

Méthodologie de détermination des constantes cinétiques de reconnaissance

III-1- Etat de l'art

L'étude cinétique d'une réaction nécessite de suivre l'évolution d'un signal représentatif de la concentration de l'un des réactifs ou de l'un des produits en fonction du temps. Les méthodes cinétiques sont donc qualifiées essentiellement en fonction de la résolution temporelle qu'elles permettent d'atteindre, c'est-à-dire l'« âge » minimal observable d'une réaction. Parmi ces méthodes, on distingue principalement :

- Les méthodologies en flux basées sur un mélange extrêmement rapide ;
- Les techniques de relaxations basées sur la perturbation d'un système à l'équilibre par une variation brutale de température ou de pression ;
- Les techniques de flash photolyse basées sur l'activation photo induite d'un *pro*-réactif ;
- Les méthodes séparatives d'un état à l'équilibre vers un état hors-équilibre.

Pour les techniques en flux, basées sur un mélange extrêmement rapide des réactifs, la résolution temporelle dépend notamment des facteurs cinétiques suivants :

- Le temps d'injection des réactifs, τ_{inj} ;
- Le temps de mélange des réactifs, τ_{mix} ;
- Le temps mort du dispositif, c'est-à-dire le temps nécessaire aux réactifs pour atteindre le point d'observation τ_{min} ;
- La durée d'acquisition du signal τ_{aq} ;

D'une part, τ_{inj} , τ_{mix} et τ_{min} sont dépendants des techniques employées pour déclencher la réaction. D'autre part, τ_{aq} dépend de la méthode de transduction utilisée. Ces méthodes sont nombreuses, et dans le cas de l'étude des interactions entre un aptamère et une petite molécule, la cinétique du processus est le plus souvent suivie par spectroscopie de fluorescence ou par RMN.

La somme de ces fenêtres de temps est limitante pour l'analyse cinétique d'une réaction. Pour être capable de mesurer avec précision une cinétique de réaction, il est impératif que la constante de temps de la méthode soit inférieure au temps de demi-réaction ($t_{1/2}$), ou d'être capable de déconvoluer le temps de réponse global de l'appareillage du temps de réaction.

a. Technique en flux

Les techniques en flux sont, le plus souvent, couplées à une détection spectroscopique, et sont utilisées pour étudier des réactions sur des durées de quelques dizaines de microseconde à plusieurs centaines de secondes. De faibles volumes de réactifs sont rapidement poussés par des seringues

vers une chambre de mélange, où la réaction s'initie. Puis ce mélange homogène gagne la chambre d'observation. La solution fraîchement mélangée n'est alors âgée que du temps qu'il lui faut pour passer de la chambre de mélange à la chambre d'observation, typiquement quelques millisecondes, c'est le *temps-mort* (τ_{min}) du dispositif (Fig 60).

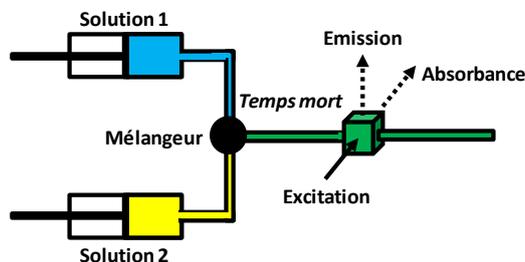


Fig 60 : Schéma générale d'un mélangeur rapide couplé à de la spectroscopie.

Les premiers dispositifs utilisant ces techniques en flux ont été décrits par B. Chance¹⁶³ en 1964. Dans ce cas, le flux de mélange était alors ininterrompu (*Continuous-Flow*) et plus la mesure était effectuée proche du mélangeur, plus l'évènement observé était précoce. Il n'y avait dans ce cas pas d'exigences sur l'échantillonnage de la mesure, permettant l'utilisation de techniques d'analyses comme la spectrométrie Raman^{164,165}, ou la diffusion des rayons X aux petits angles^{166,167}. Les performances du *Continuous flow* ont été améliorées par M. Shastry¹⁶⁸ en 1998 notamment en utilisant une caméra CCD (Coupled Charge Device, où le capteur est constitué de milliers de diodes photosensibles) et un mélangeur capillaire pour atteindre un temps de mélange de 15 μs et un temps mort de 45 μs . Ainsi, la solution est âgée de 60 μs lorsqu'elle arrive au détecteur. Il est alors impossible de mesurer un temps de réaction inférieur à cette limite. Les échantillons peuvent être analysés ici jusqu'à 1 ms après le mélange.

Une alternative, pour consommer moins de matière, est le *Stopped-flow*, où lorsque le flux a gagné la chambre d'observation, il est stoppé à l'aide d'une troisième seringue (*Stopping syringe*), ce qui permet d'explorer une fenêtre de temps réactionnel allant jusqu'à la minute¹⁶⁹. La réaction est alors suivie dans le temps en enregistrant les variations d'un signal optique (généralement d'absorption ou de fluorescence) ou de conductivité.

Les temps de mélange peuvent être réduits à la centaine de microseconde grâce à des mélangeurs turbulents de type *Berger*¹⁷⁰, utilisés notamment par le constructeur OLIS et BioLogic. Ce dernier propose également des dispositifs où $\tau_{\text{inj}} + \tau_{\text{mix}} + \tau_{\text{min}} < 0,6 \text{ ms}$. Ces dispositifs peuvent utiliser des volumes très faibles de l'ordre de la dizaine de microlitres dans la chambre de réaction, mais un minimum d'un millilitre est à prévoir pour remplir les seringues d'injection.

Dans le contexte d'une reconnaissance entre un aptamère et sa cible, cette technique a été utilisée par J. Wachtveitl¹⁷¹ pour étudier la dynamique conformationnelle de l'aptamère anti-tétracycline, ainsi que le confinement de la tétracycline dans l'aptamère. Cette molécule est intrinsèquement fluorescente, et cette propriété est exaltée lorsque la tétracycline interagit avec l'aptamère. Un suivi

de l'augmentation du signal de reconnaissance sera donc suffisant pour déterminer la cinétique de réaction.

Disposant de la structure cristallographique du complexe Aptamère/Cible, ils ont également pu muter précisément quelques bases impliquées dans le site de reconnaissance ou dans le maintien de la structure tertiaire. Ainsi, ils ont montré que deux nucléotides étaient indispensables à une première étape de complexation, et qu'un troisième nucléotide, qui n'interagit pas avec la cible, verrouillait structurellement le complexe (fig 61). Cet exemple illustre les possibilités offertes par la méthode *Stopped-flow* d'accéder aux grandeurs cinétiques du processus de reconnaissance et d'identifier les étapes élémentaires du mécanisme.

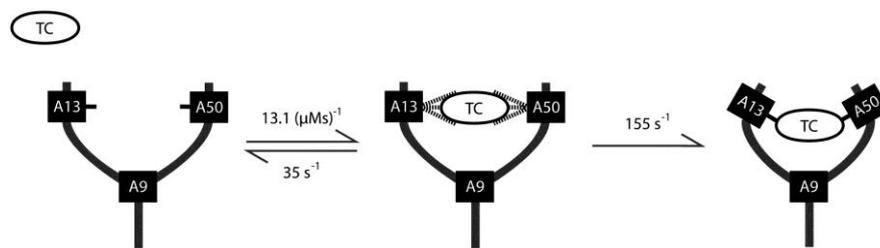


Fig 61 : Représentation schématique du processus de reconnaissance de la tetracycline par son aptamère¹⁷¹.

Dans les cas où aucun changement de fluorescence ou d'absorbance ne peut rendre compte de l'avancement d'une réaction, la technique de *Quenched-flow* constitue une alternative intéressante. Dans cette déclinaison du *Stopped-flow*, la première étape consiste toujours en un mélange rapide des réactifs. Pendant la deuxième étape, le transport du mélange, la réaction s'opère. Dans la dernière étape, la réaction est arrêtée par le mélange avec une troisième solution (le plus souvent un acide, mais également des chélateurs comme l'EDTA pour des réactions qui dépendent de la présence d'un métal). Typiquement, des réactions âgées de 2 à 150 ms peuvent être étudiées grâce à cette méthode. Des solutions plus âgées pourraient être obtenues en allongeant le circuit dans lequel circule la solution ou en diminuant le débit. Néanmoins, ces options contraignent à l'utilisation de plus de réactifs ou à un changement des conditions de mélange. Cette technique permet donc de stopper une réaction à des temps extrêmement courts ce qui peut donner accès à des intermédiaires de réactions¹⁷². Cette technique ne peut être que très difficilement appliquée à l'étude d'une réaction de reconnaissance bimoléculaire impliquant des biomolécules, car l'ajout d'acide ou de chélateur conduira le complexe à se dénaturer.

Lorsque la réaction ne peut pas être figée chimiquement, le *Quenched-freeze* peut être une solution. Dans ce système, la solution est gelée et permet une analyse par RMN ou RPE par exemple.

b. Techniques de relaxation

Dans le cas des réactions trop rapides pour être étudiées avec ces méthodes de mélange, des méthodes dites de perturbation peuvent être utilisées. Dans ces techniques, il est question de perturber un système déjà à l'équilibre en appliquant une variation brutale d'un paramètre influençant l'équilibre, typiquement l'augmentation de la température (*T-jump*) ou de la pression

(*Pressure jump*). La cinétique de retour à l'équilibre ou l'établissement d'un nouvel équilibre est alors suivie.

Dans le cas du *T-jump*, les sauts de température sont obtenus par effet Joule en faisant traverser un courant électrique à travers la solution. Classiquement, les sauts de température sont de l'ordre de 5°C en 1 à 2 μs . Les réactions de demi-vie plus courtes que la microseconde peuvent également être étudiées à l'aide de sauts de température induits par un laser en quelques nanosecondes^{173,174}. L'inconvénient de cette méthode est que la température n'est pas maintenue en solution. Il existe donc une limite supérieure au temps d'étude de la réaction, de l'ordre de la dizaine de secondes. Cette technique permet notamment l'étude cinétique de repliement de protéines¹⁷⁵.

En 1976, R. Clegg et B. Maxfield¹⁷⁶ ont décrit le premier appareil à saut de pression. Cet instrument permettait d'appliquer des variations de pression de 0,01 à 5 atm. La subite variation de pression imposée à un système à l'équilibre altère l'énergie libre de réaction, dans laquelle il y a une différence de volume entre les réactifs et les produits : pour une réaction de type $A + B \rightarrow AB$, si les réactifs $A + B$ ont un volume total V et le complexe AB un volume $V + \Delta V^\circ$, alors la réaction de complexation doit produire un travail $P\Delta V^\circ$ contre la pression extérieure pour se produire.

