

Centre Énergie Matériaux Télécommunications

Vers le Développement d'une Plateforme pour l'Étude Électrochimique des Mitochondries Humaines

Par

Uriel Bruno Mota

Thèse présenté(e) pour l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences de l'énergie et des matériaux

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examineur interne

Marc André Gauthier
INRS-EMT

Examineur externe

Marc Germain
Département de biologie médicale
Université du Québec à Trois-Rivières

Examineur externe

Steen Brian Schougaard
Département de chimie
Université du Québec à Montréal

Directeur de recherche

Ana C. Tavares
INRS-EMT

Codirecteur de recherche

Ian-Gaël Rodrigue-Gervais
INRS-AFSB

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer avant tout ma profonde gratitude à Dieu, dont la guidance, la force et la lumière m'ont accompagné tout au long de ce voyage. C'est par Sa grâce que j'ai trouvé la persévérance dans les moments de doute, le courage face aux défis et la clarté dans mes choix. Sans cette foi et cette présence constante, ce projet n'aurait pas pu être mené à bien. À Lui revient toute la gloire pour cette étape importante de ma vie.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury qui évalueront cette thèse pour le temps qu'ils y consacreront et pour leurs précieux retours.

Je remercie sincèrement mes directeurs de thèse, Ana et Ian Gaël, pour leur encadrement, leurs conseils avisés et l'accès aux ressources matérielles et aux laboratoires nécessaires à la réalisation de ce travail. Leur soutien constant a été essentiel tout au long de ce parcours.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à ma fiancée Laura et à notre bébé Sophia, qui ont été une source inestimable de motivation et de détermination pour mener ce projet à son terme.

Un grand merci à tous les membres de mon groupe de recherche pour leur aide précieuse chaque fois que cela était nécessaire, ainsi que pour les discussions enrichissantes et le partage d'idées.

À mes parents, je ne saurais trouver les mots pour exprimer toute ma gratitude. Vous avez toujours été présents, m'encourageant et me soutenant depuis le début de mes études, et je vous en suis éternellement reconnaissant. À mes frères, merci pour votre présence et votre soutien constant, qui ont été d'un grand réconfort dans les moments de doute.

Enfin, je remercie chaleureusement mes amis et toutes les personnes qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réalisation de cette thèse. Votre aide, vos encouragements et vos conseils ont été précieux pour mener à bien ce travail.

Finalement, je tiens à exprimer ma gratitude à Alexandra Elbakyan, pour son engagement envers l'accès libre à la connaissance scientifique. Son travail incarne l'esprit de partage et de collaboration qui fait avancer la science et permet à des chercheurs du monde entier, indépendamment de leurs ressources financières, de poursuivre leurs travaux avec des outils et des informations de qualité. Merci infiniment pour votre contribution précieuse à la communauté scientifique mondiale.

Merci à tous!

RÉSUMÉ

Les mitochondries sont des organites essentiels présents dans presque toutes les cellules eucaryotes, jouant un rôle central dans la production d'énergie par phosphorylation oxydative. Elles génèrent l'adénosine triphosphate (ATP), indispensable aux processus biologiques, et participent à des fonctions vitales telles que la régulation du métabolisme, la signalisation cellulaire, l'homéostasie calcique et l'apoptose. Le dysfonctionnement mitochondrial est impliqué dans de nombreuses maladies, y compris les troubles neurodégénératifs, les maladies cardiovasculaires, le diabète et certains cancers. Comprendre les mécanismes sous-jacents de la fonction mitochondriale et de ses altérations est donc crucial pour développer de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques. La caractérisation électrochimique directe des mitochondries dans des conditions physiologiques offre un moyen puissant d'étudier leurs processus bioénergétiques et redox. Cependant, cela présente des défis liés au maintien de l'intégrité des organites, à leur immobilisation sur les électrodes et à l'obtention de signaux électrochimiques sensibles et reproductibles.

Dans cette étude, nous avons développé une plateforme bioélectrochimique améliorée pour la caractérisation directe de mitochondries humaines isolées, en utilisant l'oxyde de graphène obtenu par exfoliation électrochimique de graphite (EGO) comme matériau d'électrode. Un protocole optimisé de purification des mitochondries a été établi pour préserver leur intégrité structurelle et fonctionnelle, confirmé par des techniques de microscopie. Les électrodes en graphite pyrolytique modifiées avec de l'EGO ont permis une immobilisation efficace des mitochondries sans nécessiter de couches supplémentaires, et des signaux électrochimiques fiables ont été détectés. Les propriétés structurales de l'EGO, telles que la taille des feuillets et le degré d'oxydation, ont été déterminantes pour moduler l'activité électrochimique mitochondriale. La sonication des suspensions d'EGO ont conduit à la formation de points quantiques d'oxyde de graphène, qui interagissent avec les membranes mitochondriales et facilitent le transfert d'électrons entre la chaîne de transport des électrons et l'électrode.

Notre travail démontre l'efficacité des électrodes modifiées avec de l'EGO pour faciliter la communication électrochimique directe avec les mitochondries humaines isolées dans des conditions physiologiques. Cette plateforme bioélectrochimique optimisée permet d'approfondir la compréhension de la fonction mitochondriale et peut contribuer à la recherche sur les maladies liées aux dysfonctionnements mitochondriaux. De plus, l'utilisation potentielle d'ultramicroélectrodes, caractérisées dans cette étude pour des applications futures, pourrait

améliorer la sensibilité et la résolution des mesures électrochimiques dans le domaine de l'électrochimie mitochondriale.

Mots-clés : Électrochimie mitochondriale, Oxyde de graphène, Technique d'analyse Seahorse, Graphite pyrolytique, Ultramicroélectrodes coniques, Tungstène, Carbone pyrolytique, Voltampérométrie cyclique, Voltammetrie à onde carrée, Modélisation numérique.

ABSTRACT

Mitochondria are essential organelles present in nearly all eukaryotic cells, playing a central role in energy production through oxidative phosphorylation. They generate adenosine triphosphate (ATP), crucial for biological processes, and participate in vital functions such as metabolism regulation, cell signaling, calcium homeostasis, and apoptosis. Mitochondrial dysfunction is implicated in numerous diseases, including neurodegenerative disorders, cardiovascular diseases, diabetes, and certain cancers. Understanding the underlying mechanisms of mitochondrial function and its impairments is therefore critical for developing new diagnostic and therapeutic approaches. The direct electrochemical characterization of mitochondria under physiological conditions offers a powerful way to study their bioenergetic and redox processes. However, this approach poses challenges related to maintaining organelle integrity, immobilizing them on electrodes, and obtaining sensitive and reproducible electrochemical signals.

