catalytique d'une enzyme en fonction de la concentration du substrat. À des faibles concentrations de substrat, la vitesse catalytique augmente linéairement, tandis qu'à des concentrations plus élevées, elle stagne. La forme de la courbe enzymatique est parabolique. La constante de Michaelis (K_m) est définie comme la concentration du substrat à laquelle la vitesse catalytique de l'enzyme est la moitié de la vitesse maximale.

Dans ce projet, la technique de microscopie électrochimique à balayage en cellule (SECCM) sera utilisée. Cette technique d'analyse surpasse celles spectrophotométriques et calorimétriques au niveau de la résolution temporelle et en plus d'une capacité topographique de la surface échantillonnée. Plus encore, elle est plus informative puisqu'elle mesure spécifiquement une population enzymatique locale, donc chiffrée et visuellement observable. De ce fait l'interaction mesurée serait incontestablement celle des particules topographiées. Sans compter que la mesure se fait sur une surface sèche, dépourvue de tout complication en lien avec la perte d'enzymes par dissolution.



Figure 1.17 Essai enzymatique typique d'une seule concentration donnée de substrat. C'est possible de suivre soit le taux de disparition du substrat, ou le taux d'apparition du produit. Pour chaque essai enzymatique, le segment de la courbe réponse correspondant à l'activité enzymatique initiale, avant l'atteinte de l'étatstationnaire du substrat, reflète la vitesse catalytique à extraire. Une tangente à cette portion de la réponse est superposée et la pente de cette tangente est la vitesse catalytique de l'enzyme à la concentration de substrat donnée.

1.3.2 Les équations du modèle de Michaelis-Menten et la transformation de Lineweaver-Burk

Cette section couvre la compréhension du modèle enzymatique de Michaelis-Menten ainsi que la transformation en la double réciproque de Lineweaver-Burk. L'utilité de ce modèle est d'en ressortir des paramètres cinétiques propres à l'enzyme à l'étude. Dans ce travail, l'enzyme à l'étude est seulement la catalase, bien que la technique pourrait éventuellement s'étendre à d'autres enzymes ayant au moins un produit ou un substrat électroactif et/ou capable d'effectuer des transferts d'électrons directement avec l'électrode de travail. Puisqu'il s'agit d'enzymes immobilisées sur la surface d'un support, les termes de la constante de Michaelis (K_m) prendront la forme de la constante de Michaelis apparente soit (K'_m). L'enzyme sous cette forme est spatialement orientée différemment que lorsque libre en solution.

$$K_m \approx K'_m = \frac{(k_{-1}+k_2)}{k_1}$$
 (Équation 1.7)

Prenant compte cette contrainte, les sites actifs ne sont peut-être pas tous aussi prédisposés à la catalyse, quelques enzymes peuvent avoir subi une dénaturation pendant le processus de fixage, une double couche de diffusion peut limiter l'accès du substrat à l'enzyme et/ou la sortie du produit empêchant un échange substrat-produit favorable à la catalyse enzymatique, et d'autres raisons encore (Mosbach, 1976).

1.3.2.1 Le modèle de Michaelis-Menten

La dérivation de l'équation de Michaelis-Menten est tirée de la littérature (Berg *et al.*, 2002). Pour l'appliquer, il est fondamental d'adopter deux suppositions :

- Le moment de la réaction enzymatique étudiée est à un stade où la concentration de produit formé est nettement inférieure à la concentration du substrat ([P]<<<[S]). À cet instant, la vitesse catalytique est considérée la vitesse initiale;
- ii) La concentration du substrat dépasse largement celle de la concentration des enzymes participantes à la réaction de la catalyse ($[S] >>> [E_T]$).

Spécifiquement dans le cadre de ce travail, le moment de la réaction enzymatique étudié n'est pas forcément le début. Contrairement aux autres méthodes dont la spectrophotométrie ou la calorimétrie, cette étude électrochimique enzymatique prend compte que l'enzyme catalyse spontanément la réaction à la rencontre du substrat. La vitesse de la réaction est donc limitée par le flux de la solution à travers le réservoir de la pipette. En ces termes, les suppositions du modèle de Michaelis-Menten risquent de ne pas être respectées.



Figure 1.18. Gradient de substrat H_2O_2 formé à l'extrémité de la pipette. Quand l'état-stationnaire du système pipette-enzyme est atteint, un gradient de substrat à l'extrémité de la pipette assure le transport continue d'un flux constant de substrat H_2O_2 aux enzymes par l'intermédiaire de la gouttelette (voir section 1.1.8).

D'après ce système, la dynamique du circuit enzymatique atteint un état constant : la quantité de substrat consommé par les enzymes est stable. Au fur et à mesure que le substrat est consommé, un flux provenant du réservoir de la pipette assure continuellement un apport égal de substrat en fonction du temps, aux enzymes. D'où l'apparition d'un gradient (Williams *et al.*, 2009) (Figure 1.18). Par simple diffusion, le produit formé est partiellement dissout ou spontanément éloigné de la couche

enzymatique. Probablement diffus dans l'atmosphère immédiate à la gouttelette tampon phosphate/substrat électrolytique. Dans la nature, c'est commun de retrouver une accumulation d'oxygène dans les eaux, au-delà de la saturation. Autrement dit, il surgit une augmentation locale de O_2 (Li *et al.*, 2010). Dans ce montage, aucune force empêche la diffusion de O_2 formé dans l'atmosphère immédiate, donc la supersaturation de la solution en O_2 ne sera pas considérée. Le produit formé de la catalyse enzymatique est un gaz, et la catalase ne possède pas un site actif catalytique pour la réaction inverse. D'où l'impossibilité d'inverser l'équilibre de cette réaction. Il est prévu qu'à des différentes concentrations de substrat, la vitesse catalytique sera différente. Ces différences pourraient compter pour le tracé d'une courbe Michaelis-Menten :

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{(\kappa'_m + [S])} = \frac{V_{max}[S]}{(\kappa'_m + [S])}$$
(Équation 1.8)

L'équation qui décrit la forme parabolique de la courbe du modèle Michaelis-Menten est donnée ci-haut (Figure 1.16). Elle explique qu'à de faibles concentrations (où $[S] \leq \leq [K'_m]$), la vitesse de la réaction V_o est entièrement fonction de la concentration de substrat, soit :

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{(\kappa'_m)}$$
 (Équation 1.9)

Tandis que, lorsque la concentration du substrat dépasse un certain seuil ($[S] >>> [K'_m]$), la vitesse de la réaction V_o fait un plateau à la valeur de V_{max} .

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S]} = V_{max}$$
 (Équation 1.10)

1.3.2.2 La signification des paramètres cinétiques Km (ou K'm), Vmax et kcat

Les paramètres cinétiques K_m et k_{cat} servent de critères pour classifier et caractériser les propriétés cinétiques des enzymes. La constante de Michaelis K_m (ou apparente K'_m) est la concentration de substrat à laquelle une enzyme atteint la moitié de sa vitesse catalytique maximale, soit $V_{max}/2$.

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{(\kappa'_m + [S])} = V_{max} \frac{[\kappa'_n]}{[\kappa'_m + \kappa'_m]} = V_{max} \frac{[\kappa'_m]}{2[\kappa'_m]} = \frac{V_{max}}{2} \quad (\text{Équation 1.11})$$

Cette constante K_m (ou K'_m) a deux significations majeures.

i) Elle est indicatrice de la concentration à laquelle il peut y avoir catalyse significative d'une réaction. Elle correspond à la concentration à laquelle la moitié des sites actifs sont occupés. Quand elle est connue, il est possible de calculer la fraction des sites actifs occupés (f_{ES}) par un substrat à une concentration donnée, soit :

$$f_{ES} = \frac{V_0}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]} ou \frac{[S]}{K'_m + [S]}$$
 (Équation 1.12)

ii) Dans les situations où $k_1 >>> k_2$, c'est-à-dire où la dissociation du complexe enzymesubstrat [ES] est plus favorable au retour vers les substrats ([E] et [S]) que vers les produits ([E] et [P]), K_m (ou K'_m) devient représentative de la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat [ES]. Cette propriété est observable par l'équation 1.7, quand K_m (ou K'_m) est définie pour la première fois.

$$K_m \approx K'_m = \frac{(k_{-1}+k_2)}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$
 (Équation 1.13)

Quand cette condition est rencontrée, K_m (ou K'_m) devient une mesure de la force retenant le complexe [ES]. Une valeur de K_m (ou K'_m) élevée signifie une faible affinité et vice-versa. Ceci est exclusivement valide lorsque la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (k_1) est beaucoup plus élevée que la constante de vitesse de la réaction (k_2) soit $k_1 >>> k_2$. Ce qui n'est pas le cas de la catalase.

La vitesse maximale (V_{max}) est révélatrice du taux catalytique (k_2) de l'enzyme. Ce dernier est le taux auquel une enzyme convertit le substrat en produit lorsque tous ces sites sont occupés par le substrat. Cette constante est aussi appelée k_{cat} . Pour connaître la valeur de cette constante, les paramètres V_{max} et [E_T] doivent être connus. L'équation reliant ces paramètres est 1.14.

$$V_{max} = k_2[E_T]$$
 (Équation 1.14)

1.3.2.3 La perfection catalytique

Certaines enzymes ont développé, au cours de l'évolution, des astuces biologiques pour optimiser leur efficacité catalytique. C'est dès lors que fait surface le terme de perfection catalytique. Dans les conditions physiologiques, une enzyme est normalement exposée à une quantité de substrat raisonnable. Contrairement à la circonstance de sites actifs saturés décrite par l'équation 1.14 où k_2 (ou k_{cat}) règne le taux réactionnel, la vitesse catalytique est principalement influencée par le quotient $[S]/K_m$ (ou $[S]/K'_m$) vu dans l'équation 1.9. Généralement, le quotient occupe un nombre entre 0.01 et 1.

$$V_o = \frac{k_{cat}}{\kappa_m} [S][E] \approx \frac{k_{cat}}{\kappa'_m} [S][E]$$
 (Équation 1.15)

Quand $[S] \leq [K_m]$ (ou $[K'_m]$), la concentration d'enzymes libres [E] devient la concentration d'enzymes totale soit $[E_T]$.

$$V_o = \frac{k_{cat}}{\kappa_m} [S][E_T] \approx \frac{k_{cat}}{\kappa'_m} [S][E_T]$$
 (Équation 1.16)

Les variables servant de points de repère pour la comparaison entre différentes enzymes et mêmes différents substrats pour le même enzyme sont k_{cat} et K_m (ou K'_m), donc ultimement le quotient k_{cat}/K_m (ou k_{cat}/K'_m).

En décortiquant ce quotient, il devient concevable d'évaluer l'efficacité réelle d'une enzyme. En réalité, cet exercice montre que les enzymes "parfaites" sont limitées uniquement par la diffusion du substrat. En d'autres mots, la seule limitation catalytique de certaines enzymes est la fréquence à laquelle elles rentrent en collision avec le substrat. Pour accroître les probabilités de collisions, l'évolution leur a donné des forces électrostatiques. Ces accessoires bénéfiques sont poétiquement référés par les *effets Circe* (Berg *et al.*, 2002).

$$\frac{k_{cat}}{\kappa_m} \approx \frac{k_{cat}}{\kappa'_m} = \frac{k_{cat}}{(k_{-1} + k_{cat})/k_1} = \frac{k_{cat}}{(k_{-1} + k_{cat})} k_1 < k_1$$
 (Équation 1.17)

La valeur du quotient k_{cat}/K_m (ou k_{cat}/K'_m) se voit limitée à sa borne maximale par k_1 , le taux de formation du complexe enzyme-substrat [*ES*]. Ce taux ne peut pas dépasser la fréquence des collisions entre l'enzyme libre et le substrat, donc est limité par la diffusion des espèces en solution. La diffusion limite la valeur de k_1 entre 10⁸ et 10⁹ s⁻¹ ¹ M⁻¹. Alors, les valeurs les plus élevées du quotient k_{cat}/K_m (ou k_{cat}/K'_m) pouvant être atteintes par les enzymes les plus performantes sont dans le même ordre 10⁸ et 10⁹ s⁻¹ M⁻¹.

Enzyme	$k_{\rm cat}/K_{\rm M}~({\rm s}^{-1}{ m M}^{-1})$
Acetylcholinesterase	1.6 × 10 ⁸
Carbonic anhydrase	8.3 × 10 ⁷
Catalase	4 × 10 ⁷
Crotonase	2.8 × 10 ⁸
Fumarase	1.6 × 10 ⁸
Triose phosphate isomerase	2.4 × 10 ⁸
β-Lactamase	1 × 10 ⁸
Superoxide dismutase	7 × 10 ⁹

Tableau 1.1Enzymes ayant atteint la perfection catalytique. D'après (Berg et
al., 2002).

Le Tableau 1.1 expose quelques enzymes ayant atteint ou qui sont proches de la perfection catalytique. Bien entendu, la perfection catalytique est une caractéristique établie selon le modèle de Michaelis-Menten.

1.3.2.4 La double réciproque de Hans Lineweaver et Dean Burk

Il s'avère incommode d'extraire les paramètres cinétiques K_m (ou K'_m) et V_{max} directement à partir de la courbe Michaelis-Menten à cause de sa forme parabolique. Une alternative proposée par Hans Lineweaver et Dean Burk en 1934 était de transformer les données en x (concentration du substrat [S]) et en y (vitesse catalytique $[V_o]$), en prenant leur réciproque (Figure 1.19). Appliquant ce principe à l'équation 1.8, projette le suivant

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K'_m + [S]}{v_{max}[S]} = \frac{K'_m}{v_{max}} \left(\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{v_{max}}$$
(Équation 1.18)

L'équation de la double réciproque prend dorénavant la forme d'une équation linéaire

$$y = ax + b$$
 (Équation 1.19)

Cette équation a comme pente K_m/V_{max} (ou K'_m/V_{max}), ordonnée à l'origine $1/V_{max}$ et intersection avec l'axe des abscisses (y=0) $-1/K_m$ (ou $-1/K'_m$). Avec cette transformation, un simple traitement linéaire renseigne sur les paramètres cinétiques enzymatiques importants.



Figure 1.19 Droite issue de la double réciproque de la courbe Michaelis-Menten (insert - Figure 1.16). L'ordonnée à l'origine représente $1/V_{max}$, la pente représente K_m/V_{max} (ou K'_m/V_{max}) et l'intersection avec l'axe des abscisses représente $-1/K_m$ (ou $-1/K_m$).

CHAPITRE II

LE MODÈLE EXPÉRIMENTAL

L'établissement des bonnes habitudes consistantes était un devoir pour la réussite de ce projet. Le moindre détail involontaire pouvait éventuellement perturber toute une série de données, en semant le doute dans la vraisemblance des résultats. En plus, à cause des mesures provenant de cette technique peu explorée, les protocoles et procédures étaient à définir commençant de presque rien, ou du strict minimum. Une première partie des pratiques fait lien avec les outils de base, la préparation des sondes, le conditionnement des échantillons, la préparation des solutions et la stratégie du montage. Une seconde décrira les instruments de cette expérience et leur rôle. Une troisième mettra en contexte la faisabilité de l'expérience en introduisant un système modèle reproductible. Finalement l'application cartographique de cette technique à l'étude est abordée.

2.1 Les matériels, les appareils et les préparations

Les sections qui suivent détailleront les types d'outils, les instruments utilisés et les préparations des échantillons ou des montages.

2.1.1 Le matériel

Afin d'aboutir aux conditions expérimentales favorables, certains outils étaient nécessaires. Bien que ce ne sont pas forcément les seuls outils pouvant mener à une mesure satisfaisante, ils s'étaient montrés systématiquement efficaces. On comptait, les sondes micropipettes, les plaques d'électrodes de carbone vitreux, la bobine de fil d'argent, un rouleau de téflon, de la gommette bleue, un support magnétique à échantillon, du ruban adhésif double côté, de la peinture d'argent, un thermomètre (allant au moins à 100°C), des petites et grandes boîtes de pétri, des papiers et tissus essuyant et des pinces. Autres que les objets, les réactifs d'utilités étaient l'enzyme biologique catalase du foie bovin lyophilisée (sku# C1345, Sigma-Aldrich Canada Co., Oakville, Canada), du dichloro-dimethyl-silane (Sigma-Aldrich Canada Co, Oakville, Canada), du tampon phosphate (0.067 M 10x -magnesium et -calcium, Hyclone, Missisauga, Canada), des billes de polystyrène-carboxylate 200 nm (Phosphorex, Hopkinton, États-Unis), l'acide sulfurique concentré (95-98 % M/V), du peroxyde d'hydrogène (30 % M/V), de l'eau désionisée, du chlorure de sodium, du ferricyanure, et des solvants organiques dont l'acétone et le méthanol (ACS).

2.1.2 L'appareillage

Pour la mise en œuvre du projet, plusieurs instruments devaient être assemblés (Figure 2.1). L'instrument complet était un microscope électrochimique à balayage en cellule (SECCM). Cet instrument était un assemblage d'un microcontrôleur contrôlant trois étages mobiles (x-y-z) en plus d'un moteur à déplacement fin (z seulement) intégré d'un cristal piézoélectrique. Ce cristal était responsable du mouvement sensible au nanomètre près. L'échantillon était déposé sur l'étage motile en x-y et la sonde était fixée sur un porte-pipette rattaché sur le moteur piézoélectrique, qui lui à son tour était immobilisé sur le composant du microcontrôleur se déplaçant sur l'axe vertical (z). Le microscope était composé de 2 boîtes contrôleurs (miCos/PI Instruments SMC Corvus Desktop et E-665 Piezo-Amplifier/Servo Controller, Auburn, USA) et d'une caméra

numérique (Dinolite, New Taipei City, Taiwan) servant à synchroniser les étages avec les commandes de l'usager. Pour l'utilité de ce travail, ces contrôleurs ont été adaptés



Figure 2.1 Montage du microscope électrochimique à balayage en cellule (SECCM).