Bien que les perturbations induites par des sauts de pression soient plus faibles que celles induites par un saut de température, la répétition de la perturbation n'est pas restreinte comme dans le cas du saut de température, où il faut attendre un retour à la température ambiante.

Ce dispositif permet d'étudier des réactions de demi-vie $> 20 \mu\text{s}$, pendant plusieurs minutes. En 2002, D. Pearson¹⁷⁷ rapportent un dispositif de *Pressure-Jump* en microvolume (50 μl) permettant d'appliquer des variations de pression de 200 atm, en 80 μs . Cette méthodologie a été appliquée à l'étude des interactions protéine-protéine ou protéine-ligand par spectroscopie de fluorescence. Le principe du *Pressure-jump* a également été adapté à de la diffusion des rayons X aux petits angles¹⁷⁸.

c. Technique de flash photolyse

La technique de flash-photolyse a été développée par R.G.W. Norrish et G. Porter^{179,180} au cours des années 1950, ce qui leur a valu le prix Nobel en 1967. Cette technologie était alors limitée aux réactions initiées par un pulse lumineux. L'applicabilité de cette méthode a ensuite été étendue à des méthodes dans lesquelles un réactif est emprisonné dans une cage moléculaire photosensible. A l'application d'un « flash », ces cages sont dégradées et libèrent le réactif dans un délai (temps de flash + temps de libération) de quelques ms à 200 ms. Ces techniques sont principalement utilisées pour l'étude de processus biologiques très rapides. Beaucoup de ligands photosensibles ont été mis au point pour interagir avec des nucléotides comme l'ATP¹⁸¹, des neuro-excitateurs tels que le L-glutamate¹⁸², ou encore pour chélater spécifiquement le calcium¹⁸³. Après photolyse, les réactifs sont relargués en solution et réagissent. Remarquons également qu'il est possible d'induire un changement brutal de pH par photolyse de *o*-nitrobenzaldéhyde¹⁸⁴.

Récemment, S. Pisch¹⁸⁵ rapporte l'utilisation d'une guanine modifiée par un groupe nitrophenylethyl (NPE) photosensible qui permet d'empêcher un ARN de 20 nucléotides de coexister sous deux structures tertiaires différentes. La photolyse de la fonction NPE débloquent la guanine fonctionnalisée, l'ARN peut alors adopter la structure tertiaire inaccessible, et la mesure des paramètres cinétiques gouvernant la conversion d'une structure à l'autre peut alors être effectuée par RMN.

Cette technique de flash photolyse est néanmoins limitée aux systèmes pour lesquels sont développés des cages moléculaires spécifiques ou aux molécules modifiables par une fonction photosensible qui bloque la reconnaissance. Beaucoup de développements sont donc nécessaires pour chaque nouveau système.

d. Electrophorèse capillaire cinétique (KCE)

Dans les méthodes d'électrophorèse capillaire cinétique, deux molécules interagissent entre elles dans un capillaire, pendant qu'elles sont séparées par électrophorèse. Les constantes cinétiques et thermodynamique sont déterminées en analysant les profils de propagation d'une des deux molécules.

Ces méthodes de KCE ont largement été développées par S. Krylov dès 2002, en décrivant la technique de NECEEM¹⁸⁶ (Non-equilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixture) et de Sweeping Capillary Electrophoresis¹⁸⁷ (SweepCE) notamment.

C'est en 2011 que S. Krylov a mis au point le *plug-plug KCE*¹⁸⁸ (ppKCE), représenté figure 62. Dans cette technique des quantités connues de récepteur et de cible sont séquentiellement injectées dans le capillaire à $t = 0$ s, le composant ayant la plus faible mobilité étant injecté en premier. Lorsque le champ électrophorétique est appliqué, la molécule migrant le plus vite va alors traverser la zone du capillaire où se trouve le récepteur : la cible « rattrape » le récepteur. Il se forme alors une certaine quantité de complexe cible/récepteur, qui dépend de la concentration des espèces, de la constante d'affinité et de la cinétique de reconnaissance. Lorsque les molécules de cible libres ont dépassé les récepteurs, le complexe cible/récepteur se trouve hors équilibre et se dissocie sous contrôle cinétique.

Un profil de propagation en fonction du temps est enregistré par un détecteur placé en bout de capillaire, et les valeurs des constantes d'associations et de dissociations peuvent être calculées à partir des intensités de pics et du temps de migration de l'espèce suivie.

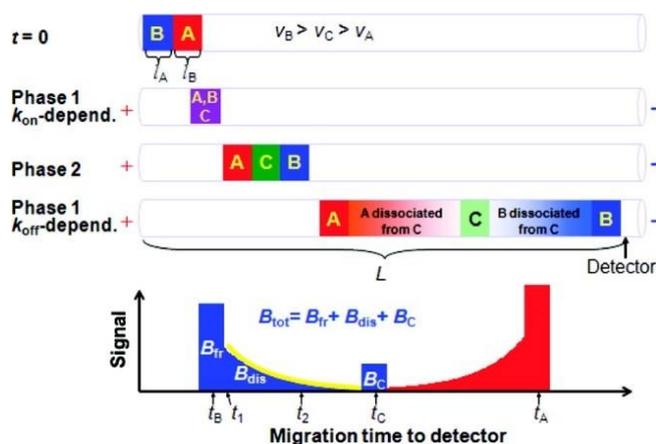


Fig 62 : Description schématique de la technique de plug-plug KCE¹⁸⁸

Cette technique a été utilisée pour étudier l'interaction entre la cocaïne et son aptamère, également capable de reconnaître la quinine¹⁸⁸. La détermination des constantes cinétiques pour des brins mutés de cet aptamère a montré que des mutations sur l'aptamère modifiaient le k_{off} mais pas le k_{on} , ce qui suggère que les énergies d'activation sont les mêmes, mais pas celle de dissociation.

La technique d'électrophorèse capillaire combine mobilité électrophorétique et flux électro-osmotique. Ce dernier dépend notamment de la concentration et de la nature des ions du tampon utilisé, tout comme la reconnaissance aptamère/cible. Il est donc crucial de trouver le bon équilibre entre conditions optimales de séparation et de réaction.

e. Titration calorimétrique isotherme (KinITC)

En 2012, deux articles se sont proposés d'extraire des informations cinétiques à partir des signaux obtenus par ITC^{189,190}. L'idée est que les informations cinétiques sont comprises dans la forme de chaque pic mesuré.

Ainsi, D. Burnouf et P. Dumas ont décrit le « KinITC¹⁸⁹ », sur la base des travaux de J. Sturtevant¹⁹¹ et en utilisant un dispositif moderne très sensible (limite de détection à 0,1 μ W). D'un point de vue cinétique, cette méthode est limitée par le temps d'injection et le temps de mélange, mais également par le temps de réponse du calorimètre, τ_{ITC} . La mesure de τ_{ITC} a été calibrée, dans ce cas, à l'aide d'un procédé proche du *T-jump*, c'est-à-dire par impulsion électrique dans la cellule de mesure et par injection rapide de méthanol. Ainsi, un τ_{ITC} de 3,5 s a pu être déterminé pour un appareillage moderne, ce qui est 4 à 5 fois plus court que ce qui se fait avec des dispositifs plus anciens¹⁸⁹ (10-15 s). Néanmoins, en utilisant des méthodes standards de traitement du signal, ces facteurs influençant la mesure peuvent être pris en compte dans la procédure de simulation (KinITCdemo, <http://www-ibmc.u-strasbg.fr:8080/webMathematica/kinITCdemo/>).

Ainsi, cette nouvelle méthodologie a permis de déterminer les paramètres cinétiques et thermodynamiques de reconnaissance entre une reverse-transcriptase issue du VIH-1 et un inhibiteur, et entre un riboswitch et son ligand¹⁸⁹.

f. Bilan

Ce panel d'outils disponible pour l'analyse cinétique de réactions chimiques est très varié. Les principales caractéristiques de chaque méthode sont résumées dans le tableau 1.

	($t_{1/2}$) accessible	Avantages	Inconvénients
<i>Continuous Flow</i>	> 60 μ s	Temps mort	Consommation en réactifs; temps d'observation < s
<i>Stopped Flow</i>	> 600 μ s	Fenêtre de temps d'acquisition;	Préparation minimale d'un ml de réactifs
<i>Quenched Flow/Quenched Freeze</i>	> 1 ms	Techniques d'analyses plus nombreuses; Accès aux intermédiaires de réactions	Limite de détection
<i>T-Jump</i>	> 1 μ s	Pas de mélange; Temps mort	Temps d'observation < 1 s
<i>P-Jump</i>	> 80 μ s		"home made"
<i>Flash Photolyse</i>	> 1 ms	Réactifs à l'équilibre; Applicable <i>in vivo</i>	Nécessite une molécule cage
<i>KinITC</i>	> 3 s	Indépendant des propriétés physicochimiques des réactifs	Temps caractéristique de l'appareillage non négligeable
<i>KCE</i>	-	Indépendant de t_{mix} et t_{min}	Contraintes sur la charge des espèce et la force ionique

Tableau 1 : Résumé des performances des méthodologies cinétiques rapides

g. Méthodologie électrochimique

Malgré les avantages analytiques et pratiques que procure l'électrochimie, celle-ci a été rarement combinée à une technique de mélange rapide pour l'étude cinétique d'une réaction chimique. La majorité de ces travaux utilisent une électrode tournante plongée dans une solution de plusieurs millilitres, la rotation de l'électrode de travail permettant à la fois de mélanger rapidement les réactifs et de contrôler l'apport constant de matière à l'électrode.

L'électrode à disque tournante (*EDT*) a déjà été utilisée¹⁹²⁻¹⁹⁴ pour déterminer des grandeurs cinétiques de réaction par électrochimie. Cette approche dispose en effet de 2 avantages.

Premièrement, la rotation de l'électrode permet de travailler en régime stationnaire, la convection forcée fixant la taille de la couche de diffusion selon l'équation :

$$\delta = 1,61D^{\frac{1}{3}}\nu^{\frac{1}{6}}\omega^{-\frac{1}{2}} \quad (19)$$

Où δ est l'épaisseur de la couche de diffusion en cm, D est le coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), ν est la viscosité cinématique du solvant ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) et ω la vitesse de rotation de l'électrode ($\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$).

La figure 63 présente la réponse électrochimique d'une solution de ferrocène méthanol (FcMeOH) avec et sans convection forcée.

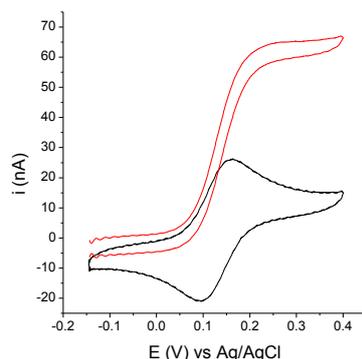


Fig 63 : Voltammogrammes d'une solution de FcMeOH à 5 µM et LiClO₄ = 100 mM, $\omega = 0$ et **2000 rpm**, $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.