In this study, we developed an enhanced bioelectrochemical platform for the direct characterization of isolated human mitochondria, using graphene oxide obtained through the electrochemical exfoliation of graphite (EGO) as an electrode material. An optimized protocol for mitochondrial purification was established to preserve their structural and functional integrity, as confirmed by microscopy techniques. Pyrolytic graphite electrodes modified with EGO enabled efficient mitochondrial immobilization without requiring additional layers, and reliable electrochemical signals were detected. The structural properties of EGO, such as sheet size and degree of oxidation, were critical in modulating mitochondrial electrochemical activity. Sonication of EGO suspensions led to the formation of graphene oxide quantum dots, which interact with mitochondrial membranes and facilitate electron transfer between the electron transport chain and the electrode.

Our work demonstrates the efficacy of EGO-modified electrodes in facilitating direct electrochemical communication with isolated human mitochondria under physiological conditions. This optimized bioelectrochemical platform provides deeper insights into mitochondrial function and may contribute to research on diseases associated with mitochondrial dysfunctions. Furthermore, the potential use of ultramicroelectrodes, characterized in this study for future applications, could enhance the sensitivity and resolution of electrochemical measurements in mitochondrial electrochemistry.

Keywords: Mitochondrial electrochemistry, Graphene oxide, Seahorse analysis technique, Pyrolytic graphite, Conical ultramicroelectrodes, Tungsten, Pyrolytic carbon, Cyclic voltammetry, Square wave voltammetry, Numerical modeling.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
RÉSUMÉ.....	v
ABSTRACT.....	vii
TABLE DES MATIÈRES.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES ÉQUATIONS.....	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xix
1 INTRODUCTION.....	1
2 Notions de base et revue de littérature.....	9
2.1 BIOÉNERGÉTIQUE ET MÉTABOLISME.....	9
2.1.1 Réactions biologiques d'oxydo-réduction.....	11
2.1.2 La mitochondrie.....	14
2.1.3 Principes classiques de la respiration mitochondriale.....	30
2.2 ÉLECTROCHIMIE.....	33
2.2.1 Méthodes électrochimiques.....	40
2.2.2 L'importance du matériel d'électrode.....	54
2.3 ÉLECTROCHIMIE MITOCHONDRIALE.....	59
2.3.1 Études fondamentales sur l'électrochimie mitochondriale.....	60
2.3.2 Piles à combustible biologiques à base de mitochondries.....	63
2.3.3 Biocapteurs électrochimiques à base de mitochondries.....	64
2.4 ÉLECTROCHIMIE À L'ÉCHELLE NANOMÉTRIQUE.....	67
2.4.1 Géométrie des UME.....	70
2.4.2 Modélisation numérique du transfert d'électrons aux électrodes coniques.....	73
3 Objectifs.....	75
3.1 OBJECTIF GÉNÉRAL.....	75
3.2 OBJECTIFS PARTICULIERS.....	75
4 Méthodologie.....	78
4.1 CULTURE CELLULAIRE ET PURIFICATION MITOCHONDRIALE.....	78
4.2 MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE.....	81
4.3 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION.....	82
4.4 SYNTHÈSE DE L'OXYDE DE GRAPHENE.....	83
4.5 CARACTERISATION DES PRODUITS DE SONICATION DE L'OXYDE DE GRAPHENE.....	84
4.6 ESSAIS MÉTABOLIQUES (SEAHORSE).....	86
4.7 MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE DES MITOCHONDRIES DÉPOSÉES SUR LES ÉLECTRODES.....	87

4.8	ANALYSES ÉLECTROCHIMIQUES	88
4.9	CODE MATLAB POUR SOUSTRACTION DE LA LIGNE BASE DES VOCs	89
4.10	FABRICATION, CARACTÉRISATION ET FONCTIONNALISATION D'ULTRAMICROÉLECTRODES CONIQUES	91
4.11	SIMULATIONS NUMÉRIQUES DE DYNAMIQUE DE FLUIDES	94
5	Résultats et discussion	96
5.1	PURIFICATION MITOCHONDRIALE	96
5.2	CONFIRMATION DE LA PRESENCE DES MITOCHONDRIES SUR LA SURFACE DES ELECTRODES	99
5.3	MESURES ELECTROCHIMIQUES ET VALIDATION AVEC DES ESSAIS METABOLIQUES (SEAHORSE) DE MITOCHONDRIES PURIFIEES	100
5.3.1	<i>Électrochimie de mitochondries des cellules HeLa</i>	102
5.3.2	<i>Électrochimie de mitochondries des cellules HEK293</i>	109
5.3.3	<i>Effet du temps de sonication des suspensions d'EGO sur la respiration mitochondriale</i> 117	
5.4	CARACTERISATION DES PRODUITS DE LA SONICATION DE L'EGO ET SON INTERACTION AVEC LES MITOCHONDRIES	121
5.5	ULTRAMICROELECTRODES POUR L'ELECTROCHIMIE D'ENTITES INDIVIDUELLES	127
5.5.1	<i>Caractérisation des UMEs coniques fonctionnalisées</i>	127
5.5.2	<i>Modélisation numérique des processus électrochimiques sur des UMEs</i>	135
6	CONCLUSIONS	141
7	Perspectives et travaux futurs	145
8	BIBLIOGRAPHIE	147
9	ANNEXES.....	157
9.1	ANNEXE 1	157
9.2	ANNEXE 2	158
9.3	ANNEXE 3	159
9.4	ANNEXE 4	160
9.5	ANNEXE 5	161