à des mesures électrochimiques à balayage en cellule. La composante électronique des mesures exigeait un émetteur et lecteur de signaux électriques. Dans ce cas, il s'agissait du potentiostat (Heka PG340 USB, Lambrecht/Pfalz, Germany). Dans le cas des mesures électrochimiques macroscopiques, un différent potentiostat (Solartron 1470 Battery Test Unit, Hampshire, United-Kingdom) était utilisé. Les autres instruments concernés étaient le microscope à force atomique (Multimode6 de Bruker, Santa Barbara, USA), un système de revêtement par rotation (Laurell WS-650-23, North

Wales, USA), un microscope à lumière visible à éclairage du haut (Nikon Eclipse LV150 couplé à un convertisseur numérique NIS Instruments, Cambridge, Canada), un microscope à lumière visible à éclairage du bas (Nikon Eclipse 50i, Cambridge, Canada), un tireur à laser CO₂ (Sutter P-2000, Novato, USA), un microscope électronique à balayage (JEOL JSM7600F, Tokyo, Japan) et un spectrophotomètre UV-Vis (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). D'autres équipements et verreries standards de laboratoires ont été utilisés, par exemple des balances analytiques, des ballons jaugés et des capillaires (1.00 mm OD x 0.8 mm ID de VitroCom). Toutes les mesures ont été produites à température de pièce. Chaque instrument occupait une fonction définie dans la préparation des échantillons et dans la prise des mesures, qui sera discutée dans la section suivante.

2.1.3 Les cellules électrochimiques macroscopiques

Une cellule électrochimique à trois ouvertures était remplie de la solution à l'étude et dégazée (si nécessaire). Chaque ouverture servait d'entrée pour l'électrode de travail en carbone vitreux 3 mm de diamètre (BasI, West Lafayette, USA), l'électrode de référence saturée Ag/AgCl (BasI, West Lafayette, USA), la contre-électrode étant une maille de platine (Alfa Aesar, Tewksbury, USA) et l'aiguille à gaz. L'aiguille du jet d'argon (pureté 4.8) servait à dégazer partageait l'entrée avec soit l'électrode de travail ou la contre-électrode. Toutes les ouvertures de la cellule étaient bouchées avec de la paraffine ou avec un bouchon en caoutchouc pour éviter des fuites d'argon ou des infiltrations de dioxygène. La solution contrôle et le solvant étaient de l'eau désionisée saline (100 mM KCl) pour les expériences sur le ferricyanure/ferrocyanure et l'H₂O₂. Pour les mesures de ferricyanure/ferrocyanure, la solution contrôle était supplémentée jusqu'à 2 mM en ferricyanure de potassium. Pour celles du H₂O₂ et de catalase, l'ajout du H₂O₂ se faisait directement dans la cellule électrochimique, aux volumes nécessaires. La démonstration de l'effet du H₂O₂ sur le courant cathodique invoquait l'ajout successif d'aliquotes de H₂O₂ pour atteindre les concentrations de 0.1, 1, 2, 5, 10 et 25

mM. Lorsqu'il s'agissait des mesures de l'effet de catalase, l'électrode de carbone était retirée de la solution, rincée et 15 μ L d'une solution de 100 mg/mL de catalase était déposé sur l'électrode de carbone. L'électrode était laissée sécher pendant 2 heures avant d'être remise dans la solution réactionnelle. À l'instant où l'électrode était replongée dans la solution réactionnelle, le balayage voltammétrique était mis en marche.

2.1.4 La préparation des échantillons de la microscopie électrochimique à balayage en cellule

Dans l'ordre, une séquence de mesure commençait par la découpure de plaques de carbone vitreux (Alfa Aesar, Tewksbury, États-Unis) en de petits morceaux d'environ 1 cm x 0.5 cm avec un coupeur à diamant. Les fragments suivaient une période de submergement de 20 minutes dans une solution «piranha» de 7.5 mL (6 : 1.5 acide sulfurique : peroxyde d'hydrogène) sous agitation constante, chauffée à 60°C. Une pause après 10 minutes de lavage était prise pour frotter l'électrode avec un tissu non-tissé, délicat, propre et jetable, avant de reprendre la séquence de nettoyage. Lorsque le temps de lavage était terminé, l'électrode baignant dans la solution piranha était procéduralement retirée et frottée délicatement. La solution piranha est idéale car elle réagit violement avec toutes traces d'impuretés organiques, formant du dioxyde de carbone, qui s'échappe de la solution sous forme de gaz. En plus, toutes traces de métaux sont rapidement dissoutes dans la solution excessivement acide et réactive. Après traitement, la surface de l'électrode devenait lisse, hormis quelques déformations intrinsèques aux matériaux (Figure 2.2).



Figure 2.2 Images obtenues par microscopie à force atomique de la surface de l'électrode de carbone vitreux après nettoyage. Pour la plupart de la zone balayée, la surface était lisse. À l'exception de quelques déformations intrinsèques du matériau qui étaient visibles aux deux premiers agrandissements. Quoiqu'aux agrandissements supérieures, la surface était plane.

Une paire de pince en fer avec les extrémités recouvertes de téflon était adaptée à la solution piranha. Ce n'était pas pratique d'employer une pince métallique nue pour récupérer le morceau de carbone fraichement traité, car une pince métallique se solubilise facilement en milieu acide libérant des résidus métalliques en solution. Le téflon autour de la pince protègeait la pince métallique de cet effet. Immédiatement après le retrait, le substrat de carbone était rincé abondamment avec de l'eau désionisée pour le débarrasser des molécules d'acides encore adhérées à la surface. La plaque était doucement frottée sur du tissu non-tissé, délicat et propre pour amorcer l'assèchement sans laisser des marques d'eau évaporée. Finalement la plaque était prête à servir comme contrôle carbone vitreux propre ou comme support d'accueil à la fonctionnalisation enzymatique. En enchaînant la préparation de l'échantillon de l'électrode de carbone nouvellement conditionnée, l'électrode de carbone était minutieusement déposée sur un porte-échantillon magnétique dédié à l'AFM. À ce moment, il était possible de fonctionnaliser l'électrode avec une solution enzymatique

47
de 1.7 mg/mL dans du PBS typiquement au pH physiologique. Pour la fonctionnalisation, une petite goutte de la solution bien mélangée était déposée sur la plaque de carbone recouvrant le quart de la plaque. La plaque, préalablement montée sur le porte-échantillon magnétique, était soumise au revêtement par rotation à une vitesse de 9 000 RPM pendant 2 min, accélérant à une cadence de 100 RPM/s. Après ce, l'électrode de carbone vitreux modifiée était observée par AFM. Une fois les observations terminées, l'électrode sur la plaque magnétique était collée au fond d'une petite boîte de pétri avec du ruban adhésif deux côtés. Ensuite, un fil d'argent était retenu sur l'électrode en le fixant avec de la gommette bleue aux deux bordures de la boîte de pétri. Le fil d'argent était maintenu au-dessus de l'électrode de carbone (Figure 2.3-A). En bref, le fil d'argent est un intermédiaire pour soutenir le contact électrique entre les pinces alligators du potentiostat et l'échantillon (Figure 2.3-B).



Figure 2.3 Échantillons conditionnés pour les mesures microscopiques. (A) Schéma illustrant la fixation de l'électrode de carbone vitreux modifiée avec la catalase. (B) L'effet fortifiant du contact électrique sur l'échantillon par la colle d'argent conductrice.

De la peinture d'argent intensifie le contact physique entre le fil d'argent et l'électrode de travail afin d'assurer une meilleure continuité du courant. De nombreuses méthodes de fonctionnalisation ont été tentées pour fixer la catalase sur la surface de l'électrode de carbone, et ce, à une multitude de concentrations différentes. Il y a encore des combinaisons différentes à essayer pour étudier la morphologie et la réactivité des fixations conséquentes. Certaines expérimentations étaient produites avec de très basses concentrations d'enzymes, soit une dizaine de microlitre (dépendant de la largeur de la surface de l'électrode de carbone) de catalase d'une solution de 0.4 mg/mL de catalase stock du foie bovin dans de l'eau désionisée ou du PBS, adhérées par revêtement par rotation à des vitesses et accélérations variables. Il y avait aussi des solutions très concentrées de catalase 40 mg/mL qui ont été déposées sur l'électrode de carbone afin d'en observer les effets. Évidemment, l'électrode de carbone propre servait toujours de contrôle négatif, sans enzymes. Une gamme de concentrations entre 0.1 et 40 mM (soit une fenêtre de 3.5 ordres de grandeurs) de H₂O₂ dans du tampon phosphate 6.7 mM typiquement pH physiologique a été étudié à température de pièce. Les solutions contenaient aussi 50 mM NaCl pour accroître la conductivité de la solution.

2.2 Les modèles étudiés

Comme pour toute expérience, un modèle fiable est un préalable exigé avant de proposer une nouveauté. C'est pour cette raison que pour le projet dont il s'agit, un système modèle était utilisé comme pilier pour le fondement de ce travail. Pour la première fois dans l'histoire de la microscopie électrochimique à balayage en cellule, il y avait tentative d'étude enzymatique. Avant les mesures microscopiques, une cellule macroscopique électrochimique à trois électrodes isolait le phénomène d'intérêt recherché. En commençant d'abord par une démonstration de la réversibilité du couple redox ferricyanure/ferrocyanure et du transfert mono-électronique. Prochainement, l'effet de diverses concentrations de H_2O_2 sur la réponse ampérométrique en

maintenant un seul potentiel de réduction, était noté. Ensuite l'exposition de l'effet de la catalase recouvrant une électrode macroscopique de carbone vitreux sur la hausse du courant aux potentiels réducteurs, au moment du contact avec une solution de H_2O_2 à diverses concentrations, fondait les bases de ce système. Ces deux mêmes systèmes étaient ensuite examinés par microscopie électrochimique à balayage en cellule, afin d'obtenir un portait localisé et hautement résolu de ces évènements catalytiques.

2.2.1 Mesures macroscopiques

Les montages des trois modèles, soient ferricyanure/ferrocyanure, H₂O₂ et catalase qui étaient premièrement abordés à l'échelle macroscopique, sont brièvement décrits dans les sections suivantes.

2.2.1.1 Modèle du ferricyanure

Un système modèle de base était à établir. L'usage d'un produit manifestant un signal électrochimique reconnaissable était indispensable. Avec ce but en vue, le composé de choix pour mettre en place le système modèle était le duo redox ferricyanure/ferrocyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆). Ce complexe est vastement utilisé dans les études électrochimiques en milieu physiologiques pour accroître le potentiel redox de la solution. Ce composé sert aussi de correcteur en photographie pour des fins de correction d'image. Comme dans le cas de ce travail de recherche, ce dernier est aussi appliqué comme système de référence (Niranjana *et al.*, 2009). Les justifications de son usage sont sa stabilité, sa réversibilité, son potentiel redox entièrement prévisible (≈ 230 mV vs. SHE) et son transfert d'électron unique figurant une séparation entre le potentiel anodique (E_a) et cathodique (E_c) d'exactement 0.059 mV.



Figure 2.4 Structures (A) de ferricyanure et (B) de ferrocyanure.

Au niveau de sa géométrie, l'atome de fer est chélaté par six ligands de cyanure adoptant une structure cristalline octaédrique, où les atomes de potassium se séparent du complexe ferrique lorsque dispersés en solution (Figure 2.4). L'électrode de travail était une électrode de carbone vitreux, l'électrode de référence était une électrode Ag/AgCl et l'électrode auxiliaire était une maille de platine. Une tige de dégazage à l'argon partageait l'ouverture avec l'électrode de travail ou l'électrode auxiliaire. La solution était dégazée préalablement aux mesures. Dans le contexte des mesures de cette section de l'expérience, la solution électrolytique de 100 mM KCl contenait un supplément de 2 mM de ferricyanure de potassium, la fenêtre de balayage était de + 0 à + 0.79 mV et la vitesse de balayage était de 100 mV/s. Le pH était typiquement neutre et la température était ambiante.

2.2.1.2 Modèle de H₂O₂

Une fois de plus, une cellule électrochimique à trois ouvertures est remplie d'une solution électrolytique de 100 mM KCl (voir section 2.2.1.1). La solution était dégazée avant d'ajouter des volumes de H₂O₂ 250 mM nécessaires pour aboutir à 1, 2, 5 et 10 mM. Les cycles voltammétriques étaient balayés dans l'intervalle de + 0.25 à - 1.25 V

51

(vs. Ag/AgCl) à une vitesse de balayage de 20 mV/s. Seulement le premier cycle est traité. Un second volet de ce modèle à potentiel statique gardé à -0.6 V (vs. Ag/AgCl) pendant 10 minutes, compilait les courants cathodiques après les ajouts successifs de volumes de H₂O₂ 250 mM nécessaires pour totaliser des concentrations de 0.1, 1, 2, 5, 10 et 25 mM dans une solution électrolytique de 50 mM KCl à pH neutre. Un délai de 30 secondes était alloué avant chaque ajout subséquent. Le courant à l'état stationnaire de l'ajout est pris pour le tracé de la relation du courant cathodique en fonction de la concentration de H₂O₂.

2.2.1.3 Modèle enzymatique de la catalase

Le même montage à trois électrodes est repris (voir section 2.2.1.1). La fenêtre et la vitesse de balayage sont les mêmes que pour le modèle du H_2O_2 (voir section 2.2.1.2). Seulement le premier cycle est traité. L'électrode était fonctionnalisée de la manière décrite précédemment (voir section 2.1.4).

2.2.2 Mesures microscopiques

Les mesures microscopiques sont plus délicates que celles macroscopiques. De cette perspective, une attention particulière se devait toujours porter sur la propreté des instruments de mesures et sur les conditions expérimentales, (i.e. nettoyage des fils conducteurs, nettoyage des surfaces, fraîcheur des solutions, calibration des équipements, quantité de vibrations terrestres, quantité de bruits électriques et mécaniques environnant, fragilité des pipettes sondes et l'indice d'humidité dans l'air). Les prochains paragraphes portent sur la préparation des sondes, le montage du SECCM et la procédure de prise de mesure. Les solutions étaient à pH physiologique et les mesures ont été toutes effectuées à température de pièce.

2.2.2.1 Préparation des sondes

Puisque les mesures par microscopie électrochimique sont localisées, la fabrication de sondes est prescrite. Les sondes en électrochimie sont variées. La liste est moins exhaustive pour la sonde en microscopie électrochimique à balayage. Elle est finalement distincte en microscopie électrochimique à balayage en cellule. Cette sonde est un capillaire tiré par un tireur à laser CO_2 (Sutter P-2000) donnant deux pipettes symétriques. Ces pipettes sont remplies de solution électrolytique adaptée à l'étude en question (Figure 2.5). Les pipettes retrouvées par suite des tirages sont légèrement variables de 8 à 15 μ m avec un programme à 3 lignes :

L1	HEAT 760	FIL 4	VEL 55	DEL 130	PUL	20
L2	HEAT 760	FIL 4	VEL 55	DEL 130	PUL	20
L3	HEAT 760	FIL 2	VEL 55	DEL 130	PUL	40



Figure 2.5 Un exemple de sonde (pipette) utilisée pour mener aux mesures électrochimiques à balayage en cellule. Chaque graduation sur l'échelle représente $10 \,\mu$ m, qui est environ le diamètre de l'ouverture de cette pipette. Elle est constituée de verre de quartz provenant d'un capillaire quartz 1.00 mm OD x 0.80 mm ID d'une longueur de 10 cm tirée par un tireur à laser (Sutter P-2000) avec un programme à trois lignes. L'image est obtenue à l'aide d'un microscope à lumière visible avec éclairage du bas.

Le remplissage des pipettes nécessitait une seringue connectée à un fin filament en quartz (Microfil). Assez fin pour infiltrer dans le réservoir de la pipette jusqu'à l'atteinte de la pointe. Le liquide était éjecté dans la pipette. La première solution était toujours la solution électrolytique contrôle. Les suivantes étaient soit du ferricyanure lors de l'établissement du modèle de ferricyanure/ferrocyanure ou différentes concentrations de H_2O_2 lors des mesures enzymatiques.

2.2.2.2 Le montage du SECCM

Déjà mentionné plus haut (section 2.1.1, 2.12 et 2.1.3), les composants instrumentaux majeurs du montage étaient les deux contrôleurs, le caméra microscope numérique, le potentiostat et les ordinateurs. Sur un ordinateur, le microcontrôleur, le microscope numérique et le potentiostat étaient opérés. L'autre ordinateur servait uniquement à manier le contrôleur piézoélectrique. Sachant que cet équipement devait être fonctionnel au nanomètre près, un ordinateur au complet était destiné à son service afin de prévenir les interférences. La pipette était montée sur le porte-pipette, avec un fil d'argent oxydé (QRCE) dedans qui la transformait simultanément en électrode de référence et contre électrode lorsque lié aux pinces alligators respectives du potentiostat. Les plaques de carbone modifiée ou non-modifiée étaient placées sur l'étage horizontalement mobile et le fil d'argent lui étant collé était connecté à la pince alligator de l'électrode de travail. Au départ, le microcontrôleur servait pour approcher la pipette au maximum de l'électrode de travail, toujours sans la toucher. Prochainement, le contrôleur piézoélectrique était mis en marche pour approcher doucement la pipette par des pas de 10 nm. Pendant l'approche, une mesure électrochimique de longue durée était activée. La moindre perturbation intervenait au sein du circuit causant un signal sur l'oscilloscope du logiciel synchronisé au potentiostat. Au moment où le ménisque du fluide au bout de la pipette établissait un contact physique avec la surface de l'électrode de travail, un signal remarquable surgissait (Figure 2.6). Ce phénomène est

connu sous le nom de capacitance. C'est un effet électronique qui a lieu lorsqu'une double couche ionique se forme presque



Figure 2.6 L'approche de la pipette sur la surface de l'électrode. Cette figure compte d'innombrables informations. Ce qu'elle reflète c'est la réponse électrochimique aux tous premiers temps de rencontre entre la sonde et la surface. Les processus qui ont lieu pendant ces quelques millisecondes peuvent contenir d'énormes valeurs scientifiques, encore méconnues actuellement. La mesure ciconcernée, est celle d'un ménisque de la solution contrôle électrolyte 50 mM NaCl à l'intérieur d'une pipette d'environ 10 μ m de diamètre qui touche la surface d'une plaque de carbone vitreux propre. La période de la mesure est d'environ 10 secondes avant que la sonde soit rétractée. Un gros plan de l'effet capacitif affiche que la durée de sa perdure 0.653 ms. Le potentiel est maintenu à – 0.75 V (vs. Ag/AgCl). Une transformation de Cottrell de ce segment de la réponse devrait générer une courbe linéaire.

immédiatement lors de la fermeture d'un circuit (Salitra *et al.*, 2000). Il y a eu des efforts pour tenter d'automatiser le processus de l'approche. C'est-à-dire programmer l'équipement de sorte qu'elle halte à l'instant où il y a contact. Théoriquement, l'ordinateur devrait avoir une réponse nettement supérieure à celui de l'humain. Hélas, la tentative de l'automatisation a entraîné d'autres complications. En revanche, le projet

continua en se reposant sur les réflexes humains. Les mesures enzymatiques de la décomposition de H_2O_2 par la catalase prévoyaient détecter l'oxygène produit sous l'effet de cette transformation enzymatique. L'oxygène produit était vraisemblablement détectable par l'électrode de carbone vitreux en maintenant un potentiel de réduction. Le potentiel requis pour détecter le produit de la réaction est dans l'intervalle de -0.5 à-0.9 V (vs. Ag/AgCl) (voir section 1.1.5). Pour cette raison, toutes les mesures étaient prises en gardant le potentiel à -0.75 V (vs. Ag/AgCl).