Sur cette figure, en absence de convection (en noir), pour $E \gg E^\circ$, le courant diminue du fait de l'augmentation de la taille de la couche de diffusion avec le temps (méthode non stationnaire). En présence de convection forcée (en rouge), le courant est constant pour $E \gg E^\circ$ et dépend de la vitesse de rotation. Pour une réaction électrochimique hétérogène limitée par le transport de matière, le courant s'écrit :

$$i_{stat} = \frac{nFSDC^0}{\delta} = 0.620nFSD^{\frac{2}{3}}\omega^{\frac{1}{2}}\nu^{\frac{-1}{6}}C^0 \quad (20)$$

Avec n le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday, S la surface de l'électrode (cm^2), D le coefficient de diffusion du FcMeOH ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$), C^0 la concentration initiale en FcMeOH.

Le deuxième avantage apporté par l'EDT est la possibilité de mélanger rapidement deux réactifs en solution grâce à la convection forcée induite par la rotation de l'électrode. Le temps de mélange t_{mix} d'une molécule injectée est alors contrôlé par les conditions hydrodynamiques du système.

La première étude utilisant ce type de dispositif a été rapportée en 1994¹⁹². Les auteurs ont étudié les paramètres cinétiques de l'oxydation du glucose catalysée par la Glucose Oxydase (GO_{ox}) en solution. La régénération du site actif de l'enzyme (via l' O_2 en solution) conduit à l'accumulation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . C'est la production de ce métabolite qui est suivie par électrochimie sur électrode tournante consécutivement à l'injection de glucose.

Cette technique de suivi d'une cinétique sur électrode tournante suite à l'injection d'une molécule en solution a été plus récemment exploitée pour suivre et caractériser la cinétique hétérogène d'enzymes immobilisées sur la surface même de l'électrode. Bien qu'il soit difficile avec cette méthode de connaître le nombre précis d'enzymes actives et donc de déterminer les constantes cinétiques de l'enzyme immobilisée, les variations relatives de courant au cours du temps permettent d'obtenir des informations sur la réactivité¹⁹³.

D'autres exemples de cinétiques enzymatiques hétérogènes ont également été explorées, notamment avec une peptidase en solution venant réagir à la surface d'une électrode pour hydrolyser un peptide accroché sur la surface et fonctionnalisé par un ferrocène¹⁹⁴. L'électrode tournante est alors employée afin de ne pas être limitée par la cinétique de transport de l'enzyme. Le clivage du peptide entraîne une baisse du signal du marqueur (Fc) en fonction du temps, donnant ainsi accès à la cinétique d'hydrolyse hétérogène.

Une alternative à l'électrode tournante consiste à utiliser un dispositif microfluidique couplé à une détection électrochimique. C'est ainsi que récemment, B. Zheng¹⁹⁵ a décrit un circuit microfluidique dans lequel sont injectées des microgouttes issues du mélange de deux réactifs à l'aide d'une jonction en T (Fig 64). Une fois introduites dans le circuit, ces microgouttes sont homogénéisées grâce à un canal sinueux¹⁹⁶, et des valves pneumatiques permettent de contrôler le temps mis par ces microgouttes pour atteindre le point d'observation situé en aval du microcanal. Ainsi, pour un flux maximal de $100 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, le temps mort du dispositif est de 50 ms. Ce dispositif a permis de confirmer les paramètres cinétiques de la décomposition de H_2O_2 par la catalase bovine.

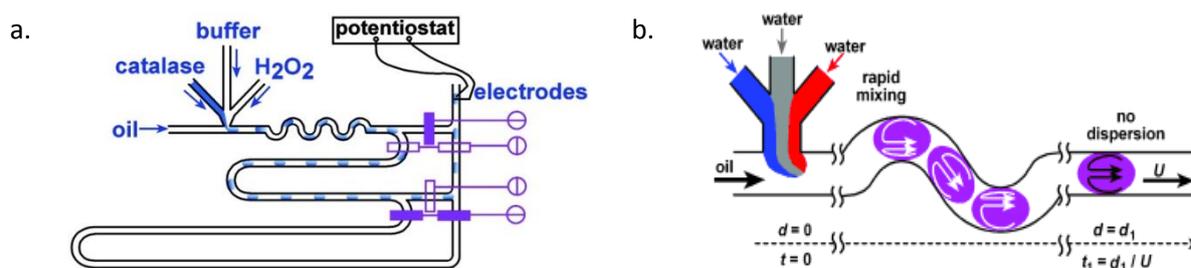


Fig 64 : a. Circuit microfluidique associé à une détection électrochimique¹⁹⁵
 b. Représentation du processus de mélange dans la goutte¹⁹⁶

La production continue de mélanges de réactifs en microgouttes rappelle la technique de flux continu. Mais dans le cas présenté ici, l'échantillonneur (c'est-à-dire l'électrode) ne peut pas être déplacé le long du circuit. L'âge d'une microgoutte est donc strictement déterminé par son temps de voyage. Bien qu'il soit contrôlé par les valves pneumatiques, certains « âges » ne sont pas accessibles, ce qui fait que les courbes cinétiques sont faites avec peu de points expérimentaux. Ce n'est donc pas un système idéal.

Le problème majeur des techniques utilisant l'EDT est qu'elles utilisent de grands volumes de solution, ce qui impose l'utilisation de grandes quantités de réactifs. Toutefois, les temps de mélange atteignables ($< 0,5 \text{ s}^{193}$) en utilisant une électrode tournante sont compatibles avec la majeure partie des cinétiques de réactions impliquant des biomolécules. La possibilité de réduire le volume de réaction est donc très intéressante.

Dans ce sens, W. Heineman^{197,198} a proposé un dispositif d'EDT appliqué sur microvolume ($50 \mu\text{l}$), pour la mise au point d'un immunodosage à base de billes magnétiques. Ces billes magnétiques sont fonctionnalisées par un anticorps anti-ovalbumine servant à concentrer les antigènes sur les billes.

Puis, une reconnaissance moléculaire en "sandwich" de type ELISA (Fig 65.a) est effectuée où l'anticorps secondaire est marqué par une enzyme, la β -galactosidase. Cette enzyme catalyse l'oxydation du 4-aminophényl- β -D-galactopyranoside (PAPG) en 4-aminophénol (PAP), oxydable à une électrode en 4-quinone-imine (PQI). Ces billes sont ensuite récupérées grâce à un aimant, concentrées dans un volume de 50 μ l et placées entre une électrode tournante et une lame de verre recouverte de parafilm. La micro-goutte est alors mise en rotation (Fig 65.b) et reste stable jusqu'à des vitesses de rotation de 3000 rpm.

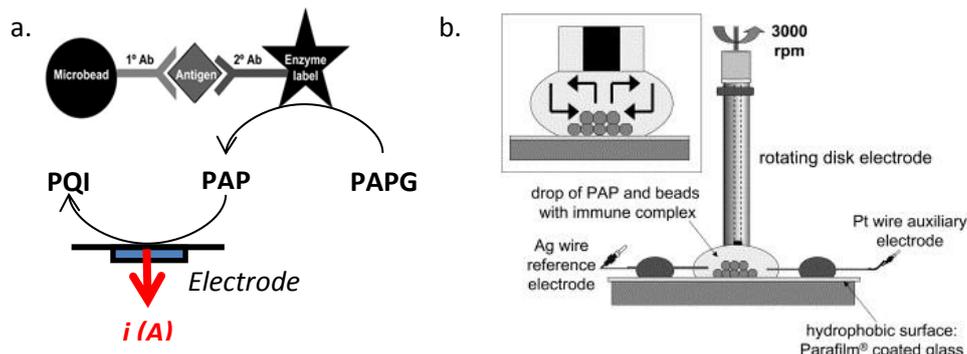


Fig 65 : a. Schéma du dispositif hétérogène de détection de l'antigène utilisé par W. Heinman¹⁹⁸
 b. Schéma du dispositif de EDT sur microvolume d'après W. Heinman¹⁹⁸

Cette étude montre alors que les courants stationnaires mesurés en voltammétrie cyclique pour l'oxydation du PAP en PQI sont dépendants de la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode de 0,1 μ M à 0,1 mM. Ce résultat indique l'obtention d'un régime hydrodynamique laminaire. Ce travail montre également qu'il est possible, pendant que l'échantillon tourne, d'y injecter grâce à une pipette le substrat de l'enzyme. Lorsque l'électrode tournante est polarisée, le produit de la réaction enzymatique peut alors être détecté, et l'évolution du courant mesuré est représentative de la vitesse initiale de catalyse. La vitesse de catalyse enzymatique est directement liée à la concentration du marqueur enzymatique sur les billes. Ainsi les auteurs ont pu établir une courbe de calibration $V_{max} = f([\text{ovalbumine}])$ avec les mêmes limites de détection ($\text{sub}\mu\text{M}$) qu'une méthode basée sur une détection par fluorescence¹⁹⁹.

Une alternative à l'EDT est d'obtenir un régime de convection autrement que par la rotation de l'électrode, c'est-à-dire en faisant tourner la solution. Cette approche a été proposée par M. Gratzl^{200,201} dès 1997. Le système consiste à déposer 20 μ l d'une solution sur un anneau d'or servant directement d'électrode de travail. La goutte est ensuite mise en rotation par l'application d'un jet de gaz tangentiel (Fig 66).

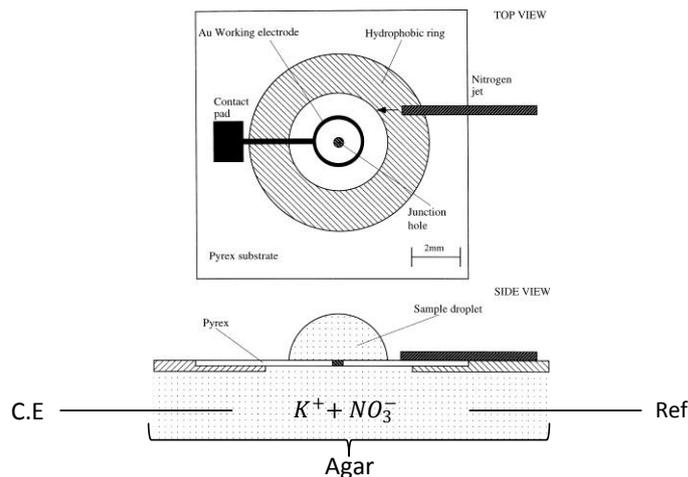


Fig 66 : Schéma du dispositif de EDT sur microvolume d'après M. Gratzl^{200,201}

Ce système permet d'atteindre des tailles de couche de diffusion comparables à celles obtenues avec une EDT. Ces gouttes sont stables grâce aux tensions de surface qui maintiennent la goutte sur son support. Cependant l'injection de gaz conduit à une évaporation accélérée de l'échantillon (5% du volume par minute), phénomène à prendre en compte dans les analyses. La méthode a été appliquée à la détection de métaux lourds par redissolution anodique²⁰⁰ mais jamais utilisée pour des études cinétiques.