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. NIVEAUX D'OXYDATION DU CARBONE DANS LES BIOMOLECULES.	12
FIGURE 2. STRUCTURE DE LA MITOCHONDRIE.	14
FIGURE 3. LA CHAÎNE DE TRANSPORT D'ÉLECTRONS MITOCHONDRIALE.....	16
FIGURE 4. UBIQUINONE (COENZYME Q).....	17
FIGURE 5. GROUPES PROSTHÉTIQUES DES CYTOCHROMES.	19
FIGURE 6. COMPLEXE I : NADH A UBIQUINONE.	20
FIGURE 7. COMPLEXE II : SUCCINATE À UBIQUINONE.	22
FIGURE 8. COMPLEXE III : UBIQUINONE À CYT C.	25
FIGURE 9. COMPLEXE IV : CYT C À O ₂	26
FIGURE 10. TRANSFERT D'ÉLECTRONS AU COMPLEXE IV.	27
FIGURE 11. COMPLEXE V (ATP-ASE) : SYNTHÈSE D'ATP.....	28
FIGURE 12. CELLULE ÉLECTROCHIMIQUE ÉLECTROLYTIQUE.	36
FIGURE 13 LA COUCHE DOUBLE ÉLECTRIQUE	37
FIGURE 14. CHRONOAMPÉROMÉTRIE	42
FIGURE 15. VOLTAMPÉROMÉTRIE LINÉAIRE [6].	43
FIGURE 16. VOLTAMPEROMETRIE CYCLIQUE [6].	44
FIGURE 17. PROFILS DE CONCENTRATION DE Fc ET Fc À L'INTERFACE ÉLECTRODE-ÉLECTROLYTE PENDANT UNE VOLTAMPÉROMÉTRIE CYCLIQUE.....	46
FIGURE 18. FONCTION IMPOSÉE DANS LA VOLTAMPÉROMÉTRIE À ONDE CARRÉE.....	48
FIGURE 19. TRANSITOIRES DE COURANT POUR UNE EXPÉRIENCE DE VOC.	51
FIGURE 20. VOLTAMPÉROGRAMMES EN ONDE CARRÉE POUR LE CAS RÉVERSIBLE R/O AVEC O ABSENT DE LA SOLUTION [6].....	52
FIGURE 21. SIGNAUX ÉLECTROCHIMIQUES DES MITOCHONDRIES ISOLÉES, DU CYTOCHROME C ET DE LA COENZYME Q.....	60
FIGURE 22. EFFET DES CONDITIONS DE PURIFICATION SUR L'ÉLECTROCHIMIE MITOCHONDRIALE.....	62
FIGURE 23. COURBE DE PUISSANCE D'UNE BIOPILE MITOCHONDRIALE AU PYRUVATE.....	63
FIGURE 24. CAPTEUR ÉLECTROCHIMIQUE D'EXPLOSIFS À BASE DE MITOCHONDRIES.....	64
FIGURE 25. DIFFUSION VERS LA SURFACE DES MACROÉLECTRODES ET DES UME.	69
FIGURE 26. GÉOMÉTRIE DES UMES.	70

FIGURE 27. PROTOCOLE DE PURIFICATION MITOCHONDRIAL CLASSIQUE.	79
FIGURE 28. IMMUNO-PURIFICATION DES MITOCHONDRIES AVEC DES BILLES MAGNETIQUES.	80
FIGURE 29. DROP-CASTING ET CELLULE ÉLECTROCHIMIQUE	88
FIGURE 30. MONTAGE EXPÉRIMENTALE POUR LA FABRICATION ET CARACTÉRISATION D'ULTRAMICROÉLECTRODES.	91
FIGURE 31. FONCTIONNALISATION DES UMEs AVEC DU CARBONE.	92
FIGURE 32. GÉOMÉTRIE DES ÉLECTRODES CONIQUES.....	93
FIGURE 33. EXEMPLE DE MAILLAGE POUR LES SIMULATIONS NUMÉRIQUES.....	94
FIGURE 34. OPTIMISATION DE LA PURIFICATION MITOCHONDRIALE PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE.....	97
FIGURE 35. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DES MITOCHONDRIES ISOLEES.	98
FIGURE 36. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE DES MITOCHONDRIES IMMOBILISEES SUR DES ELECTRODES.	99
FIGURE 37. VOLTAMPEROGRAMMES DE PGE ET DES MITOCHONDRIES SUR PGE.	102
FIGURE 38. SIGNAUX ELECTROCHIMIQUES EN FONCTION DE LA CHARGE MITOCHONDRIALE.....	104
FIGURE 39. VOLTAMPEROGRAMMES CYCLIQUES DES MITOCHONDRIES ISOLEES PAR IMMUNO-PURIFICATION.....	105
FIGURE 40. TAUX DE CONSOMMATION D'OXYGENE DE MITOCHONDRIES DE CELLULES HELA ET HEK293.	107
FIGURE 41. VOLTAMPÉROMÉTRIE CYCLIQUE ET VOLTAMPÉROMÉTRIE À ONDE CARRÉE DES MITOCHONDRIES ISOLÉES.	110
FIGURE 42. DECONVOLUTION DES SIGNAUX ELECTROCHIMIQUES MITOCHONDRIALES PAR VOC.....	111
FIGURE 43. VOC ET ANALYSE SEAHORSE DES MITOCHONDRIES EN PRESENCE D'INHIBITEURS SPECIFIQUES. ...	112
FIGURE 44. EFFET DE LA SONICATION DE L'EGO SUR LES SIGNAUX ELECTROCHIMIQUES MITOCHONDRIALES....	117
FIGURE 45. EFFET DE LA SONICATION DE L'EGO SUR LES REponses SEAHORSE DES MITOCHONDRIES ISOLEES.	118
FIGURE 46. IMAGERIE MEB DES FEUILLETS D'EGO SONIQUES PENDANT DIFFERENTS TEMPS.	121
FIGURE 47. SPECTRES XPS DES EGOS SONIQUÉS PENDANT DIFFÉRENTS TEMPS.	122
FIGURE 48. IMAGES MET DE L'INTERACTION DES MITOCHONDRIES ISOLEES AVEC L'EGO	123
FIGURE 49. CARACTERISATION DES SURNAGEANTS D'EGO SONIQUE PENDANT DIFFERENTS TEMPS.	125
FIGURE 50. UMEs EN TUNGSTENE VS TUNGSTENE/CARBONE PYROLYTIQUE.	128
FIGURE 51. VC DES UMEs EN TUNGSTENE VS TUNGSTENE/CARBONE PYROLYTIQUE.	130
FIGURE 52. CARACTERISATION ELECTROCHIMIQUE DES NANO ELECTRODES CONIQUES.	131

FIGURE 53. COURANTS A L'ETAT STATIONNAIRE NORMALISES POUR DES UME AVEC DIFFERENTS ROC ET H, OBTENUS A PARTIR DE SIMULATIONS COMSOL MULTIPHYSICS®.....	132
FIGURE 54. PROFILS DE CONCENTRATION ET FLUX VERS LA SURFACE DE NANO-ELECTRODES CONIQUES.	136
FIGURE 55. IMAGES MEB DE LA COUCHE D'OXYDE DE W SUR DEUX UME AVEC DIFFERENTS ROC ET H.....	137
FIGURE 56. FLUX EN FONCTIONNE DU ROC ET DE H DES UME.....	139

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. VALEURS DES COEFFICIENTS Q ET P POUR DES UME AVEC DIFFÉRENTS ROC.....	133
--	-----