2.2.2.3 Mesures du ferricyanure

Un fragment d'électrode de carbone vitreux propre était placé sous le microscope électrochimique à balayage en cellule. Une pipette sonde d'environ 10 μ m de diamètre était remplie d'une solution 2 mM ferricyanure et 50 mM NaCl. Le balayage était effectué entre + 0.6 et – 0.45 V (vs. Ag/AgCl) à une vitesse de 20 mV/s. Seulement le premier cycle est retenu.

2.2.2.4 Mesures de l'effet de H₂O₂ et de catalase

Les étapes de la prise de mesures étaient suivies méthodiquement. Cette pratique assurait des résultats soigneux, organisés et comparables. L'étude enzymatique de la catalase par SECCM se voulait accomplie en variant la concentration de substrat tout en conservant la quantité d'enzyme uniforme. L'enzyme étant déjà immobilisée sur l'électrode, la concentration des solutions substrats était variée. Les solutions de 0, 0.5, 2, 5, 20 et 40 mM de H₂O₂ étaient préparées dans du PBS 6.7 mM avec 50 mM NaCl à pH physiologique. Pour chaque concentration la méthodologie suivante était suivie. i) Remplissage de la pipette avec la seringue et le microfil ii) photographie de la pipette remplie et témoignage de l'absence de bulles d'air pouvant fausser les observations iii) positionnement de la pipette sur le contrôleur et prise des mesures. Les mesures étaient prises à 4 répliques. Soient 4 sur l'électrode de carbone vitreux propre enchaînées de 4 sur l'électrode de carbone vitreux modifiée avec catalase. Chaque point de mesure

durait pour environ 10 secondes. Chaque déplacement d'un point à un autre était de 100 μ m sur l'axe des x. Facultativement, l'intervalle de temps entre chaque point était raisonnablement jugé pour comprendre la totalité des 8 mesures à l'intérieur de 1 000 secondes. iv) la pipette était rapportée sous le microscope afin d'être photographiée à nouveau et de consolider son intégrité physique. Elle était conservée sécuritairement en cas de référence à venir. v) Les deux électrodes échantillonnées étaient portées à un microscope à lumière visible à éclairage du haut. Les points échantillonnés étaient repérés à l'aide des traces laissées par les gouttelettes de la solution. À l'aide de ces mêmes traces, les aires recouvertes par ces électrodes étaient échelonnées en utilisant un logiciel d'imagerie (NIS Instruments). vi) Finalement le cycle était repris à l'étape i) jusqu'à épuisement ou complétion des concentrations à examiner. Les mesures ont été prises à température pièce.

2.2.2.5 La cartographie des complexes catalase et polystyrène-carboxylate

Une matrice composée d'un quadrillage 5 x 5 était obtenue en sondant 25 points espacés de 20 μ m sur les axes bidimensionnels x et y. La méthode d'échantillonnage consistait en l'enregistrement des données de courant à un potentiel de réduction de – 0.75 V (vs. Ag/AgCl) pendant environ 10 secondes, à chaque point. Tous les déplacements de la sonde par rapport à la surface étaient séquentiels, un déplacement sur chaque axe à la fois. Les déplacements horizontaux de 20 μ m sur x et y, ainsi que les déplacements verticaux de 100 μ m sur l'axe des z étaient exécutés à l'aide du microcontrôleur. Les déplacements fins verticaux étaient saisis au moyen du microcontrôleur piézoélectrique. Les échantillons examinés étaient l'électrode de carbone vitreux recouverte de particules agencées par des enzymes de catalase et des particules de polystyrène-carboxylate 200 nm. Le contrôle négatif pour l'enzyme était une électrode de recouvrement était la même que pour l'enzyme seule (revoir Section 2.1.4). La complexation des particules reprenait la solution fraichement

préparée de 1.7 mg/mL de catalase stock, et dans ce, 2 μ L de polystyrène-carboxylate 200 nm était additionné. La solution était mélangée pendant 30 secondes par vortex.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cette section débute avec les mesures macroscopiques et clôt avec les mesures microscopiques. Les mesures macroscopiques paraissent pour rappeler le fondement et l'intérêt scientifique des systèmes étudiés. Aussi, indirectement, elles justifient la pertinence de l'agrandissement apporté à travers les mesures microscopiques. En première partie, les mesures macroscopiques montrent un exemple du système de ferricyanure/ferrocyanure. Ensuite, l'effet de l'ajout du H2O2 sur le courant de réduction est discuté. Par ailleurs, l'activité catalytique de la catalase est démontrée. En deuxième partie, les mesures microscopiques tracent un premier parallèle avec le modèle de ferricyanure/ferrocyanure. De même, la preuve de conservation de la relation de proportionnalité entre le courant de réduction et la concentration de H₂O₂ autant à l'échelle microscopique qu'à l'échelle macroscopique est mise au clair. Une vue globale de l'effet enzymatique de la catalase est aussi discutée. L'analyse tend vers l'incompatibilité du modèle Michaelis-Menten dans cette étude. Cependant, une vue alternative des données microscopiques contredit totalement les observations précédemment établies à l'échelle macroscopique. En troisième partie, une application pratique dévoile la réussite de l'imagerie 3D en cartographiant la réponse électrochimique à un temps donné commun entre tous les points. En plus, la hauteur relative de la surface est aussi imagée en 3D. Ces tracés sont originaires d'une matrice de 25 points échantillonnés sur la surface de l'électrode de carbone vitreux modifiée par des complexes de polystyrène-carboxylate avec catalase et sans catalase. Cette preuve de principe surligne l'application de cette technique pour des études enzymatiques oxydoréductrices, de particules bioactives et cartographique.

3.1 Les mesures macroscopiques

Les résultats et explications des systèmes modèles macroscopiques du ferricyanure, H₂O₂ et catalase sont présentés. D'abord la voltammétrie cyclique du ferricyanure de potassium est présentée. Ensuite l'influence de l'oxygène et de H₂O₂ sur le courant de réduction est discutée. La proportionnalité du courant de réduction en fonction de la concentration de H₂O₂ est aussi prouvée. Enfin, l'effet de la catalase en solution contenant du H₂O₂ est visiblement exposé.

3.1.1 Ferricyanure

Le ferricyanure est populaire dans l'électrochimie. Le suffixe cyanure dans son nom risque de mettre mal à l'aise les individus, quoique sa constante de dissociation (K_d) est si faible que ce serait pratiquement impossible de dissocier le complexe. Exclusivement en milieu hautement thermique, à l'exposition accrue de lumière ou en condition acide, ferricyanure peut se dissocier et libérer du gaz sous forme d'acide cyanhydrique dont les ions cyanures sont hautement toxiques (Domingo *et al.*, 1990; Nauth *et al.*, 2015). L'électrochimie du ferricyanure est reconnue pour produire des voltammogrammes prévisibles accordés à sa réversibilité, stabilité et transfert d'électron unique (Risch., 2015; Van Benschoten *et al.*, 1983). Son potentiel standard de réduction (vs. SHE) est de + 0.360 V (Skoog *et al.*, 2015). Ceci équivaut à + 0.125 V (vs. Ag/AgCl). En théorie, puisqu'il s'agit d'un transfert d'électron unique, le couple redox ferricyanure/ferrocyanure devrait refléter un écart de \pm 0.059 V entre le potentiel d'oxydation et celui de la réduction. Ces observations devraient être attendues pourvu que la cellule électrochimique soit dépourvue d'impureté et que la surface de l'électrode de travail soit propre (Figure 3.1). Un écart entre les valeurs de littérature

et expérimentales est inévitable. Pour réduire au plus ces discrépances, une attention et minutie prononcée devraient être appliquées à la pratique expérimentale.



Figure 3.1 Courbe de voltammétrie cyclique d'une solution dégazée de 100 mM KCl et 2 mM de ferricyanure de potassium dans une cellule électrochimique à trois électrodes dont l'électrode de travail était du carbone vitreux, la contre électrode était une maille de platine et l'électrode de référence était Ag/AgCl. La fenêtre de balayage était comprise entre + 0.79 et 0 V. La vitesse de balayage était 100 mV/s. Seulement le premier cycle est montré.

3.1.2 Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et catalase

La cellule électrochimique à trois électrodes est reprise à nouveau pour, cette fois, entreprendre des mesures qualitatives et quantitatives de H_2O_2 . Afin de séparer l'effet de chaque composant sur le système à l'étude, les observations ont été segmentées en plusieurs étapes. Les étapes impliquaient d'abord le contrôle négatif étant l'eau désionisée contenant 50 mM NaCl. Subséquemment, l'effet du dégazage de la solution pendant 10 minutes avec l'argon est montré (Figure 3.2). La répercussion lors de l'ajout du H_2O_2 dans le milieu était d'ailleurs visible par des étapes d'ajout. En plus, une relation linéaire entre le courant de réduction en fonction de la concentration de H_2O_2 s'accordait (Figure 3.3). Finalement, l'électrode de travail



Figure 3.2 Courbes de voltammétrie cyclique d'une solution électrolytique d'eau désionisée et 50 mM KCl (ligne pleine) lorsqu'elle est dégazée (ligne pointillée). L'électrode de travail était une électrode de carbone vitreux, la contre électrode était une maille de platine et l'électrode de référence était Ag/AgCl. La fenêtre de balayage était comprise entre + 0.25 et - 1.25 V. La vitesse de balayage était 20 mV/s. Seulement le premier cycle est montré.

revêtue de catalase accentuait significativement le courant de réduction de O_2 lorsqu'elle était plongée dans la solution de H_2O_2 (Figure 3.4). À la lumière de ces observations, plusieurs énoncés sont déclarables. En dégazant la solution électrolytique, un abaissement du courant aux potentiels débutant à – 0.4 V (vs. Ag/AgCl) est flagrant. Cette courbe est lisse et ne montre aucune espèce électroactive en solution. Ce qui est contraire à la courbe non-dégazée, contenant l'oxygène. Dès lors, les variations de

courant entre ces bornes de potentiel défini sont attribuables à la réduction de l'oxygène en H₂O₂ (Skoog *et al.*, 2015). D'un autre aspect, l'addition d'un volume de H₂O₂ en solution perturbe la courbe du voltammogramme en provoquant une hausse du courant, qui n'est définitivement pas en provenance de l'oxygène infiltré pendant l'ajout du volume. Pour justifier cette proposition, un ajout successif de différentes proportions de H₂O₂ dans la solution électrolytique maintenu à -0.6 V (vs. Ag/AgCl) conduisait à une courbe de type cascade. Le courant stationnaire de chaque étape d'addition a été tracé en fonction de la concentration de H₂O₂ en solution après chaque ajout. Le but étant d'illustrer la proportionnalité entre le courant de réduction dans cet intervalle de potentiel et la concentration de H_2O_2 . En d'autres termes, il y a un potentiel de réduction du H_2O_2 confluent à celui de O_2 dans cette même gamme de potentiel, entre -0.8 V et -0.9 V (vs. Ag/AgCl), soit la fin du signal de réduction de l'oxygène et le début de la réduction du peroxyde d'hydrogène. En revanche, cette confluence est relativement négligeable par rapport à la platine comme électrode de travail (revoir Figure 1.7 et Section 1.1.7). Il s'avère que cette proportionnalité permet de quantifier H₂O₂ utilisant simplement une électrode de carbone vitreux macroscopique. Une étude semblable, mais à une échelle nettement inférieure, fait preuve de concept avec un microbiosenseur ayant une sensibilité de 2 μ M envers H₂O₂ (Emerson *et al.*, 1996). Le microbiosenseur mentionné était à la base une électrode à oxygène de type Clark. La platine, comme constituant de cette électrode, est responsable pour la sensibilité à l'oxygène. Le microbiosenseur mentionné exploite la catalase pour détecter la concentration de H_2O_2 en solution, lui offrant une sensibilité amplifiée. La réaction assistée par l'enzyme libère de l'oxygène. Ce même oxygène est détecté par l'électrode Clark modifiée. De cette manière, la catalase contribue à la détection de petites quantités de H_2O_2 par le microbiosenseur. Dans ce projet, le but n'était pas de quantifier H₂O₂, ni de fabriquer un microbiosenseur. Mais c'était pertinent de montrer la hausse de sensibilité envers



Figure 3.3 (A) Courbes voltammétriques de la solution électrolytique de 50 mM KCl dégazée (ligne pointillée) lorsqu'un aliquote de H_2O_2 est ajouté pour apporter la solution à 10 mM H_2O_2 (ligne pleine). L'électrode de travail était une électrode de carbone vitreux, la contre électrode était une maille de platine et l'électrode de référence était Ag/AgCl. La fenêtre de balayage était comprise entre + 0.25 et – 1.25 V (vs. Ag/AgCl). La vitesse de balayage était 20 mV/s. Seulement le premier cycle est montré. (B) Courbe potentiostatique à – 0.6 V (vs. Ag/AgCl) pendant 10 minutes d'une solution électrolytique de 100 mM KCl en ajoutant à chaque 30 secondes un aliquote de H_2O_2 pour atteindre des concentrations de 0.1, 1, 2, 5, 10 et 25 mM. Les mêmes électrodes étaient utilisées qu'en (A). (C) Relation linéaire entre le courant à l'état stationnaire après chaque aliquote ajoutée de H_2O_2 . La droite porte un coefficient de détermination de $R^2 = 0.999$.

H₂O₂ simplement en adhérant des enzymes à la surface de la sonde. La fonctionnalisation de la macroélectrode par la catalase a été expérimentée pour

64

présenter l'effet amplificateur du courant réducteur en présence de différentes concentrations de H2O2. En recouvrant l'électrode de travail de carbone vitreux macroscopique avec une couche de catalase, et en la plongeant dans la cellule électrochimique de 10 mM H₂O₂, un saut de courant extensif se démarquait par rapport à la réponse électrochimique de la solution électrolytique H₂O₂ sans enzymes. Et surtout par rapport à la solution électrolytique dégazée. Lorsque l'électrode modifiée est mise dans la solution de 10 mM H_2O_2 , une augmentation d'approximativement 15x est perçue. Ce même évènement était constaté avec la plongée de l'électrode nouvellement revêtue dans des solutions de 1, 2 et 5 mM H2O2, mais à des intensités moindres. Une telle réponse était prévue, puisque moins de substrats à disposition de l'enzyme engendreraient moins de produits. La tendance observée du courant en fonction de la concentration pour les 4 concentrations était parabolique, telle qu'attendu d'une réaction enzymatique de premier ordre modélisable par l'équation de Michaelis-Menten. Néanmoins, l'ensemble des données de cette expérience demeure insuffisant pour établir une courbe enzymatique. À travers ces observations, il est suggéré que ce système d'enzymes-substrats fonctionnerait avec des études d'électrochimie microscopique. Les avantages d'une étude électrochimique locale sont une population d'enzymes échantillonnées plus restreintes et une résolution améliorée des réactions catalysées.



Figure 3.4 (A) Courbes voltammétriques de l'électrode de travail propre dans une solution électrolytique dégazée de 10 mM de H_2O_2 et 50 mM KCl (ligne pointillée) et lorsqu'elle est revêtue de l'enzyme avant d'être plongée dedans (ligne pleine). (B) Courbes voltammétriques d'une solution électrolytique dégazée de 50 mM KCl (petits pointillés) en comparaison avec des solutions électrolytiques contenant aussi 1, 2, 5 et 10 mM de H_2O_2 (ligne pleine et autres lignes segmentées) lorsque l'électrode de travail fonctionnalisée avec catalase est plongée dedans. L'électrode de travail était une électrode de carbone vitreux, la contre électrode était une maille de platine et l'électrode de référence était Ag/AgCl. La fenêtre de balayage était comprise entre + 0.25 et – 1.25 V. La vitesse de balayage était 20 mV/s. Seulement le premier cycle de chaque balayage est présenté.

3.2 Les mesures microscopiques

Les résultats et explications des systèmes du ferricyanure, H_2O_2 et catalase à l'échelle microscopique sont présentés. Pour le couple redox ferricyanure/ferrocyanure, il y avait conservation de la forme de la courbe de voltammétrie cyclique. De même, la proportionnalité entre le courant de réduction et la concentration de H_2O_2 , était conforme aux observations à l'échelle macroscopique. En ce qui concerne les mesures enzymatiques, l'effet du dégagement d'oxygène capté par l'électrode était exclusivement visible aux faibles concentrations de H_2O_2 . Après un seuil de concentration, la réponse de la densité de courant était confondue avec celle de

66

l'électrode de carbone propre. Une période de transition était remarquée avant la confluence des signaux en provenance des deux surfaces. Ces observations étaient inexistantes quand le calcul des densités de courant reposait sur une généralisation de l'aire électroactive. En généralisant l'aire, l'effet de l'enzyme aux faibles concentrations de H_2O_2 était négligeable.