Il serait donc intéressant de développer une méthode électrochimique combinant les avantages des approches d'Heineman et de Gratzl, c'est-à-dire en utilisant un système d'agitation mécanique (évaporation minimisée) autre que la rotation de l'électrode elle-même (amélioration du rapport signal sur bruit) et bien sûr la possibilité de travailler en microvolume.

III-2- Electrochimie stationnaire en microvolume

a. Présentation

Le dispositif que nous proposons est illustré figure 67. Un échantillon de 50 μl est pris en sandwich entre un ambout tournant et une mini-cellule électrochimique sérigraphiée, formée d'un montage à trois électrodes délimitées par une couche de diélectrique hydrophobe.

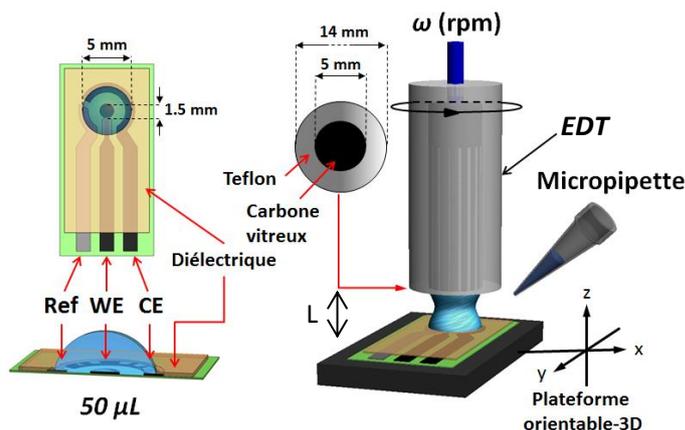


Fig 67 : Dispositif expérimental proposé.

Bien que l'embout tournant soit constitué d'une électrode de carbone vitreux scellée dans un manchon cylindrique en Teflon (hydrophobe), celui-ci n'est pas utilisé comme électrode de travail et ne sert qu'à agiter la solution via sa rotation. L'étalement de la goutte est limité par la couche de diélectrique hydrophobe sur la cellule électrochimique sérigraphiée et pas le Teflon entourant l'électrode de carbone vitreux, ce qui permet le maintien de la goutte de 50 µL en condition de rotation jusqu'à 3500 rpm.

Pour déterminer les performances de la technique de microgoutte tournante, un certain nombre de tests préliminaires ont été effectués.

b. Influence de la taille de l'électrode de travail

Dans un premier temps, ce dispositif a été caractérisé en étudiant 50 µL d'une solution à 50 µM de ferrocène-méthanol (*FcMeOH*). D'après la figure 68, un régime stationnaire est obtenu lorsque l'ambout est mis en rotation, générant ainsi en voltammétrie cyclique une vague sigmoïdale d'oxydation bien définie et reproductible, y compris pour des vitesses de rotation élevées.

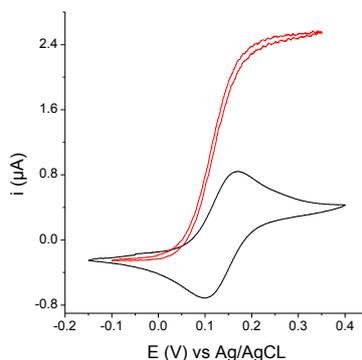


Fig 68 : Voltammogrammes d'une solution de *FcMeOH* à 50 µM et $\text{LiClO}_4 = 100 \text{ mM}$, $\omega = 0$ et **2000 rpm**, $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.

Cependant, un décalage de la sigmoïde en fonction du nombre de cycles successifs est observé en voltammétrie cyclique, comme en témoigne la figure 69, où sont reportés le premier et le vingtième cycle.

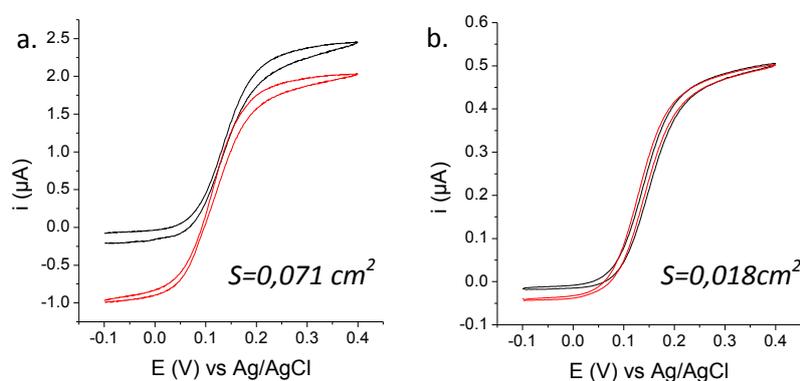


Fig 69 : Voltammogrammes d'une solution de FcMeOH à 50 μM et $\text{LiClO}_4 = 100 \text{ mM}$, $\omega = 2500 \text{ rpm}$, $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ cycle 1 et 20 dans le cas d'une électrode de travail de (a.) $0,071 \text{ cm}^2$ et (b.) $0,018 \text{ cm}^2$, température ambiante.

Ces premiers essais ont été réalisés en utilisant les mêmes électrodes sérigraphiées que dans le chapitre précédent, où la surface de l'électrode de travail est de $0,071 \text{ cm}^2$, donc relativement grande par rapport au volume de la goutte. L'oxydation du FcMeOH conduit à la formation de fericinium FcMeOH^+ , lequel diffuse ensuite en solution compte tenu des conditions hydrodynamiques forcées.

En travaillant dans un volume de $V = 50 \mu\text{l}$ avec une grande surface d'électrode, donc un grand rapport surface/volume, une quantité non négligeable de molécule FcMeOH est oxydée en FcMeOH^+ ce qui amène l'accumulation de ce dernier dans la goutte au cours des balayages répétés. Comme la contre électrode n'est pas isolée dans un compartiment indépendant, le FcMeOH^+ peut être régénéré par réduction à la contre électrode. Cette régénération n'est cependant pas aussi efficace que la production, ce qui induit une accumulation progressive de FcMeOH^+ . C'est la raison pour laquelle après plusieurs balayages, la sigmoïde se décale vers des courants cathodiques (Fig 69.a).

Un moyen de limiter le phénomène est de diminuer le ratio surface/volume. En réduisant la taille de l'électrode de travail par un facteur quatre ($S = 0,018 \text{ cm}^2$) le phénomène devient négligeable, puisque les voltammogrammes successifs sont quasiment superposables (Fig 69.b).

c. Caractérisation du régime hydrodynamique

Les caractéristiques du régime hydrodynamique ont été étudiées par voltammétrie cyclique avec une solution de FcMeOH à $50 \mu\text{M}$ (LiClO_4 à $0,1 \text{ M}$) soumise à différentes vitesses de rotation (Fig 70.a), dans trois configurations différentes :

- Une cellule électrochimique standart ($V = 5 \text{ ml}$) avec une EDT classique plongeant dans 5 ml de solution;
- Une mini-cellule électrochimique sérigraphiée avec une goutte tournante de $50 \mu\text{l}$ (montage de la figure 67);

- Une électrode de carbone vitreux mise en contact d'une goutte de 50 μl (même montage que la figure 67, mais l'embout tournant est de nouveau utilisé comme électrode de travail).

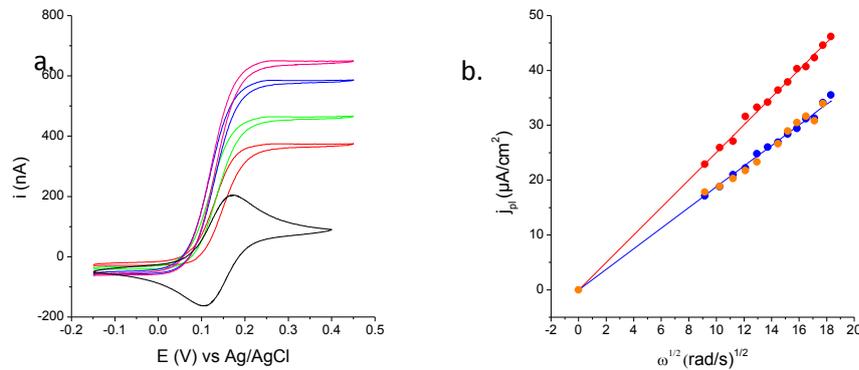


Fig 70 : a. Voltammétrie cyclique d'une solution de FcMeOH = 50 μM , LiClO_4 = 100 mM pour une électrode sérigraphiée à la base d'une goutte tournante de 50 μl , ω = 0, 1000, 1600, 2400 et 2800 rpm, température ambiante ;
 b. Représentation graphique des densités de courant de plateau en fonction de la racine carrée de la vitesse de rotation pour une EDT dans 5 ml de FcMeOH = 50 μM , LiClO_4 = 100 mM, une EDT au sommet d'une goutte de 50 μl , et une électrode sérigraphiée à la base d'une goutte tournante de 50 μl : pour V = 5 ml, pente = $8,1 \times 10^{-7} \text{ A}/\text{cm}^2/\text{rpm}^{1/2}$; r^2 = 0,9926; microvolume: pente = $6,1 \times 10^{-7} \text{ A}/\text{cm}^2/\text{rpm}^{1/2}$; r^2 = 0,9903.

Quelle que soit la configuration utilisée et pour des vitesses de rotation comprises entre 1000 et 2800 rpm, des voltammogrammes sigmoïdaux typiques de conditions hydrodynamiques sont obtenus (Fig 70.a). Les densités de courant (j_p) varient linéairement avec la racine carrée de la vitesse de rotation (Fig 70.b), ce qui est caractéristique d'un régime hydrodynamique laminaire. Néanmoins, la pente des droites associées aux résultats obtenus dans 50 μl est systématiquement inférieure de 25 % à celle obtenue avec un système d'EDT conventionnel dans un grand volume de solution. Le rapport de ces pentes indique que le régime hydrodynamique en microvolume correspond à 75 % de celui obtenu avec une EDT conventionnelle.