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 1. Équation de Nernst	44
Équation 2. Équation de Nernst pour l'oxydation monovalente de ferrocène	45
Équation 3. Deuxième loi de Fick	73
Équation 4. Équation de Butler-Volmer.....	73
Équation 5. Loi de Faraday sur l'électrolyse	95
Équation 6. Équation de Nernst pour un processus dépendant du pH.	113
Équation 7. Courant à l'état stationnaire pour des électrodes coniques avec rapports d'aspect inférieurs à 3	131
Équation 8. Courant à l'état stationnaire pour des électrodes coniques avec rapports d'aspect inférieurs à 3 modifié.....	132
Équation 9. Courant à l'état stationnaire pour des électrodes coniques avec rapports d'aspect entre 3 et 22	133
Équation 10. Aire électrochimiquement active des électrodes coniques.....	133

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abréviation	Définition
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumin)
CTE	Chaîne de transport des électrons
DMEM	Milieu de culture Dulbecco modifié par Eagle (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGO	Oxyde de graphène obtenu par exfoliation électrochimique de graphite
EGTA	Acide éthylèneglycol-tétracétique
ESA	Surface électrochimiquement active
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide réduite
FCCP	Carbonylcyanure-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone
FMN	Flavine mononucléotide
FWHM	Largeur à mi-hauteur (Full Width at Half Maximum)
GCE	Électrode en carbone vitreux (Glassy Carbon Electrode)
GO	Oxyde de graphène (Graphene Oxide)
GOQD	Points quantiques d'oxyde de graphène (Graphene Oxide Quantum Dots)
HEPES	Tampon N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(2-éthanesulfonique)
LSA	Surface latérale géométrique
MAS	Solution d'essai pour mitochondries (Mitochondrial assay buffer)
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique en transmission
MF	Microscopie en fluorescence
MG	Matériaux dérivés du graphène
MME	Membrane mitochondriale externe
MMI	Membrane mitochondriale interne
MPS	Solution de purification de mitochondries (Mitochondria purification buffer)
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OCR	Taux de consommation d'oxygène (Oxygen Consumption Rate)
OM	Oligomycine
OXPHOS	Phosphorylation oxydative
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate-Buffered Saline)
PGE	Électrode en graphite pyrolytique (Pyrolytic Graphite Electrode)
PHE	Plan de Helmholtz externe
PHI	Plan de Helmholtz interne
PMSF	Fluorure de phénylméthanesulfonyl (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)
QH ₂	Ubiquinol
RAA	Mélange de roténone-antimycine A
ROC	Rayon de courbure (Radius of Curvature)
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
SECM	Microscopie électrochimique à balayage (Scanning Electrochemical Microscopy)
UME	Ultramicroélectrode
UV	Ultraviolet
VC	Voltampérométrie cyclique
VOC	Voltampérométrie à onde carrée (Square Wave Voltammetry)
XPS	Spectroscopie de photoélectrons X (X-ray Photoelectron Spectroscopy)

1 INTRODUCTION

L'électrochimie biologique est un domaine de recherche en pleine expansion qui vise à comprendre en profondeur le rôle des processus électrochimiques dans les organismes vivants. En s'intéressant aux transferts d'électrons et aux réactions redox au sein des systèmes biologiques, cette discipline offre des perspectives essentielles sur les mécanismes fondamentaux qui sous-tendent les fonctions cellulaires. Ces fonctions incluent notamment la production d'énergie, le métabolisme des nutriments, la signalisation cellulaire et la régulation de diverses activités biologiques [1].

Tous les êtres vivants nécessitent de l'énergie pour survivre, croître et se reproduire. Ils possèdent la capacité essentielle de capter cette énergie et de la convertir d'une forme à une autre, par exemple en transformant l'énergie chimique des nutriments en macromolécules complexes, en mouvement ou en chaleur. Comme l'avait observé Antoine Lavoisier au XVIII^e siècle, la respiration est comparable à une combustion lente du carbone et de l'hydrogène, similaire à celle d'une bougie allumée, symbolisant ainsi la flamme de la vie.

La bioénergétique est l'étude quantitative des transductions énergétiques au sein des cellules vivantes, c'est-à-dire des conversions d'une forme d'énergie en une autre, en se focalisant sur les processus chimiques qui sous-tendent ces transformations. Ces conversions obéissent aux lois universelles de la thermodynamique, notamment le principe de conservation de l'énergie et l'augmentation de l'entropie [2].

Bien que les organismes vivants soient des systèmes hautement organisés, ils respectent la seconde loi de la thermodynamique en étant des systèmes ouverts qui échangent matière et énergie avec leur environnement. Ils parviennent ainsi à maintenir et à produire de l'ordre en leur sein sans violer les principes thermodynamiques.

Au cœur de ces processus vitaux se trouvent les mitochondries, souvent qualifiées de « centrales énergétiques » de la cellule. Ces organites jouent un rôle crucial en générant la majeure partie de l'énergie cellulaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) par le biais de la phosphorylation oxydative. Ce processus complexe implique une série de réactions d'oxydo-réduction (redox) au sein de la chaîne de transport des électrons, où les électrons sont transférés à travers diverses protéines intégrales de la membrane mitochondriale interne, conduisant à la synthèse d'ATP [3].

Structurellement, la mitochondrie est délimitée par deux membranes phospholipidiques distinctes : une membrane externe lisse et une membrane interne fortement invaginée, formant des replis appelés crêtes mitochondriales. Ces crêtes augmentent considérablement la surface de la membrane interne, permettant d'accueillir un grand nombre de complexes protéiques impliqués dans la respiration cellulaire. Entre les deux membranes se trouve l'espace intermembranaire, tandis que l'intérieur de la mitochondrie est rempli par la matrice mitochondriale, un compartiment riche en enzymes cruciales pour le métabolisme énergétique [4].

La chaîne de transport des électrons (CTE) mitochondriale, située au sein de la membrane interne, est composée des complexes protéiques I à IV. Ces complexes agissent en série pour faciliter le transfert séquentiel d'électrons provenant de molécules réduites telles que le NADH et le FADH_2 , produits lors du cycle de Krebs dans la matrice mitochondriale. Au fur et à mesure que les électrons sont transférés d'un complexe à l'autre, de l'énergie est libérée, ce qui permet aux complexes I, III et IV de pomper des protons (H^+) de la matrice vers l'espace intermembranaire [3].

