

## Thèse de Doctorat

Renaud BOISSEAU

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Matière, Matériaux, Molécules en Pays de la Loire 3MPL

Discipline : Chimie

Spécialité : Chimie Analytique et Électrochimie

Unité de recherche : Laboratoire Chimie et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse,  
Modélisation (CEISAM) UMR 6230, CNRS

Soutenue le 5 juillet 2016

# Élucidation des mécanismes de dégradation de polluants émergents par couplage électrochimie-spectrométrie de masse ou électrochimie-résonance magnétique nucléaire

## JURY

Rapporteurs : **Jean Marie HEYDEL**, Professeur, Université de Bourgogne, France  
**Stephano CALDARELLI**, Professeur, Université Aix-Marseille, France

Examineurs : **Jean Michel BOULER**, Professeur, Université de Nantes, France

Invité(s) : **Christine THOBIE-GAUTIER**, Maitre de Conférences, Université de Nantes, France  
**Patrick GIRAUDEAU**, Maitre de Conférences, Université de Nantes, France  
**Ugo BUSSY**, Senior Research Associate, Michigan State University, USA

Directeur de Thèse : **Mohammed BOUJITA**, Maitre de Conférences, Université de Nantes, France



# Remerciements

Je remercie Bruno Bujoli pour son accueil au sein du laboratoire CEISAM (Chimie et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse et Modélisation).

Je remercie également Jean Marie Heydel et Stefano Caldarelli pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Mes plus grands remerciements vont à Mohammed Boujtita (Hamada) pour son encadrement, sa disponibilité, sa joie de vivre et ses nombreuses blagues qui m'ont permis d'avancer sereinement durant l'ensemble de cette thèse. Sa patience ainsi que ses nombreux conseils m'ont permis de m'épanouir et de gagner en autonomie, qui j'en suis sûr seront des atouts majeurs pour la poursuite de mon avenir professionnel quel qu'il soit.

Je ne peux pas continuer ces remerciements sans parler de Ugo Bussy, qui aura été une source à la fois de motivation, de conseils, et de soutien indéfectible durant ces trois années. Nos nombreux échanges, qu'ils soient scientifiques ou footballistiques, m'ont permis de franchir les difficultés rencontrées. Un immense merci à toi !

Je n'oublie pas Patrick Giraudeau qui est à l'origine de mon envie de faire de la recherche. En effet, les deux stages effectués sous son encadrement m'ont donné l'envie de continuer dans cette direction. Je tiens également à le remercier pour son aide dans la mise en place du couplage CE-RMN 2D ultrarapide.

Merci à Denis Jacquemin et Nicolas Galland pour leur aide pour les calculs de modélisation moléculaire. Je tiens à remercier également Benoit Charrier et Virginie Silvestre pour leur aide lors des manip CE-RMN et autres.

Mes remerciements s'adressent aussi à Christine Thobie, Nadine Szuwarski et Cyril Delacôte pour leur intérêt dans mes travaux, leur expérience et leurs conseils durant ces trois années.

Merci à Aurélien dit « the board » pour les nombreuses pauses café et cigarettes qui ont été accompagnées d'excellentes discussions (pas forcément scientifiques d'ailleurs), ainsi que Yann, Errol, Clémence, et François Xavier qui ont participé à ces différents moments agréables.

Je souhaite également remercier l'ensemble des thésards et plus particulièrement Yoan, David, Maxime, Titouan, Antoine, Martin, Florent, Florian, Adrien, Pauline, Yoann, Kevin, Valentin, Laetitia, Tangy, Boris... pour les excellents moments passés tous ensemble lors des différents apéro Michelet, pause clope, café et autres. J'ai pu nouer avec eux durant ces trois années des amitiés qui j'en suis sûr dureront dans le temps.

Je remercie mes ami(e)s, que ce soit le groupe des Vendéens, ou les bidochons pour leur soutien et leur écoute !

Je remercie énormément ma famille, ma belle-famille pour leur soutien au quotidien qui je pense m'a permis de m'épanouir pleinement durant mon parcours universitaire.

Enfin pour finir je remercie du plus profond de mon cœur ma futur femme Pauline sans qui je ne serai pas l'homme que je suis aujourd'hui au travers de son soutien sans faille durant ces nombreuses années (je peux vous assurer que ce n'est pas évident...). Vivement notre mariage !

# Abréviations

AA : acide aristolochique

ACN : acétonitrile

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

APAP : N-Acétyl-*Para*-AminoPhénol, Acétaminophène, Paracétamol

AQ : durée d'acquisition du signal RMN

BDD : *Boron Doped Diamond*, anglicisme décrivant le matériau en carbone dopé bore

BMK : *Boese and Martin for Kinetic*, anglicisme décrivant l'Hamiltonien employé pour les calculs théoriques

BPA : BisPhénol A

BQ : BenzoQuinone

CE : Cellule Electrochimique

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance

COSY : *CO*rrelation Spectroscopy, anglicisme décrivant une séquence RMN

DESI : *Desorption ElectroSpray Ionisation*, anglicisme décrivant le mode d'ionisation par bombardement d'un solvant électronébulisé sur un échantillon

DFT : *Density Functionnal Theory*, anglicisme décrivant la fonctionnelle de densité utilisée pour les calculs théoriques

ERO : Espèces Réactives Oxygénées

ESI : *ElectroSpray Ionisation*, anglicisme décrivant l'ionisation par électronébulisation

FID : *Free Induction Decay*, anglicisme expliquant la décroissance du signal d'induction libre

GSH : Glutathion, tripeptide obtenu par condensation de l'acide glutamique, de la cystéine et de la glycine

HAT : *Hydrogen Atom Transfer*, anglicisme décrivant le transfert d'un atome d'hydrogène

NADPH : Forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NBO : *Natural Bond Orbital*, anglicisme expliquant la transcription des résultats des calculs théoriques en représentation de Lewis

PEEK : *Poly-Ether-Ether-Ketone*, anglicisme décrivant un polymère

QToF : *Quadrupole-Time of Flight*, anglicisme décrivant le couplage entre un analyseur quadripolaire et un analyseur de masse à temps de vol

RF : Radio Fréquence

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SET : *Single Electron Transfer*, anglicisme décrivant le transfert d'un électron seul

SM : Spectrométrie de Masse

SM(HR) : Spectrométrie de Masse (Haute Résolution)

SMSM : Spectrométrie de Masse à deux dimensions

SMD : *Solvent Model Density*, anglicisme décrivant les interactions soluté/solvant en chimie théorique

S/B : Rapport Signal/Bruit

TBBPA : TétrabromoBisPhénol A

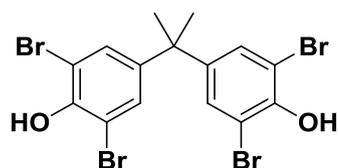
TF : Transformation de Fourier

TOCSY : *TOTAL Correlation SpectroscopY*, anglicisme décrivant une séquence RMN

$t_1$  : temps d'évolution en RMN

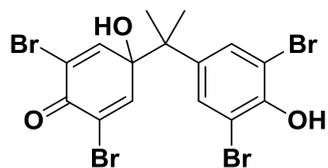
T2 : Temps de relaxation transversale

TOF : *Time Of Flight*, anglicisme décrivant le temps de vol en spectrométrie de masse



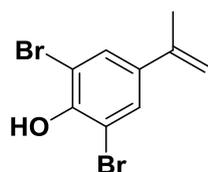
4,4'-(propane-2,2-diyl)bis  
(2,6-dibromophenol)

TBBPA  
[M-H]<sup>-</sup> monoisotopique 538,7505



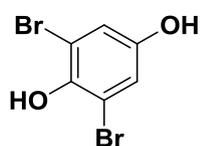
2,6-dibromo-4-(2-(3,5-  
dibromo-4-  
hydroxyphenyl)propan-2-yl)-  
4-hydroxycyclohexa-2,5-dien-1-one

TB<sub>1</sub>  
[M-H]<sup>-</sup> monoisotopique 554,7437



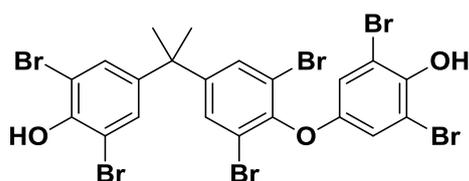
2,6-dibromo-4-(prop-1-en-2-yl)  
phenol

TB<sub>2</sub>  
[M-H]<sup>-</sup> monoisotopique 288,8866



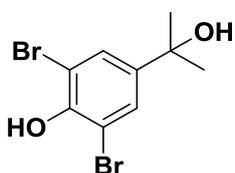
2,6-dibromobenzene-1,4-diol

TB<sub>3</sub>  
[M-H]<sup>-</sup> monoisotopique 264,8941



2,6-dibromo-4-(2,6-dibromo-4-(2-(3,5-  
dibromo-4-hydroxyphenyl)  
propan-2-yl)phenoxy)phenol

TB<sub>4</sub>  
[M-H]<sup>-</sup> monoisotopique 786,5958



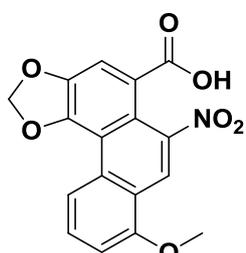
2,6-dibromo-4-  
(2-hydroxypropan-2-yl)phenol

TB<sub>5</sub>  
[M-H]<sup>-</sup> monoisotopique 306,8971



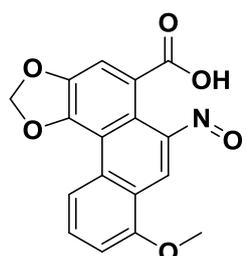
2,6-dibromocyclohexa-2,5-diene-  
1,4-dione

2,6-  
dibromobenzoquinone



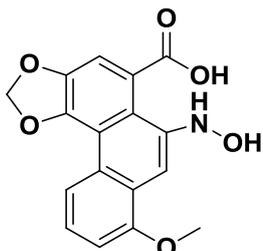
8-methoxy-6-nitrophenanthro  
[3,4-d][1,3]dioxole-5-carboxylic acid

Acide Aristolochique (AA)  
[M+H]<sup>+</sup> 342,0619



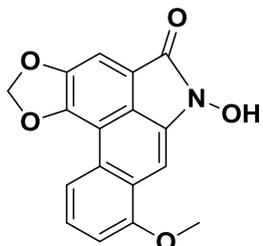
8-methoxy-6-nitrosophenanthro[3,4-d]  
[1,3]dioxole-5-carboxylic acid

AA<sub>2</sub>  
[M+H]<sup>+</sup> 326,0669



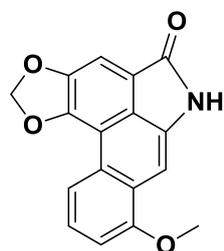
6-(hydroxyamino)-8-methoxyphenanthro  
[3,4-d][1,3]dioxole-5-carboxylic acid

AA<sub>3</sub>  
[M+H]<sup>+</sup> 328,0829



6-hydroxy-8-methoxy-[1,3]dioxolo[4',5':4,5]  
benzo[1,2,3-cd]benzo[f]indol-5(6H)-one

AA<sub>4</sub>  
[M+H]<sup>+</sup> 310,0719



8-methoxy-[1,3]dioxolo[4',5':4,5]  
benzo[1,2,3-cd]benzo[f]indol-5(6H)-one

AA<sub>5</sub>  
[M+H]<sup>+</sup> 294,0766

# Table des matières

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>A. PARTIE THEORIQUE : Généralités sur l'électrochimie, la spectrométrie de masse et les couplages CE-(CL-)SM .....</b>	<b>7</b>
<i>A.1 Rappels théoriques sur l'électrochimie .....</i>	<i>8</i>
A.1.1 Généralités <sup>16-17</sup> .....	8
A.1.2 Cinétique de transfert de charge .....	9
A.1.3 Phénomènes de transport de matière en solution.....	10
A.1.3.1 Courant de convection .....	10
A.1.3.2 Courant de migration .....	10
A.1.3.3 Courant de diffusion.....	11
A.1.3.4 Equation de Nernst-Planck.....	11
A.1.3.5 Les lois de diffusion de Fick .....	12
A.1.4 Cellules électrochimiques.....	13
A.1.5 Etude électrochimique en régime de diffusion naturelle pure (voltampérométrie cyclique) .....	14
A.1.5.1 Principe .....	14
A.1.5.2 Utilisation des résultats de voltampérométrie cyclique .....	15
A.1.6 La chronoampérométrie.....	17
<i>A.2 Rappels théoriques sur la spectrométrie de masse .....</i>	<i>18</i>
A.2.1 Principes .....	18
A.2.2 Ionisation par <i>electrospray</i> <sup>19</sup> .....	18
A.2.3 Analyseurs de masse <sup>18</sup> .....	20
A.2.3.1 Analyseur Quadripolaire .....	20
A.2.3.2 Analyseur à temps de vol .....	22
A.2.3.3 Analyseur hybride Quadripôle/Temps de vol .....	23
A.2.4 Détecteur.....	25

## A.3 Couplage entre une cellule électrochimique et un spectromètre de masse 26

A.3.1	Historique .....	26
A.3.2	Mise en œuvre des couplages CE-(CL-)SM.....	27
A.3.2.1	Cellules électrochimiques à électrode poreuse .....	28
A.3.2.2	Cellules électrochimiques à couche mince .....	29
A.3.2.3	Le couplage CE-CL-SM .....	30
A.3.2.4	Le couplage CE-SM.....	31
A.3.2.5	Paramètres expérimentaux .....	33
A.3.3	Miniaturisation des systèmes (micro-fluidique) .....	34
A.3.4	Application des couplages CE-(CL-)SM.....	35
A.3.4.1	Simulation des dégradations de polluants émergents dans l'environnement.....	36
A.3.4.2	Investigation de biomolécules.....	37
A.3.4.2.1	Oxydation électrochimique : digestion non enzymatique.....	38
A.3.4.2.2	Réduction électrochimique de pont disulfures.....	39
A.3.4.2.3	Marquage par des composés générés électrochimiquement .....	40
A.3.4.3	Simulation du métabolisme <i>in vivo</i> de xénobiotiques.....	42
A.3.4.3.1	Le cytochrome P450 .....	43
A.3.4.3.2	Le métabolisme .....	45
A.3.4.3.3	Outils de simulation du métabolisme <i>in vivo</i> .....	46
A.3.4.3.4	Réactions d'oxydation électrochimique directe .....	48
A.3.4.3.4.1	Désalkylation d'hétéroatomes.....	48
A.3.4.3.4.2	Désalkylation d'éthers aromatiques activés ou non.....	49
A.3.4.3.4.3	Hydroxylation directe d'atomes de carbone .....	51
A.3.4.3.5	Réactions d'oxydation électrochimique indirecte.....	54
A.3.4.3.5.1	Espèces Réactives Oxygénées (ERO).....	55
A.3.4.3.5.2	Procédé Fenton assisté par électrochimie .....	55
A.3.4.3.6	Formation et identification d'espèces réactives .....	57
A.3.4.3.6.1	Métabolites réactifs aryle .....	58

A.3.4.3.6.2	Intermédiaires arène époxyde .....	58
A.3.4.3.6.3	Espèces réactives azotées.....	60
A.3.4.3.6.4	Intermédiaire radicalaire et carbocationique.....	61
A.3.4.3.7	Simulation des réactions de réduction .....	61
A.3.5	Perspectives du couplage CE-(CL-)SM .....	62
<b>B.</b>	<b>PARTIE RESULTATS : Applications des couplages CE-(CL-)SM</b>	
	<b>pour la simulation de la dégradation du TBBPA et de l'acide aristolochique</b>	
	.....	<b>65</b>
<i>B.1</i>	<i>Comportement oxydatif du Tétrabromobisphénol A (TBBPA),</i>	
	<i>élucidation mécanistique par couplage CE-(CL)-SM .....</i>	<i>66</i>
B.1.1	Introduction .....	66
B.1.2	Matériels et méthodes .....	68
B.1.2.1	Réactifs.....	68
B.1.2.2	Electrochimie .....	68
B.1.2.2.1	Voltampérométrie cyclique .....	68
B.1.2.2.2	Electrolyse en flux.....	69
B.1.2.2.3	Voltampérométrie massique : couplage direct CE-SM.....	69
B.1.2.3	Chromatographie liquide et spectrométrie de masse.....	69
B.1.2.4	Calcul théorique .....	70
B.1.3	Résultats et discussions .....	71
B.1.3.1	Comportement électrochimique du TBBPA .....	72
B.1.3.1.1	Voltampérométrie cyclique .....	72
B.1.3.1.2	Signaux en spectrométrie de masse du TBBPA.....	75
B.1.3.1.3	Voltampérométrie massique.....	75
B.1.3.1.4	Analyses CL-SM(HR) d'une solution de TBBPA oxydée.....	77
B.1.3.2	Elucidation structurale des produits d'oxydation.....	79
B.1.3.2.1	Compositions élémentaires .....	79
B.1.3.2.2	Analyses CL-SMSM .....	79

B.1.3.3	Calcul théorique expliquant l'absence du produit doublement hydroxylé...	82
B.1.3.4	Mécanisme d'oxydation électrochimique du TBBPA .....	85
B.1.3.4.1	Formation des produits d'oxydation TB <sub>1</sub> , TB <sub>2</sub> , TB <sub>3</sub> et TB <sub>4</sub> .....	86
B.1.3.4.2	Comportement de l'entité TB <sub>2</sub> : formation de TB <sub>5</sub> .....	87
B.1.3.4.3	Comportement électrochimique de l'espèce TB <sub>1</sub> .....	88
B.1.3.4.3.1	Identification de l'adduit glutathion de la quinone .....	89
B.1.3.4.3.2	Observation de l'adduit glutathion par couplage CE-SM .....	91
B.1.3.4.4	Comportement électrochimique de l'espèce TB <sub>3</sub> .....	92
B.1.4	Electrochimie vs. dégradation environnementale et/ou biologique.....	93
B.1.5	Conclusion .....	94
<b>B.2</b>	<b><i>Métabolisme réductif de l'acide aristolochique : électrochimie vs. cytochrome P450</i></b> .....	<b>96</b>
B.2.1	Introduction .....	96
B.2.2	Matériel et méthodes .....	98
B.2.2.1	Réactifs.....	98
B.2.2.2	Electrochimie .....	98
B.2.2.2.1	Voltampérométrie cyclique .....	98
B.2.2.2.2	Electrolyse en flux.....	98
B.2.2.2.3	Voltampérométrie massique.....	99
B.2.2.3	Chromatographie liquide et spectrométrie de masse.....	99
B.2.3	Résultats et discussion .....	100
B.2.3.1	Comportement électrochimique de la fonction nitro.....	100
B.2.3.2	Identification des produits de réduction .....	101
B.2.3.2.1	Analyse CL-SM.....	101
B.2.3.2.2	Identification structurale .....	102
B.2.3.3	Couplage CE-SM en ligne.....	105
B.2.3.4	Mécanisme de réduction électrochimique de l'acide aristolochique .....	106
B.2.3.4.1	Adduit aristolactame-guanosine ou aristolactame-adénosine .....	107

B.2.3.4.2	Adduit aristolactame-glutathion.....	108
B.2.4	Conclusion.....	110
<b>C.</b>	<b>COUPLAGE CE-RMN : Rappels théoriques et résultats sur la mise en place du couplage CE-RMN 2D ultrarapide .....</b>	<b>113</b>
<i>C.1</i>	<i>Rappels théoriques sur la résonance magnétique nucléaire .....</i>	<i>114</i>
C.1.1	Généralités sur la RMN .....	114
C.1.1.1	Principe de base.....	114
C.1.1.2	RMN impulsionnelle .....	115
C.1.1.3	RMN multi-impulsionnelle .....	117
C.1.2	RMN multidimensionnelle .....	118
C.1.2.1	Principe de base.....	118
C.1.2.2	Les principales techniques de RMN 2D.....	119
C.1.3	RMN 2D ultrarapide .....	120
C.1.3.1	Principe.....	120
C.1.3.1.1	Codage spatial .....	120
C.1.3.1.2	Obtention de la première dimension .....	121
C.1.3.1.3	Obtention de la deuxième dimension .....	122
C.1.3.2	Avantages et inconvénients de la RMN 2D ultrarapide.....	123
<i>C.2</i>	<i>Couplage électrochimie - résonance magnétique nucléaire.....</i>	<i>125</i>
C.2.1	Contraintes expérimentales.....	126
C.2.1.1	Concentration initiale de la solution en composé et électrolyte support	126
C.2.1.2	Homogénéités de l'échantillon et du champ magnétique.....	127
C.2.2	Couplage entre une cellule électrochimique et la RMN.....	128
C.2.2.1	Couplage CE-RMN en ligne .....	128
C.2.2.2	Couplage CE-RMN <i>in situ</i> .....	130
<i>C.3</i>	<i>Développement du couplage électrochimie - RMN 2D ultrarapide : application pour la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène .....</i>	<i>138</i>
C.3.1	Matériels et méthodes .....	138

C.3.1.1 Réactifs.....	138
C.3.1.2 Cellule électrochimique.....	138
C.3.1.3 Voltampérométrie cyclique .....	139
C.3.1.4 Spectromètre RMN et paramètres RMN 2D ultrarapide.....	140
C.3.2 Résultats et discussions .....	140
C.3.2.1 Voltampérométrie cyclique .....	140
C.3.2.2 Elucidation mécanistique par couplage CE-RMN 2D ultrarapide.....	141
C.3.3 Conclusion et perspectives pour la CE-RMN 2D ultrarapide <i>in situ</i> .....	146
C.4 Conclusion et perspectives sur la CE-RMN.....	147
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>149</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>154</b>
<b>PRODUCTION SCIENTIFIQUE.....</b>	<b>155</b>
PUBLICATIONS.....	155
COMMUNICATIONS ORALES.....	156
COMMUNICATIONS POSTERS.....	156
<b>TABLES DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>157</b>
FIGURES.....	157
ÉQUATIONS.....	164
TABLEAUX.....	165
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>166</b>

# Introduction générale

L'étude du devenir d'un xénobiotique (substance étrangère à un organisme vivant) au sein du corps humain a conduit au développement de nombreux outils de prédiction/simulation ces dernières années.<sup>1-2</sup> Un xénobiotique est caractérisé par différentes propriétés pharmacocinétiques qui définissent des paramètres tels que l'absorption au sein d'un organisme vivant (voulue ou non), sa distribution, sa métabolisation et pour finir son excrétion (ADME).<sup>3</sup> Le métabolisme d'un principe actif fait intervenir majoritairement des enzymes appartenant à la superfamille des cytochromes P450s (CYP450) présents dans le foie. Les cytochromes P450s sont des hémoprotéines ayant comme cofacteur une porphyrine de fer. Les réactions catalysées par les P450s ont pour principal objectif l'incorporation d'un atome d'oxygène au travers de différentes transformations, augmentant ainsi l'hydrosolubilité du xénobiotique et facilitant son excrétion.

Les réactions de biotransformation induites par les P450s durant le métabolisme *in vivo* d'un xénobiotique se divisent en deux phases. La Phase I rassemble les réactions d'hydroxylation, d'oxydation (notamment d'hétéroatomes), de réduction ou bien encore de désalkylation au niveau des hétéroatomes (O, N, S,...). Durant cette première phase, les réactions d'oxydation peuvent être initiées selon deux réactions principales : le transfert d'un électron seul (*Single Electron Transfer* SET) ou le transfert d'un atome d'hydrogène radicalaire (*Hydrogen Atom Transfer* HAT) vers l'ion Fe(III) complexe du P450. Ensuite, la perte d'une molécule d'eau conduit à la formation d'un ou plusieurs produits d'oxydation appelé(s) métabolite(s). Contrairement aux réactions de phase I qui impliquent la modification structurelle du xénobiotique, les réactions de phase II font intervenir des conjugaisons chimiques entre le ou les métabolite(s) et des biomolécules ayant un caractère nucléophile très prononcé. En effet la conjugaison avec des molécules telles que le glutathion, la glycine, un sulfate ou l'acide glucuronique facilite l'excrétion du xénobiotique. Cette étape de conjugaison est essentielle dans le processus de détoxification engagé par l'organisme. A l'issue du métabolisme d'un xénobiotique, le métabolite peut être inerte ou présenter une activité médicamenteuse (dans le cas de principes actifs pharmaceutiques) ou bien conduire à la formation d'un ou plusieurs intermédiaires réactifs toxiques. L'aptitude de ces intermédiaires réactifs à former des liaisons covalentes avec des biomolécules telles que l'ADN ou des protéines peut provoquer une inactivité biologique de ces dernières.<sup>4</sup>

L'observation de métabolite(s) réactif(s) formé(s) durant le métabolisme d'un principe actif pharmaceutique est une étape primordiale dans le développement de candidats médicaments. Ceci justifie pleinement l'attention portée aux développements de techniques de prédiction et/ou simulation du métabolisme *in vivo*. Ces techniques doivent permettre le tri à haut débit de candidats médicaments lors du développement d'un nouveau principe actif pharmaceutique. De plus, la simulation du métabolisme *in vivo* de xénobiotiques s'avère essentielle pour le suivi du devenir de ces composés dans l'environnement. En effet, le rejet dans l'environnement de nombreux xénobiotiques ainsi que leurs produits de dégradation engendre une pollution non négligeable. Ces polluants dits plus communément émergents ne sont pas comme leur nom l'indique nouveaux, mais nouvellement détectés dans l'environnement. La pollution de l'ensemble de l'écosystème par des composés organiques chimiques constitue de nos jours un enjeu sociétal majeur. Les processus de retraitement des eaux usées ne sont actuellement pas optimisés pour retraiter les nombreux produits organiques générés par l'activité humaine. De plus, dans la majorité des cas, le retraitement est focalisé sur la molécule mère et non sur les produits ou métabolites engendrés lors de sa dégradation. Ceci est essentiellement dû au manque d'information sur la structure chimique des polluants, leurs faibles concentrations ainsi que la complexité des matrices qui les contiennent.

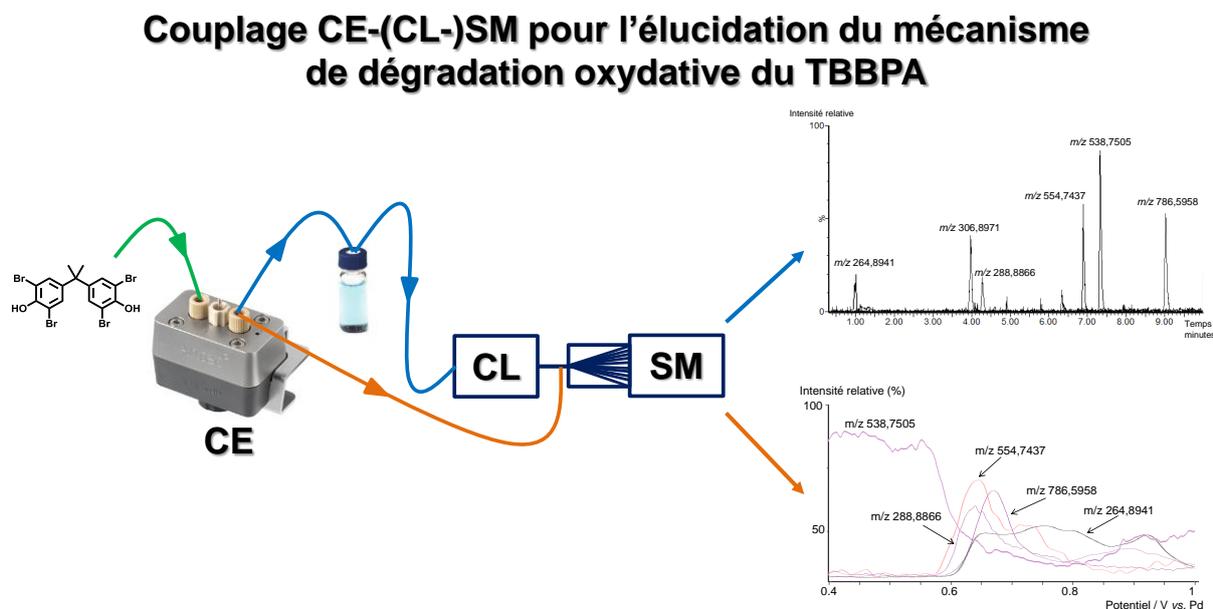
De nombreuses approches permettant la simulation du métabolisme *in vivo* de xénobiotique sont utilisées. La majorité exploitent des systèmes biologiques *in vitro* (hépatocytes, microsomes de foies)<sup>5</sup> issus d'organismes vivants (*in vivo*) ou bien encore directement des animaux vivants. Toutefois, ces approches engendrent des coûts d'utilisation importants. De plus, les milieux d'incubation exploitant les conversions enzymatiques sont généralement des matrices complexes qui handicapent l'analyse structurale, que ce soit par spectrométrie de masse (SM) ou par résonance magnétique nucléaire (RMN). La mise en place de synthèses enzymatiques pour l'obtention de standards en vue d'analyses structurales et/ou toxicologiques est fastidieuse. C'est pourquoi des alternatives ont été développées, comme par exemple l'utilisation de porphyrine de fer pour mimer les réactions induites par le cytochrome P450.<sup>6</sup> D'autres outils de simulation comme l'électrochimie présentent de nombreux avantages.<sup>7</sup> L'oxydation électrochimique de xénobiotiques s'est montrée apte à mimer les réactions du cytochrome P450 initiées par le transfert d'un électron seul (SET).<sup>8</sup> De plus, l'oxydation électrochimique permet une production d'analytes en quantités suffisantes, dans des matrices d'échantillons simples favorisant l'analyse structurale par couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse (CL-SM). Les premières études

rapportant le couplage CE-SM pour la simulation du métabolisme de xénobiotiques interviennent dans les années 80.<sup>2</sup> Depuis, l'association CE-(CL-)SM connaît un essor important, essentiellement au travers des travaux du groupe d'Uwe Karst<sup>9</sup> et des travaux d'Ulrik Jurva.<sup>10</sup> En revanche, le couplage entre l'électrochimie et la RMN, bien que rapporté dès les années 70,<sup>11</sup> n'a pas connu le même engouement que le couplage CE-SM. La majorité des études rapportant l'utilisation du couplage CE-RMN se concentre sur l'approche *in situ*.<sup>12</sup> Avec cette approche, la cellule électrochimique se trouve au cœur de l'instrument RMN et les produits d'oxydation ou de réduction sont détectés en temps réel. Les récents développements d'électrodes ont permis de relancer l'intérêt porté à ce couplage. En effet, l'utilisation d'électrodes en microfibre de carbone a permis de rendre accessible le couplage CE-RMN *in situ* à des utilisateurs non spécialistes.<sup>13</sup> De plus, la surface d'électroactivité étant plus importante avec un tel dispositif, ceci permet d'améliorer le taux de conversion électrochimique, ce qui justifie pleinement son utilisation lors du couplage avec la RMN, au vu de la faible sensibilité de l'outil RMN comparé à la spectrométrie de masse.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un contexte scientifique, sociétal et économique important. La présence de plus en plus importante de polluants émergents dans l'environnement nécessite une amélioration des processus de traitement. L'utilisation de l'outil de simulation électrochimique doit permettre dans un premier temps d'élucider les différents mécanismes de dégradation mis en jeu et l'observation de possibles espèces intermédiaires réactives. De plus, le couplage avec différents outils analytiques tels que la SM et la RMN permet d'obtenir des informations essentielles sur la structure moléculaire des produits de dégradation. La toxicité *in vivo* d'un xénobiotique n'est pas forcément due à la molécule mère, mais généralement à ses produits de dégradation. C'est pourquoi, une meilleure connaissance sur les caractéristiques chimiques d'un xénobiotique et de ses produits de dégradation doit permettre d'améliorer les processus de traitement, limitant ainsi l'impact sur l'ensemble de l'écosystème.

Le premier chapitre de cette thèse rassemble les rappels bibliographiques nécessaires à la compréhension des travaux discutés dans les chapitres suivants. Dans un premier temps les principes fondamentaux de l'électrochimie et de la spectrométrie de masse seront rappelés. Dans un second temps, les couplages CE-(CL-)SM seront introduits et leurs applications discutées.

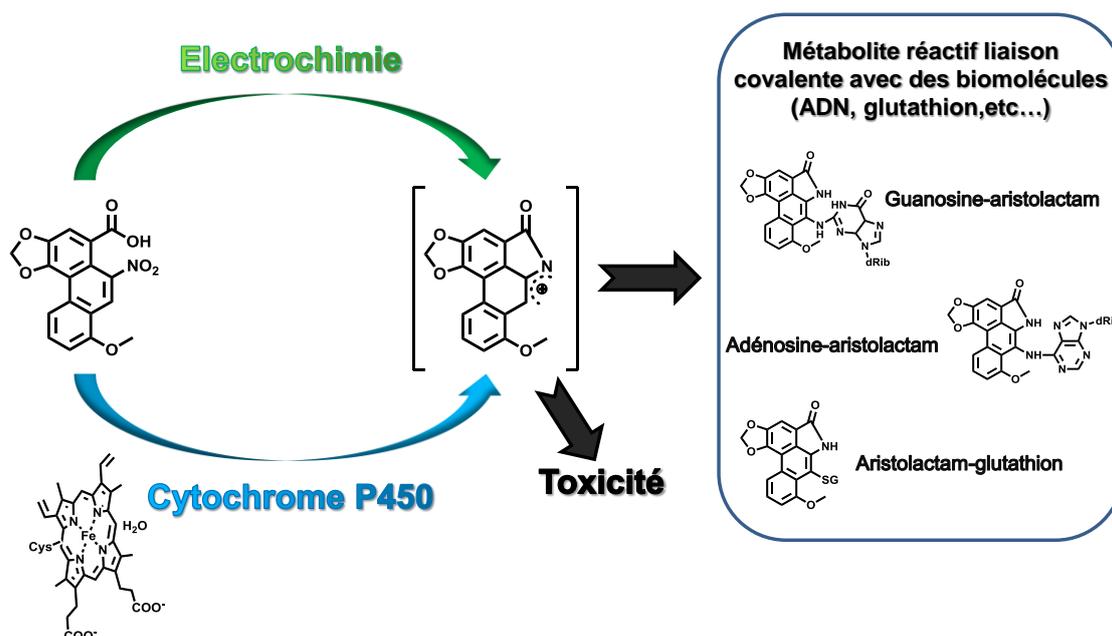
Le deuxième chapitre de cette thèse est focalisé sur l'utilisation de l'outil électrochimique pour l'étude de la dégradation oxydative du Tétrabromobisphénol A (TBBPA). En effet, le TBBPA est un polluant largement identifié dans l'environnement, ce qui en fait un exemple de choix pour l'évaluation des couplages CE-(CL-)MS pour les études des dégradations environnementales et biologiques (Figure 1).



**Figure 1 : Schéma présentant l'utilisation du couplage CE-(CL-)SM pour l'élucidation du mécanisme de dégradation oxydative du TBBPA.**

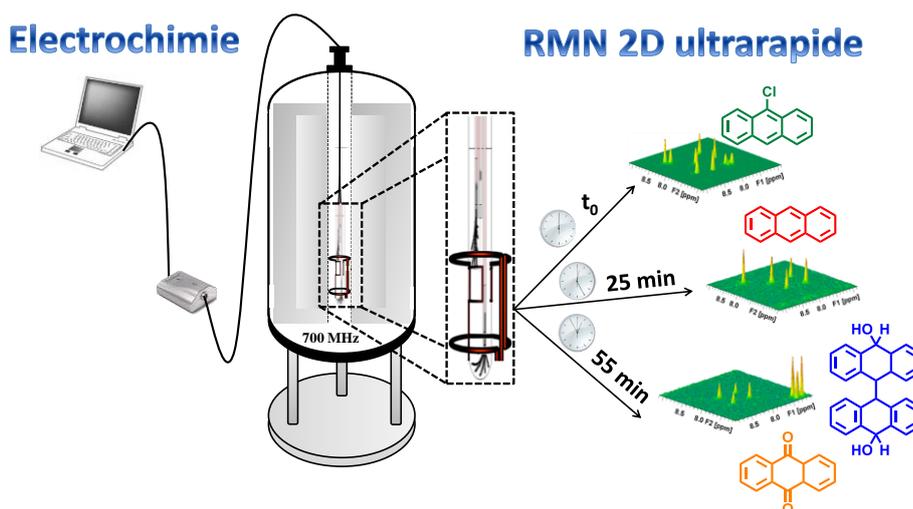
La suite de ce chapitre s'est attachée à présenter la simulation du métabolisme réductif d'un xénobiotique nitro-aromatique. Très peu d'études rapportent le mime du métabolisme réductif de xénobiotiques *in vivo*. Le comportement électrochimique de l'acide aristolochique (AA) a été étudié en vue de mimer son métabolisme réductif. L'AA représente un exemple complet pour l'étude de la simulation électrochimique de métabolisme réductif de nitro aromatiques. En effet, le métabolisme de l'AA *in vivo* a été rapporté dans la littérature comme rassemblant des métabolites de phase I, la formation de métabolites réactifs, des phénomènes de cyclisation intramoléculaires et la formation d'adduit avec des biomolécules. C'est pourquoi une attention toute particulière a été portée sur l'observation de cet intermédiaire réactif durant les réactions électrochimiques afin de valider la simulation du métabolisme réductif par l'outil électrochimique (Figure 2).

## Simulation du métabolisme réductif par couplage CE-(CL-)SM



**Figure 2 :** Schéma du couplage CE-(CL-)SM appliqué à la simulation du métabolisme réductif de l'acide aristolochique.

Dans le dernier chapitre, l'évaluation des techniques électrochimiques couplées sera achevée avec le suivi de la réduction du 9-chloroanthracène par CE-RMN 2D ultrarapide (Figure 3). Les précédents travaux rapportant l'utilisation du couplage CE-RMN l'ont été avec l'acquisition de spectre RMN à une dimension ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ).<sup>14-15</sup>



**Figure 3 :** Schéma du couplage CE-RMN 2D ultrarapide pour le suivi *in situ* et en temps réel de la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène.

Toutefois, l'introduction du dispositif électrochimique au sein du spectromètre ainsi que l'étude de mélanges/molécules complexes peuvent provoquer l'élargissement des signaux

RMN, créant des recouvrements sur le spectre RMN 1D. Afin de limiter l'impact de ces recouvrements il est communément admis d'utiliser la RMN à deux dimensions (2D). Néanmoins, la durée d'acquisition d'un spectre RMN 2D conventionnel (plusieurs dizaines de minutes) n'est pas compatible avec le suivi en temps réel d'un processus redox. C'est pourquoi nous avons développé le premier couplage entre une cellule électrochimique et la RMN 2D ultrarapide. En effet, la RMN 2D ultrarapide permet de diminuer de façon drastique la durée d'acquisition d'un spectre 2D.

**A. PARTIE THEORIQUE : Généralités sur  
l'électrochimie, la spectrométrie de masse  
et les couplages CE-(CL-)SM**

# A.1 Rappels théoriques sur l'électrochimie

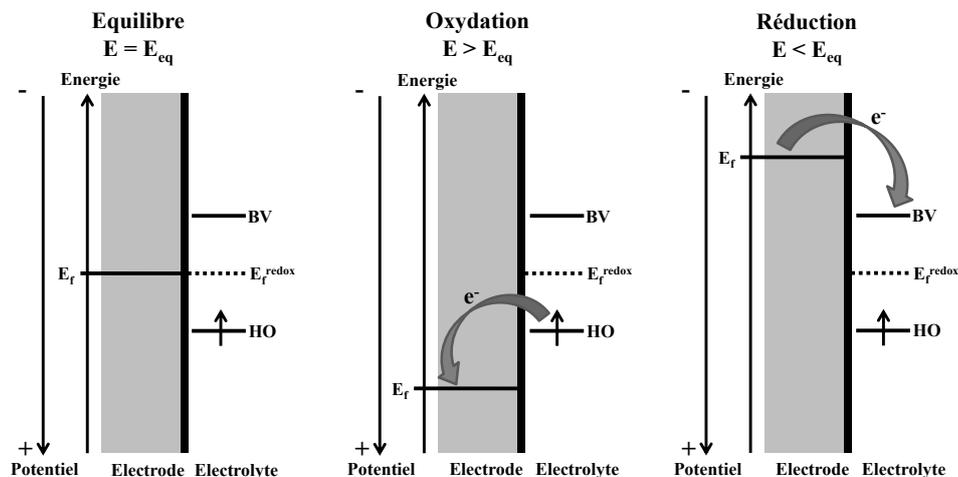
## A.1.1 Généralités<sup>16-17</sup>

La réaction électrochimique repose sur la présence d'une différence de potentiel à l'équilibre à l'interface entre une électrode et une solution électrolytique. A l'équilibre  $\mu_{e^-}^{\text{électrode}} = \mu_{e^-}^{\text{redox}}$  où  $\mu_{e^-}^{\text{électrode}}$  correspond à une mole d'électron dans l'électrode et  $\mu_{e^-}^{\text{redox}}$  une mole d'électron localisée sur une espèce électroactive en solution. Ceci montre que lorsqu'une électrode conductrice constituée d'un matériau solide inerte (carbone, platine, or...) est plongée dans une solution électrolytique, elle adopte le potentiel d'équilibre du couple *Ox/Red* de l'espèce électroactive présente en solution. Le potentiel d'équilibre est donné par l'équation de Nernst ci-dessous :

$$E_{eq} = E^0 + \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln \frac{C_{ox}}{C_{red}} \quad \text{Équation 1}$$

Où  $E^0$  est le potentiel standard (en V) caractéristique de l'espèce électroactive,  $F$  la constante de Faraday,  $n$  le nombre d'électrons échangés,  $R$  la constante des gaz parfaits ( $8,31 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) et  $T$  la température (en Kelvin).  $C_{ox}$  et  $C_{red}$  ( $\text{mol}^{-1}$ ) sont respectivement les concentrations des formes oxydée et réduite de l'espèce électroactive en solution.

L'application d'un potentiel différent de  $E^0$  provoque une variation du niveau de Fermi de celle-ci. Ainsi, l'interface électrode/solution peut être représentée sous trois configurations différentes (Figure 4).



**Figure 4 : Représentation schématique de l'interface électrode/solution selon la configuration : équilibre, oxydation et réduction.  $E_f$  correspond au niveau de Fermi.**

L'application à l'électrode d'un potentiel égal à la valeur d'équilibre du système n'engendre pas de réaction à l'interface de l'électrode. L'application d'un potentiel supérieur à la valeur d'équilibre engendre une diminution du niveau de Fermi de l'électrode, ce qui provoque un transfert électronique de l'espèce électroactive vers l'électrode, il s'agit ici d'une réaction d'oxydation. Inversement, si le potentiel appliqué est inférieur au potentiel d'équilibre, il s'agit d'une réaction de réduction. Il est donc possible de contrôler le sens de la réaction électrochimique à partir du potentiel de l'électrode : favoriser l'oxydation en augmentant le potentiel de l'électrode, ou favoriser la réduction en l'abaissant.

Outre ces considérations thermodynamiques, la cinétique de transfert électronique entre l'interface électrode/solution est régie par plusieurs paramètres, tels que :

- La cinétique du transfert électronique à la surface de l'électrode.
- La cinétique du transport de matière du réactif et du produit.
- Les phénomènes d'absorption à la surface de l'électrode.

### A.1.2 Cinétique de transfert de charge

Lors d'une réaction électrochimique, le transfert des électrons impliqués dans la réaction se produit entre l'espèce électroactive et l'électrode, directement à la surface de celle-ci. Lorsque le processus de transfert électronique est le facteur limitant de la réaction électrochimique, la vitesse du transfert de charge est définie par la loi de vitesse suivante :

$$I = nFA(k_a C_{red}^* - k_c C_{ox}^*) \quad \text{Équation 2}$$

Où  $A$  ( $\text{cm}^2$ ) désigne la surface conductrice de l'électrode,  $k_a$  et  $k_c$  ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) les constantes de vitesse des processus d'oxydation et de réduction,  $C_{red}^*$  et  $C_{ox}^*$  ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) les concentrations respectives en espèces oxydée et réduite avoisinant l'électrode et  $I$  (A) le courant traversant l'électrode.

Toutefois, la cinétique du transfert de charge à l'interface électrode/solution dépend du potentiel  $E$  et du coefficient de transfert de charge  $\alpha$  ( $0 < \alpha < 1$ ). Ainsi, la relation de Butler-Volmer permet de prendre en compte ces paramètres, se traduisant par une nouvelle relation l'intensité du courant électrique :

$$I = nFAk^0 \left[ C_{red}^* e^{\left(\frac{(1-\alpha)nF}{RT}(E-E^0)\right)} - C_{ox}^* e^{\left(\frac{-\alpha nF}{RT}(E-E^0)\right)} \right] \quad \text{Équation 3}$$

où

$$k_a = k^0 e^{\left(\frac{(1-\alpha)nF}{RT}(E-E^0)\right)} \quad \text{Équation 4}$$

et

$$k_c = k^0 e^{\left(\frac{-\alpha nF}{RT}(E-E^0)\right)} \quad \text{Équation 5}$$

avec  $k^0$  ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) la constante de vitesse standard de transfert électronique. Toutefois, si l'on considère l'équilibre à l'interface électrode/solution ( $I=0$ ), nous retrouvons l'expression de la loi de Nernst.

### A.1.3 Phénomènes de transport de matière en solution

Les électrons qui sont responsables du courant électrique dans un conducteur ne peuvent pas exister libres en solution. C'est pourquoi la conduction du courant électrique entre les deux électrodes séparées par une solution électrolytique est assurée par un mouvement d'espèces chargées en solution, par différents phénomènes qui sont discutés ci-dessous.

#### A.1.3.1 Courant de convection

Le courant de convection est le résultat du déplacement de matière présente en solution par un phénomène d'agitation mécanique.

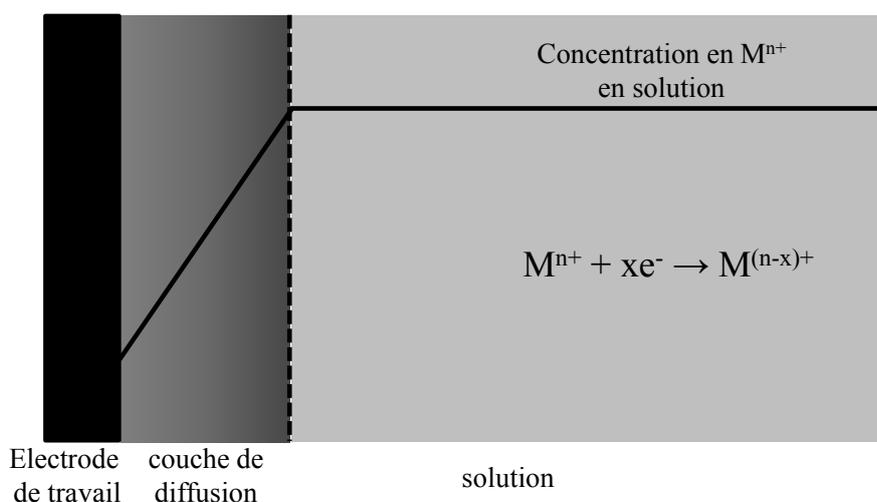
#### A.1.3.2 Courant de migration

Sous l'influence d'un champ électrique, les espèces chargées vont se déplacer vers les différentes électrodes selon leur polarité. En effet, les anions (charge électrique négative) se déplacent vers l'anode (borne positive) et les cations (charge électrique positive) vers la cathode (borne négative), créant ainsi un courant de migration. Ce courant de migration est la résultante de l'ensemble des ions présents en solution. Lors d'une réaction électrochimique, l'électrolyte support possède une tension de décomposition élevée de telle sorte que le potentiel appliqué aux électrodes ne permet pas sa décharge. La substance électroactive étant

en faible concentration par rapport à l'électrolyte support, le courant de migration est presque exclusivement due à celle-ci.

### A.1.3.3 Courant de diffusion

Durant la réaction électrochimique, il y a un appauvrissement en substance électroactive au voisinage de l'électrode de travail, ce qui provoque l'apparition d'un gradient de concentration. Pour rétablir l'homogénéité de la solution, les molécules électroactives vont se déplacer, créant un courant de diffusion (Figure 5).



**Figure 5 : Représentation schématique du profil de concentration de l'espèce électroactive dans une couche de diffusion : exemple d'une réduction électrochimique de l'ion  $M^{n+}$ .**

### A.1.3.4 Equation de Nernst-Planck

L'équation de Nernst-Planck associe les trois modes de transport de la matière afin de définir le flux  $J$  unidirectionnel selon l'axe  $x$  d'une espèce  $j$  considérée :

$$J_j(x) = -D_j \frac{\partial C_j(x)}{\partial x} - \frac{z_j F}{RT} D_j C_j \frac{\partial \phi(x)}{\partial x} + C_j \vartheta(x) \quad \text{Équation 6}$$

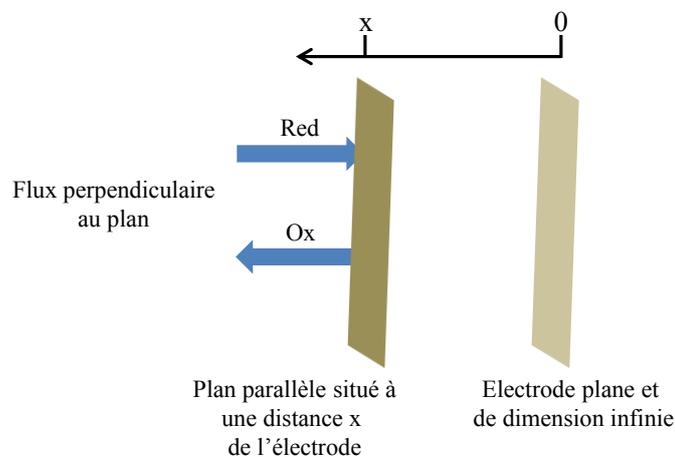
Ici  $J_j(x)$  ( $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) correspond au flux unidimensionnel de l'espèce  $j$  à une distance  $x$  (cm) de l'électrode, le coefficient de diffusion  $D_j$  ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) est caractéristique de l'espèce  $j$ ,  $z_j$  est la charge et  $C_j$  ( $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) la concentration de l'espèce  $j$ ,  $\vartheta(x)$  ( $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) est la vitesse d'un élément de volume dans la solution,  $\frac{\partial C_j(x)}{\partial x}$  le gradient de concentration et  $\frac{\partial \phi(x)}{\partial x}$  le gradient de potentiel selon l'axe  $x$ . Cette équation est constituée de trois termes, le premier terme  $D_j \frac{\partial C_j(x)}{\partial x}$

correspond à la diffusion des espèces en solution, le second terme  $\frac{z_j F}{RT} D_j C_j \frac{\partial \phi(x)}{\partial x}$  correspond à la migration des espèces chargées dans la solution et le dernier terme  $C_j v(x)$  représente la convection de la solution.

Comme mentionné dans la partie A.1.3.2, la présence d'un excès d'électrolyte support dans la solution permet de limiter la migration des espèces électroactives durant le processus électrochimique. De plus, en l'absence d'agitation mécanique de la solution, le terme issu de la convection peut être négligé. Ainsi, en régime stationnaire, le transport des espèces en solution est majoritairement assuré par la diffusion.

### A.1.3.5 Les lois de diffusion de Fick

Considérons le cas d'électrodes planes où la diffusion s'effectue suivant la direction normale à un plan se trouvant à la distance  $x$  de l'origine, le flux d'une espèce  $j$  à travers ce plan noté  $J_j(x)$  représente le nombre de moles d'espèce  $j$  traversant ce plan par unité de temps  $t$  et à la distance  $x$  (Figure 6).



**Figure 6 : Bilan de matière à un plan parallèle à la surface d'une électrode, situé à une distance  $x$  de celle-ci.**

Les lois de Fick décrivent le flux d'une espèce et sa concentration. La première loi de Fick établit que le flux est proportionnel au gradient de concentration  $\frac{\partial C_j}{\partial x}$ . La constante de proportionnalité est définie par le coefficient de diffusion  $D_j$ .

$$J_j(x) = -D_j \frac{\partial C_j(x)}{\partial x} \quad \text{Équation 7}$$

Cette première loi de Fick permet de relier entre eux l'intensité du courant et le flux des espèces électroactives en solution :

$$i = nFAD_j \frac{\partial C_j(x)}{\partial x} \quad \text{Équation 8}$$

La deuxième loi de Fick traduit la variation de la concentration en espèce considérée dans l'espace au cours du temps :

$$\frac{\partial C_j(x)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_j(x)}{\partial x^2} \quad \text{Équation 9}$$

La résolution de cette équation différentielle permet de déterminer la variation de  $C_j$  dans l'espace et dans le temps. Ainsi, il est possible d'obtenir la densité de flux de diffusion à la surface de l'électrode en fonction du temps.

### A.1.4 Cellules électrochimiques

Une cellule électrochimique contient, de manière générale, la solution électrolytique, ainsi qu'un montage à trois électrodes : électrode de travail ou indicatrice, contre électrode ou auxiliaire et électrode de référence, dont le potentiel est fixe et connu (Figure 7). La solution électrolytique est composée d'un solvant ou d'un mélange de solvants, d'un électrolyte support non électroactif pour assurer la conduction (conducteur ionique) et de la substance électroactive à étudier.

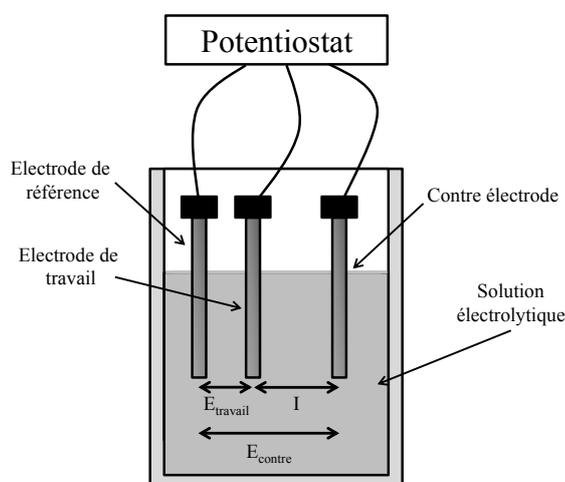


Figure 7 : Schéma d'une cellule électrochimique à trois électrodes.

Lors d'une réaction électrochimique, l'utilisation d'un potentiostat permet d'appliquer une différence de potentiel entre l'électrode de référence et l'électrode de travail, ainsi cette dernière devient le siège des réactions électrochimiques. Le courant généré par la réaction de transfert électronique est mesuré entre l'électrode de travail et la contre électrode. L'utilisation d'un montage à trois électrodes permet de minimiser les phénomènes de fluctuation du potentiel, mais également de chute ohmique, par rapport à un montage à seulement deux électrodes.

## **A.1.5 Etude électrochimique en régime de diffusion naturelle pure (voltampérométrie cyclique)**

### **A.1.5.1 Principe**

Le principe de la voltampérométrie est d'imposer une rampe linéaire de potentiel à la surface de l'électrode de travail par rapport à une électrode de référence. Le balayage de potentiel s'effectue linéairement entre deux valeurs de potentiel : de  $E_i$ , potentiel initial, jusqu'à  $E_L$ , potentiel limite, puis un retour au potentiel initial. La réponse des espèces électroactives à cette rampe de potentiel génère un courant qui sera mesuré entre l'électrode de travail et la contre électrode. L'analyse de ce courant peut nous renseigner sur la cinétique du transfert électronique à l'interface électrode/solution.

Dans le cas d'un système réversible ( $Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$ ) pour lequel le transport de matière est assuré seulement par la diffusion, on obtient un voltampérogramme ( $I = f(E)$ ) caractéristique présenté sur la Figure 8.

En diffusion naturelle pure, l'augmentation du potentiel provoque une hausse du courant, qui se traduit par une augmentation du gradient de concentration en espèces électroactives. Cependant, ici la couche de diffusion n'est pas contrôlée et évolue naturellement durant la réaction électrochimique. Lorsque le courant atteint un pic, cela signifie que le gradient de concentration est maximal et qu'ainsi la concentration en espèces électroactives est nulle à la surface de l'électrode. Suite à ce pic, la diminution du courant s'explique par l'influence du phénomène de diffusion, qui s'avère être le facteur limitant ici. Toutefois, l'évolution du courant avant d'atteindre le pic est très influencée par la cinétique électronique, ce qui nous permet de caractériser le système en mesurant le  $k^0$ . Le balayage retour nous permet de caractériser la réversibilité électrochimique du système étudié.

La voltampérométrie cyclique offre donc la possibilité d'enregistrer des courbes  $I = f(E)$  fournissant des informations sur les potentiels redox et sur la cinétique des systèmes électrochimiques mis en jeu.

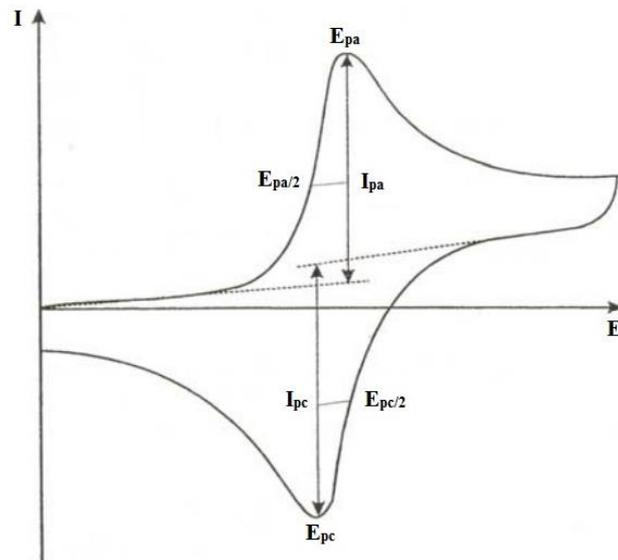


Figure 8 : Voltampérogramme théorique d'un système réversible et rapide.

### A.1.5.2 Utilisation des résultats de voltampérométrie cyclique

L'intégration des lois de diffusion de Fick conduit à l'expression de la concentration des espèces en solution au niveau de la surface de l'électrode. En fonction du type de système étudié l'expression de  $I = f(E)$  sera différente. En effet, pour un système rapide l'application de lois du type Nernst sera nécessaire, alors que pour un système lent, il faudra choisir la loi de Butler-Volmer.

Prenons le cas d'un système dit rapide où l'étape cinétiquement limitante de la réaction électrochimique est le transport de matière et non le transfert électronique ( $k^0 \gg k_D$ ), avec  $k_D$  la constante de diffusion de l'espèce électroactive considérée. Pour ce genre de système, la réaction d'oxydation se fait aussi facilement que la réduction, le système est dit réversible (Figure 8). Nous enregistrerons ainsi les caractéristiques suivantes pour ce système :

- $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 56/n$  (mV)    n: nombre d'électrons échangés, avec  $E_{pa}$  et  $E_{pc}$  les potentiels d'oxydation et de réduction respectifs qui sont indépendants de la vitesse de balayage  $v$ .

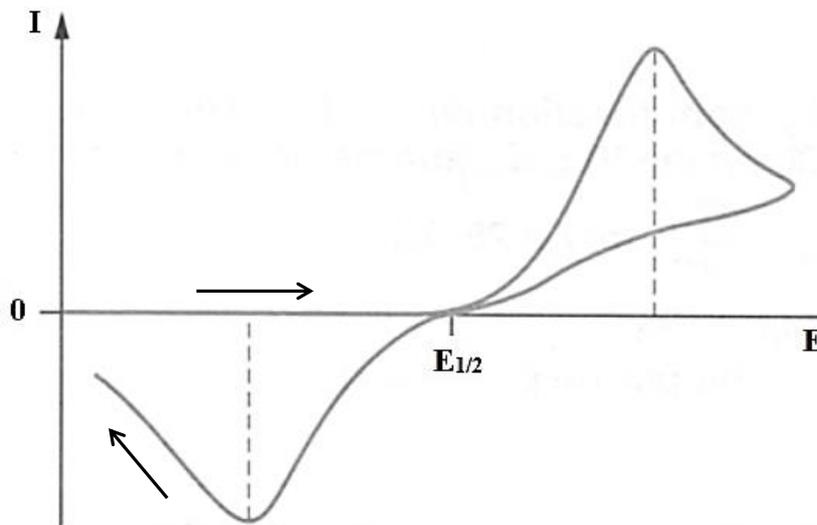
- $I_p$  varie de façon proportionnelle à  $v^{1/2}$  selon l'équation de Randles-Sevcik ci-dessous :

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} D_j^{1/2} v^{1/2} C_j \quad \text{Équation 10}$$

- $I_{pa}/I_{pc} = 1$  avec  $I_{pa}$  et  $I_{pc}$  les intensités respectives des pics d'oxydation (anodique) et de réduction (cathodique).

Considérons maintenant un système réversible lent (Figure 9) où ici l'étape cinétiquement déterminante est le processus de transfert électronique ( $k^0 \ll k_D$ ), les caractéristiques de ce systèmes deviennent :

- $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} > 56/n$  (mV) et augmente avec la vitesse de balayage  $v$ .
- $I_p$  est proportionnel à  $v^{1/2}$ .
- $I_{pa}/I_{pc} \neq 1$



**Figure 9 : Voltampérométrie théorique d'un système réversible et lent.**

Toutefois, il faut noter que, durant une réaction électrochimique, l'ensemble des modifications observées ne sont pas uniquement dues à des transferts électroniques. En effet, une réaction de transfert électronique peut être suivie par une ou des réaction(s) chimique(s) se produisant en amont (système CE chimie-électrochimie) ou en aval (système EC électrochimie-chimie) de la réaction électrochimique.

## A.1.6 La chronoampérométrie

La chronoampérométrie est, tout comme la voltampérométrie cyclique, une technique ampérométrique. Elle consiste en l'application d'un potentiel fixe et à la mesure du courant résultant des réactions de transfert électronique en fonction du temps.

Pour une réaction électrochimique régie par la diffusion où une seule espèce est présente en solution, l'intensité du courant enregistré évolue en fonction de l'équation de Cottrell :

$$I(t) = nFAC_{ox/red} \sqrt{\frac{D_{ox/red}}{\pi t}} \quad \text{Équation 11}$$

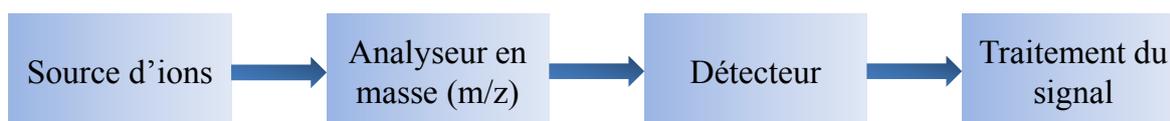
Cette équation montre qu'au cours d'une expérience ampérométrique en l'absence de convection en solution, le courant d'électrolyse évolue en  $\sqrt{\frac{D_{ox/red}}{\pi t}}$  en fonction du temps. Le courant quant à lui tend vers zéro après la consommation de toute l'espèce au voisinage de l'électrode. En présence d'une agitation mécanique le courant va tendre vers zéro lorsque l'ensemble des espèces électroactives présentes en solution sera consommé (ou bien que l'électrode de travail sera inactive par de possibles phénomènes d'absorption).

## A.2 Rappels théoriques sur la spectrométrie de masse

### A.2.1 Principes

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse reposant sur des principes physico-chimiques permettant de discriminer des molécules selon leurs rapports masse sur charge ( $m/z$ ) supportant des analyses structurales et quantitatives.

Le fonctionnement d'un spectromètre de masse est schématisé ci-dessous (Figure 10).<sup>18</sup> La source d'ionisation permet de transformer les molécules présentes dans une matrice liquide, solide ou gazeuse en ions, qui sont par la suite séparés par l'analyseur en fonction de leur rapport  $m/z$ . Il existe plusieurs types d'analyseur dont le fonctionnement de certains d'entre eux sera discuté dans cette partie. Le détecteur permet ensuite la conversion d'un courant ionique en courant électrique, et pour finir un traitement du signal est nécessaire pour obtenir un spectre de masse.



**Figure 10 : Différents étapes réalisées lors d'une analyse par spectrométrie de masse.**

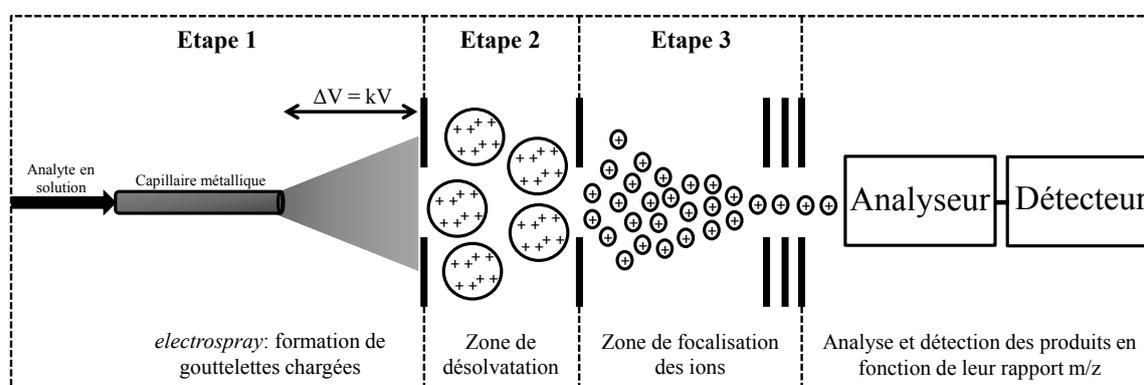
Dans la suite de cette partie, nous discuterons seulement de l'ionisation par électro-nébuleuse (« *electrospray* »), souvent utilisée pour les matrices liquides et les couplages avec la chromatographie en phase liquide (aucun autre mode d'ionisation n'a été utilisé durant ces travaux).

### A.2.2 Ionisation par *electrospray*<sup>19</sup>

La formation d'ions en phase gazeuse par le biais d'une source *electrospray* a été pour la première fois proposée par John Fenn dans les années 80, ce qui lui valut le Prix Nobel de Chimie en 2002.<sup>20</sup> De nos jours, l'*electrospray* est la source d'ionisation la plus utilisée pour l'étude de molécules en solution par introduction directe ou après une séparation chromatographique.