3.2.2 Ferricyanure

Semblable aux mesures macroscopiques (Figure 3.1), la solution de ferricyanure 2 mM échantillonnée sur l'électrode de carbone vitreux à l'échelle microscopique maintenait une courbe de voltammétrie cyclique aussi bien définie (Figure 3.5). Le potentiel d'oxydation se situait à + 0.235 V (vs. Ag/AgCl) et celui de la réduction à + 0.120 V (vs. Ag/AgCl). Ce qui revenait à un potentiel standard de réduction de + 0.355 V (vs. SHE). Cette valeur était raisonnablement proche du potentiel standard de la littérature à 25 °C étant de + 0.360 V, exprimant un écart négligeable d'environ 1 % (Skoog et al., 2015). Entre le potentiel d'oxydation et de réduction, un écart d'un multiple de ± 0.059 V devrait exister. Le couple redox $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ évoque le transfert d'un seul électron par changement d'état d'oxydation, par conséquent la différence de potentiel entre le pic d'oxydation et le pic de réduction devrait se situer à \pm 0.059 V (Van Benschoten et al., 1983). Puisque le couple redox ferricyanure/ferrocyanure est connu pour être sensible à l'état de la surface de l'électrode de travail, il se pouvait que la surface de l'électrode de carbone vitreux n'était pas entièrement favorable aux transformations redox de cette espèce et qu'un prétraitement, autre que le nettoyage piranha, soit recommandé (McCreery, 2008). Le manque de réversibilité dans les deux cas semblait être une conséquence de l'électrode de travail choisie et du traitement de sa surface. Quoique dans les deux cas, la réversibilité de ce couple redox n'était pas bien illustrée. Il se peut que le carbone vitreux ne soit pas l'électrode le plus apte pour le transfert d'électron de ce système à cause des effets de surfaces (McCreery, 2008).



Figure 3.5 Courbe voltammétrique obtenue par microscopie électrochimique à balayage en cellule d'une solution de 2 mM de ferricyanure de potassium et 50 mM NaCl, remplie dans une micropipette, mesurée à la surface d'une plaque d'électrode de carbone vitreux propre. Le cycle de balayage était effectué entre + 0.6 et - 0.45 V (vs. Ag/AgCl) à une vitesse de balayage de 20 mV/s. Seulement le premier cycle est exposé. L'électrode de travail ici était la plaque de carbone. Les électrodes auxiliaires et de références étaient combinées en un seul fil d'argent (QRCE) baignant dans le réservoir de la micropipette.

3.2.3 Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et catalase

Un large domaine de concentration de H_2O_2 allant du plus petit 0.1 mM au plus grand 40 mM a été échantillonné sur l'électrode de carbone vitreux propre et modifiée par catalase pour en déduire les différences. Se fiant aux résultats obtenus par les mesures macroscopiques, il était attendu que la hausse de concentration de H_2O_2 provoquerait un accroissement dans la réponse du courant. L'explication repose sur la réduction du H_2O_2 par le carbone vitreux, aux potentiels de réduction entre – 0.6 et – 0.8 V (vs. Ag/AgCl), telle qu'observée à l'échelle macroscopique (revoir Figure 3.3 et section 1.1.5). L'autre prédiction était que la surface recouverte de catalase devrait manifester un courant plus élevé que celui perçu sur le carbone vitreux propre, similairement observée à l'échelle macroscopique (revoir Figure 3.4). Pour établir cette étude comparative, les mesures ont premièrement commencé sur le carbone vitreux propre avec la pipette remplie d'une solution de H_2O_2 de concentrations parmi 0, 0.5, 2, 5, 20 et 40 mM. Après chaque mesure de concentration, une nouvelle pipette sonde était utilisée. Les mesures débutaient toujours sur le carbone vitreux propre avant d'arriver sur le carbone vitreux modifié par catalase. Elles ont été prises sur 4 points différents pour chaque surface et chaque concentration. Les réponses transitoires de la sonde remplie avec 20 mM H_2O_2 sur le carbone vitreux sont illustrées à la Figure 3.6. Toutes les valeurs des courants lus ont été corrigées par une division avec l'aire de la gouttelette; cette opération donne lieu à la densité de courant survenant dans cette superficie électroactive (Annexe A et Appendice A-I)-1)). La transformation des courants en densités de courant était une étape importante dans le traitement et l'analyse des données.



Figure 3.6 (A) Réponses typiques des courants transitoires manifestant lorsque le ménisque de la solution de 20 mM H_2O_2 et 50 mM NaCl dans la solution tampon phosphate, au bout de la pipette, atterrissait sur la surface de la plaque d'électrode de carbone vitreux propre pendant qu'un potentiel statique reducteur était maintenu. Chaque transitoire était chronométrée pour perdurer une dizaine de secondes. (B) Agrandissement du troisième transitoire. L'électrode de travail était la plaque de carbone vitreux propre. Les électrodes auxiliaires et références étaient combinées par un fil d'argent (QRCE) baignant dans le réservoir de la pipette sonde. Le potentiel maintenu était – 0.75 V (vs. Ag/AgCl).

Puisque la densité de courant est une unité exprimant le courant en fonction de l'aire de la surface électroactive, deux possibilités s'offraient à la manière d'analyser. Les deux voies étaient soit de considérer l'aire mesurée par les gouttelettes au microscope à lumière visible ou de supposer l'aire recouverte étant égale à l'aire de l'ouverture de la pipette sonde utilisée pour chaque série de mesure utilisant la même pipette. Les résultats ont été analysés des deux façons et leur interprétation a différé.

3.2.3.1 Interprétation des résultats avec les densités de courant calculées à base de l'aire mesurée au microscope à lumière visible

La relation entre les densités de courant calculées en utilisant les aires mesurées de chaque point au microscope à lumière visible et la concentration de H₂O₂ était linéaire sur l'électrode de carbone propre. D'où la tendance qui était attendu sur les prémisses des résultats macroscopiques (Figure 3.7). Cette même méthodologie est transposée aux mesures sur l'électrode de carbone vitreux modifiée par catalase (Annexe C et Appendice A)-I)-3)). En premier lieu, la surface de l'électrode modifiée est caractérisée par microscopie à force atomique. Ceci pour tenter de déchiffrer le niveau de recouvrement enzymatique (Figure 3.8). S'inspirant des images de surface de l'électrode de carbone vitreux modifiée par catalase, obtenues par microscopie à lumière visible, il a été vu que la catalase modifie la surface en formant des ilots espacés d'une fine délimitation (Figure 3.13-D). Il est spéculé que ces structures soient des formes cristallines d'entassement enzymatique induites par des interactions électrostatiques (Rink et al., 2017). En supposant que catalase retient une forme sphérique de diamètre 10 nm, le niveau de recouvrement approximativement évalué par microscopie à force atomique suggère un recouvrement d'au minimum deux et au maximum huit épaisseurs de déposition enzymatique. Malgré tout, la surface de l'électrode de carbone vitreux demeurait toujours visible. Donc le blocage de la surface conductrice n'était pas un souci. Supposant un recouvrement estimé à 50 % de la surface, tel que le suggérait les images, l'adhésion moyenne d'une pentacouche enzymatique dont le rayon d'une entité de catalase est 5 nm, décompte conjecturalement 3 x 10¹⁶ entités enzymatiques par m² (Annexe E et Appendice B). Il y aurait beaucoup moins d'une mole d'enzymes dans la zone échantillonnée par la pipette sonde. D'après ce calcul, une surface de 100 μ m² ne devrait contenir pas plus de 3 x 10⁶ enzymes. Ce recouvrement est lointain vis-à-vis une des plus petites populations enzymatiques déjà échantillonnées. Bien que ce soit une enzyme différente, le nombre d'enzymes sur l'échantillon était seulement de 50 (Hoeben et al., 2008). Pour 3 x 10⁶ entités de catalase fonctionnant à la vitesse catalytique suggérée par la

littérature, à flux continu de substrats en excès et sans contrainte inhibitrice, un courant dans l'ordre de 14 uA devait se produire (Annexe G). Nonobstant, les courants transitoires des points de mesures sur la surface de l'électrode de carbone vitreux modifiée par la catalase (Figure 3.9-A-1 à -A-6) ressemblaient beaucoup à ceux de la surface de l'électrode de carbone vitreux propre (Figure 3.6), tant d'apparence que d'ordre de grandeur. Cependant, la lecture des courants de réduction et leur correction avec l'aire de la surface recouverte par l'électrode fluidique mesurée ont révélé des densités de courant au-delà de celles détectées plus tôt sur l'électrode de carbone privée de catalase, aux plus faibles concentrations de H₂O₂ (Figure 3.9-B). Ce qui, encore une fois, accordait avec les attentes basées sur les observations macroscopiques. Aux concentrations de 5 mM et plus, les densités de courant provenant de l'électrode de carbone modifiée par l'enzyme déviaient des attentes. Elles convergeaient à des valeurs équivalentes à celles calculées pour l'électrode de carbone nue. L'hypothèse prédominante ici est associée aux limitations de l'enzyme étudiée. Vu que le ratio enzyme/substrat dans l'environnement électroactive était beaucoup inférieur à l'échelle microscopique que macroscopique, les effets délétères du substrat risquaient d'être amplifiés. La catalase ne pourrait pas accomplir sa fonction intrinsèque lorsqu'exposée à de fortes concentrations de H2O2. D'abord, elle subissait un changement dans son profil catalytique cinétique en permutant d'un profil β à α , toujours réversible en fonction de la concentration de H₂O₂. Cette période de transition était percevable sur la courbe de densité de courant en fonction de la concentration de H_2O_2 entre 2 (exclusivement) et 20 mM (Figure 3.9-B). En période d'exposition continue à des concentrations élevées, la catalase perdait définitivement son activité catalytique à la suite de dommages oxydatifs irréversibles (Heck et al., 2010; Lardinois et al., 1996).





Figure 3.7 (A) Relation entre la densité de courant et la concentration de H_2O_2 par microscopie électrochimique à balayage en cellule. Une forte linéarité est exprimée par un coefficient de détermination $R^2 = 0.998$. (B) et (C) Images par microscopie à lumière visible à grossissement 1000 X de la trace laissée par la gouttelette du troisième transitoire des mesures de 20 mM H_2O_2 de la (Figure 3.6). Cette information sur chaque point de mesure avait permis d'obtenir l'aire de l'électrode afin de calculer les densités de courant moyennes en (A) pour chaque concentration de H_2O_2 .



Figure 3.8 (A) et (B) Images topographiques obtenues par microscopie à force atomique de la surface de la plaque d'électrode de carbone vitreux propre à des cadres de 10 μ m x 10 μ m et 3 μ m x 3 μ m. (C) et (D) Images topographiques de la surface de la plaque d'électrode de carbone vitreux modifiée par une solution de catalase à des cadres de 10 μ m x 10 μ m et 3 μ m x 3 μ m. Les tracées de profil sont

74



Figure 3.9 (A-1 à A-6) Courants transitoires des mesures de différentes concentrations de H₂O₂, soit 0, 0.5, 2, 5, 20 et 40 mM, sur la plaque d'électrode de carbone vitreux fonctionnalisée par la catalase. L'électrode de travail était la plaque de carbone vitreux. L'électrode auxiliaire et celle de référence sont courtcircuitées sur un fil d'Ag/AgCl (QRCE) trempé dans le réservoir de la pipette. La durée de chaque transitoire était chronométrée pour durer 10 secondes. Le potentiel maintenu pendant les mesures de transitoire était de -0.75 V (vs. Ag/AgCl). (B) Relation entre les densités de courant et la concentration de H₂O₂ des mesures performées sur la plaque de carbone revêtue de catalase. (C) image par microscopie électronique à balayage du 3^e point à 2 mM H₂O₂.

Pour déduire la quantité d'oxygène provenant de la dégradation du substrat par l'enzyme, c'est-à-dire exclure tout le courant de réduction de H₂O₂ par l'électrode de carbone, c'était possible de soustraire la densité du courant de réduction sur la surface de l'électrode inoccupée par les enzymes (Figure 3.7-A) de la densité du courant de réduction issu de l'électrode enzymatique fonctionnalisée (Figure 3.9-B). La courbe résultante (Figure 3.10-A) était une courbe croissante linéaire de 0 à 2 mM H₂O₂, décroissante de 2 à 20 mM H₂O₂ et plus ou moins stable aux concentrations supérieures. Cette apparence appuyait l'interprétation précédemment discutée à propos de la dénaturation progressive de la catalase par H₂O₂ (Lardinois et al., 1996). À partir des points du domaine linéaire, il devenait juste de déclarer qu'à chaque instant de la mesure, le courant de réduction détecté était assignable aux molécules d'oxygènes libérées par la réaction enzymatique de dégradation de H₂O₂. Utilisant la loi de Faraday (présentée à la section 1.1.6), le calcul de la charge à un temps donné de la mesure parvenait à la quantité de produits enzymatiques. Avec cette pièce d'information deux approximations étaient possibles. i) Soit l'estimation du nombre d'enzymes participant à la réaction sous l'électrode (Annexe H et Appendice D). Cette opération était possible en prenant la valeur de la constante catalytique k_2 de la littérature, en moyenne de 30 000 000 substrats/s. ii) Soit de déduire cette constante par la densité de courant et en incorporant le dénombrement des enzymes déterminées plus haut par microscopie à force atomique (Annexe I et Appendice E). Dans le premier cas les calculs considérant la densité moyenne des courant mesurés avec 2 mM H₂O₂, prévoyaient 16 unités enzymatiques échantillonnées par µm². Dans le deuxième cas, les opérations renvoyaient une constante catalytique k_2 de 15 000 substrats/s. Ces résultats sousestimaient l'attendu. Ceci était bon signe et orientait l'objectif de ce travail positivement. La littérature incite que les enzymes déposées sur une surface auraient une activité dissimilaire à lorsque solubilisées en solution (Mosbach, 1976). Ce qui pourrait expliquer cette sous-évaluation. Le recouvrement enzymatique semblait nettement moins dense qu'estimée par les images de microscopie à force atomique, soit d'un ordre de 10³ moins dense.



Figure 3.10 (A) Courbe résultante obtenue par la soustraction arithmétique de la courbe de densité de courant en fonction de la concentration de H_2O_2 de la plaque de l'électrode de carbone enzymatique modifiée (Figure 3.9-B) de celle de la densité de courant en fonction de la concentration de H_2O_2 sur la plaque de l'électrode de carbone propre (Figure 3.7-A). (B) Agrandissement du fragment linéaire de la courbe résultante entre 0 et 2 mM de H_2O_2 . Ce fragment renvoyait un coefficient de détermination de $R^2 = 0.996$.

En ce qui à trait la courbe enzymatique corrigée obtenue, un intérêt portait sur le fragment linéaire de cette résultante. Un isolement de ce fragment du reste des points et un agrandissement fortifiait la linéarité avec un R^2 de 0.996 (Figure 3.10-B). La soustraction de la contribution de l'électrode de carbone vitreux propre avait théoriquement pour effet de seulement projeter le courant de réduction en provenance de l'oxygène produit par la dégradation enzymatique ou par l'oxygène atmosphérique dissout en solution. Voyant que le courant n'était pas nul à 0 mM, il s'agirait donc d'une réaction en chaîne de la réduction de l'oxygène atmosphérique dissoute dans l'électrode fluidique en H₂O₂ par l'électrode de carbone vitreux, suivie de la décomposition enzymatique de cette molécule de H₂O₂ en oxygène et eau. Cette source d'oxygène était



Figure 3.11 Normalisation des points du fragment linéaire (Figure 3.10-B) de la réponse enzymatique.

celle détectée à l'interface de l'électrode lorsque la solution réservoir de la pipette était manquante en H₂O₂. Pour s'assurer de ce fait, l'application de la méthode de standard ajouté devrait aboutir à la concentration d'oxygène dissoute en solution. Effectivement, d'après l'extrapolation, une valeur de 0.60 mM était trouvée (Annexe J et Appendice F). Cette valeur était comprise dans l'intervalle d'une solution atmosphérique et une solution saturée en oxygène, entre 0.381 et 1.24 mM respectivement (Sepunaru *et al.*, 2016; Smith et Delorme, 2010). Admettant que ce système servirait d'un microbiosenseur spécifique au H₂O₂ et en reprenant cette droite, la limite de détection (LOD) de H₂O₂ de ce microbiosenseur serait de 22 μ M (Figure 3.11, Annexe K et Appendice G). N'étant pas le but de fabriquer un microbiosenseur, ce LOD était seulement d'un ordre de grandeur plus élevé par rapport aux microbiosenseurs véritables (Emerson *et al.*, 1996). Cependant, si c'était pour expliquer la différence, elle s'explique par une lacune de notre système d'acquisition : l'amplificateur. Dans l'éventualité où l'équipement à la disposition du laboratoire était plus sensible, la sensibilité des mesures prescrites avec ce montage pourrait détecter 22 femtomolaires (Annexe K) de H₂O₂ en solution.