Ce pompage de protons crée un gradient électrochimique à travers la membrane interne, connu sous le nom de force proton-motrice. Ce gradient est essentiel pour la synthèse d'ATP par l'ATP synthase (complexe V), une enzyme située également dans la membrane interne. L'ATP synthase utilise l'énergie potentielle stockée dans le gradient de protons pour phosphoryler l'ADP en ATP, la principale molécule énergétique de la cellule [3].

Ainsi, le couplage entre le flux d'électrons au sein de la CTE et le pompage de protons à travers la membrane interne illustre l'intégration harmonieuse entre la chimie des réactions d'oxydoréduction (redox) et la fonction biologique. Ce mécanisme permet une conversion efficace de l'énergie chimique, contenue initialement dans les nutriments, en énergie utilisable par la cellule pour mener à bien ses diverses activités métaboliques.

L'étude de ces processus bioénergétiques peut être approfondie grâce à l'électrochimie, qui offre des outils précieux pour analyser les réactions redox, le transfert d'électrons et le flux de protons impliqués. Cela permet une compréhension plus détaillée de la dynamique énergétique cellulaire et ouvre des perspectives pour le développement de technologies bioélectrochimiques innovantes.

L'électrochimie joue un rôle central dans l'étude des réactions d'oxydoréduction biologiques qui sont essentielles au métabolisme des organismes vivants. Elle permet d'explorer et de comprendre les transferts d'électrons entre molécules, processus fondamental dans des

systèmes tels que les enzymes, les membranes et les organites comme les mitochondries. En manipulant le potentiel électrique appliqué à une électrode, l'électrochimie offre un contrôle précis sur la forme chimique des analytes à la surface de l'électrode, facilitant ainsi l'analyse des réactions redox complexes.

Cinq concepts fondamentaux sont essentiels pour maîtriser l'électrochimie : le potentiel de l'électrode détermine l'état de l'analyte à sa surface ; la concentration de l'analyte peut différer entre la surface de l'électrode et la solution en vrac ; l'analyte peut participer à des réactions autres que l'oxydation ou la réduction ; le courant reflète la vitesse des réactions redox ; et le courant et le potentiel ne peuvent être contrôlés simultanément [5].

Les méthodes électrochimiques interfaciales, en particulier les techniques voltammétriques comme la voltampérométrie cyclique (VC) et la voltampérométrie à onde carrée (VOC), sont essentielles pour étudier les processus électrochimiques aux interfaces électrode-électrolyte. La VC est largement utilisée pour caractériser les réactions redox et diagnostiquer les mécanismes réactionnels, tandis que la VOC offre une sensibilité accrue pour la détection d'espèces à faibles concentrations, grâce à sa capacité à minimiser les effets de courant capacitif [6].

Le choix du matériau d'électrode est crucial pour optimiser les performances électrochimiques. Les matériaux à base de carbone, tels que le carbone vitreux, le carbone pyrolytique et les dérivés du graphène comme l'oxyde de graphène (GO), sont particulièrement adaptés en raison de leur excellente conductivité électrique, de leur large fenêtre électrochimique et de leur stabilité chimique. Le GO, en particulier, présente des propriétés uniques comme une grande surface spécifique, une hydrophilie remarquable et la présence de groupes fonctionnels oxygénés qui permettent une interaction spécifique avec diverses biomolécules [7].

Le GO a trouvé des applications prometteuses dans le domaine biomédical, notamment dans la délivrance de médicaments et de gènes [8], la régénération tissulaire [9], l'amélioration de la transmission synaptique [10] et le développement de biocapteurs [11]. Cependant, des préoccupations subsistent quant à sa toxicité et sa biocompatibilité, avec des résultats contradictoires selon les modèles biologiques étudiés [12–15]. Il est donc essentiel de caractériser adéquatement le GO et d'adapter ses propriétés à l'application spécifique envisagée, en tenant compte de facteurs tels que la densité des groupes fonctionnels oxygénés, la taille des feuillets et la fonctionnalisation du matériau.

En intégrant les avancées en électrochimie et en matériaux à base de GO, il est possible de développer de nouvelles plateformes pour l'étude des structures subcellulaires et des processus

bioénergétiques fondamentaux. Cette approche offre des perspectives significatives pour une meilleure compréhension des phénomènes biochimiques et pour le développement d'outils innovants permettant l'évaluation directe de la fonction cellulaire.

L'électrochimie joue un rôle crucial dans la compréhension des transferts d'électrons au sein des mitochondries. Ces organites, essentiels à la production d'énergie cellulaire, sont au cœur de réactions redox complexes impliquant des molécules clés telles que le cytochrome c (cyt c) et la coenzyme Q (CoQ). Au cours des deux dernières décennies, des avancées significatives ont été réalisées dans l'électrochimie mitochondriale, mettant en lumière le potentiel de ces organites en tant que bioélectrocatalyseurs.

Des études fondamentales ont démontré que des voltampérogrammes cycliques avec des pics redox distincts peuvent être obtenus à partir de mitochondries isolées et immobilisées sur des électrodes en graphite pyrolytique [16]. Ces signaux électrochimiques sont attribués à des espèces redox telles que le cytochrome c (cyt c), la coenzyme Q (CoQ) et le couple FAD/FADH₂, qui agissent comme des intermédiaires dans la chaîne de transport des électrons (CTE). Dans d'autres études, la CoQ a été identifiée comme un contributeur majeur aux signaux électrochimiques [17]. Par ailleurs, il a été mis en évidence que les méthodes d'isolement et de manipulation des mitochondries influencent fortement leurs propriétés électrochimiques [18].

Au-delà des études fondamentales, l'électrochimie mitochondriale a trouvé des applications pratiques. Les mitochondries ont été utilisées comme bioanodes dans des piles à biocarburant, exploitant leur capacité à oxyder complètement des substrats comme le pyruvate pour générer de l'énergie électrique [19–21]. De plus, la sensibilité de la CTE à divers inhibiteurs a été exploitée pour développer des biocapteurs électrochimiques capables de détecter des substances nocives, notamment des pesticides, des antibiotiques et des explosifs nitroaromatiques [22–25].

Étant donné l'importance cruciale des mitochondries dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et de la fonction énergétique, l'étude de leur fonction par des méthodes électrochimiques offre de grandes perspectives. Ces méthodes permettent non seulement de suivre en temps réel les processus redox au sein des mitochondries, mais aussi de développer de nouvelles technologies bioélectrochimiques pour le diagnostic, le suivi thérapeutique et la compréhension des pathologies liées aux dysfonctionnements mitochondriaux. Ainsi, la recherche dans ce domaine a le potentiel de faire progresser significativement notre compréhension de la bioénergétique cellulaire et de contribuer au développement d'applications médicales innovantes.