La formation d'ions par *electrospray* peut être décrite en trois étapes bien distinctes représentées par la Figure 11. Dans un premier temps, la nébulisation de gouttelettes chargées

est assurée par l'action d'un champ électrique intense (plusieurs kV) au travers d'un capillaire métallique chauffé. Par la suite, sous l'effet d'un courant gazeux (généralement de l'azote), le solvant résiduel s'évapore progressivement jusqu'à ce que les gouttelettes deviennent instables. A cet instant, par interactions coulombiennes, les gouttelettes se déforment jusqu'à leur explosion en une multitude de microgouttelettes chargées. La densité de charge des gouttelettes devenant trop importante pour assurer leur cohésion, elles explosent, conduisant à la formation d'ions (phénomène de désolvatation-explosion). Finalement, le faisceau d'ions ainsi formé est focalisé et accéléré par des lentilles électrostatiques ou un guide d'ions (quadripôle ou hexapôle) vers l'analyseur de masse. Cependant, durant ce processus, il se peut que des molécules neutres soient formées mais étant insensibles à la focalisation électrostatique, elles sont évacuées par le vide.



**Figure 11 : Schématisation des trois étapes d'ionisation par une source *electrospray*.**

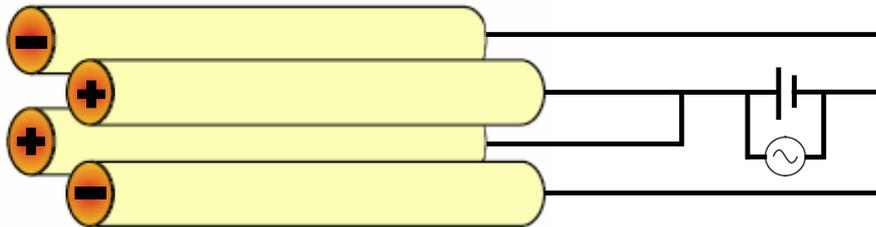
La source *electrospray* entraîne la formation d'ions chargés au travers de réactions acido-basiques. C'est pourquoi la source *electrospray* peut être utilisée soit en mode positif, soit en mode négatif selon le signe de la tension appliquée sur le capillaire. En effet, lors d'expériences en mode positif les ions formés seront principalement sous la forme  $[M+nH]^{n+}$  où M représente le poids moléculaire de la molécule ionisée et n son état de charge. Dans le cas où l'*electrospray* est utilisé en mode négatif, il y aura préférentiellement formation d'ions  $[M-nH]^{n-}$ . C'est pourquoi, lors de l'utilisation de l'*electrospray* il est important d'ajouter de faibles quantités d'acide ou de base pour faciliter l'ionisation des analytes. Toutefois, d'éventuels adduits de sodium, ammonium ou d'autres ions présents en solution peuvent être aussi observés.

## A.2.3 Analyseurs de masse<sup>18</sup>

Nous ne discuterons ici que des analyseurs quadripolaire et à temps de vol car seuls ceux-ci ont été utilisés durant l'ensemble de ces travaux.

### A.2.3.1 Analyseur Quadripolaire

Le fonctionnement d'un analyseur quadripolaire repose sur l'application d'une tension continue additionnée à une tension alternative sur quatre électrodes métalliques parallèles les unes aux autres (Figure 12). Ceci implique que le faisceau d'ions traversant le quadripôle est soumis à un champ électrique quadripolaire.



**Figure 12: Schématisation d'un analyseur quadripolaire linéaire.**

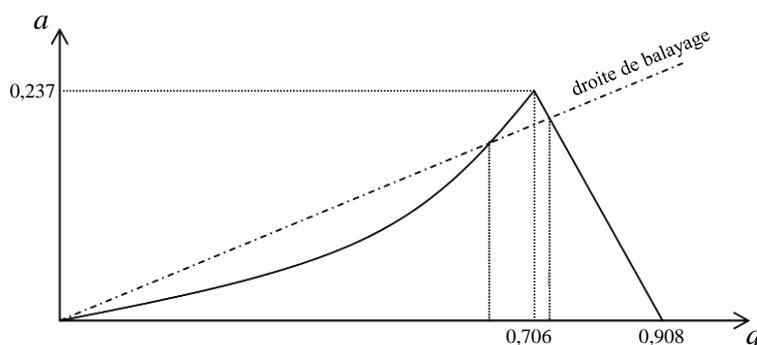
La stabilisation des ions préalablement formés au sein du quadripôle sera conditionnée par la valeur des tensions appliquées à celui-ci. En effet, en fonction des tensions alternative ( $V$ ) et continue ( $U$ ) appliquées, soit les ions auront une trajectoire stable à travers le quadripôle, soit la trajectoire sera incohérente et les ions seront éjectés de l'analyseur. La trajectoire des ions à travers le quadripôle est régie par l'équation de Mathieu :<sup>18</sup>

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cdot \cos 2\xi) \cdot u = 0 \quad \text{Équation 12}$$

Avec  $u = x$  ou  $y$ ,  $\xi = \omega t/2$ ,  $a_u = 8zeU/mr_0^2\omega^2$ ,  $q_u = 4zeV/mr_0^2\omega^2$ ,  $r_0$  est le rayon entre les quatre barres du quadripôle et  $\omega$  la fréquence angulaire telle que  $\omega = 2\pi f$  où  $f$  est la fréquence du champ alternatif.

Pour qu'un ion puisse traverser le quadripôle il faut que les valeurs de  $x$  et  $y$  restent inférieures à  $r_0$ . Ces valeurs (représentées par  $u$  dans l'équation de Mathieu) étant directement liées aux paramètres  $a_u$  et  $q_u$ , eux-mêmes fonctions des tensions  $U$  et  $V$ , il est possible de définir selon les valeurs de  $a_u$  et  $q_u$  des zones dans lesquelles les ions seront stables

(diagramme de stabilité). Le diagramme de stabilité des ions à travers le quadripôle est construit grâce au calcul des paramètres  $a$  et  $q$ . Les ions dont les conditions de stabilité ne sont pas respectées seront éjectés du quadripôle. La Figure 13 représente le diagramme de stabilité d'un analyseur quadripolaire classique.



**Figure 13: Diagramme de stabilité des ions dans un quadripôle en fonction des paramètres  $a$  et  $q$ .**

La zone quasi rectangulaire correspond à la partie où la combinaison des paramètres  $a$  et  $q$  offre une bonne stabilité aux ions. La largeur du segment de droite compris dans cette zone détermine la largeur des pics observés. C'est pourquoi, plus la droite se rapproche du sommet du diagramme (0,237 ; 0,706), plus la résolution sera augmentée au détriment de la sensibilité (quantité d'ions stables qui diminue). Pour effectuer de bonnes analyses en spectrométrie de masse il est nécessaire d'ajuster les tensions pour obtenir les valeurs de  $a$  et  $q$  les plus proches possibles du sommet. Au final, le balayage des tensions permet de ne sélectionner à la fois qu'un seul  $m/z$  collecté par le détecteur, les autres étant éjectés du quadripôle.

Il est possible d'utiliser le quadripôle dans une autre configuration. En effet, en positionnant la droite de balayage sur l'axe des abscisses (à l'extrémité du diagramme  $q=0,908$ ) la composante tension continue est nulle, ce qui permet d'utiliser le quadripôle en configuration guide d'ions ou cellule de collision. Ceci offre une trajectoire oscillante aux ions, ce qui tend à augmenter leur parcours au sein du quadripôle. Deux possibilités se distinguent : i) les ions ont une énergie cinétique faible, le passage dans le quadripôle conduit à la focalisation du faisceau d'ions ou ii) les ions possèdent une énergie cinétique élevée, ceci accroît les chances de collisions avec des molécules neutres (typiquement d'argon). Ce phénomène de fragmentation ionique peut être très appréciable pour l'analyse structurale de molécules d'intérêt.

En conclusion, l'utilisation d'un quadripôle offre de nombreux avantages tels que la possibilité d'un balayage rapide des tensions, l'alternance aisée d'analyses d'ions positifs et négatifs.

### A.2.3.2 Analyseur à temps de vol

L'analyseur à temps de vol (TOF, *Time Of Flight*) fait partie des analyseurs les plus utilisés au vu de sa résolution nettement supérieure à celle d'un analyseur quadripolaire (25000 pour le TOF contre 2000 pour un quadripôle). Une telle résolution permet la détermination de masses exactes, offrant l'avantage d'associer une formule brute à un  $m/z$  donné.

Son fonctionnement est basé sur l'accélération des particules sous l'action d'un champ électrique. En effet, des ions de masse  $m$  et de charge  $z$  accélérés par une différence de potentiel ou tension accélératrice notée  $U$ , acquièrent une énergie cinétique, donnée par l'équation suivante :

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 = zU \quad \text{Équation 13}$$

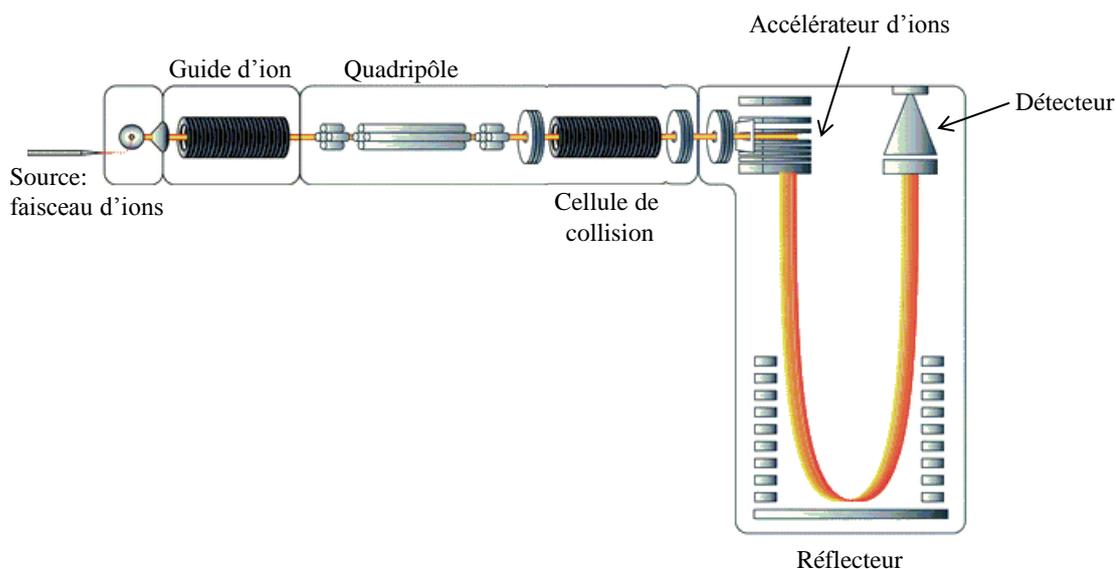
Ils possèdent alors une vitesse égale à :

$$v = \sqrt{\frac{2zU}{m}} \quad \text{Équation 14}$$

Par conséquent, après accélération et libération des ions dans le tube où ne règne aucun champ électrique ou magnétique, la particule considérée possède une vitesse constante ( $v = d/t$ ). Le  $m/z$  d'une particule peut alors être exprimé en fonction de son temps de vol, de la tension accélératrice et de la distance parcourue :

$$\frac{m}{z} = 2U\left(\frac{t}{d}\right)^2 \quad \text{Équation 15}$$

La Figure 14 représente un spectromètre équipé d'un analyseur à temps de vol.



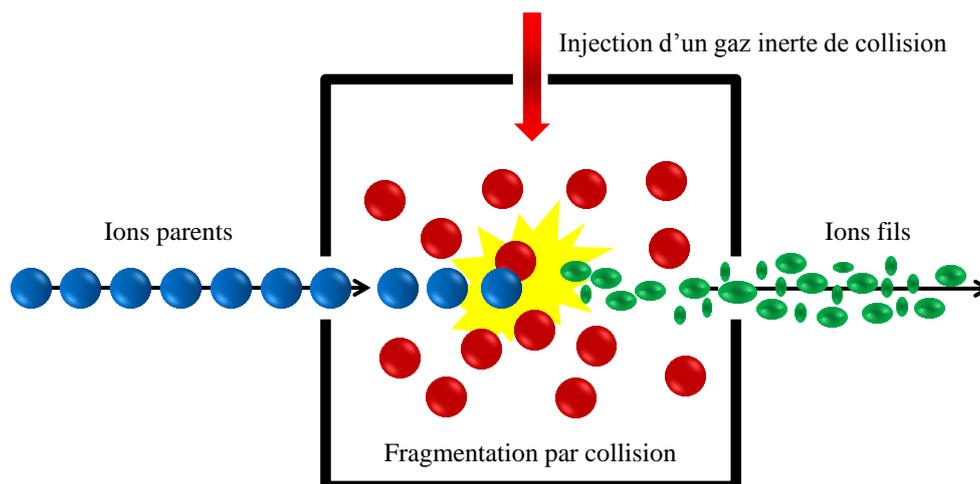
**Figure 14: Schématisation du fonctionnement d'un analyseur à temps de vol.**

L'analyseur à temps de vol présenté ici est dit de configuration en V (un seul aller-retour des ions dans le tube de vol), il existe aussi une configuration dite en W (double aller-retour) permettant d'augmenter la résolution des analyses au détriment de la sensibilité.

### A.2.3.3 Analyseur hybride Quadripôle/Temps de vol

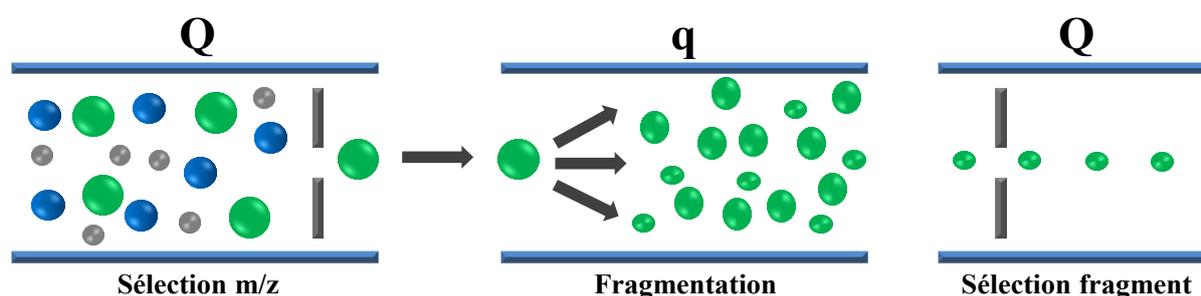
Dans la configuration présentée ci-dessus le quadripôle sert de guide d'ions entre la source et l'analyseur TOF (*time of flight*). Toutefois, la majorité des spectromètres de masse haute résolution actuels offre la possibilité de réaliser des expériences de spectrométrie de masse à deux dimensions (SM<sup>2</sup> ou SMSM). Pour cela, il suffit d'associer un analyseur quadripolaire (Q) et une cellule de collision (q) en amont de l'analyseur à temps de vol (QqTOF). Deux configurations possibles s'offrent à nous.

Dans un premier cas, les quadripôles sont configurés en mode guide d'ions. Ainsi, les masses exactes mesurées par l'analyseur à temps de vol permettent d'aboutir à une unique formule brute et donc faciliter l'élucidation structurale des molécules d'intérêt. La seconde configuration permet la sélection d'un  $m/z$  par le quadripôle (ion parent). Ainsi, l'ion sélectionné va entrer dans cette cellule de collision et subir des interactions plus ou moins fortes avec un gaz neutre en excès (typiquement Ar) et potentiellement se fragmenter (ions fils) comme l'indique la Figure 15.



**Figure 15: Schématisation du principe de fragmentation en spectrométrie de masse. Les ions parents rentrent dans la chambre de collision et, par contact avec un gaz inerte, les ions se fragmentent pour donner des ions fils.**

Le phénomène de collision d'union avec une molécule neutre, suivie de sa possible fragmentation, est connu sous le nom de dissociation induite par collision (*Collision Induced Dissociation*, CID). Les fragmentations observées résultent la majorité du temps de la coupure de liaisons hétéronucléaires, de pertes de neutres et de possibles réarrangements intramoléculaires. La spectrométrie de masse à deux dimensions est un outil de poids pour l'élucidation structurale ainsi que pour la quantification de molécules organiques. Toutefois, lors d'analyses quantitatives, l'analyseur quadripolaire est préféré à un analyseur à temps de vol, donnant naissance à un système QqQ plus sensible que l'hybride QqTOF. En effet, pour la quantification par SMSM le mode d'acquisition phare est le mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) présenté en Figure 16.



**Figure 16 : Schématisation du mode d'acquisition MRM en spectrométrie de masse à deux dimensions.**

Le mode MRM consiste en la sélection d'un  $m/z$  appelé ion parent ou ion précurseur par le premier quadripôle, puis en sa fragmentation dans la cellule de collision, pour finir par la détection d'un seul ion issu de la fragmentation (ion fils ou ion produit). Cette configuration

améliore significativement la sensibilité et la résolution des expériences vis-à-vis d'autres modes tels que le mode balayage par exemple. Cependant l'aspect quantitatif de ce mode de détection nécessite l'optimisation des paramètres tels que l'énergie de collision et la sélection d'une ou plusieurs fragmentations par analyte. Ces optimisations sont généralement réalisées sur des standards. C'est pourquoi dans le cas de métabolites inconnus, son application est limitée.

#### **A.2.4 Détecteur**

L'essentiel des spectromètres de masse haute résolution d'aujourd'hui utilise un photomultiplicateur comme détecteur. Une fois les ions séparés, ils possèdent des énergies cinétiques importantes, et en allant heurter une plaque métallique plusieurs électrons sont libérés. Les électrons ainsi éjectés vont à leur tour heurter une autre plaque, provoquant l'éjection d'un nombre plus important d'électrons. Ce processus est répété plusieurs fois, permettant d'accroître l'intensité du signal mesuré et d'aboutir à ce qu'on appelle le courant ionique total (CIT). Finalement, par l'utilisation d'un traitement du signal adapté, il sera possible d'extraire un  $m/z$  donné du CIT donnant accès au courant ionique extrait (CIE).

## A.3 Couplage entre une cellule électrochimique et un spectromètre de masse

### A.3.1 Historique

La première étude portant sur le couplage entre une cellule électrochimique (CE) et un spectromètre de masse (SM) a été rapportée par Bruckenstein et Gadde dans les années 70. Les auteurs exposent le comportement redox et l'identification de composés volatiles.<sup>21</sup> La cellule électrochimique utilisée est constituée par une électrode poreuse de platine imprégnée d'une solution électrolytique et directement connectée au spectromètre de masse. Par la suite, d'autres études ont rapporté l'utilisation de ce dispositif.<sup>22-25</sup>

Dans les années 80, Hambitzer *et al.* ont présenté le couplage CE-SM en vue d'étudier le comportement électrochimique d'un composé non volatil, la N-N-diméthylaniline.<sup>26</sup> Dans cette étude, la cellule électrochimique est connectée au spectromètre de masse par le biais d'une source thermospray. L'utilisation d'un tel couplage fut présentée par Getek *et al.* pour l'étude du comportement oxydatif de principes actifs pharmaceutiques, tels que le paracétamol.<sup>2</sup>

Dans les années 90, Brajter-Toth *et al.* sont les premiers à présenter le couplage entre une cellule électrochimique, la chromatographie liquide (CL) et la spectrométrie de masse (système CE-CL-SM). Ce dispositif permet la production en ligne, la séparation et la détection d'espèces générées électrochimiquement.<sup>27, 28</sup> Pour cette étude les auteurs ont utilisé une cellule électrochimique commerciale (ESA<sup>®</sup>).

Les premières études concernant le couplage CE-(CL-)SM utilisaient des techniques d'ionisation du type bombardement d'atomes rapide,<sup>29</sup> thermospray<sup>30</sup> ou ionisation chimique à pression atmosphérique.<sup>31</sup> Toutefois, Zhou et Van Berkel rapportent l'implémentation de différents types de cellules électrochimiques avec un spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation par *electrospray*.<sup>32-34</sup> L'utilisation de cette source d'ionisation permet d'appliquer le couplage à une gamme plus étendue de molécules.

En 2000, les travaux de Jurva, Wikström et Bruins permettent une avancé dans l'utilisation du couplage CE-(CL-)SM. En effet, les auteurs rapportent l'utilisation de ce couplage pour la simulation des réactions induites par les cytochromes P450.<sup>7</sup> Leurs avancées font intervenir des techniques électrochimiques permettant la génération et l'observation d'espèces réactives

oxygénées.<sup>35-38</sup> La capacité du couplage CE-(CL-)SM pour la simulation de l'activité des cytochromes P450 a aussi été étudiée par le groupe de Karst.<sup>31, 39-41</sup> Ces groupes font aujourd'hui partie des acteurs majeurs du domaine d'application du couplage CE-(CL-)SM pour la simulation des réactions induites par les cytochromes P450.<sup>4, 9</sup> Plus récemment, des travaux de Küppers et ses collaborateurs rapportent l'utilisation du couplage CE-SM comme un outil polyvalent pour l'étude mécanistique de l'oxydation de xénobiotiques et de la possible interaction du xénobiotique et de ses produits de dégradations avec la matière organique présente dans l'environnement.<sup>42-44</sup> Une étude complémentaire de Faber *et al.* rapporte la comparaison des produits de dégradations par voie électrochimique ou par ozonation sur deux composés modèles (métoprolol et diclofénac). Les auteurs ont constaté la formation d'un nombre important de produits de transformation communs entre les deux approches. Toutefois, des conditions électrochimiques adaptées sont nécessaires pour observer certains produits de dégradations (formation de radicaux hydroxyle).<sup>45</sup>

Dans un même temps, les groupes de Girault et Van Berkel se sont attachés au développement instrumental de l'*electrospray* pour la mise en œuvre de processus d'oxydoréduction *in situ*.<sup>46-48</sup> Cette approche du couplage CE-SM permet l'observation d'espèces relativement instables telles que des complexes de Cu(I).<sup>49</sup>

De nombreuses revues sont dédiées aux applications du couplage CE-(CL-)SM,<sup>8-9, 50-53</sup> ainsi qu'aux développements technologiques du couplage. En effet, un intérêt majeur est porté sur la miniaturisation du dispositif électrochimique,<sup>54</sup> mais également sur la modification des électrodes permettant d'accéder à un plus grand panel de réactions induites par les cytochromes P450.<sup>50, 55</sup>

Par la suite, nous discuterons de l'aspect technique et des contraintes expérimentales de la mise en œuvre de ces couplages.<sup>56</sup> Nous continuerons avec la présentation des applications majeures du couplage CE-(CL-)SM telles que la simulation de réactions biologiques,<sup>57-60</sup> du devenir environnemental de polluants émergents<sup>42-43</sup> ou encore l'étude de biomolécules telles que les protéines par marquage électrochimique.<sup>61</sup>

### A.3.2 Mise en œuvre des couplages CE-(CL-)SM

La majorité des travaux qui font état d'une étude CE-(CL-)SM utilisent une cellule électrochimique indépendante de la source d'ionisation du spectromètre de masse. De plus,

les études se basent sur l'utilisation de deux configurations de cellules électrochimiques. La première configuration est basée sur la circulation de la solution électrolytique à travers une électrode de travail poreuse, tandis que la seconde configuration met en œuvre la circulation de la solution en couche mince à la surface des électrodes. Toutefois, il est important de noter que ces deux configurations reposent sur une circulation hydrodynamique de la solution électrolytique (le volume interne des cellules n'excède pas quelques microlitres). Le volume interne ainsi que le débit d'injection de la solution électrolytique doivent être adaptés afin de permettre l'observation par spectrométrie de masse de la variation d'un paramètre électrochimique sur le signal étudié et des produits de réactions électrochimiques. De plus, des débits non adaptés peuvent engendrer une influence non négligeable sur la couche de diffusion et la conversion électrochimique.

### A.3.2.1 Cellules électrochimiques à électrode poreuse

Une vue éclatée d'une cellule électrochimique ESA<sup>®</sup> ([www.spectrotech.com](http://www.spectrotech.com)) à électrode poreuse est présentée sur la Figure 17. Dans cette cellule, la solution traverse une électrode de travail en carbone poreux. Les électrodes de référence et contre électrode sont toutes les deux constituées de Palladium et doublées (placées de part et d'autres de l'électrode de travail), ainsi le phénomène de chute ohmique est limité durant la réaction électrochimique. Cette cellule est maintenue fermée par une résine PEEK (*Poly-Ether-Ether-Ketone*) et ne peut pas être démontée pour la maintenance ou l'échange d'électrode.

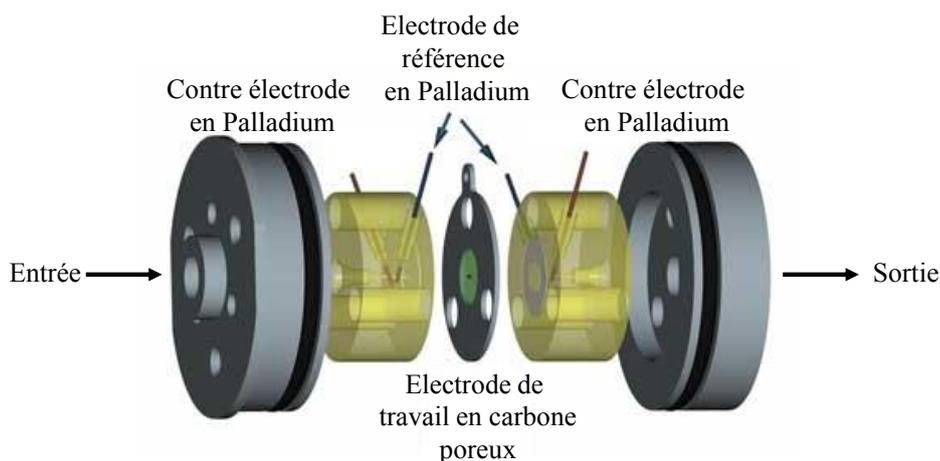
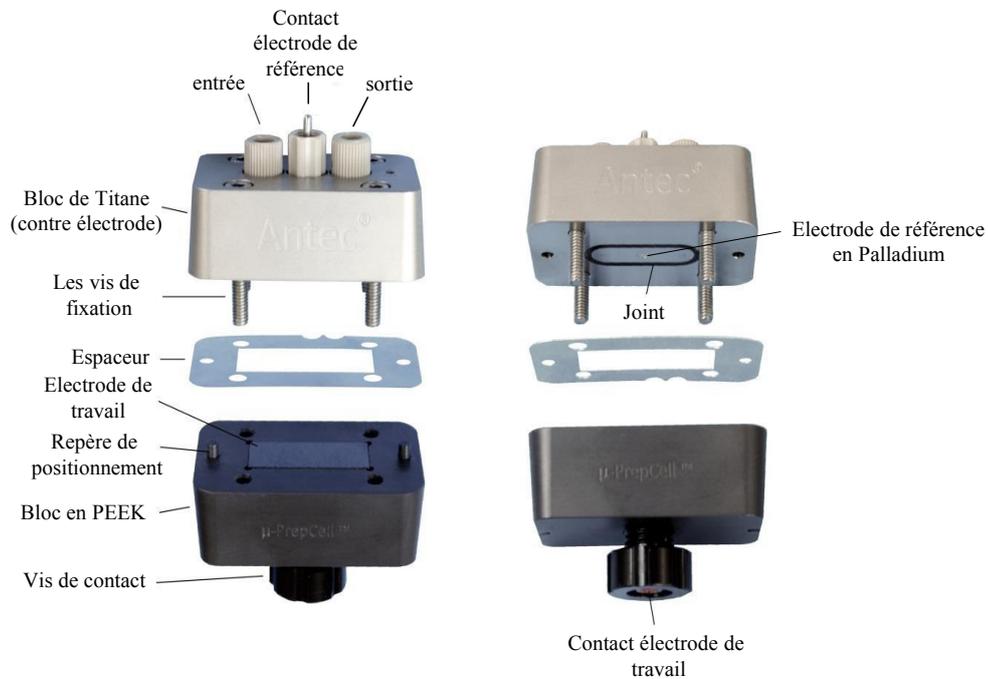


Figure 17 : Vue éclatée d'une cellule électrochimique commerciale à piston de la société Spectrotech (groupe Thermo Scientific<sup>®</sup>).<sup>62</sup>

Ce type de cellule présente de nombreux avantages vis-à-vis des cellules à couche mince (présentées en partie A.3.2.2). En effet, l'ensemble de la cellule étant constitué par un polymère rigide, elle est rarement sujette aux fuites, ce qui permet de travailler à des débits et pressions plus élevés. De plus, avec ce genre de dispositif le taux de conversion électrochimique est plus important, dû à une plus grande interaction entre la surface de l'électrode de travail et la solution électrolytique.

### A.3.2.2 Cellules électrochimiques à couche mince

Ce type de configuration apparaît être le plus simple pour la mise œuvre d'un système électrochimique lors d'expériences hydrodynamiques. La Figure 18 présente une cellule commercialisée par la société Antec® (www.myantec.com) sous le nom de  $\mu$ PrepCell™.



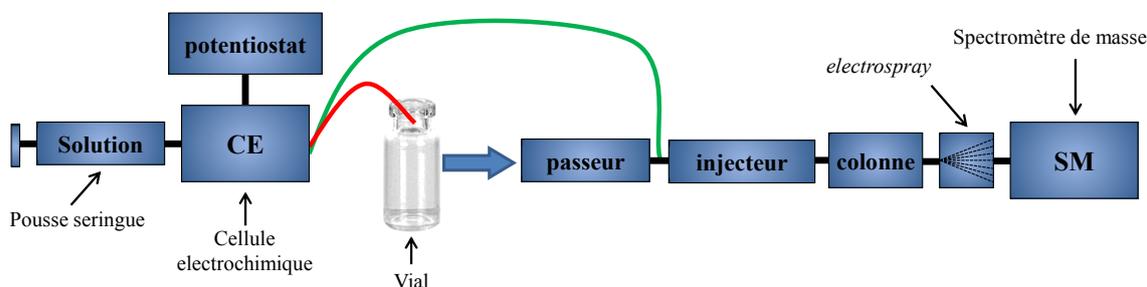
**Figure 18 : Vue éclatée de la cellule électrochimique  $\mu$ PrepCell™ commercialisée par la société Antec®.**<sup>63</sup>

La solution est injectée dans la cellule par le biais d'un capillaire en PEEK afin d'arriver face à l'électrode de travail. Par la suite la circulation de la solution au sein de la cellule s'effectue sous la forme d'une couche mince, guidée à la surface des électrodes. Le volume interne de la cellule est régi par l'utilisation d'espaceurs métalliques qui ne sont pas en contact avec la solution. La proximité spatiale de l'ensemble des électrodes limite le phénomène de chute ohmique.

L'avantage principal de cette cellule est la possibilité d'accéder aux différentes électrodes, ce qui facilite son nettoyage après chaque expérience. De plus, elle offre la possibilité d'utiliser plusieurs types d'électrodes de travail avec différents matériaux tels que l'or, le platine ou bien du carbone diamant dopé bore (« *Boron-Doped Diamond* » BDD). Certains de ces matériaux permettent d'étendre la fenêtre d'électroactivité et ainsi de travailler à des potentiels plus élevés.

### A.3.2.3 Le couplage CE-CL-SM

Ces cellules, qui peuvent être dites de synthèse, sont utilisées pour la production en grande quantité de produit(s) de réaction redox.<sup>64</sup> Une fois les espèces générées et collectées, une séparation par chromatographie liquide suivie d'une détection par spectrométrie de masse assistée d'une ionisation par *electrospray* est réalisée (Figure 19). Toutefois, deux approches expérimentales se distinguent, d'une part la production électrochimique d'échantillon suivie de son analyse par CL-SM, d'autre part l'association directe d'une cellule électrochimique avec le dispositif d'injection de la chromatographie liquide. Ce dernier protocole permet l'automatisation des analyses CE-CL-MS par la connexion du flux en aval de la cellule électrochimique à une boucle d'injection.

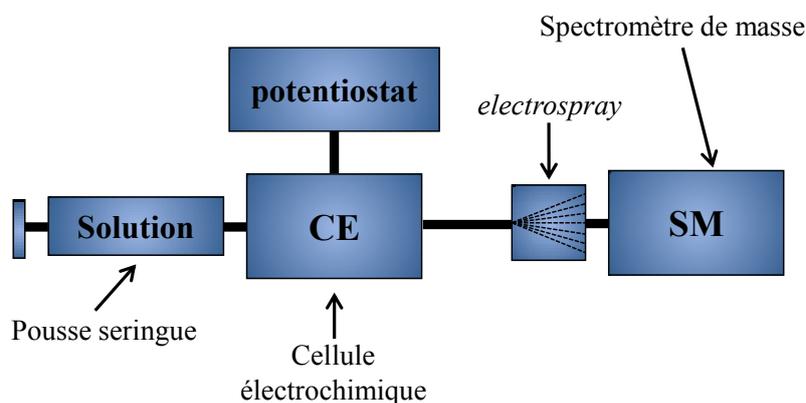


**Figure 19 : Schéma de principe du couplage CE-CL-SM. En rouge, l'association pour l'injection des espèces électro générées se fait par le passeur d'échantillon de la chromatographie liquide. En vert, la sortie de la cellule électrochimique est connectée à la boucle d'injection du chromatographe.**

La première approche (en rouge sur la Figure 19) ne nécessite pas de modification sur l'appareillage de chromatographie liquide. Néanmoins l'utilisation d'une cellule directement connectée en amont du circuit chromatographique peut permettre une automatisation des expériences.

### A.3.2.4 Le couplage CE-SM

L'association CE-SM peut aussi se faire en marge d'une séparation chromatographique. En effet, l'approche dite CE-SM correspond comme son nom l'indique au couplage direct entre le flux sortant du dispositif électrochimique et la source d'ionisation en amont du spectromètre de masse (Figure 20).



**Figure 20 : Représentation schématique du couplage CE-SM.**

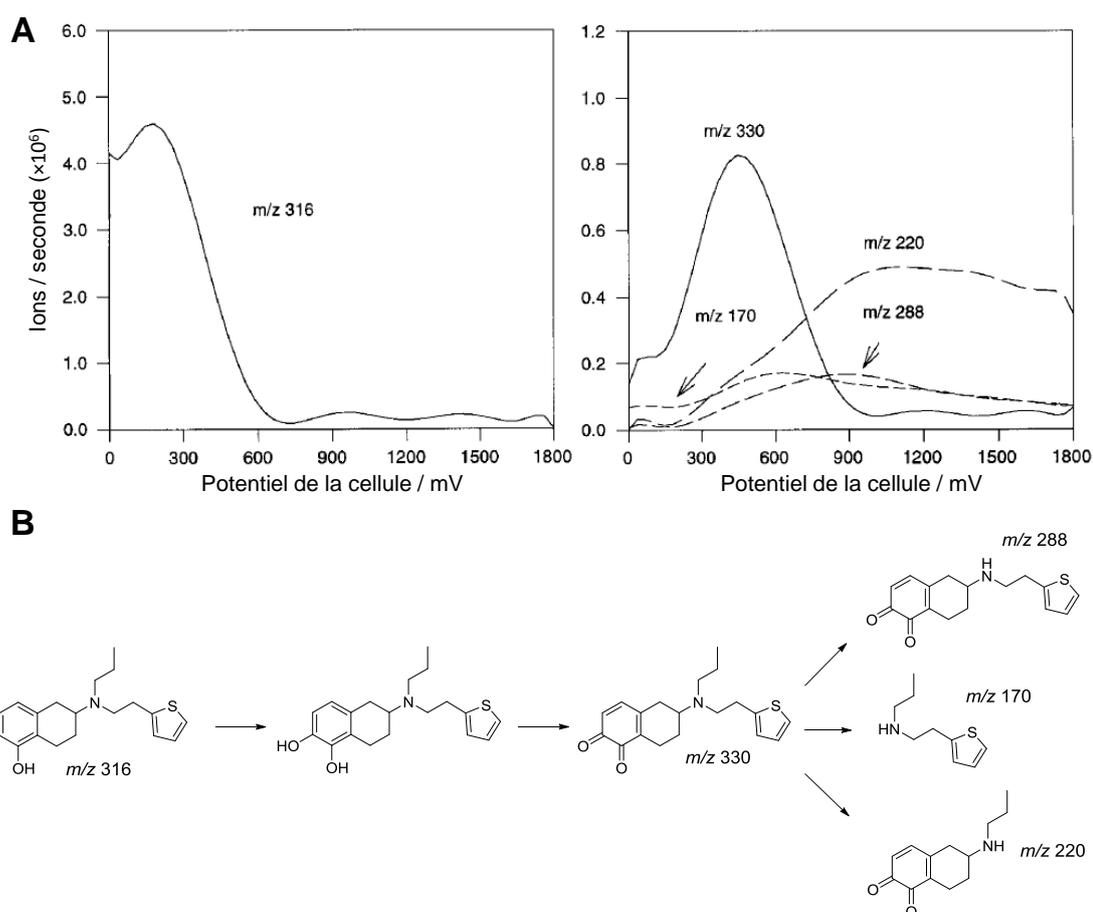
Dans un premier temps, la solution électrolytique circule dans la cellule électrochimique constituée de trois électrodes. Ici, l'élimination de bulles d'air est primordiale afin de limiter les interférences à la surface de l'électrode de travail. Les espèces électrochimiquement générées sont véhiculées par le flux de solution directement vers l'entrée de la source d'ionisation du spectromètre de masse, comme l'indique la Figure 20.

Lors d'une expérience de couplage CE-SM, l'électrode de travail, qui est placée au cœur même de la cellule, peut subir un balayage linéaire lent (typiquement  $2-5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) de potentiel croissant (oxydation), ou décroissant (réduction) induisant ainsi des réactions électrochimiques à l'interface électrode/solution de façon progressive. Les espèces ainsi générées sont ionisées avant que leurs  $m/z$  ne soient mesurés par l'analyseur. Le résultat est l'enregistrement d'un voltampérogramme massique.

La voltampérométrie massique permet, comme la voltampérométrie cyclique, d'observer le comportement électrochimique d'une espèce électroactive en fonction du potentiel appliqué à l'électrode de travail. De plus, l'intérêt majeur de cette technique réside dans la possibilité d'observer de façon quasi-instantanée les espèces générées durant la réaction électrochimique (à la condition que ces espèces générées soient sensibles vis-à-vis de la technique d'ionisation utilisée). Le délai entre la production électrochimique d'analytes et leur détection permet

néanmoins la dégradation des espèces les plus réactives. Ce délai peut être minimisé par l'utilisation de systèmes électrochimiques miniaturisés décrit dans la partie A.3.3. Le couplage direct CE-SM facilite l'interprétation du comportement électrochimique de l'espèce considérée lors d'une réaction électrochimique.

La Figure 21 présente un exemple de voltampérogramme massique généré par le couplage direct CE-SM. Les auteurs ont pu observer et identifier aisément les produits d'oxydation électrochimique du principe actif N-0923.<sup>7</sup>



**Figure 21 :** En (A) voltampérogramme massique pour les  $[M+H]^+$  du principe actif N-0923 (à gauche) et de ses produits d'oxydation (à droite). En (B) bilan de l'oxydation du N-0923 en accord avec les résultats observés en voltampérométrie massique.<sup>7</sup>

Le couplage CE-SM fait ainsi partie des outils de tout premier plan pour l'élucidation mécanistique des réactions induites par un transfert électrochimique. Toutefois, la mise en pratique de ce couplage nécessite des conditions expérimentales adaptées tant à l'électrochimie qu'au spectromètre de masse.

### A.3.2.5 Paramètres expérimentaux

Pour réaliser un couplage CE-SM il est primordial d'établir un compromis sur les conditions expérimentales pour favoriser la mise œuvre de chacune des techniques. La principale contrainte présente dans cette méthodologie est la matrice dans laquelle l'échantillon est placé. La concentration en analyte doit être minimisée afin d'obtenir le meilleur rendement électrochimique tout en produisant une quantité de métabolites suffisantes pour être détectée par ESI-MS. De plus, une concentration excessive en analytes peut engendrer des phénomènes de polymérisation, d'absorption et de passivation d'électrode ainsi qu'une pollution importante du spectromètre de masse. Il en est de même pour la concentration en électrolyte support nécessaire à tous processus d'électrochimie. En effet, pour réaliser une expérience d'électrochimie de bonne qualité, la concentration en électrolyte support doit être suffisamment importante (de l'ordre de 100 mmol.L<sup>-1</sup>) pour limiter le phénomène de chute ohmique et permettre une bonne conversion électrochimique. Cependant, la présence de cet électrolyte en grande quantité dans la solution induit des perturbations lors de l'acquisition des spectres de masse (augmentation du bruit de fond, phénomène de suppression ionique).<sup>10</sup> Usuellement, afin de satisfaire aux exigences des deux techniques, la concentration de travail en électrolyte support est de 20 mmol.L<sup>-1</sup>.

Si les premiers couplages CE-SM ont été rapportés avec l'utilisation d'ionisation *thermospray*, les études les plus récentes rapportent l'utilisation d'une ionisation *electrospray*. Les performances de cette technique d'ionisation sont améliorées lorsque le milieu est protique (formation d'ion [M+H]<sup>+</sup>), mais également grâce à l'utilisation d'un solvant organique volatil afin de faciliter la désolvatation au sein de la source. L'utilisation d'un solvant organique a un autre avantage non négligeable qui est d'améliorer la solubilité des analytes et ainsi limiter le phénomène d'adsorption de molécules organiques à la surface de l'électrode de travail. C'est pourquoi, dans la majorité des cas, on choisira un mélange de solvants (en proportions équivalentes la plupart du temps) eau/acétonitrile, auquel on ajoute un électrolyte support volatil de type acétate d'ammonium (CH<sub>3</sub>-COO<sup>-</sup> ; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) facilement éliminé durant les étapes d'évaporation et d'ionisation de la solution.

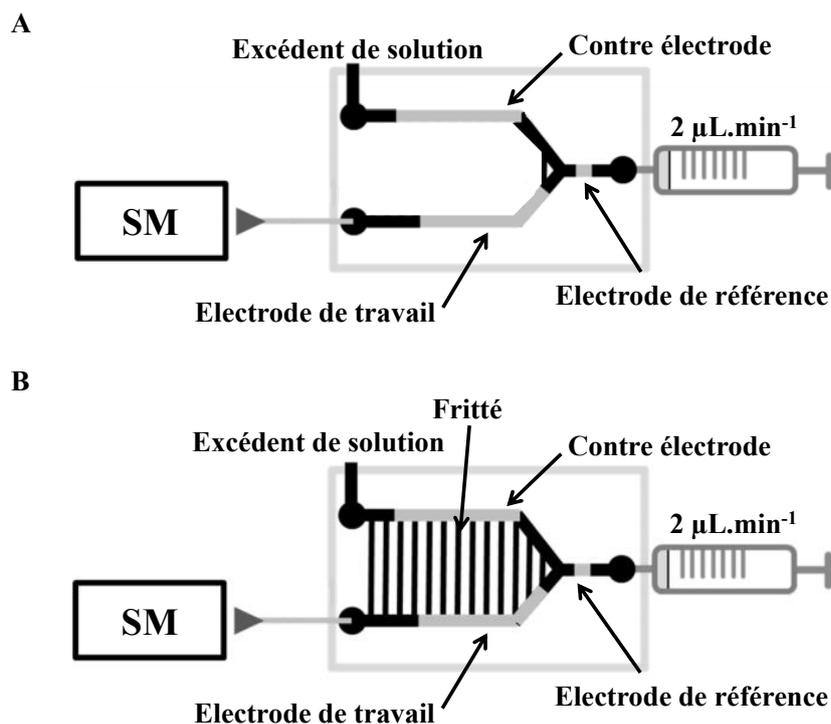
Pour finir, la source d'ionisation par *electrospray* fait intervenir des tensions importantes afin de pouvoir effectuer une bonne ionisation des molécules. C'est pourquoi, lors du couplage direct CE-SM, il est nécessaire de connecter la sortie de la cellule électrochimique à

la prise de terre du spectromètre de masse, afin d'éviter toute réaction électrochimique non souhaitée par action des tensions présentes dans la source d'ionisation.

### A.3.3 Miniaturisation des systèmes (micro-fluidique)

La miniaturisation des dispositifs électrochimiques trouve tout son sens pour les applications du type couplage entre l'électrochimie et une autre technique d'analyse. En effet, l'utilisation de systèmes miniaturisés offre la possibilité de travailler avec une très faible quantité d'échantillon (quelques microlitres).<sup>65</sup> Une récente étude a montré que l'utilisation de systèmes micrométriques réduit de façon drastique le temps de latence entre le processus électrochimique et l'analyse par spectrométrie de masse.<sup>66</sup> De plus, les systèmes utilisant des micro-électrodes possèdent des performances accrues en termes de sensibilité, sélectivité, résolution et reproductibilité.<sup>67</sup>

Odijk *et al.* ont mis au point un dispositif électrochimique basé sur la circulation micro-fluidique d'une solution à la surface du dispositif équipé d'une électrode de platine.<sup>68</sup> Grâce à ce dispositif, lors de l'entrée de la solution, une séparation du flux vers deux canaux est réalisée. Le premier canal guide la solution vers l'électrode de travail où les réactions électrochimiques seront réalisées, tandis que l'autre est connecté à la contre électrode. La sortie des espèces se fait selon deux voies, le flux arrivant de l'électrode de travail est directement envoyé dans le spectromètre de masse, tandis que pour l'autre canal, la solution sortante n'est pas utilisée (Figure 22A). En 2012, Odijk *et al.* proposent l'utilisation de canaux frittés comme connections électrolytiques entre l'électrode de travail et la contre électrode. Ceci permet de réduire le phénomène de chute ohmique et induire une meilleure répartition de l'activité électrochimique à la surface de l'électrode de travail (Figure 22B).<sup>69</sup>



**Figure 22 : Représentation schématique d'une cellule miniaturisée constituée de 3 électrodes sans canaux frittés (A) et avec (B).<sup>66</sup>**

Ce dispositif a permis d'observer le comportement oxydatif de plusieurs entités chimiques telles que l'amodiaquine, la chlorpromazine ou encore la clozapine, auparavant étudiés par un couplage CE-SM conventionnel.<sup>66, 70</sup> De plus, l'utilisation d'un dispositif miniaturisé comme outil de simulation du comportement oxydatif induit par les cytochromes P450 a été validé par l'étude de l'oxydation électrochimique sur électrode de platine de la procaïnamide.<sup>71</sup>

### A.3.4 Application des couplages CE-(CL-)SM

La forte complémentarité entre l'électrochimie, la chromatographie et la spectrométrie de masse contribue à l'ouverture d'un important champ d'applications. Cette partie présentera un aperçu non exhaustif des principales applications, à savoir :

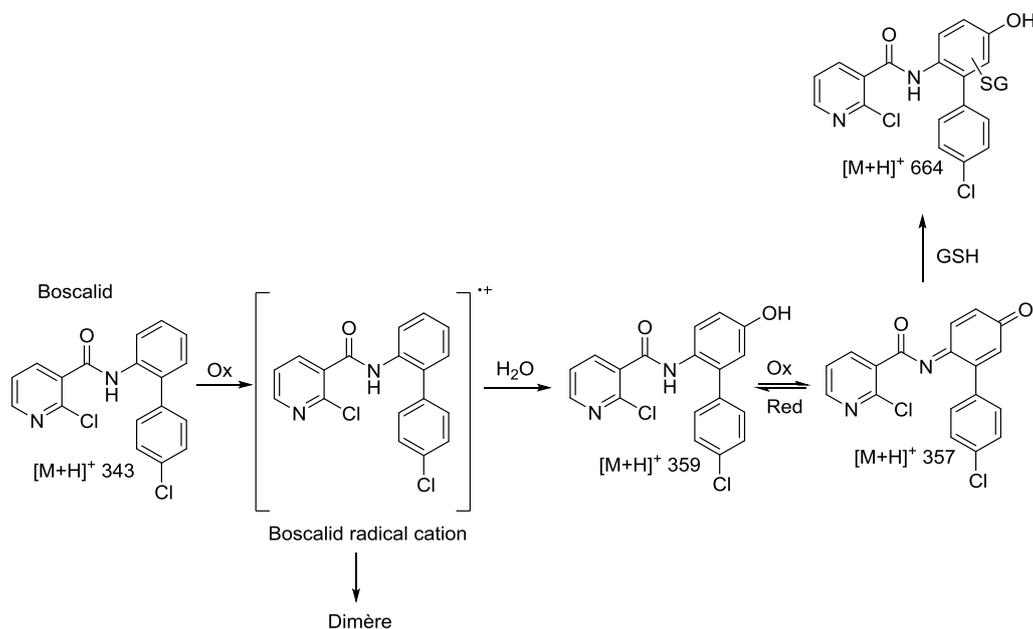
- Simulation des dégradations de polluants émergents dans l'environnement
- Etude structurale de biomolécules
- Simulation du métabolisme oxydatif et réductif de xénobiotiques induit par le CYP450

### A.3.4.1 Simulation des dégradations de polluants émergents dans l'environnement

Une grande variété de contaminants de type organique est présente dans l'environnement. Ces polluants peuvent induire une toxicité sur l'environnement et la santé humaine. Ils peuvent être présents dans l'air, les sols, les eaux usées, les organismes aquatiques vivants et sont généralement issus de l'industrie, de pesticides ou bien de produits ménagers ou de médicaments. Toutefois, l'identification de ces contaminants est difficile en raison de la grande variété de leurs compositions chimiques et de leurs propriétés physico chimiques, combinée à la complexité des matrices environnementales. C'est pourquoi l'utilisation de techniques d'analyses sophistiquées, telles que la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse (en tandem ou à haute résolution), permettent respectivement des analyses qualitatives ou quantitatives. Toutefois, il est important de comprendre comment ces polluants organiques se comportent et interagissent dans et avec l'environnement. En effet, ces polluants émergents sont sujets à de multiples dégradations au travers de réactions d'hydrolyses chimiques, réactions photocatalysées ou dégradations biologiques (par des microorganismes ou organismes vivants). Ces dégradations peuvent éventuellement conduire à la formation d'espèces toxiques mais surtout à la transformation du polluant en une espèce inconnue et donc impossible à traquer. C'est ici qu'intervient l'électrochimie pour sa capacité à simuler les réactions initiées par un transfert mono-électronique. En effet, si l'électrochimie a récemment été développée pour sa capacité à simuler les réactions du CYP450 initiées par le transfert d'un électron seul (détaillé en partie A.3.4.3), peu d'exemples se sont consacrés à la simulation des dégradations de polluants émergents dans l'environnement.

En 2009, Lohmann *et al.* décrivent la simulation des dégradations d'un pesticide, le boscalid (2-chloro-N-(4'chlorobiphenyl-2-yl)-nicotinamide).<sup>72</sup> Les auteurs ont mis en évidence la formation d'une espèce réactive toxique de type quinone imine durant la dégradation électrochimique du boscalid.<sup>41</sup> Afin d'évaluer la réactivité du produit de dégradation quinone imine, deux expériences électrochimiques ont été successivement réalisées. Dans un premier temps, le boscalid subit une oxydation électrochimique (sous potentiel contrôlé) qui aboutit à la formation de l'espèce réactive quinone imine. La solution passe ensuite dans une seconde cellule électrochimique qui entraîne la réduction de la quinone imine en phénol amide correspondant, ce qui permet de vérifier que l'espèce quinone imine est engagée dans un processus réversible. Dans un second temps, le piégeage de la quinone imine par réaction avec le glutathion et formation de l'adduit a confirmé la nature électrophile

du produit d'oxydation (Figure 23). Ces résultats mettent en lumière l'intérêt d'utiliser le couplage CE-(CL-)SM pour la simulation de la dégradation d'espèces organiques dans l'environnement, en particulier pour la formation d'espèces réactives quinones imines.



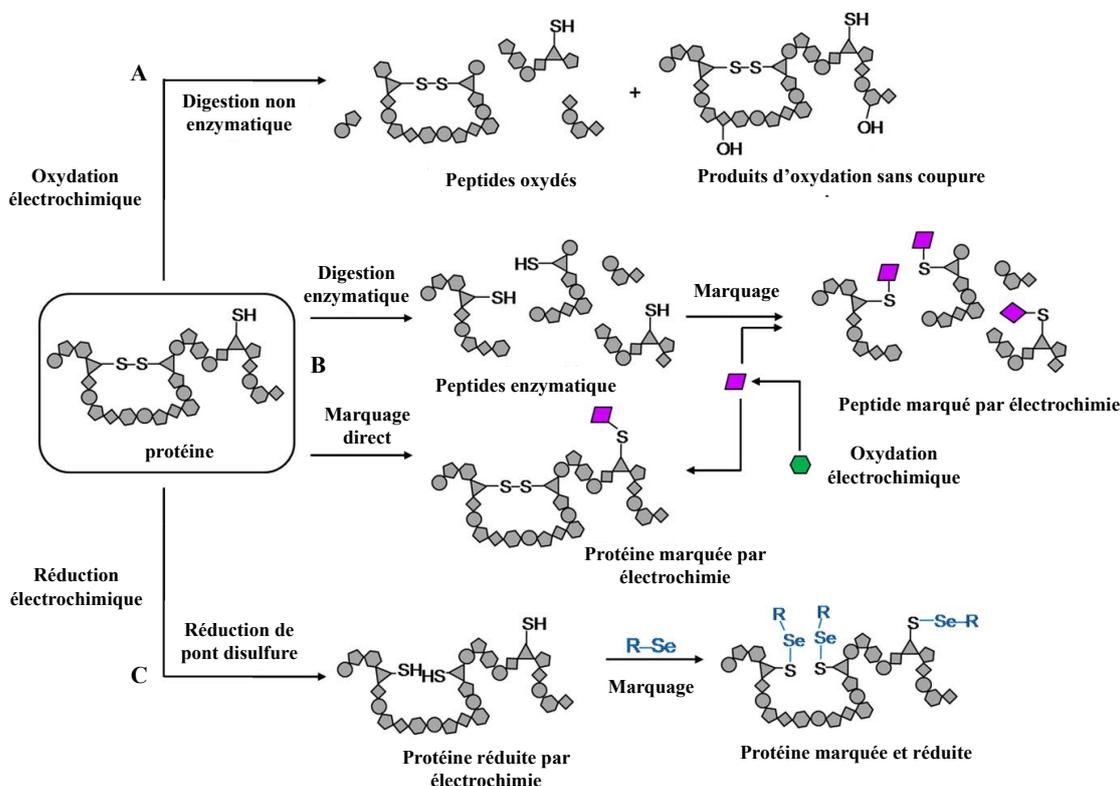
**Figure 23 : Mécanisme de dégradation oxydative du boscalid à potentiel contrôlé.<sup>72</sup>**

C'est en 2012 qu'une étude réalisée par le groupe de Küppers s'est focalisée sur la compréhension de l'interaction covalente entre polluants organiques et matière organique végétale. Il s'agissait ici de modéliser la rétention de polluants émergents et leurs possibles produits de dégradation dans la matrice organique qui les contient.<sup>43</sup> En effet, selon le xénobiotique considéré, il se peut que seuls les produits de dégradation se lient aux composants bioorganiques environnementaux. Ainsi, avec l'identification de ces produits liés de manière covalente à la matrice organique, il est possible d'en déduire le type d'interactions mises en œuvre et donc d'élucider le mécanisme de dégradation du xénobiotique considéré dans l'environnement. Pour ce faire, les auteurs proposent quatre molécules modèles (catéchol, acide phtalique, glutathion et histidine) pour une représentation optimale des fonctions chimiques de l'humus (couche supérieure du sol créée et entretenue par la décomposition de la matière organique) décrite par Stevenson.<sup>73</sup>

### A.3.4.2 Investigation de biomolécules

Lors de l'étude du métabolisme ou de la modification d'une biomolécule par l'utilisation d'un système enzymatique, des étapes fastidieuses (incubation, extraction) sont nécessaires.

L'électrochimie permet de s'affranchir aisément de ces différentes étapes par la génération rapide d'échantillons dans une matrice simple. Les applications les plus courantes sont : la réduction de ponts disulfures, le marquage d'acides aminés par le biais de composés électrochimiques générés et la digestion non enzymatique de protéine, comme l'indique la Figure 24.



**Figure 24 : Différentes applications du couplage CE-(CL)-SM pour l'étude de biomolécules. En (A) et (C) par des réactions électrochimiques et en (B) par voie enzymatique.<sup>9</sup>**

#### A.3.4.2.1 Oxydation électrochimique : digestion non enzymatique

De nos jours, l'identification structurale d'une protéine se fait généralement par la combinaison de digestions chimiques ou enzymatiques de la macromolécule. La digestion consiste en la rupture de liaisons peptidiques (liaison covalente entre une fonction carboxyle portée par le carbone en  $\alpha$  d'un acide aminé et la fonction amine portée par le carbone en  $\alpha$  de l'acide aminé suivant dans la chaîne peptidique). Lors du séquençage de la protéine, le choix de l'enzyme permettant le clivage (rupture de liaison) est primordial. En effet, l'utilisation de l'enzyme appropriée permet de mettre en œuvre des clivages spécifiques. Par la suite, une analyse par spectrométrie de masse des peptides générés lors de la digestion permet un séquençage précis de la protéine mise en jeu.<sup>74</sup>

Dans les années 2000, Permentier *et al.* ont rapporté une étude sur le clivage électrochimique de liaisons peptidiques par oxydation sur une électrode de carbone poreux.<sup>75-</sup>  
<sup>76</sup> Pour cette étude une cellule électrochimique commerciale (ESA<sup>®</sup> 5020) a été employée et connectée directement avec le spectromètre de masse. Les auteurs ont pu observer que l'oxydation électrochimique d'un peptide est sélective vis-à-vis de la présence de tyrosine ou de tryptophane dans un peptide. Néanmoins, des réactions secondaires conduisant à des réactions d'oxydation (oxygénation) de la protéine sans clivage engendrent un mélange de produits qui peuvent nuire au séquençage de la biomolécule étudiée. De plus, les rendements d'oxydation électrochimique d'une protéine sont intimement liés à la taille de cette dernière. En effet, les meilleurs rendements d'oxydation ont été observés pour des macromolécules de petite taille (moins de 5 kDa). L'inactivité de certains peptides présents dans des macromolécules de grande taille s'explique par leur inaccessibilité au sein de la macromolécule par gêne stérique. Plus la molécule est grande plus les réactions de transfert électronique à la surface de l'électrode sont défavorisées et le clivage électrochimique de la biomolécule inhibé.

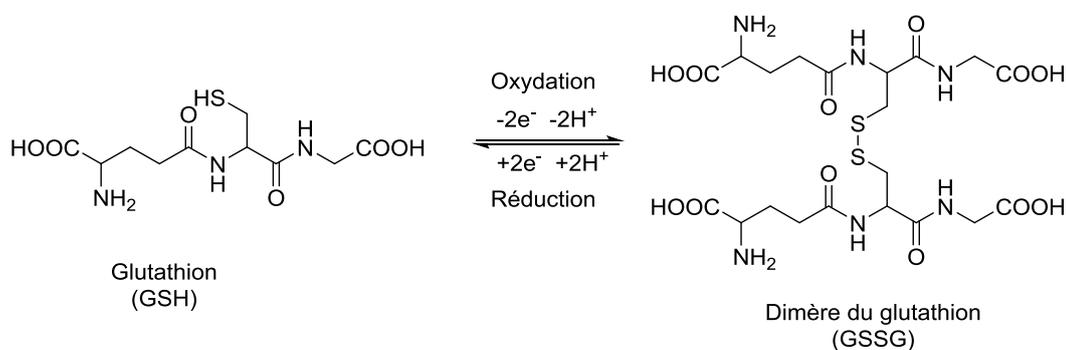
Les récentes optimisations du couplage CE-(CL-)SM menées par le groupe de Permentier ont permis une amélioration significative. Les auteurs ont rapporté un clivage maximum de 80% de la quantité de peptides introduits en milieu acide (pH 1,9-3,1) à des potentiels élevés pour une macromolécule présentant un encombrement stérique modéré.<sup>77</sup> Cette étude a également mis en avant l'influence de la position des acides aminés dans la macromolécule sur les réactions chimiques secondaires survenant après la première étape d'oxydation.

Les rendements d'oxydation électrochimique sont moins importants que pour les digestions enzymatiques ou chimiques. En effet, les réactions dites secondaires, qui n'impliquent pas de coupure, ainsi que la taille des protéines mises en jeu sont des facteurs limitants. Toutefois, la rapidité, la forte sélectivité, ainsi que la facilité de mise en œuvre du couplage CE-(CL-)SM, font de cette association une méthode très prometteuse pour l'étude de la digestion de protéines.

#### A.3.4.2.2 Réduction électrochimique de pont disulfures

La combinaison CE-(CL-)SM est une technique puissante pour l'étude de réactions de réduction électrochimique de biomolécules. Par exemple, elle trouve tout son intérêt dans l'étude de la réduction de ponts disulfures.<sup>78</sup> Les ponts disulfures sont présents dans les

macromolécules telles que les protéines. Ces liaisons covalentes entre deux atomes de soufre (S-S) réduisent le rendement de clivage des protéines lors de leur digestion, rendant l'analyse du séquençage des acides aminés par SMSM moins sensible. Les principales études concernant la réduction de pont disulfures ont été rapportées sur le dimère du glutathion (Figure 25) et de l'insuline.<sup>79</sup>



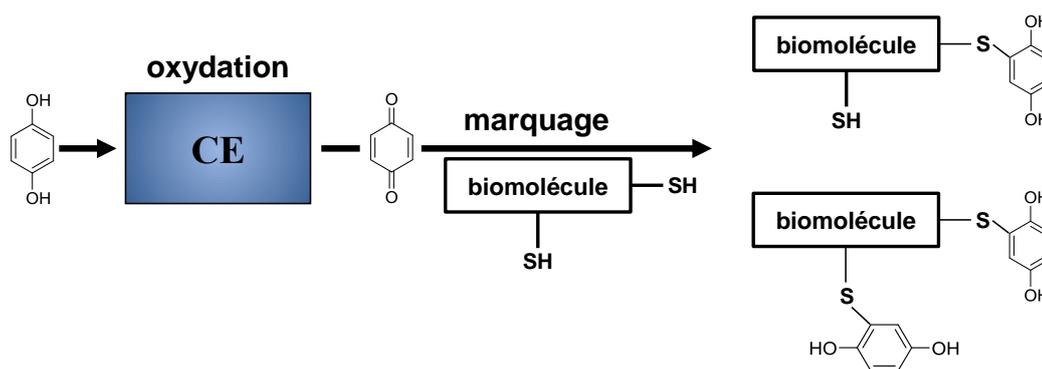
**Figure 25 : Réaction d'oxydation/réduction du glutathion et de son dimère.**

Les auteurs présentent la combinaison d'une cellule électrochimique en flux (cellule en couche mince) avec une source d'ionisation par désorption suivie d'une ionisation par *electrospray* (*Desorption ElectroSpray Ionisation* « *DESI* »). L'intérêt majeur d'un tel couplage réside dans la possibilité d'interrompre à tout instant la réduction électrochimique des ponts disulfures, ce qui permet d'observer rapidement les ponts disulfures qui sont mis en jeu dans chacun des fragments générés lors de la digestion d'une protéine.<sup>80-81</sup>

La réduction électrochimique des ponts disulfures conduit à la libération de deux nouvelles fonctions thiols libres, permettant par la suite un marquage plus efficace de ces fonctions.

#### A.3.4.2.3 Marquage par des composés générés électrochimiquement

Le marquage sélectif des acides aminés d'un peptide peut être employé pour l'élucidation du séquençage d'un polypeptide. Le piégeage d'espèces électrophiles électrochimiquement générées par des fonctions thiols est très largement employé pour l'identification des espèces les plus réactives. De plus, cette forte affinité peut être exploitée pour le marquage sélectif de peptides contenant une ou plusieurs fonctions thiols (Figure 26).



**Figure 26 :** Schématisation de l'oxydation électrochimique de l'hydroquinone et de son utilisation pour le marquage des fonctions thiols de biomolécules.

En 2004, Roussel *et al.* rapportent le marquage de fonction thiols par addition de Michael sur une benzoquinone.<sup>61</sup> Dans cette étude, les auteurs se basent sur l'oxydation inhérente à l'ionisation par *electrospray* de l'hydroquinone en *para*-benzoquinone. La *para*-benzoquinone possède un caractère électrophile qui conduit à sa réaction spontanée avec les biomolécules thiolées. Cette réaction entre une entité nucléophile (fonction thiols) et la *para*-benzoquinone conduit à la formation d'une liaison covalente et à l'observation d'un adduit entre l'agent nucléophile et la benzoquinone. Plusieurs molécules de la famille de la benzoquinone ont été étudiées, telles que la 2-méthoxy-benzoquinone, la 2-méthyl-benzoquinone, la 2-carboxyméthyl-benzoquinone ou bien encore la 2-nitro-benzoquinone. Les meilleurs résultats en termes de marquage des fonctions thiols sont attribués à la 2-carboxyméthyl-benzoquinone (marquage jusqu'à trois fonctions thiols sur un même peptide). Des travaux complémentaires de la même équipe ont permis de mettre en avant l'intérêt de la réduction des ponts disulfures avant l'étape de marquage. En effet, l'ouverture de ce pont fait apparaître deux nouvelles fonctions thiols et donc deux nouvelles positions de marquage possibles.<sup>82</sup>

Très récemment, l'équipe de Karst a mis en avant la possibilité de quantifier le nombre de fonctions thiols présentes dans une macromolécule par réactions de ces dernières avec des espèces intermédiaires réactives générées électrochimiquement.<sup>83-85</sup> L'utilisation d'espèces marquées par des atomes de deutérium ( $^2\text{H}$ ) a également permis de mieux comprendre le phénomène d'addition de Michael entre l'espèce électrophile et la fonction thiol. L'efficacité de leur dispositif a été démontrée avec des rendements quasi-quantitatifs (rendement dépendant de l'espèce intermédiaire réactive).

### A.3.4.3 Simulation du métabolisme *in vivo* de xénobiotiques

De nos jours, les organismes vivants sont de plus en plus exposés à la présence de xénobiotiques. L'exposition des bio-organismes aux polluants environnementaux tels que des principes actifs pharmaceutiques, ou des pesticides est en constante croissance. C'est pourquoi de nombreuses études se sont focalisées sur la compréhension du devenir de ces xénobiotiques lors de leur absorption, volontaire ou non, dans un organisme. La toxicité observée pour ces polluants peut être due non seulement au xénobiotique, mais également à ses produits de dégradation.

Le devenir des xénobiotiques au sein de l'organisme vivant se résume à quatre étapes bien distinctes : Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion (ADME).<sup>3</sup> La première étape d'absorption correspond au passage des xénobiotiques au travers des membranes biologiques vers la circulation systémique. Une fois que les xénobiotiques sont présents dans la circulation systémique, ils sont distribués vers les organes cibles (étape de distribution). Ensuite le métabolisme consiste en l'augmentation de la polarité des xénobiotiques afin de faciliter leur excrétion de l'organisme comme l'indique la Figure 27.