3.2.3.2 Densités de courant à partir de l'aire calculée

Les résultats obtenus lorsque l'aire importée dans les calculs de densités de courant était celle calculée, en supposant le diamètre de la pipette sonde utilisée pour chaque mesure comme l'aire électroactive, les courbes obtenues étaient totalement différentes (Annexes B, D et Appendice A-2) et A-4)). Premièrement, les densités de courant ne suivaient plus une tendance linéaire en fonction de la concentration de H2O2 (Figure 3.12-A). De plus, l'effet de l'augmentation du courant par la catalase, aux faibles concentrations de H₂O₂, n'était plus apparent (Figure 3.12-B). L'aspect rigoureux de l'analyse en supposant une aire égale entre les points de chaque série promouvrait une nette réduction de l'écart-type de chaque point. Cette observation était une indication que l'aire était un contribuant majeur dans la variabilité des résultats, conséquence probable de subjectivité humaine pendant les mesures au microscope à lumière visible. Ou était-ce un vrai effet que l'aire était différente à chaque point de mesure? C'était peu probable que la gouttelette formée au bout de la pipette sonde avait varié lors des mesures, donc ce point de vue était forcément plus systématique. Distinguer la grosseur véritable des traces de gouttelettes devenait matière subjective et parfois les discrépances dans les aires étaient flagrantes. Toutefois, en théorie, la gouttelette formée à l'extrême de la pipette sonde était toujours la même tant que la pipette demeurait indemne de dommages physiques, ce qui était le cas dans toutes les mesures du travail ici. Malgré cela, restait la possibilité que la gouttelette interagissait avec la surface de l'électrode de manière différente, modulant ainsi la surface réellement recouverte. Par exemple, la surface de carbone vitreux était hydrophobe tandis que la surface recouverte de l'enzyme était hydrophile. Ces propriétés pourraient influencer la forme et l'affinité de la gouttelette envers la surface mesurée. Étrangement, ce raisonnement n'expliquait pas pourquoi la densité de courant était supérieure sur l'électrode de carbone non-revêtue en comparaison avec l'électrode de carbone modifiée (Figure 3.12-C), parce que cette hypothèse susciterait l'effet



Figure 3.12 Relations entre les densités de courant en supposant une aire électroactive égale pour tous les points de mesures utilisant la même sonde pipette. (A) Les mesures sur l'électrode de carbone vitreux propre. (B) Les mesures sur l'électrode de carbone modifiée par catalase. (C) La résultante de la différence entre (B) et (A).

contraire. En fin de compte, s'il y avait vraiment un effet originaire de la catalase, la différence serait marquante. Ce qui n'était pas le cas. Le cas présent suggère que le signal fonctionnel de la catalase dans ce système réside dans les subtilités, camouflé par la rigueur et l'ordre. Pour le percevoir, les mesures doivent suivre un régime de concentrations de substrat.

3.3 Cartographie microscopique

C'était le temps de lancer une application. Le but de l'application était de détecter des différences dans l'activité enzymatique sur une matrice de points échantillonnés. C'est d'ici que surgissait l'occasion de produire de l'imagerie à travers des données électrochimiques. Une grille de 5 x 5 points espacés de 20 µm avait servi de moule pour tracer le profil de la densité de courant réducteur à une durée de temps commun, soit à 8.28 secondes, depuis le temps d'atterrissage à 0 secondes. La matrice sur la plaque de l'électrode de carbone vitreux déposée de particules de 200 nm de polystyrène carboxylate (PSC) servait de mesure contrôle négatif pour catalase et celle sur la plaque de l'électrode de carbone modifiée par catalase et les particules de polystyrène carboxylate 200 nm était le contrôle positif pour les adduits bioactifs (Figure 3.13 et Annexe M). Simplement par microscopie à lumière visible, la différence entre les deux agents de recouvrement était perceptible. L'électrode non-recouverte d'enzymes paraissait lisse à grossissement moyen. Quoiqu'un agrandissement maximal au microscope à lumière visible accédait à la détection de petites structures, sous forme de points, réparties partout sur la surface. Ces points étaient les particules de polystyrène-carboxylate 200 nm. Ces billes étaient mieux perçues par microscopie électronique à balayage (comparer Figure 3.13-B et Annexe P). D'autres part, la surface de l'électrode recouverte de l'assemblage enzyme-PSC était reconnaissable en comparaison avec l'électrode de carbone vitreux propre. Des ilots espacés par une mince délimitation occupaient toute la région de l'électrode. Ce mécanisme d'assemblage était curieux et il n'y avait pas d'explication exacte pour le justifier. Possiblement, les minéraux dans le tampon contribuaient à favoriser des interactions électrostatiques entre les macromolécules (Rink et al., 2017). Assisté en plus par le revêtement par rotation, la vitesse permettait d'uniformiser la surface. Le but de la cartographie était de mettre en valeur les différences dans l'activité catalytique de la particule catalase-PSC en comparaison avec PSC seul. Avec cela à l'esprit, chaque point de la matrice était une mesure du courant transitoire d'égale durée. Une compilation de la densité de courant à un temps commun de tous les points a permis l'architecture d'un plan de surface 3D pouvant informer sur le profil de la densité de courant réducteur au temps choisi. De nouveau, il y avait les deux manières de configurer la densité de courant, soit par l'aire mesurée ou soit par l'aire calculée à partir de la pipette sonde utilisée (Figure 3.14) (Annexe L à O). Une différence significative était attendue entre la surface fonctionnalisée avec l'agent bioactive et la surface non-bioactive. En effet, une différence statistiquement significative était identifiée (Appendice H). Quoique cette différence n'était pas celle prévue. La prédiction voulait que l'étude de la surface recouverte d'enzymes exprime une densité de courant plus élevée par rapport à la surface non-modifiée par l'enzyme, puisque catalase augmenterait localement la concentration d'oxygène. En plus, ce sont ces molécules d'oxygènes qui seront réduites à la surface de l'électrode, donc le courant de réduction serait étroitement lié au montant de molécules d'oxygène réduit par l'électrode. Malgré ca, ce qui est véritablement observé, c'est l'effet inverse. La densité de courant de réduction était plus élevée sur le carbone non-modifié avec l'enzyme. Cette observation était soutenue même en uniformisant l'aire de la sonde pour chaque point de mesure. La densité moyenne du courant, calculée en divisant le courant de réduction à 8.28 secondes de chaque point par l'aire de la gouttelette mesurée à la microscopie à lumière visible, était de $0.85 \text{ mA/cm}^2 \pm 0.18 \text{ et } 0.36 \text{ mA/cm}^2 \pm 0.08 \text{ pour}$ l'électrode avec seulement polystyrène carboxylate 200 nm et avec les particules catalase-polystyrène carboxylate 200 nm respectivement.



Figure 3.13 Images obtenues par microscopie à lumière visible des traces de gouttelettes transitoires formant le quadrillage de la matrice 5×5 , où chaque point est espacé de 20 µm. (A) Vue de la matrice sur la plaque d'électrode de carbone vitreux propre déposée de particules de polystyrène carboxylate 200 nm à un objectif de 500 X. (B) Le coin supérieur gauche de la matrice agrandie à 1000 X permet de voir des petits points de 200 nm qui sont les particules de PSC (C) Vue de la matrice sur la plaque de l'électrode modifiée par l'agencement de catalase-PSC à un objectif de 500 X. (D) Éloignement de la matrice à un objectif de 200 X. L'image permet de distinguer la particularité de l'arrangement des enzymes recouvrant l'électrode.
En tenant compte de l'aire de la pipette sonde, la densité moyenne du courant était 1.29 $mA/cm^2 \pm 0.15$ et 0.64 $mA/cm^2 \pm 0.12$ pour l'électrode sans enzymes et avec enzymes respectivement.



Figure 3.14 Représentations tridimensionnelles de la densité de courant réducteur détecté à chaque point de la matrice. La valeur de la densité de courant montrée est celle à 8.28 secondes depuis le moment de l'atterrissage de la sonde, remplie de 2 mM H₂O₂ et 50 mM NaCl, sur la surface. Le potentiel était maintenu à -0.75 V (vs. Ag/AgCl). En (A) cartographie 3D de la fluctuation de la densité de courant réducteur au travers la matrice échantillonnée sur la plaque de l'électrode de carbone vitreux recouverte de polystyrène-carboxylate 200 nm et en (B) recouverte d'adduits catalase et polystyrène-carboxylate 200 nm. (C) et (D) sont les équivalents respectifs de (A) et (B) ayant considéré l'aire calculée de la sonde utilisée pour tous les 25 points de chaque matrice.

Plusieurs explications pouvaient justifier les observations de cette tendance inverse. Le point de vue de transport de masse des espèces suggèrerait que puisque les deux pipettes sondes utilisées dans l'exécution de la cartographie matricielle de 25 points des deux surfaces étaient différentes, alors certainement la géométrie et la silhouette de la gouttelette devenaient inégales entre les deux échantillons. Cette différenciation induisait sans doute des changements dans le motif de diffusion des molécules de substrats dans le réservoir de la pipette, de la gouttelette à la surface. Ces conditions rendaient les deux scénarios incomparables. À part cartographier l'activité électrochimique en fonction du temps, la microscopie électrochimique à balayage en cellule accédait à des mesures topographiques de la surface. La résolution de ces mesures était principalement limitée par le diamètre de la sonde, soit la micropipette. Mais une erreur était aussi attribuée à l'exactitude de l'axe vertical du microcontrôleur (si utilisé). En revanche, une incertitude relativement négligeable était aussi assignée au microcontrôleur piézoélectrique. Dans le cas de ce projet, le diamètre de la pipette était d'environ 10 µm, la résolution était alors très faible relativement à une sonde de microscope à force atomique qui en possède un dans l'ordre de quelques nanomètres. Soit une image 1 000 X plus résolue. Supposant que la technologie donnerait accès aux nanopipettes. Cette capacité hautement sensible de topographier serait aussi un atout de cette technique. Dans les circonstances instrumentales présentes, la meilleure image de la topologie relative des deux surfaces échantillonnées est montrée à la Figure 3.15. D'après la figure, il semblerait que la surface sans enzymes était porteuse de plus de déformations de surface en comparaison avec la surface préposée d'enzymes. Ceci est distingué par les ondulations sur l'image topographique en 3D. Plus encore, dans les deux cas, une légère augmentation graduelle de la hauteur de la surface échantillonnée était marquante. Cette déficience dans le nivelage de la surface simplement attribuée à une inclinaison lors de la préparation de la plaque de l'électrode sur le porte-échantillon est une explication plausible.



Figure 3.15 Hauteur relative de la surface échantillonnée selon la distance parcourue avec la sonde électrochimique. En (A) la surface de l'électrode de carbone vitreux recouverte seulement des particules de polystyrène-carboxylate 200 nm et en (B) recouverte des adduits catalase et polystyrène-carboxylate 200 nm.

Pour but d'informer davantage sur le relief topographique, des observations par microscopie à force atomique dirigées à proximité du premier point de la matrice sur la surface enzymatique ont été examinées (Figure 3.16). Sur l'image du plus petit grossissement (Figure 3.16-A), l'arc supérieur droit de l'empreinte laissée par la gouttelette est focalisé. Au centre de la trace de la gouttelette, des particules de types granulaires étaient laissées. Ces granules étaient sûrement un mélange de sels et d'enzymes qui s'étaient recombinés après l'assèchement de la gouttelette. Tout autour de cet amas, un creux bornant les extrémités de la gouttelette marquait la plus mince couche d'enzymes. De là, le restant de la surface demeurait sauf de la gouttelette. L'insert dans cette figure (Figure 3.16-A) illustre, par les tracés de profil, qu'il y avait au moins 4 couches d'enzymes entassées les unes sur les autres (en supposant qu'une enzyme a un diamètre de 10 nm). De plus, l'insert montre aussi le tracé de profil d'une particule de polystyrène carboxylate de 200 nm, enfouie et enterrée dans un nuage de catalase. Les particules de polystyrène n'étaient pas aussi clairement visibles sur la

surface de l'électrode bioactive que sur la surface défaillante d'enzymes en contemplant les images de microscope à lumière visible et les images de microscopie électronique à balayage (revoir Figure 3.13-B et -C et Annexe P). Le balayage à 3 μ m² (Figure 3.16-B) focalisait davantage sur le foisonnement des enzymes avoisinant les alentours de la première gouttelette. Encore une fois, l'insert démontre le dépôt d'une multicouche enzymatique sur l'électrode. La bille de polystyrène avait aussi perdu sa forme initialement sphérique car elle était maintenant enrobée par les molécules de catalase retenues par des forces électrostatiques (Chan *et al.*, 2017; Yu et Caruso, 2003).



Figure 3.16 (A) et (B) Images topographiques obtenues par microscopie à force atomique du point #1 de la matrice de la surface de la plaque d'électrode de carbone vitreux modifiée par catalase et PSC 200 nm à des cadres de 10 μ m x 10 μ m et 3 μ m x 3 μ m respectivement.

88

CHAPITRE IV

PERSPECTIVES

En lien avec ce projet, des études plus poussées sur les aires réelles des gouttelettes à la surface des électrodes seraient une nécessité. D'ailleurs, si le temps le permet, cette étude sera prise en charge. Aussi, des répliques avec plus de données seraient bienvenues. Ces raffinements seront sans-doute apportés. Avec cette technologie, les possibilités à l'horizon deviennent innombrables. Sachant que vraisemblablement n'importe quel système est potentiellement propice à cette méthodologie. C'est-à-dire, débuter par un regard à l'échelle macroscopique pour ensuite pousser les expériences à l'échelle microscopique. Cette pratique est une excellente démonstration de l'approche scientifique, tant au terme pratique que théorique. À l'instar, les échantillons compatibles avec cette étude sont les éléments conducteurs d'électricités. Réellement, cette limitation est contraignante puisqu'un large éventail d'éléments devient incompatible. En échange, il existe une infinité de corps conducteurs et semiconducteurs, autant vivants que non-vivants, qui peuvent être modulés de façon à s'assimiler dans les prérequis techniques de cet appareillage. En résidant seulement dans la catégorie des enzymes, toute la classe des enzymes oxydoréductrices y est admissible. Commencer à caractériser chaque espèce jusqu'à l'échelle d'une seule entité enzymatique approfondira les connaissances scientifiques dans le cadre des catalyseurs biologiques. En plus, les enzymes produisant ou consommant une substance électroactive sont automatiquement éligibles à cette série étudiable. Il y aurait 1863 enzymes faisant partie de la classe des oxydoréductases. Ceci classe au 2^e rang cette catégorie d'enzymes en termes d'abondance, tout de suite après les

transférases (McDonald et al., 2009). En agrandissant les réalisations, il se trouve que des organelles entières adoptent des mécanismes à transfert d'électrons potentiellement étudiables par l'électrochimie. En peu de temps, des organelles cellulaires pourront être directement étudiées ex vivo sans manipulations complexes. La microscopie électrochimique à balayage en cellule à l'étude pourrait même s'étendre à l'étude des organismes unicellulaires tels que des cellules, des mycètes et des protozoaires. Il existe déjà des applications avec la microscopie électrochimique à balayage. Là où les aspects intéressants dominent sont ceux des échanges et des séquelles que la solution réservoir de la sonde peut induire sur le fonctionnement, le comportement et les sécrétions des organismes vivants. Les domaines d'applications valables sont les sujets de défenses contre les agents pathogènes, les interactions biologiques et les processus d'adaptations. Dans le champ du non-vivant, les applications sont aussi innombrables. Pour l'instant, les applications en demande concernent l'optimisation des HER, OER, ORR pour l'électrolyse de l'eau et l'énergie électrochimique. Aussi, la photoélectrochimie et spectroélectrochimie sont compatibles avec cette vision. Les preuves de principes peuvent facilement être reproduites à l'échelle macroscopique. À l'échelle microscopique, une caractérisation raffinée peut attribuer la contribution de chaque infime superficie dans l'évolution de la réaction. Ces informations permettent de mieux classifier les matériaux en fonction de leur efficacité et leur appartenance parmi les nombreux catalyseurs.

CONCLUSION

Une technique versatile et adaptée à une variété de scénarios a été développée dans le champ de caractérisation enzymatique et de particules bioactives. Les observations macroscopiques d'un montage ont suscité des questionnements microscopiques. Le couple rédox du ferricyanure/ferrocyanure est désigné comme système modèle pour démontrer la conservation des propriétés lors de l'agrandissement du terrain examiné. Par suite de cela, l'effet du H2O2 lorsque dans les parages du carbone vitreux est visualisé à l'échelle macroscopique. Son effet est répliqué à l'échelle microscopique, mais à une résolution nettement améliorée. Plus encore, l'enzyme antioxydante catalase, est expérimentée à l'échelle macroscopique en soulignant son impact lorsqu'adhérée. En parallèle, son implication catalytique à l'échelle microscopique est offerte pour des petites concentrations de substrats. Les limites de la concentration de substrat sont peut-être imposées par la petite population enzymatique échantillonnée face à une relative surexposition de substrat toxique oxydant. Les approximations ont permis d'estimer un nombre de 16 enzymes de catalase échantillonnées par µm² lorsque la constante de vitesse k_2 moyenne de la littérature était considérée. Cette évaluation est de 3 ordres de grandeur moindre que le compte estimé par microscopie à force atomique, étant de 3×10^4 entités de catalase par μm^2 . Il se peut que le décompte par microscopie à force atomique ait surestimé le nombre véritable d'enzymes. Ou, serait-ce un effet attribuable à l'enzyme immobilisée adoptant un comportement catalytique différent que lorsque libre en solution. En appliquant le décompte enzymatique par microscopie à force atomique, la constante de vitesse k_2 expérimentale a suggéré une conversion de 15 000 substrats/s. Ce qui équivaut à une constante de vitesse 3 ordres de grandeurs moins élevée que ce que suggère la valeur moyenne théorique, soit de 30 000 000 substrats/s. Du temps et de la main-d'œuvre investies dans l'optimisation de cette technique est cruciale pour le développement et la familiarisation de la portée de cette instrumentation. En plus de mettre en place la méthodologie, ce travail a montré un exemple concret de topographie électrochimique locale en comparant une surface recouverte de particules bioactives catalase/polystyrène carboxylate avec une surface recouverte seulement de polystyrène carboxylate. Les profils du courant de réduction des deux régions sont juxtaposés et la hauteur relative est aussi déterminée. Comme conclusion, les études enzymatiques par microscopie électrochimique à balayage en cellule ont apporté de l'information essentielle pour le développement du savoir et de la technologie. Non seulement l'apport des preuves de principes, mais autant des applications pratiques. Ces aspects mèneront sans doute le savoir à un niveau supérieur. ANNEXES

ANNEXE A

Tableau de calcul des densités de courant des mesures sur l'électrode propre avec les aires mesurées par le microscope à lumière visible