Ces avancées soulignent l'importance de l'électrochimie comme outil d'investigation des fonctions mitochondriales et ouvrent la voie à de nouvelles applications technologiques. Cependant, des défis subsistent pour améliorer la sensibilité, la spécificité et la stabilité des dispositifs basés sur les mitochondries. Une compréhension approfondie des mécanismes redox au sein des mitochondries est essentielle pour progresser dans le développement de biocapteurs fiables et de systèmes de conversion d'énergie bio-inspirés.

Pour relever ces défis et approfondir notre compréhension des mécanismes électrochimiques à l'échelle mitochondriale, il est nécessaire d'explorer des approches novatrices capables de fournir des informations précises sur des systèmes hautement confinés. À cet égard, les ultramicroélectrodes (UME) représentent une avancée prometteuse. Ces dispositifs, en raison de leur taille réduite et de leur capacité à sonder les phénomènes locaux avec une sensibilité accrue, constituent un outil idéal pour étudier les interactions redox complexes et les processus biologiques au sein des organites. Leur conception et caractérisation s'inscrivent ainsi comme une étape clé pour élargir le champ d'application de l'électrochimie aux environnements biologiques complexes et aux échelles nanométriques.

Les UME, avec des dimensions critiques inférieures à 25 μm , ont révolutionné la chimie électroanalytique depuis leur introduction dans les années 1980 [26]. Elles ont trouvé de nombreuses applications, notamment dans l'étude détaillée des réactions chimiques homogènes et hétérogènes [27], les expériences avec des nanoparticules uniques [28], l'exploration de petits environnements comme les cellules vivantes individuelles [29], l'imagerie électrochimique à haute résolution [30] et l'étude des réactions électrochimiques dans des solutions de haute résistance ou sur des échelles de temps très courtes [30,31].

Les caractéristiques uniques des UME—un taux élevé de transport de masse, de faibles effets capacitifs et résistifs, et de faibles constantes de temps [32–34]—confèrent une sensibilité et une précision accrues pour détecter et analyser les phénomènes électrochimiques. Ces propriétés permettent des réponses rapides aux changements des conditions expérimentales, réduisent les interférences et le bruit de fond dans les mesures, et facilitent la surveillance des courants à l'état stationnaire grâce à la diffusion radiale dominante vers la surface des UME.

Comme nous étudierons dans les sections suivantes, la réduction de la taille des électrodes dans les UME permet de surmonter les limitations imposées par la capacité de la double couche électrique et la résistance de la solution dans les expériences électrochimiques macroscopiques. De plus, les UME et les nanoélectrodes offrent la possibilité d'étudier des processus fondamentaux tels que la structure de la double couche, le transport de masse au sein de couches

de diffusion de dimensions comparables à celles de la double couche, les réactions de molécules sur des surfaces de taille similaire et même les effets quantiques associés aux petites nanoélectrodes [32,35].

Dans ce travail, l'utilisation d'électrodes coniques est explorée en raison de leurs avantages uniques pour certaines applications. Les électrodes coniques, avec leur forme effilée et leur apex très fin, permettent une résolution spatiale supérieure et sont particulièrement adaptées aux mesures électrochimiques dans des espaces localisés et confinés—essentiel pour des études *in situ* des structures internes des cellules vivantes où une perturbation minimale du système est requise. Bien que leur comportement électrochimique soit complexe, notamment en raison de la diffusion radiale des espèces vers l'apex et plane vers le reste de la surface, des simulations numériques permettent de décrire leur comportement voltammétrique [26].

Ainsi, l'exploration du comportement des UME vise à tirer parti de leurs propriétés pour étudier l'électrochimie des réactions hautement confinées se déroulant au niveau de la chaîne de transport des électrons des mitochondries dans des travaux futurs. Ces réactions, qui se produisent dans des environnements nanométriques complexes au sein des membranes mitochondriales, présentent des défis uniques que les UME peuvent aider à surmonter grâce à leur résolution spatiale et temporelle exceptionnelle.

L'objectif à long terme de ce travail est de développer une plateforme bioélectrochimique améliorée pour la caractérisation directe des mitochondries isolées provenant de cellules humaines dans des conditions physiologiques. Contrairement aux approches conventionnelles qui s'appuient souvent sur des mitochondries de levures ou sur des couches intermédiaires pour l'immobilisation, notre démarche se concentre sur l'étude des mitochondries humaines en meilleure santé, avec une attention particulière portée à la préservation de leur intégrité structurelle et fonctionnelle. Cette méthodologie est essentielle pour des applications diagnostiques, car elle permet une analyse plus représentative des mécanismes mitochondriaux humains.

Pour relever ce défi, nous avons aussi exploré divers matériaux d'électrodes à base de carbone, notamment le carbone vitreux, le graphite pyrolytique et l'oxyde de graphène obtenu par exfoliation électrochimique de graphite (EGO). Ces matériaux ont été testés en termes de leur capacité à supporter des mitochondries intactes et à générer des signaux électrochimiques fiables. L'effet des propriétés structurales et chimiques de l'EGO, en particulier le temps de sonication de ses suspensions, sur la réponse électrochimique mitochondriale a été examiné en détail à l'aide de techniques telles que la voltampérométrie cyclique, la voltampérométrie à onde

carrée et les essais métaboliques Seahorse. Des inhibiteurs spécifiques de la chaîne de transport des électrons (CTE) ont également été utilisés pour identifier les signaux électrochimiques associés aux différents composants de la CTE.

Par ailleurs, l'intégration d'ultramicroélectrodes (UME) et d'EGO fabriqués sur mesure a été envisagée comme une solution pour optimiser l'interface électrode-mitochondries. Ces efforts visent à améliorer la résolution et la spécificité des mesures électrochimiques, tout en ouvrant la voie à l'étude des réactions bioélectrochimiques confinées à l'échelle nanométrique.

En combinant ces approches, ce travail établit une base solide pour des applications bioélectrochimiques avancées, tout en offrant une meilleure compréhension des mécanismes redox mitochondriaux et de leurs implications dans les dysfonctionnements mitochondriaux.

Le lecteur est invité à parcourir les différentes sections de ce mémoire, qui détaillent les bases théoriques, les méthodologies expérimentales employées dans ce travail, ainsi que les résultats les plus importants.