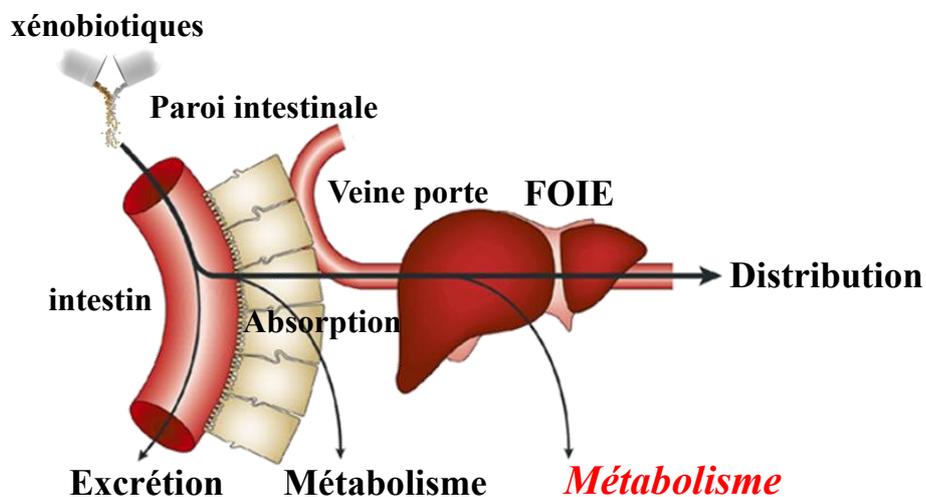
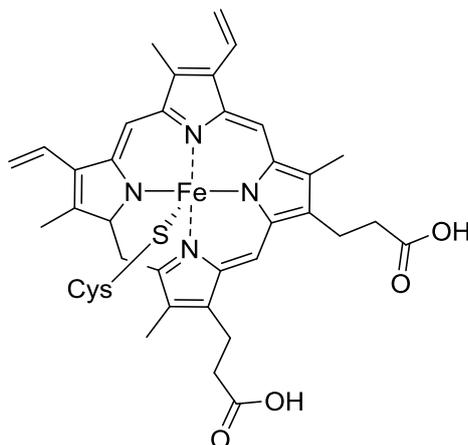


Figure 27 : Schématisation du devenir *in vivo* d'un xénobiotique dans l'organisme.

Les transformations subies par les xénobiotiques se passent en priorité dans le foie et font intervenir des réactions d'oxydation, de réduction ou de conjugaison. Les enzymes responsables de ces transformations sont majoritairement de la famille des cytochromes P450 (CYP450), ce qui fait de celui-ci l'acteur majeur du métabolisme *in vivo* des xénobiotiques.

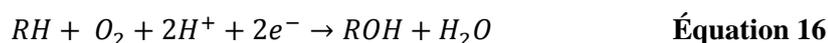
### A.3.4.3.1 Le cytochrome P450

Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines (protéine ayant un hème pour cofacteur). Le terme P450 correspond au maximum d'absorption (450 nm) de la porphyrine de Fer. L'atome de Fer(III) est chélaté par quatre atomes d'azote d'une porphyrine et un thiol (cinquième ligand) (Figure 28).



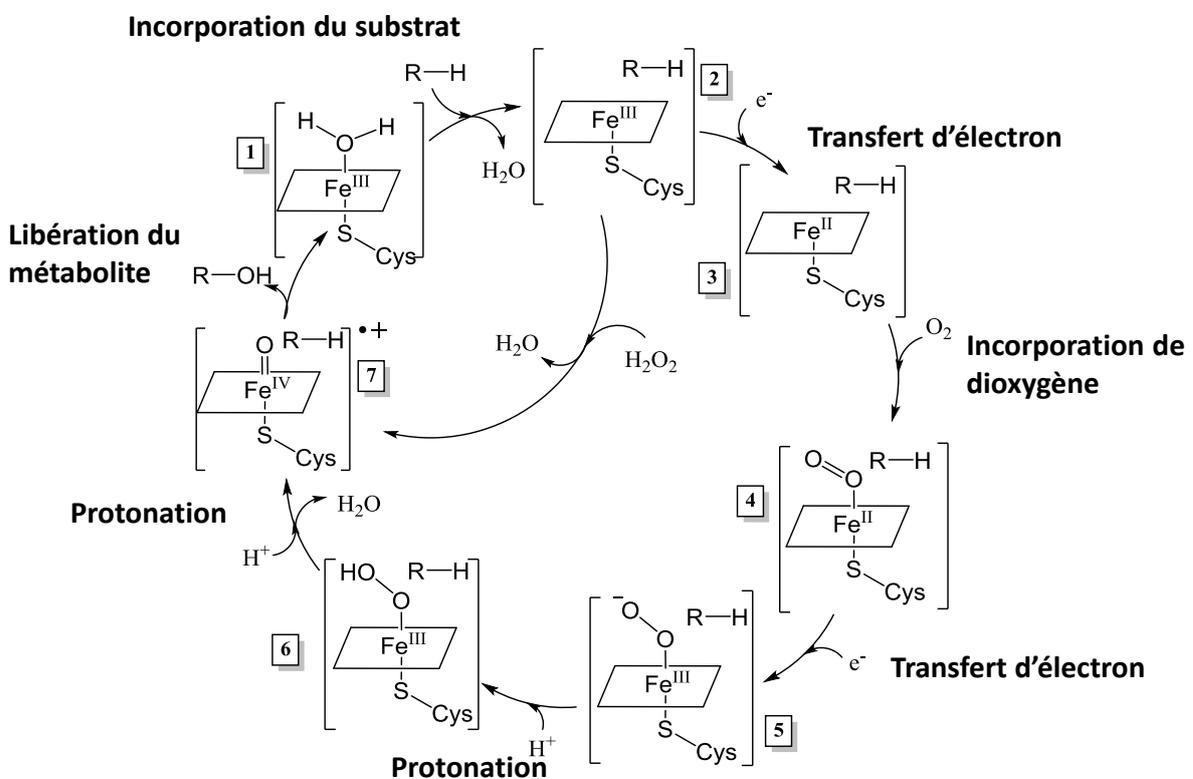
**Figure 28 : Représentation de la métalloporphyrine de fer constituant le centre actif du cytochrome P450.**

La réaction la plus couramment catalysée par le CYP450 correspond à une activité de monooxygénase. Cette réaction permet l'insertion d'un atome d'oxygène issu du dioxygène sur un substrat organique (RH), aboutissant à la formation du métabolite ROH, tandis que l'autre oxygène est réduit en H<sub>2</sub>O (Équation 16). Lors de ce processus redox, deux électrons et deux protons sont mis en jeu.<sup>86</sup>



Le cycle catalytique du cytochrome P450 peut être divisé en sept étapes différentes (Figure 29). La première étape est l'incorporation du substrat RH en position axiale vis-à-vis de l'atome de Fer sur l'espèce ferrique hexacoordinée [1]. L'incorporation du substrat provoque le départ du ligand *aqua* et la formation d'un complexe ferrique pentacoordiné [2]. La liaison du substrat provoque un abaissement du potentiel redox, ce qui favorise le transfert d'électron à partir de son partenaire redox. La seconde étape consiste donc en un transfert mono-électronique réduisant le Fe(III) à l'état ferreux Fe(II) [3]. L'étape suivante est l'entrée d'une molécule de dioxygène dans la sphère de coordination de l'atome de Fe(II). La formation d'une liaison avec un atome d'oxygène conduit à un réarrangement lent pour

former le complexe oxyferreux [4]. Ce complexe s'avère être le dernier intermédiaire relativement stable dans ce cycle. Par la suite, un second transfert mono-électronique intervient afin de former un intermédiaire péroxoferrique [5]. Cet intermédiaire anionique est rapidement protoné pour aboutir à l'intermédiaire hydroperoxoferrique [6]. De là s'en suit une seconde protonation, immédiatement suivie par l'élimination d'une molécule d'eau, donnant naissance à l'ion oxoferryle [7]. Ce dernier réagit alors avec le substrat, libérant ainsi un équivalent oxygéné (ROH). Une fois le substrat libéré l'enzyme se réengage dans son cycle catalytique grâce à une liaison avec une molécule d'eau.



**Figure 29 : Représentation du cycle catalytique induit par le cytochrome P450.**

Le cytochrome P450 joue ainsi un rôle central dans le métabolisme de substrats à travers deux types de réactions. En effet, les transformations induites par le cytochrome P450 peuvent être initiées soit par le transfert d'électron seul (SET), soit par le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT).

### A.3.4.3.2 Le métabolisme

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent au sein d'un être vivant pour lui permettre de se maintenir en vie, se reproduire et également répondre aux stimuli de son environnement. Le métabolisme *in vivo* des xénobiotiques peut être divisé en deux phases (I et II). La phase I regroupe l'ensemble des transformations chimiques principalement induites par les cytochromes P450, mais également par les glucuronosyltransférases et les glutathion S-transférases. Ces modifications chimiques font généralement intervenir des oxydations, clivage de liaison(s) hétéronucléaire(s), incorporation(s) d'oxygène(s). Tandis que la phase II est définie par des conjugaisons entre des molécules hydrophiles et le composé chimique afin de faciliter le franchissement des parois biologiques et son excrétion de l'organisme. Dans le métabolisme *in vivo*, les entités responsables de la détoxification sont généralement le glutathion (tripeptide, formé par condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine), le phosphoadenosine-5-phosphosulfate ou l'acide uridine-diphosphate-glucuronique.

La Figure 30 présente un aperçu du parcours d'un xénobiotique au sein de l'organisme au travers des différentes phases de son métabolisme. En effet, durant le parcours d'un xénobiotique dans l'organisme plusieurs chemins peuvent s'offrir à lui : soit il peut être directement distribué sur son site d'activité thérapeutique, puis excrété, soit le xénobiotique est métabolisé en métabolites stables, qui seront ensuite excrétés, soit il est métabolisé en une ou plusieurs espèces instables, qui peuvent endommager l'organisme par le biais de liaisons covalentes avec des biomolécules.

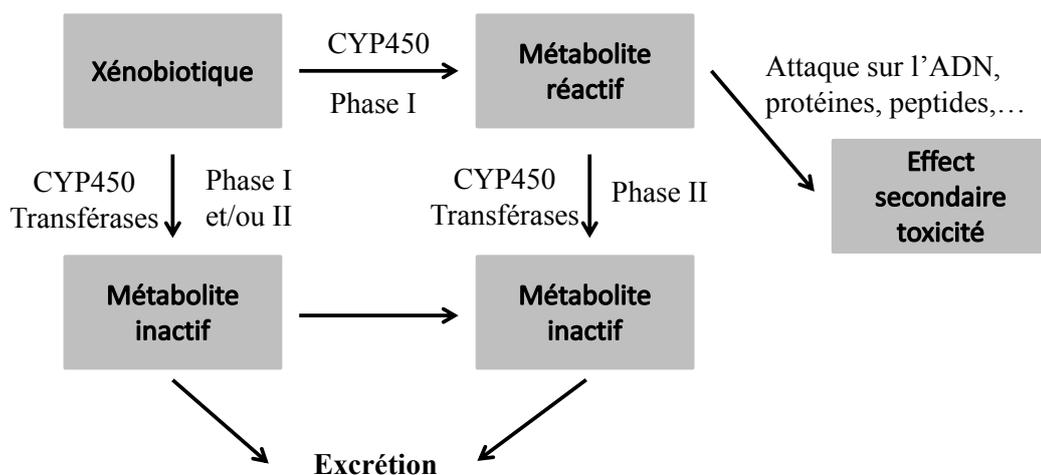


Figure 30 : Schématisation des différentes phases du métabolisme *in vivo* d'un xénobiotique.

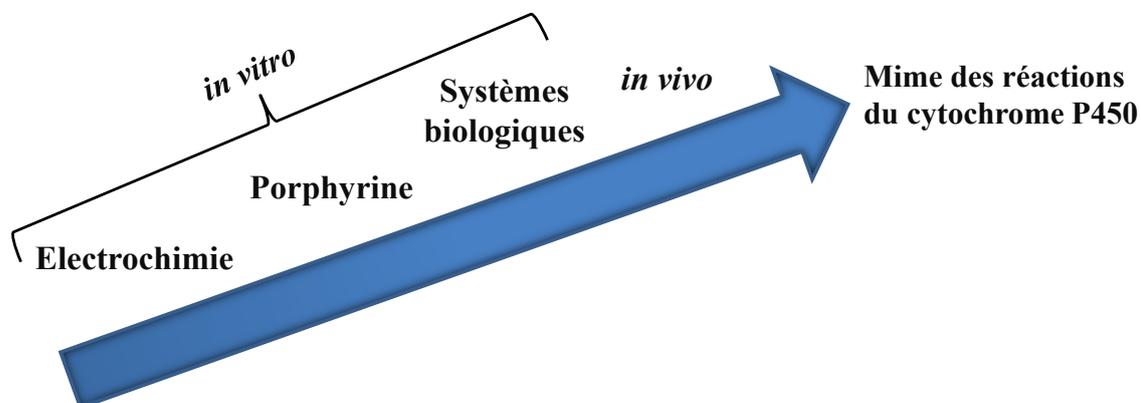
D'un point de vue sociétal, la compréhension ainsi que la simulation du métabolisme *in vivo* des xénobiotiques offre plusieurs intérêts majeurs. En effet, ceci permet d'anticiper la formation d'espèces réactives toxiques durant le développement de candidats médicaments, mais également d'augmenter la biodisponibilité des principes actifs en diminuant leur métabolisation.

Concernant l'aspect économique, la simulation du métabolisme d'un xénobiotique peut permettre d'éliminer rapidement des candidats inappropriés et donc limiter les coûts de développement, et des essais *in vivo* et cliniques souvent très onéreux.

#### A.3.4.3.3 Outils de simulation du métabolisme *in vivo*

Lors du développement d'un nouveau principe actif pharmaceutique, l'étape d'élucidation de son métabolisme est primordiale. En effet, si la formation de métabolites inactifs ou toxiques est observée, ceci conduit dans la majorité des cas à la modification de sa structure chimique.<sup>5</sup>

Les principaux outils de simulation du métabolisme *in vivo* des xénobiotiques sont présentés par la Figure 31.



**Figure 31 : Différents outils possibles pour la simulation du métabolisme *in vivo* de xénobiotiques induit par le cytochrome P450.**

L'utilisation de systèmes biologiques (typiquement un organe perfusé) est un outil très efficace pour simuler le métabolisme oxydatif *in vivo* de xénobiotiques. Toutefois, pour une étude à haut débit, cette approche connaît quelques limitations. Ce modèle souffre d'une mauvaise reproductibilité et l'activité biologique de tels systèmes est limitée dans le temps (seulement quelques heures). Une partie des inconvénients de cette approche peut être contournée en utilisant par exemple des coupes de foie perfusé. Cette méthodologie, qui

débute au XX<sup>ème</sup> siècle, fût progressivement remplacée par l'utilisation de cellules de foie (hépatocytes).

Les hépatocytes possèdent les mêmes capacités de simulation que les coupes de foie. De plus, leur stockage par cryogénéisation permet leur commercialisation sans perte d'activité métabolique.<sup>5</sup> Cependant, l'expression des enzymes hépatiques telles que le CYP450 est sujette à de fortes variations interindividuelles. C'est pourquoi l'utilisation d'un mélange d'hépatocytes permet de limiter les variations possibles. Les nombreux avantages qu'offrent les fractions cellulaires hépatiques tels que, leur facilité d'utilisation, une bonne reproductibilité et leur bonne conservation à long terme (congélation à très basse température), font d'eux l'outil privilégié pour ce genre d'étude. Toutefois, les microsomes étant issus d'organismes vivants, la complexité des matrices générées, ainsi qu'une synthèse à plus grande échelle fastidieuse font partie des inconvénients majeurs de cette approche. C'est pourquoi, depuis quelques années, des études rapportent l'utilisation d'outils n'impliquant pas l'utilisation de systèmes biologiques, tels que les porphyrines, l'électrochimie ou les systèmes *in silico*.<sup>1, 50-51, 87-90</sup>

L'utilisation de porphyrines pour la simulation de réactions catalysées par le cytochrome P450 offre l'avantage d'obtenir une matrice d'échantillon bien moins complexe qu'avec un système biologique. La majorité des études rapportant l'utilisation de porphyrines l'ont été avec des porphyrines de Fer (analogie avec le centre actif du CYP450), bien que d'autres ions métalliques tels que le Manganèse, le Ruthénium ou le Cobalt aient été étudiés.<sup>55, 87, 91</sup> Lors de la réaction entre le xénobiotique et la porphyrine, cette dernière peut être régénérée par du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et ne fait donc pas intervenir de composante biologique. D'un point de vue pratique les porphyrines apparaissent tout à fait adaptées pour simuler le métabolisme *in vivo* de xénobiotiques.<sup>88</sup> Cependant, la porphyrine impliquée dans le cytochrome P450 est liée à une protéine par une liaison thiol ce qui lui confère sa sélectivité biologique. Ceci implique que toutes les réactions induites par la porphyrine (en solution ou sur une électrode) ne seront pas forcément réalisées par un cytochrome P450, et inversement.

En ce qui concerne l'électrochimie, son utilisation comme outil de simulation du métabolisme connaît un intérêt toujours grandissant.<sup>7-8, 10, 39, 50</sup> Le développement technologique des couplages CE-(CL-)SM permet la mise en œuvre d'expériences en ligne par le biais de cellules de faible volume interne (quelques µL) qui facilite les couplages directs avec un spectromètre de masse. Durant ces dix dernières années, un nombre important

d'études ont mis en avant l'intérêt des couplages CE-(CL-)SM pour la génération, la séparation et l'identification de produits issus de la dégradation de xénobiotiques, dans l'objectif de simuler l'action du cytochrome P450.<sup>27, 91</sup>

La partie qui suit présente les principales réactions d'oxydation et de réduction induites par le cytochrome P450, et que l'outil électrochimique peut simuler de façon directe ou indirecte. Un soin particulier sera attaché à l'identification et la caractérisation des métabolites réactifs.

### A.3.4.3.4 Réactions d'oxydation électrochimique directe

#### A.3.4.3.4.1 Désalkylation d'hétéroatomes

La désalkylation d'hétéroatomes implique une réaction d'hydroxylation du carbone situé en  $\alpha$  d'un hétéroatome. Cette étape d'hydroxylation engendre la formation d'une espèce instable qui conduit à la rupture de la liaison entre le carbone et l'hétéroatome. Ces réactions de désalkylation sont catalysées par le cytochrome P450 et peuvent être initiées soit par le transfert d'un électron seul (SET), soit par le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT) comme l'indique la Figure 32.

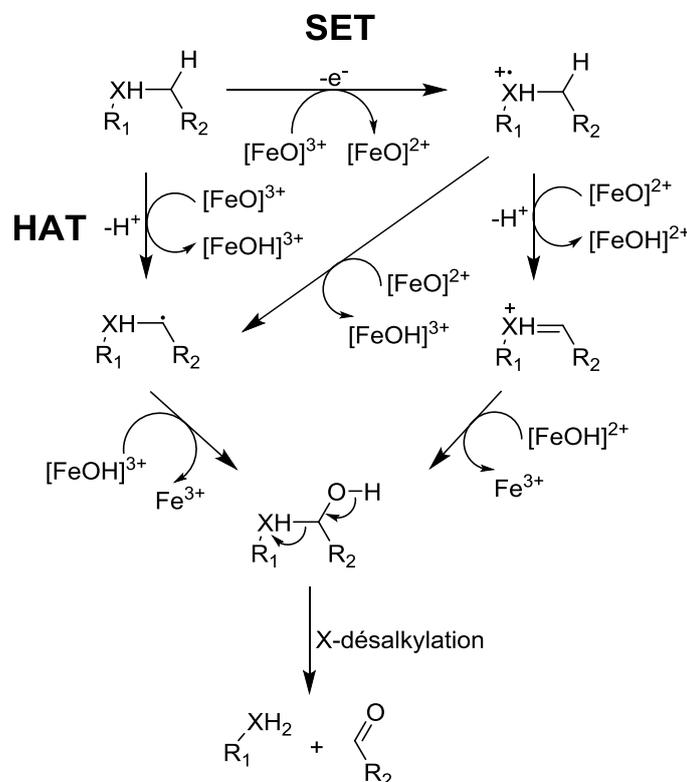


Figure 32: Mécanisme de X-désalkylation initié soit par le transfert d'un électron seul (SET), soit par le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT).<sup>8</sup>

Des études impliquant des mesures d'effet isotopique ont montré que les réactions de désalkylation catalysées par le cytochrome P450 et impliquant certaines fonctions chimiques telles que les amines,<sup>92</sup> les amides,<sup>93</sup> ou les éthers aromatiques,<sup>94</sup> sont initiées par le transfert d'un électron seul.<sup>95</sup>

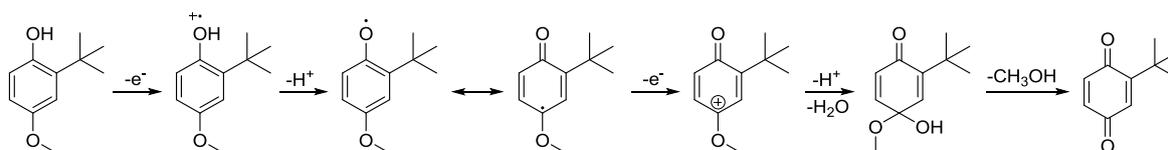
Le groupe de Jurva *et al.* rapporte une étude comparative entre l'oxydation électrochimique et l'activité du cytochrome P450 en vue de mettre en lumière la capacité de simulation de l'outil électrochimie.<sup>10</sup> Les auteurs ont clairement présenté le mécanisme de N-désalkylation induit par électrochimie et celui-ci correspond bien à la voie empruntée par le cytochrome P450, initiée par la voie SET (Figure 32 partie SET, en remplaçant le X par N).

En 2007, Johansson *et al.* ont étudié le métabolisme oxydatif du métoprolol par différentes voies (électrochimie, voie enzymatique, Fenton et porphyrine).<sup>88</sup> Les auteurs ont mis en évidence la présence du métabolite issu de la O-déméthylation et O-déalkylation du métoprolol par voie électrochimique, qui s'avère être le même que par voie enzymatique. Toutefois, les auteurs n'ont pas détaillé le mécanisme réactionnel qui est supposé identique au mécanisme décrit par Jurva *et al* en 2003.<sup>10</sup>

#### A.3.4.3.4.2 Désalkylation d'éthers aromatiques activés ou non

Nous avons présenté précédemment que la première étape de désalkylation est l'hydroxylation du carbone en  $\alpha$  de l'hétéroatome. Toutefois, pour des hétéroatomes engagés dans un système d'électrons  $\pi$  conjugués et/ou en l'absence d'hydrogène sur le carbone en  $\alpha$ , l'hydroxylation peut intervenir sur le carbone impliqué dans la délocalisation des électrons  $\pi$ . Hinson *et al.* ont parfaitement illustré ceci pour la O-désalkylation de la phénacétine en conditions enzymatiques.<sup>96-97</sup> Les auteurs ont utilisé de l'eau enrichie en  $^{18}\text{O}$  afin d'observer la perte du groupement éthyle de la phénacétine et la formation d'un métabolite O-désalkylé enrichi en  $^{18}\text{O}$ . En effet, l'élimination d'un atome d'hydrogène donne naissance à une espèce radicalaire, qui par recombinaison avec le  $[\text{FeOH}]^{3+}$  peut générer une entité chimique hydroxylée instable. Cette entité va subir un réarrangement intramoléculaire, donnant lieu à une coupure hétérolytique entre l'atome de carbone du système  $\pi$  conjugué et l'atome d'oxygène, formant le NAPQI (N-Acétyle-Para-QuinoneImine). Ce métabolite possède un caractère électrophile très marqué et s'avère être le principal responsable de la toxicité *in vivo* de la phénacétine. Des résultats identiques ont été observés sur le paracétamol.<sup>98</sup>

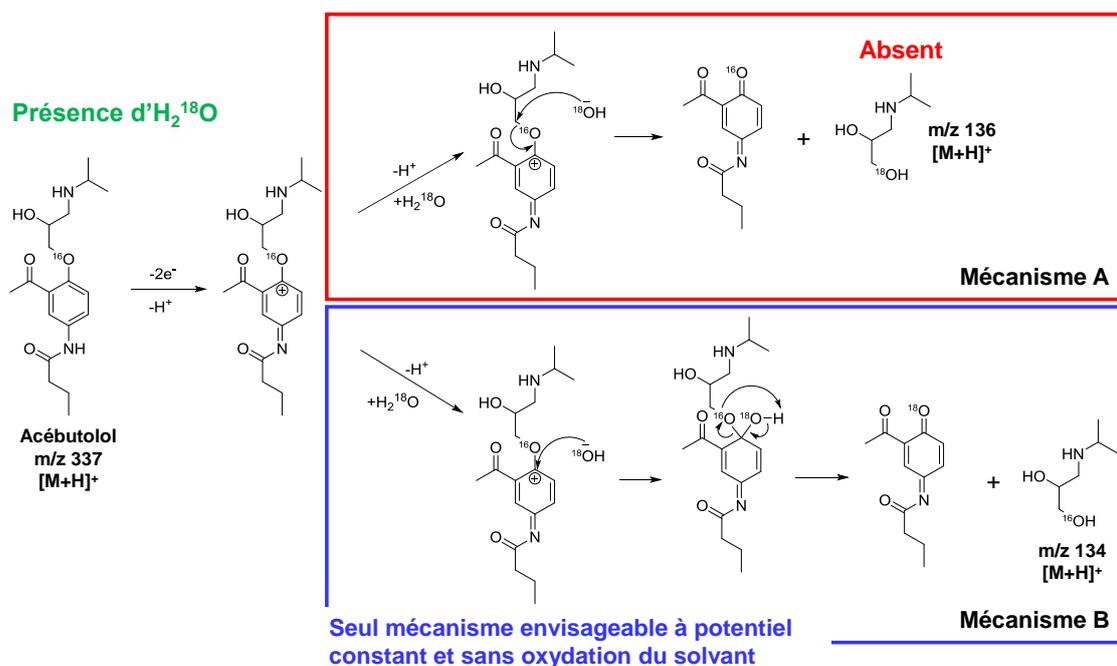
Madsen *et al.* ont proposé un mécanisme de O-désalkylation initié par le transfert d'un électron seul pour le BHA (3-*tert*-Butyl-4-HydroxyAnisole). De là s'en suit une déprotonation et un second transfert électronique pour obtenir un intermédiaire carbocationique. Cette intermédiaire subit ensuite l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau, suivie d'un réarrangement intramoléculaire aboutissant à la formation d'une espèce benzoquinone (Figure 33). La formation d'un adduit de glutathion avec l'espèce benzoquinone permet de confirmer sa présence durant la réaction. De plus cette étude met en lumière l'intérêt d'avoir un substituant donneur d'électron en position *ortho/para* de la fonction éther.<sup>99</sup>



**Figure 33 : Mécanisme d'O-désalkylation par voie électrochimique du BHA.**

Nouri-Nigjeh *et al.* ont étudié l'oxydation électrochimique de la phénacétine par l'application d'impulsions électrochimiques carrées en présence d'eau marquée ( $^{18}O$ ).<sup>36</sup> Les auteurs rapportent deux mécanismes possibles pour la réaction d'O-désalkylation d'un éther aromatique activé. Le premier fait intervenir le carbone alkyle situé en  $\alpha$  de l'éther, qui entraîne une coupure de la liaison  $C_{aromatique}-O$ , libérant ainsi un équivalent d'éthanol marqué à l' $^{18}O$  et une molécule de paracétamol non marqué. L'autre mécanisme est similaire à celui proposé par Jurva *et al.* sur le BHA (Figure 33). Toutefois, les conditions expérimentales n'ont pas été détaillées et la présence éventuelle d' $H_2^{16}O$  pourrait justifier la présence de paracétamol non marqué, écartant le premier mécanisme. De plus, les potentiels électrochimiques utilisés dans cette étude induisent probablement la formation d'espèces réactives radicalaires (oxydation de l'eau) conduisant à la mise en place d'une hydrolyse d'éther aromatique non sélective.

Une étude complémentaire de Bussy *et al.* sur l'oxydation électrochimique à potentiel constant de l'acébutolol en présence d'eau marquée vient justifier le mécanisme de O-désalkoxylation.<sup>60</sup> Les résultats ont montré que le clivage de la liaison éther aromatique se fait exclusivement par un mécanisme de O-désalkoxylation, conduisant à la formation d'une quinone imine et d'un alcool à potentiel constant et sans oxydation du solvant (Figure 34).



**Figure 34 : Mécanismes proposés pour l'oxydation électrochimique de la fonction éther aromatique de l'acébutolol en milieu marqué <sup>18</sup>O, et plus particulièrement le clivage de la liaison éther aromatique. Mécanisme A, O-désalkylation ; mécanisme B, O-désalkoxylation.**

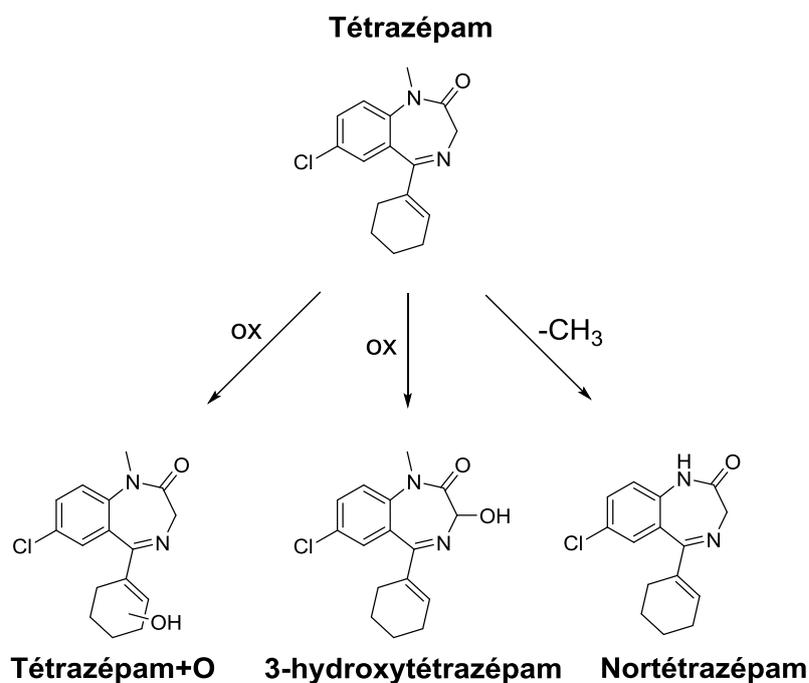
En ce qui concerne la réaction d'O-désalkylation pour des éthers aromatiques non activés, aucune étude ne rapporte son mime par réaction électrochimique. Jurva *et al.* ont apporté un exemple probant à travers l'étude de la 7-éthoxycoumarine.<sup>7</sup> Comme mentionné précédemment, pour qu'un éther aromatique soit sensible aux réactions électrochimiques, il doit être substitué en *ortho/para* avec un ou plusieurs groupements donneurs d'électrons afin d'activer la fonction.

#### A.3.4.3.4.3 Hydroxylation directe d'atomes de carbone

Contrairement aux réactions qui font intervenir un hétéroatome, l'hydroxylation d'un atome de carbone engagé dans une chaîne aliphatique est initiée par le transfert d'un atome d'hydrogène. En effet, les chaînes alkyles sont dépourvues de doublets d'électrons non liants, ce qui défavorise grandement le transfert d'un électron seul. Les réactions électrochimiques étant exclusivement amorcées par le transfert d'électron(s), le mime de la réaction d'hydroxylation d'un atome de carbone d'une chaîne aliphatique paraît compromis. C'est pourquoi devant l'incapacité de l'électrochimie sur électrode classique (carbone vitreux) à mettre en œuvre les réactions d'hydroxylation sur les chaînes aliphatiques, beaucoup d'études rapportent l'utilisation de nouveau matériaux comme électrode de travail.<sup>55, 100-103</sup> L'utilisation de matériaux tels que le platine, l'or, ou le carbone dopé bore (BDD) permet

d'élargir la fenêtre d'électroactivité et donc d'accéder à une plus grande variété de réactions électrochimiques.

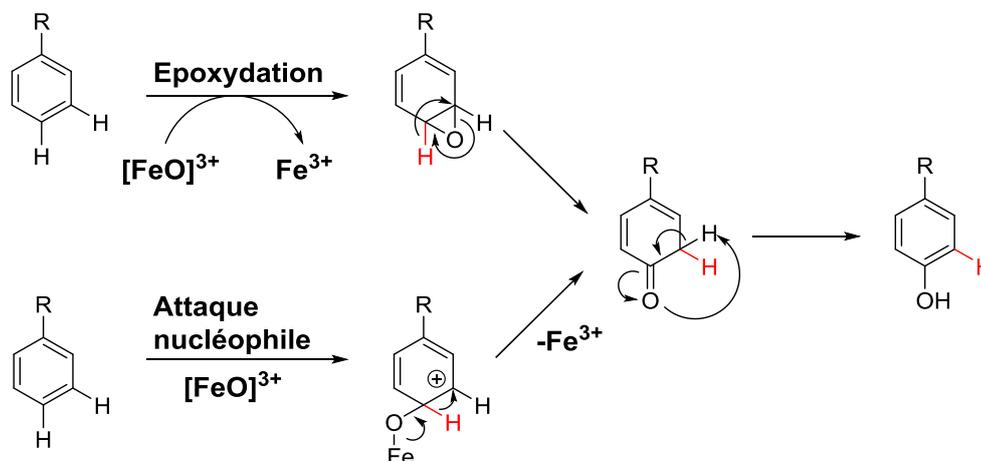
En 2009, Baumann *et al.* rapportent l'utilisation d'une électrode de travail en platine afin d'atteindre un potentiel de 2000 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub> pour l'hydroxylation de la molécule de tétrazépam, et plus particulièrement du groupement cyclohexényle, mais également pour l'hydroxylation d'alcane et d'alcènes.<sup>104</sup> Dans cette étude, les espèces générées électrochimiquement et identifiées par spectrométrie de masse sont pour la plupart identiques à celles observées lors de l'incubation de ce xénobiotique en présence de microsomes de foie (Figure 35). L'utilisation d'une gamme de potentiel élargie offre la possibilité d'une électrolyse de l'eau, conduisant à la formation d'espèces radicalaires réactives pouvant réagir par la suite avec le groupement cyclohexényle (mécanisme non décrit par les auteurs).



**Figure 35 : Bilan de la première voie d'oxydation du tétrazépam par électrochimie. Les métabolites présentés ici sont communs à l'oxydation par électrochimie et à l'incubation en présence de microsomes.**

En ce qui concerne l'hydroxylation d'un cycle aromatique non activé deux mécanismes sont proposés pour l'incorporation d'un atome d'oxygène (Figure 36).<sup>95</sup> Nous constatons que, pour les deux mécanismes proposés, aucun n'est initié par le transfert d'un électron seul. En effet, il peut s'agir soit de la formation d'un époxyde, soit d'une attaque nucléophile. Toutefois, dans les deux cas, le transfert intramoléculaire d'un atome d'hydrogène forme un

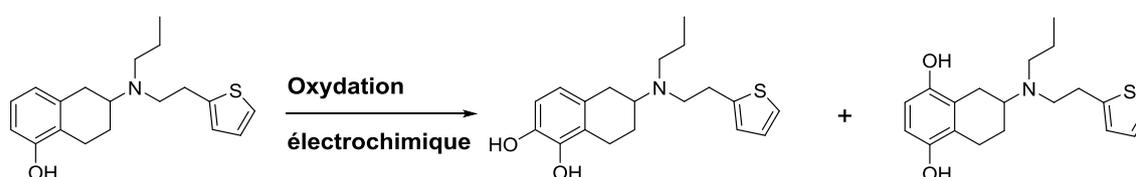
intermédiaire cyclique cétonique, qui par un second transfert intramoléculaire va permettre de retrouver l'aromaticité du composé et former l'espèce hydroxylée correspondante.



**Figure 36 : Mécanismes expliquant l'hydroxylation par le cytochrome P450 des cycles aromatiques inactivés.**

Pour que l'outil électrochimie soit capable de simuler des réactions d'hydroxylation aromatique, il est essentiel que ce cycle aromatique soit substitué par un groupement donneur d'électrons non liants. Jurva *et al.* furent les premiers à montrer l'influence d'un groupement substituant pour l'hydroxylation de carbones aromatiques.<sup>7</sup> La présence d'un groupement substituant donneur d'électrons permet de diminuer le potentiel d'oxydation de l'espèce considérée et ainsi initier la réaction d'hydroxylation par le transfert d'un électron seul. De manière générale, l'hydroxylation d'un cycle aromatique activé se fait très bien sur les positions activées en *ortho/para* du substituant.

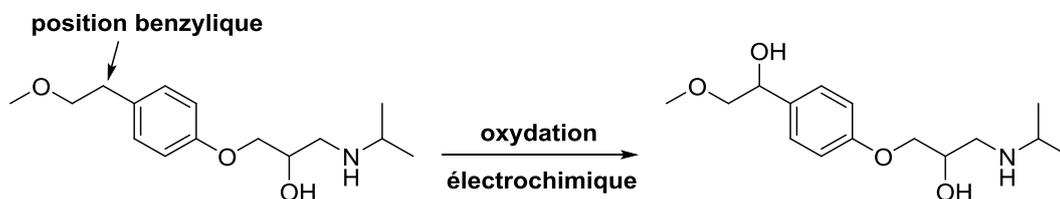
En 2007, Johansson *et al.* ont simulé par voie électrochimique la réaction d'hydroxylation aromatique sur un agoniste de la dopamine, la 2-(N-propyl-N-2-thienyléthylamine)-5-hydroxytétraline.<sup>88</sup> Les résultats ont permis d'observer l'hydroxylation aromatique sur les deux positions activées en *ortho/para* du groupement donneur d'électrons (Figure 37).



**Figure 37 : Bilan de l'oxydation électrochimique d'un agoniste de la dopamine.**

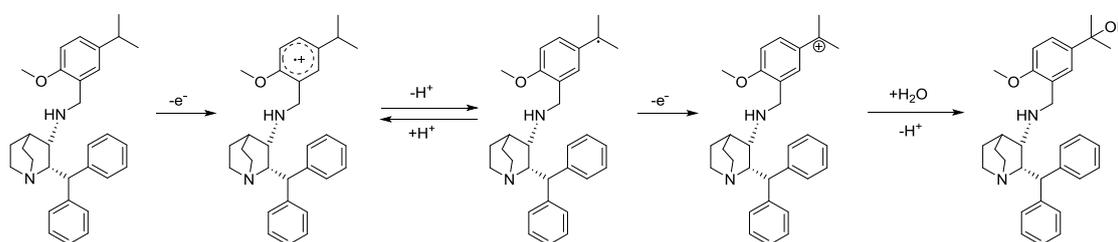
Pour l'hydroxylation d'un atome de carbone benzylique, les mécanismes SET et HAT sont tous deux envisageables. La simulation de l'hydroxylation d'un carbone benzylique par voie

électrochimique a été présentée par Johansson *et al.* à travers l'étude de l'oxydation électrochimique sur électrode de carbone poreux du métoprolol, sans toutefois présenter le mécanisme de cette réaction (Figure 38).<sup>88</sup>



**Figure 38 : Bilan de l'oxydation électrochimique du métoprolol.**

Très récemment Torres *et al.* ont proposé un mécanisme électrochimique mettant en jeu l'hydroxylation du carbone benzylique d'un composé modèle.<sup>105</sup> La réaction est initiée par le transfert d'un électron seul, qui aboutit à la formation d'un intermédiaire radical cation. Une déprotonation au niveau du carbone benzylique, suivie d'un second transfert électronique, engendre l'apparition d'un carbocation. Cette entité réactive va par la suite subir l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau pour générer l'espèce hydroxylée, comme l'indique la Figure 39.



**Figure 39 : Mécanisme d'hydroxylation benzylique initié par une réaction électrochimique.**

#### A.3.4.3.5 Réactions d'oxydation électrochimique indirecte

La partie précédente a mis en avant la capacité de l'électrochimie à simuler uniquement les réactions induites par le transfert d'un électron seul. L'utilisation de l'électrochimie en conditions classiques impose des limitations, que ce soit par l'oxydation et la réduction du solvant ou par les limites propres au matériau constituant l'électrode. Toutefois, l'électrochimie est capable de générer des Espèces Réactives Oxygénées (ERO), qui peuvent réaliser des réactions secondaires en solution et donc améliorer la capacité de simulation de l'outil électrochimique. De plus, l'utilisation du procédé Fenton permet la formation de radicaux hydroxyles qui peuvent par la suite réaliser des réactions secondaires de transfert de

proton par exemple. Ces deux approches ERO et Fenton vont être discutées dans la suite de cette partie

#### A.3.4.3.5.1 Espèces Réactives Oxygénées (ERO)

Lors d'une réaction de réduction électrochimique dans un solvant aprotique (acétonitrile par exemple) on peut observer la réduction du dioxygène (sans dégazage de la solution) en ion  $O_2^{\cdot-}$ , jusqu'à l'ion  $O_2^{2-}$ . L'ion  $O_2^{\cdot-}$  est hautement réactif et peut induire un grand nombre de réactions, du transfert de proton à la réduction à un électron, mais également le transfert d'atome d'hydrogène. Cette transformation du dioxygène paraît intéressante afin de mimer un plus grand nombre de réactions induites par le cytochrome P450, et plus particulièrement celles initiées par le transfert d'un atome d'hydrogène.

En 2010, Nouri-Nigjeh *et al.* ont mis en avant la capacité de simulation de la réaction d'oxygénation d'hétéroatomes par réduction électrochimique du dioxygène moléculaire.<sup>38</sup> Les auteurs ont choisi comme molécule modèle la lidocaïne en solution dans l'acétonitrile en présence d'eau (1%). L'application d'un potentiel cathodique à l'électrode de travail en or permet la réduction du dioxygène, tandis qu'à la contre électrode un potentiel anodique permet l'oxydation de la lidocaïne. L'oxydation de la lidocaïne à la contre électrode conduit à la formation d'un métabolite N-désalkylé. La présence de dioxygène réduit génère le métabolite N-oxydé (Figure 40).

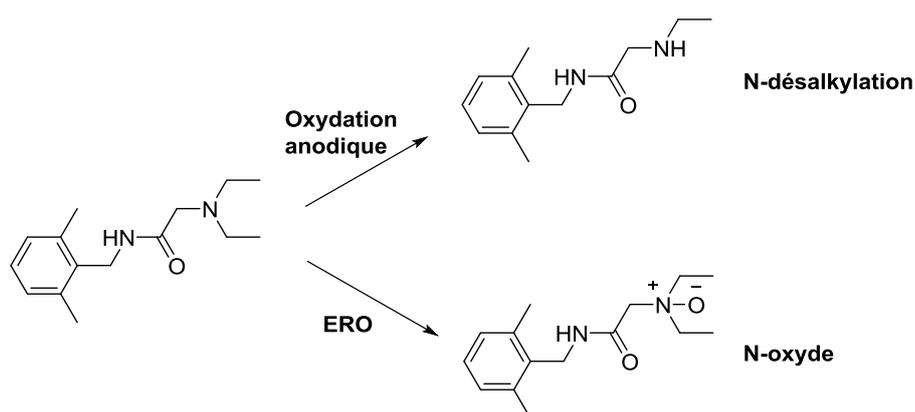
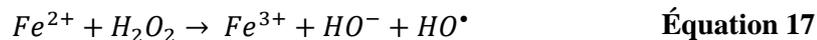


Figure 40 : Bilan des réactions de N-désalkylation et N-oxydation sur la lidocaïne.

#### A.3.4.3.5.2 Procédé Fenton assisté par électrochimie

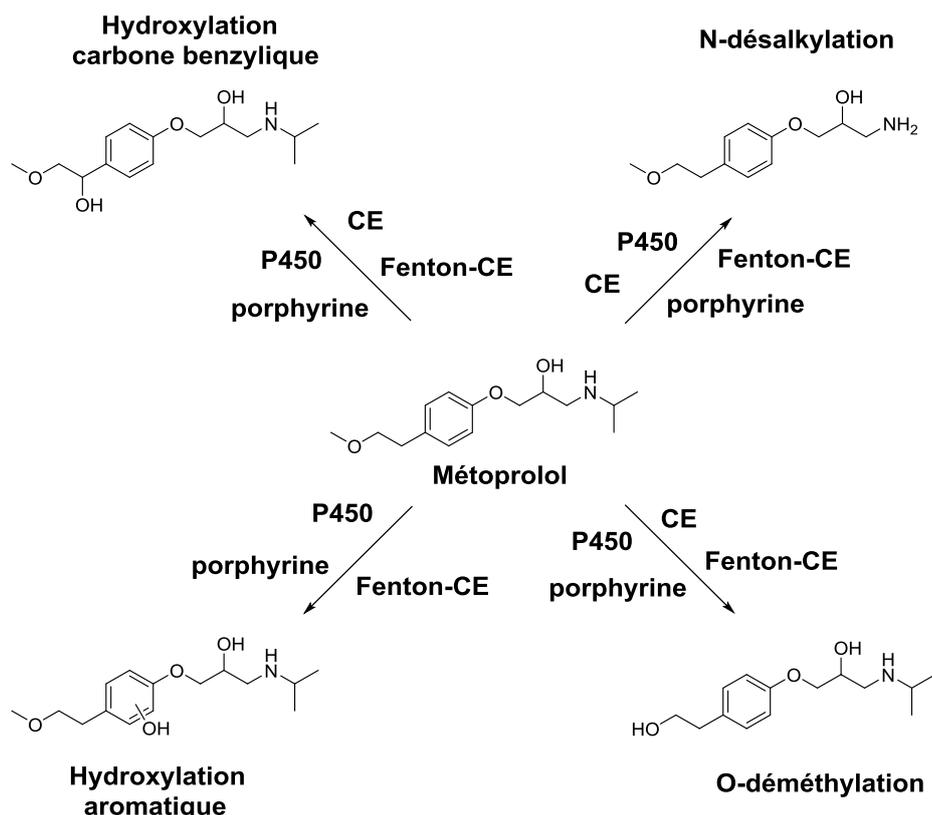
Le procédé Fenton fait intervenir la catalyse homogène de l'oxydation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en ions et radicaux hydroxyle par l'ion  $Fe^{2+}$  en solution (Équation 17).

Ce système permet de générer très rapidement des radicaux hydroxyles en solution, qui par la suite vont permettre de mimer des réactions initiées par le transfert d'un atome d'hydrogène.



La cinétique très rapide de formation de ces radicaux est un avantage majeur pour améliorer les performances de ce système de simulation.<sup>106</sup> Durant le procédé Fenton, l'ion  $Fe^{2+}$  est oxydé en ion  $Fe^{3+}$ , et c'est ici qu'intervient l'électrochimie de par sa capacité à régénérer l'ion  $Fe^{2+}$  par réduction des ions  $Fe^{3+}$ . En 2002, Jurva *et al.* présentent la comparaison entre un système Fenton classique et un système Fenton assisté par électrochimie (Fenton-CE).<sup>107</sup> Dans le système Fenton classique, la régénération des ions  $Fe^{2+}$  se fait par ajout d'acide ascorbique. Les auteurs mettent en avant plusieurs faits marquants, comme l'aptitude de l'électrochimie à régénérer plus efficacement les ions  $Fe^{2+}$  que par voie chimique. De plus, la comparaison d'une oxydation directe avec le système Fenton-CE-SM en ligne montre la possibilité de mimer de nouvelles réactions (l'insertion d'un atome d'oxygène par exemple).

Des travaux de Johansson *et al.* ont permis de confirmer la puissance du système Fenton en flux pour la simulation du métabolisme *in vivo* de xénobiotiques. Les auteurs ont réalisé une étude comparative entre le système électrochimique, le système Fenton assisté par électrochimie, les porphyrines et le système biologique (microsome) sur le métoprolol.<sup>88</sup> Le métabolisme *in vivo* du métoprolol aboutit à la formation de métabolites issus des réactions d'O-déméthylation, N-désalkylation, d'hydroxylation de carbones benzyliques et d'hydroxylation de carbones aromatiques (Figure 41). Toutefois, par voie électrochimique, la réaction d'hydroxylation de carbones aromatiques n'est pas observée, alors que pour le système Fenton-CE celle-ci a bien lieu.



**Figure 41 : Bilan de l'oxydation du métoprolol par quatre systèmes différents : Fenton assisté par électrochimie (Fenton-CE), cytochrome P450, porphyrine et système électrochimique classique (CE).**

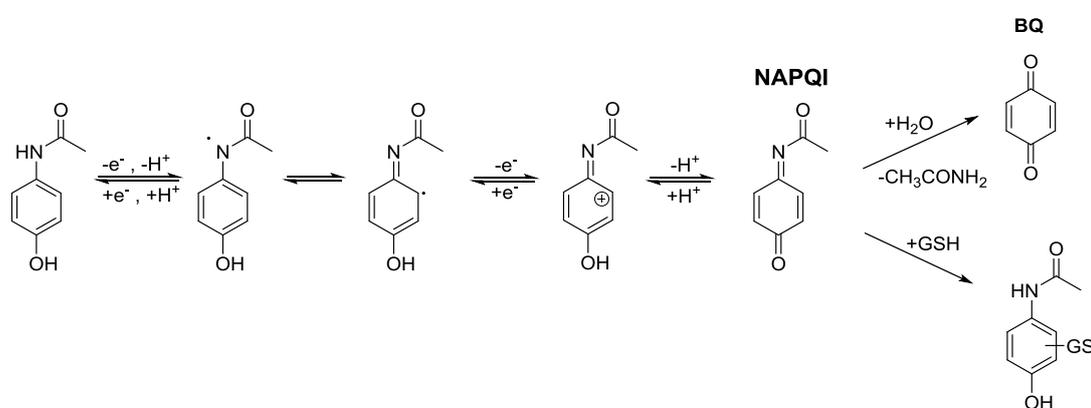
Cette étude attire notre attention sur l'aptitude de ce système Fenton-CE en ligne à simuler un panel plus important de réactions induites par le cytochrome P450. Cependant, la faible sélectivité de ce procédé induit un grand nombre de réactions pouvant complexifier l'étude.

#### A.3.4.3.6 Formation et identification d'espèces réactives

Comme mentionné précédemment, durant le métabolisme *in vivo* d'un xénobiotique, les réactions induites par le cytochrome P450 peuvent engendrer la formation d'espèces réactives. La toxicité *in vivo* d'un xénobiotique peut être expliquée par le caractère électrophile prononcé de ces espèces réactives, ce qui facilite la formation de liaisons covalentes avec les groupements nucléophiles de macromolécules biologiques (ADN, protéines, peptides).<sup>108</sup> L'aptitude de l'outil électrochimique pour l'observation et la caractérisation d'intermédiaires réactifs va être discutée dans la partie ci-dessous.

#### A.3.4.3.6.1 Métabolites réactifs aryle

Le paracétamol (APAP) est certainement le composé le plus exploité dans le domaine du développement de l'électrochimie comme outils de simulation du métabolisme *in vivo*. En effet, le métabolisme de l'APAP conduit à la formation d'une espèce réactive, le NAPQI (Figure 43). Getek *et al.* furent les premiers à rapporter l'oxydation électrochimique de l'APAP en présence de glutathion dans l'objectif d'observer l'adduit glutathion du NAPQI.<sup>2</sup> La formation de l'adduit s'explique par l'addition nucléophile de la fonction thiol du glutathion. L'adduit généré est nettement moins réactif et plus hydrophile, ce qui facilite son excrétion de l'organisme.



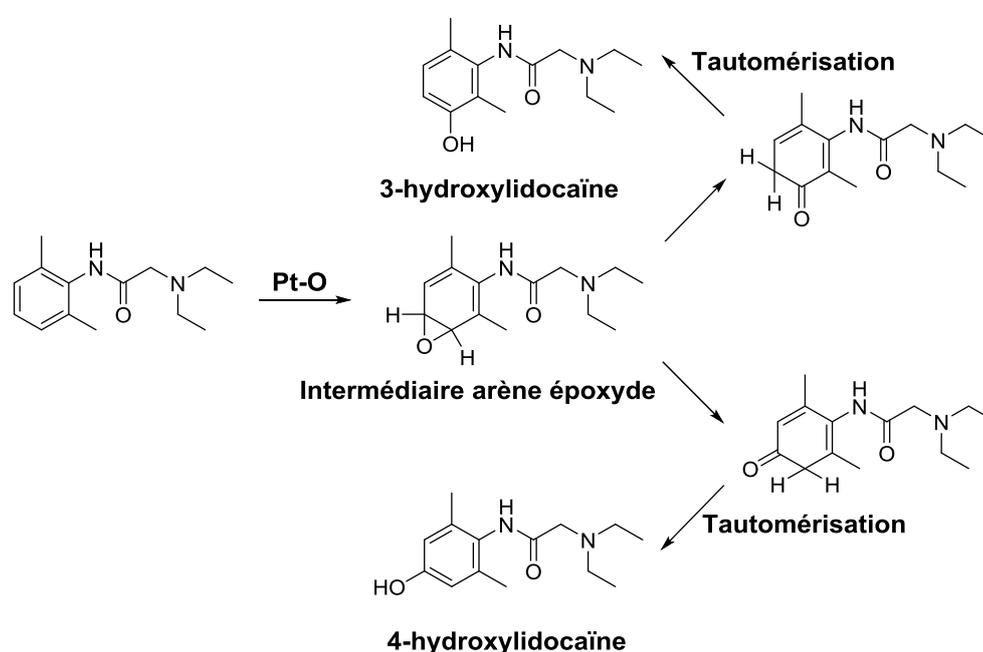
**Figure 42 : Mécanisme de déshydrogénation du paracétamol par électrochimie aboutissant à la formation du NAPQI. Identification du NAPQI par piégeage au glutathion ou hydrolyse en benzoquinone.**

Plus récemment, Faber *et al.* ont démontré la haute réactivité du NAPQI avec des biomolécules par l'observation de son adduit avec la  $\beta$ -lactoglobuline A.<sup>4</sup> Lohmann *et al.* rapportent la comparaison entre l'oxydation électrochimique et par voie enzymatique de trois composés pharmaceutiques.<sup>108</sup> Les auteurs mettent en évidence l'observation directe de métabolites réactifs de type benzoquinone, benzodiimine et benzoquinone imine par adduit avec le glutathion.

#### A.3.4.3.6.2 Intermédiaires arène époxyde

Comme mentionné précédemment, l'hydroxylation d'un carbone aromatique par l'action du CYP450 peut se faire par la formation d'un intermédiaire arène époxyde (Figure 36). Toutefois, il convient de noter que l'hydroxylation aromatique peut se produire au travers d'une liaison covalente de l'hème du CYP450 et donc totalement indépendamment de la formation d'un intermédiaire époxyde.<sup>109-110</sup> Compte tenu de la possible formation

d'intermédiaire arène époxyde, des travaux de Nouri Nigjeh *et al.* rapportent l'implication de l'oxydation électrochimique à la surface d'une électrode de platine en amont d'une détection par spectrométrie de masse.<sup>35</sup> Les auteurs ont observé l'hydroxylation des positions *meta* et *para* du noyau aromatique de la lidocaïne. L'hydroxylation de la position *meta* est due à la formation d'un oxyde de platine résultant des conditions électrochimiques utilisées (potentiel d'oxydation très élevé). L'oxyde de platine ainsi formé est capable de promouvoir l'insertion d'un atome d'oxygène dans le système aromatique, tout comme le radical oxo-ferryle présent dans le cycle catalytique du CYP450.<sup>35</sup> L'insertion de cet oxygène entraîne la formation de l'intermédiaire arène époxyde conduisant par la suite à l'hydroxylation aromatique des positions *meta* et *para* après ouverture du cycle (Figure 43).

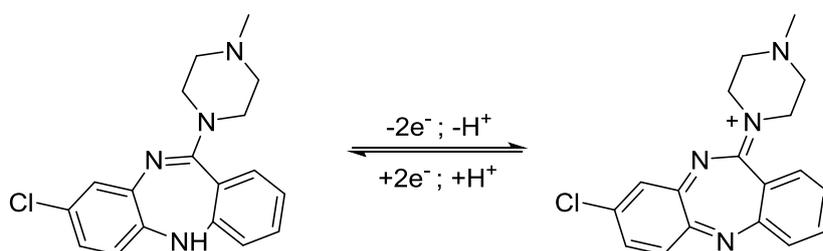


**Figure 43 :** Mécanisme de transfert d'oxygène induit par l'oxyde de platine aboutissant à l'hydroxylation aromatique en position *meta* et *para* de la lidocaïne par passage par un intermédiaire arène époxyde.

Cette étude est la seule à rapporter la formation électrochimique d'un intermédiaire réactif arène époxyde par détection en spectrométrie de masse. La formation d'époxyde durant le métabolisme *in vivo* d'un xénobiotique peut induire une forte toxicité. Par exemple, l'époxydation d'aflatoxine conduit à des effets néfastes par liaison avec l'ADN ou l'inhibition d'enzymes,<sup>50, 111</sup> les efforts pour améliorer les performances de simulation de l'outil électrochimique pour l'époxydation devraient être poursuivis.

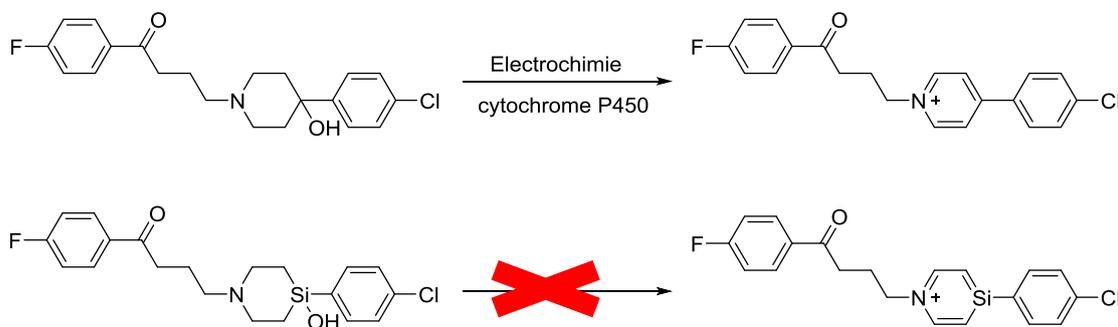
### A.3.4.3.6.3 Espèces réactives azotées

L'élucidation par Blankert *et al.* du comportement oxydatif de la clozapine par CE-SM a mis en avant la formation de l'ion iminium (Figure 44) considéré comme responsable de nombreux effets secondaires de cet antipsychotique.<sup>112</sup> La formation par électrochimie de cette espèce réactive est due à l'oxydation de l'azote contenu dans l'hétérocycle à sept atomes. Toutefois, cette étude dénote la difficulté d'observation d'un tel intermédiaire par *electrospray*, non pas par difficulté d'ionisation, mais en raison de sa forte réactivité chimique. Néanmoins, l'électrochimie apparaît être un outil approprié pour observer des espèces réactives contenant des azotes quaternaires.



**Figure 44 : Bilan de l'oxydation électrochimique de la clozapine aboutissant à la formation de l'espèce réactive iminium.**

Des travaux de Johansson *et al.* sur l'halopéridol vont d'ailleurs dans ce sens. Les auteurs ont rapporté l'observation de l'espèce réactive pyridinium lors de l'oxydation électrochimique et par incubation en présence de microsomes de foie.<sup>113</sup> En outre, l'utilisation de sel de cyanure comme agent de piégeage chimique a permis de caractériser l'intermédiaire cationique. Fait intéressant, ces mêmes auteurs ont confirmé les conclusions de la première étude en substituant l'atome de carbone en position 4 du cycle pipéridine de l'halopéridol par un atome de silicium, empêchant ainsi toute formation d'ion pyridinium (Figure 45).<sup>114</sup>



**Figure 45 : Bilan de la formation de l'ion pyridinium par voie électrochimique et enzymatique sur l'halopéridol. La substitution d'un atome de carbone par un atome de silicium empêche toute formation d'ion pyridinium.**

#### A.3.4.3.6.4 Intermédiaire radicalaire et carbocationique

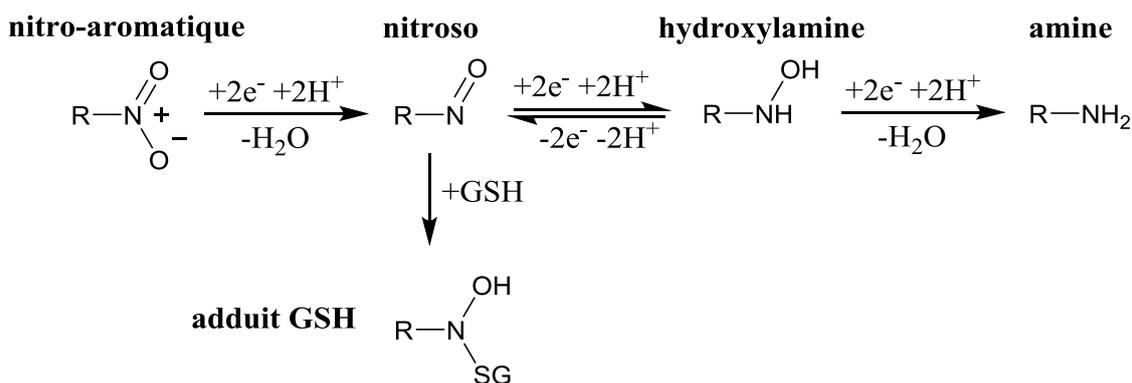
Comme présenté précédemment, le couplage CE-SM peut être utilisé pour identifier des intermédiaires réactionnels tels que des radicaux benzyle, également observés par voie enzymatique.<sup>8, 50</sup> Par exemple, il a été démontré que l'hydroxylation benzylique de l'alprénolol par voie électrochimique est précédée de la formation d'un intermédiaire cationique, tandis que les réactions du CYP450 peuvent être initiées par l'hydroxylation des intermédiaires radicalaires et carbocationiques.<sup>58</sup> La formation de ces intermédiaires peut conduire à l'inhibition de l'activité du CYP450.<sup>115</sup>

Les futures recherches sur l'observation et la caractérisation des intermédiaires radicalaires et carbocationiques devraient certainement être menées au travers d'un couplage CE-SM *in situ*. En effet, dans cette configuration, les réactions électrochimiques sont réalisées dans le capillaire de la source d'ionisation *electrospray*, ce qui réduit considérablement le temps entre la formation des espèces par électrochimie et leur détection par spectrométrie de masse. Ceci doit permettre d'observer les espèces réactives ayant une très courte durée de vie.<sup>116</sup>

#### A.3.4.3.7 Simulation des réactions de réduction

La grande majorité des études rapportant la simulation du métabolisme d'un xénobiotique par couplage CE-SM l'ont été pour des réactions d'oxydation. Toutefois, des réactions de réduction (typiquement sur des composés nitro-aromatiques) initiées par des bactéries, enzymes, ou bio-organismes peuvent être observées.<sup>117-118</sup> L'élucidation du métabolisme de composés nitro-aromatiques peut être utilisée pour le développement de nouveaux principes actifs pharmaceutiques, mais également pour une meilleure compréhension du devenir de ces polluants organiques dans l'environnement.

Les travaux rapportant l'utilisation de l'outil électrochimique sur les composés nitro-aromatiques s'est limitée à l'observation et l'étude de la réactivité des radicaux anions.<sup>119</sup> Ce n'est que très récemment que le couplage CE-(CL-)SM a été utilisé pour l'étude du métabolisme réductif de trois composés nitro-aromatiques (deux principes actifs pharmaceutiques et un pesticide).<sup>120</sup> Les auteurs ont démontré la capacité de l'outil électrochimique pour simuler les réactions de phase I et II du métabolisme réductif *in vivo* des composés nitro-aromatiques. L'observation d'espèces telles que le nitroso, l'hydroxylamine, l'amine et l'adduit glutathion du nitroso confirme ceci (Figure 48).



**Figure 46 : Bilan de la réduction électrochimique d'un composé nitro-aromatique.**<sup>120</sup>

L'observation de l'adduit glutathion de l'entité nitroso montre bien la potentielle toxicité de ces composés nitro-aromatiques pour l'écosystème.

### A.3.5 Perspectives du couplage CE-(CL)-SM

Le couplage CE-(CL)-SM a démontré son fort potentiel dans la simulation du métabolisme *in vivo* de xénobiotiques, la compréhension de dégradations environnementales et l'étude de biomolécules. Les nombreux avantages de ce couplage tels que sa rapidité ou sa simplicité de mise en œuvre sont ses atouts majeurs. De plus, la commercialisation de cellules électrochimiques de plus en plus perfectionnées, ainsi que la possibilité d'utiliser différents type de matériaux pour les électrodes de travail améliorent grandement les performances de ce couplage.

Concernant la simulation des réactions enzymatiques, l'outil électrochimique a montré sa capacité à mimer les réactions initiées par le transfert d'un électron seul (SET). Toutefois, un gros travail reste à accomplir pour la simulation des réactions initiées par le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT). Le développement de nouvelles méthodologies (couplage Fenton-CE) et l'utilisation de nouveaux matériaux d'électrode est à envisager pour élargir significativement le panel de simulation de biotransformations. En effet, l'utilisation d'électrodes modifiées à l'aide de métalloporphyrines ou bien même par greffage direct d'un cytochrome P450 apparaît être une voie très prometteuse.<sup>55</sup>

L'association CE-(CL)-SM ne doit également pas se limiter à la simulation du métabolisme de principes actifs pharmaceutiques, mais à d'autres champs d'applications telles que l'étude de composés cosmétiques par exemple.

Dans la suite de ces travaux nous allons présenter les résultats obtenus lors de l'étude du TBBPA et de l'acide aristolochique par couplages CE-(CL-)SM. L'objectif affiché est une meilleure compréhension de la dégradation oxydative du TBBPA par l'observation et la caractérisation de ces produits d'oxydation, ainsi que l'élucidation mécanistique de l'oxydation de ce xénobiotique. Dans un second temps, nous avons choisi de simuler le métabolisme réductif de l'acide aristolochique (composé nitro-aromatique) par couplages CE-(CL-)SM afin de confirmer davantage l'aptitude de l'outil électrochimique pour simuler les réactions de réductions.