Avec l'EDT en microvolume, les densités de courant 25 % plus faibles signifient que l'épaisseur de la couche de diffusion δ est 33 % plus importante. En l'absence d'un modèle théorique permettant de rationaliser cette variation, l'équation (19) a été modifiée empiriquement par un facteur correctif :

$$\delta_{corr} = 2,15 D_{FCOH}^{\frac{1}{3}} \nu^{\frac{1}{6}} \omega^{-\frac{1}{2}} \quad (21)$$

Ainsi, à partir des conditions expérimentales (*i.e* ω = 2500 rpm, $[\text{FcMeOH}]$ = 50 μM) et en considérant D_{FCOH} = $6,7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, une épaisseur de couche de diffusion de 11,6 μm peut être calculée, au lieu des 8,7 μm obtenu pour une EDT classique.

d. Influence de la distance

La configuration du dispositif impose d'étudier l'influence de la distance L entre l'électrode sérigraphiée et l'ambout tournant (Fig 67). Ce paramètre peut en effet influencer sur le régime

hydrodynamique et donc sur l'épaisseur de la couche de diffusion (δ_{corr}). La viscosité du milieu, les interactions à l'interface électrode de travail/solution ou encore le volume utilisé (corrélé à la distance entre l'électrode de travail et l'embout tournant) sont autant de paramètres pouvant influencer l'efficacité de la convection. Afin d'étudier l'effet de la distance séparant l'électrode sérigraphiée et l'embout tournant, une vis micrométrique a été installée afin de contrôler finement cet écart. Pour 50 μl de solution, il est possible de faire varier la distance entre 2 et 3 mm à 2500 rpm, mais pour des distances plus faibles, il est nécessaire de réduire le volume de solution. Finalement, quelle que soit cette distance (Fig 71.a) ou le volume (Fig 71.b), aucune variation significative des voltammogrammes n'est observée. Ce résultat montre qu'un contrôle précis de la hauteur n'est pas nécessaire pour garantir une bonne reproductibilité.

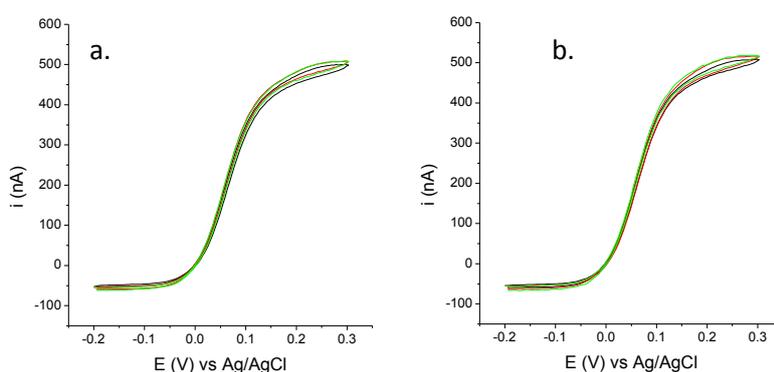


Fig 71 : a. Voltammétrie cyclique d'une solution de FcMeOH = 50 μM , LiClO_4 = 100 mM, ω = 2500 rpm, a. V = 50 μl , h = 3, 2,5, 2 mm
b. V = 50 μl et h = 3 mm, V = 25 μl et h = 2 mm, V = 15 μl et h = 1 mm, température ambiante.

e. Injection *in situ* de réactifs

Afin évaluer l'efficacité de mélange du dispositif suite à l'injection d'un réactif dans la goutte en rotation, nous avons suivi par électrochimie la cinétique de mélange d'un microlitre d'une solution de peroxyde d'hydrogène injectée manuellement dans une goutte de 49 μl en rotation, pendant que l'électrode de travail est polarisée à un potentiel cathodique pour réduire H_2O_2 . Comme cette réduction est facilitée sur électrode d'or²⁰², l'électrode de travail sérigraphiée a été modifiée d'une couche d'or poreuse par électroréduction d'un sel d'or (Fig 72.a). Cette électrode modifiée permet de réduire H_2O_2 à un potentiel de -0,6V vs Ag/AgCl. A ce potentiel, le dioxygène est également réduit, ce qui conduit à un courant cathodique stationnaire de départ non négligeable. Sur la figure 72.b, lorsqu'un microlitre d'une solution d' H_2O_2 est injecté dans 49 μl à ω = 2000 rpm, la densité de courant cathodique initiale croît exponentiellement jusqu'à atteindre une valeur maximale j_{max} . Ce comportement est typique d'un système perturbé qui relaxe exponentiellement avec le temps. Cette variation de densité de courant peut donc être ajustée grâce à l'équation (22) :

$$j = j_{max}[1 - \exp(-t/\tau)] \quad (22)$$

Où τ est le temps caractéristique de relaxation. D'après l'ajustement figure 71.b, $\tau = 1,25$ s.

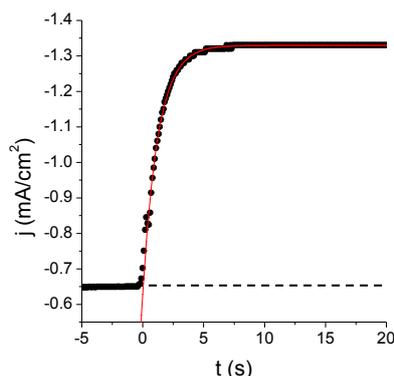
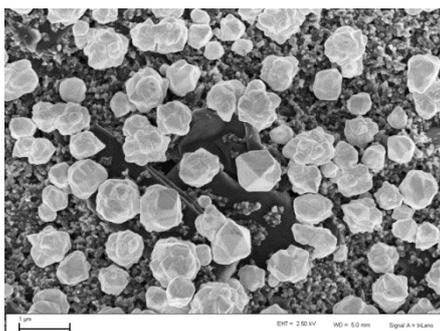


Fig 72 : a. Microstructure d'or observée au MEB sur électrode sérigraphiée modifiée après polarisation à $E = -500$ mV vs Ag/AgCl pendant 240 s en milieu HCl 0,1 M, HAuCl_4 4 g.L⁻¹ ; b. Variation du courant obtenu après l'injection de 1 μL de H_2O_2 dans 49 μL de H_2SO_4 à 0,1 M. Courant enregistré à partir d'une électrode de travail modifiée par des particules d'or, $E = -0.6$ V vs Ag/AgCl, $\omega = 2000$ rpm. En rouge l'ajustement pour $\tau = 1,25$ s

Les mêmes expériences ont été réalisées dans du PBS et dans du PBS contenant 0,1 % de BSA, et des constantes de relaxation similaires ont pu être déterminées, permettant de calculer une valeur moyenne de $\tau = 1,23 \pm 0,12$ s. Cette constante de temps caractérise le temps nécessaire pour homogénéiser le peroxyde d'hydrogène dans la goutte, laquelle est relativement indépendante de la composition du milieu.

Ce temps τ résulte d'une convolution des temps d'injection, de mélange, de transport à travers la couche de diffusion et d'acquisition. Toutefois, le temps de transport à travers la couche de diffusion est de l'ordre de quelques ms et le temps d'acquisition bien inférieur à la ms. Le temps d'injection d'un microlitre pouvant raisonnablement être évalué à moins d'une seconde, il semble que l'étape limitante soit le mélange du microlitre injecté dans les 50 μL en rotation.

III-3- Détermination de paramètres cinétiques

a. Mesure cinétique d'une réaction bimoléculaire

Afin de valider la méthodologie pour la caractérisation cinétique de réactions, nous avons dans un premier temps étudié la cinétique d'ordre deux d'une réaction chimique irréversible : la déprotection de l'ester pinacolic de l'acide *p*-aminophénylboronique (PAPB) par hydrolyse oxydative d' H_2O_2 conduisant à la formation en *p*-aminophénol (PAP) (Fig 73).

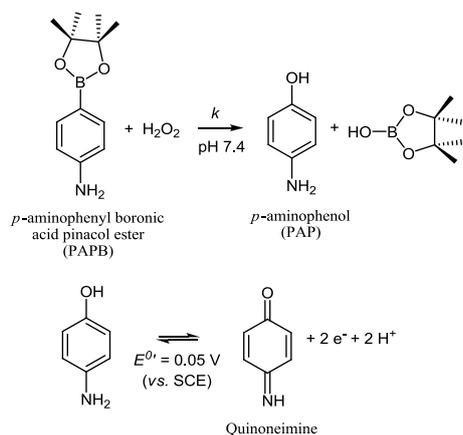


Fig 73 : Schéma réactionnel de la déprotection oxydative du PAPB en PAP détectable à une électrode

Cette déprotection a été récemment proposée pour quantifier électrochimiquement le glucose en présence de la glucose oxydase et de dioxygène²⁰³. La détection électrochimique de cette réaction est rendue possible grâce aux propriétés redox du PAP, oxydable de façon réversible à 0,05 V vs Ag/AgCl à pH 7,4. C'est ce qui est illustré figure 74, où le PAPB ne peut être oxydé de manière irréversible qu'à partir de 0,5 V. Cette oxydation irréversible conduit à une vague de réduction réversible vers 0 V, typique du couple PAP/quinoneimine.

Afin d'enregistrer la réaction de déprotection par ampérométrie à potentiel contrôlé, il est essentiel de bien choisir le potentiel appliqué afin d'éviter l'oxydation directe de PAPB à l'électrode.

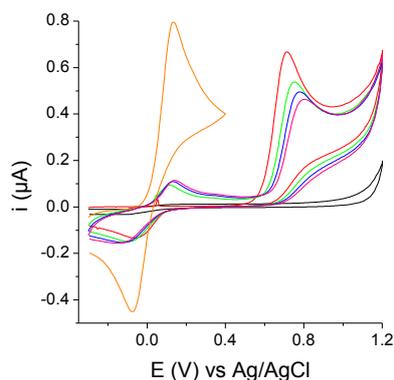


Fig 74 : Voltammogrammes en tampon phosphate pH 7,4 de 1 mM de PAPB (cycle 1, 2, 3 et 4), 1 mM de PAP en présence de 2,5 mM de H₂O₂ en jaune. v = 50 mV/s, température ambiante.

Un potentiel de +0,3 V a donc été choisi. Afin de suivre électrochimiquement la cinétique de réaction bimoléculaire entre le PAPB et H₂O₂, une solution de PAPB est mise en rotation à la surface d'une électrode sérigraphiée polarisée à +0,3 V. Puis à t = 0 s, le peroxyde d'hydrogène est injecté dans la solution en rotation à l'aide d'une pipette.

La figure 75 montre les résultats obtenus en ampérométrie à la suite de l'introduction de différentes concentrations en H₂O₂ dans une microgoutte d'une solution de PAPB à 0,1 mM. Immédiatement après l'injection de H₂O₂ (0,2 à 10 mM), le PAP généré par déprotection oxydative engendre un courant d'oxydation du PAP en quinoneimine jusqu'à transformation totale du PAPB contenu dans la goutte.