H Conce	202 entration	Optical (µm)	inner area (µm²)	innerarea (cm²)	inner diameter (μm)	Current (nA)	Current (mA)	Current density (j) (mA/cm²)	
	p1		231.81	2.3181E-06	17.17992022	6.286	0.000006286	2.71170355	
	p2		144.43	1.4443E-06	13.56075173	7.764	0.000007764	5.375614485	
0	p3	12.8	173.3	0.000001733	14.85437353	10.637	0.000010637	6.137911137	
	p4		131.06	1.3106E-06	12.91784714	8.63	0.00000863	6.584770334	
	average		170.15 44.727	2E-06 4E-07	14.628 1.8821	8.3293 1.8176	8E-06 2E-06	5.2025 1.7339	
	p1			-	17.69649678	11.917	0.000011917		
	p2		245.96	2.4596E-06	15.03160303	13.864	0.000013864	5.636688893	
0.5	p3	14.9	177.46	1.7746E-06	17.65291417	10.727	0.000010727	6.044742477	
	p4		244.75	2.4475E-06	11.69592817	12.945	0.000012945	5.28907048	
	average		107.44 39.204	2E-06 9E-07	14.793 2.8372	12.363 1.35	1E-05 1E-06	5.6568 0.3782	
	p1		184.25	1.8425E-06	19.28769375	16.208	0.000016208	8.796743555	
	p2	15.5 ge	292.18	2.9218E-06	19.49844425	11.124	0.000011124	3.807242111	
2	p3		298.6	0.000002986	16.32800136	13.864	0.000013864	4.64300067	
	p4		209.39	2.0939E-06	17.70171229	15.036	0.000015036	7.180858685	
	average		246.11 57.887	2E-06 6E-07	18.204 1.4857	14.058 2.1775	1E-05	6.107 2.2964	
	p1		311.7	0.000003117	16.47472227	25.721	0.000025721	8.251844722	
	p2		213.17	2.1317E-06	20.7572701	18.119	0.000018119	8.499788901	
5	p3	19.3	338.4	0.000003384	20.54827725	15.715	0.000015715	4.64391253	
	p4		331.62	3.3162E-06	19.50244343	16.797	0.000016797	5.065134793	
	average		298.72 58.15	3E-06 6E-07	19.321 1.9751	19.088 4.53	2E-05 5E-06	6.6152 2.0428	
	p1		316.52	3.1652E-06	16.13542755	31.79	0.00003179	10.04359914	
	p2		204.48	2.0448E-06	20.76033684	30.709	0.000030709	15.01809468	
20	p3	20.8	338.5	0.000003385	20.35966272	37.891	0.000037891	11.19379616	
	p4		325.56	3.2556E-06	19.4220574	26.352	0.000026352	8.094360487	
	average		296.27 61.851	3E-06 6E-07	19.169 2.0989	31.686 4.7581	3E-05 5E-06	11.087 2.916	
	p1		178	0.00000178	14.04820734	33.744	0.000033744	18.95730337	
	p2		155	0.00000155	14.75547228	30.709	0.000030709	19.81225806	
40	p3	11.3	171	0.00000171	16.35176762	23.317	0.000023317	13.63567251	
	p4		210	0.0000021	15.07558486	30.048	0.000030048	14.30857143	
	average		178.5 23.101	2E-06 2E-07	15.058 0.9636	29.455 4.3968	3E-05 4E-06	16.678 3.1564	

ANNEXE B

Tableau de calcul des densités de courant des mesures sur l'électrode propre avec les aires des pipettes sondes respectives à chaque mesure

H Conce	12O2 Entration	Optical (µm)	Area (um2)	Current (nA)	Current density (nA/um2)	Current density {mA/cm2}	
	p1			6.286	0.048849999	4.884999865	
	p2	1.2 91		7.764	0.060335888	6.033588761	
0	p3	12.8	128.6796351	10.637	0.082662653	8.266265282	
	p4			8.63	0.067065779	6.706577924	
	average			8.32925 1.817557	0.064729 0.014125	6.472858 1.412467	
	p1			11.917	0.06834465	6.834464959	
	p2	and the second		13.864	0.079510802	7.951080153	
0.5	p3	14.9	174.3662463	10.727	0.061519934	6.151993422	
	p4			12.945	0.074240286	7.424028605	
	average			12.36325 1.349955	0.070904 0.007742	7.090392 0.774207	
	p1			16.208	0.085896635	8.589663493	
	p2	15.5	188. 59 19088	11.124	0.058953243	5.895324327	
2	p3			13.864	0.073474269	7.347426867	
	p4			15.036	0.079685452	7.96854518	
	average			14.058 2.177535	0.074502 0.01154	7.45024 1.154016	
	p1			25.721	0.087919124	8.791912355	
	p2			18.119	0.061934085	6.193408497	
5	p3	19.3	292.5529619	15.715	0.053716769	5.371676943	
	p4	 A second s		16.797	0.057415245	5.741524506	
	average			19.088 4.529954	0.065246 0.015484	6.524631 1.548422	
	p1			31.79	0.093556502	9.355650224	
	p2			30.709	0.090375169	9.037516915	
20	p3	20.8	339.7946614	37.891	0.111511464	11.15114635	
	p4			26.352	0.077552719	7.755271931	
	average			31.6855 4.758113	0.093249 0.014003	9.324896 1.400291	
	p1			33.744	0.33647267	33.64726697	
	p2			30.709	0.306209673	30.62096733	
40	p3	11.3	100.2874915	23.317	0.232501578	23.25015778	
	p4			30.048	0.299618622	29.9618622	
	average			29.4545 4.396769	0.293701 0.043842	29.37006 4.384165	

ANNEXE C

Tableau de calcul des densités de courant des mesures sur l'électrode modifiée avec les aires mesurées par le microscope à lumière visible

H Conce	2D2 entration	Optical (µm)	inner area (µm²)	inner area (cm²)	inner diameter (μm)	Current (nA)	Current (mA)	Current density (j) (mA/cm²)	
	p1		181.43	1.8143E-06	15.19881083	10.793	0.000010793	5.948850796	
	p2		166.42	1.6642E-06	14.55652861	11.49	0.00001149	6.904218243	
0	p3	12.8	159.49	1.5949E-06	14.25022719	11.49	0.00001149	7.20421343	
	p4		132.48	1.3248E-06	12.98763931	10.877	0.000010877	8.210295894	
	average		159.96 20.478	2E-06 2E-07	14.248 0.9288	11.163 0.3797	1E-05 4E-07	7.0669 0.9314	
	p1		135.67	1.3567E-06	13.14307457	14.225	0.000014225	10.48500037	
	p2		166.24	1.6624E-06	14.5486543	13.053	0.000013053	7.851900866	
0.5	p3	14.9	192.24	1.9224E-06	15.64504938	12.8	0.0000128	6.658343737	
	p4		127.83	1.2783E-06	12.75767263	12.674	0.000012674	9.914730501	
	average		155.5 29.575	2E-06 3E-07	14.317 1.327	13.188 0.7091	1E-05 7E-07	8,7275 1,7839	
	p1		102.68	1.0268E-06	11.43399477	15.018	0.000015018	14.62602259	
	p2	15.5	106.72	1.0672E-06	11.65676302	14.495	0.000014495	13.58227136	
2	p3		105.21	1.0521E-06	11.57400244	14.099	0.000014099	13.40081741	
	p4		107.96	1.0796E-06	11.72428852	14.369	0.000014369	13.3095591	
	average		105.64 2.2727	1E-06 2E-08	11.597 0.125	14.495 0.3857	1E-05 4E-07	13.73 0.6082	
	p1		138.42	1.3842E-06	13.27560988	19.381	0.000019381	14.00158937	
	p2		201.21	2.0121E-06	16.00589044	18.72	0.00001872	9.303712539	
5	p3	19.3	187.13	1.8713E-06	15.4357156	19.171	0.000019171	10.24474964	
	p4		182.28	1.8228E-06	15.23437246	19.802	0.000019802	10.86350669	
	average		177.26 27.109	2E-06 3E-07	14.988 1.1874	19.269 0.4501	2E-05 5E-07	11.103 2.0358	
	p1		156.67	1.5667E-06	15.65562558	19.591	0.000019591	12.50462756	
	p2		192.5	0.000001925	15.65562558	17.849	0.000017849	9.272207792	
20	p3	20.8	192.68	1.9268E-06	15.66294338	17.218	0.000017218	8.936059788	
	p4		217.13	2.1713E-06	16.6270413	16.346	0.000016346	7.528208907	
	average		189.75 24.9	2E-06 2E-07	15.9 0.4845	17.751 1.3727	2E-05 1E-06	9.5603 2.1033	
	p1	1	95.6	0.00000956	11.0327558	25.03	0.00002503	26.18200837	
	p2		82.74	8.274E-07	10.26390958	18.51	0.00001851	22.37128354	
40	p3	11.3	91.72	9.172E-07	10.80655038	15.475	0.000015475	16.87200174	
	p4		113.09	1.1309E-06	11.99961083	10.697	0.000010697	9.458838094	
	average		95.788 12.73	1E-06 1E-07	11.026 0.725	17.428 6.0023	2E-05 6E-06	18.721 7.2617	

ANNEXE D

Tableau de calcul des densités de courant des mesures sur l'électrode modifiée avec les aires des pipettes sondes respectives à chaque mesure

H Conce	1202 Entration	Optical (µm)	Area (um2)	Current (nA)	Current density (nA/um2)	Current density (mA/cm2)	
	p1			10.793	0.083874966	8.387496586	
	p2		1	11.49	0.089291518	8.929151837	
0	p3	12.8	128.6796351	11.49	0.089291518	8.929151837	
	p4			10.877	0.08452775	8.452774981	
	average			11.1625 0.379716	0.086746 0.002951	8.674644 0.295086	
	p1		174.3662463	14.225	0.081581156	8.158115636	
	p2	100 and 11		13.053	0.074859672	7.485967199	
0.5	p3	14.9		12.8	0.073408703	7.340870309	
	p4			12.674	0.072686086	7.268608617	
	average			13.188 0.709068	0.075634 0.004067	7.56339 0.406655	
	p1			15.018	0.079590058	7.95900582	
	p2	15.5	188.6919088	14.495	0.076818344	7.681834423	
2	p3			14.099	0.074719685	7.471968508	
	p4			14.369	0.076150589	7.615058905	
	average			14.49525 0.385669	0.07682 0.002044	7.681967 0.204391	
	p1			19.381	0.066247834	6.624783381	
	p2			18.72	0.063988414	6.398841386	
5	p3	19.3	292.5529619	19.171	0.065530015	6.553001507	
	p4			19.802	0.067686889	6.768688949	
	average			19.2685 0.450051	0.065863 0.001538	6.586329 0.153836	
	p1			19.591	0.057655408	5.765540847	
	p2			17.849	0.052528783	5.25287829	
20	p3	20.8	339.7946614	17.218	0.050671779	5.067177903	
	p4			16.346	0.048105523	4.810552329	
	average			17.751 1.372749	0.05224 0.00404	5.224037 0.403994	
	p1			25.03	0.249582472	24.95824716	
	p2			18.51	0.184569379	18.45693788	
40	p3	11.3	100.2874915	15.475	0.154306382	15.43063823	
	p4			10.697	0.106663352	10.66633519	
	average			17.428 6.002269	0.17378 0.059851	17.37804 5.985062	

ANNEXE E

Tableau des approximations du nombre d'enzymes par µm² selon les images de microscopie à force atomique

	Numbero	of enzymes pe	r m2 (AFM approxim	ation)
1 catalase molecule	diameter	10	nm	
	=	0.0000001	m	
area covered		7.85398E-17	m2	
in 1 meter square		1.27324E+16	enzymes molecules	
in 100 micrometer s	quare			
1E-10 m2		1273239.545	enzyme molecules	100um2
Assuming 50% enzyme coverage		636619.7724	enzyme molecules	
pentalayer assumti	on	3183098.862	enzyme molecules	
in 300 micrometer s	quare	9549296.586	enzyme molecules	
= per um2		31830.98862		

ANNEXE F

Prédiction du courant attendu pour l'échantillonnage d'une surface électroactive renfermant 50 enzymes

Current predi	icted from 50 cata	lase enzyme	s			
O2 generated	l per second by 50) enzymes				
=	750000000	o2/s from t	his enzyme quantity	1		
in moles of O	2					
=	1,24543E-15	moles O2/s				
Faraday Law						
Q = nFN		n = 2 numb	er of electrons in pr	ocess	2	
		F = 96485 c	/mol of electrons		96485	
		N = moles (02/s		1,25E-15	
in 1 second		Q=	2,40331E-10	coulombs C		
		I =	2,40331E-10	Α		
		=	240	pA		
		For a contin	nuous flow of substr	ate without inhib	itory effects on th	ne enzvr

ANNEXE G

Prédiction du courant attendu pour l'échantillonnage d'une surface électroactive renfermant le nombre estimé (Annexe E) d'entités enzymatiques

	Predictive	calculations			
	Current pr	edicted from 3	x 10^6 catalase enz	ymes	
Catalase catalytic	constant				
k2 (average)		3000000	h2o2/s		
	=	1500000	02/s		
Analas (1994)	O2 genera	s			
	=	4,5E+13	o2/s from this enz	yme quantity	
	in moles o	f 02			
	=	7,4726E-11	moles O2/s		
	Faraday La	W			
	Q = nFN		n = 2 number of el	2	
			F = 96485 c/mol o	felectrons	96485
			N = moles O2/s		7,4726E-11
in 1 second	Q=	1,44199E-05	coulombs C		
	I =	1,44199E-05	Α		
		14	шА		
	For a cont	inuous flow of s	substrate without in	hibitory effects on the enz	yme

ANNEXE H

Estimation du nombre d'enzymes actives sondées selon la densité du courant mesuré

					Calcul du nombre	d'enzyme	
densite	de couran	t stationnaire moye	nne 2mM		7.62E+00	mA/cm2	
		resolution du ter	nps		1	5	
			charge		7.62E+00	mC/s	
				=	0.00762	C/s	
		Loi de faraday					
n=2 nur	nber of el	lectrons in process			2 3.9488E-08	moles/s	
F = 9648	5 c/mol of	electrons		964	85 2.37797E+16	molecules	s O2/s
Q=0,00	762 moles	02/s		0.007	62		
	Conaiss	Conaissant k2 = 30 000 000 l			1585311706	enzymes a	actives
	=	15 000 000 o2/s				par cm2	
				=	15.85311706	par um2	

ANNEXE I

Estimation de la constante de vitesse selon le nombre calculé d'enzymes actives déduit par la densité du courant mesuré

	Calcul de k2		
	7.62E+00	mA/cm2	
	1	s	
	7.62	mC/s	
	0.00762	C/s	
	0.00381	C/s	
	3.9488E-08	moles/s	
	2.37797E+16	molecules O2/s	
		7133.902679	
x2 pour s	ubstrat	14267.80536	est k2

ANNEXE J

Calcul de la concentration dissoute d'oxygène selon la méthode de standard ajouté

			Line	st FUNCTION						
			2.91505	1.756711926						
			0.124341	0.147995837						
			0.998184	0.183025546						
			549.6177	1						
			18.41129	0.033498351						
			Could it be	Could it be that every 2 H2O2 molecule dismutation						
			generates	1 O2 molecule						
			require a	factor multiplicatio	on of 2?					
-			0.602635	mM	is the x intercept					
			1.20527	mM	if multiplied by 2					
			Theoretic	al O2 solubility in a	queous solution					
			1.24	mM	(Compton)					
40	mg/L	=	1.25	mM	(Google)					
9	ng/L	=	0.281	mM						

ANNEXE K

Calcul de la limite de détection actuelle et en supposant un équipement plus sensible

	LOD calculations			
	noise =	30	рА	
	3σ=	90	рА	
		9E-08	mA	
	Assuming an area of	140.3642	um2	
		1.4E-06	cm2	
	the lowest detectabl	e limit is		
		0.064119	mA/cm2	
_	LOD =		0.022484	mM
Now	with a commonly availa	able ampl	ifier noise	can be
Now	with a commonly avail reduced to the a noise =	able ampl tto molar 30	ifier noise range aA	can be
Now	with a commonly availa reduced to the a noise = 3σ=	able ampl tto molar 30 90	ifier noise range aA aA	can be
Now	with a commonly availa reduced to the a noise = 3σ=	able ampl tto molar 30 90 9E-14	ifier noise range aA aA mA	can be
Now	with a commonly availar reduced to the a noise = 3 a a a a a a a a a a a a a a a a a a	able ampl tto molar 30 90 9E-14 140.3642	ifier noise range aA aA mA um2	can be
Now	with a commonly availa reduced to the a noise = 3σ= Assuming an area of	able ampl tto molar 30 90 9E-14 140.3642 1.4E-06	ifier noise range aA aA mA um2 cm2	can be
Now	with a commonly availareduced to the a noise = 3σ= Assuming an area of the lowest detectabl	able ampl tto molar 30 90 9E-14 140.3642 1.4E-06 e limit is	ifier noise range aA aA mA um2 cm2	can be
Now	with a commonly availa reduced to the a noise = 3σ= Assuming an area of the lowest detectabl	able ampl tto molar 30 90 9E-14 140.3642 1.4E-06 e limit is 6.41E-08	ifier noise range aA aA mA um2 cm2 mA/cm2	can be
Now	with a commonly availate reduced to the a noise = 3σ= 4 and the second	able ampl tto molar 30 90 9E-14 140.3642 1.4E-06 e limit is 6.41E-08	ifier noise range aA aA mA um2 cm2 mA/cm2 2.25E-08	can be

ANNEXE L

Tableau de calcul des densités de courant des points de la cartographie sur l'électrode sans enzymes avec les aires mesurées au microscope à lumière visible