**B. PARTIE RESULTATS : Applications des couplages CE-(CL-)SM pour la simulation de la dégradation du TBBPA et de l'acide aristolochique**

## **B.1 Comportement oxydatif du Tétrabromobisphénol A (TBBPA), élucidation mécanistique par couplage CE-(CL)-SM**

### **B.1.1 Introduction**

Dans les parties précédentes, nous avons discuté la capacité de l'outil électrochimique à simuler le métabolisme des xénobiotiques.<sup>7, 121</sup> Ces xénobiotiques, ainsi que leurs produits de dégradation, sont susceptibles d'être présents dans l'environnement, les sols, les boues, les eaux usées et les organismes aquatiques vivants. Cette pollution potentielle pourrait avoir un impact non négligeable sur l'environnement et les organismes vivants qui en font partie.<sup>122</sup>

Les polluants émergents ne sont pas nouveaux comme leur nom l'indique, mais nouvellement détectés et identifiés dans l'environnement. Plusieurs sources de polluants sont actuellement ciblées, comme les polluants industriels, agricoles ou les principes actifs pharmaceutiques et leurs métabolites. Une décision du Parlement Européen Numéro 2455/2001/CE identifie des substances dans la liste des polluants émergents dans les eaux comme à risques.<sup>123</sup> Cette liste n'est pas exhaustive et peut être complétée avec l'avancée de la recherche scientifique. Parmi les polluants émergents listés, certains peuvent être dégradés dans l'environnement par des procédés photochimiques, oxydo-réductifs ou chimiques. Bien que l'occurrence de certains métabolites de polluants soit étudiée dans l'environnement, la présence de la plupart des métabolites ou produits de dégradation n'est pas suivie. En effet, divers métabolites ou produits de dégradation sont dans la plupart des cas non identifiés ou indisponibles commercialement, ce qui rend leur détection difficile et limite de ce fait le développement de méthodes quantitatives par CL-SMSM. Pour répondre à cette limite, il est donc essentiel de comprendre et prédire les différents mécanismes potentiellement mis en jeu lors de la dégradation de ces xénobiotiques. En effet, même à de très faibles quantités, ces composés, qu'ils soient des produits de dégradation ou non, peuvent conserver des effets potentiellement toxiques importants. L'élucidation des mécanismes de dégradations permettrait sans doute de prédire ou simuler le devenir d'un polluant dans l'environnement. L'identification de ces produits de dégradation ou métabolites peut contribuer à un meilleur suivi des polluants dans l'environnement, et par exemple servir à l'optimisation des procédés de traitement des eaux usées.

Plusieurs outils tels que l'électrochimie ont été proposés pour la simulation de la dégradation environnementale et *in vivo* des xénobiotiques. L'électrochimie représente un avantage certain pour la génération de produits de dégradation et leur identification. En effet, les matrices biologiques ou environnementales sont des milieux souvent complexes qui peuvent engendrer le plus souvent des phénomènes de suppression et/ou surestimation du signal en spectrométrie de masse, affectant les performances telles que sensibilité, justesse et précision. La simplicité de la matrice (solvant, sel de fond) lors des expériences d'électrochimie limite l'influence des phénomènes présentés précédemment.

Les travaux du Dr. Ulrik Jurva *et al.* ont rapporté la comparaison entre les procédés électrochimiques et les systèmes catalysés par le cytochrome P450 et ont permis de montrer l'intérêt de l'outil électrochimique pour la simulation des dégradations oxydatives de xénobiotiques.<sup>7, 51, 99</sup> Tandis que le groupe du Dr. Uwe Karst a décrit l'utilisation du couplage CE-(CL)-SM pour la simulation de la biodégradation oxydative de xénobiotiques.<sup>39, 124</sup> De plus, des travaux novateurs ont également été rapportés par le Dr. Stephan Kuppers *et al.*, qui démontrent l'utilisation du couplage CE-SM comme un outil polyvalent pour des études mécanistiques de l'oxydation de xénobiotiques, et leur possible interaction avec la matière organique présente dans l'environnement.<sup>42-43</sup> Les auteurs mettent en avant la formation de résidus non-extractibles au travers de liaisons chimiques entre la matière organique naturelle, le xénobiotique et/ou ses produits de dégradation en conditions oxydantes.<sup>10</sup>

Ce chapitre s'attache à présenter le comportement électrochimique du Tétrabromobisphénol A (TBBPA). Le TBBPA fait partie des composés utilisés comme retardateur de flamme bromé dans le bois, les plastiques et l'électronique. De récentes études ont montré la présence de TBBPA, ainsi que de ses produits de dégradation, dans de nombreuses matrices telles que, l'eau, l'air, les poussières de maison et des matrices biologiques.<sup>125-126</sup> De plus, des études ont révélé la toxicité pour la santé humaine et l'environnement des retardateurs de flamme bromés.<sup>127</sup> Une comparaison entre l'oxydation électrochimique et le métabolisme *in vivo* ainsi que les dégradations environnementales<sup>128-129</sup> du TBBPA est présentée. Une attention toute particulière est allouée à la détection et l'identification de ses produits d'oxydation. En effet, la cause de la toxicité avérée du TBBPA peut s'expliquer par la réactivité de ses produits de dégradation.

## B.1.2 Matériels et méthodes

### B.1.2.1 Réactifs

L'ensemble des réactifs et solvants ont été achetés chez [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) sous les références suivantes :

- Tétrabromobisphénol A référence 330396
- Acétate d'ammonium référence 372331
- Glutathion référence G4251
- Acétonitrile référence 271004

### B.1.2.2 Electrochimie

Les différentes études par électrochimie, de la voltampérométrie cyclique à la synthèse, ont été réalisées à l'aide d'un potentiostat multicanaux VMP PerkinElmer<sup>TM</sup> Instruments de [www.bio-logic.info](http://www.bio-logic.info) piloté par le logiciel ECLab version 10.32. Concernant les expériences de couplage direct CE-SM, nous avons utilisé un potentiostat portable de chez PalmSens ([www.palmsens.com](http://www.palmsens.com)) piloté par le logiciel PSTrace 2.3.

#### B.1.2.2.1 Voltampérométrie cyclique

L'ensemble des expériences de voltampérométrie cyclique a été réalisé dans une cellule composée de trois électrodes :

- Une électrode de travail composée d'un disque de 1,6 mm de diamètre en carbone vitreux ([www.bio-logic.info](http://www.bio-logic.info)) référence A-012297
- Un fil de palladium (99,95%) de 0,25 mm de diamètre fait office d'électrode de référence ([www.goodfellow.com](http://www.goodfellow.com)) référence PD005130
- La contre électrode ou auxiliaire est en inox

L'électrolyte support choisi est l'acétate d'ammonium à la concentration de 20 mmol.L<sup>-1</sup> pour satisfaire aux exigences expérimentales de l'électrochimie et de la spectrométrie de masse.

#### B.1.2.2.2 Electrolyse en flux

La solution est continuellement injectée dans la cellule électrochimique  $\mu$ PrepCell™ ([www.myantec.com](http://www.myantec.com)) à l'aide d'un pousse seringue ([www.fischersci.com](http://www.fischersci.com), model A-99) au débit de  $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . La cellule  $\mu$ PrepCell™ est une cellule de synthèse avec un volume interne de  $33 \mu\text{L}$  (correspondant à un espaceur de  $150 \mu\text{m}$ ). L'électrode de travail est en carbone vitreux, un bloc de Titane fait office de contre électrode et la référence est en Palladium.

La solution d'électrosynthèse est constituée de  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de TBBPA et  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  d'acétate d'ammonium, dans un mélange eau/acétonitrile (50/50). Une autre solution contenant en plus  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de glutathion sera également électrolysée.

L'électrolyse est réalisée dans un premier temps à un potentiel de travail de  $0,65 \text{ V vs Pd/H}_2$  durant 6h. Dans un second temps, une solution contenant le TBBPA et le glutathion est également électrolysée dans les mêmes conditions. Les produits d'oxydation sont collectés dans un vial de  $2 \text{ mL}$  et entreposés à  $-18^\circ\text{C}$  à l'abri de la lumière en vue d'analyses CL-MS et CL-SMSM.

#### B.1.2.2.3 Voltampérométrie massique : couplage direct CE-SM

La solution est injectée en continu dans la cellule électrochimique  $\mu$ PrepCell™ à l'aide des pompes de la chromatographie liquide ([www.waters.com](http://www.waters.com)) à un débit de  $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Lors des expériences de couplage en ligne CE-SM on applique un balayage linéaire de potentiel allant de  $0$  à  $1 \text{ V vs Pd/H}_2$  par pas de  $2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Les produits d'oxydation sont directement injectés dans l'entrée de la source d'ionisation du spectromètre de masse. Les résultats obtenus lors de ces analyses correspondent à des voltampérogrammes massiques (intensité des  $m/z$  en fonction du potentiel appliqué à l'électrode de travail).

#### B.1.2.3 Chromatographie liquide et spectrométrie de masse

Les analyses CL-SM et CL-SMSM ont été réalisées à l'aide d'un système couplant une Chromatographie Liquide à Ultra Haute Performance (CLUHP) de chez Waters ([www.waters.com](http://www.waters.com)) et un spectromètre de masse Synapt G2 HDMS équipé d'un quadripôle/analyseur à temps de vol. Le spectromètre de masse est équipé d'une source

d'ionisation par *electrospray* (Z-Spray). Le système CL-SM utilisé ici est entièrement piloté par le logiciel MassLynx de chez Waters.

Le TBBPA et ses produits d'oxydation contenus dans 10 $\mu$ L sont injectés et séparés sur une colonne de chromatographie liquide de phase inverse greffée C<sub>18</sub> (Acquity<sup>®</sup> BEH, 2,1 mm  $\times$  100 mm, taille des particules 1,7  $\mu$ m de www.water.com) maintenue à 50°C. Les phases mobiles sont composées d'un mélange eau/acétonitrile (95/5) pour la voie A et de 100% d'acétonitrile contenant 0,1 % d'acide formique pour la voie B. La séparation chromatographique se fait à l'aide d'un gradient binaire à débit constant de 400  $\mu$ L.min<sup>-1</sup> présenté dans le Tableau 1 ci-dessous.

**Tableau 1 : Composition du gradient en voies A et B utilisé pour la séparation chromatographique du TBBPA et de ses produits d'oxydation.**

Temps (minutes)	0	1	8	10
% A (H <sub>2</sub> O/ACN 95:5)	80	80	20	80
% B (ACN)	20	20	80	20

Concernant les paramètres de la source d'ionisation par *electrospray*, il a été choisi d'utiliser le mode d'acquisition négatif donnant accès aux ions [M-H]<sup>-</sup>. Les paramètres de la source ont été réglés afin d'obtenir le meilleur rapport résolution/sensibilité pour nos analyses. Les données ont été acquises pour des *m/z* allant de 50 à 1200. La tension de capillaire, la tension de cône, le débit du gaz de désolvatation, la température de la source ainsi que la température du gaz de désolvatation sont respectivement de 2,5 kV, 40 V, 900 L.h<sup>-1</sup>, 120 °C et 550° C.

Pour les analyses SMSM, le gaz induisant la fragmentation de l'ion parent est de l'Argon avec une énergie de collision de 30 V. La présence d'atomes de Brome engendre l'apparition d'un massif isotopique caractéristique (détaillé par la suite). C'est pourquoi, pour l'ensemble des analyses SMSM pour le TBBPA et ses produits d'oxydation, nous choisissons l'ion parent correspondant au *m/z* mono-isotopique.

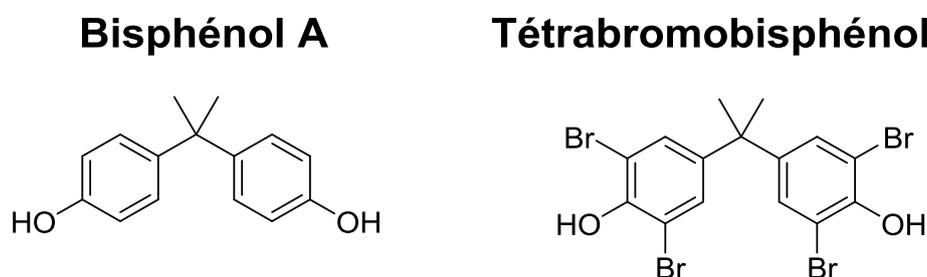
#### B.1.2.4 Calcul théorique

L'ensemble des calculs théoriques a été effectué en collaboration avec l'équipe de modélisation du laboratoire CEISAM. Les résultats ont été obtenus par le programme

Gaussian09 utilisant des algorithmes, procédures et seuils de convergence par défaut.<sup>130</sup> Dans un premier temps, la structure moléculaire a été optimisée grâce à la structure cristallographique de la molécule, la fonctionnelle BMK (*Boese and Martin for Kinetic*) et la base de fonctions atomiques 6-31G(d). La fonctionnelle BMK est une fonctionnelle *meta*-GGA (hybride 42/58 Hartree-Fock/DFT *Density Fonctionnal Theory*) dont les paramètres sont optimisés afin de simuler la réactivité chimique. Par la suite, les fréquences vibrationnelles ont été calculées pour valider les géométries optimisées (minima et non état de transition), ainsi que pour le calcul des enthalpies libres. Pour finir, le modèle des orbitales naturelles (NBO, *Natural Bond Orbitals*) a permis l'analyse des densités SMD (*Solvent Model Density*)-BMK/6-311++G(d,p) dans l'objectif de déterminer les énergies libres de solvation. Le modèle SMD crée une forme qui contient la molécule, ce qui permet de fournir une estimation précise de l'influence des interactions électrostatiques soluté-solvant plutôt que de les calculer une à une entre des molécules de solvant et la molécule cible.<sup>131</sup>

### B.1.3 Résultats et discussions

Le TBBPA est un dérivé tétrabromé du bisphénol A (BPA). La molécule présente deux cycles phénoliques, non conjugués entre eux (Figure 47).



**Figure 47 : Représentation des molécules de Bisphénol A et de Tétrabromobisphénol A.**

D'un point de vue électrochimique, la non-conjugaison des cycles aromatiques rend théoriquement possible une oxydation électrochimique par le transfert de deux électrons et d'un proton sur chaque cycle phénolique. Des travaux de Chan *et al.* présentent l'oxydation électrochimique du bisphénol A (BPA) faisant intervenir quatre électrons et deux protons dans un solvant aprotique en présence d'eau.<sup>132</sup> Les auteurs rapportent la formation d'une espèce doublement hydroxylée issue du passage par un intermédiaire doublement cationique (Figure 48).

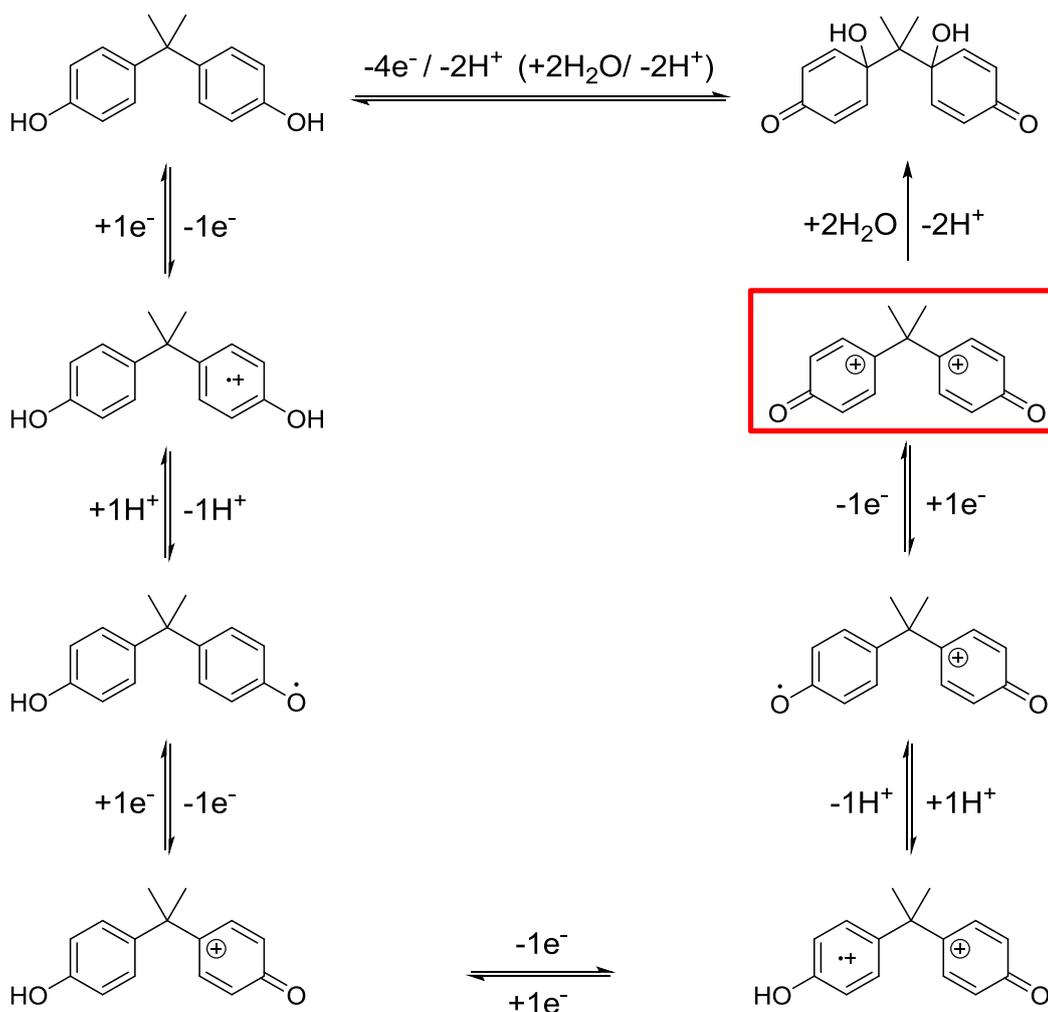


Figure 48 : Mécanisme de double oxydation électrochimique du bisphénol A présenté par Chan *et al.* Le passage par un double carbocation explique la formation de l'espèce doublement hydroxylée.<sup>132</sup>

Au vu de la similarité des structures moléculaires du BPA et du TBBPA, une espèce doublement hydroxylée durant l'oxydation électrochimique du TBBPA est attendue.

### B.1.3.1 Comportement électrochimique du TBBPA

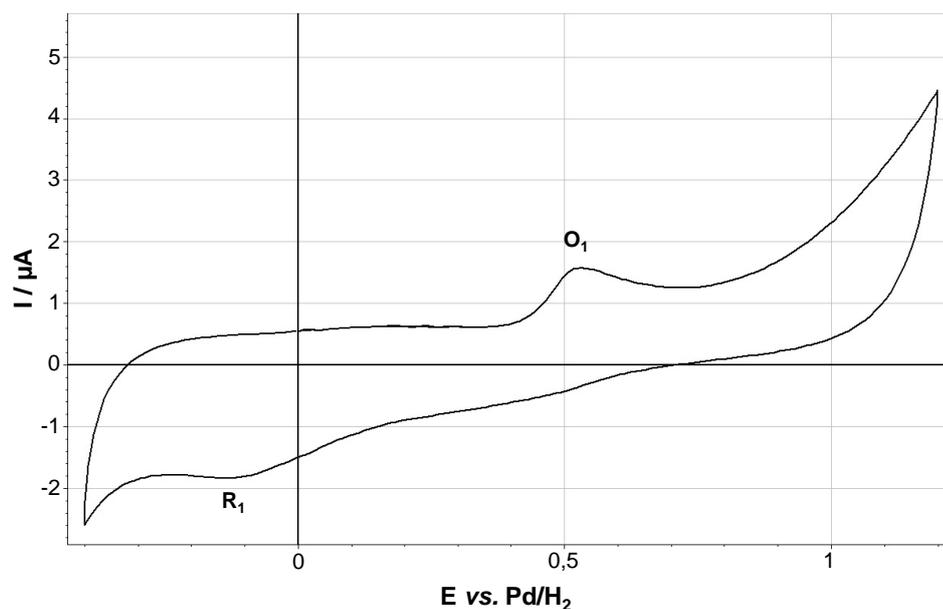
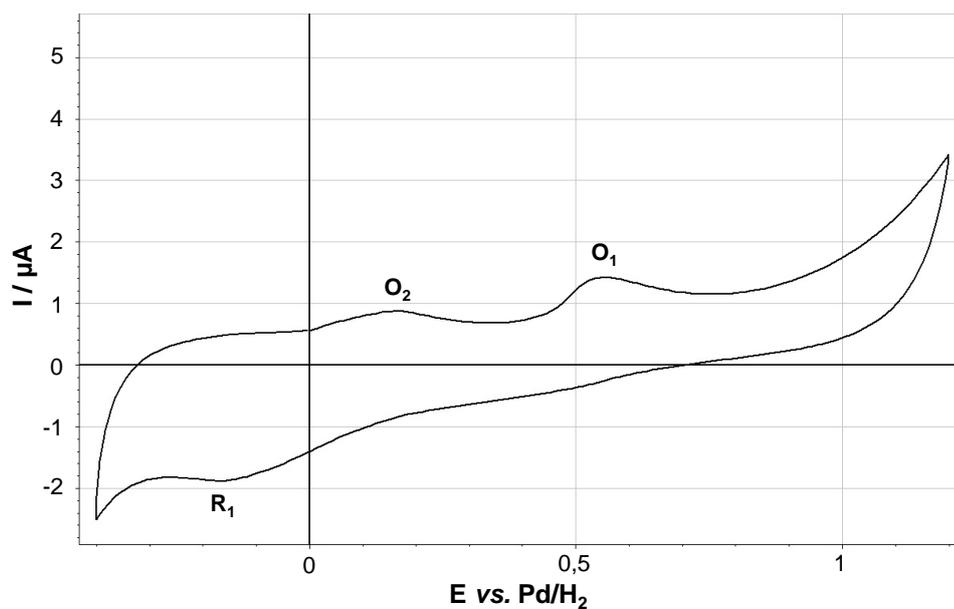
#### B.1.3.1.1 Voltampérométrie cyclique

Le comportement électrochimique du TBBPA a dans un premier temps été examiné sur une électrode de carbone vitreux dans une solution contenant 1 mmol.L<sup>-1</sup> du composé électroactif en présence d'acétate d'ammonium comme électrolyte support. Toutefois, les résultats obtenus ont mis en évidence un phénomène de passivation de l'électrode de travail à cette concentration. En effet, une diminution importante du courant lors de l'expérience de

voltampérométrie cyclique a été observée (85 % du courant perdu après le second cycle de balayage).

Dans l'état, le phénomène de passivation de l'électrode est un frein majeur pour la synthèse en flux ou non des produits d'oxydation du TBBPA (cette passivation très rapide empêche toute expérience de plusieurs heures nécessaire à la synthèse électrochimique). Les composés phénoliques sont connus pour induire ce phénomène de passivation, c'est pourquoi nous avons choisi de travailler à une concentration plus faible pour minimiser les phénomènes d'adsorption.<sup>133</sup> Un compromis entre sensibilité et adsorption a été trouvé pour une concentration de 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> en TBBPA.

La diminution du phénomène de passivation nous a permis par la suite d'étudier plus précisément le comportement électrochimique du TBBPA. Le voltampérogramme cyclique représenté en Figure 49A met en évidence le caractère électroactif du TBBPA. En effet, au cours du premier cycle de balayage de potentiel, une vague d'oxydation O<sub>1</sub> est observée au voisinage de 550 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub>. Durant le balayage retour du premier cycle, une vague de réduction R<sub>1</sub> est observée à un potentiel d'environ -150 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub>. Toutefois, cette vague de réduction est associée à la vague d'oxydation O<sub>2</sub> qui apparaît au cours du deuxième cycle de balayage (Figure 49B) à un potentiel avoisinant les 150 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub>. Le système O<sub>2</sub>/R<sub>1</sub> constituerait un système quasi-réversible (écart de potentiel de 250 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub>) attribué à la formation d'une entité chimique formée après l'oxydation irréversible du TBBPA au potentiel de 550 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub>.

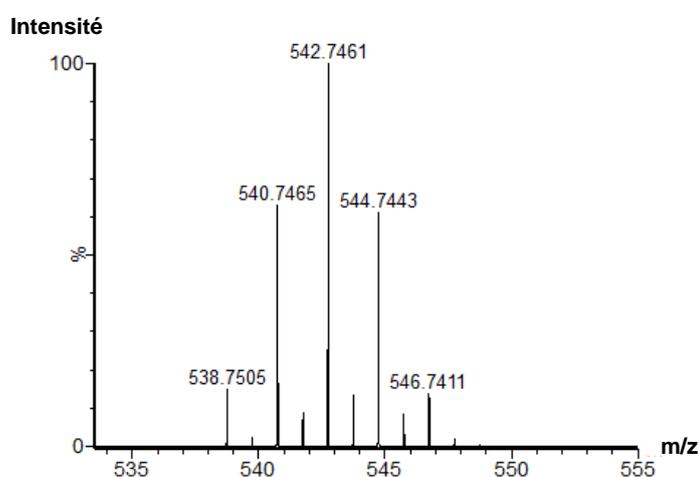
**A****B**

**Figure 49 :** Voltampérométrie cyclique du TBBPA à  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  dans un mélange eau/acétonitrile (50/50) en présence d'acétate d'ammonium ( $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) comme électrolyte support. Le balayage de potentiel se fait de  $-0,4\text{V}$  à  $1,2 \text{ V vs. Pd/H}_2$  à la vitesse de  $50 \text{ mV.s}^{-1}$ . En (A) premier cycle de balayage et en (B) le second cycle.

Afin d'identifier les réactions associées aux vagues  $O_1$ ,  $R_2$  et  $O_2$ , nous avons réalisé des expériences d'électrolyse à potentiel constant du TBBPA en milieu stationnaire et en flux ( $\mu\text{PrepCell}^{\text{TM}}$  présentée dans la partie B.3.2.2.2).

### B.1.3.1.2 Signaux en spectrométrie de masse du TBBPA

Une analyse préliminaire d'un échantillon de TBBPA sans oxydation électrochimique a été réalisée afin d'observer son comportement en spectrométrie de masse. En effet, la présence d'atomes de brome engendre l'apparition sur le spectre SM d'un massif isotopique caractéristique. L'atome de brome possède 32 isotopes connus, avec des nombres de masse variant de 66 à 97. Parmi ces isotopes, seulement deux sont stables, le  $^{79}\text{Br}$  et le  $^{81}\text{Br}$  et constituent l'ensemble du brome naturel en proportions approximativement équivalentes (51/49). C'est pourquoi le signal en spectrométrie de masse d'un complexe multibromé comme le TBBPA apparaît sous la forme d'un massif isotopique complexe (Figure 50).



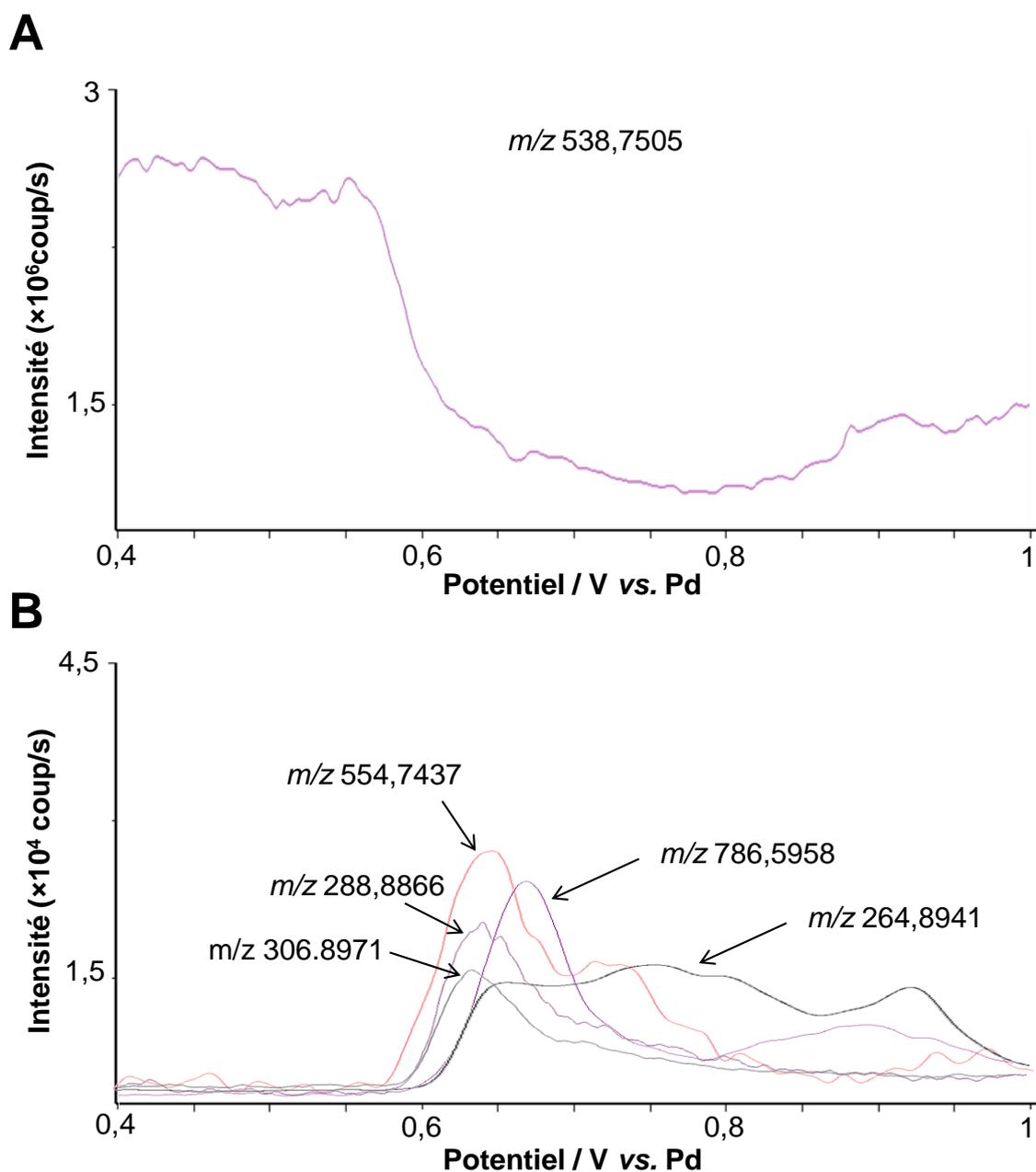
**Figure 50 : Spectre du TBBPA correspondant à l'ion  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .**

Dans le cas du TBBPA, la présence de quatre atomes de Brome engendre un massif isotopique composé de cinq signaux d'intensités respectives 1/4/6/4/1. Afin de faciliter l'analyse des expériences CE-SM et CE-CL-SM nous avons choisi de ne prendre en compte que le pic mono-isotopique (constitué uniquement de  $^{79}\text{Br}$ ) de chaque molécule. Néanmoins, l'allure du massif isotopique de chaque produit d'oxydation étudié sera comparée au massif théorique attendu en fonction de sa formule brute (nombre d'atome de bromes principalement).

### B.1.3.1.3 Voltampérométrie massique

Les résultats de l'expérience CE-SM en ligne nous permettent de corréler l'intensité d'un ion  $m/z$  donné en fonction du potentiel appliqué à l'électrode de travail. L'évolution de cette intensité nous apporte des informations essentielles sur l'aspect mécanistique de la réaction électrochimique. Comme le montre la Figure 51A, le voltampérogramme massique du  $m/z$

538,7505 associé au pic mono-isotopique du TBBPA décroît significativement avec l'augmentation du potentiel à l'électrode de travail confirmant son oxydation. Cette diminution débute aux alentours de 550 mV vs. Pd/H<sub>2</sub> (ce qui corrèle bien avec le potentiel d'oxydation du TBBPA) avant d'atteindre un plateau vers 700 mV.



**Figure 51 :** En (A) signal extrait du  $m/z_{\text{mono-isotopique}}$  538,7505 correspondant au TBBPA, en (B) les  $m/z_{\text{mono-isotopique}}$  des produits d'oxydation électrochimique. L'ensemble des voltampérogrammes massiques est représenté en fonction du potentiel imposé à l'électrode de travail.

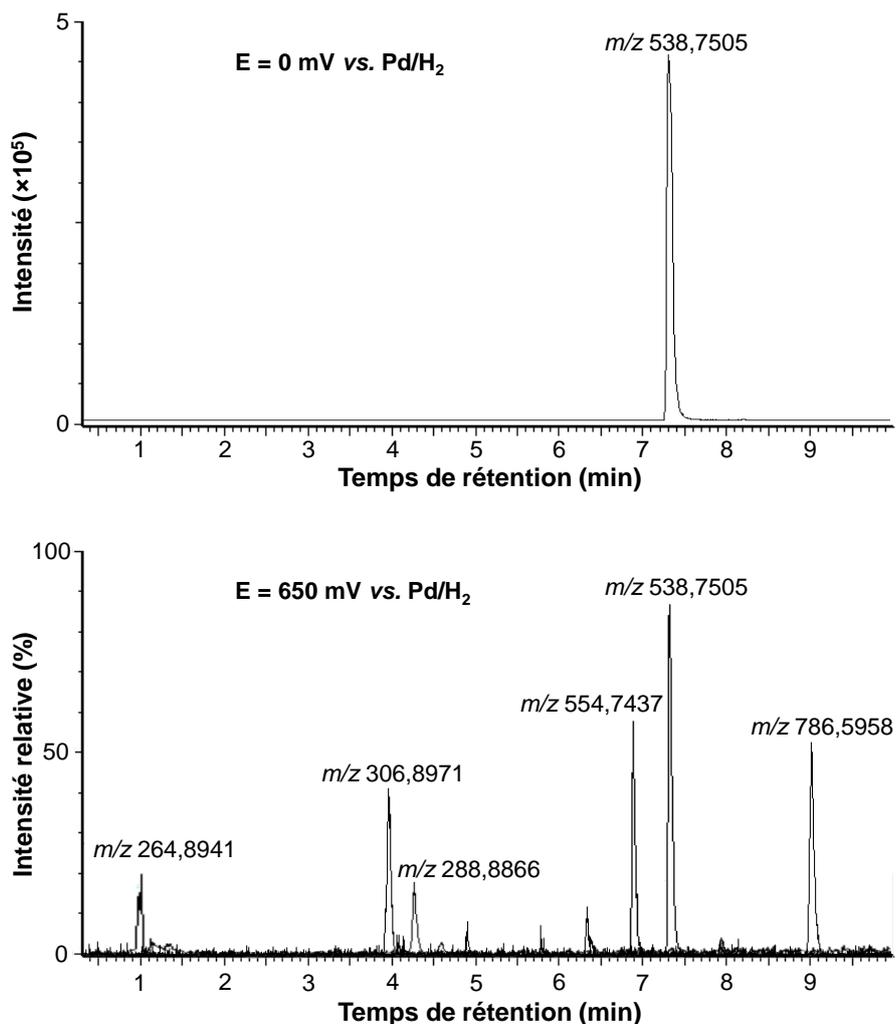
L'effet du potentiel sur les produits d'oxydation du TBBPA est tout aussi significatif. La Figure 51B montre l'apparition des différents produits d'oxydation en corrélation avec la

diminution d'intensité du signal du TBBPA. En effet, cinq espèces voient les intensités des signaux associés augmenter un peu avant 600 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub>, ce qui fait penser à une corrélation entre leur formation et l'oxydation électrochimique du TBBPA.

Afin de s'assurer que les produits d'oxydation identifiés lors de l'expérience CE-SM en ligne sont bien formés par l'oxydation électrochimique du TBBPA et non au sein de la source d'ionisation du spectromètre de masse, les analyse CL-SM(HR) d'une solution de TBBPA oxydée sont nécessaires.

#### B.1.3.1.4 Analyses CL-SM(HR) d'une solution de TBBPA oxydée

L'oxydation du TBBPA a été conduite à 650 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub> afin d'obtenir une efficacité maximum de la production de produit d'oxydation. L'analyse CL-SM(HR) d'un échantillon de TBBPA ayant subi une oxydation électrochimique au potentiel constant de 650 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub> montre l'apparition de pics chromatographiques correspondant aux *m/z* présentés précédemment (Figure 52).



**Figure 52 :** En haut, chromatogramme extrait d'un échantillon sans oxydation pour le  $m/z_{\text{mono-isotopique}}$  538,7505 correspondant au TBBPA. En dessous, le chromatogramme extrait pour les  $m/z_{\text{mono-isotopique}}$  des différents produits d'oxydation et du TBBPA sur un échantillon oxydé électrochimiquement. L'intensité des pics correspondant aux produits d'oxydation est multipliée par 100.

L'apparition de ces entités chimiques est corrélée avec la diminution du pic mono-isotopique du TBBPA. Pour des raisons pratiques, nous appellerons par la suite TB<sub>n</sub> (n= 1, 2, 3, 4 ou 5) les produits d'oxydation formés. Les temps de rétention sont compris entre 0,9 et 9,1 minutes avec une séparation satisfaisante entre les pics (écart minimum 0,4 minute). La présence de pics chromatographiques indépendants entre eux pour les différents produits d'oxydation observés lors du couplage CE-SM indique leur formation durant la réaction d'oxydation électrochimique du TBBPA.

La suite de l'étude a porté sur l'identification structurale des produits d'oxydation afin d'établir un mécanisme d'oxydation électrochimique du TBBPA. Pour cela, l'obtention de la composition élémentaire ainsi que des analyses CL-SMSM sont nécessaires. Toutefois, de

possibles espèces intermédiaires réactives peuvent être formées sans pour autant être détectées. Ces espèces peuvent être stabilisées et observées grâce à des réactions de piégeages chimiques.

### B.1.3.2 Elucidation structurale des produits d'oxydation

#### B.1.3.2.1 Compositions élémentaires

L'identification structurale a été réalisée dans un premier temps par l'obtention de leur composition élémentaire sur le pic mono-isotopique (Tableau 2).

**Tableau 2 : Composition élémentaire du TBBPA et de ses produits d'oxydation.**

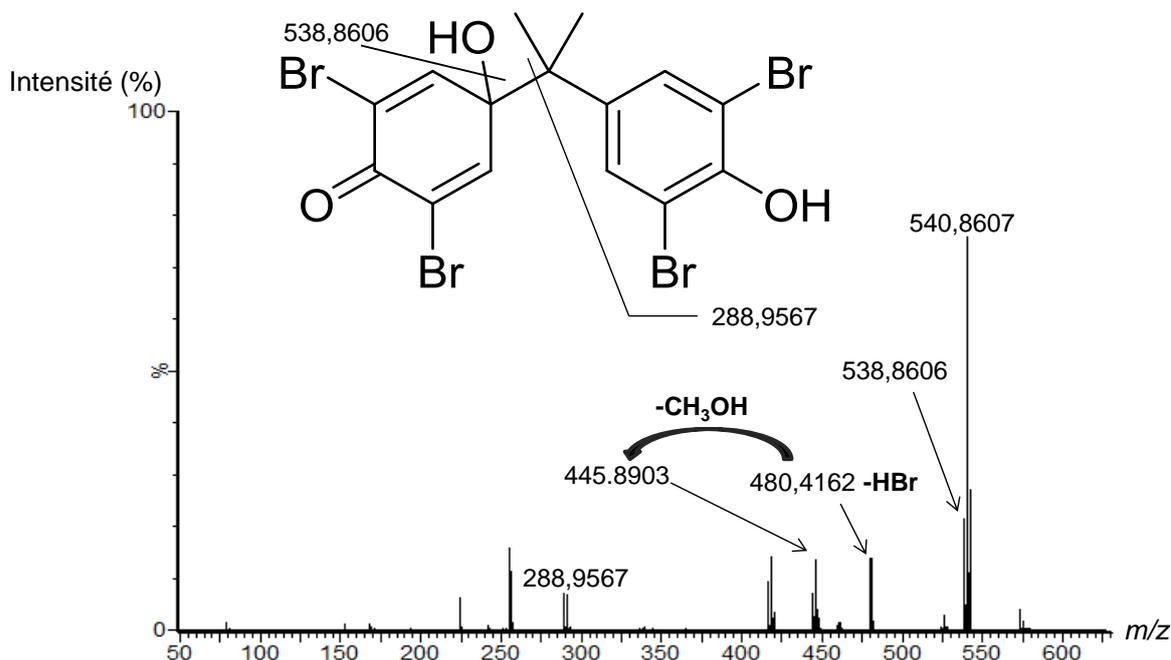
Composé	Ion	$m/z_{\text{expérimentale}}$ (Da)	$m/z_{\text{calculé}}$ (Da)	$\Delta_{m/z}$ (ppm)	Temps de rétention (min)	Composition élémentaire
TBBPA	[M-H] <sup>-</sup>	538,7505	538,7493	2,2	7,4	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> <sup>79</sup> Br <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
TB <sub>1</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	554,7437	554,7442	0,9	6,9	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> <sup>79</sup> Br <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
TB <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	288,8866	288,8864	0,7	4,3	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> <sup>79</sup> Br <sub>2</sub> O
TB <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	264,8941	264,8950	3,4	0,9	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> <sup>79</sup> Br <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
TB <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	786,5958	786,5965	0,9	9,1	C <sub>21</sub> H <sub>14</sub> <sup>79</sup> Br <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
TB <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	306,8971	306,8969	0,7	3,9	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> <sup>79</sup> Br <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Dans l'état, l'analyse élémentaire seule ne permet pas de donner une structure moléculaire fiable pour les produits d'oxydation. Toutefois, la comparaison des compositions élémentaires entre les produits d'oxydation et la molécule mère permet d'orienter l'identification structurale. De plus, en s'appuyant à la fois sur les analyses CL-SMSM avec l'interprétation des différentes fragmentations ainsi que la littérature nous avons pu élucider la structure chimique de chacun des produits d'oxydation.

#### B.1.3.2.2 Analyses CL-SMSM

L'ensemble des structures chimiques des produits d'oxydation du TBBPA ont été élucidées par l'interprétation des spectres de fragmentations SMSM en accord avec les compositions élémentaires. En effet, la différence de composition élémentaire entre le TBBPA et le TB<sub>1</sub> par exemple correspond à l'insertion d'un atome d'oxygène ( $\Delta m = 16$  Da). La présence de cet atome d'oxygène est sensiblement due à l'hydroxylation d'une des positions aromatiques suite à l'oxydation électrochimique d'une des fonctions phénols, ce qui

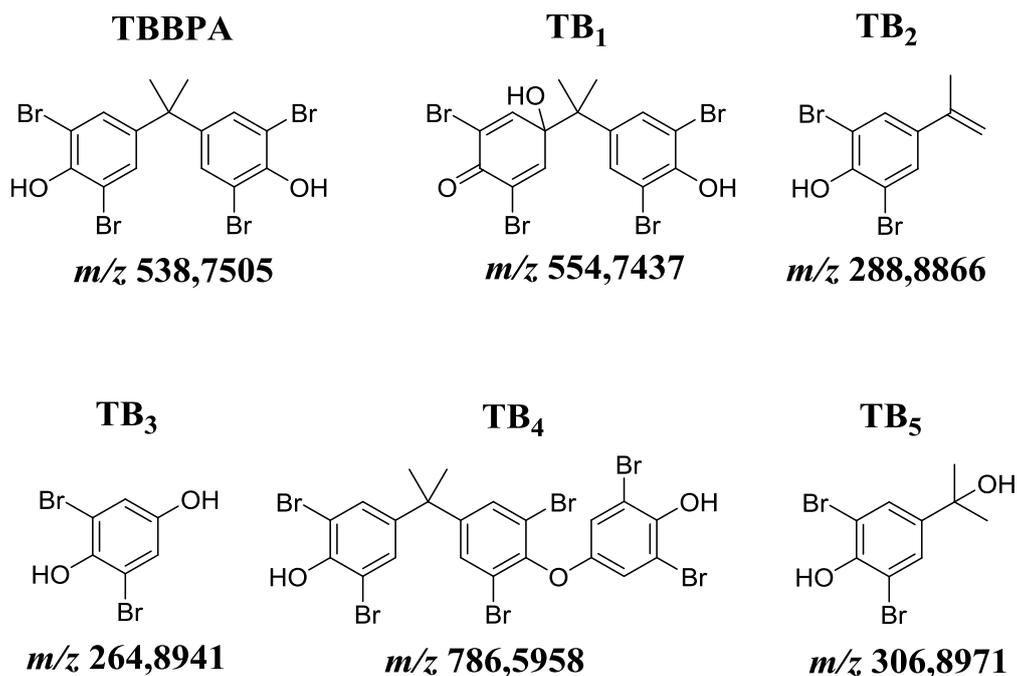
doit être confirmé par l'analyse SMSM. La Figure 53 présente le spectre SMSM du produit d'oxydation TB<sub>1</sub> (*m/z* 554,7437).



**Figure 53 : Spectre SMSM pour le *m/z* 554,7 correspondant au produit d'oxydation TB<sub>1</sub>.**

Une méthodologie similaire a été appliquée aux autres produits d'oxydation du TBBPA (les spectres SMSM des produits d'oxydation TB<sub>2</sub>, TB<sub>3</sub>, TB<sub>4</sub> et TB<sub>5</sub> sont donnés en Annexe). Ceci nous a permis d'élucider la structure moléculaire des produits d'oxydation présentés en Figure 54.

L'élucidation des structures moléculaires des produits d'oxydation du TBBPA sont en accord avec des travaux rapportant l'oxydation du TBBPA par d'autres procédés que l'électrochimie, tels que la dégradation bactérienne,<sup>128</sup> biologique,<sup>134</sup> chimique (solution aqueuse de permanganate)<sup>135</sup> ou bien encore par photochimie.<sup>136</sup> En effet, aucune étude à ce jour ne rapporte l'élucidation structurale et mécanistique d'une oxydation électrochimique du TBBPA.



**Figure 54 : Structure chimique du TBBPA et de ses produits d'oxydation élucidée par analyse de la composition élémentaire et CL-SMSM.**

L'obtention des structures moléculaires des produits de réactions doit nous permettre par la suite de proposer un mécanisme d'oxydation électrochimique du TBBPA. Toutefois, comme nous l'avons présenté dans la partie B3.3, Chan *et al.* ont observé la formation d'une espèce doublement hydroxylée durant l'oxydation du BPA.<sup>132</sup> En effet, la présence de deux systèmes phénoliques non conjugués sur la molécule de TBBPA rend théoriquement possible une double oxydation au niveau des fonctions phénols (oxydation à quatre électrons et deux protons) pour aboutir à un intermédiaire dicationique. Toutefois, que ce soit lors des expériences CE-CL-SM ou CE-SM en ligne, nous avons toujours constaté l'absence du produit doublement hydroxylé, au contraire de l'espèce mono-hydroxylée (TB<sub>1</sub>). De plus, dans la partie B.3.3.4.3, l'allure du voltampérogramme massique du produit d'oxydation TB<sub>1</sub> sera discutée, ce qui peut expliquer l'absence du produits d'oxydation doublement hydroxylé.

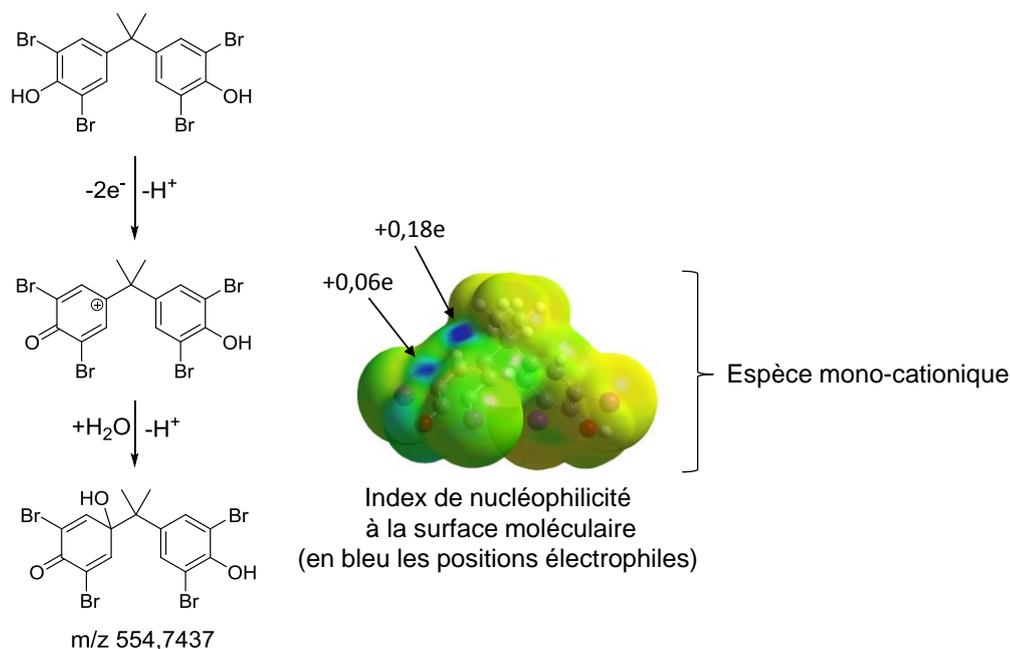
Dans la partie qui suit, des calculs théoriques ont été mis en œuvre afin de mieux comprendre l'absence du dication, qui conduit à la formation de l'espèce doublement hydroxylée.

### B.1.3.3 Calcul théorique expliquant l'absence du produit doublement hydroxylé.

Les corrélations entre les données expérimentales et celles obtenues par simulation *ab initio* sont de plus en plus exploitées pour fournir un aperçu du comportement électrochimique d'espèces électroactives.

Les calculs théoriques ont été effectués sur une structure moléculaire optimisée par l'analyse de la diffraction des rayons X de TBBPA cristallisé.<sup>137</sup> Du point de vue énergétique, les calculs théoriques mettent en évidence la formation de l'espèce mono-hydroxylée par oxydation électrochimique du TBBPA. La formation de cette espèce est rendue possible par l'oxydation à deux électrons et un proton de la fonction phénol, qui aboutit à un intermédiaire cationique. Cet intermédiaire subit par la suite une attaque nucléophile par une molécule d'eau, donnant ainsi l'entité TB<sub>1</sub>.

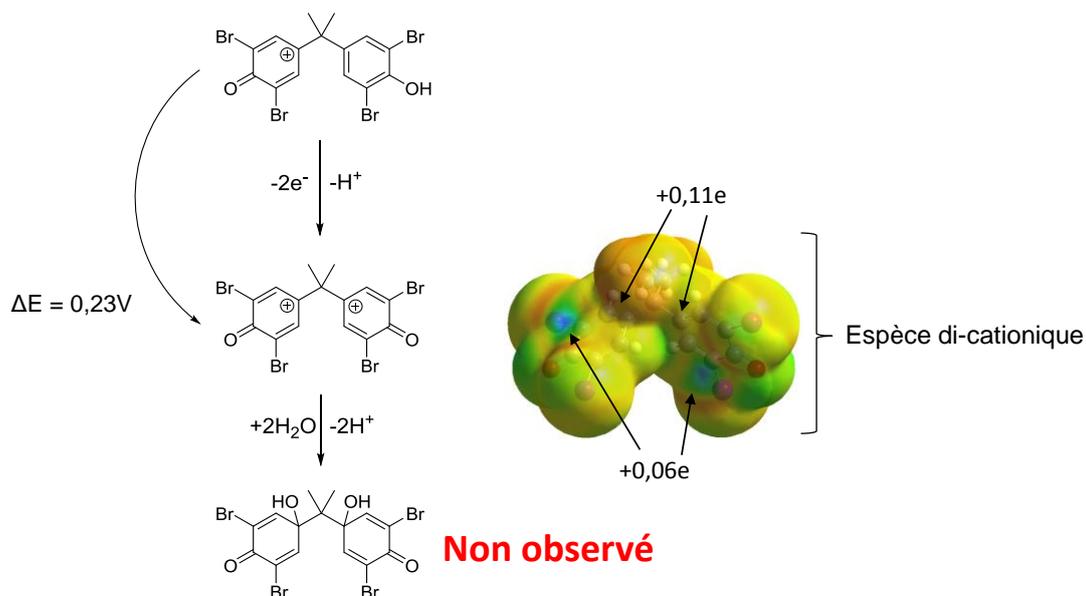
De plus, l'exploitation de la fonction de Fukui nous renseigne sur l'index de nucléophilicité à la surface moléculaire de l'espèce mono-cationique. Cet indice nous informe sur le caractère électrophile de chaque atome dans la molécule. Deux positions peuvent faire l'objet d'une attaque par une entité nucléophile, typiquement une molécule d'eau. Ces deux positions sont le carbone portant la fonction cétone et le carbone en *para* de cette fonction. Toutefois, au vu des indices de Fukui obtenus, l'addition se fera principalement sur le carbone en *para* (de la fonction benzoquinone), comme l'indique la Figure 55. Ceci confirme à la fois la structure chimique du composé mono-hydroxylé, mais également le mécanisme de mono-hydroxylation.



**Figure 55 :** Représentation du mécanisme de mono-hydroxylation par oxydation électrochimique du TBBPA. L'observation de l'index de Fukui valide la position où l'addition nucléophile est réalisée.

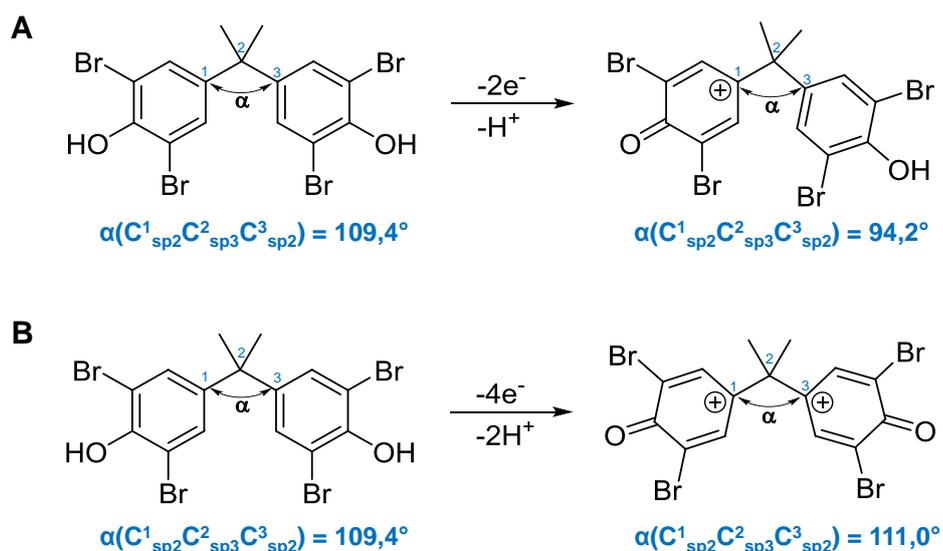
Afin d'évaluer la possibilité de deux oxydations parallèles du TBBPA,<sup>132</sup> des expériences de calculs théorique utilisant la même stratégie ont été entrepris sur la structure de l'intermédiaire conduisant à la formation de l'espèce doublement hydroxylée.

Les énergies obtenues pour le TBBPA doublement chargé ne contredisent pas la formation d'un intermédiaire réactionnel di-cationique par électrochimie. En effet, la différence de potentiel entre les formes mono et di-cationique n'est que de  $\Delta E = 0,23\text{ V}$ . L'interprétation des indices de Fukui indique une plus grande électrophilie des carbones en *para* de chaque fonction benzoquinone (Figure 56). Toutefois, nous constatons que la valeur d'électrophilie de ces carbones a diminué lors du passage au di-cation, ce qui peut potentiellement expliquer le manque de réactivité de ces positions lors d'une attaque nucléophile par une molécule d'eau. Cependant, la diminution de l'électrophilie des carbones en *para* n'est pas la seule raison qui peut expliquer l'absence de l'espèce doublement hydroxylée.



**Figure 56 : Passage du mono-cation au di-cation par oxydation électrochimique du TBBPA. L'index de Fukui indique les positions les plus électrophiles de l'espèce di-cationique.**

En effet, la mesure de l'angle de liaison entre les deux carbones en *para* et le carbone portant les deux groupements méthyle (hybridation respective des trois atomes de carbone  $sp^2sp^3sp^2$ ) nous apporte une information essentielle. Comme nous l'avons indiqué ci-dessous, la charge positive est, après la première étape d'oxydation du TBBPA, localisée sur le carbone en *para* de la fonction benzoquinone. La présence de cette charge positive induit une attraction électrostatique entre les deux cycles aromatiques, provoquant une diminution de l'angle de liaison entre ces trois carbones. Cette diminution angulaire engendre un éloignement spatial des groupements méthyles vis-à-vis du carbone portant la charge, ce qui facilite l'accès par une espèce nucléophile peu encombrante telle qu'une molécule d'eau, comme l'indique la Figure 57A.



**Figure 57 :** (A) mesure de l'angle  $\alpha$  entre les trois carbones pour l'espèce mono-cationique, (B) mesure de l'angle  $\alpha$  pour l'espèce bi-cationique.

Des mesures similaires ont été effectuées sur l'espèce di-cationique après optimisation de sa structure géométrique. Nous constatons une augmentation de la valeur angulaire entre les trois carbones, qui s'explique par une répulsion électrostatique de deux cycles aromatiques en présence des charges positives. Cette répulsion induit un rapprochement stérique des groupements méthyle vis-à-vis des carbones portant la charge, rendant l'accès par une entité nucléophile impossible par gêne stérique (Figure 57B). Comme précédemment, une simulation mettant en œuvre une attaque nucléophile par une molécule d'eau a mis en lumière l'impossibilité d'accès par l'espèce nucléophile des positions électrophiles par gêne stérique pour l'espèce di-cationique.

L'ensemble des simulations *ab initio* a permis de mieux comprendre pourquoi l'espèce doublement hydroxylée n'est pas formée durant nos expériences d'oxydation électrochimique du TBBPA. Toutefois, l'influence des atomes de brome n'a pas été évoquée et peut également permettre de justifier l'absence de l'espèce doublement hydroxylée durant la réaction électrochimique.

#### B.1.3.4 Mécanisme d'oxydation électrochimique du TBBPA

Comme mentionné dans la partie B.3.3.1.4, l'oxydation électrochimique du TBBPA à potentiel constant conduit à la formation de cinq entités chimiques. L'élucidation mécanistique de l'oxydation électrochimique de TBBPA doit se faire en accord avec les voltampérogrammes massiques présentés dans la partie B.3.3.1.3.

### B.1.3.4.1 Formation des produits d'oxydation TB<sub>1</sub>, TB<sub>2</sub>, TB<sub>3</sub> et TB<sub>4</sub>

La première étape d'oxydation du TBBPA fait intervenir le transfert de deux électrons et d'un proton, conduisant à la formation d'un intermédiaire carbocationique, discuté partie B3.3.3.1. Par la suite, une attaque nucléophile par une molécule d'eau génère l'entité TB<sub>1</sub> (*m/z* 554,7437). Toutefois, l'intermédiaire carbocationique peut également être engagé dans une réaction de scission intramoléculaire, aboutissant à la formation d'un nouvel intermédiaire cationique et de l'espèce TB<sub>2</sub> (*m/z* 288,8866). L'intermédiaire cationique ainsi formé durant la scission peut à son tour réagir soit avec une molécule d'eau, soit avec une molécule de TBBPA présente en solution pour former les produits d'oxydation TB<sub>3</sub> (*m/z* 264,8941) et TB<sub>4</sub> (*m/z* 786,5958), comme l'indique la Figure 58A.

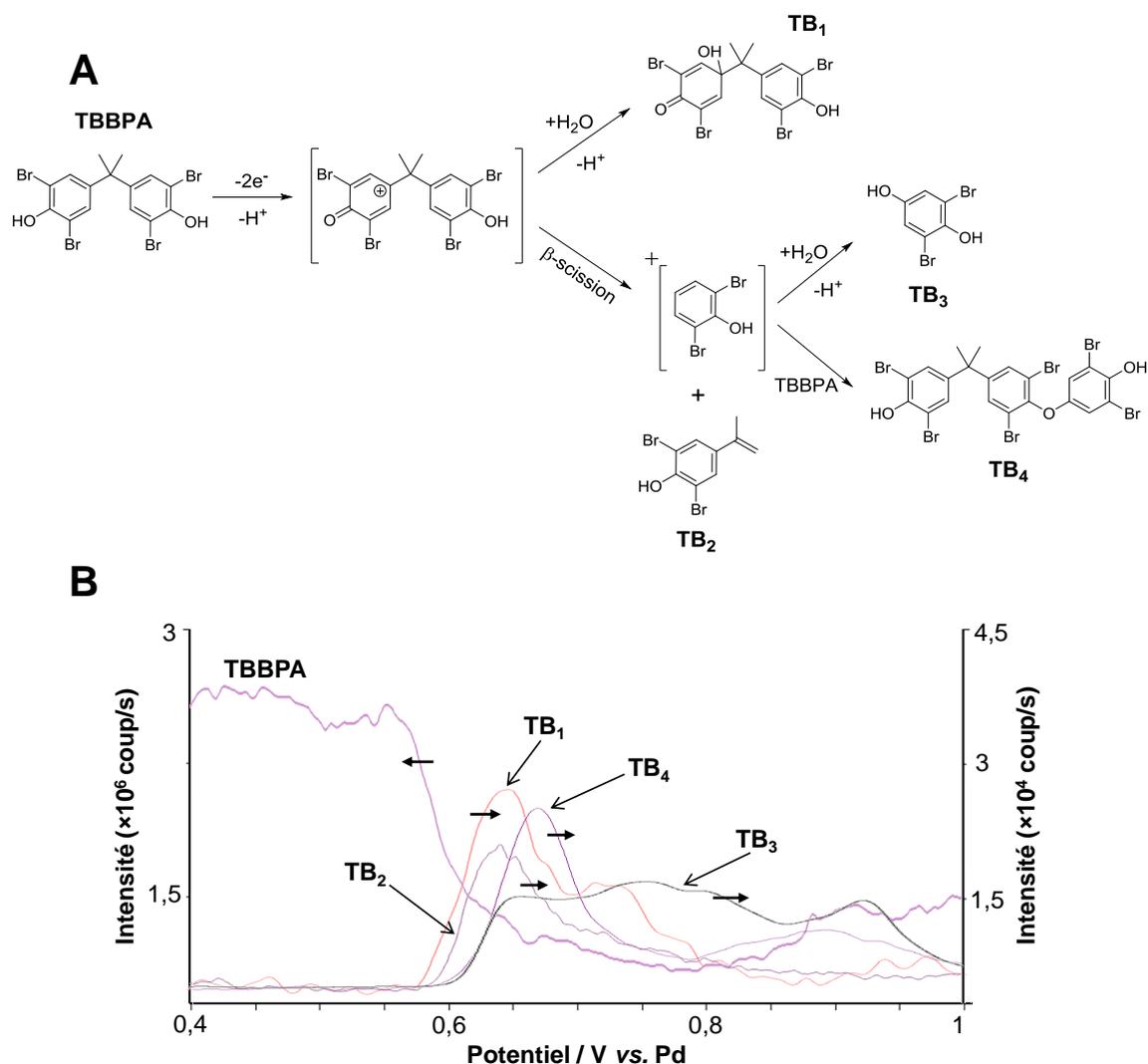
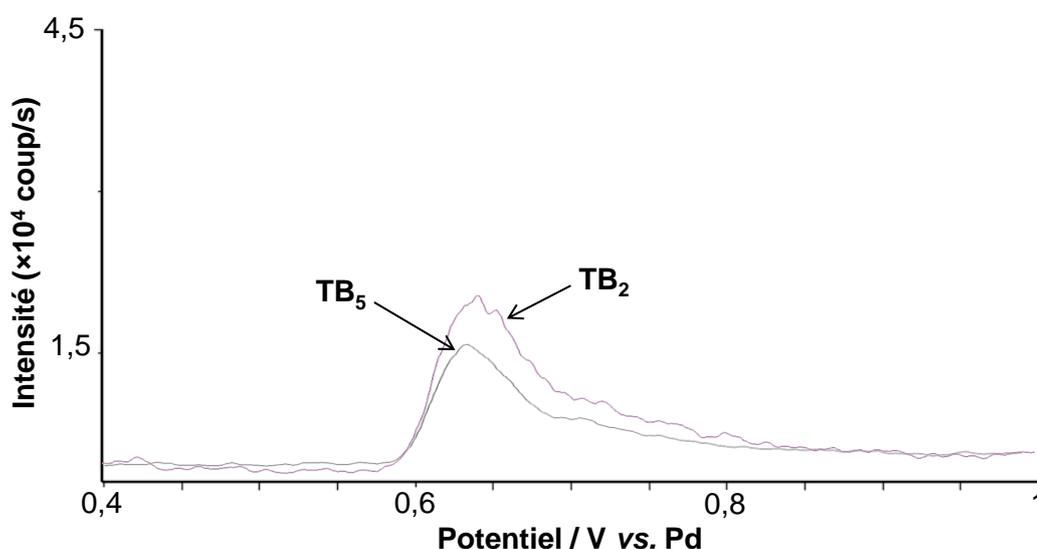


Figure 58 : (A) Mécanisme d'oxydation électrochimique du TBBPA expliquant la formation des produits d'oxydation TB<sub>1</sub>, TB<sub>2</sub>, TB<sub>3</sub> et TB<sub>4</sub>. (B) Voltampérométrie massique extraite des *m/z* correspondant au TBBPA et aux produits d'oxydation considérés.

La diminution d'intensité d'un  $m/z$  considéré durant l'augmentation du potentiel appliqué à l'électrode de travail peut s'expliquer soit par des réactions secondaires d'électrochimie, ou par des réactions chimiques en solution.

#### B.1.3.4.2 Comportement de l'entité TB<sub>2</sub> : formation de TB<sub>5</sub>

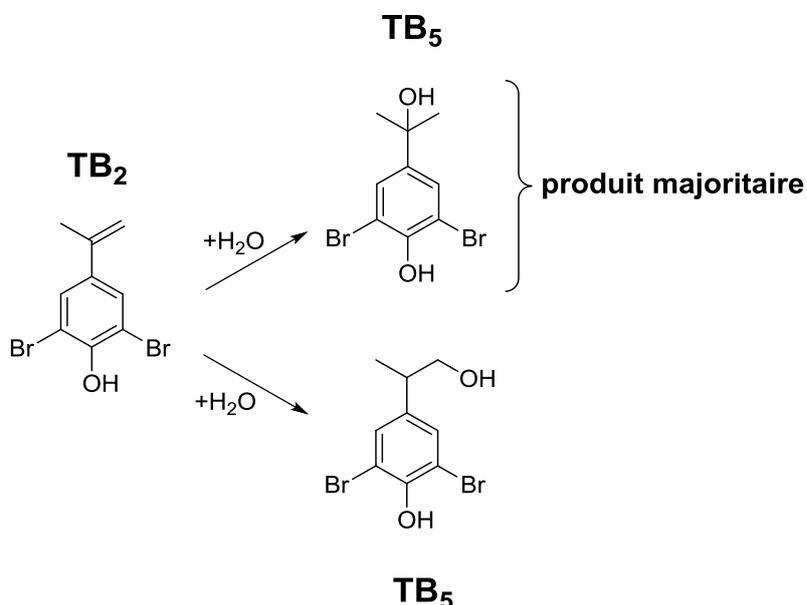
En ce qui concerne l'entité TB<sub>2</sub>, on observant le voltampérogramme massique correspondant à son  $m/z$ , nous constatons un comportement similaire à celui de l'entité TB<sub>5</sub>, comme l'indique la Figure 59.