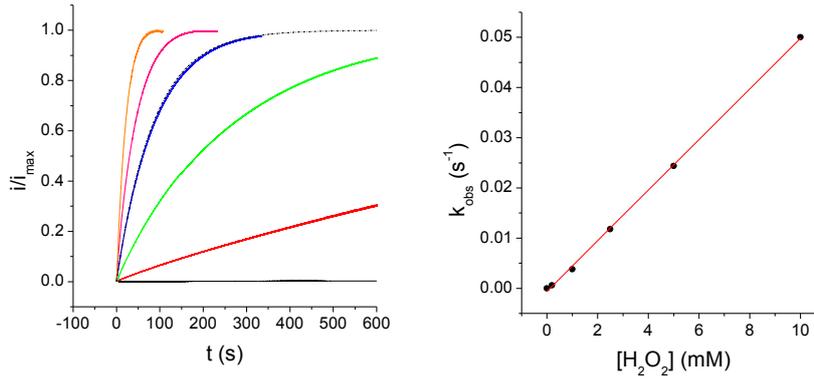


Fig 75 : a. Chronoampérommes normalisés enregistrés à 0,3 V vs Ag/AgCl après l'injection de H_2O_2 à 0, 0,2, 1, 2,5, 5 et 10 mM, [PAPB] = 0,1 mM, température ambiante. En noir l'ajustement à partir de l'équation (25) avec $k_{obs} = 0,012 \text{ s}^{-1}$; b. Représentation graphique $k_{obs} = f([H_2O_2])$, en rouge l'ajustement linéaire : pente = $5,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $y_0 = 0,0006 \text{ s}^{-1}$, $r^2 = 0,9994$

Tous ces ampérommes atteignent donc une densité de courant maximale correspondant à l'entière conversion de PAPB en PAP. Cette valeur maximale peut alors être utilisée pour normaliser les signaux. En considérant un temps de mélange à 1,2 s, on peut considérer que la réaction en solution est homogène durant toute la durée de la réaction.

En faisant l'hypothèse d'une cinétique de pseudo premier ordre, les résultats expérimentaux de la figure 75.a peuvent être analysés de la façon suivante :

En considérant une réaction d'ordre 2, la vitesse d'apparition du PAP est donnée par l'équation (23) :

$$\frac{dC_{PAP}}{dt} = -\frac{dC_{PAPB}}{dt} = k \cdot C_{PAPB} \cdot C_{H_2O_2} \quad (23)$$

Où k est la constante cinétique bimoléculaire en $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Lorsque le peroxyde d'hydrogène est en large excès, l'équation (23) peut être assimilée à un pseudo-premier ordre:

$$\frac{dC_{PAP}}{dt} = k_{obs} \cdot C_{PAPB} \quad (24)$$

Où $k_{obs} = k \cdot C_{H_2O_2}^0$.

Après integration :

$$\frac{C_{PAP}}{C_{PAPB}^0} = 1 - \exp(-k_{obs}t) \quad (25)$$

Les courants mesurés étant proportionnels aux concentrations en PAP :

$$\frac{j}{j_{max}} = 1 - \exp(-k_{obs}t) \quad (26)$$

La représentation graphique de $k_{obs} = f([H_2O_2])$ (Fig 75.b) montre alors une très bonne relation de linéarité ($r^2=0,994$). De la pente, il est possible d'extraire la constante cinétique de deuxième ordre

$k = 5 \pm 0,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur est en bon accord avec celles rapportées dans la littérature pour la déprotection médiée d'esters d'acide arylboronique par H_2O_2 ($0,07 < k (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}) < 2,2$)²⁰⁴⁻²⁰⁷.

b. Mesure cinétique d'une reconnaissance moléculaire aptamère/cible

Dans le chapitre précédent, l'électrochimie a permis de déterminer la constante thermodynamique de complexation entre l'aptamère de 49 nucléotides et la *L-Tym*. La discrimination entre les deux états (libre et lié) de la cible a été réalisée grâce à la différence de coefficient de diffusion. Cette approche est bien entendue envisageable dans les conditions hydrodynamiques puisque le courant stationnaire mesuré dépend du coefficient de diffusion des espèces en solution (cf équation (20)). Le principe de catalyse médiée d'oxydation de la fonction phénol de la *L-Tym* pour suivre la cinétique de formation du complexe aptamère/cible a donc été repris.

Dans un premier temps, des injections séquentielles de complexe d'osmium (II) et de *L-Tym* ont été réalisées sur une goutte de 50 μl tournant à 2500 rpm à potentiel imposé de + 0,7 V vs Ag/AgCl, pour lequel l'oxydation de la *L-Tym* est catalysée par le complexe d'osmium (III) généré électrochimiquement.

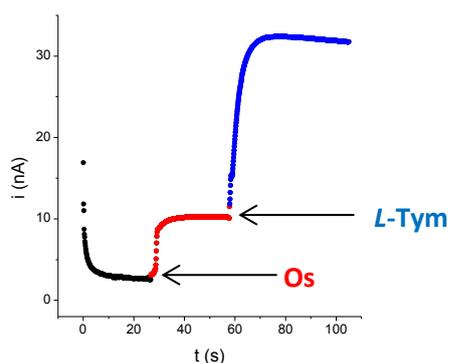


Fig 76 : Chronoampérogramme en EDT, $\omega = 2500 \text{ rpm}$, $E = 0,7 \text{ V vs Ag/AgCl}$, injection de 1 μl à 50 μM d'Osmium et 1 μl à 250 μM de *L-Tym*, température ambiante.

La figure 76 représente l'ampérogramme enregistré pour une goutte de 48 μl d'une solution tampon dans laquelle est injectée d'abord 1 μl d'une solution de complexe d'osmium (II) à 50 μM puis 1 μl de *L-Tym* à 250 μM . Dès l'introduction du catalyseur, un courant stationnaire d'oxydation est rapidement obtenu. Lorsque la *L-Tym* est introduite, l'apparition d'un courant d'oxydation catalytique est observée avec une cinétique de croissance caractéristique de la cinétique de mélange.

i. Temps de mélange

L'injection de *L-Tym* dans une solution d'osmium conduit à un accroissement de l'intensité du courant avec le temps pour atteindre une valeur maximale i_{max} . La figure 77 a été obtenue en moyennant 10 expériences et en normalisant les valeurs de courant par i_{max} .

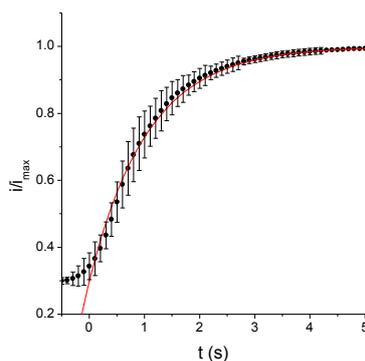


Fig 77: Chronoampérométrie obtenue après injection de *L*-Tym ($n = 10$), $E = 0,7$ V vs Ag/AgCl, $\omega = 2500$ rpm, température ambiante. La courbe rouge représente la fonction d'ajustement avec $\tau = 1,04$ s

D'après cette figure, la répétabilité de ces injections manuelles est plutôt bonne, avec une incertitude maximale de $\pm 10\%$ dans la zone d'accroissement du courant. Cette variation du courant peut être ajustée par une équation de la forme :

$$\frac{i}{i_{max}} = 1 - \left(\frac{i_{max} - i_{min}}{i_{max}}\right) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (27)$$

Ainsi, une constante de temps $\tau_{EDT} = 1,04 \pm 0,01$ s peut être déduite. Cette valeur est proche de celle obtenue pour H_2O_2 et donc représentative de la cinétique de mélange.

ii. Identification du régime de catalyse

Il est important de s'assurer que le régime de catalyse est total pour des concentrations micromolaires en catalyseur et $5 \mu\text{M}$ de *L*-Tym dans les conditions hydrodynamiques employées. Pour cela, la méthode la plus directe est de vérifier la linéarité du courant en fonction de la concentration en *L*-Tym. Pour un régime de catalyse totale limitée par la diffusion de la molécule catalysée, le courant dépend de sa concentration, tandis qu'un régime de catalyse stationnaire entraîne une dépendance en fonction de la racine carrée de la concentration en substrat (Annexe I p 129). Sur la Figure 78 sont représentées les intensités de courant relevées pour des concentrations croissantes en *L*-Tym en présence de 1, 2 et $5 \mu\text{M}$ d'osmium à $\omega = 2500$ rpm.

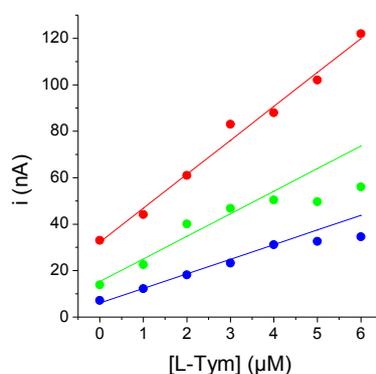


Fig 78 : $i = f([L\text{-Tym}])$ pour des concentrations en complexe d'Osmium (II) = 1, 2,5 et $5 \mu\text{M}$, $\omega = 2500$ rpm, $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

Pour les concentrations en catalyseur inférieure à 5 μM , la linéarité n'est vérifiée qu'aux faibles concentrations en *L*-Tym puisqu'au-delà de 3-4 μM une déviation est observée, indiquant que le régime de catalyse n'est plus total. Une concentration en catalyseur de 5 μM a donc été sélectionnée pour la suite du travail.

Afin de pouvoir vérifier les résultats obtenus en voltammétrie cyclique dans le chapitre précédent et ceux obtenus dans des conditions hydrodynamiques, la mesure du K_d dans ces nouvelles conditions de catalyse a été réalisée. Sur la figure 79 sont représentées les variations de courant de catalyse en fonction de la concentration en aptamère pour des concentrations en osmium de 1 et 5 μM .

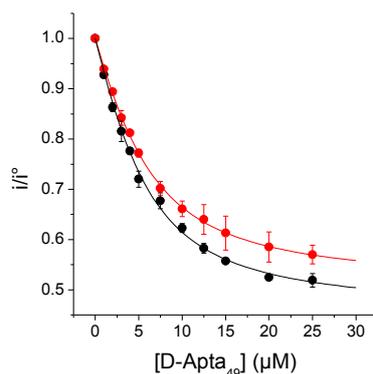


Fig 79 : $i/i^\circ = f([D-Apta_{49}])$ pour $[Os] = 1 \mu\text{M}$ et $[Os] = 5 \mu\text{M}$. Résultats obtenus sans rotation de la goutte.