Dans la deuxième partie de la thèse, une revue de littérature approfondie est présentée, couvrant les notions fondamentales de la bioénergétique et du métabolisme, avec un accent particulier sur les réactions biologiques d'oxydo-réduction et la fonction mitochondriale. Les principes de l'électrochimie et son application à l'étude des mitochondries sont ensuite explorés, avec un état de l'art en électrochimie mitochondriale mettant en lumière les avancées récentes dans le domaine. De plus, cette partie intègre une introduction détaillée sur l'électrochimie à l'échelle nanométrique, en particulier l'utilisation des ultramicroélectrodes (UME). L'intégration des UME dans ce travail est d'une importance capitale, car elles offrent des avantages significatifs pour l'étude de l'électrochimie mitochondriale.

Les objectifs de cette étude sont ensuite explicités dans le chapitre 3, avant d'aborder la méthodologie détaillée dans le chapitre 4, où sont décrites les techniques de culture cellulaire, de purification mitochondriale, ainsi que les méthodes de synthèse et de caractérisation de l'oxyde de graphène et les analyses électrochimiques.

La partie 5 présente les résultats et les discussions, incluant l'étude des signaux électrochimiques des mitochondries isolées, l'impact de l'ultrasonication de l'EGO sur la respiration mitochondriale, et l'analyse de l'interaction entre les organites et les électrodes. Une section dédiée à la caractérisation des UME à l'aide de modélisations numériques est également présentée.

Enfin, la conclusion synthétise les principaux résultats de l'étude et ouvre des perspectives pour des recherches futures dans le domaine de l'électrochimie des mitochondries. Ce travail, à la

croisée de la bioénergétique, de l'électrochimie et de la science des matériaux, apporte de nouvelles connaissances sur les mécanismes biologiques sous-jacents à la fonction mitochondriale et propose des outils novateurs pour l'analyse de ces processus à l'échelle moléculaire et cellulaire.

2 Notions de base et revue de littérature

2.1 Bioénergétique et métabolisme

Tous les êtres vivants doivent accomplir un certain travail pour maintenir leur survie, croître et se reproduire. Leur capacité à exploiter l'énergie et à l'orienter vers des activités biologiques est une caractéristique essentielle. Les organismes modernes effectuent une large gamme de transformations énergétiques, convertissant une forme d'énergie en une autre. Ils sont capables d'utiliser l'énergie chimique des combustibles pour synthétiser des macromolécules complexes à partir de composants plus simples. De plus, ils transforment cette énergie en gradients de concentration, en potentiels électriques, en mouvement, en chaleur, et parfois même en lumière chez certains.

Au XVIII^e siècle, le chimiste français Antoine Lavoisier a mis en évidence que les animaux transforment les combustibles chimiques, tels que la nourriture, en chaleur—un processus essentiel à la vie. En effet, la respiration est une combustion lente du carbone et de l'hydrogène, similaire à celle qui se produit dans une lampe ou une bougie allumée. Ainsi, les animaux respirants peuvent être comparés à des organismes en combustion, brûlant et se consumant comme une flamme de vie. Au cours du XX^e siècle, la chimie sous-jacente à ce "flambeau de la vie" a commencé à être dévoilée. Les transductions énergétiques biologiques obéissent aux mêmes lois physiques et chimiques que les autres processus naturels. Il est donc crucial de bien comprendre ces lois pour saisir le flux d'énergie au sein de la biosphère.

La bioénergétique est l'étude quantitative des transductions énergétiques, c'est-à-dire des conversions d'un type d'énergie en un autre, qui se déroulent au sein des cellules vivantes. Elle se penche également sur la nature et le rôle des processus chimiques à la base de ces conversions [2].

Au cours du XIX^e siècle plusieurs facteurs clés liés à l'observation des phénomènes naturels ont conduit vers la formulation de deux lois fondamentales de la thermodynamique. La première loi est le principe de conservation de l'énergie : pour n'importe quel changement physique ou chimique, l'énergie total dans l'univers reste constante ; l'énergie peut changer de forme ou se déplacer d'une région à une autre, mais elle ne peut pas être créée ni détruite. La deuxième loi, stipule que pour tout processus thermodynamique, l'entropie d'un système isolé ne peut qu'augmenter ou rester constante, mais ne diminue jamais : dans tous les processus naturels, l'entropie de l'univers augmente [36].

Les organismes vivants sont constitués d'ensembles de molécules bien plus organisées que les matériaux environnants à partir desquels ils sont formés, et les organismes maintiennent et produisent de l'ordre, semblant ainsi échapper à la deuxième loi de la thermodynamique. Cependant, les organismes vivants ne violent pas la deuxième loi ; ils fonctionnent strictement dans ses limites. Les cellules et les organismes sont des systèmes thermodynamiques ouverts qui échangent du matériel et de l'énergie avec leur environnement. Les systèmes vivants ne sont jamais en équilibre avec leur environnement, et les échanges constants entre le système et son environnement expliquent comment les organismes peuvent créer de l'ordre en eux-mêmes tout en respectant la deuxième loi de la thermodynamique [2].

En résumé, le flux d'énergie au sein des systèmes biologiques est régi par les lois universelles de la thermodynamique, soulignant l'équilibre entre l'ordre et le désordre dans les organismes vivants. Ces principes permettent aux cellules de maintenir des structures et des processus hautement organisés tout en interagissant de manière dynamique avec leur environnement. Au cœur de ces transductions énergétiques se trouvent des mécanismes moléculaires qui convertissent une forme d'énergie en une autre, soutenant ainsi des fonctions cellulaires essentielles. Un sous-ensemble clé de ces mécanismes implique les réactions redox, où le transfert d'électrons joue un rôle fondamental dans des voies métaboliques et bioénergétiques critiques. Cela nous amène à examiner de manière plus approfondie les réactions redox biologiques, en mettant en lumière leur rôle dans le flux énergétique, leur base chimique et leurs contributions essentielles à des processus tels que la respiration et la phosphorylation oxydative (OXPHOS) que nous allons étudier plus tard.

2.1.1 Réactions biologiques d'oxydo-réduction

Les transductions énergétiques biologiques, essentielles au fonctionnement des systèmes vivants, s'appuient sur des réactions chimiques spécifiques. La chimie cellulaire n'englobe pas toutes les réactions connues en chimie organique, mais plutôt un ensemble restreint, adapté aux besoins métaboliques des organismes vivants. Les réactions biologiques pertinentes répondent à deux critères majeurs : leur pertinence métabolique et leur rapidité [2]. Une réaction pertinente utilise un substrat disponible pour produire un produit utile. Cependant, même une réaction prometteuse peut être exclue si sa cinétique est trop lente, c'est-à-dire si son énergie d'activation est trop élevée, même en présence de catalyseurs enzymatiques.