**Figure 59 : Signaux extraits des  $m/z$  288,8866 et 306,8971 correspondant aux produits d'oxydation TB<sub>2</sub> et TB<sub>5</sub>, représentés en fonction du potentiel imposé.**

Le comportement similaire des deux entités nous oriente vers la formation de l'entité TB<sub>5</sub>, non pas par une réaction électrochimique, mais plutôt par une réaction chimique en solution de l'entité TB<sub>2</sub> (expliquant la diminution d'intensité sur le voltampérogramme massique). De plus, la présence de deux pics chromatographiques pour chaque entité écarte la formation de l'une ou l'autre dans la source d'ionisation. La différence de composition élémentaire entre les deux molécules correspond à deux atomes d'hydrogène et un atome d'oxygène. Cette différence laisse présager l'addition d'une molécule d'eau. Au vu de la structure chimique du TB<sub>2</sub>, la présence d'une double liaison laisse entrevoir une addition de type Markovnikov d'une molécule d'eau. Dans ce cas, l'addition nucléophile sur l'entité TB<sub>2</sub> conduira à la formation de deux espèces, l'une étant très majoritaire vis-à-vis de l'autre.<sup>138</sup> En effet, selon la règle de Zaitsev, le produit majoritaire est celui issu de la formation de l'intermédiaire carbocationique le plus stable formé lors de l'addition électrophile. Cette règle reste valable

lors de l'addition d'une molécule d'eau, le groupement OH se fixe sur le carbone le plus substitué, tandis que l'hydrogène se fixe à l'autre extrémité de la double liaison, comme l'indique la Figure 60.



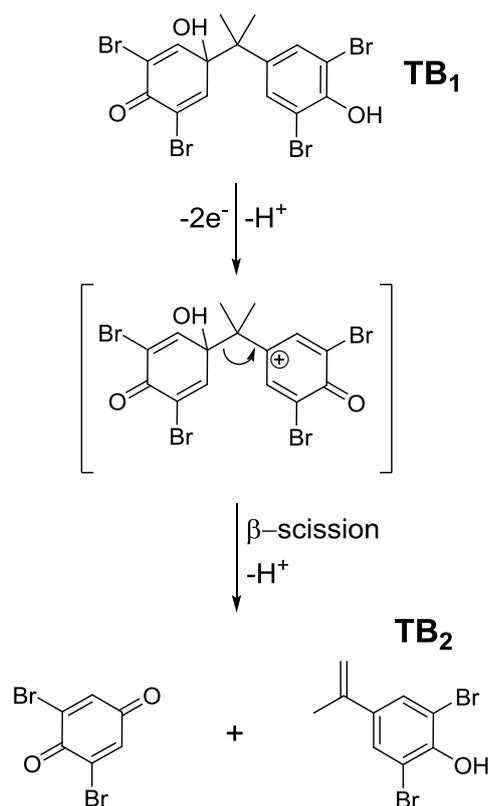
**Figure 60 : Bilan de l'addition de Markovnikov d'une molécule d'eau sur l'entité TB<sub>2</sub> conduisant à deux produits, dont l'un très majoritaire vis-à-vis de l'autre.**

L'analyse du spectre SMSM du composé TB<sub>5</sub> montre bien la perte d'un groupement H<sub>2</sub>O conduisant à l'entité TB<sub>2</sub>.

La diminution d'intensité sur le voltampérogramme massique des entités TB<sub>2</sub> et TB<sub>5</sub> est également observable sur d'autres produits d'oxydation. C'est pourquoi, dans la suite de notre étude nous nous sommes attachés à élucider les différentes réactions mise en jeu sur les produits d'oxydation du TBBPA lors de l'augmentation du potentiel appliqué à l'électrode de travail.

#### B.1.3.4.3 Comportement électrochimique de l'espèce TB<sub>1</sub>

La diminution d'intensité du produit TB<sub>1</sub> débute aux alentours de 0,65 V vs Pd/H<sub>2</sub>. Au vu de la structure chimique de l'espèce TB<sub>1</sub>, la présence d'une fonction phénol rend possible un second processus d'oxydation faisant intervenir la perte de deux électrons et d'un proton. L'absence de l'espèce doublement hydroxylée présentée précédemment nous oriente vers un mécanisme de β-scission intramoléculaire. A la suite de cette scission, une déprotonation conduit à la formation de la 2,6-dibromobenzoquinone et de l'entité TB<sub>2</sub> (Figure 61).



**Figure 61 : Mécanisme d'oxydation électrochimique du TB<sub>1</sub> conduisant à la formation de la 2,6-dibromobenzoquinone et du TB<sub>2</sub>.**

L'identification de la 2,6-dibromobenzoquinone par analyse CL-SM doit nous permettre de valider ce mécanisme. Toutefois, cette espèce n'a pu être observée durant les analyses de spectrométrie de masse, ce qui peut s'expliquer soit par la difficulté d'ionisation des quinones (aucun site capable de céder un proton) ou bien par son instabilité en solution. C'est pourquoi nous avons choisi d'effectuer une réaction d'oxydation électrochimique du TBBPA en présence de glutathion, qui permet de piéger, stabiliser et observer les espèces réactives électrophiles de type quinoïde.

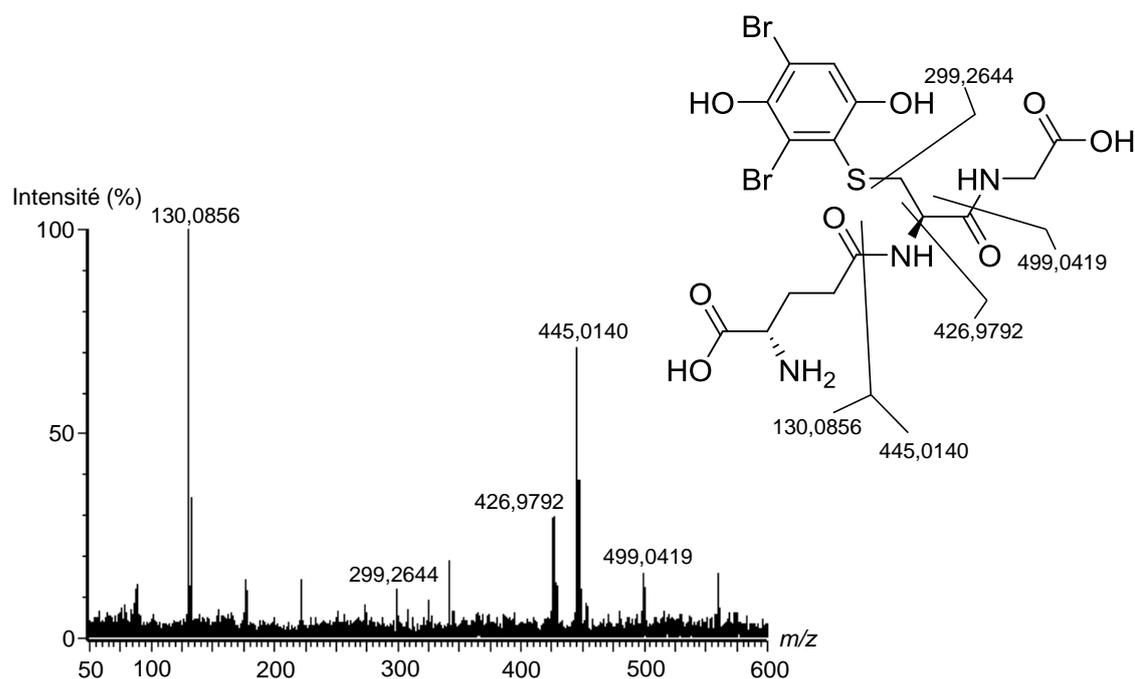
#### B.1.3.4.3.1 Identification de l'adduit glutathion de la quinone

Pour confirmer l'hypothèse mettant en jeu la formation de la 2,6-dibromobenzoquinone lors de l'oxydation électrochimique du TBBPA, et plus particulièrement de l'oxydation de l'entité TB<sub>1</sub>, une expérience de synthèse électrochimique à potentiel constant (650 mV vs. Pd/H<sub>2</sub>) a été effectuée en présence d'un large excès de glutathion (10 fois la concentration en TBBPA). L'utilisation de glutathion comme agent de piégeage nucléophile a déjà été rapportée dans la littérature.<sup>139</sup> En effet, les espèces quinones peuvent subir des additions de

Michael, engendrant la substitution d'un atome d'hydrogène aromatique par le groupement nucléophile du glutathion, jusqu'à la ré-aromatisation du cycle.<sup>108, 140</sup>

Dans un premier temps, les analyses CL-ESI-SM d'un échantillon après oxydation du TBBPA en présence de glutathion ont mis en avant la formation d'une espèce à  $[M-H]^-$  571,9 correspondant à l'adduit glutathion de la 2,6-dibromobenzoquinone. En effet, l'analyse élémentaire montre une excellente concordance entre la masse mesurée expérimentalement et la masse théorique ( $\Delta m = 3,2$  ppm,  $C_{16}H_{19}N_3O_8S_1Br_2$ ).

Pour confirmer la structure d'adduit de glutathion, des expériences de spectrométrie de masse à deux dimensions (SMSM) ont été mises en œuvre. Toutefois, les expériences CL-SMSM en ionisation négative n'ont pas permis d'obtenir un spectre de fragmentation de bonne qualité. C'est pourquoi nous avons choisi d'analyser l'échantillon contenant l'adduit en mode positif afin d'élucider la structure de l'adduit. La Figure 62 présente le spectre obtenu après la dissociation de l'ion  $[M+H]^+$  573,9 induite par collision au cours de l'expérience, ainsi que l'attribution des différents fragments observés.



**Figure 62 : Spectre SMSM de l'ion  $m/z$  573,9 correspondant à l'adduit glutathion de la quinone.**

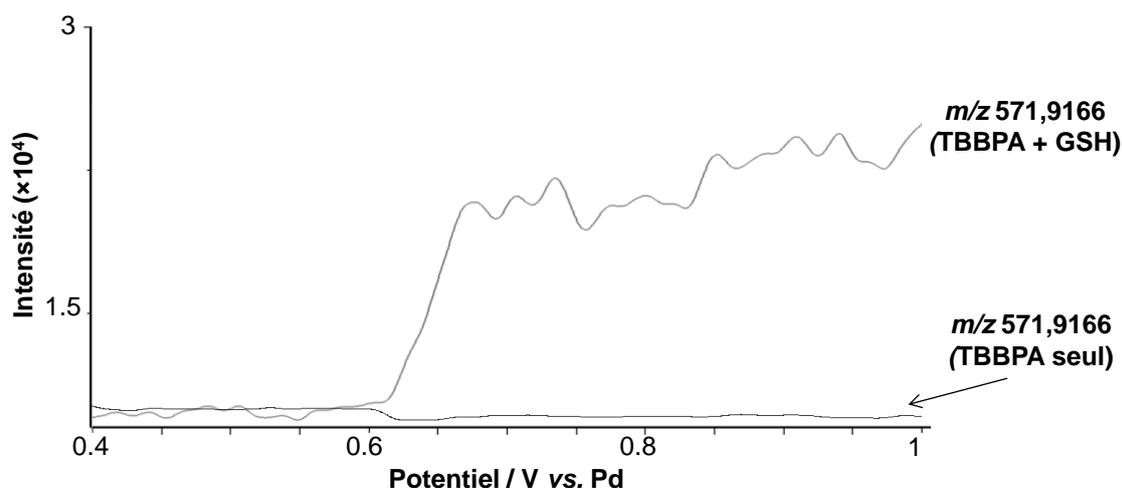
L'expérience SMSM sur l'adduit glutathion de la quinone a permis de valider la structure proposée. En effet, la perte de molécules neutres telles que la  $\gamma$ -glu-ala-gly (-275), la glycine

(-75), la glutamine (-146) ainsi que l'acide pyroglutamique (-129) sont des caractéristiques de la fragmentation SMSM d'un adduit glutathion en ionisation positive.<sup>141</sup>

Afin de valider totalement la formation de l'adduit glutathion de la quinone, nous avons réalisé des expériences de couplage direct CE-SM en présence de glutathion.

#### B.1.3.4.3.2 Observation de l'adduit glutathion par couplage CE-SM

Les expériences de couplage en ligne CE-SM ont été réalisées sur deux échantillons, l'un contenant seulement du TBBPA et l'autre un mélange de TBBPA et glutathion. Le mode d'ionisation choisi est le mode négatif afin de pouvoir comparer ces résultats à ceux obtenus en couplage indirect. L'analyse du voltampérogramme massique pour le  $m/z$  571,9166 de l'échantillon contenant du TBBPA et du glutathion montre une augmentation de l'intensité aux environs de 0,6 V vs. Pd/H<sub>2</sub>. *A contrario*, pour l'échantillon contenant seulement du TBBPA, aucune modification de l'intensité du  $m/z$  571,9166 n'est observée, comme l'indique la Figure 63.

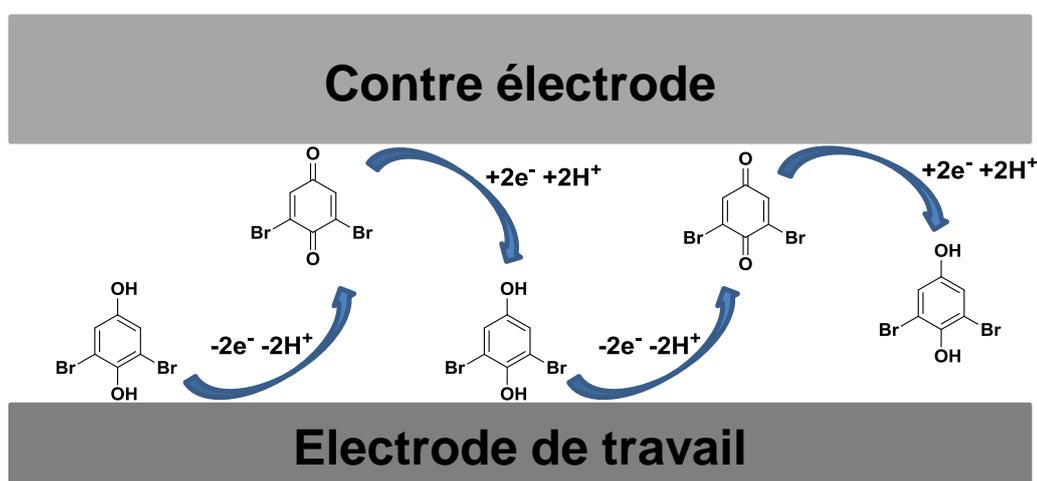


**Figure 63 :** Signal extrait du  $m/z$  571 correspondant à l'adduit glutathion de la 2,6-dibromobenzoquinone pour l'échantillon de TBBPA avec et sans glutathion, représenté en fonction du potentiel imposé.

La formation d'une quinone durant l'oxydation du TBBPA souligne une éventuelle toxicité *in vivo*. En effet, les quinones sont connues pour leur forte interaction avec des biomolécules telles que l'ADN ou les protéines.<sup>142</sup>

#### B.1.3.4.4 Comportement électrochimique de l'espèce TB<sub>3</sub>

L'entité TB<sub>3</sub> (2,6-dibromohydroquinone) générée durant la première étape d'oxydation du TBBPA a un comportement intéressant en voltampérométrie massique. Au contraire des autres produits d'oxydation, son intensité augmente puis reste constante durant l'ensemble de l'oxydation électrochimique. Ceci peut s'expliquer soit par une absence d'activité électrochimique, soit par une forte stabilité de la molécule en solution ou bien par un comportement redox particulier. En effet, l'entité TB<sub>3</sub> rentre dans un système redox réversible. La 2,6-dibromohydroquinone peut s'oxyder en 2,6-dibromobenzoquinone, qui peut elle-même se réduire en 2,6-dibromohydroquinone (réduction possible à la contre électrode durant l'expérience CE-SM en ligne). Ainsi, la stabilité du signal de l'espèce TB<sub>3</sub> s'explique par les différents cycles d'oxydation/réduction, comme l'indique la Figure 64.



**Figure 64 : Schématisation du phénomène redox mis en jeu pour l'entité TB<sub>3</sub>.**

L'étude par voltampérométrie cyclique du TBBPA (Figure 49B) laisse apparaître la formation d'un système redox réversible ( $O_2/R_1$ ) après un premier cycle d'oxydation du TBBPA. Ce système redox peut être attribué à la formation de la 2,6-dibromobenzoquinone. De plus, l'allure du voltampérogramme massique de l'adduit glutathion de la 2,6-dibromobenzoquinone (Figure 63) est similaire à celui de la 2,6-dibromohydroquinone, ce qui confirme également ce processus redox.

## B.1.4 Electrochimie vs. dégradation environnementale et/ou biologique

En 2014, Li *et al.* ont étudié le métabolisme du TBBPA dans des sols avec présence de microorganismes bactériens.<sup>128</sup> Les microorganismes vivants présents dans ce milieu engendrent des dégradations importantes du TBBPA. Les auteurs rapportent la formation de plusieurs métabolites durant la dégradation bactérienne du TBBPA tels que la 2,6-dibromohydroquinone ou bien encore les entités TB<sub>1</sub>, TB<sub>2</sub> et TB<sub>5</sub> présentées précédemment. Des travaux complémentaires de Sun *et al.* en 2004 viennent confirmer la formation de ces métabolites mais cette fois-ci par l'action d'un milieu anaérobie en présence d'organismes végétaux.

Le métabolisme *in vivo* du TBBPA a été étudié par Zalko *et al.* en 2004 par incubation du TBBPA en présence de microsomes de foie humains.<sup>134</sup> L'analyse CL-SM d'un échantillon oxydé électrochimiquement a permis de mettre en évidence la formation d'un nombre conséquent de métabolite dont beaucoup sont communs à ceux observés par dégradation environnementale ou biologique. La Figure 65 présente les métabolites observés lors des différentes dégradations du TBBPA.

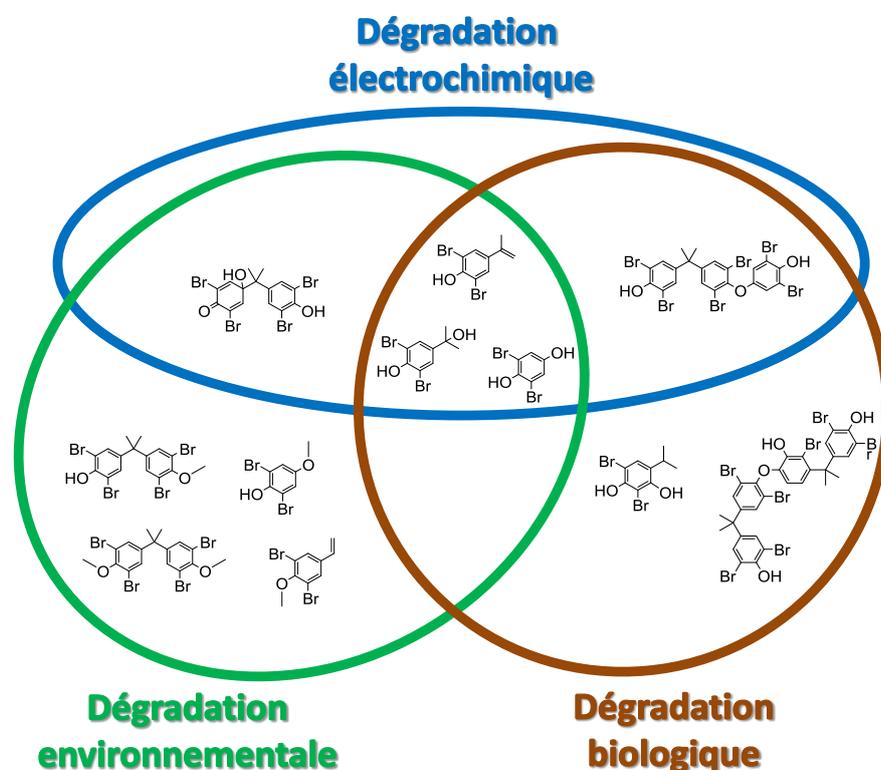


Figure 65 : Comparaison entre les dégradations environnementale, biologique et/ou électrochimique du TBBPA.

La comparaison entre ces différentes dégradations montre l'intérêt majeur de l'outil électrochimique pour la simulation du métabolisme, que ce soit environnemental ou biologique d'un xénobiotique. Toutefois, au travers de cette étude, nous constatons par exemple l'incapacité de l'outil électrochimique pour simuler des réactions d'O-méthylation observées lors de la dégradation environnementale.

## B.1.5 Conclusion

Cette étude a permis de mettre en avant les capacités du couplage entre l'électrochimie et l'analyse CE-(CL-)SM(SM) pour élucider les structures des produits d'oxydation électrochimique du TBBPA (Figure 66) afin de proposer un mécanisme de dégradation par voie électrochimique. La possibilité de générer par voie électrochimique les produits d'oxydation à partir d'une matrice simple permet de faciliter l'élucidation structurale par SMSM en comparaison avec des matrices biologiques ou environnementales. En effet, à l'exception de l'espèce benzoquinone, toutes les espèces ont pu être directement détectées et caractérisées par CL-SM/SM. Toutefois, concernant l'espèce quinone, l'observation et la caractérisation de son adduit avec le glutathion justifie pleinement sa formation.

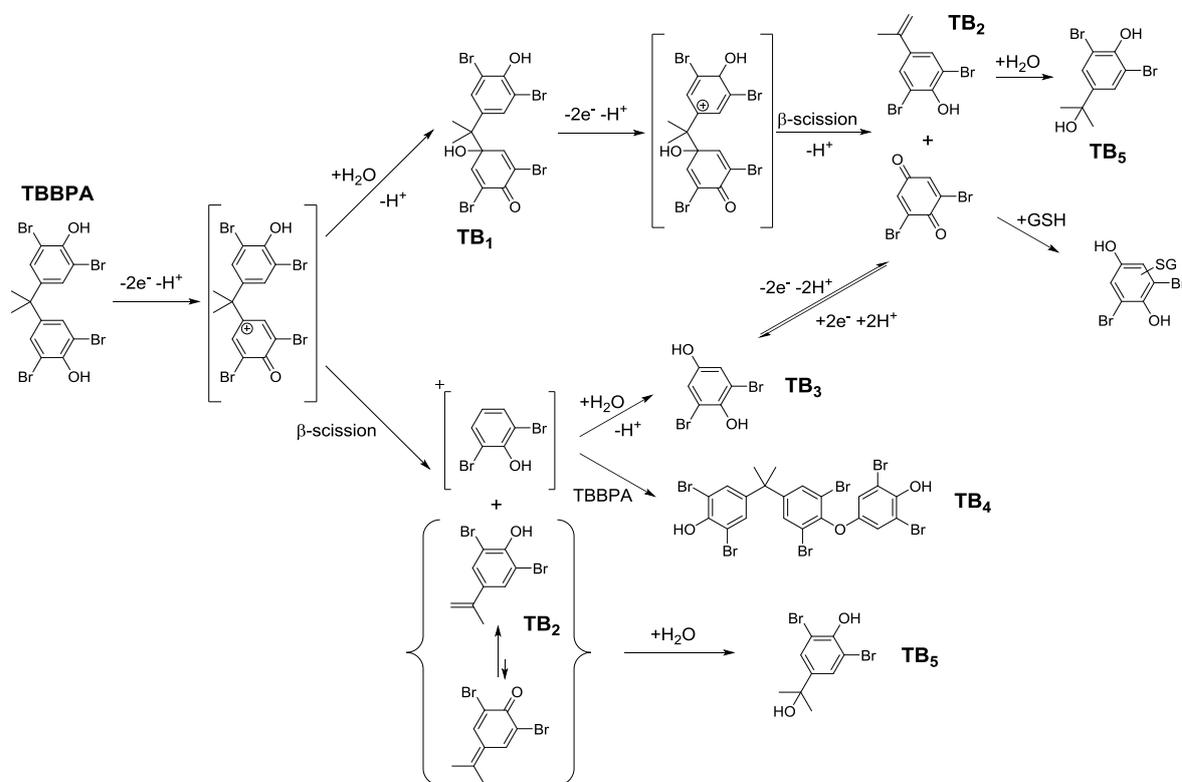


Figure 66 : Mécanisme d'oxydation du TBBPA par voie électrochimique.

De plus, cette étude a démontré les performances de l'outil électrochimique pour la simulation du devenir environnemental ou biologique d'un xénobiotique. En effet, plusieurs des métabolites identifiés au cours des expériences électrochimiques sont communs aux différentes voies de dégradation. De plus, la simplicité de mise en œuvre, ainsi que la rapidité d'analyse en font un outil de tout premier plan pour l'étude du devenir d'un xénobiotique.

Par la suite, nous avons choisi d'utiliser l'électrochimie dans le but de simuler des réactions non plus d'oxydation, mais de réduction induite par le cytochrome P450. En effet, la majorité des études rapportent l'utilisation de l'électrochimie comme outil de simulation du métabolisme oxydatif de xénobiotiques. En 2014, Bussy *et al.* présentent la simulation du métabolisme réductif de phase I et II par couplage CE-(CL-)SM.<sup>120</sup> Les auteurs rapportent l'utilité de l'électrochimie pour l'étude du métabolisme réductif de composés nitro-aromatiques.

## B.2 Métabolisme réductif de l'acide aristolochique : électrochimie vs. cytochrome P450

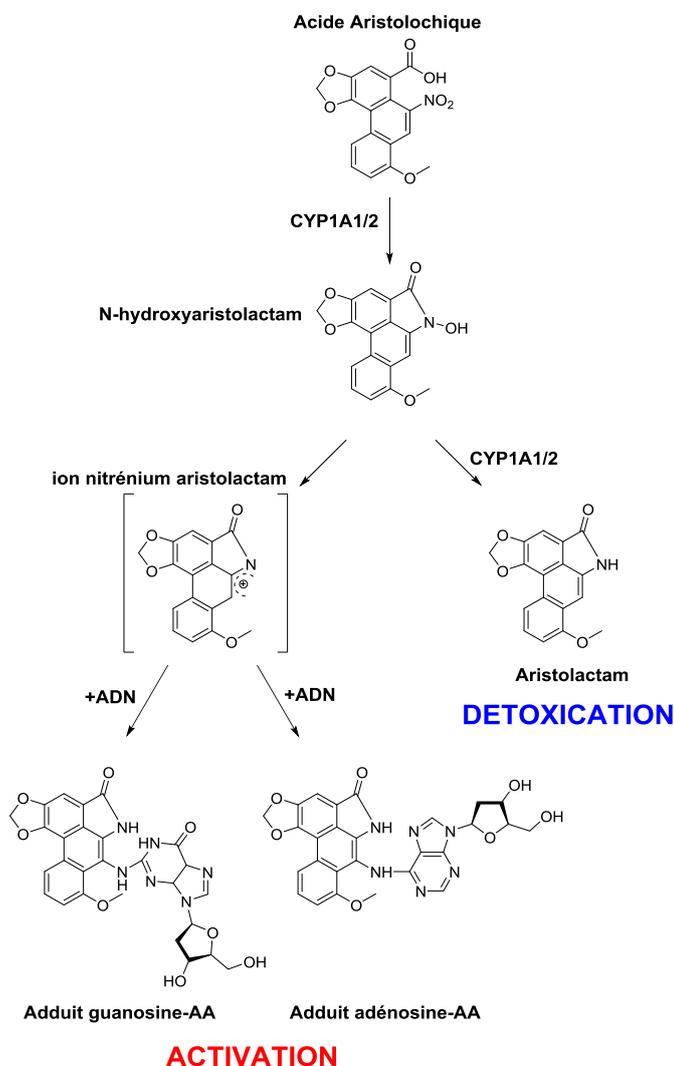
### B.2.1 Introduction

Comme nous l'avons présenté au travers des parties précédentes, l'utilisation de l'outil électrochimique cible le mime des réactions d'oxydation catalysées par le cytochrome P450, en vue de simuler le métabolisme de xénobiotiques. En effet, l'électrochimie a démontré son intérêt pour identifier certains métabolites issus des réactions catalysées par le P450. Le couplage en ligne CE-(CL)-SM représente un apport analytique pour l'identification structurale des produits de réaction, mais également pour l'étude de mécanismes réactionnels qui conduisent à la formation de ces produits de réactions électrochimiques. De plus, l'approche CE-(CL)-SM permet une identification des espèces réactives par la formation d'adduits (glutathion, N-acétylcystéine, beta-lactoglobuline A, cyanure, *etc...*). L'électrochimie peut également, hormis l'aspect « identification », être utilisée pour la production des analytes en milieu relativement peu complexe (comparé aux incubations avec des matériaux hépatiques). En effet, l'aspect purement « synthèse » de l'outil électrochimique permet le développement de systèmes à plus grande échelle (synthèse de métabolites) et aussi l'automatisation des analyses CE-CL-SM qui permettent production, séparation et identification de métabolites en ligne (criblage à haut débit).

Des études comparatives entre les mécanismes réactionnels électrochimique et enzymatique (P450) ont été rapportées.<sup>58, 113, 143</sup> La majorité de ces études compare les produits d'oxydation et métabolites par le biais d'analyses CL-SM pour des principes actifs pharmaceutiques. En 1997, Lu et al. rapportent la première voltampérométrie massique en réduction d'un composé nitro-aromatique (nitrobenzène) conduisant à l'identification d'aniline et phénylhydroxylamine en milieu aqueux et de l'anion nitro-radical en milieu anhydre.<sup>144</sup> En 2014, Bussy *et al.* rapportent l'utilisation de l'outil électrochimie dans le but de simuler le métabolisme réductif de phase I et II de deux pesticides et d'un principe actif.<sup>120</sup> Les auteurs rapportent la formation d'espèces réactives intermédiaires (nitroso et hydroxylamine), de produits de dimérisation (azo, azoxy et hydrazine) ainsi que de l'équivalent aminé des espèces chimiques étudiées. De plus, l'observation et la caractérisation par SMSM d'un adduit glutathion-nitroso met en évidence la formation d'espèces réactives. Cette méthode sera dans un deuxième temps utilisée pour la production de standards et le

développement d'une méthode quantitative supportant la comparaison entre espèces ichthyennes du métabolisme des pesticides ciblés.

Ce chapitre s'attache à la comparaison entre conversion électrochimique et biotransformation pour l'Acide Aristolochique (AA), molécule notamment identifiée dans certaines herbes médicinales chinoises. L'AA est un composé constitué d'une fonction acide carboxylique et nitro-aromatique (Figure 67). En plus de son appartenance à la liste des composés carcinogènes,<sup>145</sup> ce xénobiotique est connu pour induire des défaillances rénales importantes. L'étude du métabolisme *in vivo* de l'AA a mis en évidence la formation d'intermédiaires réactifs associés à la toxicité *in vivo* de l'AA, notamment au travers de réactions avec l'ADN (Figure 67).<sup>146</sup>



**Figure 67 :** Représentation du métabolisme *in vivo* de l'acide aristolochique initié par le cytochrome P450, expliquant sa toxicité par formation d'un intermédiaire réactif.<sup>146</sup>

Le chapitre qui suit rapporte l'utilisation du couplage CE-(CL)-SM pour la simulation du métabolisme réductif de nitro aromatiques et de la formation d'espèces réactives. L'AA est un exemple de choix pour le développement de l'outil de simulation électrochimique étant donné la formation d'espèces peu communes telles que le N-hydroxyaristolactame et l'ion nitrénium aristolactame.

## B.2.2 Matériel et méthodes

### B.2.2.1 Réactifs

L'ensemble des réactifs et solvants ont été achetés chez [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) sous les références suivantes :

- Acide aristolochique référence A5512
- Acétate d'ammonium référence 372331
- Glutathion référence G4251
- Acétonitrile référence 271004

### B.2.2.2 Electrochimie

Les différentes études par électrochimie, de la voltampérométrie cyclique à la synthèse, ont été réalisées à l'aide d'un potentiostat multicanaux VMP PerkinElmer<sup>TM</sup> instruments de [www.bio-logic.info](http://www.bio-logic.info) piloté par le logiciel ECLab version 10.32.

#### B.2.2.2.1 Voltampérométrie cyclique

L'ensemble des voltampérométries cycliques a été réalisé dans une solution préalablement dégazée dans la cellule à trois électrodes présentée dans la partie A.3.2.2. Brièvement, le potentiel est balayé linéairement de 0 à -2,5 V vs. Pd/H<sub>2</sub>.

#### B.2.2.2.2 Electrolyse en flux

La solution est continuellement injectée dans la cellule électrochimique  $\mu$ PrepCell<sup>TM</sup> comme présenté dans la partie B.1.2.2.2. Les produits de réduction sont collectés dans un vial de 2 mL et entreposés à -18 °C à l'abri de la lumière en vue d'une analyse CL-MS et CL-

SMSM ultérieure. Les caractéristiques de la cellule sont les mêmes que dans la partie B.1.2.2.2, sauf concernant l'électrode de travail qui a été remplacée par une électrode BDD.

Les expériences de synthèse électrochimique ont été conduites dans une solution aqueuse d'AA (0,1 mmol.L<sup>-1</sup>) et d'acétate d'ammonium (20 mmol.L<sup>-1</sup>) dans un mélange eau/acétonitrile (50/50). La formation d'adduits de glutathion a été obtenue dans les mêmes conditions avec rajout de glutathion à la concentration de 1 mmol.L<sup>-1</sup>.

Les expériences d'électrolyse ont été réalisées à un potentiel de travail de -2,5 V vs Pd/H<sub>2</sub> durant 4h.

### B.2.2.2.3 Voltampérométrie massique

Les paramètres appliqués lors des expériences de couplage CE-SM en ligne sont les mêmes que dans la partie B.1.2.2.3. Le débit de travail a été adapté à 20 µL.min<sup>-1</sup> et le balayage linéaire de potentiel commence à 0V pour aller jusqu'à -2,5 V vs. Pd/H<sub>2</sub> par pas de 5 mV.s<sup>-1</sup>.

### B.2.2.3 Chromatographie liquide et spectrométrie de masse

Les analyses CE-CL-SM et CE-CL-SMSM ont été réalisées avec le même système couplant une chromatographie liquide à ultra haute performance et un spectromètre de masse, présenté dans la partie B.1.2.3.

10 µL de la solution réduite électrochimiquement sont injectés et séparés sur une colonne de chromatographie liquide de phase inverse greffée C<sub>18</sub> (Acquity® BEH, 2,1 mm × 100 mm, taille des particules 1,7 µm de [www.water.com](http://www.water.com)) maintenue à 50°C. Les phases mobiles sont composées d'un mélange eau/acétonitrile (95/5) pour la voie A et 100% d'acétonitrile contenant 0,1 % d'acide formique pour la voie B. La séparation chromatographique s'est faite à l'aide d'un gradient binaire à débit constant de 200 µL.min<sup>-1</sup> présenté dans le Tableau 3 ci-dessous.

**Tableau 3 : Gradient binaire eau/acétonitrile utilisé en chromatographie liquide pour la séparation des produits de réduction de l'acide aristolochique.**

Temps (minutes)	0	7	8	10
% A (H <sub>2</sub> O/ACN 95:5)	80	20	20	80
% B (ACN)	20	80	80	20

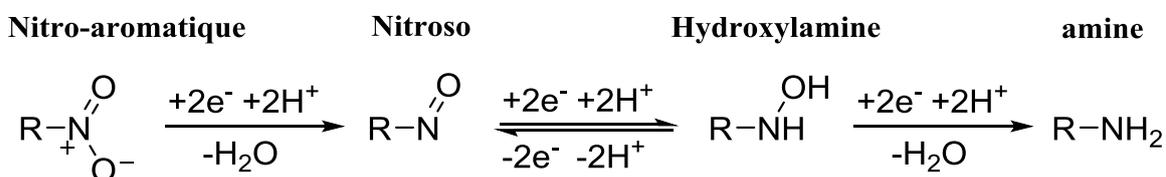
L'interface *electrospray* entre CL et SM a été opérée dans son mode positif, conduisant à une observation plus sensible qu'avec le mode négatif. Les paramètres de la source ont été optimisés afin d'obtenir le meilleur compromis entre résolution et sensibilité. Les données ont été acquises pour des  $m/z$  allant de 50 à 1200. La tension de capillaire, la tension de cône, le débit du gaz de désolvatation, la température de la source et la température du gaz de désolvatation étaient respectivement de 2,5 kV, 20 V, 900 L.h<sup>-1</sup>, 120 °C et 550° C. Pour les analyses SMSM, l'Argon a été utilisé dans la cellule de collision avec une énergie de collision de 20 V.

Une solution de leucine enképhaline à la concentration de 2 ng.μL<sup>-1</sup> (deux points de contrôle de masse exacte : 278,1141 Da [M+2H]<sup>2+</sup> et 556,2771 Da [M+H]<sup>+</sup>) est infusée au débit de 20 μL.min<sup>-1</sup> sur le canal *lockspray* avec l'acquisition d'un spectre pendant 0,5 s toutes les 10 s . Ceci permet la calibration en continu ainsi que la mesure de masses exactes pour les différentes expériences CL-SM(HR) et CL-SMSM(HR).

## B.2.3 Résultats et discussion

### B.2.3.1 Comportement électrochimique de la fonction nitro

Le mécanisme de réduction électrochimique d'une fonction nitro-aromatique a déjà été rapporté dans la littérature et est présenté sur la Figure 68.<sup>147</sup> L'addition de deux électrons et deux protons, suivie de la perte d'une molécule d'eau, conduit à la formation de l'espèce nitroso.



**Figure 68 : Bilan de la réduction électrochimique d'une fonction nitro-aromatique conduisant à la formation des espèces nitroso, hydroxylamine et amine.**

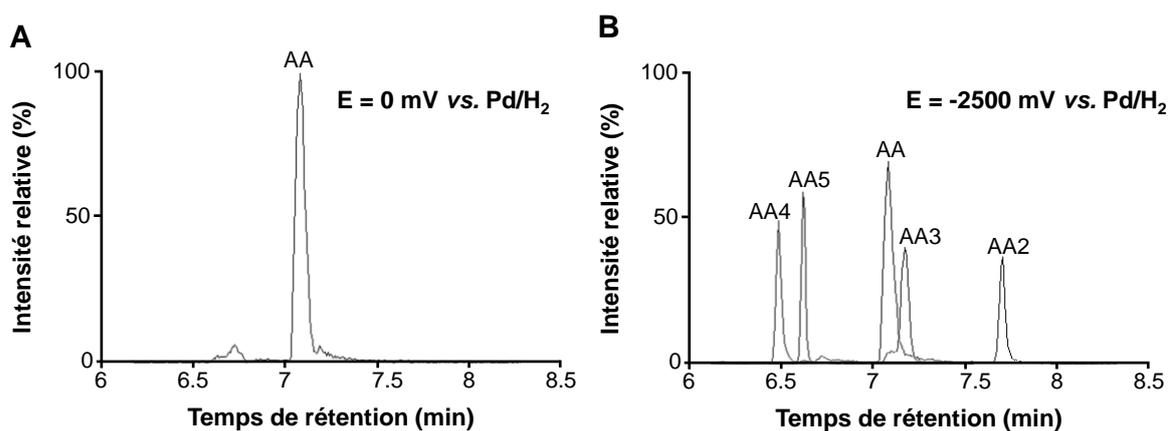
L'espèce nitroso se caractérise par un comportement électrochimique cathodique réversible impliquant deux électrons et deux protons pour former l'espèce hydroxylamine, qui à son tour subit une réduction à deux électrons et deux protons conduisant ainsi à l'amine correspondante après la perte d'une molécule d'eau.

## B.2.3.2 Identification des produits de réduction

### B.2.3.2.1 Analyse CL-SM

L'analyse par CL-SM permet d'identifier différentes espèces en fonction de leur temps de rétention et de leur  $m/z$ . La présence d'un pic CL pour un  $m/z$  donné permet d'écartier la formation de cette espèce dans la source d'ionisation par le biais de réactions d'oxydation ou de condensation aboutissant à la perte d'une molécule d'eau.

La Figure 69 présente les chromatogrammes extraits pour les produits de réaction observés par CL-SM(HR), avant et après réduction électrochimique de l'AA à potentiel constant de -2,5 V vs. Pd/H<sub>2</sub>. Nous observons quatre produits de réduction nommés AAn (n = 2, 3, 4 ou 5) correspondant respectivement aux  $m/z$  : 326,0669 ; 328,0829 ; 310,0719 et 294,0766.



**Figure 69 : Chromatogramme extrait pour l'AA et ses produits de réduction en (A) avant réduction et en (B) après réduction électrochimique.**

Comme l'indique la Figure 69, l'apparition des produits de réduction est bien corrélée avec la diminution de l'intensité du pic chromatographique de l'AA. Les temps de rétention sont compris entre 6,4 et 7,7 minutes avec une séparation satisfaisante (écart minimum 0,1 minute) entre les différents pics chromatographiques. Toutefois, un recouvrement entre le pic de l'AA et du métabolite AA3 est présent mais n'empêche pas leur discrimination.

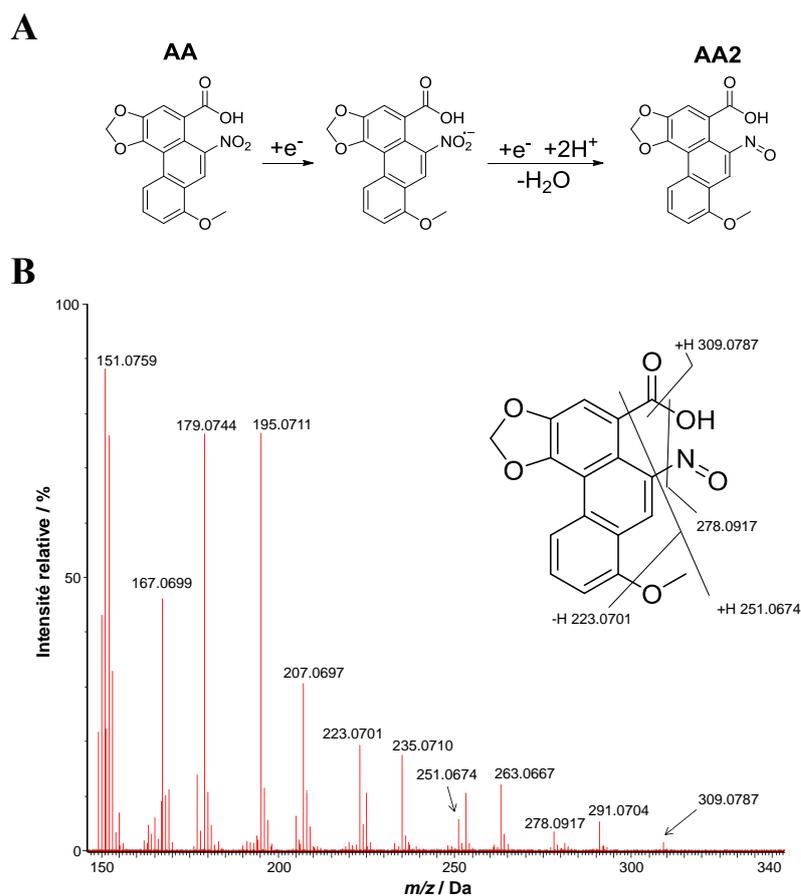
### B.2.3.2.2 Identification structurale

L'analyse structurale des produits de réduction peut commencer par l'obtention de la composition élémentaire de la molécule mère et de chaque produit de réaction (Tableau 4)

**Tableau 4 : Composition élémentaire de l'AA et de ses produits de réduction.**

Composé	Ion	$m/z_{\text{expérimentale}}$ (Da)	$m/z_{\text{calculé}}$ (Da)	$\Delta_{m/z}$ (ppm)	Temps de rétention (min)	Composition élémentaire
AA	[M+H] <sup>+</sup>	342,0619	342,0614	1,5	7,1	C <sub>17</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>7</sub>
AA2	[M+H] <sup>+</sup>	326,0669	326,0665	1,2	7,7	C <sub>17</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>6</sub>
AA3	[M+H] <sup>+</sup>	328,0829	328,0821	2,4	7,2	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>6</sub>
AA4	[M+H] <sup>+</sup>	310,0719	310,0719	1,3	6,5	C <sub>17</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>
AA5	[M+H] <sup>+</sup>	294,0766	294,0766	0,0	6,6	C <sub>17</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>

Considérons le produit de réduction AA2, la différence de composition élémentaire avec l'AA suggère la perte d'un atome d'oxygène. La perte de cet atome d'oxygène peut correspondre à la première réduction électrochimique de la fonction nitro-aromatique. En effet, l'addition d'un électron conduit à la formation d'un anion radical qui est très rapidement protoné. Par la suite, le transfert d'un second électron et d'un proton aboutit à la perte d'une molécule d'eau, formant ainsi l'espèce nitroso (AA2) comme l'indique la Figure 70A. L'analyse SMSM du  $m/z$  326,0669 confirme bien la formation de l'espèce nitroso par réduction électrochimique de l'AA (Figure 70B)

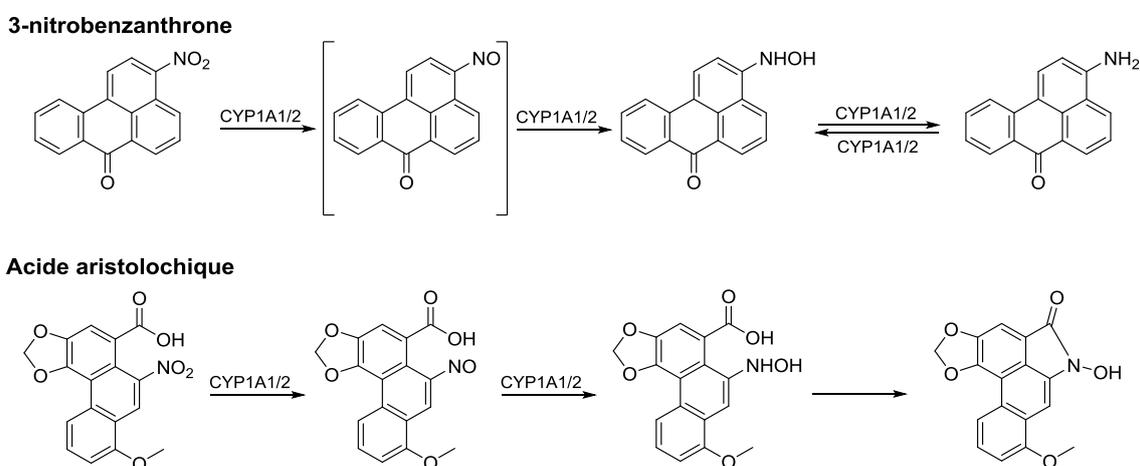


**Figure 70 :** En (A) mécanisme de réduction électrochimique d'une fonction nitro-aromatique en nitroso. En (B) spectre SMSM du  $m/z$  326 correspondant à l'espèce nitroso.

L'espèce AA3 est quant à elle formée par la réduction du nitroso en hydroxylamine par le transfert de deux électrons et deux protons. Ce processus de réduction électrochimique du nitroso en hydroxylamine est un processus réversible, mais très largement favorisé dans le sens de la formation de l'hydroxylamine. C'est la raison pour laquelle, l'entité nitroso peut être difficilement observable par voie électrochimique en raison d'une limitation thermodynamique. L'analyse SMSM de l'espèce AA3 confirme la structure chimique de l'hydroxylamine.

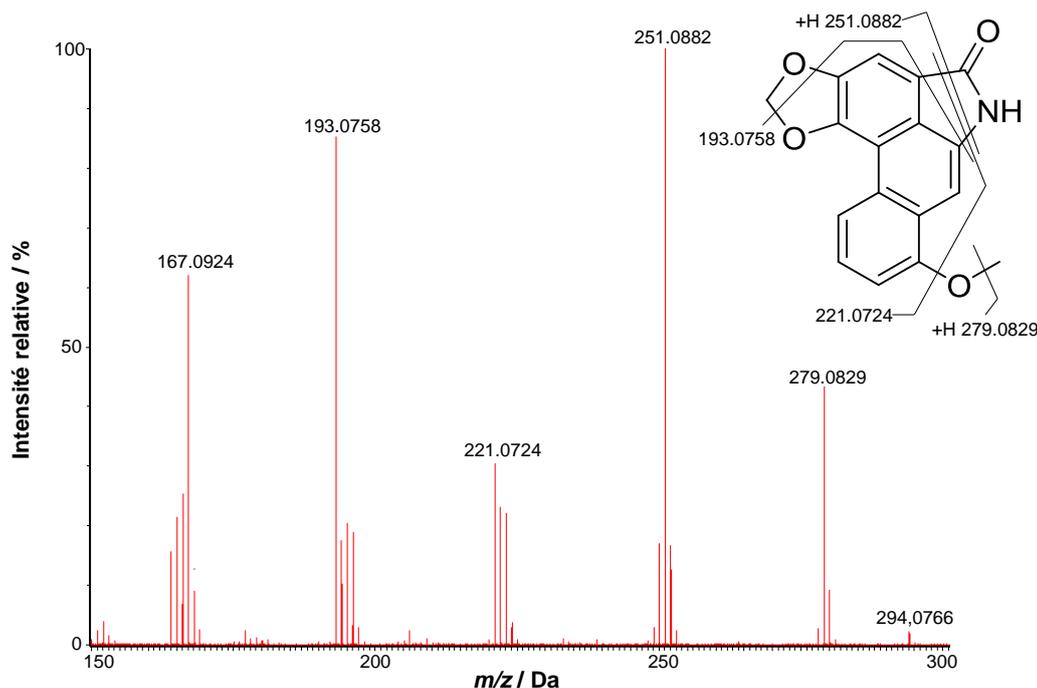
La présence d'une fonction acide carboxylique en position  $\beta$  du carbone portant l'hydroxylamine rend possible une réaction de condensation intramoléculaire entre la fonction hydroxylamine et l'acide carboxylique aboutissant à l'entité N-hydroxyaristolactame (AA4) après la perte d'une molécule d'eau. Les analyses SMSM vont bien dans le sens de la formation d'un cycle à 5 atomes de type N-hydroxylactam.

Contrairement aux études précédentes discutant la réduction de nitro aromatiques, la formation de l'équivalent aminé n'a pas été observée dans le cas de l'AA. Cette absence peut être justifiée par la contribution de la réaction de condensation intramoléculaire. En effet, Stiborová *et al.* ont étudié le métabolisme réductif de l'AA par voie enzymatique.<sup>148</sup> Les auteurs rapportent la formation du N-hydroxyaristolactame (AA4) par condensation de l'hydroxylamine sur l'acide carboxylique, expliquant ainsi l'absence de l'espèce aminée de l'AA, sans toutefois proposer de mécanisme. De plus, ceci est étayé par l'étude du métabolisme enzymatique de la 3-nitrobenzanthrone qui aboutit quant à elle à l'amine (absence de fonction acide carboxylique sur cette molécule empêchant ainsi une cyclisation intramoléculaire) comme l'indique la Figure 71.



**Figure 71 : Réduction de la 3-nitrobenzanthrone et l'acide aristoloïque par voie enzymatique conduisant à l'amine pour le premier et à l'hydroxylactame pour le second.<sup>148</sup>**

L'aristolactame (AA5) est obtenu par réduction électrochimique de l'AA4 (addition de deux électrons et deux protons suivie de la perte d'une molécule d'eau). L'aristolactame apparaît être le produit de réaction final de la réduction électrochimique de l'AA. La structure lactamique du produit de réduction AA5 a été confirmée lors de la fragmentation SMSM de l'ion à  $m/z$  294,0766. En effet, la perte d'un fragment neutre de 43 Da correspondant à la rupture au niveau du cycle lactamique met bien en évidence la formation de ce dernier (Figure 72)

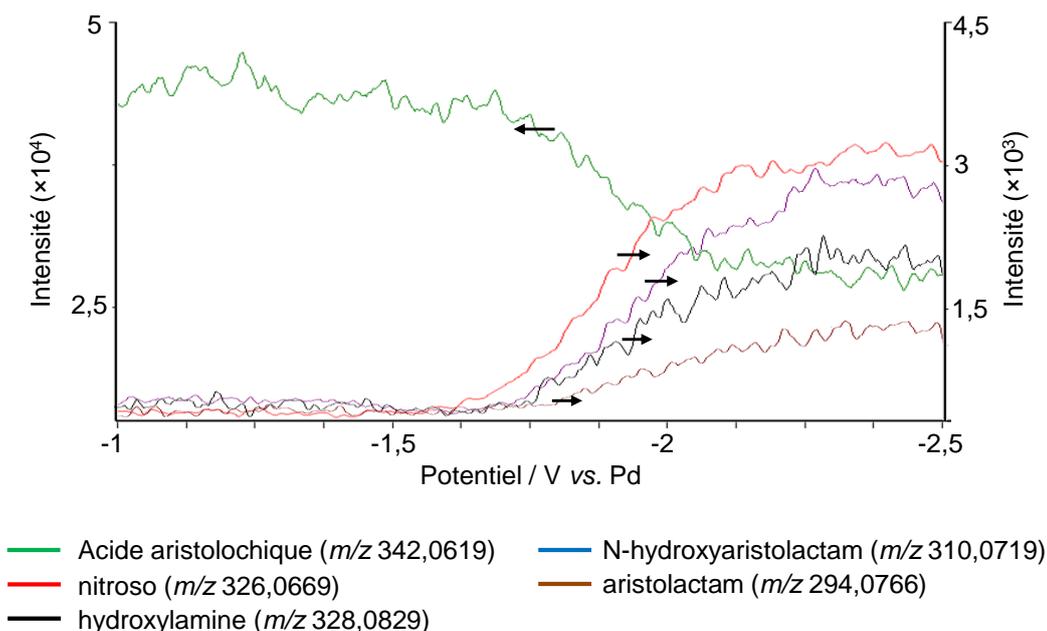


**Figure 72 : Spectre SMSM de l'ion  $m/z$  294 correspondant à l'espèce aristolactame.**

Toutefois, l'étude du métabolisme réductif *in vivo* de l'AA montre la formation d'un intermédiaire nitrénium très réactif qui peut se lier de manière covalente avec des biomolécules de l'organisme, expliquant sa toxicité *in vivo* (Figure 67). Dans la suite de nos travaux nous avons cherché à observer et caractériser cet intermédiaire réactif afin de mettre en avant les capacités de simulation de l'outil électrochimie.

### B.2.3.3 Couplage CE-SM en ligne

Les résultats obtenus par le couplage CE-SM en ligne (Figure 73) sont essentiels pour l'élucidation mécanistique de la réaction de réduction électrochimique de l'AA. Dans un premier temps, nous observons bien une diminution de l'intensité du signal correspondant à l'AA ( $m/z$  342,0619) aux alentours de -1,6 V vs. Pd/H<sub>2</sub>. L'augmentation du signal au  $m/z$  326,0669 correspondant à l'entité nitroso est bien corrélée avec la diminution de l'intensité de l'AA. De plus, nous constatons que l'entité nitroso apparaît bien comme premier produit de réduction électrochimique de l'AA. De là s'en suit l'apparition des autres produits de réduction présentés précédemment. Fait intéressant, l'apparition quasi simultanée de l'hydroxylamine et du N-hydroxyaristolactame laisse présager un mécanisme de cyclisation intramoléculaire présenté précédemment extrêmement rapide. Ceci peut expliquer un peu plus l'absence de l'espèce aminée lors de la réduction électrochimique de l'AA.

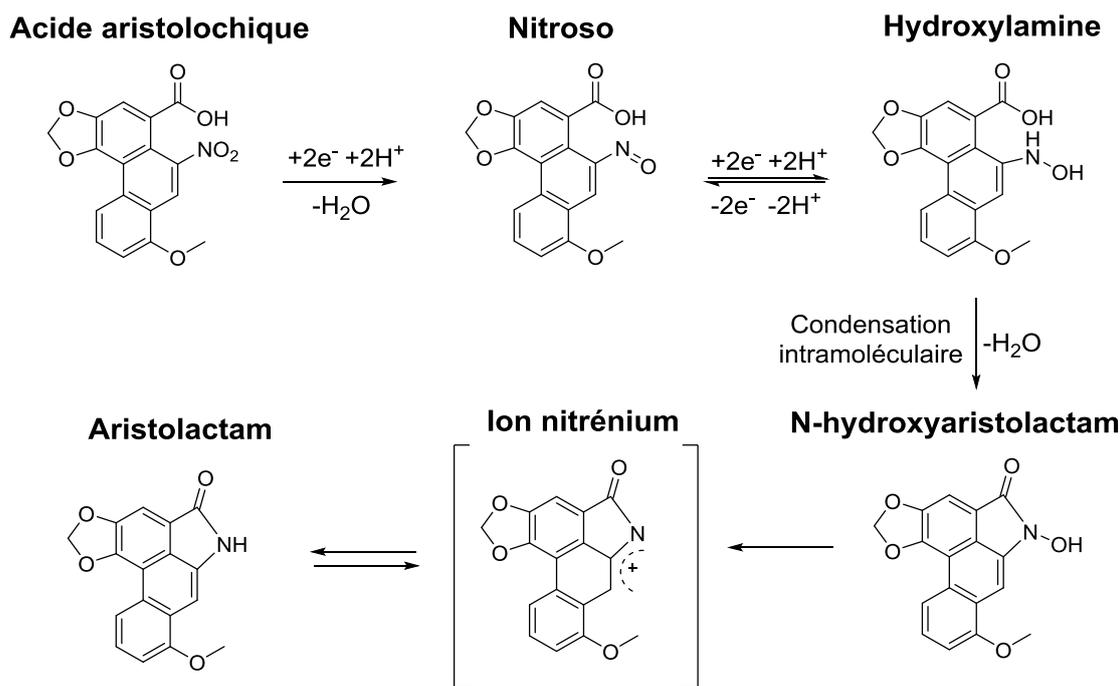


**Figure 73 : Voltampérométrie massique extrait pour l'AA et ses produits de réduction électrochimique.**

Pour finir, le voltampérométrie massique pour l'aristolactame ( $m/z$  294,0766) apparaît bien en dernière position, ce qui confirme le mécanisme de réduction électrochimique proposé précédemment.

#### B.2.3.4 Mécanisme de réduction électrochimique de l'acide aristolochique

Au vu des structures chimiques des produits de réduction électrochimique de l'AA et des résultats obtenus par couplage direct CE-SM, nous pouvons proposer un mécanisme de réduction de l'acide aristolochique (Figure 74). La réduction est initiée par le transfert d'un électron seul conduisant au radical anion qui, en milieu aqueux, va immédiatement se protoner. Ensuite, il y a addition d'un second électron et d'un second proton pour former l'espèce nitroso après perte d'une molécule d'eau. Le composé nitroso rentre dans un processus redox réversible conduisant à l'hydroxylamine. Comme nous l'avons montré précédemment, une réaction de condensation intramoléculaire entre l'hydroxylamine et l'acide carboxylique aboutit à la formation d'un cycle à 5 atomes (N-hydroxylactame), empêchant ainsi la formation de l'amine correspondant par réduction électrochimique de la fonction hydroxylamine. Le N-hydroxyaristolactame peut se réduire en aristolactame par un processus similaire à la réduction du nitro en nitroso.



**Figure 74 : Mécanisme de réduction électrochimique de l'acide aristoloïque expliquant la formation des produits de réduction stables.**

Toutefois, la formation de l'aristolactame est précédée par la formation d'un intermédiaire réactif (l'ion nitrenium) à partir du N-hydroxyaristolactame. La formation de cet intermédiaire réactif explique la toxicité *in vivo* de l'AA. En effet, cet intermédiaire électrophile peut se lier de façon covalente aux biomolécules environnantes. Afin de justifier sa formation durant la réduction électrochimique de l'AA, nous avons réalisé des expériences en présence de différentes biomolécules nucléophiles telles que l'adénosine, la guanosine et le glutathion.

#### B.2.3.4.1 Adduit aristolactame-guanosine ou aristolactame-adénosine

La majorité des travaux rapportant l'étude du métabolisme *in vivo* de l'AA et la caractérisation de l'ion nitrenium ont été décrits avec l'observation d'adduits guanosine-aristolactame et/ou adénosine-aristolactame (Figure 67).<sup>148-151</sup> Afin d'observer des adduits similaires nous avons réalisé des expériences de réduction électrochimique de l'AA en présence d'adénosine et de guanosine. Cependant, l'ensemble des expériences menées au sein de notre équipe n'a pas permis d'observer la formation de tels adduits. L'influence de différents paramètres tels que le pH ou la concentration en agent de piégeage a été testée, mais dans aucun cas nous avons pu mettre en évidence la formation de la guanosine-aristolactame et/ou adénosine-aristolactame. La possible activité électrochimique des agents de piégeage peut être à l'origine de leur manque d'efficacité comme agent nucléophile. De plus, les études

rapportant la formation d'adduit avec les biomolécules guanosine ou adénosine ont été réalisées par le biais d'incubation à 37 °C.<sup>152-153</sup> Par la suite nous avons effectué des expériences similaires mais en présence de glutathion. En effet, pour l'identification d'intermédiaires réactionnels électrophiles par spectrométrie de masse, le glutathion est certainement l'approche la plus commune. La formation d'adduit de glutathion permet la stabilisation de l'espèce réactive avec formation d'un adduit ( $m/z+307$ ) avec des fragmentations SMSM caractéristiques, et dans certains, cas une amélioration de la sensibilité vis-à-vis de l'ionisation. Ce résultat est discuté dans le sous-paragraphe qui suit.

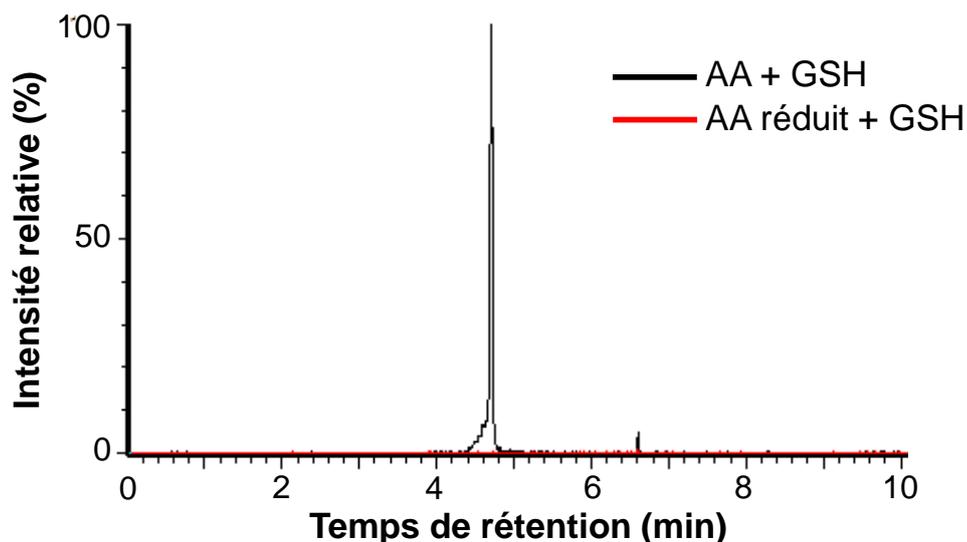
#### B.2.3.4.2 Adduit aristolactame-glutathion

La réduction électrochimique de l'AA en présence de glutathion a été réalisée en flux à potentiel constant (-2,5 V vs. Pd/H<sub>2</sub>) dans la cellule  $\mu$ PrepCell<sup>TM</sup> avec l'électrode BDD. L'analyse CL-SM(HR) de l'échantillon après réduction met en avant la formation d'un produit de réduction au  $m/z$  599,1443. L'analyse élémentaire de cette entité nous indique la présence d'un atome de Soufre caractéristique du glutathion (Tableau 5).

**Tableau 5 : Composition élémentaire de l'AA, de l'aristolactame et de l'adduit glutathion de l'ion nitrénium.**

Composé	Ion	$m/z_{\text{expérimentale}}$ (Da)	$m/z_{\text{calculé}}$ (Da)	$\Delta_{m/z}$ (ppm)	Temps de rétention (min)	Composition élémentaire
AA	[M+H] <sup>+</sup>	342,0619	342,0614	1,5	7,1	C <sub>17</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>7</sub>
Aristolactame	[M+H] <sup>+</sup>	294,0766	294,0766	0,0	6,6	C <sub>17</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>
Adduit glutathion	[M+H] <sup>+</sup>	599,1443	599,1448	0,8	4,3	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> S

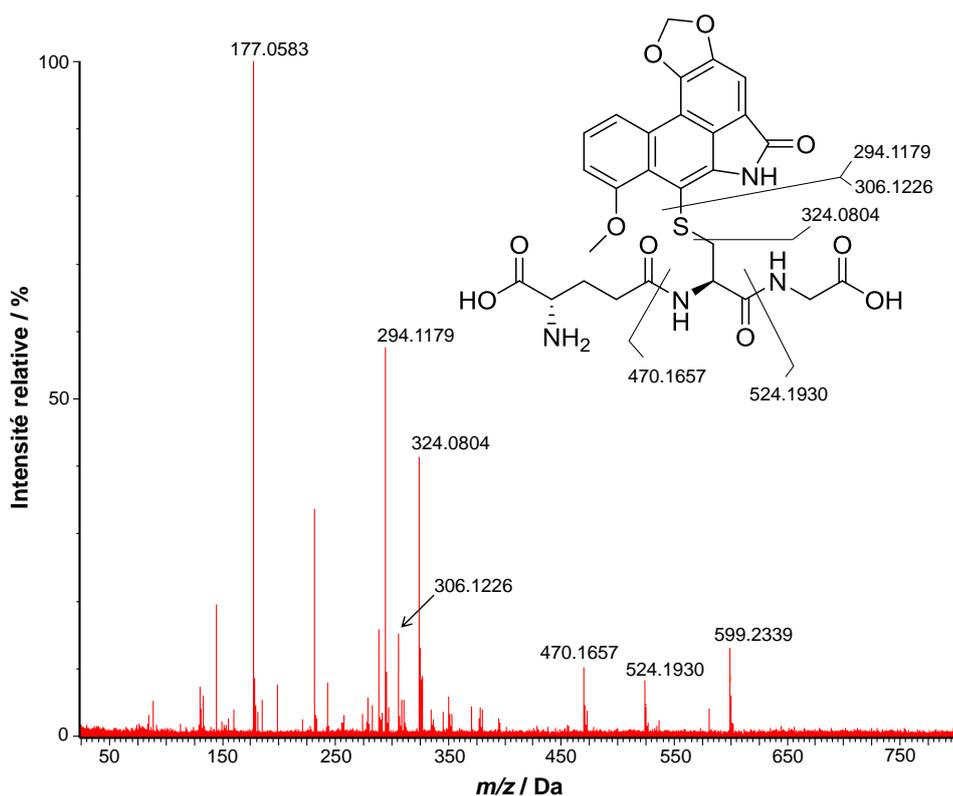
De plus, une analyse CL-SM(HR) d'un mélange AA réduit électrochimiquement avec ajout de glutathion doit permettre d'écarter la formation de l'adduit *in situ* dans la source d'ionisation. En effet, il se peut que l'adduit se forme au sein de la source d'ionisation, écartant ainsi la formation de l'intermédiaire réactionnel durant la réaction électrochimique. La Figure 75 présente les chromatogrammes extraits pour le  $m/z$  599,1443 correspondant à l'adduit glutathion d'un mélange AA/glutathion réduit et AA réduit avec ajout de glutathion.