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
raw cum	ent	-3.20232	-3.04142	-3.04142	-3.2239	-3.29258	-3.37303	-3.3279	-3.16307	-3.31613	-3.35145	-3.20232	-3.24353
baselin	P	-2 28204	-2 28597	-2 2742	-2 27616	-2.29578	-2.28793	-2.29186	-2.28597	-2.28597	-2.30755	-2.28597	-2.2997
correcte	d nA	0 92028	0.75545	0.76722	0.94774	0.9968	1.0851	1.03604	0.8771	1.03016	1.0439	0.91635	0.94383
area um	2	140.54	126.19	117.3	133.01	126.57	115.63	120.76	137.63	107.53	120.1	119.38	132.06
density	(nA/um2)	0.006548171	0.005987	0.006541	0.007125	0.007875	0.009384	0.008579	0.006373	0.00958	0.008692	0.007676	0.007147
density	(mA/cm2)	0.654817134	0.598661	0.654066	0.712533	0.787548	0.938424	0.857933	0.637288	0.958021	0.869192	0.767591	0.714698
	(
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25**
	-3.34948	-3.28473	-3.30828	-3.36322	-3.26315	-3.5045	-3.54178	-3.33771	-3.39658	-3.42209	-3.44367	-3.37303	-3.41424
	-2.29578	-2.29186	-2.30755	-2.2997	-2.30363	-2.30167	-2.30167	-2.31344	-2.29578	-2.30167	-2.28401	-2.28793	-2.29186
	1.0537	1.0537	0.99287	1.06352	0.95952	1.20283	1.24011	1.02427	1.1008	1.12042	1.15966	1.0851	1.12238
	143.08	127.78	137.89	108.75	105.26	88.38	136.57	137.17	118.62	121.39	97.47	107.34	124.725
	0.007364	0.008246204	0.0072	0.009779	0.009116	0.01361	0.00908	0.007467	0.00928	0.00923	0.011898	0.010109	0.008999
	0.736441	0.824620441	0.720045	0.977949	0.911571	1.360975	0.90804	0.746716	0.928005	0.922992	1.189761	1.0109	0.899884
					******						**trend v	alue	
	corrected	mA	9.2E-07										
	area cm2		1.41E-06										
			0.654817										
		lancity	0.007636	n & lum 7									
	daciage (bensity	0.762564	mA/cm2	+	0 120973	mA/cm2			-			
			0.702501	in y cinz	-		in yeme						
	relative s	surface heigh	t						-				
			1	. 2	3	4	5		1	2	3	4	5
			37.4	38.25	38.4	37.05	36.8		0.6	1.45	1.6	0.25	0
			38.11	38.35	39.05	39.65	40.05		1.31	1.55	2.25	2.85	3.25
			39.95	40.35	40.3	40.7	40.75		3.15	3.55	3.5	3.9	3.95
			40.3	39.75	39.8	40	40.136		3.5	2.95	3	3.2	3.336
			39.81	41.31	40.31	40.39	40.45		3.01	4.51	3.51	3.59	3.65

ANNEXE M

Tableau de calcul des densités de courant des points de la cartographie sur l'électrode sans enzymes avec l'aire de la pipette sonde

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
raw current		-3.20232	-3.04142	-3.04142	-3.2239	-3.29258	-3.37303	-3.3279	-3.16307	-3.31613	-3.35145	-3.20232	
baseline		-2.28204	-2.28597	-2.2742	-2.27616	-2.29578	-2.28793	-2.29186	-2.28597	-2.28597	-2.30755	-2.28597	
corrected	nA	0.92028	0.75545	0.76722	0.94774	0.9968	1.0851	1.03604	0.8771	1.03016	1.0439	0.91635	
area um2		78.53981634	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	
density (nA/um2)		0.011717369	0.009619	0.009769	0.012067	0.012692	0.013816	0.013191	0.011168	0.013116	0.013291	0.011667	
density (n	nA/cm2)	1.171736888	0.961869	0.976855	1_2057	1.269165	1.381592	1.319127	1.116758	1.31164	1.329135	1.166733	
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
-3.24353	-3.34948	-3.28473	-3.30828	-3.36322	-3.26315	-3.5045	-3.54178	-3.33771	-3.39658	-3.42209	-3.44367	-3.37303	-3.41424
-2.2997	-2.29578	-2.29186	-2.30755	-2.2997	-2.30363	-2.30167	-2.30167	-2.31344	-2.29578	-2.30167	-2.28401	-2.28793	-2.29186
0.94383	1.0537	1.0537	0.99287	1.06352	0.95952	1.20283	1.24011	1.02427	1.1008	1.12042	1.15966	1.0851	1.12238
78.53982	78.53982	78.53981634	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982	78.53982
0.012017	0.013416	0.013416125	0.012642	0.013541	0.012217	0.015315	0.01579	0.013041	0.014016	0.014266	0.014765	0.013816	0.014291
1.201722	1.341613	1.341612508	1.264161	1.354116	1.221699	1.531491	1.578957	1.304141	1.401582	1.426563	1.476525	1.381592	1.429059
average d	lensity	0.012010283	nA/um2										
		1.201028343	mA/cm2	±	0.140164	mA/cm2							

ANNEXE N

Tableau de calcul des densités de courant des points de la cartographie sur l'électrode avec enzymes utilisant les aires mesurées au microscope à lumière visible

	CAT-PSC20	Onm-PBS on G	SCE (25poi	nts)							*****		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
raw curre	nt	-3.69679	-3.68895	-3.54374	-3.63008	-3.53197	-3.40835	-3.47507	-3.36911	-3.31809	-3.20036	-3.17681	-3.16504
baseline		-2.4194	-2.39193	-2.38015	-2.40174	-2.39389	-2.39978	-2.39389	-2.38604	-2.38015	-2.37623	-2.36446	-2.39193
corrected	nA	1.27739	1.29702	1.16359	1.22834	1.13808	1.00857	1.08118	0.98307	0.93794	0.82413	0.81235	0.77311
area um2		236.83	243.14	248.12	252.59	249.08	259.98	260.74	242.74	260.74	259.98	277.28	285.72
density (r	nA/um2)	0.0053937	0.005334	0.00469	0.004863	0.004569	0.003879	0.004147	0.00405	0.003597	0.00317	0.00293	0.002706
density (r	nA/cm2)	0.539370012	0.533446	0.468963	0.486298	0.456913	0.387941	0.414658	0.404989	0.359722	0.316997	0.292971	0.270583
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
-3.167	-3.14345	-3.12383	-3.20036	-3.16111	-3.17289	-3.14934	-3.16307	-3.23568	-3.11598	-3.18858	-3.22979	-3.16111	
-2.35661	-2.35857	-2.37427	-2.36446	-2.3625	-2.34484	-2.38212	-2.38015	-2.37034	-2.34876	-2.37427	-2.38015	-2.38015	
0.81039	0.81039	0.78488	0.8359	0.79861	0.82805	0.76722	0.78292	0.86534	0.76722	0.81431	0.84964	0.78096	
261.33	257.44	262.77	272.61	269.02	263.01	257.68	268.5	284.68	269.05	255.8	267.86	242.01	
0.003101	0.003148	0.002986947	0.003066	0.002969	0.003148	0.002977	0.002916	0.00304	0.002852	0.003183	0.003172	0.003227	
0.310102	0.314788	0.298694676	0.306629	0.296859	0.314836	0.297741	0.29159	0.303969	0.285159	0.318339	0.317196	0.322697	
					8416								
	corrected	mA	1 28E-06					1111 at 1 - and 1			-		
	area cm2		2.37E-06	-									
			0 53937										
	average (lensity	0.004111	nA/um2									
			0.411071	mA/cm2	±	0.089597	mA/cm2						
	Average	lensity no en	zymes - G	CE	0.849533	mA/cm2				1			
	Panalasia		hingh (b)							-			
	Statistic	omparison v	s olank yu	St PSC)									
		SD cat-psc	0.081321	mA/cm2		0.006613							
		SD psc	0.17512	mA/cm2		0.030667							
		Rooled SD		0.022192									
		, ooicu oo		V.VLL10J									
		t-calc		68.46948	>>>	t-table							

ANNEXE O

Tableau de calcul des densités de courant des points de la cartographie sur l'électrode avec enzymes utilisant l'aire de la pipette sonde

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
raw curre	nt	-3.69679	-3.68895	-3.54374	-3.63008	-3.53197	-3.40835	-3.47507	-3.36911	-3.31809	-3.20036	-3.17681	
baseline	-2.4194 -2.39193 -2.38015 -2.4017		-2.40174	-2.39389	-2.39978	-2.39389	-2.38604	-2.38015	-2.37623	-2.36446			
corrected	nA	1.27739	1.29702	1.16359	1.22834	1.13808	1.00857	1.08118	0.98307	0.93794	0.82413	0.81235	
area um2		143.5632444	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	
density (r	A/um2)	0.008897751	0.009034	0.008105	0.008556	0.007927	0.007025	0.007531	0.006848	0.006533	0.005741	0.005658	
density (r	nA/cm2)	0.889775099	0.903449	0.810507	0.855609	0.792738	0.702527	0.753104	0.684764	0.653329	0.574054	0.565848	
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	21
-3.16504	-3.167	-3.14345	-3.12383	-3.20036	-3.16111	-3.17289	-3.14934	-3.16307	-3.23568	-3.11598	-3.18858	-3.22979	-3.16111
-2.39193	-2.35661	-2.35857	-2.37427	-2.36446	-2.3625	-2.34484	-2.38212	-2.38015	-2.37034	-2.34876	-2.37427	-2.38015	-2.3801
0.77311	0.81039	0.81039	0.78488	0.8359	0.79861	0.82805	0.76722	0.78292	0.86534	0.76722	0.81431	0.84964	0.7809
143.5632	143.5632	143.5632444	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	143.5632	143.563
0.005385	0.005645	0.005644829	0.005467	0.005823	0.005563	0.005768	0.005344	0.005453	0.006028	0.005344	0.005672	0.005918	0.00544
0.538515	0.564483	0.564482924	0.546714	0.582252	0.556277	0.576784	0.534413	0.545348	0.602759	0.534413	0.567213	0.591823	0.54398

average d	lensity	0.007441548	nA/um2										
		0.744154767	mA/cm2	±	0.118356	mA/cm2							

ANNEXE P







APPENDICES

APPENDICE A

Exemples de calculs des densités de courant

I) (Annexe A, B, C et D) Conversion des courants en densité de courant

 $\frac{Moyenne \ des \ courant \ lus \ (mA)}{Aire \ de \ la \ gouttelette \ (cm^2)}$

 Exemple avec le point #1 à 2 mM H₂O₂ utilisant l'aire mesurée au microscope à lumière visible sur le courant obtenu du carbone vitreux propre (Annexe A)

$$\frac{16.208 \ nA}{187.25 \ \mu m^2} = \frac{1.6208 \ \times 10^{-5} \ mA}{1.8725 \ \times 10^{-6} \ cm^2} = 8.7967 \ \frac{mA}{cm^2} \sim 8.8 \ \frac{mA}{cm^2}$$

 Exemple avec le point #1 à 2 mM H₂O₂ utilisant l'aire calculée par le diamètre de la pipette sur le courant obtenu du carbone vitreux propre (Annexe B)

$$\frac{16.208 \ nA}{188.69 \ \mu m^2} = \frac{1.6208 \ \times 10^{-5} \ mA}{1.8869 \ \times 10^{-6} \ cm^2} = 8.5896 \ \frac{mA}{cm^2} \sim 8.6 \ \frac{mA}{cm^2}$$

 Exemple avec le point #1 à 2 mM H₂O₂ utilisant l'aire mesurée par microscopie à lumière visible sur le courant obtenu du carbone vitreux modifié avec catalase (Annexe C)

$$\frac{15.018 \ nA}{102.68 \ \mu m^2} = \frac{1.5018 \ \times 10^{-5} \ mA}{1.0268 \ \times 10^{-6} \ cm^2} = 14.626 \ \frac{mA}{cm^2} \sim 15 \ \frac{mA}{cm^2} / cm^2$$

 Exemple avec le point #1 à 2 mM H₂O₂ utilisant l'aire calculée par le diamètre de la pipette sur le courant obtenu du carbone vitreux modifié avec catalase (Annexe D)

$$\frac{15.018 \ nA}{188.69 \ \mu m^2} = \frac{1.5018 \ \times 10^{-5} \ mA}{1.8869 \ \times 10^{-6} \ cm^2} = 7.9590 \ \frac{mA}{cm^2} \sim 8 \ \frac{mA}{cm^2}$$

APPENDICE B

Exemples de calculs du recouvrement enzymatique par microscopie à force atomique

- II) (Annexe E) Exemple de l'approximation des entités de catalase par μm² avec la microscopie à force atomique
- 1) Calcul de l'aire recouverte par 1 entité de catalase

$$A = \pi \times r^2$$

$$A = \pi \times (5 \times 10^{-9} \, m)^2 = 7.85 \times 10^{-17} \, m^2$$

Où r est le rayon d'une molécule de catalase, soit 5 x 10^{-9} m. Et A est l'aire recouverte par une molécule de catalase.

2) Nombre d'entité de catalase recouvrant 100 % d'une superficie de 1 m²

$$N=\frac{1}{A}$$

$$\frac{1}{7.85 \times 10^{-17} m^2} = 1.27 \times 10^{16} \ catalase/m^2$$

Ou N est le nombre d'entité enzymatique par unité de surface.

3) Conversion des m^2 en μm^2

$$1 \,\mu m^2 = 10^{-12} \,m^2$$

$$1.27 \times 10^{16} \ catalase/_{m^2} \times 10^{-12} \frac{m^2}{\mu m^2} = 1.27 \times 10^4 \ catalase/_{\mu m^2}$$

4) Présumant 50 % de couverture et formation d'une pentacouche

$$N_{estimée} = \frac{5 \times N}{2}$$

$$\frac{5 \times 1.27 \times 10^4 \ catalase}{2} = 3 \times 10^4 \ catalase}{\mu m^2}$$

Où $N_{estimée}$ est le nombre d'entité enzymatique estimée par unité de surface déterminé par microscopie à force atomique

APPENDICE C

Exemples de calculs d'une prédiction de courant selon le décompte enzymatique par microscopie à force atomique et l'aire mesurée par microscopie à lumière visible

- III) (Annexe G) Approximation du courant généré par 3 x 10⁶ molécules/μm² (soit sous l'aire du point #1 à 2 mM H₂O₂ étant d'environ 100 μm² (exemple de calcul I)-3))
- 1) Calcul du O_2 généré par seconde par 3 x 10^6 molécules de catalase

$$N_{02} = k_2 \times 3 \times 10^6 \, catalase/_{100} \, \mu m^2$$

$$15\,000\,000 \, \frac{O_2}{s} \times 3 \times 10^6 \, catalase_{100 \, \mu m^2} = 4.5 \times 10^{13} \, \frac{O_2}{s}$$

Où k_2 est la constante de vitesse de la littérature moyenne de 30 000 000 substrat/s, soit 15 000 000 produits/s (stœchiométrie 2 pour 1) et N_{O2} est le taux de production de produit O_2 .

2) Conversion en moles de O2 généré par seconde

$$n_{O2} = \frac{N_{O2}}{6.022 \times 10^{23}}$$

$$\frac{4.5 \times 10^{13} O_2/_S}{6.022 \times 10^{23}} = 7.5 \times 10^{-11} \text{ moles } O_2/_S$$

Où n_{O2} est le nombre de moles d'O₂ produit par seconde.

 Application de la loi de Faraday pour calculer le courant attribué à la réduction de ce taux d'O₂ sur l'électrode de carbone (revoir section 1.1.6)

Q = nFN

$$2 e^{-} \times 96 485 C/_{moles} \times 7.5 \times 10^{-11} \frac{moles}{s} = 1.4 \times 10^{-5} = 14 \mu A$$

Où *n* est le nombre d'électrons impliqués dans le processus de réduction de O_2 en H_2O_2 par l'électrode de carbone, *F* est la constante de Faraday (96 485 Coulomb/moles électrons), *N* est le taux de production de produit (moles O_2/s) et *Q* est la charge attribuée au taux de production (Coulomb/s). Puisqu'il s'agit ici d'un taux, la charge est également le courant (A).

APPENDICE D

Exemples de calculs du recouvrement enzymatique selon la densité moyenne du courant

- IV) (Annexe H) Estimation du nombre d'enzymes actives sous l'aire mesurée par microscopie à lumière visible, selon la densité de courant moyenne mesurée des solutions de 2 mM H₂O₂.
- 1) Conversion de la densité de courant en densité de charge

$$Q = I dt$$

$$7.62 \ \frac{mA}{cm^2} \times 1 \ s = 7.62 \ \frac{mC}{cm^2} = 0.00762 \ \frac{C}{cm^2}$$

Où Q est la charge (en Coulomb/cm²), I est la densité de courant (en mA/cm²) et dt est le temps.

 Application de la loi de Faraday pour dénombrer le nombre de moles de produit oxygène formés

$$Q = nFN$$

$$\frac{0.00762 \ C/_{cm^2}}{2 \ e^- \times 96 \ 485 \ C/_{moles}} = 3.95 \ \times 10^{-8} \ moles \ O_2/_{cm^2}$$

Où *n* est le nombre d'électrons impliqués dans le processus de réduction de O_2 en H_2O_2 par l'électrode de carbone, *F* est la constante de Faraday (96 485 Coulomb/moles électrons), *N* est le taux de production de produit (moles O_2/s) et *Q* est la charge attribuée au taux de production (Coulomb/s). Puisqu'il s'agit ici d'un taux, la charge est également le courant (A).

3) Conversion en molécules de O2 par unité de surface

$$N \times N_A = N_{O2}$$

$$3.95 \times 10^{-8} \text{ moles } O_2/_{cm^2} \times 6.022 \times 10^{23} = 2.38 \times 10^{16} \text{ molécules } d'O_2/_{cm^2}$$

Où N est le nombre de moles d'O₂ par cm², N_A est le nombre d'Avogadro et N_{O2} est le nombre de molécules d'O₂ par cm².

 Détermination du nombre d'enzymes par unité de surface avec la constante catalytique k₂ de la littérature

$$\frac{N_{02}}{k_2} = \frac{2.38 \times 10^{16} \text{ molécules } d'^{0_2} / \text{s. cm}^2}{15\ 000\ 000\ \text{molécules } d'^{0_2} / \text{s.}}$$

=
$$16 \times 10^8 \text{ catalase}/_{cm^2} = 16 \text{ catalase}/_{\mu m^2}$$

Puisqu'il s'agit d'une densité de courant relativement stable à l'état stationnaire, on présume que le nombre de molécule produit d'O₂ ne varie pas en fonction du temps. D'où l'ajout du paramètre de temps au dénominateur de la formation de produit. Aussi, k_2 est divisé par 2 car la constante catalytique théorique évoque la transformation de substrat en produit par seconde et non la production de produit à partir du substrat par seconde par entité de catalase.
APPENDICE E

Exemples de calculs de l'évaluation de la constante catalytique selon la densité moyenne du courant

- V) (Annexe I) Évaluation de la constante catalytique selon la densité moyenne de courant mesuré à 2 mM et le décompte enzymatique par microscopie à force atomique.
- 1) à 3) même étapes que calcul IV)
- Détermination de la constante catalytique k₂ expérimentale selon le décompte enzymatique par microscopie à force atomique

$$\frac{N_{O2}}{N_{estimée}} = \frac{2.38 \times 10^{16} \text{ molécules } d'O_2/_{s.cm^2}}{3 \times 10^{12} \text{ catalase}/_{cm^2}} = 7500 \text{ molécules } d'O_2/_s$$

$$k_2 = 2 \times 7500$$
 molécule d' $O_2/s = 15000$ substrat/s

Où $N_{estimée}$ est l'approximation du recouvrement enzymatique par microscopie à force atomique.