Par régression non linéaire de l'équation (7) des résultats expérimentaux réalisés avec 5 μM de complexe d'osmium (II), un $K_d = 3,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ et une valeur de $i_p^\infty / i_p^0 = 0,50 \pm 0,01$ sont obtenus. Pour une concentration en catalyseur à 1 μM , un $K_d = 2,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ et une valeur de $i_p^\infty / i_p^0 = 0,45 \pm 0,01$ avaient été déterminées. La valeur de K_d est donc en bon accord avec celle obtenue à 1 μM de complexe d'osmium. En revanche, la valeur de i_p^∞ / i_p^0 est légèrement différente.

iii. Oxydation irréversible de la *L*-Tym

Il est important de noter que dès que le mélange de la *L*-Tym est terminé, l'intensité du courant de catalyse d'oxydation de la *L*-Tym diminue progressivement au cours du temps (Fig 80). Sachant que l'oxydation de la *L*-Tym est un processus irréversible, celle-ci ne peut pas être régénérée à la contre électrode. Il y a donc consommation de la *L*-Tym au cours de l'expérience.

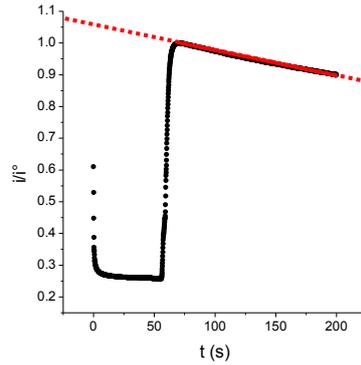


Fig 80 : Chronoampérogramme obtenu après injection de L-Tym, E = 0,7 V vs Ag/AgCl, $\omega = 2500$ rpm, température ambiante.
La courbe rouge représente la fonction d'ajustement avec $k_{cons} = 8,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

L'intensité de courant mesurée étant proportionnelle à la concentration en L-Tym, ces 2 grandeurs peuvent être reliées de la façon suivante:

$$\frac{dC_T}{dt} = \frac{i}{nFV} \quad (28a)$$

D'après (19) :

$$\frac{dC_T}{dt} = \frac{SD}{V\delta_{corr}} C_T^0 \quad (28b)$$

Où V est le volume de la goutte. A partir de l'équation de Levich et après intégration, on obtient :

$$C_T(t) = C_T^0 \exp\left[\left(-\frac{SD}{V\delta_{corr}}\right) t\right] \quad (29)$$

Ou

$$\frac{i(t)}{i_0} = \frac{C_T(t)}{C_T^0} = \exp\left[\left(-\frac{SD}{V\delta_{corr}}\right) t\right] \quad (30)$$

La consommation de la L-Tym peut être ajustée grâce à cette équation. Une valeur de $8,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ est déterminée pour le paramètre $\left(\frac{SD}{V\delta_{corr}}\right)$. Cette valeur (k_{cons}) peut être définie comme la constante relative à la vitesse de consommation de la L-Tym dans les conditions expérimentales utilisées.

c. Injection d'aptamère

Avec l'ajout d'aptamère dans la goutte en rotation (cf matériels et méthodes p 111), l'intensité du courant de catalyse devrait diminuer conformément au changement de coefficient de diffusion de la L-Tym lorsqu'elle est complexée par l'aptamère.

La figure 81.a a été obtenue selon la procédure suivante : 48 μL d'une solution tampon comprenant 5 μM de médiateur est mise en rotation ($\omega = 2500 \text{ rpm}$). Puis, 1 μL de *L-Tym* à 250 μM est injecté, de manière à ce que la concentration finale en *L-Tym* soit de 5 μM . Une fois que le courant de catalyse est stabilisé, 1 μL de *D-Apta*₄₉ est injecté pour atteindre une concentration final de 25 μM . L'intensité est ici normalisée par le courant atteint au moment de l'injection.

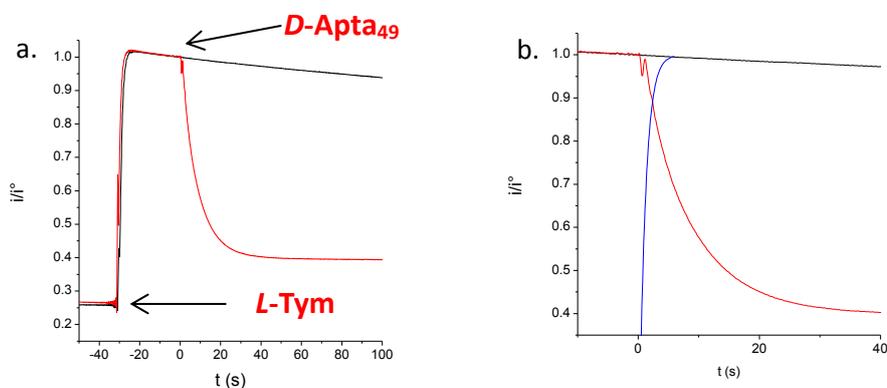


Fig 81 : a. Chronoampéromégramme obtenu après injection de *L-Tym* seule et de *L-Tym* puis de *D-Apta*₄₉, $E = 0,7 \text{ V}$ vs Ag/AgCl , température ambiante.

b. Agrandissement de (a), en bleu est représentée la cinétique de mélange.

Sur la figure 81.b est représenté un agrandissement de la figure 81.a, où est superposé en bleu la cinétique théorique du mélange du système. Cette cinétique apparait négligeable devant le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre de la réaction de complexation *L-Tym*/*D-apta*₄₉ ($\sim 40 \text{ s}$).

Une remarque est néanmoins nécessaire à ce stade: la consommation de la *L-Tym* étant dépendante du coefficient de diffusion de l'espèce consommée, cette consommation est différente pour la *L-Tym* libre et celle complexée à l'aptamère. Cela se vérifie assez bien sur la figure 81.a, où une fois l'équilibre de complexation atteint, la diminution du courant devient négligeable par rapport à celle observée sans aptamère. Comme cette consommation dépend des coefficients de diffusion de l'espèce catalysée ($k_{cons} = \left(\frac{SD}{V\delta}\right)$), le rapport des constantes de consommation pour la *L-Tym* libre et complexée ne peut être que comparable au rapport des coefficients de diffusion.

d. Détermination du K_d

L'ampéromégramme obtenu figure 82 apporte deux informations : la première est d'ordre cinétique et reliée à la constante d'association k_{on} à travers la décroissance du courant aux temps courts. La seconde est d'ordre thermodynamique, et reliée à la constante d'équilibre K_d atteinte au temps longs. Ainsi, K_d et k_{on} peuvent être déterminés à partir d'un seul ensemble de données, collectées pour différentes concentrations en aptamère. Le k_{off} peut alors être déduit de ces valeurs.

Sur la figure 82.a sont représentés les chronoampéromégrammes normalisés des expériences réalisées pour des concentrations croissantes en aptamère.

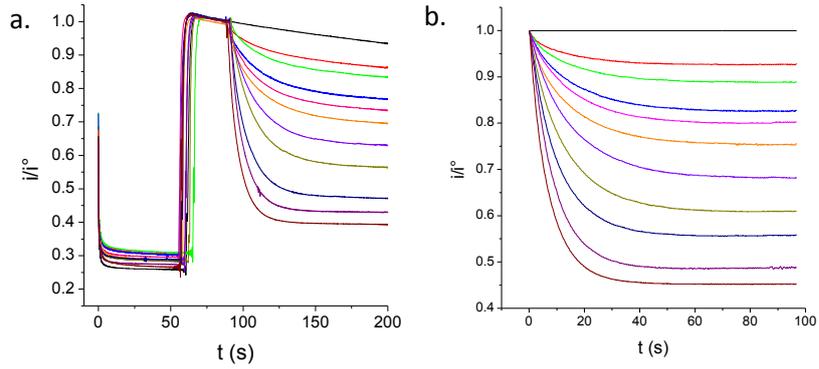


Fig 82: a. Chronoampérogrammes normalisés obtenus après injection de *L*-Tym puis de *D*-Apta₄₉ = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25 μM, E = 0,7 V vs Ag/AgCl, température ambiante.
b. Résultats expérimentaux normalisés et corrigés de la consommation (n = 2)

Les intensités du courant de catalyse sont convoluées au phénomène de consommation de la *L*-Tym. Il est néanmoins possible d'évaluer cette consommation pour chaque ajout d'aptamère et, en première approximation, de la corriger (Fig 82.b). En effet pour chaque ajout d'aptamère, il est possible d'évaluer k_{cons}^i , qui peut être considérée comme une combinaison linéaire des consommations relatives à la *L*-Tym libre et complexée. D'après (26) :

$$k_{cons}^i = \left(\frac{S}{V\delta_{corr}} \right) \cdot (\chi_T \cdot D_T + \chi_{AT} \cdot D_{AT}) \quad (31)$$

Dans le cas où l'aptamère n'est pas injecté, la valeur de $i(t)/i^0$ corrigée est égale à 1 et peut s'écrire :

$$\frac{i_p^{cor}(t)}{i_p^0} = \frac{i_p^{exp}(t)}{i_p^0} + \left(1 - \frac{i_p^{exp}(t)}{i_p^0} \right) \quad (32)$$

Pour l'ajout d'une concentration i en aptamère, le terme correctif à introduire est de moindre proportion puisque la consommation est fonction du coefficient de diffusion, plus faible lorsque la *L*-Tym est complexée. Le rapport des constantes de consommation k_{cons}^i/k_{cons}^0 peut servir à pondérer la correction à apporter à chacune des concentrations i en aptamère :

$$\frac{i_p^{cor}(t)}{i_p^0} = \frac{i_p^{exp}(t)}{i_p^0} + \left(1 - \frac{i_p^{exp}(t)}{i_p^0} \right) \cdot \frac{k_{cons}^i}{k_{cons}^0} \quad (33)$$

Où k_{cons}^0 est la constante de consommation sans aptamère en solution et k_{cons}^i la constante de consommation pour une concentration i en aptamère. L'évolution des courants ainsi corrigés en fonction du temps est représentée figure 82.b.

La figure 83 représente l'évolution des intensités de courant à l'équilibre normalisées et corrigées en fonction de la concentration en aptamère.