**Figure 75 : Chromatogramme extrait du  $m/z$  599 pour un mélange AA/GSH après réduction électrochimique et un échantillon AA réduit avec ajout de GSH.**

L'absence de signal au  $m/z$  599,1443 pour l'échantillon d'AA réduit avec ajout de glutathion permet d'écarter la formation de l'adduit *in situ* dans la source d'ionisation.

Les analyses LC-SMSM(HR) ont permis de confirmer la structure de l'adduit de glutathion (Figure 76). En effet, comme présenté dans la partie B.1.3.4.3.1, la perte de molécules neutres telles que  $\gamma$ -glu-ala-gly (-275), la glycine (-75), la glutamine (-146) ainsi que l'acide pyroglutamique (-129) sont des caractéristiques de la fragmentation SMSM d'un adduit de glutathion en ionisation positive.



**Figure 76 : Spectre SMSM de l'adduit glutathion à  $m/z$  599 avec attribution des fragments.**

La formation de cet adduit confirme à la fois le passage par un intermédiaire réactif durant la réduction électrochimique de l'AA, mais également l'aptitude de l'outil électrochimique à simuler les réactions de réduction par voie enzymatique, ainsi que la condensation intramoléculaire conduisant à la formation de cycle lactame et plus particulièrement de l'espèce aristolactame.

## B.2.4 Conclusion

Ce chapitre s'est attaché à la comparaison entre la réduction enzymatique par action du cytochrome P450 et la réduction électrochimique pour la simulation du métabolisme de l'acide aristolochique. Il a été démontré que les métabolites de l'acide aristolochique produits par l'action du P450 peuvent être générés par voie électrochimique.

Les réactions permettant la formation des entités nitroso, hydroxylamine et la formation de cycle lactamique induites par l'action enzymatique peuvent être mimées par une réduction électrochimique conventionnelle initiée par un transfert d'électron. De plus, l'élucidation du comportement électrochimique de l'AA a permis d'interpréter l'absence de métabolite aminé lors de la nitro réduction de l'AA *in vivo*.<sup>146</sup> L'électrochimie a démontré tout son intérêt pour

l'observation des intermédiaires réactifs. En effet, la formation de l'ion nitrenium durant la réaction de réduction électrochimique a été caractérisée par son adduit avec le glutathion. L'ion nitrenium formé durant le métabolisme *in vivo* de l'AA explique sa toxicité pour l'organisme et l'ensemble de l'écosystème.

Cette étude a permis de démontrer une nouvelle fois la puissance de l'outil électrochimique pour la simulation du métabolisme non pas oxydatif mais réductif de xénobiotiques. La réduction électrochimique doit permettre la synthèse à plus grande échelle (production de quantités de l'ordre du milligramme) de la majorité des métabolites formés au cours du métabolisme, permettant par la suite des études toxicologiques.

**C. COUPLAGE CE-RMN : Rappels théoriques  
et résultats sur la mise en place du couplage  
CE-RMN 2D ultrarapide**

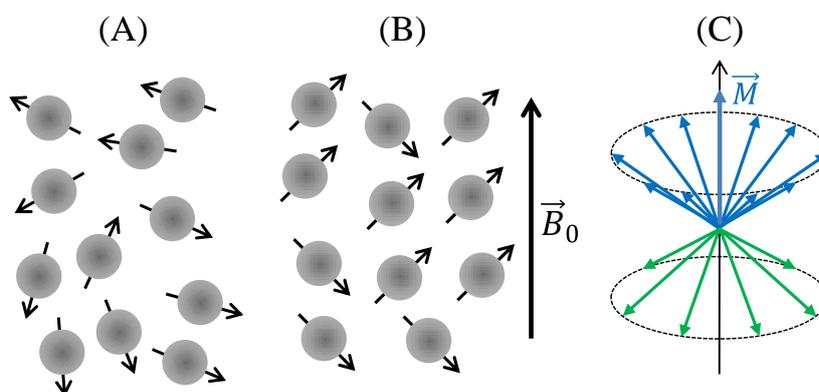
# C.1 Rappels théoriques sur la résonance magnétique nucléaire

## C.1.1 Généralités sur la RMN

### C.1.1.1 Principe de base

La résonance magnétique nucléaire est un outil incontournable dans le domaine de la chimie analytique moderne.<sup>154</sup> Cette technique est principalement utilisée pour l'élucidation de structures moléculaires en chimie et en biologie, mais elle constitue également un outil puissant pour l'analyse quantitative non-destructive.<sup>155-157</sup> C'est également une méthode très utilisée pour le suivi de phénomènes cinétiques et dynamiques.<sup>158-160</sup>

La RMN permet de détecter tous les noyaux qui possèdent un moment magnétique de spin non nul ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,...). Sous l'effet d'un champ magnétique intense  $\vec{B}_0$  (plusieurs Teslas), chaque moment magnétique adopte une orientation préférentielle en faveur de celle du champ magnétique imposé. Si l'on considère un ensemble de noyaux, la somme vectorielle  $\vec{M}$  des moments magnétiques, également appelée aimantation, est dirigée dans la direction du champ magnétique  $\vec{B}_0$  généralement orienté selon l'axe z (Figure 77).<sup>161</sup>



**Figure 77 :** Représentation de l'orientation des moments magnétiques nucléaires. (A) en l'absence de champ magnétique extérieur, (B) en présence d'un champ magnétique extérieur. (C) représentation de  $\vec{M}$  correspondant à la somme vectorielle des moments magnétiques en présence du champ magnétique extérieur,  $\vec{M}$  est non nulle et dirigée dans la direction de  $\vec{B}_0$ .

De plus, lorsqu'un noyau possédant un moment magnétique est plongé dans un champ magnétique intense tel que  $\vec{B}_0$ , on peut montrer qu'il est animé d'un mouvement de

précession, dit de Larmor, autour de ce champ magnétique. La fréquence de précession est définie par la relation de Larmor ci-dessous :

$$\omega_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad \text{Équation 18}$$

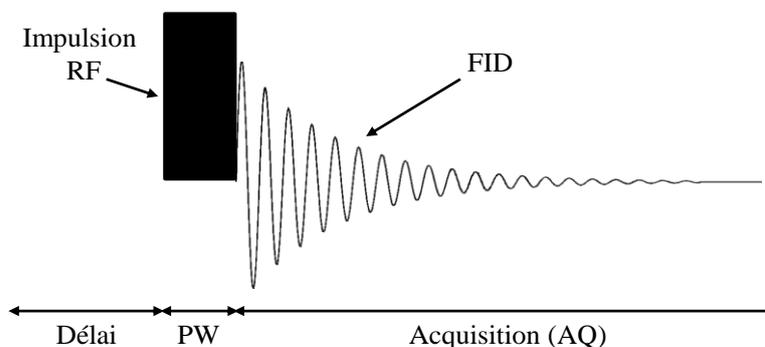
Ici  $\gamma$  définit le rapport gyromagnétique du noyau observé, exprimé en  $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$ . Le mouvement de précession de Larmor autour de  $\vec{B}_0$  est donc propre à chaque noyau mais ne change par l'orientation prise par l'aimantation ( $\vec{M}$ ).

Cependant, la détection de cette somme vectorielle  $\vec{M}$  est impossible à l'équilibre. C'est pourquoi celle-ci est basculée perpendiculairement à  $\vec{B}_0$  par le biais d'un champ magnétique impulsionnel  $\vec{B}_1$ , qui est la composante magnétique d'un champ radio-fréquence (*RF*).  $\vec{B}_1$  est perpendiculaire à  $\vec{B}_0$  et précesse autour de  $\vec{B}_0$  à la fréquence  $\nu_0$ . Immédiatement après la fin de l'impulsion *RF*, l'aimantation revient progressivement à son état d'équilibre, parallèle à  $\vec{B}_0$ . Ce phénomène de retour à l'état d'équilibre est nommé relaxation. L'enregistrement de ce phénomène de relaxation donne naissance à un signal radio-fréquence, le FID (*Free Induction Decay*), qui est caractéristique à la fois du noyau observé mais aussi de son environnement chimique. Après l'acquisition du FID une transformation mathématique (transformation de Fourier ; FT) permet d'obtenir un spectre qui constitue une véritable empreinte digitale de l'échantillon étudié. L'exploitation du spectre ainsi obtenu nous informe sur les déplacements chimiques, les constantes de couplage (en Hz), l'intensité et la multiplicité des signaux RMN caractéristiques des molécules étudiées. Le spectre est représenté sur une échelle universelle de fréquences relatives, le déplacement chimique, exprimé en ppm (parties par millions).<sup>161</sup>

### C.1.1.2 RMN impulsionnelle

Une expérience classique de RMN peut être décomposée en deux phases : excitation et détection.<sup>162</sup> La phase d'excitation est constituée par une impulsion *RF* dont la fréquence est proche des fréquences de résonance de l'échantillon. L'amplitude et la durée de cette impulsion sont calibrées afin de produire une bascule de l'aimantation dans le plan transversal par rapport à  $\vec{B}_0$  (basculement de  $90^\circ$  des aimantations), tandis que la phase de détection est la période durant laquelle les aimantations retournent à l'équilibre, ce qui permet l'enregistrement du FID (période d'acquisition ; AQ).

La Figure 78 est la représentation d'une expérience classique de RMN, cette séquence pouvant être répétée à plusieurs reprises afin d'augmenter le rapport sensibilité/résolution de l'expérience. Toutefois, il est nécessaire d'attendre le retour à l'équilibre de l'ensemble des aimantations entre chaque répétition afin d'obtenir le meilleur compromis sensibilité/résolution sur le spectre RMN.



**Figure 78 : Séquence classique pour la spectroscopie RMN ; après une impulsion RF de durée PW, le FID est détecté pendant la période AQ.**

Comme pour la plupart des techniques de chimie analytique moderne, la résolution et la sensibilité définissent les performances des analyses RMN. En effet, la résolution spectrale définit le plus petit écart permis pour distinguer deux raies voisines. Ainsi, une largeur de raie trop importante induit une faible résolution. La largeur de raie en RMN est influencée par plusieurs facteurs tels que les inhomogénéités du champ magnétique  $\vec{B}_0$ , ou le temps de relaxation transversale appelé  $T_2$ . D'autre part, l'utilisation de paramètres expérimentaux non adaptés affecte directement la résolution, par exemple l'enregistrement d'un nombre insuffisant de points ou bien une durée d'acquisition du FID trop faible (troncature). Cependant, il est possible de contourner le problème en utilisant des traitements post-acquisition tels que la multiplication par une fonction d'apodisation adaptée.<sup>162</sup>

La RMN possède une faible sensibilité par rapport à d'autres techniques analytiques telles que la spectrométrie de masse. La sensibilité d'une expérience dépend en grande partie du noyau. En effet, le rapport gyromagnétique  $\gamma$  du noyau ainsi que son abondance naturelle sont des facteurs primordiaux. De plus, la sensibilité est également conditionnée par l'appareillage RMN utilisé (intensité du champ magnétique  $\vec{B}_0$ ) et par le nombre total de spins détectés.

Toutefois, il est possible d'améliorer significativement la sensibilité RMN en répétant  $n$  fois les expériences RMN et ainsi augmenter le rapport signal sur bruit (S/B), et donc la sensibilité, d'un facteur  $\sqrt{n}$ . De plus, des séquences de RMN multi-impulsionnelle permettent

de transférer la polarisation d'un noyau plus sensible vers un noyau moins sensible, augmentant ainsi la sensibilité des expériences RMN.<sup>162</sup> De plus, l'utilisation d'une sonde RMN refroidie (cryosonde) améliore de façon significative la sensibilité des analyses.<sup>163</sup>

### C.1.1.3 RMN multi-impulsionnelle

Les séquences RMN utilisées quotidiennement pour l'élucidation structurale de molécules organiques sont pour la plupart multi-impulsionnelles. De plus, certaines séquences visent aussi à améliorer la sensibilité des mesures RMN. En effet, la RMN multi-impulsionnelle offre la possibilité de créer une ou plusieurs dimensions supplémentaires dans le spectre. Les séquences RMN multi-impulsionnelles sont construites avec des motifs/briques de séquences comme l'écho de spin.<sup>164</sup> Par exemple, de nombreuses séquences telles que l'INEPT (*Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer*) mais aussi la DEPT (*Distortionless Enhancement Polarization Transfer*) permettent de faire de l'édition spectrale (orientation différente des signaux selon qu'il s'agisse de CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>).

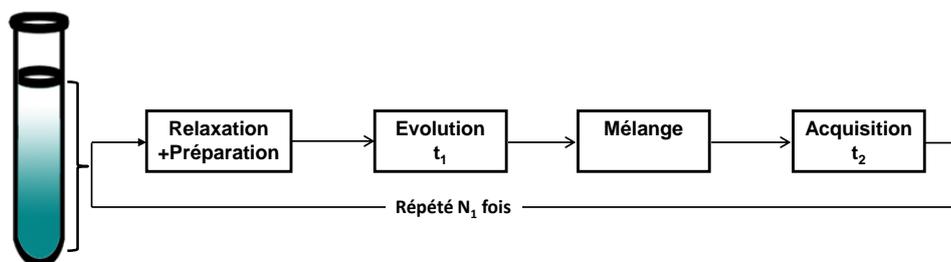
La RMN à une dimension (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) fait partie des techniques les plus utilisées par les chimistes spécialisés dans la synthèse organique afin d'élucider la structure de leurs composés. La RMN à une dimension est largement utilisée pour estimer la composition d'un mélange réactionnel. Cependant, dans la plupart des situations, il est nécessaire d'utiliser la RMN à plusieurs dimensions pour une élucidation structurale sans ambiguïté. En effet, la RMN multidimensionnelle permet l'établissement de corrélations hétéro ou homonucléaires intramoléculaires. De plus, lors de l'étude de mélanges complexes la présence de plusieurs molécules engendre une multitude de signaux RMN pouvant conduire à des recouvrements entre les pics, rendant difficile l'interprétation des spectres. C'est pourquoi l'ajout d'une nouvelle dimension RMN crée un étalement des informations telles que le déplacement chimique, mais également des corrélations internucléaires sur plusieurs dimensions, ce qui permet de réduire les recouvrements entre les signaux RMN et facilite l'élucidation structurale.

## C.1.2 RMN multidimensionnelle

### C.1.2.1 Principe de base

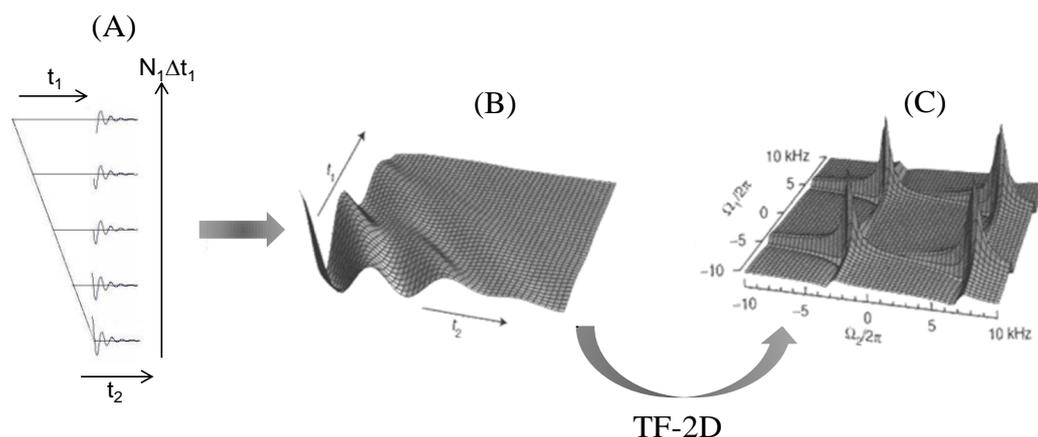
La RMN multidimensionnelle a été initialement développée afin de corrélérer les paramètres de couplages nucléaires (homonucléaire, hétéronucléaire) ou de déplacements chimiques (ou les deux). De plus, l'étalement des pics sur plusieurs dimensions rend possible l'analyse quantitative de mélanges complexes (diminution des recouvrements entre les signaux).<sup>154</sup>

L'acquisition d'un spectre RMN à deux dimensions (2D) nécessite l'enregistrement d'un FID à deux dimensions. C'est pourquoi les séquences de RMN 2D sont pour la grande majorité constituées de 4 étapes : la préparation, l'évolution, le mélange et la détection, comme l'indique la Figure 79.



**Figure 79 : Représentation des 4 étapes d'une expérience de RMN 2D.**

Cependant, la détection du FID ne peut se réaliser que durant la période d'acquisition  $t_2$ . C'est pourquoi, pour enregistrer l'information présente dans la période d'évolution  $t_1$ , J. Jeener a proposé de répéter un grand nombre de fois la même expérience à une dimension, mais en incrémentant le temps  $t_1$  d'un délai régulier  $\Delta t_1$  entre chaque répétition, afin de créer de façon artificielle la seconde dimension temporelle (créant ainsi un codage temporel).<sup>154, 165</sup> En plaçant ensuite les données dans une matrice adéquate, ceci génère un FID à deux dimensions et, après une double transformation de Fourier (TF-2D), on obtient le spectre RMN à deux dimensions (Figure 80).<sup>166</sup>



**Figure 80 :** (A) schématisation de l'incrémentation de la dimension indirecte. (B) FID à deux dimensions où chaque ligne de la matrice représente un FID. (C) Une double transformation de Fourier du FID 2D permet d'obtenir un spectre RMN 2D.<sup>167</sup>

### C.1.2.2 Les principales techniques de RMN 2D

La RMN 2D offre de multiples intérêts. En effet, le spectre obtenu dépend du type d'informations détectées dans chaque dimension (déplacement chimique, couplages) ainsi que du noyau observé ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , etc...). Il est ainsi possible de faire soit de la RMN 2D homonucléaire : COSY (*CORrelation Spectroscopy*), TOCSY (*TOTAL Correlation Spectroscopy*), soit de la RMN 2D hétéronucléaire : HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation spectroscopy*).<sup>164</sup>

La RMN à deux dimensions présente un intérêt essentiel pour l'élucidation structurale ou l'étude quantitative de mélanges complexes. Toutefois, l'un des inconvénients majeurs de la RMN 2D est son temps d'acquisition. Outre un problème d'occupation des spectromètres, les longues durées d'expérience affectent la précision de l'analyse. En effet, lors d'expériences plus longues, les mesures sont plus sensibles aux instabilités de l'appareillage.<sup>154, 167</sup> L'utilisation de la RMN 2D est également limitée pour l'étude de mélanges qui évoluent dans le temps.

Toutefois, il existe des alternatives permettant de réduire de façon importante la durée d'acquisition d'un spectre à deux dimensions. L'une d'entre elles est l'approche ultrarapide proposée par L. Frydman, qui permet d'obtenir des spectres 2D avec l'ensemble des corrélations en une fraction de seconde.<sup>168</sup> Nous trouvons également l'échantillonnage non uniforme<sup>169</sup> ou bien la spectroscopie Hadamard,<sup>170</sup> mais ils ne seront pas discutés ici. Nous avons choisi d'utiliser la RMN 2D ultrarapide dans ces travaux. En effet, cette approche offre

une rapidité d'analyse inégalée, elle est également la moins sensible aux instabilités de l'appareillage, ce qui en fait un outil performant en chimie analytique.<sup>171</sup>

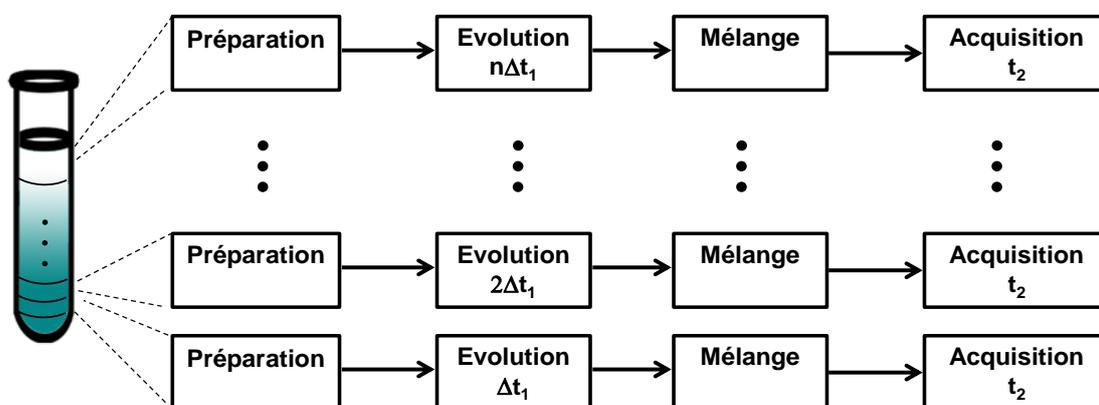
## C.1.3 RMN 2D ultrarapide

### C.1.3.1 Principe

Au début des années 2000, Lucio Frydman conçoit la RMN 2D ultrarapide qui permet d'obtenir un spectre RMN 2D en un seul scan. Cette méthodologie comporte des éléments inspirés de l'imagerie par résonance magnétique (IRM).<sup>168</sup>

#### C.1.3.1.1 Codage spatial

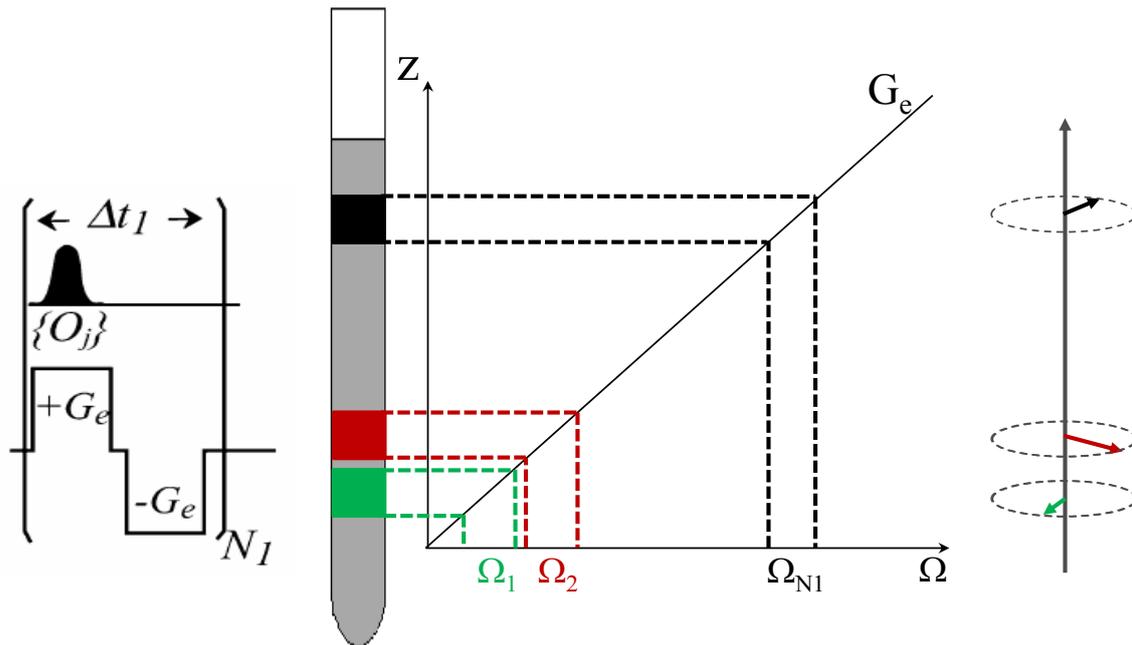
En RMN 2D ultrarapide, le codage temporel est remplacé par un codage spatial.<sup>172</sup> En effet, à l'aide de gradients de champ magnétique combinés à des impulsions de fréquence variable, le volume sensible de l'échantillon peut être divisé en « tranches ». <sup>173</sup> Dans chacune de ces tranches, les aimantations subissent un temps d'évolution  $t_1$  différent dans le plan transversal (Figure 81). L'ensemble de la matrice 2D peut donc être obtenu en une seule expérience, rendant possible l'acquisition d'un spectre 2D en un seul scan.



**Figure 81 :** Schématisation d'une expérience RMN 2D ultrarapide. L'échantillon est divisé en « tranches virtuelles » et chacune possède une période d'évolution qui lui est propre.

Pour réaliser cette découpe virtuelle du tube en sous-ensembles, la méthode impose l'utilisation de gradients de champ magnétique orientés selon l'axe z (parallèle à  $\vec{B}_0$ ). Le principe est d'appliquer un gradient de champ magnétique linéairement inhomogène suivant l'axe z, en même temps qu'une série d'impulsions sélectives, afin de basculer uniquement les

aimantations d'un sous- ensemble du tube. Le nombre de sous- ensembles obtenus est alors le même que le nombre d'impulsions sélectives appliquées durant le gradient (Figure 82).

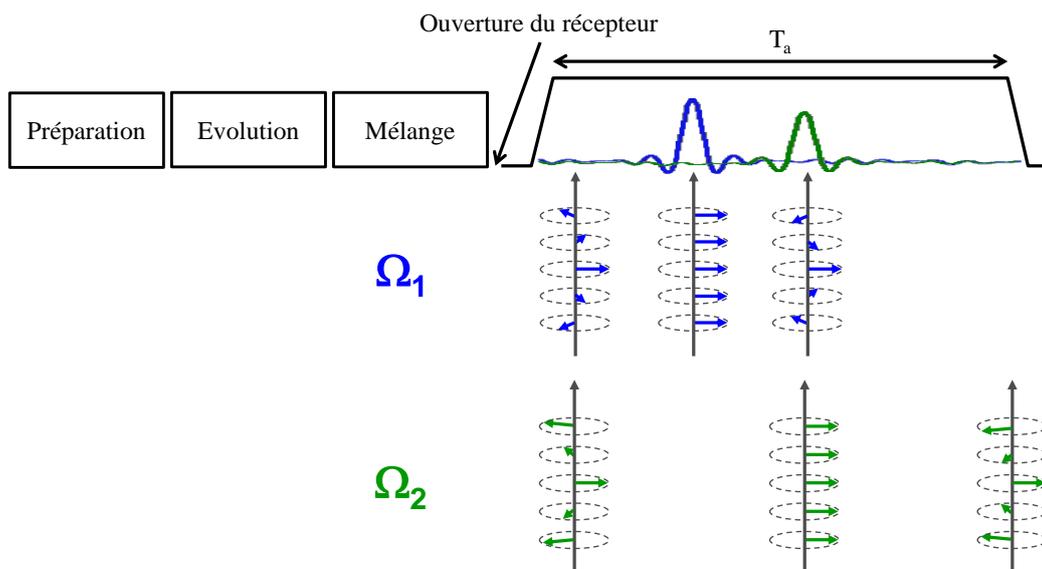


**Figure 82 :** Schéma du principe de codage spatial en RMN 2D ultrarapide décrit par L. Frydman *et al.* A gauche, la séquence d'impulsions d'excitation discrète pour le codage spatial. Au centre, sélection des sous- ensembles en fonction de la position  $z$  dans le tube. A droite, une représentation vectorielle des aimantations transversales après le codage spatial.

Actuellement, lors d'expériences ultrarapides l'excitation sélective des différents sous-ensembles ne se fait plus de manières discrète mais plutôt de façon continue sur l'ensemble de la zone de détection RMN.

### C.1.3.1.2 Obtention de la première dimension

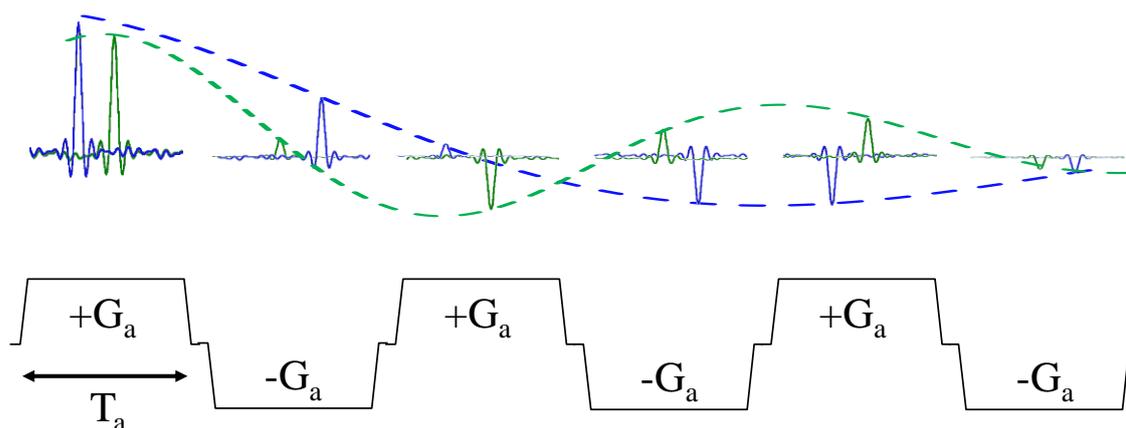
Une fois le motif de codage spatial appliqué, les aimantations sont toutes dispersées et décrivent une hélice. Pour obtenir la première dimension du spectre 2D ultrarapide, il faut par la suite appliquer un gradient qui permet de refocaliser les aimantations, comme le montre la Figure 83. Cette refocalisation des spins génère un écho dont le temps de refocalisation est caractéristique de la fréquence de résonance du spin considéré. Ainsi, la première dimension dite « dimension ultrarapide » est obtenue sans effectuer de transformation de Fourier.<sup>167</sup>



**Figure 83 : Représentation du gradient d’acquisition qui refocalise les aimantations, ce qui permet d’obtenir un spectre sans effectuer de transformation de Fourier. La position de l’écho est proportionnelle à la fréquence de résonance du spin considéré.**

### C.1.3.1.3 Obtention de la deuxième dimension

La seconde dimension, appelée « dimension conventionnelle », est obtenue quant à elle en répétant un nombre de fois défini un motif constitué d’une paire de gradients de signes opposés mais de même intensité. Ce motif est inspiré de ce qui se fait en imagerie (*Echo Planar Spectroscopic Imaging*) et permet d’obtenir une série de sous-spectres 1D grâce à une série de refocalisations successives des hélices d’aimantation.<sup>174</sup> Durant ce motif, les aimantations évoluent sous l’influence de différents paramètres conventionnels tels que déplacement chimique, couplages, ou temps de relaxation. Après réarrangement des données, les échos successifs décrivent un « pseudo-FID » comparable à celui obtenu en RMN conventionnelle (Figure 84). Après réarrangement des données, une transformation de Fourier permet d’obtenir la seconde dimension du spectre 2D ultrarapide, dénommée « dimension conventionnelle ».



**Figure 84 :** La succession de gradients de même intensité mais de signes opposés permet l'acquisition de la seconde dimension. Cette alternance permet la formation d'échos successifs et donc l'apparition d'un « pseudo FID ». L'application d'une transformation de Fourier sur ce pseudo FID permettra d'obtenir la seconde dimension RMN.

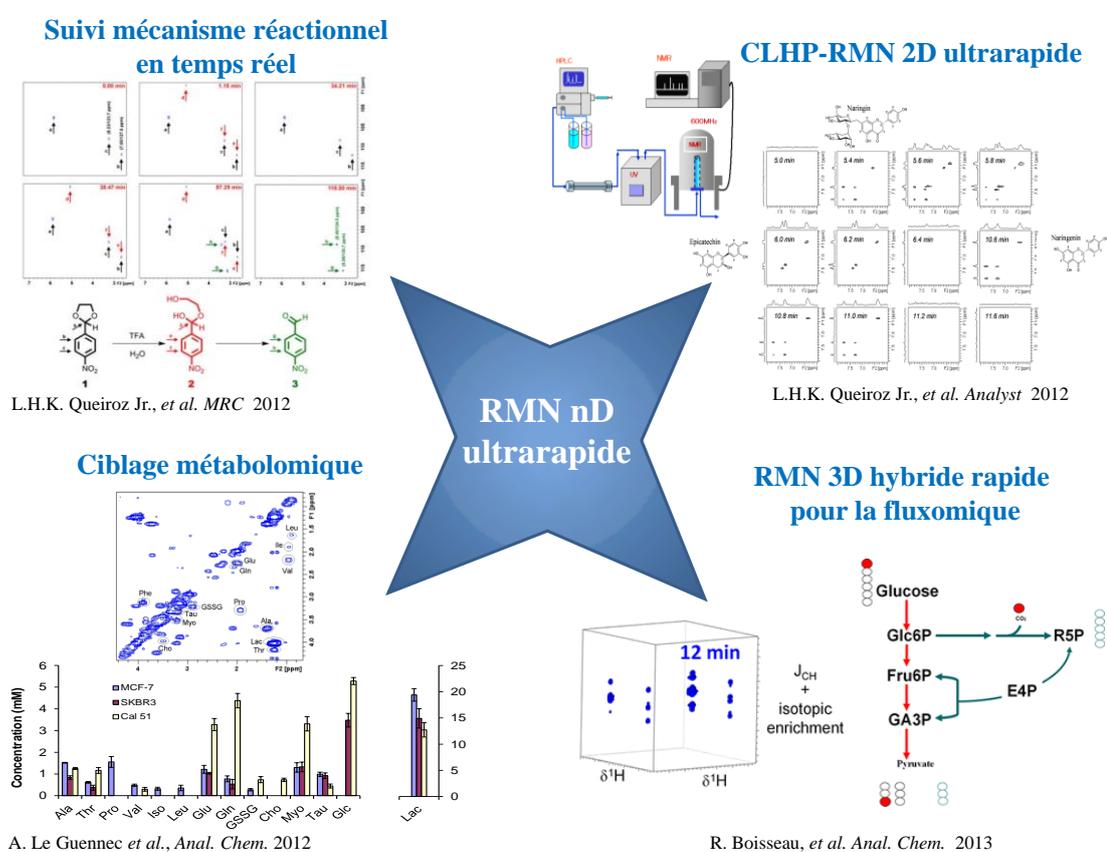
Les séquences de RMN 2D ultrarapide seront ainsi différentes de ce qui se fait en RMN 2D conventionnelle et l'utilisation de cette technique requiert la présence d'une sonde RMN équipée d'un gradient selon l'axe z.

### C.1.3.2 Avantages et inconvénients de la RMN 2D ultrarapide

La RMN 2D ultrarapide fait partie des axes majeurs d'étude au sein du laboratoire dans lequel ces travaux ont été réalisés. Ainsi, depuis son introduction, les efforts ont porté sur l'amélioration des performances analytiques de cette méthodologie.<sup>171, 175</sup> Les développements récents tels que l'optimisation des séquences d'impulsion ou le traitement post acquisition (ou bien les deux) ont permis d'améliorer à la fois la résolution et la sensibilité de cette technique.<sup>176-179</sup> En une dizaine d'années la sensibilité a été significativement améliorée et la résolution spectrale se rapproche de celle de la RMN 2D en mode conventionnel.<sup>177-178</sup> De plus, une automatisation à la fois de l'acquisition et du traitement des spectres RMN 2D ultrarapide favorise sa démocratisation.<sup>180</sup>

Comme nous l'avons montré précédemment, la RMN 2D ultrarapide permet d'obtenir un spectre en un seul scan, ce qui équivaut à une fraction de seconde. Ceci est un avantage indéniable pour les analyses quantitatives.<sup>181-182</sup> En effet, de faibles temps d'acquisition limitent l'influence des instabilités sur l'analyse. Ceci permet également l'analyse d'échantillons instables ou le suivi de réactions en temps réel.<sup>183</sup> De plus, la rapidité des analyses peut permettre un couplage de la RMN avec d'autres techniques d'analyse comme

par exemple la Chromatographie en phase Liquide Haute Performance (CLHP)<sup>184</sup> ou la Polarisation Dynamique Nucléaire (PDN).<sup>185</sup> La Figure 85 présente une partie des applications possibles de la RMN ultrarapide. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence la puissance de la RMN ultrarapide pour le suivi de mécanismes réactionnels en temps réel,<sup>183</sup> son couplage avec la CLHP,<sup>184</sup> ainsi que pour du ciblage métabolique.<sup>186</sup> Plus récemment, le principe de RMN ultrarapide a été appliqué pour enregistrer des spectres RMN 3D (par le biais de séquences hybrides rapides) en un temps fortement réduit par rapport à un spectre RMN 3D conventionnel.<sup>187</sup> Ceci pourrait trouver une application en biologie par exemple, pour l'obtention de spectres RMN de protéines.



**Figure 85 : Différentes applications de la RMN nD ultrarapide.**

Toutefois, la RMN 2D ultrarapide impose un compromis entre sensibilité et résolution. En effet, pour augmenter la résolution des spectres, il faut augmenter le temps de codage spatial. Cependant, une augmentation du temps de codage spatial entraîne des pertes de sensibilité (notamment liées à la modulation  $J$  et aux effets de la diffusion moléculaire) ainsi qu'une réduction de la largeur spectrale. Ainsi, l'enjeu principal en RMN ultrarapide est de choisir le meilleur compromis entre sensibilité, résolution et gamme spectrale.<sup>171</sup>

## C.2 Couplage électrochimie - résonance magnétique nucléaire

La première étude concernant le couplage entre une cellule électrochimique (CE) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) a été rapportée dès les années 70. Les auteurs ont alors décrit la première cellule spectro-électrochimique permettant la mise en œuvre de réactions redox pour des mesures RMN *in situ*.<sup>11</sup> Depuis, de nombreuses modifications, qui seront discutées dans cette partie, ont permis une nette amélioration des performances analytiques du couplage CE-RMN.<sup>12</sup> L'ensemble des études CE-RMN a porté sur des molécules simples, pour lesquelles la RMN à une dimension (1D) est un outil adapté. Cependant, les recouvrements entre pics RMN dans le cas d'échantillons plus complexes (mélanges) rendent l'élucidation structurale délicate. C'est pourquoi nos travaux sont dédiés au développement du couplage entre une cellule électrochimique et la résonance magnétique nucléaire à deux dimensions (2D). En effet, la RMN 2D permet de limiter les phénomènes de recouvrement sur les spectres,<sup>188-189</sup> et les expériences de RMN 2D ultrarapide récemment développées sont compatibles avec l'étude cinétique de phénomènes chimiques.

Dans un premier temps, l'association CE-RMN à l'état liquide, tant en ligne qu'*in situ* sera discutée au travers des contraintes expérimentales inhérentes au couplage CE-RMN, suivi d'un aperçu des dispositifs expérimentaux et applications possibles d'un tel couplage (Tableau 6). Pour finir, les performances du premier couplage CE-RMN 2D ultrarapide seront démontrées grâce à l'élucidation du comportement électrochimique du 9-chlororanthracène.<sup>190</sup>

**Tableau 6 : résumé des couplages CE-RMN rapportés dans la littérature.**

Référence	Electrode de travail		Caractéristiques		Description	Réactions étudiées	Type de couplage
	matériaux	forme	avantages	inconvénients			
-					-	-	-
J.A. Richard <i>et al.</i> Anal. Chem., 47, 1975, 964-966	Pt/Hg	fil	pas de modification de la RMN	mercure, élargissement des raies	hybride flux/statique	réduction du <i>trans</i> -1-phényl-1-butène-3-one	<i>in situ</i>
K. Albert <i>et al.</i> Magn. Reson. Chem., 251, 1987, 919-922	Pt	fil	pas d'élargissement des raies	sonde RMN en flux, consommation solvant deutéré	deux flux en parallèle formation/détection	réduction 2,4,6-tri- <i>tert</i> -butylphénol	en ligne
D.W. Mincey <i>et al.</i> Anal. Chem., 62, 1990, 1197-1200	SbSnO <sub>2</sub>	film	effet limité sur le champ magnétique, meilleure conversion électrochimique	tube à usage unique mercure	dispositif tournant	réduction de la benzoquinone	<i>in situ</i>
P.D. Prenzler <i>et al.</i> Electrochem. Commun., 2, 2000, 516-521	Au	film	effet limité sur le champ magnétique	taille du tube 10 mm long temps d'expérience	influence de la géométrie des matériaux	réduction de la benzoquinone	<i>in situ</i>
R.D. Webster Anal. Chem., 74, 2004, 1603-1610	Au	film	utilisable facilement en routine malgré la conception complexe de la cellule	passivation de l'électrode de travail pour certaines réactions (réduction d'halides) tube de 10 mm	investigations de réaction plus complexes mettant en jeu des signaux RMN complexes	réduction du 9-chloroanthracène, 9-bromoanthracène, 4-bromobenzophenone	<i>in situ</i>
S. Klod <i>et al.</i> Anal. Chem., 81, 2009, 10262-10267	C	microfibres	faible coût et facilité de fabrication	long temps d'expérience (dépend de la dimension des électrodes)	synthèse à grande échelle de métabolites	réduction/oxydation de la benzoquinone	<i>in situ</i>
X. Zhang <i>et al.</i> J. Of Magn. Reson., 208, 2011, 136-147	Au	Film	temps d'expérience faible, dispositif utilisable en routine	conception complexe	investigation de réaction complexe	réduction de la benzoquinone et oxydation de l'acide caféique	<i>in situ</i>
H. Simon <i>et al.</i> Anal. Chem., 84, 2012, 8777-8782	C	vitreux	facilité de mise en œuvre	forte consommation de solvant, temps de transfert entre les cellules électrochimiques	couplage en ligne de cellules commerciales pour l'analyse en flux	oxydation du paracétamol	<i>en ligne</i>
U. Bussy <i>et al.</i> Anal. Bioanal. Chem., 405, 2013, 5817-5824	C	microfibres	fabrication maison électrodes jetables	forte influence sur le champ magnétique	élucidation d'un mécanisme d'oxydation, observation d'espèces instables	oxydation de la phénacétine	<i>in situ</i>
L.M.S. Nunes <i>et al.</i> Analytica Chimica Acta, 850, 2014, 1-5	C	microfibres	temps d'expérience faible, bonne conversion électrochimique	tube 10 mm abondance naturelle faible du <sup>13</sup> C	observation des signaux <sup>13</sup> C	réduction du 9-chloroanthracène	<i>in situ</i>
R. Boisseau <i>et al.</i> Anal. Chem., 87, 2015, 372-375	C	microfibres	fabrication maison électrodes jetables	forte influence sur le champ magnétique	utilisation de la RMN 2D ultrarapide	réduction du 9-chloroanthracène	<i>in situ</i>
L. Huang <i>et al.</i> Chem. Commun., 51, 2015, 8086-8088	C	microfibres	électrode commerciales	tube de 10 mm utilisation d'éthanol marqué <sup>13</sup> C	identification et quantification des espèces durant une réactions homogène	oxydation de l'éthanol	<i>in situ</i>

## C.2.1 Contraintes expérimentales

### C.2.1.1 Concentration initiale de la solution en composé et électrolyte support

Comme mentionné précédemment, la sensibilité des mesures RMN est un facteur limitant, c'est pourquoi la concentration en produits d'oxydation générés électrochimiquement est un

facteur déterminant dans la mise en place des expériences CE-RMN. En effet, le signal RMN est directement proportionnel au nombre de noyaux en solution, il est donc préférable de travailler avec une grande concentration. Toutefois, du point de vue de l'électrochimie, une grande concentration initiale peut induire des effets de polymérisation et/ou de passivation de l'électrode de travail. De plus, il est nécessaire de trouver un compromis concernant la concentration en électrolyte support. En effet, une concentration élevée permet de limiter le phénomène de chute ohmique, mais la présence d'ions en solution perturbe l'accord de la sonde RMN. Au sein d'un milieu très conducteur le mouvement des charges provoque une fluctuation des aimantations enregistrées par la sonde.<sup>191</sup> L'accord de sonde est un paramètre clé lors d'une analyse RMN car il permet d'ajuster la fréquence de travail de l'appareil à la fréquence de Larmor du noyau considéré. C'est pourquoi, lors d'une étude couplée électrochimie-RMN, la concentration en électrolyte support ne doit pas excéder 50 mM. Une concentration judicieusement choisie en cet électrolyte permet de ne pas induire une résistance trop importante de la solution, tout en conservant une sensibilité suffisante pour une détection par RMN 2D ultrarapide.

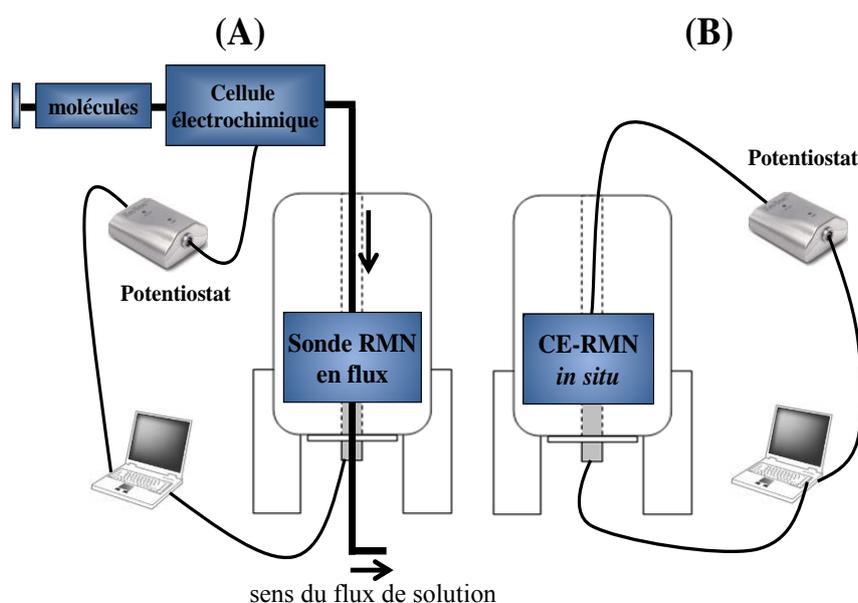
### C.2.1.2 Homogénéités de l'échantillon et du champ magnétique

La fréquence d'observation d'un noyau étant directement corrélée à son environnement intramoléculaire, mais également en solution, en théorie des noyaux identiques doivent être observés à des fréquences identiques. Cependant, les inhomogénéités du champ magnétique et/ou de l'échantillon peuvent créer des distorsions et ainsi déformer les raies RMN. De plus, une forte inhomogénéité de l'échantillon engendre une dispersion importante des signaux RMN, conduisant à des signaux élargis et déformés.

Toutefois, il existe des moyens pour s'affranchir en grande partie de ces effets. Ainsi, une correction des inhomogénéités du champ magnétique est mise en place grâce à des micro-champs magnétiques appelés « shims » qui sont ajoutés au champ principal  $\vec{B}_0$ . Le réglage des shims permet de contrôler les imperfections spatiales du champ magnétique. De plus, l'utilisation d'un verrouillage champ fréquence (« lock ») par la présence d'un solvant deutéré ( $^2\text{H}$ ) dans l'échantillon permet d'éliminer les variations temporelles du champ magnétique en temps réel.

## C.2.2 Couplage entre une cellule électrochimique et la RMN

Le couplage entre une cellule électrochimique et la résonance magnétique nucléaire fait partie des outils analytiques de premier ordre pour une meilleure compréhension des transformations électrochimiques en solution.<sup>192</sup> Un tel couplage peut se faire de deux façons différentes : en ligne ou *in situ* (Figure 86)



**Figure 86 :** (A) couplage en ligne CE-RMN, les flèches indiquent le sens du flux de la solution à travers la sonde RMN. En (B) couplage *in situ* CE-RMN.

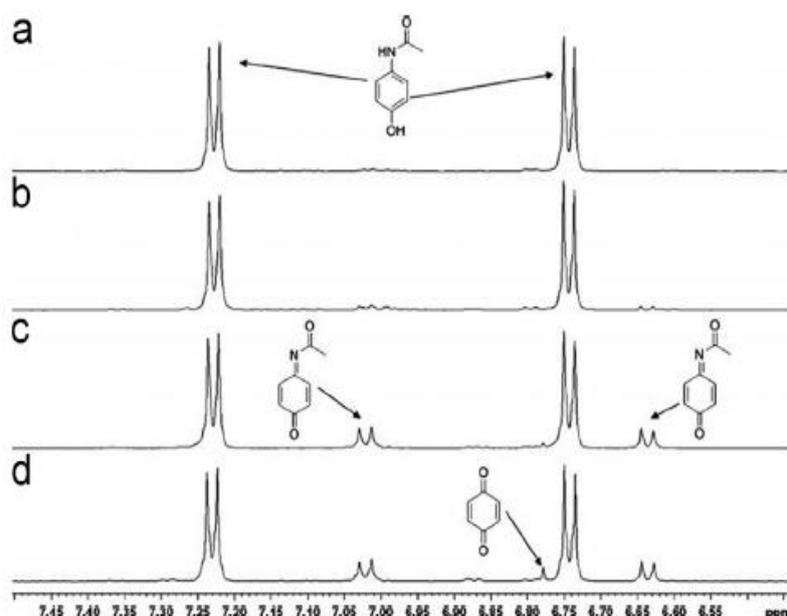
Ces deux approches offrent des performances différentes, dont les avantages et inconvénients sont discutés ci-dessous.

### C.2.2.1 Couplage CE-RMN en ligne

Concernant le couplage en ligne, la cellule électrochimique étant positionnée à l'extérieur du spectromètre RMN, celle-ci ne perturbe pas le champ magnétique local. De plus, cette configuration offre la possibilité d'utiliser une séparation chromatographique en amont de l'analyse RMN. Toutefois, avec cette méthodologie, il est nécessaire d'utiliser une sonde RMN dédiée à l'analyse en flux, ce qui engendre un coût d'achat et d'utilisation important (consommation de solvant deutéré importante).

Les premiers travaux sur ce sujet ont été rapportés en 1987 par Albert *et al.* Les auteurs se sont focalisés sur le suivi de la conversion électrochimique du 2,4,6-tri-*tert*-butylphénol à haut débit (20 mL/min).<sup>193</sup> L'analyse RMN était réalisée en flux (1 mL.min<sup>-1</sup>) grâce à un circuit

parallèle utilisant une source commune. Albert et ses collaborateurs ont également pu mettre en évidence que l'homogénéité du champ magnétique diminuait durant l'électrolyse. Plus récemment, Simon *et al.* décrivent l'utilisation d'une cellule électrochimique avec une sonde RMN en flux, pour étudier une réaction métabolique.<sup>194</sup> Les auteurs mettent en lumière la puissance de cette méthode par l'observation de l'oxydation du paracétamol en NAPQI (sans piégeage chimique), facilement hydrolysé en benzoquinone (BQ) comme présenté sur la Figure 87. Il est aussi important de noter que la conversion totale du paracétamol n'est jamais achevée, ce qui indique une possible dégradation du NAPQI entre sa production électrochimique et son analyse RMN. Ceci explique la nécessité de développer des outils analytiques capables d'observer les espèces générées électrochimiquement en temps réel.



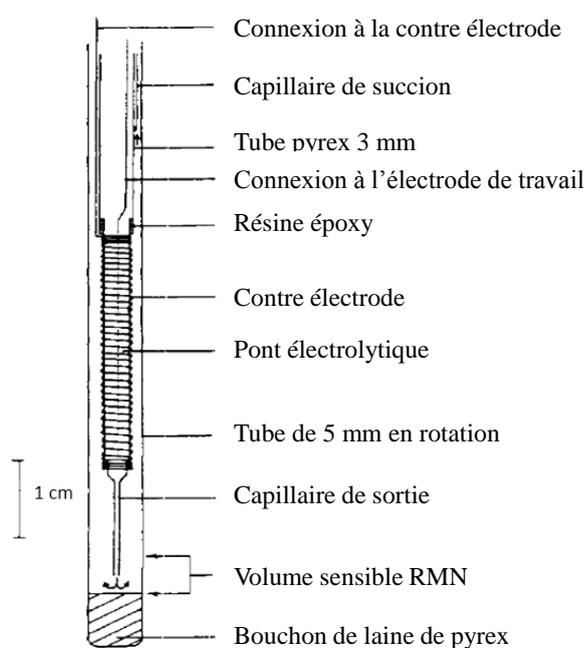
**Figure 87 : Signaux des protons aromatiques du paracétamol à 0 mV (a), 600 mV (b), 1200 mV (c), 1700 mV (d).**<sup>194</sup>

En effet, le NAPQI, ainsi que la BQ, produit de son hydrolyse, ont pu être observés sans piégeage chimique (addition nucléophile de glutathion), contrairement au couplage CE-SM. Cette étude confirme l'intérêt du couplage CE-RMN pour l'observation de métabolites réactifs. Toutefois, malgré le fort potentiel de ce couplage, notamment par la possibilité d'introduire une séparation chromatographique en amont de l'analyse RMN, sa généralisation est limitée. En effet, le coût financier important (sonde RMN en flux) s'avère être son principal inconvénient.

### C.2.2.2 Couplage CE-RMN *in situ*

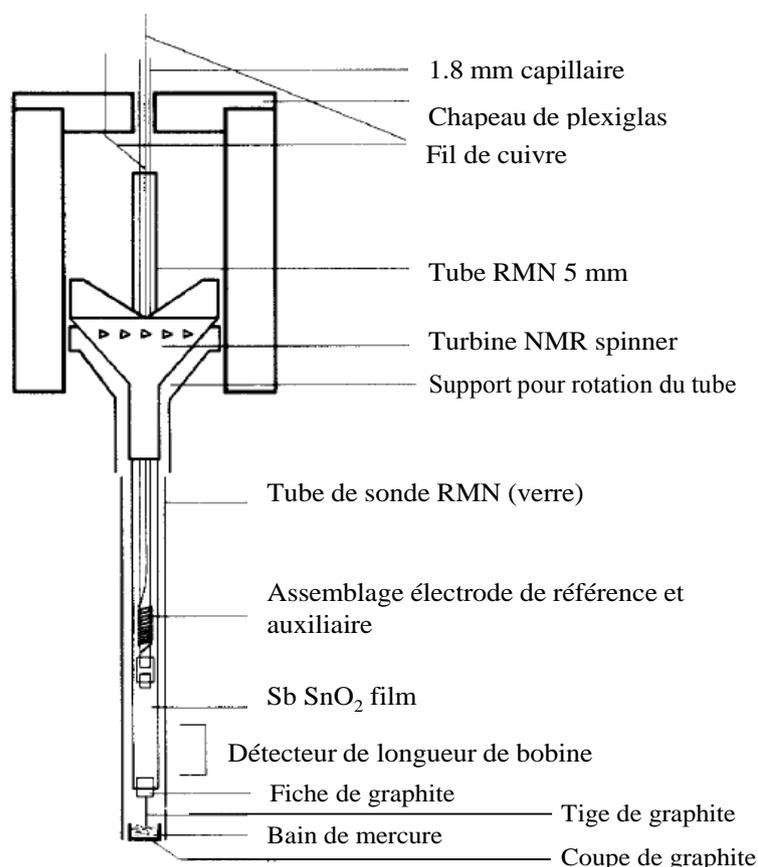
En ce qui concerne le couplage CE-RMN *in situ*, la cellule électrochimique est positionnée au sein même du système de détection RMN. Ceci offre la possibilité du suivi en temps réel d'une réaction d'oxydo-réduction. En effet, le temps écoulé entre la production électrochimique d'une espèce réactive et sa détection par RMN est réduit à zéro avec l'approche *in situ*. Ainsi, il devient possible d'observer en temps réel les espèces générées et les possibles intermédiaires réactionnels pour faciliter l'élucidation des mécanismes mis en jeu.

En 1975, Richard *et al.* sont les premiers à rapporter une telle étude.<sup>11</sup> Le dispositif est composé d'une cellule en flux et d'une cellule spectro-électrochimique pour des mesures *in situ* avec un montage à deux électrodes introduit directement dans un tube RMN (diamètre interne du tube 5 ou 10 mm) comme présenté sur la Figure 88. L'électrode de travail est constituée d'un fil de platine recouvert de mercure tandis qu'un fil de platine fait office de contre électrode. La solution est introduite à la surface de l'électrode de travail, elle-même contenue dans un tube de 3 mm concentrique au tube RMN. Le tube de 3 mm est disposé de manière à être au plus proche du centre de la zone sensible de détection. Les performances analytiques de cette cellule ont été évaluées sur la réduction de la *trans*-1-phényl-1-butèn-3-one en 1-phényl-3-butanone ainsi que sur l'étude du dimère du produit de départ.



**Figure 88 :** Cellule électrochimique utilisée par Richard *et al.* pour une implémentation *in situ* CE-RMN.<sup>11</sup>

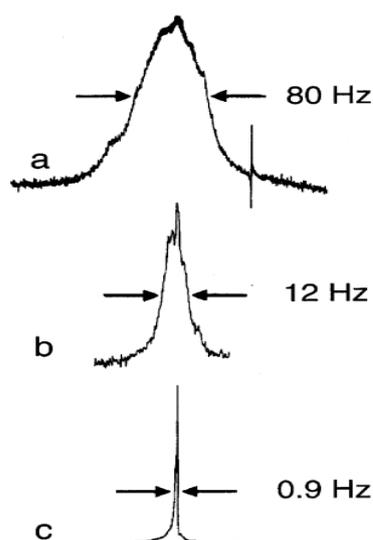
En 1990, Mincey *et al.* ont développé une cellule électrochimique utilisant comme électrode de travail un film mince de Sb-SnO<sub>2</sub> déposé chimiquement sur la paroi interne du tube (Figure 89).<sup>195</sup> Dans cette étude, l'effet de l'épaisseur du film conducteur sur le champ magnétique est rapporté (caractérisé par le paramètre « épaisseur de peau »). Ce paramètre définit l'épaisseur nécessaire pour qu'un film conducteur diminue de 37 % l'intensité initiale d'une radiation électromagnétique. Les auteurs concluent à un effet très limité du dépôt sur l'homogénéité de l'échantillon et du champ en comparaison des dispositifs métalliques. L'emploi d'un film mince apparaît être une bonne alternative pour limiter l'effet néfaste sur l'homogénéité du champ magnétique lors de l'introduction du dispositif électrochimique. En effet, il est important de limiter l'élargissement des pics pour minimiser les recouvrements des signaux RMN, en particulier pour l'analyse à une dimension.



**Figure 89 : Cellule électrochimique utilisée par Mincey *et al.* pour la réduction électrochimique de la *p*-benzoquinone en hydroquinone. Le choix d'un film mince comme électrode de travail permet de minimiser les effets néfastes sur le champ magnétique.<sup>195</sup>**

Ce dispositif électrochimique fut le premier employé pour décrire la réduction de la *p*-benzoquinone en hydroquinone. Cette cellule permet la réduction d'une solution de BQ de 0.1 mol.L<sup>-1</sup> dans D<sub>2</sub>O en environ 12 min, ce qui montre l'intérêt d'un tel dispositif pour générer *in situ* des espèces électrochimiques réactives et les détecter par RMN.

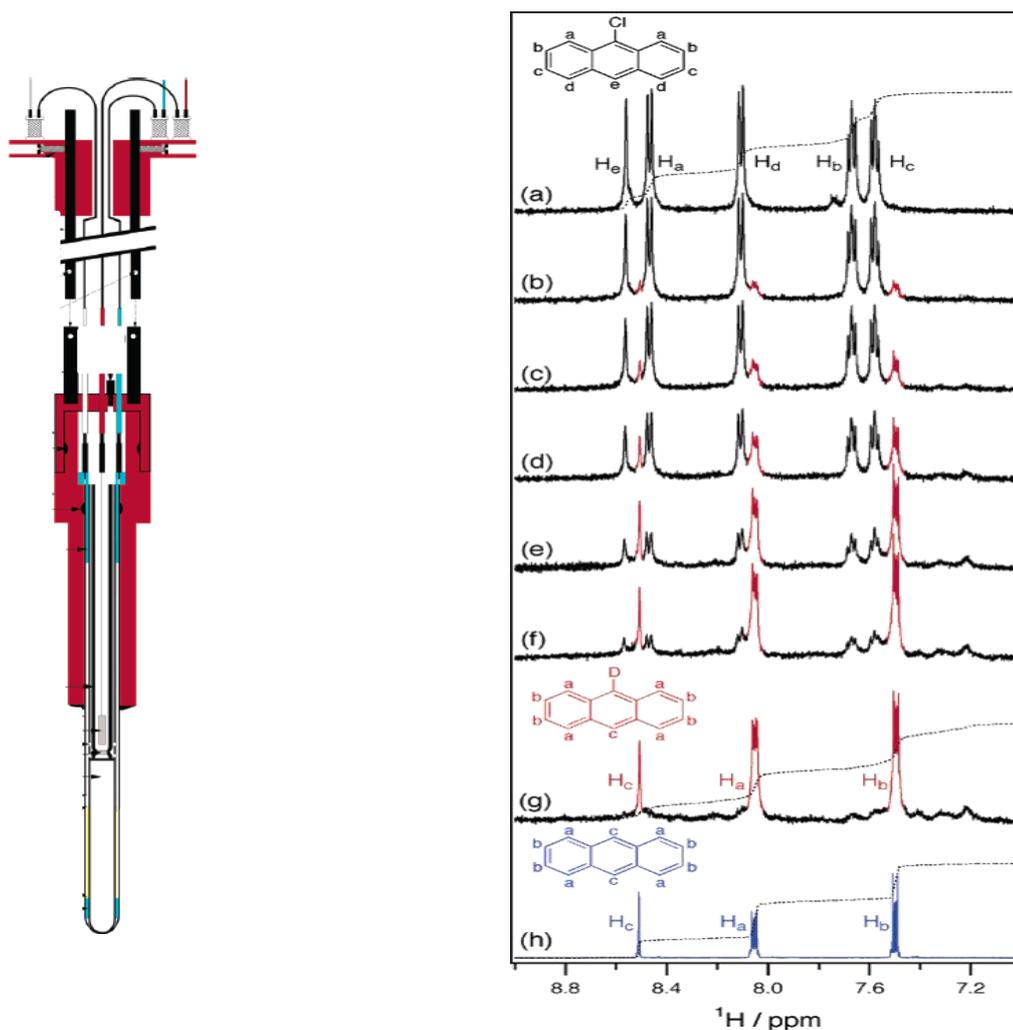
L'utilisation d'un film conducteur comme électrode de travail pour le couplage CE-RMN *in situ* constitue une avancée significative dans le domaine. En 2000, Prenzler *et al.* proposent un dispositif électrochimique basé sur l'utilisation d'un autre film conducteur en vue de la mise en place d'expériences CE-RMN *in situ*.<sup>196</sup> Les auteurs confirment l'absence d'effet du film conducteur sur les ondes radiofréquences, en plus d'une comparaison faite sur différents matériaux pouvant constituer l'électrode de travail et de leur effet sur l'élargissement des raies RMN <sup>1</sup>H. Pour un fil de platine la largeur à mi-hauteur mesurée est de 80 Hz, 12 Hz pour une grille de platine cylindrique, et seulement 0,9 Hz en présence d'un film d'or (Figure 90). Ceci permet de conclure à la fois sur le choix du matériau constituant les électrodes de travail, mais également sur la géométrie optimale de celles-ci.



**Figure 90 : L'influence de la présence d'une électrode de travail sur l'allure des signaux RMN <sup>1</sup>H à 300 MHz. (a) fil de platine en spirale, (b) grille de platine cylindrique et en (c) film d'or.<sup>196</sup>**

Plus récemment, Webster *et al.* ont présenté un autre dispositif électrochimique plus complexe constitué de trois électrodes utilisant un film conducteur d'or comme électrode de travail. Ce dispositif a permis l'étude de cas plus complexes tels que la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène, du 9-bromoanthracène et de la 4-bromobenzophénone.<sup>14</sup> Les auteurs rapportent la réduction électrochimique des deux

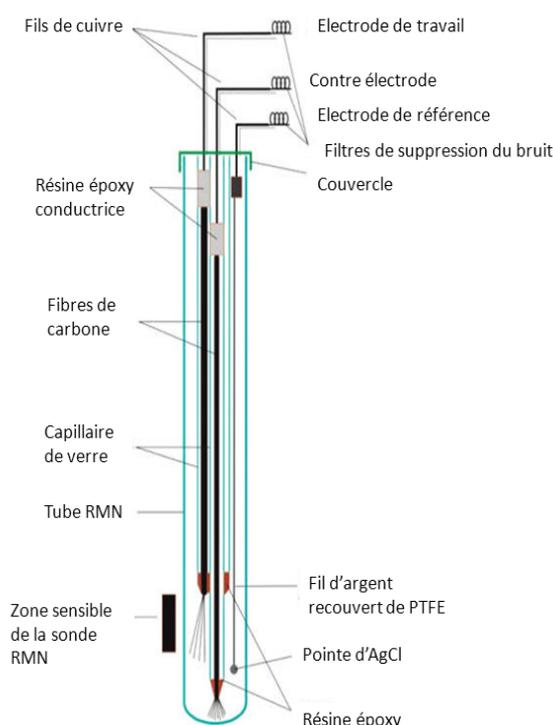
premiers composés en un temps d'expérience relativement court (1 heure) comme le montre la Figure 91. La réduction de la 4-bromobenzophénone apparaît quant à elle plus complexe. En effet, les auteurs rapportent une diminution du courant durant l'expérience du fait de la passivation de l'électrode de travail par les produits de réduction de la 4-bromobenzophénone. Les auteurs en déduisent l'intérêt des expériences CE-RMN *in situ* pour l'étude de réactions électrochimiques conduisant à la formation d'un nombre limité de produits d'oxydation, afin de limiter les recouvrements des signaux RMN.