APPENDICE F

Exemples de calculs de l'extrapolation de la concentration d'O2 dans la gouttelette

- VI) (Annexe J) Extrapolation linéaire pour déterminer la concentration d'O₂ dans la gouttelette par méthode de standard ajouté.
- 1) Régression linéaire de la droite enzymatique (Figure 3.10-B))

$$y = ax + b$$

$$y = 2.92 + 1.757$$

2) Pour y = 0, la droite intersecte l'axe des x

$$0 = 2.92x + 1.757$$

$$\frac{-1.757}{2.92} = x = -0.603 = 0.603 \ mM \ d'O_2$$

APPENDICE G

Exemples de calculs de la limite de détection

- VII) (Annexe K) Calcul de la limite de détection actuelle et de celle si l'équipement était amélioré
- 1) Régression linéaire de la droite enzymatique normalisée (Figure 3.11)

$$y = ax + b$$
$$y = 2.91 - 0.116$$

2) Détermination de la densité du courant du bruit de fond (en présumant une aire de 140 μm^2

$$\sigma = \frac{I}{A}$$

$$\sigma = \frac{I}{A} = \frac{9 \times 10^{-8} \, mA}{1.4 \times 10^{-6} \, cm^2} = 0.064 \, \frac{mA}{cm^2}$$

Où *I* est le bruit de fond sur l'oscilloscope du potentiostat, *A* est l'aire de mesure et σ est la valeur du bruit en densité de courant.

3) Application de la formule de calcul de la limite de détection

$$LOD = \frac{3 \times \sigma}{a}$$

$$LOD = \frac{3 \times (0.064 \ mA/_{cm^2})}{2.91} = 0.022 \ mM = 22 \ \mu M$$

Où σ est la valeur du bruit de fond en densité de courant, *a* est la pente de la droite et *LOD* est la limite de détection.

APPENDICE H

Exemples de calculs statistiques du t de Student unidirectionnel pour comparer deux séries de données

- VIII) (Annexe L et N) Calcul statistique du t de Student unidirectionnel pour la comparaison des deux séries de mesures cartographiques
- 1) Calcul de l'écart-type combiné

$$S_P = \sqrt{\frac{S_1^2(N_1 - 1) + S_2^2(N_2 - 2)}{N_1 + N_2 - 2}}$$

$$S_P = \sqrt{\frac{0.031^2(25-1) + 0.007^2(25-1)}{25+25-2}} = 0.022$$

Où S_I est l'écart-type de la série de matrice sans enzymes, S_2 est l'écart-type de la série de matrice avec enzymes, N_I est le nombre de points dans la matrice sans enzymes, N_2 est le nombre de points dans la matrice avec enzymes et S_P est l'écart-type combiné.

2) Calcul du t de Student

$$t_{calc} = \left(\frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{S_P}\right) \times \sqrt{\frac{(N_1 \times N_2)}{(N_1 + N_2)}}$$

$$t_{calc} = \left(\frac{|0.85 - 0.41|}{0.022}\right) \times \sqrt{\frac{(625)}{(50)}} = 70$$

Où \bar{x}_1 est la densité de courant moyenne des mesures de la matrice sans enzymes, \bar{x}_2 est la densité de courant moyenne des mesures de la matrice avec enzymes, S_p est l'écart-type combiné, N_1 est le nombre de points dans la matrice sans enzymes, N_2 est le nombre de points dans la matrice avec enzymes et t_{calc} est le t de Student calculé.

3) Comparaison entre tcalc et ttable

 $t_{calc} \gg t_{table}$ donc statistiquement différent

BIBLIOGRAPHIE

Assaad, E., Blemur, L., Lessard, M. et Mateescu, M. A. (2012). Polyelectrolyte complex of carboxymethyl starch and chitosan as protein carrier: Oral administration of ovalbumin. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23, 1713-1728.

Atkins, P. W. et De Paula, J. (2013). Chimie Physique. Bruxelles : De Boeck.

- Bard, A. J., Fan, F. R. F., Kwak, J. et Lev, O. (1989). Scanning Electrochemical Microscopy. Introduction and Principles. *Analytical Chemistry*, 61, 132-138.
- Bartolini, L., Malferrari, M., Lugli, F., Zerbetto, F., Paolucci, F., Pelicci, P. G., ... Rapino, S. (2018). Interaction of Single Cells with 2D Organic Monolayers: A Scanning Electrochemical Microscopy Study. ChemElectroChem, 5, 2975-2981.
- Beers Jr, R. F. et Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of biological chemistry*, 195, 133-140.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Stryer, L. et National Center for Biotechnology, I. (2002). Biochemistry.

- Byers, J. C., Paulose Nadappuram, B., Perry, D., McKelvey, K., Colburn, A. W. et Unwin, P. R. (2015). Single Molecule Electrochemical Detection in Aqueous Solutions and Ionic Liquids. *Analytical Chemistry*, 87, 10450-10456.
- Calinescu, C., Mondovi, B., Federico, R., Ispas-Szabo, P. et Mateescu, M. A. (2012). Carboxymethyl starch: Chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 428, 48-56.
- Chan, C., Sepunaru, L., Sokolov, S. V., Kätelhön, E., Young, N. P. et Compton, R. G. (2017). Catalytic activity of catalase-silica nanoparticle hybrids: from ensemble to individual entity activity. *Chemical Science*, 8, 2303-2308.
- Chang, J. F., Xiao, Y., Luo, Z. Y., Ge, J. J., Liu, C. P. et Xing, W. (2016). Recent progress of non-noble metal catalysts in water electrolysis for hydrogen production. *Wuli Huaxue Xuebao/ Acta Physico - Chimica Sinica*, 32, 1556-1592.
- Cheng, Y. et Jiang, S. P. (2015). Advances in electrocatalysts for oxygen evolution reaction of water electrolysis-from metal oxides to carbon nanotubes. *Progress in Natural Science: Materials International*, 25, 545-553.
- Domingo, P. L., Garcia, B. et Leal, J. M. (1990). Acid-base behaviour of the ferricyanide ion in perchloric acid media. Spectrophotometric and kinetic study. *Canadian Journal of Chemistry*, 68, 228-235.

Elements. (2015). User's Guide [Brochure].

Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T. et Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95, 197-206.

- Emerson, D., Peteu, S. F. et Worden, R. M. (1996). A catalase microbiosensor for detecting hydrogen peroxide. *Biotechnology Techniques*, 10, 673-678.
- Gready, J. E. (1980). Elaboration of microscopic and macroscopic theories of enzyme action: with implications for enzyme evolution, reversibility and kinetics. *Journal of Theoretical Biology*, 83, 175-191.
- Gulaboski, R., Mirčeski, V., Bogeski, I. et Hoth, M. (2012). Protein film voltammetry: Electrochemical enzymatic spectroscopy. A review on recent progress. *Journal* of Solid State Electrochemistry, 16, 2315-2328.
- Han, Z., Li, W., Huang, Y. et Zheng, B. (2009). Measuring rapid enzymatic kinetics by electrochemical method in droplet-based microfluidic devices with pneumatic valves. *Analytical Chemistry*, 81, 5840-5845.
- Heck, D. E., Shakarjian, M., Kim, H. D., Laskin, J. D. et Vetrano, A. M. (2010). Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1203, 120-125.
- Hentges, D. (1996). Anaerobes: General Characteristics. Dans B. S (dir.), *Medical Microbiology* (4th edition éd., chap. Chapter 17). Galveston (TX) : University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Hirano, Y., Kowata, K., Kodama, M. et Komatsu, Y. (2013). Development of a scanning electrochemical microscopy-based micropipette and its application to analysis of topographic change of single-cell. *Bioelectrochemistry*, 92, 1-5.
- Hoeben, F. J. M., Meijer, F. S., Dekker, C., Albracht, S. P. J., Heering, H. A. et Lemay, S. G. (2008). Toward single-enzyme molecule electrochemistry: [NiFe] -Hydrogenase protein film voltammetry at nanoelectrodes. ACS Nano, 2, 2497-2504.

- Huang, L., Li, Z., Lou, Y., Cao, F., Zhang, D. et Li, X. (2018). Recent advances in scanning electrochemical microscopy for biological applications. *Materials*, 11.
- Jaramillo, T. F., Jørgensen, K. P., Bonde, J., Nielsen, J. H., Horch, S. et Chorkendorff, I. (2007). Identification of active edge sites for electrochemical H₂ evolution from MoS₂ nanocatalysts. *Science*, 317, 100-102.
- Johansson, Å., Mattiasson, B. et Mosbach, K. (1976). [44] Immobilized enzymes in microcalorimetry. Dans *Methods in Enzymology* (vol. 44, p. 659-667). Academic Press.
- Kalinowska, B., Banach, M., Wiśniowski, Z., Konieczny, L. et Roterman, I. (2017). Is the hydrophobic core a universal structural element in proteins? *Journal of Molecular Modeling*, 23.
- Kamin, R. A. et Wilson, G. S. (1980). Rotating Ring-Disk Enzyme Electrode for Biocatalysis Kinetic Studies and Characterization of the Immobilized Enzyme Layer. *Analytical Chemistry*, 52, 1198-1205.
- Kätelhön, E., Sepunaru, L., Karyakin, A. A. et Compton, R. G. (2016). Can Nanoimpacts Detect Single-Enzyme Activity? Theoretical Considerations and an Experimental Study of Catalase Impacts. ACS Catalysis, 6, 8313-8320.
- Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M. et Gaetani, G. F. (1999). Mechanisms of protection of catalase by NADPH: Kinetics and stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 13908-13914.
- Kissinger, P. T. et Heineman, W. R. (1983). Cyclic voltammetry. Journal of Chemical Education, 60(9), 702-706.
- Lai, M. E. et Bergel, A. (2000). Electrochemical reduction of oxygen on glassy carbon: Catalysis by catalase. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 494, 30-40.

- Lai, M. E. et Bergel, A. (2002). Direct electrochemistry of catalase on glassy carbon electrodes. *Bioelectrochemistry*, 55.
- Lardinois, O. M., Mestdagh, M. M. et Rouxhet, P. G. (1996). Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1295, 222-238.
- Léger, C., Elliott, S. J., Hoke, K. R., Jeuken, L. J. C., Jones, A. K. et Armstrong, F. A. (2003). Enzyme electrokinetics: Using protein film voltammetry to investigate redox enzymes and their mechanisms. *Biochemistry*, 42, 8653-8662.
- Li, L., Qin, C., Peng, Q., Yan, Z. et Gao, Q. (2010). Numerical simulation of dissolved oxygen supersaturation flow over the three gorges dam spillway. *Tsinghua Science and Technology*, 15, 574-579.
- Liao, M., Li, W., Xi, X., Luo, C., Fu, Y., Gui, S., ... Jiang, C. (2017). Highly active Pt decorated Pd/C nanocatalysts for oxygen reduction reaction. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 24090-24098.
- Lin, C., Kätelhön, E., Sepunaru, L. et Compton, R. G. (2017). Understanding single enzyme activity via the nano-impact technique. *Chemical Science*, *8*, 6423-6432.
- Lodish, H. F. (2000). *Molecular cell biology*. New York; Basingstoke : W.H. Freeman ; Macmillan.
- Matsumae, Y., Takahashi, Y., Shiku, H. et Matsue, T. (2018). Quantitative Real-Time Monitoring of Antibody-Induced Internalization of Epidermal Growth Factor Receptor on Single Living Mammalian Cells Using Scanning Electrochemical Microscopy. ChemElectroChem, 5, 3096-3101.

McCreery, R. L. (2008). Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chemical Reviews*, 108, 2646-2687.

- McDonald, A. G., Boyce, S. et Tipton, K. F. (2009). ExplorEnz: The primary source of the IUBMB enzyme list. *Nucleic Acids Research*, 37, D593-D597.
- Mefford, J. T., Rong, X., Abakumov, A. M., Hardin, W. G., Dai, S., Kolpak, A. M., ... Stevenson, K. J. (2016). Water electrolysis on La_{1-x}Sr_zCoO_{3-δ} perovskite electrocatalysts. *Nature Communications*, 7.
- Milazzo, G. (1988). Applications of bioelectrochemistry in medicine. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 19, 191-205.
- Mosbach, K. (1976). [1] Introductionk. Dans *Methods in Enzymology* (vol. 44, p. 3-7). Academic Press.
- Nauth, A. M., Otto, N. et Opatz, T. (2015). α-Cyanation of Aromatic Tertiary Amines using Ferricyanide as a Non-Toxic Cyanide Source. Advanced Synthesis and Catalysis, 357, 3424-3428.
- Niranjana, E., Kumara Swamy, B. E., Raghavendra Naik, R., Sherigara, B. S. et Jayadevappa, H. (2009). Electrochemical investigations of potassium ferricyanide and dopamine by sodium dodecyl sulphate modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study. Journal of Electroanalytical Chemistry, 631, 1-9.
- O'Mullane, A. P. (2013). Electrochemistry. Dans Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier.
- Pletcher, D. (2009). A first course in electrode processes. Cambridge : Royal Society of Chemistry.

- Rajeshwar, K. et Ibanez, J. G. (1997). Environmental electrochemistry : fundamentals and applications in pollution abatement.
- Rink, V., Müller-Renno, C., Zieglera, C., Braun, M., Boonrod, K. et Krczal, G. (2017). Electrostatic conditions define the 2D self-assembly of tomato bushy stunt viruses on solid surfaces. *Biointerphases*, 12.
- Risch., M., Kelsey A. Stoerzinger., Tom Z. Regier, Derek Peak., Sayed Youssef Sayed., and Yang Shao-Horn. (2015). Reversibility of Ferri-/Ferrocyanide Redox During Operando Soft X-Ray Spectroscopy. *The journal of Physical Chemistry* C, 119, 18903-18910.
- Romero, P., Wagg, J., Green, M. L., Kaiser, D., Krummenacker, M. et Karp, P. D. (2005). Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome. *Genome biology*, 6.
- Rusling, J. F. et Suib, S. L. (1994). Characterizing Materials with Cyclic Voltammetry. Advanced Materials, 6, 922-930.
- Salitra, G., Soffer, A., Eliad, L., Cohen, Y. et Aurbach, D. (2000). Carbon electrodes for double-layer capacitors. I. Relations between ion and pore dimensions. *Journal of the Electrochemical Society*, 147, 2486-2493.
- Schroeder, W. A., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Robberson, B., Apell, G., Fang, R. S. et Bonaventura, J. (1982). The complete amino acid sequence of bovine liver catalase and the partial sequence of bovine erythrocyte catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 214, 397-421.
- Sepasi Tehrani, H. et Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 140, 5-12.

- Sepunaru, L., Laborda, E. et Compton, R. G. (2016). Catalase-Modified Carbon Electrodes: Persuading Oxygen to Accept Four Electrons Rather Than Two. Chemistry - A European Journal, 22, 5904-5908.
- Shu, F. R. et Wilson, G. S. (1976). Rotating Ring-Disk Enzyme Electrode for Surface Catalysis Studies. Analytical Chemistry, 48, 1679-1686.
- Sichak, S. P. et Dounce, A. L. (1986). Analysis of the peroxidatic mode of action of catalase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 249, 286-295.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R., Buess-Herman, C., Dauchot-Weymeers, J. et Doneux, T. (2015). *Chimie analytique*. Bruxelles : De Boeck.
- Smith, A. J. et Delorme, L. D. (2010). Chapter 19 Ostracoda. Dans J. H. Thorp et A. P. Covich (dir.), Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates (Third Edition) (p. 725-771). San Diego : Academic Press.
- Song, W. S., Lian, L., Wang, X. et Sun, H. (2014) Oxygen reduction reaction on Pt surface in PEM fuel cell cathode based on the first-principles molecular dynamics. : Vol. 672-674. Applied Mechanics and Materials (pp. 657-660).
- Sun, H., Yu, D. X., Song, W. S. et Wang, X. (2015). The analysis of oxygen reduction reaction with proton based on catalysis of pt. Kung Cheng Je Wu Li Hsueh Pao/Journal of Engineering Thermophysics, 36, 2641-2645.
- Todd, M. J. et Gomez, J. (2001). Enzyme kinetics determined using calorimetry: A general assay for enzyme activity? *Analytical Biochemistry*, 296, 179-187.
- Van Benschoten, J. J., Lewis, J. Y., Heineman, W. R., Roston, D. A. et Kissinger, P. T. (1983). Cyclic voltammetry experiment. *Journal of Chemical Education*, 60, 772-776.

- van Schie, M. M. C. H., Ebrahimi, K. H., Hagen, W. R. et Hagedoorn, P. L. (2018). Fast and accurate enzyme activity measurements using a chip-based microfluidic calorimeter. *Analytical Biochemistry*, 544, 57-63.
- Williams, C. G., Edwards, M. A., Colley, A. L., Macpherson, J. V. et Unwin, P. R. (2009). Scanning micropipet contact method for high-resolution imaging of electrode surface redox activity. *Analytical Chemistry*, 81, 2486-2495.
- Yonekura, K. et Maki-Yonekura, S. (2016). Refinement of cryo-EM structures using scattering factors of charged atoms. *Journal of Applied Crystallography*, 49, 1517-1523.
- Yu, A. et Caruso, F. (2003). Thin Films of Polyelectrolyte-Encapsulated Catalase Microcrystals for Biosensing. Analytical Chemistry, 75, 3031-3037.
- Zámocký, M. et Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: Clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72, 19-66.