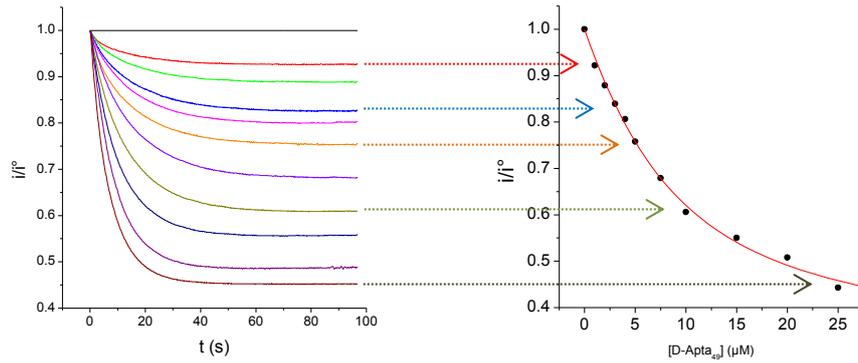


Fig 83 : Représentation graphique $i/i^0 = f([apta])$ pour des ajouts de **D-Apta₄₉ (n=2)**
 $K_d = 5,9 \pm 0,45 \mu\text{M}$, $i/i^0 = 0,31 \pm 0,02$

L'équation (7) du chapitre I peut être utilisée pour ajuster les résultats de la figure 83. Ainsi, un $K_d = 5,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ et la valeur $i_p^\infty / i_p^0 = 0,31 \pm 0,02$ ont été déterminés.

Dans ce cas la valeur de K_d est presque deux fois supérieure à celle déterminée par voltammétrie cyclique. Cependant, le protocole est ici différent car chaque expérience correspond à un seul ajout d'aptamère en solution, tandis que dans le cas de la voltammétrie cyclique, l'expérience est menée par ajouts successifs d'aptamère. Nous n'avons cependant pas d'explication claire à avancer pour justifier cet écart.

La valeur du paramètre i_p^∞ / i_p^0 n'est, en revanche, pas comparable à celle obtenue par voltammétrie cyclique. En effet, la valeur du courant dépend de \sqrt{D} dans le cas de la voltammétrie cyclique sur électrode stationnaire, tandis qu'elle dépend de $D^{2/3}$ dans le cas des conditions hydrodynamiques de la goutte tournante. Si bien que dans le premier cas :

$$\frac{i_p^\infty}{i_p^0} = \sqrt{\frac{D_{AT}}{D_T}} = 0,5 \quad \Leftrightarrow \quad \frac{D_{AT}}{D_T} = 0,25$$

Et dans le second cas :

$$\frac{i_p^\infty}{i_p^0} = \left(\frac{D_{AT}}{D_T}\right)^{2/3} = 0,31 \quad \Leftrightarrow \quad \frac{D_{AT}}{D_T} = 0,17$$

Ces rapports de coefficients de diffusion sont finalement cohérents et en bon accord avec ce que l'on peut attendre d'un rapport de coefficients de diffusion entre un acide aminé et un acide nucléique monocaténaire de 49 nucléotides.

e. Détermination du k_{on}

Afin d'extraire les paramètres k_{on} et K_d à partir des résultats expérimentaux (Fig 82.a), il est nécessaire d'établir l'équation cinétique qui relie le changement de concentration en L-Tym libre en solution avec le temps (Annexe IV p139). Si on considère l'équilibre suivant :



$$\text{Avec } K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (35)$$

L'équation différentielle qui décrit la cinétique est donnée par :

$$-\frac{dC_T}{dt} = -\frac{dC_A}{dt} = \frac{dC_{AT}}{dt} = \frac{dx}{dt} = k_{on} \cdot (C_T^0 - x)(C_A^0 - x) - k_{off} \cdot x \quad (36)$$

ou

$$\frac{dx}{(C_T^0 - x)(C_A^0 - x) - K_d \cdot x} = k_{on} \cdot dt \quad (37)$$

Qui après intégration conduit à :

$$x(t) = \frac{r_2 - r_1 \cdot \exp\left\{(r_2 - r_1)\left[k_{on} \cdot t + \frac{1}{r_2 - r_1} \cdot \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)\right]\right\}}{1 - \exp\left\{(r_2 - r_1)\left[k_{on} \cdot t + \frac{1}{r_2 - r_1} \cdot \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)\right]\right\}} \quad (38)$$

Où r_1 et r_2 sont les racines de l'équation :

$$x^2 - x(C_T^0 + C_A^0 + K_d) + C_T^0 \cdot C_A^0 = 0 \quad (39)$$

si on considère χ_f :

$$\chi_f = \frac{C_T}{C_T^0} = \frac{C_T^0 - C_{AT}}{C_T^0} = 1 - \frac{x}{C_T^0} \quad (40)$$

et que l'équation générale de la variation de courant est donnée par l'équation (7) (chapitre I) alors :

$$\frac{i_p(t)}{i_p^0} = 1 - \frac{x(t)}{C_T^0} \left(1 - \frac{i_p^\infty}{i_p^0}\right) \quad (41)$$

A partir de cette équation et son ajustement non linéaire aux données expérimentales il devient alors possible de déterminer les paramètres K_d , k_{on} et i_p^∞/i_p^0 . La figure 84 montre les courbes théoriques ajustées aux données expérimentales pour le jeu de valeurs $K_d = 5,9 \mu\text{M}$, $i_p^\infty/i_p^0 = 0,31 \pm 0,02$ et $k_{on} = 5000 \pm 650 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

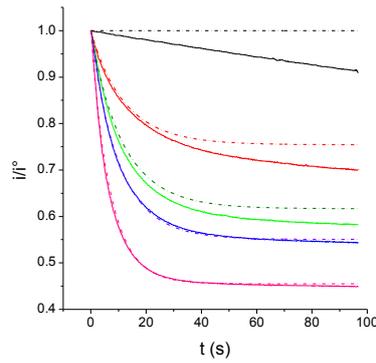


Fig 84 : Ajustement des résultats expérimentaux à l'aide de l'équation (33) pour $[D\text{-Apta}_{49}] = 0, 5, 10, 15$ et $25 \mu\text{M}$,
 $K_d = 5,9 \mu\text{M}$, $i_p^\infty / i_p^0 = 0,31 \pm 0,02$ et $k_{on} = 5000 \pm 650 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Sur cette figure, les courbes théoriques ne s'ajustent pas parfaitement aux résultats expérimentaux notamment pour les concentrations faibles en aptamère et aux temps longs. Cela résulte de la consommation de la *L*-Tym. Il est donc nécessaire d'introduire un terme correctif dans l'équation (41) permettant de tenir compte de la variation de C_T^0 au cours du temps.

Ayant évalué précédemment la cinétique de consommation pour la *L*-Tym libre, une correction itérative de la concentration en *L*-Tym a donc été introduite dans le calcul (pour chaque incrément de temps, la concentration en *L*-Tym libre est recalculée en fonction de la consommation et de la complexation, ces deux phénomènes étant interdépendants).

Ainsi ce calcul itératif permet d'ajuster les résultats présentés figure 85.a et b en introduisant les paramètres K_d et i_p^∞ / i_p^0 déterminés grâce au courant stationnaire aux temps longs et k_{cons} obtenus précédemment. Un $k_{on} = 5000 \pm 500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (quel que soit la concentration en aptamère) est obtenu. Cette valeur permet de calculer un k_{off} de $0,03 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$.

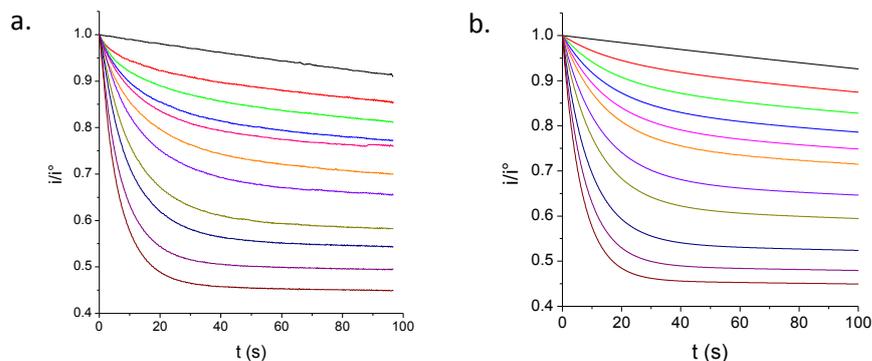


Fig 85 : a. Chronoampérommes normalisés obtenus après injection de *L*-Tym puis de *D*-Apta₄₉
b. Simulations de ces résultats pour $K_d = 5,86 \pm 0,45 \mu\text{M}$, $i_p^\infty / i_p^0 = 0,31 \pm 0,02$ et $k_{on} = 5000 \pm 500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
 $[D\text{-Apta}_{49}] = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 5, 10, 15, 20, 25 \mu\text{M}$ ($n = 2$).

Parallèlement, l'équipe du Département de Pharmacochimie Moléculaire (E. Peyrin) de l'Université Joseph Fourier de Grenoble a déterminé un $k_{on} = 2455 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et un k_{off} de $0,03 \text{ s}^{-1}$ pour le même couple aptamère/cible, mais pour une concentration *suboptimale* en magnésium¹¹⁹ ($250 \mu\text{M}$). Ce résultat est cohérent avec celui déterminé par électrochimie dans les mêmes conditions ($k_{on} = 1500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $k_{off} = 0,09 \text{ s}^{-1}$).

III-3- Conclusion

Déterminer les constantes cinétiques entre un aptamère et sa cible est important pour comprendre le mécanisme de reconnaissance et pour l'optimisation de méthodes analytiques.

Un certain nombre de données dans la littérature existent, et la valeur de k_{on} déterminée au cours de ce travail ($k_{on} = 5000 \pm 500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) est dans la moyenne des valeurs publiées^{188,189, 208, 209, 210}. Par exemples, un $k_{on} = 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a été mesuré lors de l'interaction spécifique entre un *riboswitch* et la thiamine pyrophosphate¹⁸⁹ par la technique *kinITC*, et des k_{on} entre 340 et 410 $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ont pu être déterminés par électrophorèse capillaire (ppKCE) pour des mutants de l'aptamère anti-quinine¹⁸⁷. Par *Stopped-Flow* couplé à de la spectroscopie de fluorescence, des k_{on} entre 2×10^4 et $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ont également été déterminés pour des *riboswitch*^{208,209} et l'aptamère anti-théophylline²¹⁰.

Dans ce chapitre nous avons donc décrit les principales caractéristiques d'une méthodologie électrochimique en microvolume dédiée à la caractérisation cinétique d'une réaction chimique. La résolution temporelle est pour le moment limitée à la seconde mais des développements sont en cours d'étude pour améliorer la vitesse de mélange (introduction de bulle d'air dans le microvolume en rotation ou utilisation d'une interface rugueuse au niveau de l'embout tournant).

En principe, cette technique pourrait aussi être adaptée à des réactions homogènes provoquant un changement de potentiel formel ou un changement de cinétique de transfert électronique. A l'image du travail réalisé dans le chapitre II, cette méthode pourrait également être adaptée en condition d'échange compétitif.