**Figure 91 :** A gauche schématisation de la cellule électrochimique développée par Webster *et al.* constituée d'un film mince d'or comme électrode de travail. A droite les spectres RMN  $^1\text{H}$  acquis sur un spectromètre 500 MHz, obtenus avec le couplage CE-RMN *in situ*, de la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène dans  $\text{CD}_3\text{CN}$ . (a) avant électrolyse, (b) 7-12 min, (c) 17-22 min, (d) 25-30 min, (e) 40-45 min, (f) 47-52 min, (g) 60-65 min et (h) spectre de l'anthracène dans  $\text{CD}_3\text{CN}$ .<sup>14</sup>

Les meilleures performances analytiques du couplage CE-RMN *in situ* ont été obtenues avec l'utilisation du film mince. Cependant, le développement de ces dispositifs nécessite un

savoir-faire et un équipement spécifiques. En effet, si la fabrication de tels films minces n'est possible que par la mise en place d'un dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma, d'autres alternatives ont été développées pour faciliter la mise en place d'un tel couplage. Le meilleur compromis coût/performance est à ce jour celui proposé par Klod *et al.* en 2009 (Figure 92).<sup>13</sup> Cette cellule est basée sur une fabrication artisanale d'électrodes grâce à l'utilisation de microfibrilles de carbone comme électrodes de travail et auxiliaire. Les microfibrilles de carbone sont orientées vers le volume sensible de la sonde RMN grâce à un capillaire en verre. La conduction électronique entre les microfibrilles et le fil de cuivre est assurée par la présence d'une résine époxy conductrice. Un fil d'argent recouvert de Poly-Tétra-Fluoro-Ethylène (PTFE ; Teflon<sup>®</sup>) et muni d'une pointe d'AgCl à son extrémité fait office d'électrode de référence. Comme indiqué par Prenzler *et al.*,<sup>196</sup> des filtres ont été placés sur chaque câble afin de limiter le bruit électromagnétique généré lors de l'application du potentiel, susceptible de perturber le signal RMN.



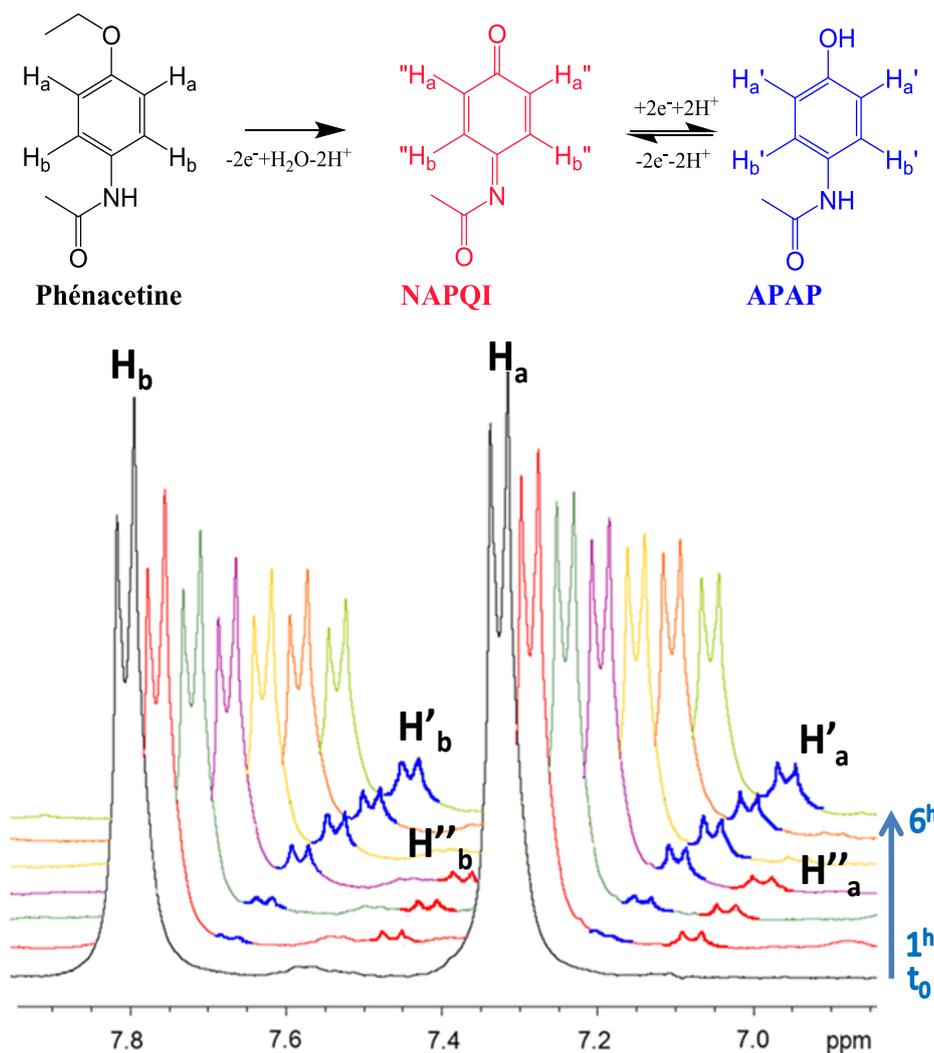
**Figure 92 : Cellule électrochimique conçue par Klod *et al.* pour les expériences CE-RMN *in situ*.**<sup>13</sup>

Les performances de cette cellule ont été également évaluées sur l'exemple de la réduction de la benzoquinone (BQ).<sup>197</sup> Malgré un temps d'électrolyse important (environ 6 heures), les capacités de production *in situ* d'espèces électrochimiques ont été démontrées pour ce dispositif. De plus, contrairement à ce qui a été présenté précédemment, la simplicité de mise

en œuvre d'une telle cellule permet de faciliter son introduction dans les laboratoires avec des prérequis limités dans le domaine de la CE-RMN.

Les auteurs ont aussi rapporté l'observation spectro-électrochimique *in situ* de la dimérisation de tétramères de thiophènes.<sup>198</sup> Grâce à l'utilisation des informations issues des expériences CE-RMN et de la voltampérométrie cyclique, ils ont identifié que la dimérisation était la cause principale de la stabilisation des charges au cours de l'oxydation des tétramères de thiophène. Toutefois, les concentrations élevées imposées par la RMN et la faible solubilité des polymères formés sont considérées comme responsables du précipité marron observé au cours de l'expérience.

Le couplage CE-RMN *in situ* a pour avantage essentiel de pouvoir suivre en temps réel la composition de la solution soumise à une réaction électrochimique, et ainsi faciliter l'élucidation structurale des produits de cette même réaction. De plus, il permet d'observer des intermédiaires réactionnels instables sans l'utilisation de piégeages chimiques. Ainsi, Bussy *et al.* ont pu observer le comportement oxydatif de la phénacétine en temps réel.<sup>199</sup> Les auteurs ont choisi de développer une cellule électrochimique basée sur le modèle de cellule introduit par Klod *et al.* Ils rapportent ainsi l'oxydation de la phénacétine en NAPQI, qui se trouve être un intermédiaire réactif, car dans un second temps elle se réduit en paracétamol, comme l'indique la Figure 93. Cette étude sera suivie par l'élucidation de la dégradation de la NAPQI en solution, expliquant l'impossibilité d'oxyder le paracétamol de façon quantitative par le couplage CE-RMN en ligne.<sup>200</sup>



**Figure 93 :** Suivi de l'oxydation électrochimique de la phénacétine par couplage CE-RMN *in situ*. On observe la diminution des signaux aromatiques de la phénacétine en faveur de 2 molécules : NAPQI et paracétamol (APAP). L'observation de la NAPQI est possible au bout d'environ 1h d'électrolyse et sa disparition totale à lieu au bout d'environ 3h d'expérience.<sup>199</sup>

Toutefois, cette étude met en avant une limitation expérimentale intrinsèque à la RMN, en partie évoquée dans les paragraphes précédents. En effet, l'exemple de la phénacétine se trouve à la limite des performances analytiques de la RMN à une dimension. Lors de l'étude de mélanges plus complexes la présence de nombreux signaux RMN peut induire des recouvrements entre eux. Ces recouvrements compliquent l'interprétation structurale et une possible quantification. De plus, l'introduction d'un dispositif électrochimique contribue à la perturbation du champ magnétique et peut donc engendrer un élargissement des signaux. La RMN à deux dimensions (RMN 2D) apparaît comme une solution évidente à ces limitations. Toutefois, l'acquisition d'un spectre RMN 2D, comme mentionné précédemment, est incompatible avec le suivi en temps réel d'une réaction électrochimique en raison d'un temps

d'expérience RMN trop long. En effet, afin d'obtenir un spectre avec un bon rapport sensibilité/résolution, les temps d'acquisition peuvent atteindre plusieurs dizaines de minutes. De plus, durant la réaction électrochimique, la composition chimique du système évolue en permanence, ce phénomène est susceptible de générer des distorsions sur le spectre de RMN 2D conventionnelle, la composition du système évoluant de manière significative entre l'acquisition de deux lignes successives du FID à deux dimensions. C'est pourquoi nous avons choisi de mettre en œuvre le couplage entre une cellule électrochimique et la RMN 2D ultrarapide. L'étude a porté sur la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène, un processus rapide engendrant des produits avec des signaux multiples, qui représente un modèle bien adapté au développement de la CE-RMN 2D ultrarapide.

## C.3 Développement du couplage électrochimie - RMN 2D ultrarapide : application pour la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène

### C.3.1 Matériels et méthodes

#### C.3.1.1 Réactifs

Une solution initiale est préparée dans l'acétonitrile- $d_3/D_2O$  95:5 (v/v), contenant 25 mmol.L<sup>-1</sup> de 9-chloroanthracène (référence L01092) et 50 mmol.L<sup>-1</sup> d'électrolyte support ( $Bu_4N^+$  ;  $PF_6^-$  référence 281026). Tous les produits ont été achetés chez [www.sigmaalrich.com](http://www.sigmaalrich.com).

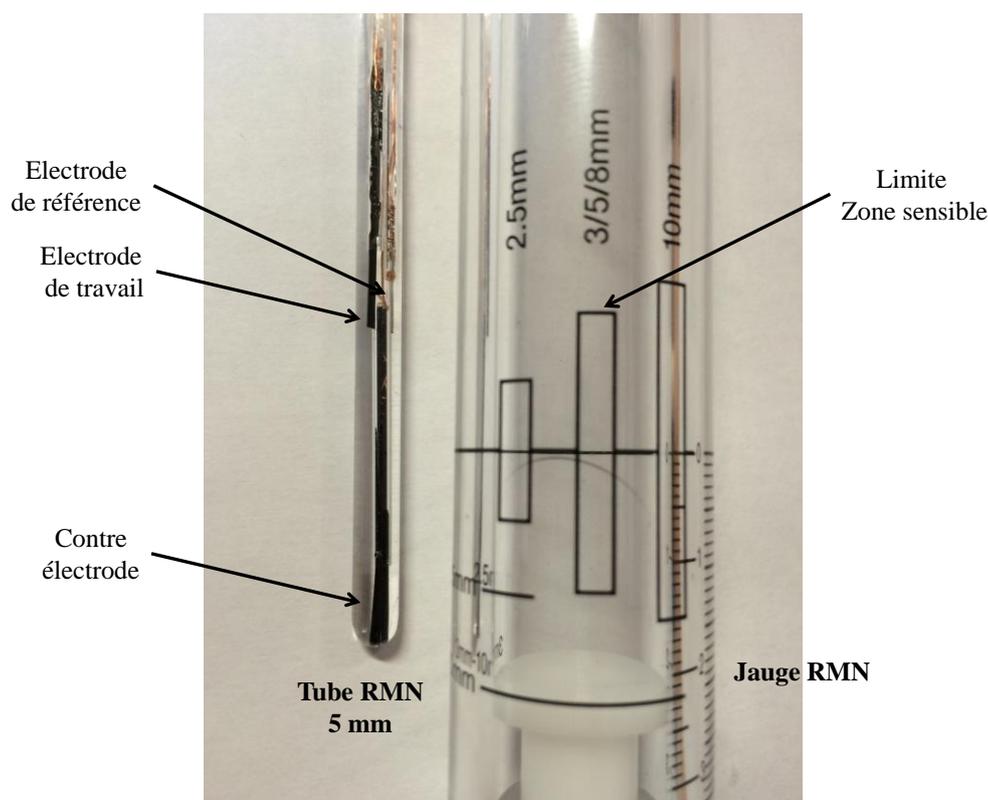
#### C.3.1.2 Cellule électrochimique

Les électrodes sont adaptées pour être introduites à l'intérieur d'un tube RMN de 5 mm de diamètre interne et de longueur 17,8 cm (Wilmad, STATE, Vineland, USA). L'électrode de travail et la contre-électrode sont constituées par des microfibres de carbone (F500 ; 9- $\mu$ m de diamètre de filament, référence C005780) achetées chez Goodfellow (Lille, France) et une résine époxy (Caldofix kit 2 de chez Struers, Champigny Sur Marne, France, référence 40200084), constituée de 25 % de durcisseur et 75 % de résine époxy (pourcentages en masse)

Les électrodes sont préparées comme précédemment décrit par Bussy *et al.*<sup>199</sup> Brièvement, pour la fabrication des électrodes de travail et de la contre-électrode, la résine est préalablement introduite dans un capillaire en verre (1 mm de diamètre) par le biais d'une seringue munie d'une aiguille. Nous introduisons par la suite les microfibres de carbone et le fil de cuivre dans le capillaire. Le capillaire est ensuite laissé à température ambiante durant environ 5h pour limiter la montée par capillarité de la résine époxy sur les microfibres. La fabrication des électrodes est achevée en plaçant celles-ci dans un four à 90°C durant 2h pour permettre le durcissement de la résine.

La préparation de l'électrode de référence suit la même méthodologie que celle de l'électrode de travail et de la contre-électrode en remplaçant les microfibres de carbone par un fil de Palladium (0,25 mm [Goodfellow](http://www.goodfellow.com), référence PD005130).

La position des électrodes est primordiale. En effet, elles sont positionnées dans le tube RMN de 5 mm afin de limiter les effets d'inhomogénéités. Les électrodes de travail et de référence sont positionnées face à face au-dessus du volume sensible de détection afin de limiter le phénomène de chute ohmique. La contre électrode est quant à elle placée en dessous du volume sensible de détection, comme le montre la Figure 94. La partie de l'électrode de travail qui traverse la zone sensible est entièrement contenue dans le capillaire en verre, ce qui permet d'éviter la présence de microfibrilles libres en solution dans la zone de détection. De cette façon l'impact des électrodes sur l'homogénéité de la solution est contrôlé.



**Figure 94 : Photo de la cellule électrochimique à 3 électrodes dans un tube RMN 5 mm. La jauge RMN permet de connaître la taille de la zone sensible de détection RMN et ainsi éviter la présence de microfibrilles de carbone libres dans cette zone.**

### **C.3.1.3 Voltampérométrie cyclique**

Les performances électrochimiques des électrodes artisanales en microfibrilles de carbone ainsi que de l'électrode de référence ont été évaluées précédemment sur une solution d'hydroxyméthylferrocène (cyclopentadiényl[(hydroxyméthyl(cyclopentadiényl))] de fer) à  $1 \text{ mmol}^{-1}$  en présence d'acétate de lithium à  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  dans un mélange eau/acétonitrile

50:50 (v/v).<sup>201</sup> Toutes les expériences d'électrochimie sont pilotées par le logiciel PStrace 2.3 et un potentiostat EmStat de chez PalmSens (Utrecht, Netherlands,).

#### C.3.1.4 Spectromètre RMN et paramètres RMN 2D ultrarapide

L'ensemble des spectres de RMN 2D ultrarapide est enregistré sur un spectromètre Bruker 700 MHz Avance III HD (Bruker Biospin, Wissembourg, France). La fréquence de résonance proton est de 700,28 MHz, le spectromètre est équipé d'une sonde cryogénique quadruple accord  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$  incluant des gradients selon l'axe z.

Toutes les expériences sont réalisées à la température de 307 K, sans rotation de l'échantillon. Avant chaque expérience l'accord de sonde et la correction des inhomogénéités du champ magnétique (« *shims* ») sont optimisés automatiquement puis ajustés manuellement.

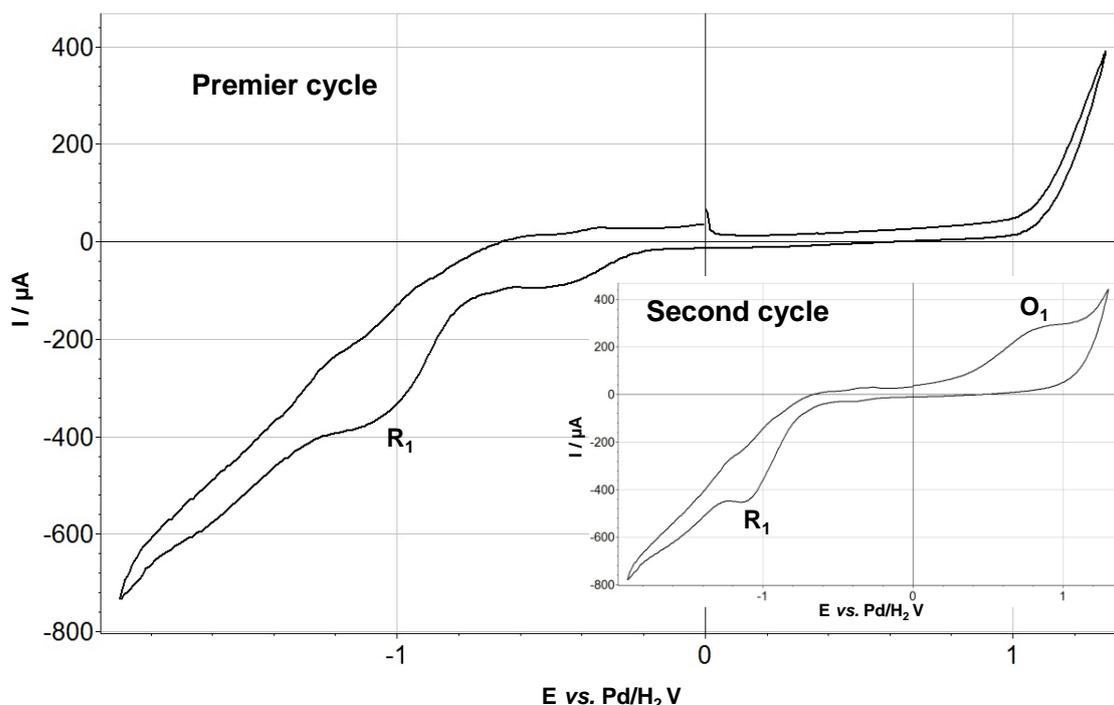
Nous avons choisi d'utiliser la séquence COSY avec la séquence d'impulsion décrite par Le Guennec *et al.*<sup>186</sup> Les spectres RMN 2D ultrarapide sont enregistrés avec une fenêtre spectrale de  $2,5 \times 2,5$  ppm (correspondant à la fenêtre spectrale des  $^1\text{H}$  aromatiques, et suffisante pour observer tous les signaux d'intérêt). Chaque spectre RMN 2D ultrarapide est obtenu en accumulant 32 scans avec un temps de répétition de 5 s entre chaque scan, ce qui correspond au temps d'acquisition et de récupération de l'aimantation. Ceci conduit à un temps d'expérience de 2 minutes 40 secondes par spectre RMN 2D ultrarapide. L'accumulation de 32 scans permet d'augmenter la sensibilité de l'expérience, tout en conservant un temps d'obtention du spectre compatible avec le suivi d'une cinétique rapide. Le traitement des données ultrarapides est réalisé à l'aide d'un programme spécifique sous Topspin<sup>®</sup> version 3.2 ([www.univ-nantes.fr/giraudeau-p](http://www.univ-nantes.fr/giraudeau-p)). Les spectres sont symétrisés pour une meilleure identification des pics de corrélation, mais l'intégration des signaux est réalisée sur les spectres non symétrisés.

### C.3.2 Résultats et discussions

#### C.3.2.1 Voltampérométrie cyclique

Dans un premier temps, le comportement électrochimique d'une solution de 9-chloroanthracène à une concentration de  $25 \text{ mmol.L}^{-1}$  a été étudié par voltampérométrie cyclique sur microfibres de carbone en présence de  $\text{Bu}_4\text{N}^+$  ;  $\text{PF}_6^-$  comme électrolyte support (Figure 95). Le caractère électroactif du 9-chloroanthracène est mis en évidence au travers de

la vague de réduction  $R_1$  (irréversible) observée à un potentiel voisin de -1100 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub> lors du premier cycle de balayage. La vague de réduction observée au voisinage de -500 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub> peut être attribuée à l'oxygène restant en solution après dégazage à l'argon. A noter qu'aucune vague d'oxydation n'est observée durant le premier cycle de balayage.



**Figure 95 :** Voltampérométrie cyclique du 9-chloroanthracène à 25 mmol.L<sup>-1</sup> dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O (95/5) en présence de Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> (50 mmol.L<sup>-1</sup>). Potentiel balayé entre 1,3 et -1,9 V *vs.* Pd/H<sub>2</sub> à  $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$ .

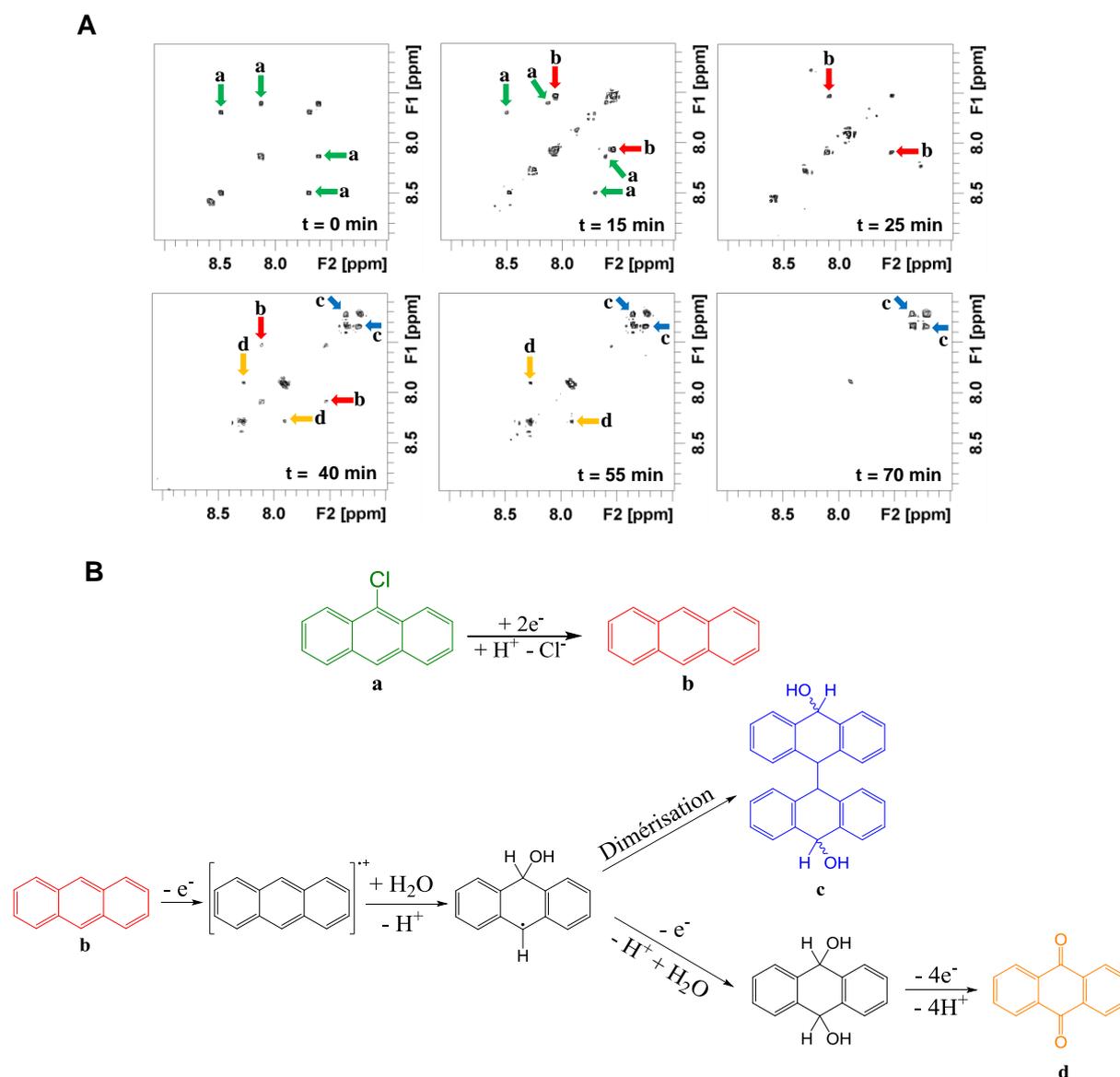
Lors du second cycle, une vague d'oxydation  $O_1$  est observée au potentiel d'environ 800 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub>. L'apparition de cette vague d'oxydation est due à la formation d'une entité chimique générée lors de la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène. L'absence d'une vague de réduction associée à la vague  $O_1$  met en avant le caractère irréversible de l'oxydation électrochimique de cette entité chimique.

Par la suite, l'élucidation mécanistique de la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène a été réalisée par couplage CE-RMN 2D ultrarapide. L'électrolyse a été effectuée au potentiel constant de -1200 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub> durant 80 min.

### C.3.2.2 Elucidation mécanistique par couplage CE-RMN 2D ultrarapide

Comme introduit dans la section C.2.2.2, la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène représente un modèle adéquat pour l'évaluation du couplage CE-RMN 2D

ultrarapide. En effet, comme on l'observe sur la Figure 91, la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène conduit à l'apparition de l'anthracène dont les signaux aromatiques se recouvrent avec ceux du réactif.<sup>14</sup> La Figure 96 présente les spectres RMN COSY 2D ultrarapide enregistrés à différents temps durant la réaction électrochimique. Ces spectres montrent les pics de corrélation caractéristiques du réactif et des différents produits de réaction.<sup>190</sup>

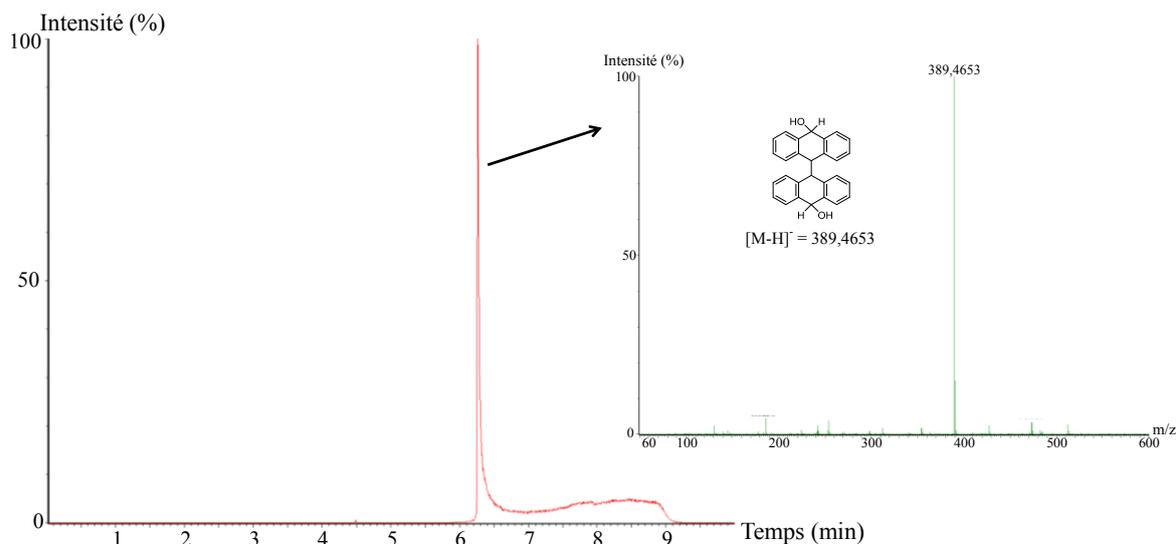


**Figure 96 : (A) Spectres RMN 2D COSY ultrarapide *in situ* enregistrés en temps réel durant la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène. Chaque spectre a un temps total d'acquisition de 2 min 40 s. Les pics de corrélation de chaque composé sont marqués par des flèches. (B) Comportement redox du 9-chloroanthracène selon les informations données par les spectres RMN. Les spectres sont symétrisés<sup>202</sup> pour une meilleure identification des pics de corrélation, mais l'intégration des signaux est réalisée sur les spectres non symétrisés.<sup>190</sup>**

Comme l'indique la Figure 96B, la première étape de réduction du 9-chloroanthracène (molécule **a** sur la Figure 96B) fait intervenir deux électrons et un proton, entraînant une déchlorination pour former l'anthracène. L'apparition de l'anthracène est constatée (molécule **b** sur la Figure 96B) après seulement 15 min de réaction et l'ensemble du réactif de départ disparaît au bout de 25 min, ce qui montre l'intérêt d'utiliser des microfibrilles de carbone pour la mise en place de conversions électrochimiques à l'échelle de temps de la RMN 2D ultrarapide. De plus, nous constatons la disparition des recouvrements entre les signaux RMN qui étaient présents sur les spectres 1D, ce qui justifie l'intérêt de la RMN 2D.

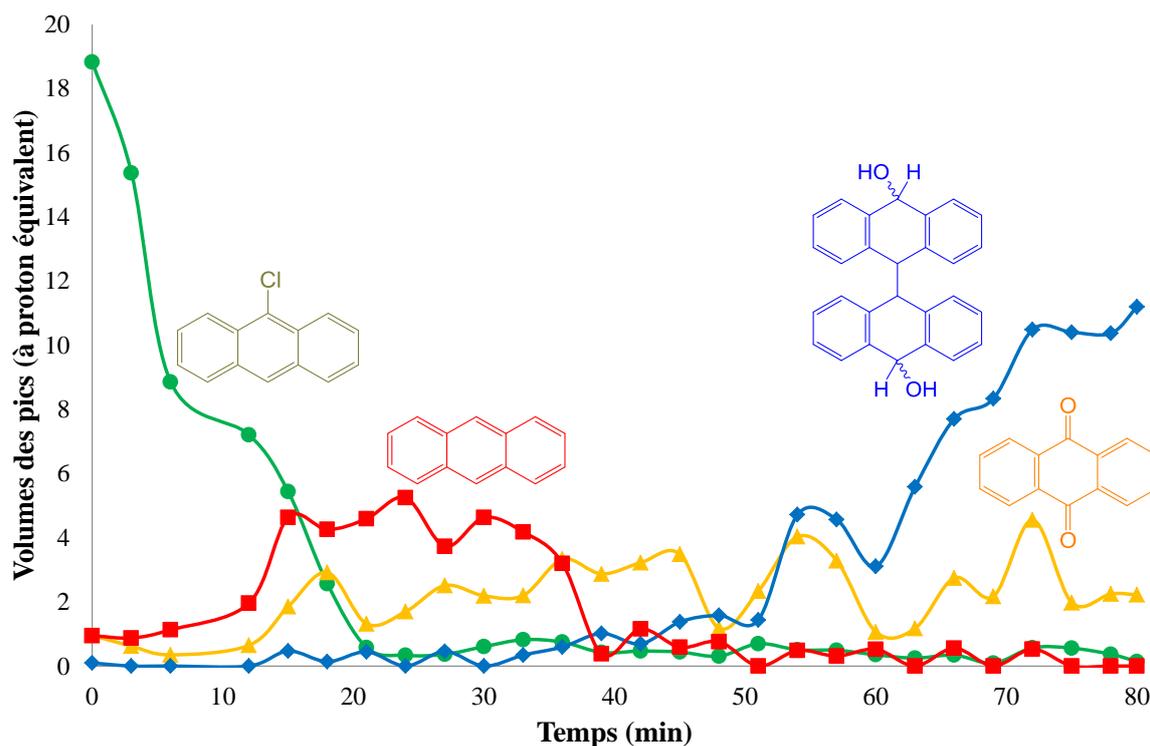
Après un temps d'expérience supérieur à 30 min, de nouveaux signaux apparaissent. En effet, l'anthracène fraîchement formé subit une oxydation à la surface de l'électrode auxiliaire. La première étape d'oxydation est la perte d'un électron qui conduit à la formation d'un radical cationique. Cet intermédiaire réactionnel subit l'addition nucléophile d'une molécule d'eau pour former un intermédiaire radicalaire après une réaction de déprotonation. Toutefois, cet intermédiaire n'est pas observé sur les spectres RMN car il ne persiste pas en solution. Ce composé peut se dimériser pour former le 10,10'-dihydroxy-9,9',10,10'-tetrahydro-9,9'-bianthryl (molécule **c** sur la Figure 96B), qui s'avère être l'espèce majoritaire en fin de réaction. De plus, nous observons également l'oxydation de l'intermédiaire radicalaire, ce qui génère l'anthraquinone (molécule **d** sur la Figure 96B). L'anthraquinone n'est pas stable en solution et a tendance à polymériser, ce qui en fait un produit minoritaire de la réaction.

Pour valider les structures des molécules **b** et **d** nous avons utilisé les standards commerciaux. Par contre, le standard commercial correspondant à la molécule **c** n'étant pas disponible, nous avons réalisé des analyses supplémentaires par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (Figure 97). La comparaison des chromatogrammes correspondant à la masse de la molécule **c** ( $m/z$  389,4653) avant et après réduction électrochimique confirme bien la présence de cette molécule. La haute résolution permet de valider la présence de cette molécule par comparaison de la masse exacte mesurée et de la masse exacte théorique. En effet le  $\Delta_{m/z}$  est de 0,5 ppm (masse exacte mesurée 389,4653 ; masse exacte théorique 389,4651).



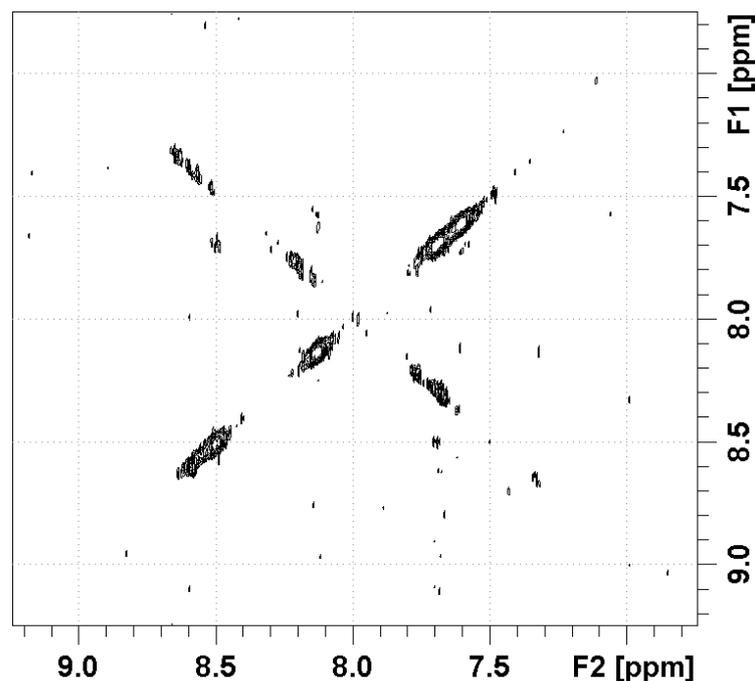
**Figure 97** : A gauche, le chromatogramme extrait pour un  $m/z$  de 389,4653 après électrolyse par CE-RMN *in situ* du 9-chloroanthracène. Le spectre de masse correspondant est présent en haut à droite. Ceci nous permet ainsi de confirmer la présence du produit c durant la réaction de réduction du 9-chloroanthracène.

En outre, pour une meilleure compréhension du mécanisme redox du 9-chloroanthracène, nous avons mesuré le volume des pics de corrélation 2D en fonction du temps de réaction (Figure 98). Le volume des pics en RMN 2D ne permet pas de remonter directement aux concentrations. En effet, il dépend de plusieurs paramètres (temps de relaxation, couplage, etc...), et le facteur de proportionnalité entre le volume des pics et la concentration est différent pour chaque pic. Une procédure de calibration peut toutefois permettre de réaliser des mesures quantitatives.<sup>203</sup> Cependant, la RMN 2D donne une réponse linéaire pour les petites molécules, et l'évolution relative du volume des pics permet ici d'évaluer l'évolution de la concentration pour chaque espèce. Ainsi, nous avons pu confirmer le caractère instable de l'anthracène lors de l'expérience, ce qui confirme qu'il s'agit d'un intermédiaire réactionnel. Notons que la répétabilité de la mesure RMN n'a pas été évaluée ici, car de précédentes études ont montré que le coefficient de variation du volume des pics sur des expériences COSY ultrarapides successives est faible (de l'ordre de 2%).<sup>186</sup>



**Figure 98 :** Evolution des volumes des pics des spectres RMN 2D COSY ultrarapide durant la réaction redox du 9-chloroanthracène. Pour chaque composé, les volumes correspondants sont la moyenne des volumes des pics marqués par des flèches sur la figure 17, normalisée au nombre de protons équivalents.

Afin de confirmer un peu plus l'intérêt du couplage CE-RMN 2D ultrarapide *in situ*, nous avons également envisagé de suivre la même réaction avec une séquence de RMN 2D conventionnelle. Pour cela une séquence RMN 2D COSY avec des temps d'acquisition de 10 min a été choisie. Cependant, les spectres enregistrés au cours de la réaction sont caractérisés par une très faible sensibilité, et ne permettent pas de détecter les pics de corrélation attendus. Ceci s'explique par la nature intrinsèque des expériences de RMN 2D conventionnelle. En effet, entre chaque scan (qui correspond à une ligne de la matrice 2D) la composition du système évolue, ce qui conduit à une perte de cohérence entre les différentes lignes de la matrice 2D (Figure 99). Au contraire, en RMN 2D ultrarapide l'ensemble de la matrice 2D est acquise en une fraction de seconde. Même si une accumulation de signal est réalisée, elle n'est que la somme de 32 spectres 2D ultrarapides, et le spectre résultant reflète la composition chimique moyenne du système au cours de l'accumulation. Ce résultat démontre la pertinence de la RMN 2D ultrarapide par rapport à la RMN 2D conventionnelle pour le suivi de réactions électrochimiques.



**Figure 99 :** Spectre *in situ* de CE-RMN 2D conventionnelle après 20 min d'électrolyse du 9-chloroanthracène, obtenu en 10 min dans les mêmes conditions expérimentales que pour les expériences avec la RMN 2D ultrarapide. Les pics de corrélation attendus ne sont pas détectés et le spectre ne peut pas être exploité.

### C.3.3 Conclusion et perspectives pour la CE-RMN 2D ultrarapide *in situ*

Cette étude nous a permis de démontrer la faisabilité et l'intérêt du couplage *in situ* entre une cellule électrochimique et la RMN 2D ultrarapide pour le suivi en temps réel des réactions redox. Ce couplage puissant est indispensable pour contourner les phénomènes de recouvrements entre pics et les élargissements de raies provoqués par l'introduction d'un dispositif électrochimique au sein du spectromètre RMN. Cette étude est la première à rapporter la mise en place du couplage CE-RMN 2D ultrarapide et ouvre un champ très large d'applications futures. En effet, l'évaluation des performances de ce couplage pour des réactions plus complexes, mettant en jeu plusieurs molécules par exemple, reste nécessaires. L'application de cette méthodologie en utilisant des séquences RMN permettant d'observer les corrélations hétéronucléaires apparaît également prometteuse, car elle permettrait une meilleure séparation des pics de composés similaires. Cela nécessitera toutefois l'optimisation de la sensibilité des expériences de RMN 2D ultrarapide hétéronucléaires et/ou l'utilisation de réactifs marqués en  $^{13}\text{C}$

## C.4 Conclusion et perspectives sur la CE-RMN

Le couplage entre une cellule électrochimique et un spectromètre RMN est un outil très puissant pour observer des espèces intermédiaires réactives et ainsi faciliter l'élucidation moléculaire et mécanistique de réactions redox, ouvrant la porte à un large panel d'études.<sup>12</sup> L'association CE-RMN en ligne présente des avantages non négligeables, dont un effet limité sur l'allure des signaux RMN et la possibilité d'introduire une séparation chromatographique entre la production électrochimique des espèces et la détection RMN. La séparation chromatographique permettrait de limiter la superposition des signaux RMN de différentes espèces. Cependant, la méthodologie *in situ* paraît être la plus adéquate pour le suivi en temps réel d'une réaction redox. En effet, le temps entre la formation et la détection des espèces générées étant minimisé, la détection d'espèces réactives est favorisée.

De plus, nos travaux ont permis de démontrer l'intérêt du couplage CE-RMN 2D ultrarapide *in situ* pour s'affranchir des problèmes de recouvrement entre les pics observés lors de réactions CE-RMN *in situ*. En effet, les recouvrements peuvent être induits par des élargissements de raies observés lors de l'introduction du dispositif au sein de la zone sensible de détection RMN, mais également lors de l'étude de mélanges complexes générant un grand nombre de signaux RMN. L'application de cette méthodologie à la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène nous a permis de démontrer les performances de ce tout nouveau couplage.

Une autre perspective intéressante provient de la RMN à bas champ qui connaît un renouveau depuis quelques années, grâce à la commercialisation de spectromètres de petite taille, avec un champ magnétique d'environ 1T basé sur un aimant permanent.<sup>204</sup> Les performances de cet appareillage se sont considérablement accrues, et il est maintenant possible de suivre des réactions en temps réel par RMN 2D ultrarapide, soit *in situ*, soit en ligne à l'aide d'un système en flux.<sup>204-205</sup> Implémenter le couplage CE-RMN sur ce type d'appareillage (en ligne ou *in situ*) permettrait par exemple d'améliorer son accessibilité. De plus, le faible champ magnétique présente un avantage supplémentaire pour le couplage CE-RMN. En effet, l'intensité du champ magnétique a une influence directe sur le couplage CE-RMN *in situ*. Plus le champ magnétique est intense et plus l'impact du dispositif électrochimique sur la qualité du spectre RMN est visible. Nous pouvons imaginer qu'avec un couplage CE-RMN *in situ* bas champ, cet effet pourrait être réduit. Toutefois, la faible sensibilité d'un tel spectromètre limite les études possibles. En effet, il faudrait travailler avec

des concentrations plus importantes que lors d'études CE-RMN à haut champ (50-100 mM) et de telles concentrations sont défavorables pour l'électrochimie (phénomènes de séparations de phase, polymérisation en solution). Néanmoins, l'utilisation d'un système de circulation en flux permet d'imaginer aisément la mise en place d'expériences CE-RMN bas champ en ligne.

En conclusion, le couplage CE-RMN, qu'il soit en ligne ou *in situ*, s'avère être un complément de choix à l'arsenal de la chimie analytique comprenant des techniques comme la CE-(CL-)SM ou bien d'autres techniques de spectroélectrochimie dédiées à l'étude de réactions de transformations électrochimiques.

## Conclusion générale

Les différents travaux présentés dans ce manuscrit ont eu pour objectif d'utiliser le couplage d'une cellule électrochimique (CE) avec des techniques analytiques performantes telles que la chromatographie liquide (CL), la spectrométrie de masse (SM) ou la résonance magnétique nucléaire (RMN). Ces couplages ont trouvé comme principale application la simulation, d'une part du métabolisme oxydatif ou réductif induit par le cytochrome P450, et d'autre part de la dégradation de xénobiotiques dans l'environnement.

La première partie a porté sur des rappels bibliographiques dans les disciplines de l'électrochimie et la spectrométrie de masse. Par la suite, l'état de l'art des couplages CE-(CL-)SM au travers des aspects techniques et de différentes applications ont été présentés. Hormis leur intérêt à simuler les réactions catalysées par les cytochrome P450 et initiées par un processus de transfert d'un électron seul,<sup>7, 10</sup> les couplages CE-(CL-)SM ont également démontré leur intérêt pour la simulation de dégradations de polluants émergents dans l'environnement.<sup>42-43</sup> L'outil CE-(CL-)SM apparaît donc comme une approche performante dans l'élucidation des mécanismes de dégradation oxydative et l'identification des espèces réactives électrophiles pouvant créer une toxicité *in vivo* ou environnementale. En effet, la formation de liaisons covalentes entre certaines espèces intermédiaires réactives et des biomolécules (ADN, protéine, peptides) peut engendrer des effets néfastes, comme cela a déjà été mentionné dans la littérature.<sup>43, 50</sup> Dans un second chapitre, les couplages CE-(CL-)SM ont été utilisés afin d'élucider le mécanisme de dégradation oxydatif du tétrabromobisphénol A (TBBPA) et de simuler l'activité réductrice enzymatique de l'acide aristolochique. Un dernier chapitre a présenté le couplage CE-RMN au travers de quelques rappels bibliographiques sur la RMN, d'un historique ainsi que d'applications du couplage CE-RMN en ligne ou *in situ*. Par la suite nous nous sommes attachés à élaborer le premier couplage entre une cellule électrochimique et la RMN 2D ultrarapide afin d'élucider le mécanisme de réduction du 9-chloroanthracène.

Les couplages CE-(CL-)SM et CE-SM ont permis d'élucider le comportement redox du TBBPA. Dans un premier temps, la voltampérométrie cyclique d'un échantillon de TBBPA met en avant son caractère électroactif (pic d'oxydation irréversible aux alentours de 550 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub>). L'observation d'une vague de réduction (-150 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub>) lors du balayage retour associée à une vague d'oxydation (150 mV *vs.* Pd/H<sub>2</sub>) constitue un système quasi-réversible attribué à la formation d'une entité chimique formée après l'oxydation du TBBPA.

Par la suite, les analyses CL-SM/SM(HR) ont permis d'identifier cinq entités issues de l'oxydation électrochimique du TBBPA. La première étape d'oxydation du TBBPA est initiée par le transfert de deux électrons et d'un proton conduisant à un intermédiaire cationique. Cet intermédiaire peut subir l'addition nucléophile d'une molécule d'eau ( $TB_1$   $m/z$  554), mais également générer une entité stable ( $TB_2$   $m/z$  288) et une autre instable (espèce cationique) par scission intramoléculaire. Cette espèce instable conduit à la formation de deux nouvelles entités par addition nucléophile d'une molécule d'eau ( $TB_3$   $m/z$  264) ou d'une molécule de TBBPA ( $TB_4$   $m/z$  786). Afin de confirmer l'aspect mécanistique de l'oxydation électrochimique du TBBPA, le couplage direct CE-SM a été utilisé. Ce couplage permet d'observer en ligne l'influence du potentiel appliqué à l'électrode de travail sur les différentes espèces. De plus, ceci rend possible l'observation d'espèces réactives à très courte durée de vie. Dans le cas de l'oxydation du TBBPA, l'analyse des voltampérogrammes massiques montre bien la formation initiale de l'entité à  $m/z$  554, suivie des  $m/z$  288, 306, 786 et 264. Autre fait intéressant, la diminution d'intensité d'un  $m/z$  considéré sur un voltampérogramme massique nous indique une possible activité électrochimique de cette espèce. La diminution d'intensité du  $m/z$  554 est attribuée à la seconde oxydation électrochimique du groupement phénol, aboutissant également à un intermédiaire cationique. L'addition nucléophile d'une molécule d'eau sur cet intermédiaire conduisant à la formation d'une espèce doublement hydroxylée n'a jamais été observée durant nos expériences. Afin de mieux comprendre l'absence de cette espèce, des calculs théoriques ont été mis en œuvre. La mesure de l'angle de liaison entre les deux carbones aromatiques et le carbone portant les deux groupements méthyle d'un intermédiaire doublement cationique met en avant une répulsion électrostatique des deux cycles aromatiques, empêchant toute addition nucléophile par gêne stérique. C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers une  $\beta$ -scission de l'intermédiaire cationique formé durant la seconde oxydation du TBBPA. Cette scission provoque la formation d'une espèce benzoquinone, qui a été mise en évidence par l'observation de son adduit glutathion. Cette étude a permis de démontrer les performances des couplages CE-(CL-)SM pour élucider à la fois les structures et les mécanismes mis en œuvre lors de l'oxydation électrochimique du TBBPA. L'outil électrochimique a également démontré son intérêt pour simuler le devenir environnemental ou biologique du TBBPA. En effet, l'observation de nombreux métabolites communs aux différentes voies en est le parfait exemple.

La deuxième partie du second chapitre s'est attachée à la simulation du métabolisme enzymatique d'un composé nitro-aromatique par réduction électrochimique (acide

aristolochique). L'étude s'est focalisée sur la formation d'un composé lactamique, ainsi que sur l'observation et la caractérisation d'un intermédiaire réactif (ion nitrénium). La première étape de réduction électrochimique d'un composé nitro conduit à l'espèce nitroso (transfert de deux électrons et deux protons). Par la suite l'espèce nitroso ( $m/z$  326) rentre dans un système réversible à deux électrons et deux protons pour former l'hydroxylamine ( $m/z$  328), puis l'amine correspondante. Toutefois, que ce soit par voie enzymatique ou électrochimique, l'amine correspondante n'a jamais été observée. Ceci s'explique par une réaction de condensation intramoléculaire entre l'hydroxylamine et la fonction acide carboxylique présente sur l'acide aristolochique. Cette condensation intramoléculaire conduit à la formation d'un cycle à 5 atomes de type N-hydroxylactame ( $m/z$  310). La réduction de l'entité N-hydroxylactame permet la formation de l'aristolactame ( $m/z$  294) avec le passage par un intermédiaire réactif, l'ion nitrénium. L'intermédiaire réactif a été mis en évidence par l'observation de son adduit avec le glutathion et les analyses SMSM de cet adduit. Cette étude permet de faire un pas supplémentaire vers la capacité de simulation de l'outil électrochimique. En effet, l'aptitude à simuler les réactions de réduction par voie enzymatique démontre une fois de plus l'intérêt des couplages CE-(CL-)SM. De plus, la réduction électrochimique apparaît être une bonne alternative pour la synthèse à plus grande échelle de composés lactames.

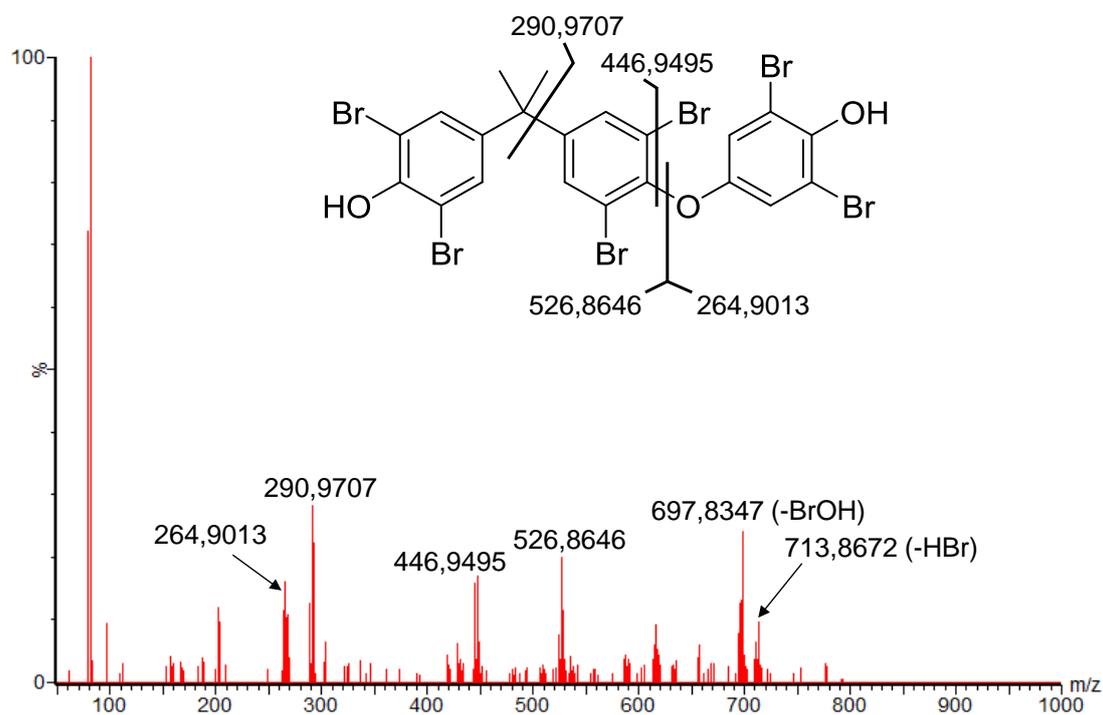
A la différence des deux chapitres précédents, le dernier chapitre a concerné la mise en place d'un dispositif électrochimique *in situ* utilisant le tube RMN comme cellule électrochimique. Des électrodes artisanales exploitant la grande surface spécifique des microfibrilles de carbones ont été utilisées pour la conversion électrochimique du 9-chloroanthracène. L'innovation apportée par nos travaux est le couplage de cette cellule électrochimique *in situ* avec la RMN 2D ultrarapide. La présence de recouvrements entre les signaux RMN lors de l'étude de mélanges complexes ou évoluant dans le temps rend difficile, voire impossible, l'élucidation structurale et mécanistique de la réaction. Afin de contourner ceci l'utilisation de la RMN 2D est à privilégier. Toutefois, le principe d'acquisition d'un spectre RMN 2D conventionnel n'est pas adapté au suivi de réactions évoluant de façon rapide dans le temps. C'est pourquoi l'utilisation de la RMN 2D ultrarapide trouve tout son sens ici. La preuve de concept de ce couplage a été réalisée sur la réaction de réduction électrochimique du 9-chloroanthracène. De précédents travaux par couplage CE-RMN ont mis en évidence la formation de l'anthracène par réduction électrochimique du 9-chloroanthracène mais, avec la présence de recouvrements sur les spectres RMN  $^1\text{H}$ .<sup>14</sup>

L'utilisation du couplage CE-RMN 2D ultrarapide a permis de faire disparaître les recouvrements entre les signaux du 9-chloroanthracène et des différents produits de réactions. Ce couplage apparaît être un outil de choix pour contourner les phénomènes de recouvrements entre pics et les élargissements de raies provoqués par l'introduction d'un dispositif électrochimique au sein du spectromètre RMN.

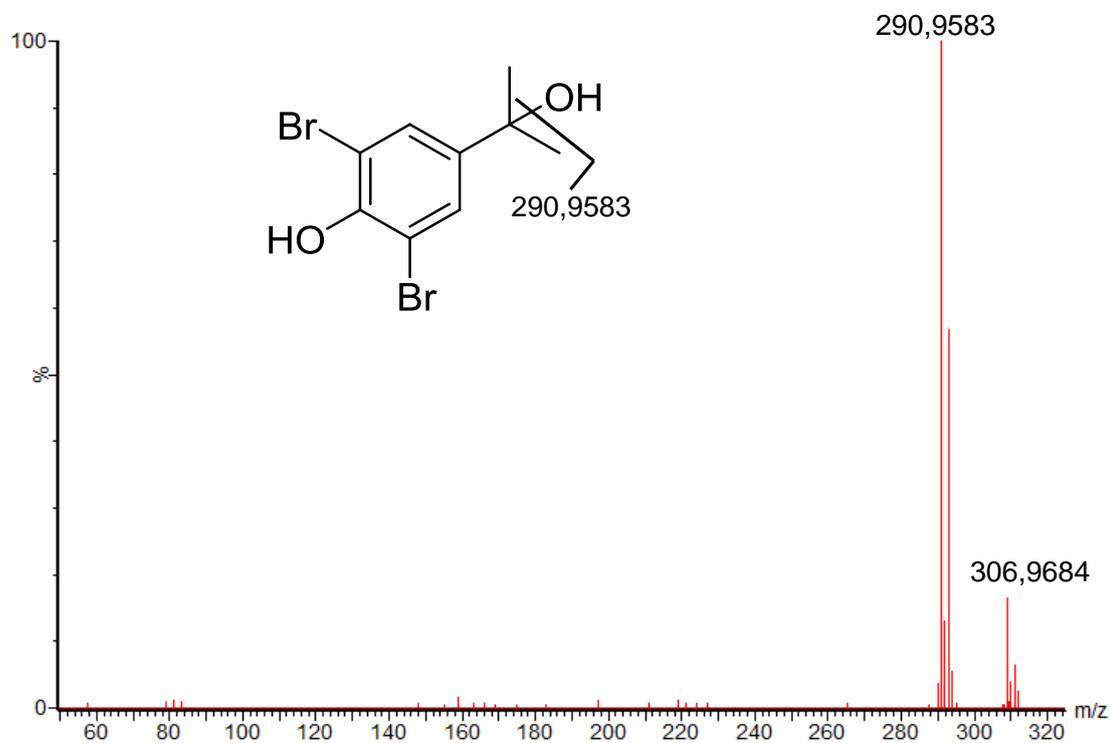
Au terme de cette thèse, nous espérons avoir contribué à la compréhension et à la maîtrise des performances actuelles des techniques électrochimiques couplées pour la simulation des métabolismes oxydatif, réductif et environnemental de xénobiotiques. L'outil électrochimique couplé à la spectrométrie de masse ou la RMN constitue un outil analytique performant susceptible d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes réactionnels. Cette méthodologie doit, au travers du développement d'électrodes modifiées, améliorer ces performances pour simuler les réactions de type HAT. La modification d'électrodes avec des porphyrines ou directement par greffage de cytochrome P450 apparaît être la voie la plus prometteuse.<sup>50, 55</sup> En effet, la modification d'électrodes avec une série de cytochromes P450 (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19,...) permet le dépistage en routine de candidats médicaments.<sup>206-207</sup> Toutefois, la modification stable de surfaces d'électrodes avec un transfert efficace d'électron reste la partie essentielle des récents développements.<sup>208-209</sup>

Une autre perspective intéressante serait de coupler une cellule électrochimique avec la spectrométrie de masse de rapport isotopique (SMRI). L'intérêt majeur étant de pouvoir simuler les effets isotopiques engendrés par des réactions enzymatiques ou environnementales. Ceci doit permettre une meilleure compréhension du flux métabolique au sein d'organismes vivants, mais également le devenir de polluants émergents dans l'environnement.

## Annexes



Annexe 1 : Spectre MSMS du  $[M-H]^- = 786$



Annexe 2 : Spectre SMSM du  $[M-H]^- = 306$

# Production scientifique

## Publications

Unexpected benzimidazole ring formation from a quinoneimide species in the presence of ammonium acetate as supporting electrolyte used in the coupling of electrochemistry with mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2015, **29**, 456-460.

*Ugo Bussy, Ulrik Jurva, **Renaud Boisseau**, Moa Andresen-Bergström, Virginie Silvestre Nicolas Galland, Denis Jacquemin et Mohammed Boujtita\**.

In situ ultrafast 2D NMR spectroelectrochemistry for real-time monitoring of redox reactions. **Analytical Chemistry**, 2015, **87**, 372-375.

***Renaud Boisseau**, Ugo Bussy, Patrick Giraudeau\* et Mohammed Boujtita.*

Electrochemistry-mass spectrometry to study reactive drug metabolites and CYP450 simulations. **Trends in Analytical Chemistry**, 2015, **70**, 67-73.

*Ugo Bussy, **Renaud Boisseau**, Christine Thobie-Gautier, Mohammed Boujtita\**.

## Communications orales

Couplage de l'électrochimie à la RMN 2D ultrarapide pour le suivi *in situ* et en temps réel de réactions redox, **GPB 2015**, Le Mans, France.

*Renaud Boisseau*, *Ugo Bussy, Patrick Giraudeau, Mohammed Boujtita.*

In situ ultrafast 2D NMR spectroelectrochemistry for real-time monitoring of redox reactions, **ElChemMS<sup>3</sup> Workshop 2015**, Münster, Allemagne.

*Renaud Boisseau*, *Ugo Bussy, Patrick Giraudeau, Mohammed Boujtita.*

Couplage de l'électrochimie à la RMN 2D ultrarapide pour le suivi *in situ* et en temps réel de réactions redox, **Journées de l'électrochimie 2015**, Rome, Italie.

*Renaud Boisseau*, *Ugo Bussy, Patrick Giraudeau, Mohammed Boujtita.*

Couplage entre une cellule électrochimique et différents appareils analytiques pour la prédiction et la compréhension du métabolisme oxydatif et réductif de polluants émergents, **Journées de l'école doctorale 3MPL 2015**, Le Mans, France.

*Renaud Boisseau*, *Ugo Bussy, Christine Thobie-Gautier, Mikaël Croyal, Nadine Szuwarski, Patrick Giraudeau, Mohammed Boujtita.*

## Communications posters

Compréhension du métabolisme oxydatif du tétrabromobisphénol A (TBBPA) par couplage entre l'électrochimie et la spectrométrie de masse, **Journées de l'électrochimie 2015**, Rome, Italie.

*Renaud Boisseau*, *Nadine Szuwarski, Ugo Bussy, Christine Thobie-Gautier, Mikaël Croyal, Mohammed Boujtita.*

# Tables des illustrations

## Figures

<b>Figure 1</b> : Schéma présentant l'utilisation du couplage CE-(CL-)SM pour l'élucidation du mécanisme de dégradation oxydative du TBBPA.....	4
<b>Figure 2</b> : Schéma du couplage CE-(CL-)SM appliqué à la simulation du métabolisme réductif de l'acide aristolochique. ....	5
<b>Figure 3</b> : Schéma du couplage CE-RMN 2D ultrarapide pour le suivi <i>in situ</i> et en temps réel de la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène.....	5
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique de l'interface électrode/solution selon la configuration : équilibre, oxydation et réduction. $E_f$ correspond au niveau de Fermi. ....	8
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique du profil de concentration de l'espèce électroactive dans une couche de diffusion : exemple d'une réduction électrochimique de l'ion $M^{n+}$ .....	11
<b>Figure 6</b> : Bilan de matière à un plan parallèle à la surface d'une électrode, situé à une distance $x$ de celle-ci. ....	12
<b>Figure 7</b> : Schéma d'une cellule électrochimique à trois électrodes. ....	13
<b>Figure 8</b> : Voltampérogramme théorique d'un système réversible et rapide.....	15
<b>Figure 9</b> : Voltampérogramme théorique d'un système réversible et lent.....	16
<b>Figure 10</b> : Différents étapes réalisées lors d'une analyse par spectrométrie de masse. ....	18
<b>Figure 11</b> : Schématisation des trois étapes d'ionisation par une source <i>electrospray</i> . ....	19
<b>Figure 12</b> : Schématisation d'un analyseur quadripolaire linéaire. ....	20
<b>Figure 13</b> : Diagramme de stabilité des ions dans un quadripôle en fonction des paramètres $a$ et $q$ . ....	21
<b>Figure 14</b> : Schématisation du fonctionnement d'un analyseur à temps de vol. ....	23
<b>Figure 15</b> : Schématisation du principe de fragmentation en spectrométrie de masse. Les ions parents rentrent dans la chambre de collision et, par contact avec un gaz inerte, les ions se fragmentent pour donner des ions fils. ....	24
<b>Figure 16</b> : Schématisation du mode d'acquisition MRM en spectrométrie de masse à deux dimensions.....	24
<b>Figure 17</b> : Vue éclatée d'une cellule électrochimique commerciale à piston de la société Spectrotech (groupe Thermo Scientific®). <sup>62</sup> .....	28

<b>Figure 18</b> : Vue éclatée de la cellule électrochimique $\mu$ PrepCell™ commercialisée par la société Antec®. <sup>63</sup> .....	29
<b>Figure 19</b> : Schéma de principe du couplage CE-CL-SM. En rouge, l'association pour l'injection des espèces électro générées se fait par le passeur d'échantillon de la chromatographie liquide. En vert, la sortie de la cellule électrochimique est connectée à la boucle d'injection du chromatographe. ....	30
<b>Figure 20</b> : Représentation schématique du couplage CE-SM. ....	31
<b>Figure 21</b> : En (A) voltampérogramme massique pour les $[M+H]^+$ du principe actif N-0923 (à gauche) et de ses produits d'oxydation (à droite). En (B) bilan de l'oxydation du N-0923 en accord avec les résultats observés en voltampérométrie massique. <sup>7</sup> .....	32
<b>Figure 22</b> : Représentation schématique d'une cellule miniaturisée constituée de 3 électrodes sans canaux frittés (A) et avec (B). <sup>66</sup> .....	35
<b>Figure 23</b> : Mécanisme de dégradation oxydative du boscalid à potentiel contrôlé. <sup>72</sup> .....	37
<b>Figure 24</b> : Différentes applications du couplage CE-(CL-)SM pour l'étude de biomolécules. En (A) et (C) par des réactions électrochimiques et en (B) par voie enzymatique. <sup>9</sup> .....	38
<b>Figure 25</b> : Réaction d'oxydation/réduction du glutathion et de son dimère. ....	40
<b>Figure 26</b> : Schématisation de l'oxydation électrochimique de l'hydroquinone et de son utilisation pour le marquage des fonctions thiols de biomolécules.....	41
<b>Figure 27</b> : Schématisation du devenir <i>in vivo</i> d'un xénobiotique dans l'organisme. ....	42
<b>Figure 28</b> : Représentation de la métalloporphyrine de fer constituant le centre actif du cytochrome P450.....	43
<b>Figure 29</b> : Représentation du cycle catalytique induit par le cytochrome P450. ....	44
<b>Figure 30</b> : Schématisation des différentes phases du métabolisme <i>in vivo</i> d'un xénobiotique.....	45
<b>Figure 31</b> : Différents outils possibles pour la simulation du métabolisme <i>in vivo</i> de xénobiotiques induit par le cytochrome P450. ....	46
<b>Figure 32</b> : Mécanisme de X-désalkylation initié soit par le transfert d'un électron seul (SET), soit par le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT). <sup>8</sup> .....	48
<b>Figure 33</b> : Mécanisme d'O-désalkylation par voie électrochimique du BHA. ....	50
<b>Figure 34</b> : Mécanismes proposés pour l'oxydation électrochimique de la fonction éther aromatique de l'acébutolol en milieu marqué <sup>18</sup> O, et plus particulièrement le clivage de la	

liaison éther aromatique. Mécanisme A, O-désalkylation ; mécanisme B, O-désalkoxylation. .....	51
<b>Figure 35</b> : Bilan de la première voie d'oxydation du tétrazépam par électrochimie. Les métabolites présentés ici sont communs à l'oxydation par électrochimie et à l'incubation en présence de microsomes.....	52
<b>Figure 36</b> : Mécanismes expliquant l'hydroxylation par le cytochrome P450 des cycles aromatiques inactivés. ....	53
<b>Figure 37</b> : Bilan de l'oxydation électrochimique d'un agoniste de la dopamine.....	53
<b>Figure 38</b> : Bilan de l'oxydation électrochimique du métoprolol.....	54
<b>Figure 39</b> : Mécanisme d'hydroxylation benzylique initié par une réaction électrochimique. ....	54
<b>Figure 40</b> : Bilan des réactions de N-désalkylation et N-oxydation sur la lidocaïne. ....	55
<b>Figure 41</b> : Bilan de l'oxydation du métoprolol par quatre systèmes différents : Fenton assisté par électrochimie (Fenton-CE), cytochrome P450, porphyrine et système électrochimique classique (CE).....	57
<b>Figure 42</b> : Mécanisme de déshydrogénation du paracétamol par électrochimie aboutissant à la formation du NAPQI. Identification du NAPQI par piégeage au glutathion ou hydrolyse en benzoquinone.....	58
<b>Figure 43</b> : Mécanisme de transfert d'oxygène induit par l'oxyde de platine aboutissant à l'hydroxylation aromatique en position <i>meta</i> et <i>para</i> de la lidocaïne par passage par un intermédiaire arène époxyde. ....	59
<b>Figure 44</b> : Bilan de l'oxydation électrochimique de la clozapine aboutissant à la formation de l'espèce réactive iminium. ....	60
<b>Figure 45</b> : Bilan de la formation de l'ion pyridinium par voie électrochimique et enzymatique sur l'halopéridol. La substitution d'un atome de carbone par un atome de silicium empêche toute formation d'ion pyridinium.....	60
<b>Figure 46</b> : Bilan de la réduction électrochimique d'un composé nitro-aromatique. <sup>120</sup> .....	62
<b>Figure 47</b> : Représentation des molécules de Bisphénol A et de Tétrabromobisphénol A.	71
<b>Figure 48</b> : Mécanisme de double oxydation électrochimique du bisphénol A présenté par Chan <i>et al.</i> Le passage par un double carbocation explique la formation de l'espèce doublement hydroxylée. <sup>132</sup> .....	72
<b>Figure 49</b> : Voltampérométrie cyclique du TBBPA à 0,1 mmol.L <sup>-1</sup> dans un mélange eau/acétonitrile (50/50) en présence d'acétate d'ammonium (20 mmol.L <sup>-1</sup> ) comme électrolyte	

support. Le balayage de potentiel se fait de -0,4V à 1,2 V vs. Pd/H <sub>2</sub> à la vitesse de 50 mV.s <sup>-1</sup> . En (A) premier cycle de balayage et en (B) le second cycle.....	74
<b>Figure 50</b> : Spectre du TBBPA correspondant à l'ion [M-H] <sup>-</sup> .....	75
<b>Figure 51</b> : En (A) signal extrait du $m/z_{\text{mono-isotopique}}$ 538,7505 correspondant au TBBPA, en (B) les $m/z_{\text{mono-isotopique}}$ des produits d'oxydation électrochimique. L'ensemble des voltampérogrammes massiques est représenté en fonction du potentiel imposé à l'électrode de travail.....	76
<b>Figure 52</b> : En haut, chromatogramme extrait d'un échantillon sans oxydation pour le $m/z_{\text{mono-isotopique}}$ 538,7505 correspondant au TBBPA. En dessous, le chromatogramme extrait pour les $m/z_{\text{mono-isotopique}}$ des différents produits d'oxydation et du TBBPA sur un échantillon oxydé électrochimiquement. L'intensité des pics correspondant aux produits d'oxydation est multipliée par 100.....	78
<b>Figure 53</b> : Spectre SMSM pour le $m/z$ 554,7 correspondant au produit d'oxydation TB <sub>1</sub> . .....	80
<b>Figure 54</b> : Structure chimique du TBBPA et de ses produits d'oxydation élucidée par analyse de la composition élémentaire et CL-SMSM. ....	81
<b>Figure 55</b> : Représentation du mécanisme de mono-hydroxylation par oxydation électrochimique du TBBPA. L'observation de l'index de Fukui valide la position où l'addition nucléophile est réalisée. ....	83
<b>Figure 56</b> : Passage du mono-cation au di-cation par oxydation électrochimique du TBBPA. L'index de Fukui indique les positions les plus électrophiles de l'espèce di-cationique. ....	84
<b>Figure 57</b> : (A) mesure de l'angle $\alpha$ entre les trois carbones pour l'espèce mono-cationique, (B) mesure de l'angle $\alpha$ pour l'espèce bi-cationique. ....	85
<b>Figure 58</b> : (A) Mécanisme d'oxydation électrochimique du TBBPA expliquant la formation des produits d'oxydation TB <sub>1</sub> , TB <sub>2</sub> , TB <sub>3</sub> et TB <sub>4</sub> . (B) Voltampérogramme massique extrait des $m/z$ correspondant au TBBPA et aux produits d'oxydation considérés. ....	86
<b>Figure 59</b> : Signaux extraits des $m/z$ 288,8866 et 306,8971 correspondant aux produits d'oxydation TB <sub>2</sub> et TB <sub>5</sub> , représentés en fonction du potentiel imposé. ....	87
<b>Figure 60</b> : Bilan de l'addition de Markovnikov d'une molécule d'eau sur l'entité TB <sub>2</sub> conduisant à deux produits, dont l'un très majoritaire vis-à-vis de l'autre. ....	88
<b>Figure 61</b> : Mécanisme d'oxydation électrochimique du TB <sub>1</sub> conduisant à la formation de la 2,6-dibromobenzoquinone et du TB <sub>2</sub> . ....	89

<b>Figure 62</b> : Spectre SMSM de l'ion $m/z$ 573,9 correspondant à l'adduit glutathion de la quinone.....	90
<b>Figure 63</b> : Signal extrait du $m/z$ 571 correspondant à l'adduit glutathion de la 2,6-dibromobenzoquinone pour l'échantillon de TBBPA avec et sans glutathion, représenté en fonction du potentiel imposé.....	91
<b>Figure 64</b> : Schématisation du phénomène redox mis en jeu pour l'entité TB <sub>3</sub> .....	92
<b>Figure 65</b> : Comparaison entre les dégradations environnementale, biologique et/ou électrochimique du TBBPA.....	93
<b>Figure 66</b> : Mécanisme d'oxydation du TBBPA par voie électrochimique.....	94
<b>Figure 67</b> : Représentation du métabolisme <i>in vivo</i> de l'acide aristoloïque initié par le cytochrome P450, expliquant sa toxicité par formation d'un intermédiaire réactif. <sup>146</sup> .....	97
<b>Figure 68</b> : Bilan de la réduction électrochimique d'une fonction nitro-aromatique conduisant à la formation des espèces nitroso, hydroxylamine et amine.....	100
<b>Figure 69</b> : Chromatogramme extrait pour l'AA et ses produits de réduction en (A) avant réduction et en (B) après réduction électrochimique.....	101
<b>Figure 70</b> : En (A) mécanisme de réduction électrochimique d'une fonction nitro-aromatique en nitroso. En (B) spectre SMSM du $m/z$ 326 correspondant à l'espèce nitroso.	103
<b>Figure 71</b> : Réduction de la 3-nitrobenzanthrone et l'acide aristoloïque par voie enzymatique conduisant à l'amine pour le premier et à l'hydroxylactame pour le second. <sup>148</sup> .....	104
<b>Figure 72</b> : Spectre SMSM de l'ion $m/z$ 294 correspondant à l'espèce aristolactame. ....	105
<b>Figure 73</b> : Voltampérogramme massique extrait pour l'AA et ses produits de réduction électrochimique.....	106
<b>Figure 74</b> : Mécanisme de réduction électrochimique de l'acide aristoloïque expliquant la formation des produits de réduction stables.....	107
<b>Figure 75</b> : Chromatogramme extrait du $m/z$ 599 pour un mélange AA/GSH après réduction électrochimique et un échantillon AA réduit avec ajout de GSH.....	109
<b>Figure 76</b> : Spectre SMSM de l'adduit glutathion à $m/z$ 599 avec attribution des fragments.....	110
<b>Figure 77</b> : Représentation de l'orientation des moments magnétiques nucléaires. (A) en l'absence de champ magnétique extérieur, (B) en présence d'un champ magnétique extérieur. (C) représentation de <b>M</b> correspondant à la somme vectorielle des moments magnétiques en	

présence du champ magnétique extérieur, $M$ est non nulle et dirigée dans la direction de $B_0$ . .....	114
<b>Figure 78</b> : Séquence classique pour la spectroscopie RMN ; après une impulsion RF de durée $PW$ , le FID est détecté pendant la période $AQ$ .....	116
<b>Figure 79</b> : Représentation des 4 étapes d'une expérience de RMN 2D. ....	118
<b>Figure 80</b> : (A) schématisation de l'incrémentación de la dimension indirecte. (B) FID à deux dimensions où chaque ligne de la matrice représente un FID. (C) Une double transformation de Fourier du FID 2D permet d'obtenir un spectre RMN 2D. <sup>167</sup> .....	119
<b>Figure 81</b> : Schématisation d'une expérience RMN 2D ultrarapide. L'échantillon est divisé en « tranches virtuelles » et chacune possède une période d'évolution qui lui est propre. ....	120
<b>Figure 82</b> : Schéma du principe de codage spatial en RMN 2D ultrarapide décrit par L. Frydman <i>et al.</i> A gauche, la séquence d'impulsions d'excitation discrète pour le codage spatial. Au centre, sélection des sous-ensembles en fonction de la position $z$ dans le tube. A droite, une représentation vectorielle des aimantations transversales après le codage spatial. .....	121
<b>Figure 83</b> : Représentation du gradient d'acquisition qui refocalise les aimantations, ce qui permet d'obtenir un spectre sans effectuer de transformation de Fourier. La position de l'écho est proportionnelle à la fréquence de résonance du spin considéré.....	122
<b>Figure 84</b> : La succession de gradients de même intensité mais de signes opposés permet l'acquisition de la seconde dimension. Cette alternance permet la formation d'échos successifs et donc l'apparition d'un « pseudo FID ». L'application d'une transformation de Fourier sur ce pseudo FID permettra d'obtenir la seconde dimension RMN. ....	123
<b>Figure 85</b> : Différentes applications de la RMN nD ultrarapide. ....	124
<b>Figure 86</b> : (A) couplage en ligne CE-RMN, les flèches indiquent le sens du flux de la solution à travers la sonde RMN. En (B) couplage <i>in situ</i> CE-RMN. ....	128
<b>Figure 87</b> : Signaux des protons aromatiques du paracétamol à 0 mV (a), 600 mV (b), 1200 mV (c), 1700 mV (d). <sup>194</sup> .....	129
<b>Figure 88</b> : Cellule électrochimique utilisée par Richard <i>et al.</i> pour une implémentation <i>in situ</i> CE-RMN. <sup>11</sup> .....	130
<b>Figure 89</b> : Cellule électrochimique utilisée par Mincey <i>et al.</i> pour la réduction électrochimique de la <i>p</i> -benzoquinone en hydroquinone. Le choix d'un film mince comme électrode de travail permet de minimiser les effets néfastes sur le champ magnétique. <sup>195</sup> ....	131

<b>Figure 90</b> : L'influence de la présence d'une électrode de travail sur l'allure des signaux RMN $^1\text{H}$ à 300 MHz. (a) fil de platine en spirale, (b) grille de platine cylindrique et en (c) film d'or. <sup>196</sup> .....	132
<b>Figure 91</b> : A gauche schématisation de la cellule électrochimique développée par Webster <i>et al.</i> constituée d'un film mince d'or comme électrode de travail. A droite les spectres RMN $^1\text{H}$ acquis sur un spectromètre 500 MHz, obtenus avec le couplage CE-RMN <i>in situ</i> , de la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène dans $\text{CD}_3\text{CN}$ . (a) avant électrolyse, (b) 7-12 min, (c) 17-22 min, (d) 25-30 min, (e) 40-45 min, (f) 47-52 min, (g) 60-65 min et (h) spectre de l'anthracène dans $\text{CD}_3\text{CN}$ . <sup>14</sup> .....	133
<b>Figure 92</b> : Cellule électrochimique conçue par Klod <i>et al.</i> pour les expériences CE-RMN <i>in situ</i> . <sup>13</sup> .....	134
<b>Figure 93</b> : Suivi de l'oxydation électrochimique de la phénacétine par couplage CE-RMN <i>in situ</i> . On observe la diminution des signaux aromatiques de la phénacétine en faveur de 2 molécules : NAPQI et paracétamol (APAP). L'observation de la NAPQI est possible au bout d'environ 1h d'électrolyse et sa disparition totale à lieu au bout d'environ 3h d'expérience. <sup>199</sup> .....	136
<b>Figure 94</b> : Photo de la cellule électrochimique à 3 électrodes dans un tube RMN 5 mm. La jauge RMN permet de connaître la taille de la zone sensible de détection RMN et ainsi éviter la présence de microfibrilles de carbone libres dans cette zone. ....	139
<b>Figure 95</b> : Voltampérométrie cyclique du 9-chloroanthracène à $25 \text{ mmol.L}^{-1}$ dans un mélange $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (95/5) en présence de $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$ ( $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). Potentiel balayé entre 1,3 et -1,9 V vs. Pd/ $\text{H}_2$ à $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$ . ....	141
<b>Figure 96</b> : (A) Spectres RMN 2D COSY ultrarapide <i>in situ</i> enregistrés en temps réel durant la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène. Chaque spectre a un temps total d'acquisition de 2 min 40 s. Les pics de corrélation de chaque composé sont marqués par des flèches. (B) Comportement redox du 9-chloroanthracène selon les informations données par les spectres RMN. Les spectres sont symétrisés <sup>202</sup> pour une meilleure identification des pics de corrélation, mais l'intégration des signaux est réalisée sur les spectres non symétrisés. <sup>190</sup> .....	142
<b>Figure 97</b> : A gauche, le chromatogramme extrait pour un m/z de 389,4653 après électrolyse par CE-RMN <i>in situ</i> du 9-chloroanthracène. Le spectre de masse correspondant est présent en haut à droite. Ceci nous permet ainsi de confirmer la présence du produit c durant la réaction de réduction du 9-chloroanthracène. ....	144

**Figure 98** : Evolution des volumes des pics des spectres RMN 2D COSY ultrarapide durant la réaction redox du 9-chloroanthracène. Pour chaque composé, les volumes correspondants sont la moyenne des volumes des pics marqués par des flèches sur la figure 17, normalisée au nombre de protons équivalents. .... 145

**Figure 99** : Spectre *in situ* de CE-RMN 2D conventionnelle après 20 min d'électrolyse du 9-chloroanthracène, obtenu en 10 min dans les mêmes conditions expérimentales que pour les expériences avec la RMN 2D ultrarapide. Les pics de corrélation attendus ne sont pas détectés et le spectre ne peut pas être exploité. .... 146

## Equations

<b>Équation 1</b> .....	8
<b>Équation 2</b> .....	9
<b>Équation 3</b> .....	10
<b>Équation 4</b> .....	10
<b>Équation 5</b> .....	10
<b>Équation 6</b> .....	11
<b>Équation 7</b> .....	12
<b>Équation 8</b> .....	13
<b>Équation 9</b> .....	13
<b>Équation 10</b> .....	16
<b>Équation 11</b> .....	17
<b>Équation 12</b> .....	20
<b>Équation 13</b> .....	22
<b>Équation 14</b> .....	22
<b>Équation 15</b> .....	22
<b>Équation 16</b> .....	43
<b>Équation 17</b> .....	56
<b>Équation 18</b> .....	115

## Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Composition du gradient en voies A et B utilisé pour la séparation chromatographique du TBBPA et de ses produits d'oxydation. ....	70
<b>Tableau 2</b> : Composition élémentaire du TBBPA et de ses produits d'oxydation. ....	79
<b>Tableau 3</b> : Gradient binaire eau/acétonitrile utilisé en chromatographie liquide pour la séparation des produits de réduction de l'acide aristolochique. ....	99
<b>Tableau 4</b> : Composition élémentaire de l'AA et de ses produits de réduction. ....	102
<b>Tableau 5</b> : Composition élémentaire de l'AA, de l'aristolactame et de l'adduit glutathion de l'ion nitrenium. ....	108
<b>Tableau 6</b> : résumé des couplages CE-RMN rapportés dans la littérature. ....	126

## Références Bibliographiques

- 1 M. S. Chorghade, D. R. Hill, E. C. Lee, R. J. Pariza, D. H. Dolphin, F. Hino, et L.-Y. Zhang, Metalloporphyrins as chemical mimics of cytochrome P-450 systems, *Pure and Applied Chemistry*, **1996**, 68, pp. 753-756.
- 2 T. A. Getek, W. A. Korfmacher, T. A. McRae, et J. A. Hinson, Utility of solution electrochemistry mass spectrometry for investigation the formation and detection of biologically important conjugates of acetaminophen, *Journal of Chromatography A*, **1989**, 474, pp. 245-256.
- 3 A. P. Li, Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery, *Drug Discovery Today*, **2001**, 6, pp. 357-366.
- 4 H. Faber, S. Jahn, J. Kunzemeyer, H. Simon, D. Melles, M. Vogel, et U. Karst, Electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry as a tool in metabolism studies, *Angewandte Chemie International Edition*, **2011**, 50, pp. A52-58.
- 5 E. F. A. Brandon, C. D. Raap, I. Meijerman, J. H. Beijnen, et J. H. M. Schellens, An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2003**, 189, pp. 233-246.
- 6 M. J. Gunter, et P. Turner, Metalloporphyrins as models for the cytochromes p-450, *Coordination Chemistry Reviews*, **1991**, 108, pp. 115-161.
- 7 U. Jurva, H. V. Wikstrom, et A. P. Bruins, In vitro mimicry of metabolic oxidation reactions by electrochemistry/mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2000**, 15, pp. 677-678.
- 8 U. Bussy, et M. Boujtita, Advances in the Electrochemical Simulation of Oxidation Reactions Mediated by Cytochrome P450, *Chemical Research in Toxicology*, **2014**, 27, pp. 1652-1668.
- 9 S. Jahn, et U. Karst, Electrochemistry coupled to (liquid chromatography/) mass spectrometry—Current state and future perspectives, *Journal of Chromatography A*, **2012**, 1259, pp. 16-49.
- 10 U. Jurva, H. V. Wikstrom, L. Weidolf, et A. P. Bruins, Comparison between electrochemistry/mass spectrometry and cytochrome P450 catalyzed oxidation reactions, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2003**, 17, pp. 800-810.
- 11 J. A. Richards, et D. H. Evans, Flow cell for electrolysis within the probe of a nuclear magnetic resonance spectrometer, *Analytical Chemistry*, **1975**, 47, pp. 964-966.
- 12 U. Bussy, et M. Boujtita, Review of advances in coupling electrochemistry and liquid state NMR, *Talanta*, **2015**, 136, pp. 155-160.
- 13 S. Klod, F. Ziegls, et L. Dunsch, In Situ NMR Spectroelectrochemistry of Higher Sensitivity by Large Scale Electrodes, *Analytical Chemistry*, **2009**, 81, pp. 10262-10267.
- 14 R. D. Webster, In Situ Electrochemical-NMR Spectroscopy. Reduction of Aromatic Halides, *Analytical Chemistry*, **2004**, 76, pp. 1603-1610.
- 15 L. M. S. Nunes, T. B. Moraes, L. L. Barbosa, L. H. Mazo, et L. A. Colnago, Monitoring electrochemical reactions in situ using steady-state free precession <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, **2014**, 850, pp. 1-5.
- 16 F. Bedioui, *Techniques de l'ingénieur, traité analyse et caractérisation. voltampérométrie. théorie et mise en oeuvre expérimentale.*, **P2-126**).
- 17 F. Bedioui, *Techniques de l'ingénieur, traité analyse et caractérisation voltampérométrie. phénomènes couplées au transfert électronique.*, **P2-127**).

- 18 G. Bouchoux, et M. Sablier, Techniques de l'Ingénieur, Spectrométrie de Masse - Principe et appareillage., **P2-645**).
- 19 B. Monégier, Techniques de l'Ingénieur, Electrospray., **P3350**).
- 20 C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, et J. B. Fenn, Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers, *Analytical Chemistry*, **1985**, 57, pp. 675-679.
- 21 S. Bruckenstein, et R. R. Gadde, Use of a porous electrode for in situ mass spectrometric determination of volatile electrode reaction products, *Journal of the American Chemical Society*, **1971**, 93, pp. 793-794.
- 22 L. Grambow, et S. Bruckenstein, Mass spectrometric investigation of the electrochemical behavior of adsorbed carbon monoxide at platinum in 0.2M sulfuric acid, *Electrochimica Acta*, **1977**, 22, pp. 377-383.
- 23 J. Willsau, et J. Heitbaum, Elementary steps of ethanol oxidation on platinum in sulfuric acid as evidenced by isotope labeling, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **1985**, 194, pp. 27-35.
- 24 J. Willsau, et J. Heitbaum, The influence of platinum activation on the corrosion of carbon in gas diffusion electrodes - a DEMS study, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **1984**, 161, pp. 93-101.
- 25 O. Wolter, et J. Heitbaum, Differential electrochemical mass spectroscopy (DEMS) - a new method for the study of electrode processes, *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie*, **1984**, 88, pp. 2-6.
- 26 G. Hambitzer, et J. Heitbaum, Electrochemical thermospray mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1986**, 58, pp. 1067-1070.
- 27 K. J. Volk, R. A. Yost, et A. Brajter-Toth, Online mass spectrometric insights into electrochemical reactions: oxidation of thiopurines, *Journal of The Electrochemical Society*, **1990**, 137, pp. 1764-1771.
- 28 K. J. Volk, M. S. Lee, R. A. Yost, et A. Brajter-Toth, Electrochemistry/thermospray/tandem mass spectrometry in the study of biooxidation of purines, *Analytical Chemistry*, **1988**, 60, pp. 720-722.
- 29 J. E. Bartmess, et L. R. Phillips, Electrochemically assisted fast atom bombardment mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1987**, 59, pp. 2012-2014.
- 30 G. Hambitzer, J. Heitbaum, et I. Stassen, Electrochemical Thermospray Mass Spectrometry Instrumentation for Coupling Electrochemistry to Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, pp. 838-842.
- 31 G. Diehl, A. Liesener, et U. Karst, Liquid chromatography with post-column electrochemical treatment and mass spectrometric detection of nonpolar compounds, *Analyst*, **2001**, 126, pp. 288-290.
- 32 G. J. Van Berkel, S. A. McLuckey, et G. L. Glish, Electrochemical origin of radical cations observed in electrospray ionization mass spectra, *Analytical Chemistry*, **1992**, 64, pp. 1586-1593.
- 33 G. J. Van Berkel, et F. Zhou, Electrospray as a Controlled-Current Electrolytic Cell: Electrochemical Ionization of Neutral Analytes for Detection by Electrospray Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1995**, 67, pp. 3958-3964.
- 34 G. J. Van Berkel, et F. Zhou, Characterization of an Electrospray Ion Source as a Controlled-Current Electrolytic Cell, *Analytical Chemistry*, **1995**, 67, pp. 2916-2923.
- 35 E. Nouri-Nigjeh, A. P. Bruins, R. Bischoff, et H. P. Permentier, Electrocatalytic oxidation of hydrogen peroxide on a platinum electrode in the imitation of oxidative drug metabolism of lidocaine, *Analyst*, **2012**, 137, pp. 4698-4702.

- 36 E. Nouri-Nigjeh, R. Bischoff, A. P. Bruins, et H. P. Permentier, Electrochemical oxidation by square-wave potential pulses in the imitation of phenacetin to acetaminophen biotransformation, *Analyst*, **2011**, 136, pp. 5064-5067.
- 37 E. Nouri-Nigjeh, H. P. Permentier, R. Bischoff, et A. P. Bruins, Electrochemical Oxidation by Square-Wave Potential Pulses in the Imitation of Oxidative Drug Metabolism, *Analytical Chemistry*, **2011**, 83, pp. 5519-5525.
- 38 E. Nouri-Nigjeh, H. P. Permentier, R. Bischoff, et A. P. Bruins, Lidocaine Oxidation by Electrogenerated Reactive Oxygen Species in the Light of Oxidative Drug Metabolism, *Analytical Chemistry*, **2010**, 82, pp. 7625-7633.
- 39 U. Karst, Analytical methods: Electrochemistry/mass spectrometry (EC/MS) - a new tool to study drug metabolism and reaction mechanisms, *Angew. Chem.*, **2004**, 43, pp. 2476-2478.
- 40 U. Karst, G. Diehl, et H. Hayen, Coupling electrochemistry to mass spectrometry and high performance liquid chromatography, **(2003)**, p. 10 pp.
- 41 W. Lohmann, et U. Karst, Electrochemistry meets enzymes: instrumental on-line simulation of oxidative and conjugative metabolism reactions of toremifene, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**, 394, pp. 1341-1348.
- 42 T. Hoffmann, D. Hofmann, E. Klumpp, et S. Kupperts, Electrochemistry-mass spectrometry for mechanistic studies and simulation of oxidation processes in the environment, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2011**, 399, pp. 1859-1868.
- 43 L. Chen, D. Hofmann, E. Klumpp, X. Xiang, Y. Chen, et S. Kupperts, Bottom-up approach for the reaction of xenobiotics and their metabolites with model substances for natural organic matter by electrochemistry-mass spectrometry (EC-MS), *Chemosphere*, **2012**, 89, pp. 1376-1383.
- 44 L. Zhu, B. Santiago-Schübel, H. Xiao, B. Thiele, Z. Zhu, Y. Qiu, H. Hollert, et S. Küppers, An efficient laboratory workflow for environmental risk assessment of organic chemicals, *Chemosphere*, **2015**, 131, pp. 34-40.
- 45 H. Faber, H. Lutze, P. L. Lareo, L. Frensemeier, M. Vogel, T. C. Schmidt, et U. Karst, Liquid chromatography/mass spectrometry to study oxidative degradation of environmentally relevant pharmaceuticals by electrochemistry and ozonation, *Journal of Chromatography A*, **2014**, 1343, pp. 152-159.
- 46 G. J. Van Berkel, et V. Kertesz, Electrochemically initiated tagging of thiols using an electrospray ionization based liquid microjunction surface sampling probe two-electrode cell, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2009**, 23, pp. 1380-1386.
- 47 G. J. Van Berkel, et V. Kertesz, Expanded Electrochemical Capabilities of the Electrospray Ion Source Using Porous Flow-Through Electrodes as the Upstream Ground and Emitter High-Voltage Contact, *Analytical Chemistry*, **2005**, 77, pp. 8041-8049.
- 48 C. Roussel, L. Dayon, H. Jensen, et H. H. Girault, On-line cysteine modification for protein analysis: new probes for electrochemical tagging nanospray mass spectrometry, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2004**, 570, pp. 187-199.
- 49 M. Prudent, C. Roussel, et H. H. Girault, Electrochemical generation of Cu(I) complexes in aqueous solutions studied by on-line mass spectrometry, *Electrochemistry Communications*, **2007**, 9, pp. 2067-2074.
- 50 U. Bussy, R. Boisseau, C. Thobie-Gautier, et M. Boujtita, Electrochemistry-mass spectrometry to study reactive drug metabolites and CYP450 simulations, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2015**, 70, pp. 67-73.

- 51 U. Jurva, et L. Weidolf, Electrochemical generation of drug metabolites with applications in drug discovery and development, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2015**, 70, pp. 92-99.
- 52 A. P. Bruins, An overview of electrochemistry combined with mass spectrometry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2015**, 70, pp. 14-19.
- 53 P. Liu, Q. Zheng, H. D. Dewald, R. Zhou, et H. Chen, The study of electrochemistry with ambient mass spectrometry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2015**, 70, pp. 20-30.
- 54 F. T. G. Van den Brink, W. Olthuis, A. van den Berg, et M. Odijk, Miniaturization of electrochemical cells for mass spectrometry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2015**, 70, pp. 40-49.
- 55 T. Yuan, H. Permentier, et R. Bischoff, Surface-modified electrodes in the mimicry of oxidative drug metabolism, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2015**, 70, pp. 50-57.
- 56 J. Gun, S. Bharathi, V. Gutkin, D. Rizkov, A. Voloshenko, R. Shelkov, S. Sladkevich, N. Kyi, M. Rona, Y. Wolanov, D. Rizkov, M. Koch, S. Mizrahi, P. V. Pridkhochenko, A. Modestov, et O. Lev, Highlights in coupled electrochemical flow cell-mass spectrometry, EC/MS, *Israel Journal of Chemistry*, **2010**, 50, pp. 360-373.
- 57 W. Lohmann, et U. Karst, Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 391, pp. 79-96.
- 58 U. Bussy, M. Delaforge, C. El-Bekkali, V. Ferchaud-Roucher, M. Krempf, I. Tea, N. Galland, D. Jacquemin, et M. Boujtita, Acebutolol and alprenolol metabolism predictions: comparative study of electrochemical and cytochrome P450-catalyzed reactions using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2013**, 405, pp. 6077-6085.
- 59 U. Bussy, V. Ferchaud-Roucher, I. Tea, M. Krempf, V. Silvestre, et M. Boujtita, Electrochemical oxidation behavior of Acebutolol and identification of intermediate species by liquid chromatography and mass spectrometry, *Electrochimica Acta*, **2012**, 69, pp. 351-357.
- 60 U. Bussy, I. Tea, V. Ferchaud-Roucher, M. Krempf, V. Silvestre, N. Galland, D. Jacquemin, M. Andresen-Bergström, U. Jurva, et M. Boujtita, Voltammetry coupled to mass spectrometry in the presence of isotope 18O labeled water for the prediction of oxidative transformation pathways of activated aromatic ethers: Acebutolol, *Analytica Chimica Acta*, **2013**, 762, pp. 39-46.
- 61 C. Roussel, L. Dayon, N. Lion, T. C. Rohner, J. Jossierand, J. S. Rossier, H. Jensen, et H. H. Girault, Generation of mass tags by the inherent electrochemistry of electrospray for protein mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2004**, 15, pp. 1767-1779.
- 62 ESAinc, <http://www.esainc.com/>.
- 63 Antec, <http://www.myantec.com/>.
- 64 K. G. Madsen, G. Groenberg, C. Skonberg, U. Jurva, S. H. Hansen, et J. Olsen, Electrochemical Oxidation of Troglitazone: Identification and Characterization of the Major Reactive Metabolite in Liver Microsomes, *Chemical Research in Toxicology*, **2008**, 21, pp. 2035-2041.
- 65 G. Liljegren, A. Dahlin, C. Zettersten, J. Bergquist, et L. Nyholm, On-line coupling of a microelectrode array equipped poly(dimethylsiloxane) microchip with an integrated graphite electrospray emitter for electrospray ionisation mass spectrometry, *Lab on a Chip*, **2005**, 5, pp. 1008-1016.

- 66** F. T. G. van den Brink, L. Büter, M. Odijk, W. Olthuis, U. Karst, et A. van den Berg, Mass Spectrometric Detection of Short-Lived Drug Metabolites Generated in an Electrochemical Microfluidic Chip, *Analytical Chemistry*, **2015**, 87, pp. 1527-1535.
- 67** R. A. Saylor, E. A. Reid, et S. M. Lunte, Microchip electrophoresis with electrochemical detection for the determination of analytes in the dopamine metabolic pathway, *ELECTROPHORESIS*, **2015**, 36, pp. 1912-1919.
- 68** M. Odijk, A. Baumann, W. Lohmann, d. B. F. T. G. van, W. Olthuis, U. Karst, et d. B. A. van, A microfluidic chip for electrochemical conversions in drug metabolism studies, *Lab on a Chip*, **2009**, 9, pp. 1687-1693.
- 69** M. Odijk, W. Olthuis, A. van den Berg, L. Qiao, et H. Girault, Improved conversion rates in drug screening applications using miniaturized electrochemical cells with frit channels, *Analytical Chemistry*, **2012**, 84, pp. 9176-9183.
- 70** W. B. Lohmann, A; Karst, U., *Electrochemistry and LC-MS for metabolite generation and identification: tools, technologies, and Trends*, LCGC Europe, **2010**, 28, pp. 470-478.
- 71** M. Odijk, A. Baumann, W. Olthuis, d. B. A. van, et U. Karst, Electrochemistry-on-chip for on-line conversions in drug metabolism studies, *Biosensors and Bioelectronics*, **2010**, 26, pp. 1521-1527.
- 72** W. Lohmann, R. Doetzer, G. Guetter, L. S. M. Van, et U. Karst, On-Line Electrochemistry/Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Simulation of Pesticide Metabolism, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2009**, 20, pp. 138-145.
- 73** F. J. Stevenson, *Humus, chemistry: genesis, composition, reactions*. second edn. Vol. 443 (New York: John Wiley & Sons, **1994**).
- 74** C. H. Becker, et M. Bern, Recent developments in quantitative proteomics, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **2011**, 722, pp. 171-182.
- 75** H. P. Permentier, et A. P. Bruins, Electrochemical oxidation and cleavage of proteins with on-line mass spectrometric detection: Development of an instrumental alternative to enzymatic protein digestion, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2004**, 15, pp. 1707-1716.
- 76** H. P. Permentier, U. Jurva, B. Barroso, et A. P. Bruins, Electrochemical oxidation and cleavage of peptides analyzed with on-line mass spectrometric detection, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2003**, 17, pp. 1585-1592.
- 77** J. Roeser, H. P. Permentier, A. P. Bruins, et R. Bischoff, Electrochemical Oxidation and Cleavage of Tyrosine- and Tryptophan-Containing Tripeptides, *Analytical Chemistry*, **2010**, 82, pp. 7556-7565.
- 78** S. Mysling, R. Salbo, M. Ploug, et T. J. D. Jørgensen, Electrochemical Reduction of Disulfide-Containing Proteins for Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, **2014**, 86, pp. 340-345.
- 79** J. Li, H. D. Dewald, et H. Chen, Online Coupling of Electrochemical Reactions with Liquid Sample Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, **2009**, 81, pp. 9716-9722.
- 80** Y. Zhang, H. D. Dewald, et H. Chen, Online Mass Spectrometric Analysis of Proteins/Peptides Following Electrolytic Cleavage of Disulfide Bonds, *Journal of Proteome Research*, **2011**, 10, pp. 1293-1304.
- 81** A. Kraj, H.-J. Brouwer, N. Reinhoud, et J.-P. Chervet, A novel electrochemical method for efficient reduction of disulfide bonds in peptides and proteins prior to MS detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2013**, 405, pp. 9311-9320.

- 82 L. Dayon, C. Roussel, et H. H. Girault, Probing Cysteine Reactivity in Proteins by Mass Spectrometric EC-Tagging, *Journal of Proteome Research*, **2006**, 5, pp. 793-800.
- 83 L. Büter, H. Faber, T. Wigger, M. Vogel, et U. Karst, Differential Protein Labeling Based on Electrochemically Generated Reactive Intermediates, *Analytical Chemistry*, **2015**, 87, pp. 9931-9938.
- 84 L. Büter, M. Vogel, et U. Karst, Adduct formation of electrochemically generated reactive intermediates with biomolecules, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2015**, 70, pp. 74-91.
- 85 A. Baumann, T. Pfeifer, D. Melles, et U. Karst, Investigation of the biotransformation of melarsoprol by electrochemistry coupled to complementary LC/ESI-MS and LC/ICP-MS analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2013**, 405, pp. 5249-5258.
- 86 P. Anzenbacher, et E. Anzenbacherova, Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2001**, 58, pp. 737-747.
- 87 D. Mansuy, A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P 450 chemistry and oxidation catalysis, *Comptes Rendus Chimie*, **2007**, 10, pp. 392-413.
- 88 T. Johansson, L. Weidolf, et U. Jurva, Mimicry of phase I drug metabolism - novel methods for metabolite characterization and synthesis, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2007**, 21, pp. 2323-2331.
- 89 K. Chipiso, et R. H. Simoyi, Electrochemistry-coupled to mass spectrometry in simulation of metabolic oxidation of methimazole: Identification and characterization of metabolites, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2016**, 761, pp. 131-140.
- 90 P. Rydberg, D. E. Gloriam, J. Zaretski, C. Breneman, et L. Olsen, SMARTCyp: A 2D Method for Prediction of Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, 1, pp. 96-100.
- 91 D. Mansuy, P. M. Dansette, F. Pecquet, et J.-C. Chottard, Iron-porphyrin catalysis of the oxidative dealkylation of para-nitro-anisole and 7-ethoxycoumarin by cumylhydroperoxide: a possible model for the corresponding cytochrome P 450-dependent reactions, *biochemical and Biophysical Research Communications*, **1980**, 96, pp. 433-439.
- 92 F. P. Guengerich, Kinetic deuterium isotope effects in cytochrome P450 oxidation reactions, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **2013**, 56, pp. 428-431.
- 93 F. P. Guengerich, C.-H. Yun, et T. L. Macdonald, Evidence for a 1-electron oxidation mechanism in N-dealkylation of N,N-dialkylanilines by cytochrome P450 2B1. Kinetic hydrogen isotope effects, linear free energy relationships, comparisons with horseradish peroxidase, and studies with oxygen surrogates, *The Journal of Biological Chemistry*, **1996**, 271, pp. 27321-27329.
- 94 C.-H. Yun, G. P. Miller, et F. P. Guengerich, Rate-Determining Steps in Phenacetin Oxidations by Human Cytochrome P450 1A2 and Selected Mutants, *Biochemistry*, **2000**, 39, pp. 11319-11329.
- 95 F. P. Guengerich, Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity, *Chemical Research in Toxicology*, **2001**, 14, pp. 611-650.
- 96 J. A. Hinson, S. D. Nelson, et J. R. Gillette, Metabolism of [p-18O]-phenacetin: the mechanism of activation of phenacetin to reactive metabolites in hamsters, *Molecular Pharmacology*, **1979**, 15, pp. 419-427.

- 97 J. A. Hinson, S. D. Nelson, et J. R. Mitchell, Studies on the microsomal formation of arylating metabolites of acetaminophen and phenacetin, *Molecular Pharmacology*, **1977**, 13, pp. 625-633.
- 98 D. J. Miner, et P. T. Kissinger, Evidence for the involvement of N-ACETYL-p-quinoneimine in acetaminophen metabolism, *Biochemical Pharmacology*, **1979**, 28, pp. 3285-3290.
- 99 K. G. Madsen, J. Olsen, C. Skonberg, S. H. Hansen, et U. Jurva, Development and Evaluation of an Electrochemical Method for Studying Reactive Phase-I Metabolites: Correlation to in Vitro Drug Metabolism, *Chemical Research in Toxicology*, **2007**, 20, pp. 821-831.
- 100 R. F. Ajayi, U. Sidwaba, U. Feleni, S. F. Douman, O. Tovide, S. Botha, P. Baker, X. G. Fuku, S. Hamid, T. T. Waryo, S. Vilakazi, R. Tshikhudo, et E. I. Iwuoha, Chemically amplified cytochrome P450-2E1 drug metabolism nanobiosensor for rifampicin anti-tuberculosis drug, *Electrochimica Acta*, **2014**, 128, pp. 149-155.
- 101 V. V. Shumyantseva, Y. D. Ivanov, N. Bistolos, F. W. Scheller, A. I. Archakov, et U. Wollenberger, Direct Electron Transfer of Cytochrome P450 2B4 at Electrodes Modified with Nonionic Detergent and Colloidal Clay Nanoparticles, *Analytical Chemistry*, **2004**, 76, pp. 6046-6052.
- 102 S. Ferro, et A. De Battisti, Electron transfer reactions at conductive diamond electrodes, *Electrochimica Acta*, **2002**, 47, pp. 1641-1649.
- 103 F. Sopaj, M. A. Rodrigo, N. Oturan, F. I. Podvorica, J. Pinson, et M. A. Oturan, Influence of the anode materials on the electrochemical oxidation efficiency. Application to oxidative degradation of the pharmaceutical amoxicillin, *Chemical Engineering Journal*, **2015**, 262, pp. 286-294.
- 104 A. Baumann, W. Lohmann, B. Schubert, H. Oberacher, et U. Karst, Metabolic studies of tetrazepam based on electrochemical simulation in comparison to in vivo and in vitro methods, *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, pp. 3192-3198.
- 105 S. Torres, R. Brown, R. Szucs, J. M. Hawkins, T. Zelesky, G. Scrivens, A. Pettman, et M. R. Taylor, The application of electrochemistry to pharmaceutical stability testing — Comparison with in silico prediction and chemical forced degradation approaches, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2015**, 115, pp. 487-501.
- 106 E. Kugelmann, C. R. Albert, G. Bringmann, et U. Holzgrabe, Fenton's oxidation: A tool for the investigation of potential drug metabolites, *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2011**, 54, pp. 1047-1058.
- 107 U. Jurva, H. V. Wikstrom, et A. P. Bruins, Electrochemically assisted Fenton reaction: reaction of hydroxyl radicals with xenobiotics followed by on-line analysis with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2002**, 16, pp. 1934-1940.
- 108 W. Lohmann, et U. Karst, Generation and Identification of Reactive Metabolites by Electrochemistry and Immobilized Enzymes Coupled On-Line to Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, **2007**, 79, pp. 6831-6839.
- 109 S. P. de Visser, et S. Shaik, A Proton-Shuttle Mechanism Mediated by the Porphyrin in Benzene Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes, *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, 125, pp. 7413-7424.
- 110 C. M. Bathelt, L. Ridder, A. J. Mulholland, et J. N. Harvey, Aromatic Hydroxylation by Cytochrome P450: Model Calculations of Mechanism and Substituent Effects, *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, 125, pp. 15004-15005.
- 111 G. S. K. Bbosa, D.; Odda, J.; Ogwal-Okeng, J., Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis, *Health*, **2013**, 5, pp. 14-34.

- 112 A. Pereira, A. McLaren, W. R. Bell, D. Copolov, et B. Dean, Potential clozapine target sites on peripheral hematopoietic cells and stromal cells of the bone marrow, *The Pharmacogenomics Journal*, **2003**, 3, pp. 227-234.
- 113 T. Johansson, L. Weidolf, J. N. Castagnoli, et U. Jurva, P450-catalyzed vs. electrochemical oxidation of haloperidol studied by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2010**, 24, pp. 1231-1240.
- 114 T. Johansson, L. Weidolf, F. Popp, R. Tacke, et U. Jurva, In vitro metabolism of haloperidol and sila-haloperidol: new metabolic pathways resulting from carbon/silicon exchange, *Drug Metabolism and Disposition*, **2010**, 38, pp. 73-83.
- 115 B. R. Baer, R. K. DeLisle, et A. Allen, Benzylic Oxidation of Gemfibrozil-1-O- $\beta$ -Glucuronide by P450 2C8 Leads to Heme Alkylation and Irreversible Inhibition, *Chemical Research in Toxicology*, **2009**, 22, pp. 1298-1309.
- 116 H. Chang, D. C. Johnson, et R. S. Houk, In situ coupling between electrochemistry and mass spectrometry — a literature review, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **1989**, 8, pp. 328-333.
- 117 S.-W. LinWu, A. H. J. Wang, et F.-C. Peng, Flavin-containing reductase: new perspective on the detoxification of nitrobenzodiazepine, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **2010**, 6, pp. 967-981.
- 118 D. R. Buhler, et M. E. Rasmusson, Reduction of p-nitrobenzoic acid by fishes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1968**, 124, pp. 582-595.
- 119 J. A. B. Squella, S.; Nunez-Vergara, L.J., Recent developments in the electrochemistry of some nitro compounds of biological significance., *Current Organic Chemistry*, **2005**, 9, pp. 565-581.
- 120 U. Bussy, Y.-W. Chung-Davidson, K. Li, et W. Li, Phase I and phase II reductive metabolism simulation of nitro aromatic xenobiotics with electrochemistry coupled with high resolution mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2014**, 406, pp. 7253-7260.
- 121 E. Nouri-Nigjeh, R. Bischoff, A. P. Bruins, et H. P. Permentier, Electrochemistry in the mimicry of oxidative drug metabolism by cytochrome P450s, *Current Drug Meabolism*, **2011**, 12, pp. 359-371.
- 122 N. M. Vieno, H. Haerki, T. Tuhkanen, et L. Kronberg, Occurrence of Pharmaceuticals in River Water and Their Elimination in a Pilot-Scale Drinking Water Treatment Plant, *Environment Science & Technology*, **2007**, 41, pp. 5077-5084.
- 123 P. E. e. d. Conseil, Décision N°2455/2001/CE du 20 Novembre 2001 établissant la liste des substance prioritaires dans le domaine de l'eau et modifiant la directive 2000/60/CE, **2001**), pp. 0001-0005.
- 124 W. Lohmann, et U. Karst, Simulation of the detoxification of paracetamol using on-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 386, pp. 1701-1708.
- 125 A. Covaci, S. Voorspoels, M. A.-E. Abdallah, T. Geens, S. Harrad, et R. J. Law, Analytical and environmental aspects of the flame retardant tetrabromobisphenol-A and its derivatives, *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, pp. 346-363.
- 126 A. C. Gerecke, W. Giger, P. C. Hartmann, N. V. Heeb, H.-P. E. Kohler, P. Schmid, M. Zennegg, et M. Kohler, Anaerobic degradation of brominated flame retardants in sewage sludge, *Chemosphere*, **2006**, 64, pp. 311-317.
- 127 P. O. Darnerud, Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife, *Environment International*, **2003**, 29, pp. 841-853.
- 128 F. Li, J. Wang, P. Nastold, B. Jiang, F. Sun, A. Zenker, B. A. Kolvenbach, R. Ji, et P. François-Xavier Corvini, Fate and metabolism of tetrabromobisphenol A in soil

- slurries without and with the amendment with the alkylphenol degrading bacterium *Sphingomonas* sp. strain TTNP3, *Environmental Pollution*, **2014**, 193, pp. 181-188.
- 129** R. Saint-Louis, et E. Pelletier, LC-ESI-MS-MS method for the analysis of tetrabromobisphenol A in sediment and sewage sludge, *Analyst*, **2004**, 129, pp. 724-730.
- 130** M. J. Frisch, Gaussian 09 Revision A.02, **2009**, p. Gaussian Inc. Wallingford CT.
- 131** A. V. Marenich, C. J. Cramer, et D. G. Truhlar, Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions, *The Journal of Physical Chemistry B*, **2009**, 113, pp. 6378-6396.
- 132** Y. Y. Chan, Y. Yue, Y. Li, et R. D. Webster, Electrochemical/chemical oxidation of bisphenol A in a four-electron/two-proton process in aprotic organic solvents, *Electrochimica Acta*, **2013**, 112, pp. 287-294.
- 133** X. Yang, J. Kirsch, Y. Zhang, J. W. Fergus, et A. Simonian, Potential Drop Based Model to Analyze Electrode Passivation by Fouling from Phenolic Compounds, *ECS Transactions*, **2013**, 53, pp. 1-14.
- 134** D. Zalko, C. Prouillac, A. Riu, E. Perdu, L. Dolo, I. Jouanin, C. Canlet, L. Debrauwer, et J.-P. Cravedi, Biotransformation of the flame retardant tetrabromo-bisphenol A by human and rat sub-cellular liver fractions, *Chemosphere*, **2006**, 64, pp. 318-327.
- 135** S.-Y. Pang, J. Jiang, Y. Gao, Y. Zhou, X. Huangfu, Y. Liu, et J. Ma, Oxidation of Flame Retardant Tetrabromobisphenol A by Aqueous Permanganate: Reaction Kinetics, Brominated Products, and Pathways, *Environmental Science & Technology*, **2014**, 48, pp. 615-623.
- 136** J. Eriksson, S. Rahm, N. Green, Å. Bergman, et E. Jakobsson, Photochemical transformations of tetrabromobisphenol A and related phenols in water, *Chemosphere*, **2004**, 54, pp. 117-126.
- 137** J. E. Eriksson, L. 2,2',6,6'-Tetrachloro-4,4'-propane-2,2-diyldiphenol, 2,2',6-tribromo-4,4'-propane-2,2-diyldiphenol and 2,2',6,6'-tetrabromo-4,4'-propane-2,2-diyldiphenol, *Acta Crystallographica Section C*, **2001**, 57, pp. 1308-1312.
- 138** M. Beller, J. Seayad, A. Tillack, et H. Jiao, Catalytic Markovnikov and anti-Markovnikov Functionalization of Alkenes and Alkynes: Recent Developments and Trends, *Angewandte Chemie International Edition*, **2004**, 43, pp. 3368-3398.
- 139** J. S. Boerma, N. P. E. Vermeulen, et J. N. M. Commandeur, One-electron oxidation of diclofenac by human cytochrome P450s as a potential bioactivation mechanism for formation of 2'-(glutathion-S-yl)-deschloro-diclofenac, *Chemico-Biological Interactions*, **2014**, 207, pp. 32-40.
- 140** U. Jurva, A. Holmen, G. Groenberg, C. Masimirembwa, et L. Weidolf, Electrochemical generation of electrophilic drug metabolites: characterization of amodiaquine quinoneimine and cysteinyl conjugates by MS, IR, and NMR, *Chemical Research in Toxicology*, **2008**, 21, pp. 928-935.
- 141** K. Levsen, H.-M. Schiebel, B. Behnke, R. Doetzer, W. Dreher, M. Elend, et H. Thiele, Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview, *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1067, pp. 55-72.
- 142** J. L. Bolton, M. A. Trush, T. M. Penning, G. Dryhurst, et T. J. Monks, Role of Quinones in Toxicology, *Chemical Research in Toxicology*, **2000**, 13, pp. 135-160.
- 143** T. Shono, T. Toda, et N. Oshino, Preparation of N-dealkylated drug metabolites by electrochemical simulation of biotransformation, *Drug Metabolism and Disposition*, **1981**, 9, pp. 481-482.
- 144** W. Lu, X. Xu, et R. B. Cole, Online Linear Sweep Voltammetry-Electrospray Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1997**, 69, pp. 2478-2484.

- 145 Y. Grosse, R. Baan, K. Straif, B. Secretan, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, L. Galichet, et V. Coglianò, A review of human carcinogens-Part A: pharmaceuticals, *The Lancet Oncology*, 10, pp. 13-14.
- 146 M. Stiborová, E. Frei, H. Schmeiser, V. Arlt, et V. Martínek, Mechanisms of Enzyme-Catalyzed Reduction of Two Carcinogenic Nitro-Aromatics, 3-Nitrobenzanthrone and Aristolochic Acid I: Experimental and Theoretical Approaches, *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15, p. 10271.
- 147 W. H. Harwood, R. M. Hurd, et W. H. Jordan, Electrochemical Reduction of Nitrobenzene at Controlled Potentials, *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, 1963, 2, pp. 72-77.
- 148 M. Stiborová, F. Bárta, K. Levová, P. Hodek, H. H. Schmeiser, V. M. Arlt, et V. Martínek, A Mechanism of O-Demethylation of Aristolochic Acid I by Cytochromes P450 and Their Contributions to This Reaction in Human and Rat Livers: Experimental and Theoretical Approaches, *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, pp. 27561-27575.
- 149 S. Shibutani, R. R. Bonala, T. Rosenquist, R. Rieger, N. Suzuki, F. Johnson, F. Miller, et A. P. Grollman, Detoxification of aristolochic acid I by O-demethylation: Less nephrotoxicity and genotoxicity of aristolochic acid Ia in rodents, *International journal of cancer*, 2010, 127, pp. 1021-1027.
- 150 H. Dong, N. Suzuki, M. C. Torres, R. R. Bonala, F. Johnson, A. P. Grollman, et S. Shibutani, Quantitative determination of aristolochic acid-derived DNA adducts in rats using <sup>32</sup>P-postlabeling/polyacrylamide gel electrophoresis analysis, *Drug Metabolism and Disposition*, 2006, 34, pp. 1122-1127.
- 151 V. M. Arlt, M. Stiborova, et H. H. Schmeiser, Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review, *Mutagenesis*, 2002, 17, pp. 265-277.
- 152 W. Chan, Y. Zheng, et Z. Cai, Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis of the DNA Adducts of Aristolochic Acids, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2007, 18, pp. 642-650.
- 153 H. H. Schmeiser, E. Frei, M. Wiessler, et M. Stiborova, Comparison of DNA adduct formation by aristolochic acids in various in vitro activation systems by <sup>32</sup>P-post-labelling: evidence for reductive activation by peroxidases, *Carcinogenesis*, 1997, 18, pp. 1055-1062.
- 154 S. Akoka, Une introduction à la résonance magnétique nucléaire, Chapitre 8: La RMN multidimensionnelle.
- 155 F. Bloch, Nuclear Induction, *Physical Review*, 1946, 70, pp. 460-474.
- 156 F. Bloch, W. W. Hansen, et M. Packard, The Nuclear Induction Experiment, *Physical Review*, 1946, 70, pp. 474-485.
- 157 E. M. Purcell, H. C. Torrey, et R. V. Pound, Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid, *Physical Review*, 1946, 69, pp. 37-38.
- 158 D. A. Foley, E. Bez, A. Codina, K. L. Colson, M. Fey, R. Krull, D. Piroli, M. T. Zell, et B. L. Marquez, NMR Flow Tube for Online NMR Reaction Monitoring, *Analytical Chemistry*, 2014, 86, pp. 12008-12013.
- 159 J. Y. Buser, et A. D. McFarland, Reaction characterization by flow NMR: quantitation and monitoring of dissolved H<sub>2</sub> via flow NMR at high pressure, *Chemical Communications*, 2014, 50, pp. 4234-4237.
- 160 R. Dass, W. Koźmiński, et K. Kazimierzczuk, Analysis of Complex Reacting Mixtures by Time-Resolved 2D NMR, *Analytical Chemistry*, 2015, 87, pp. 1337-1343.
- 161 S. Akoka, Une introduction à la résonance magnétique nucléaire, Chapitre 1: Principes de base.

- 162 S. Akoka, Une introduction à la résonance magnétique nucléaire, Chapitre 2: La RMN impulsionnelle.
- 163 H. M. Kovacs, Detlef; Spraul, Manfred, Cryogenically cooled probes - a leap in NMR technology, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2005**, 46, pp. 131-155.
- 164 S. Akoka, Une introduction à la résonance magnétique nucléaire, Chapitre 7: la RMN multi-impulsionnelle.
- 165 J. Jeener, Lecture presented at Ampere International Summer School II, Basko, Polje Yugoslavia, **1971**.
- 166 G. Bodenhausen, R. Freeman, R. Niedermeyer, et D. L. Turner, Double Fourier transformation in high-resolution NMR, *Journal of Magnetic Resonance* (1969), **1977**, 26, pp. 133-164.
- 167 P. Giraudeau, Résonance Magnétique Nucléaire Bidimensionnelle Quantitative: Développements méthodologiques en RMN 2D quantitative rapide et ultrarapide.
- 168 L. Frydman, T. Scherf, et A. Lupulescu, The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2002**, 99, pp. 15858-15862.
- 169 J. C. Hoch, M. W. Maciejewski, M. Mobli, A. D. Schuyler, et A. S. Stern, Nonuniform Sampling and Maximum Entropy Reconstruction in Multidimensional NMR, *Accounts of Chemical Research*, **2014**, 47, pp. 708-717.
- 170 V. Blechta, et R. Freeman, Multi-site Hadamard NMR spectroscopy, *Chemical Physics Letters*, **1993**, 215, pp. 341-346.
- 171 P. Giraudeau, et L. Frydman, Ultrafast 2D NMR: An Emerging Tool in Analytical Spectroscopy, *Annual Review of Analytical Chemistry*, **2014**, 7, pp. 129-161.
- 172 P. Pelupessy, Adiabatic Single Scan Two-Dimensional NMR Spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, 125, pp. 12345-12350.
- 173 L. Frydman, A. Lupulescu, et T. Scherf, Principles and Features of Single-Scan Two-Dimensional NMR Spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, 125, pp. 9204-9217.
- 174 P. Mansfield, Spatial mapping of the chemical shift in NMR, *Magnetic Resonance in Medicine*, **1984**, 1, pp. 370-386.
- 175 M. Pathan, S. Akoka, et P. Giraudeau, Ultrafast hetero-nuclear 2D J-resolved spectroscopy, *Journal of Magnetic Resonance*, **2012**, 214, pp. 335-339.
- 176 P. Pelupessy, L. Duma, et G. Bodenhausen, Improving resolution in single-scan 2D spectroscopy, *Journal of Magnetic Resonance*, **2008**, 194, pp. 169-174.
- 177 P. Giraudeau, et S. Akoka, Resolution and sensitivity aspects of ultrafast J-resolved 2D NMR spectra, *Journal of Magnetic Resonance*, **2008**, 190, pp. 339-345.
- 178 P. Giraudeau, et S. Akoka, Sensitivity and lineshape improvement in ultrafast 2D NMR by optimized apodization in the spatially encoded dimension, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2011**, 49, pp. 307-313.
- 179 P. Giraudeau, et S. Akoka, A new gradient-controlled method for improving the spectral width of ultrafast 2D NMR experiments, *Journal of Magnetic Resonance*, **2010**, 205, pp. 171-176.
- 180 M. Pathan, B. Charrier, I. Tea, S. Akoka, et P. Giraudeau, New practical tools for the implementation and use of ultrafast 2D NMR experiments, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2013**, 51, pp. 168-175.
- 181 P. Giraudeau, S. Massou, Y. Robin, E. Cahoreau, J.-C. Portais, et S. Akoka, Ultrafast Quantitative 2D NMR: An Efficient Tool for the Measurement of Specific Isotopic Enrichments in Complex Biological Mixtures, *Analytical Chemistry*, **2011**, 83, pp. 3112-3119.

- 182 P. Giraudeau, G. S. Remaud, et S. Akoka, Evaluation of Ultrafast 2D NMR for Quantitative Analysis, *Analytical Chemistry*, **2009**, 81, pp. 479-484.
- 183 L. H. K. Queiroz, P. Giraudeau, S. F. A. B. dos, K. T. Oliveira, et A. G. Ferreira, Real-time mechanistic monitoring of an acetal hydrolysis using ultrafast 2D NMR, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2012**, 50, pp. 496-501.
- 184 L. H. K. Queiroz, Jr., D. P. K. Queiroz, L. Dhooghe, A. G. Ferreira, et P. Giraudeau, Real-time separation of natural products by ultrafast 2D NMR coupled to on-line HPLC, *Analyst*, **2012**, 137, pp. 2357-2361.
- 185 P. Giraudeau, Y. Shrot, et L. Frydman, Multiple Ultrafast, Broadband 2D NMR Spectra of Hyperpolarized Natural Products, *Journal of the American Chemical Society*, **2009**, 131, pp. 13902-13903.
- 186 A. Le Guennec, I. Tea, I. Antheaume, E. Martineau, B. Charrier, M. Pathan, S. Akoka, et P. Giraudeau, Fast Determination of Absolute Metabolite Concentrations by Spatially Encoded 2D NMR: Application to Breast Cancer Cell Extracts, *Analytical Chemistry*, **2012**, 84, pp. 10831-10837.
- 187 R. Boisseau, B. Charrier, S. Massou, J.-C. Portais, S. Akoka, et P. Giraudeau, Fast Spatially Encoded 3D NMR Strategies for <sup>13</sup>C-Based Metabolic Flux Analysis, *Analytical Chemistry*, **2013**, 85, pp. 9751-9757.
- 188 E. Martineau, P. Giraudeau, I. Tea, et S. Akoka, Fast and precise quantitative analysis of metabolic mixtures by 2D <sup>1</sup>H INADEQUATE NMR, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2011**, 54, pp. 252-257.
- 189 P. Giraudeau, N. Guignard, E. Hillion, E. Baguet, et S. Akoka, Optimization of homonuclear 2D NMR for fast quantitative analysis: Application to tropine–nortropine mixtures, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2007**, 43, pp. 1243-1248.
- 190 R. Boisseau, U. Bussy, P. Giraudeau, et M. Boujtita, In Situ Ultrafast 2D NMR Spectroelectrochemistry for Real-Time Monitoring of Redox Reactions, *Analytical Chemistry*, **2015**, 87, pp. 372-375.
- 191 H. Kovacs, D. Moskau, et M. Spraul, Cryogenically cooled probes—a leap in NMR technology, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2005**, 46, pp. 131-155.
- 192 D. Falck, et W. M. A. Niessen, Solution-phase electrochemistry-nuclear magnetic resonance of small organic molecules, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2015**, 70, pp. 31-39.
- 193 K. Albert, E.-L. Dreher, H. Straub, et A. Rieker, Monitoring electrochemical reactions by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **1987**, 25, pp. 919-922.
- 194 H. Simon, D. Melles, S. Jacquilleot, P. Sanderson, R. Zazzeroni, et U. Karst, Combination of Electrochemistry and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Metabolism Studies, *Analytical Chemistry*, **2012**, 84, pp. 8777-8782.
- 195 D. W. Mincey, M. J. Popovich, P. J. Faustino, M. M. Hurst, et J. A. Caruso, Monitoring of electrochemical reactions by nuclear magnetic resonance spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1990**, 62, pp. 1197-1200.
- 196 P. D. Prenzler, R. Bramley, S. R. Downing, et G. A. Heath, High-field NMR spectroelectrochemistry of spinning solutions: simultaneous in situ detection of electrogenerated species in a standard probe under potentiostatic control, *Electrochemistry Communications*, **2000**, 2, pp. 516-521.
- 197 S. Klod, et L. Dunsch, A combination of in situ ESR and in situ NMR spectroelectrochemistry for mechanistic studies of electrode reactions: the case of p-benzoquinone, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2011**, 49, pp. 725-729.

- 198** S. Klod, K. Haubner, E. Jaehne, et L. Dunsch, Charge stabilisation by dimer formation of an endcapped thiophene tetramer - an in situ NMR spectroelectrochemical study, *Chemical Science*, **2010**, 1, pp. 743-750.
- 199** U. Bussy, P. Giraudeau, V. Silvestre, T. Jaunet-Lahary, V. Ferchaud-Roucher, M. Krempf, S. Akoka, I. Tea, et M. Boujtita, In situ NMR spectroelectrochemistry for the structure elucidation of unstable intermediate metabolites, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2013**, 405, pp. 5817-5824.
- 200** U. Bussy, P. Giraudeau, I. Tea, et M. Boujtita, Understanding the degradation of electrochemically-generated reactive drug metabolites by quantitative NMR, *Talanta*, **2013**, 116, pp. 554-558.
- 201** U. Bussy, Développements instrumentaux pour la prédiction électrochimique du métabolisme oxydatif de xénobiotiques, couplages électrochimie-spectrométrie de masse ou électrochimie-résonance magnétique nucléaire., **2013**.
- 202** L. Rouger, B. Charrier, M. Pathan, S. Akoka, et P. Giraudeau, Processing strategies to obtain clean interleaved ultrafast 2D NMR spectra, *Journal of Magnetic Resonance*, **2014**, 238, pp. 87-93.
- 203** P. Giraudeau, Quantitative 2D liquid-state NMR, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2014**, 52, pp. 259-272.
- 204** D. J. Ernesto, Perlo; Bernhard Blümich; Federico, Casanova, Small magnets for portable NMR spectrometers, *Angewandte Chemie International Edition*, **2010**, 49, pp. 4133-4135.
- 205** B. Gouilleux, B. Charrier, E. Danieli, J.-N. Dumez, S. Akoka, F.-X. Felpin, M. Rodriguez-Zubiri, et P. Giraudeau, Real-time reaction monitoring by ultrafast 2D NMR on a benchtop spectrometer, *Analyst*, **2015**, 140, pp. 7854-7858.
- 206** E. Schneider, et D. S. Clark, Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, **2013**, 39, pp. 1-13.
- 207** C. Estavillo, Z. Lu, I. Jansson, J. B. Schenkman, et J. F. Rusling, Epoxidation of styrene by human cyt P450 1A2 by thin film electrolysis and peroxide activation compared to solution reactions, *Biophysical Chemistry*, **2003**, 104, pp. 291-296.
- 208** K. Yoshioka, D. Kato, T. Kamata, et O. Niwa, Cytochrome P450 Modified Polycrystalline Indium Tin Oxide Film as a Drug Metabolizing Electrochemical Biosensor with a Simple Configuration, *Analytical Chemistry*, **2013**, 85, pp. 9996-9999.
- 209** Q. Xue, D. Kato, T. Kamata, Q. Guo, T. You, et O. Niwa, Human cytochrome P450 3A4 and a carbon nanofiber modified film electrode as a platform for the simple evaluation of drug metabolism and inhibition reactions, *Analyst*, **2013**, 138, pp. 6463-6468.

# Thèse de Doctorat

Renaud BOISSEAU

## Élucidation des mécanismes de dégradation de polluants émergents par couplage électrochimie-spectrométrie de masse ou électrochimie-résonance magnétique nucléaire

Elucidation of degradation mechanism of emerging pollutants by electrochemistry-mass spectrometry or electrochemistry-nuclear magnetic resonance couplings

### Résumé

La simulation du devenir d'un xénobiotique (médicament ou polluant émergent) est un axe de recherche important qui fait partie des grands défis sociétaux actuels à l'interface des enjeux environnementaux et sanitaires. L'objectif principal de ce travail de thèse est la mise en œuvre de couplage hybrides associant un dispositif électrochimique avec les outils analytiques que sont la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire (couplages CE-SM et CE-RMN) pour la simulation du métabolisme de xénobiotiques induites par le cytochrome P450 ainsi que des dégradations dans l'environnement de ces derniers. Les informations extraites de tels couplages permettent une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu lors des différentes étapes du devenir *in vivo* et environnemental d'un xénobiotique.

Dans un premier temps, l'élucidation du comportement électrochimique du tétrabromobisphénol A a été possible au travers de l'identification de ses produits d'oxydation par l'utilisation des couplages CE-(CL-)SM en ligne ou non. Dans un second temps, le mime par électrochimique du métabolisme réductif de l'acide aristolochique (composé nitro-aromatique) a été mise en œuvre. Un accent particulier a été porté sur l'observation de l'intermédiaire réactif formé durant le métabolisme par voie enzymatique de ce xénobiotique. Une dernière partie s'attache à présenter le premier couplage entre une cellule électrochimique et la RMN 2D ultrarapide. Un tel couplage permet le suivi *in situ* et l'élucidation en temps réel d'un processus redox ainsi que l'observation d'espèces réactives intermédiaires.

### Mots clés

Simulation, xénobiotique, CE-SM, CE-RMN, métabolisme, environnement, cytochrome P450

### Abstract

Fate of various xenobiotic (drug or emerging pollutant) constitutes nowadays one of the most important areas of research that aims at tackling societal challenges at the interface of environmental and sanitary stakes. The main objective of this study consists in coupling between an electrochemical cell (EC) with mass spectrometry (MS) or nuclear magnetic resonance (EC-MS and EC-NMR) to simulate oxidative transformation of xenobiotics initiated by cytochrome P450 as well as in environment. The expected results obtained from these hybrid devices led to a better understanding of various mechanism pathways involved during different steps of *in vivo* or environmental degradation of xenobiotic.

Firstly, the elucidation of electrochemical behavior of tetrabromobisphenol A was achieved by identifying oxidation products using EC-(LC-)MS. Secondly, we mimicked electrochemically the *in vivo* reduction of aristolochic acid (nitro aromatic compound). Special interest has been focused on the formation of reactive intermediates during enzymatic pathways. Finally we present the first coupling between an electrochemical cell and ultrafast 2D NMR. This coupling is useful for *in situ* real time monitoring of redox products and identification potential reactive intermediate species.

### Key Words

Simulation, xenobiotic, EC-MS, EC-NMR, metabolism, environment, cytochrome P450