Les voies métaboliques que nous observons aujourd'hui ont été façonnées par l'évolution pour contourner ces barrières. Les réactions qui surviennent dans les cellules constituent une « boîte à outils » que l'évolution a exploitée pour créer des processus biochimiques fonctionnels, tout en évitant les transformations chimiquement improbables. Cette sélection de réactions plausibles joue un rôle central dans le flux énergétique cellulaire, comme dans l'extraction d'énergie à partir de combustibles par oxydation ou la biosynthèse de macromolécules complexes.

La chimie de la vie suit des schémas distincts, ce qui rend inutile de mémoriser chaque réaction individuelle pour comprendre la logique moléculaire qui sous-tend la biochimie. La plupart des réactions cellulaires peuvent être regroupées en cinq grandes catégories : (1) la formation ou la rupture des liaisons carbone-carbone, (2) les réarrangements internes, isomérisations et éliminations, (3) les réactions impliquant des radicaux libres, (4) les transferts de groupes fonctionnels, et (5) les réactions d'oxydoréduction [2].

L'étude des réactions d'oxydoréduction (redox) biologiques, où le transfert d'électrons est central, constitue une clé pour comprendre ces transformations métaboliques. Elles interviennent dans des processus fondamentaux tels que la respiration cellulaire et la phosphorylation oxydative, nous offrant une perspective sur l'optimisation énergétique qui soutient la vie.

Dans les systèmes biologiques, les atomes de carbone peuvent exister dans cinq états d'oxydation distincts, déterminés par les éléments avec lesquels ils partagent leurs électrons (**Figure 1**). Les transitions entre ces états sont fondamentales pour les processus métaboliques, car elles sous-tendent les réactions d'oxydoréduction essentielles à la transduction de l'énergie et à la biosynthèse [37]. Un type courant d'oxydation biologique implique la perte de deux électrons et de deux ions hydrogène—essentiellement le retrait de deux atomes d'hydrogène.

Ces réactions, souvent appelées déshydrogénations, sont catalysées par une classe d'enzymes connue sous le nom de déshydrogénases [38].

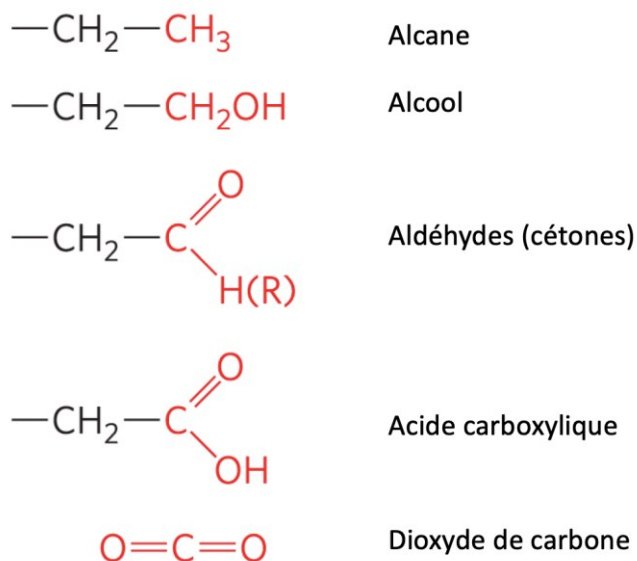


Figure 1. Niveaux d'oxydation du carbone dans les biomolécules.

Chaque composé est formé par l'oxydation de l'atome de carbone indiqué en rouge dans le composé précédent. Le dioxyde de carbone représente la forme la plus oxydée de carbone présente dans les systèmes biologiques. Adapté avec permission de [2].

Dans certains cas, les oxydations biologiques aboutissent à la formation d'une liaison covalente entre un atome de carbone et un atome d'oxygène. Les enzymes qui facilitent de telles oxydations, où l'oxygène agit comme accepteur d'électrons, sont généralement appelées oxydases [39]. Lorsque l'atome d'oxygène incorporé dans le produit provient directement de l'oxygène moléculaire (O_2), les enzymes responsables sont appelées oxygénases. Ces processus illustrent les mécanismes complexes par lesquels les systèmes biologiques gèrent le flux d'électrons pour maintenir la vie.

Les réactions d'oxydation doivent toujours être associées à des réactions de réduction, où les électrons retirés lors de l'oxydation sont acceptés par une autre molécule. Ces réactions libèrent de l'énergie, que les cellules utilisent pour accomplir leur travail en oxydant des combustibles métaboliques tels que les glucides et les lipides. Dans les voies cataboliques, les électrons des molécules d'hydrocarbures sont transférés via des transporteurs jusqu'à l'oxygène, un processus fortement exergonique qui alimente la synthèse d'Adénosine triphosphate (ATP, la monnaie énergétique des organismes), le principal objectif du catabolisme [2].

L'intrication des réactions d'oxydation et de réduction est au cœur du métabolisme énergétique cellulaire, avec les mitochondries comme centre névralgique de ces processus. Ces organites sont spécialement conçus pour gérer les voies biochimiques complexes qui alimentent la production d'énergie, notamment le cycle de l'acide citrique et la chaîne de transport des électrons. En couplant efficacement le transfert d'électrons à la synthèse d'ATP, les mitochondries illustrent l'intégration harmonieuse entre la chimie redox et la fonction biologique. Pour comprendre pleinement l'importance de ces processus, il est essentiel d'explorer la structure, la fonction et la dynamique des mitochondries, qui non seulement agissent comme centrales énergétiques de la cellule, mais jouent également un rôle clé dans la signalisation, la régulation métabolique et la mort cellulaire.

2.1.2 La mitochondrie

La mitochondrie est l'un des organites les plus étudiés en raison de son rôle central dans la fonction cellulaire ainsi que son impact profond sur la santé humaine et les maladies [40,41]. Souvent qualifiées de « centrales énergétiques de la cellule » en raison de leur rôle essentiel dans la production d'énergie, les mitochondries remplissent toutefois de nombreuses autres fonctions. Elles interviennent dans une variété de processus cellulaires cruciaux, notamment la régulation métabolique, l'homéostasie du calcium, l'apoptose et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), autant d'éléments essentiels pour maintenir l'homéostasie cellulaire et répondre au stress [41].

L'importance des mitochondries s'étend également à leur implication dans diverses maladies, notamment les troubles neurodégénératifs, les syndromes métaboliques et les cancers. Leur rôle central dans la production d'énergie et les processus de signalisation en fait un sujet clé pour comprendre et traiter les dysfonctionnements cellulaires [4,40,41]. En étudiant la structure et les fonctions mitochondriales, les chercheurs continuent de révéler des mécanismes moléculaires fondamentaux pour la santé et la maladie.

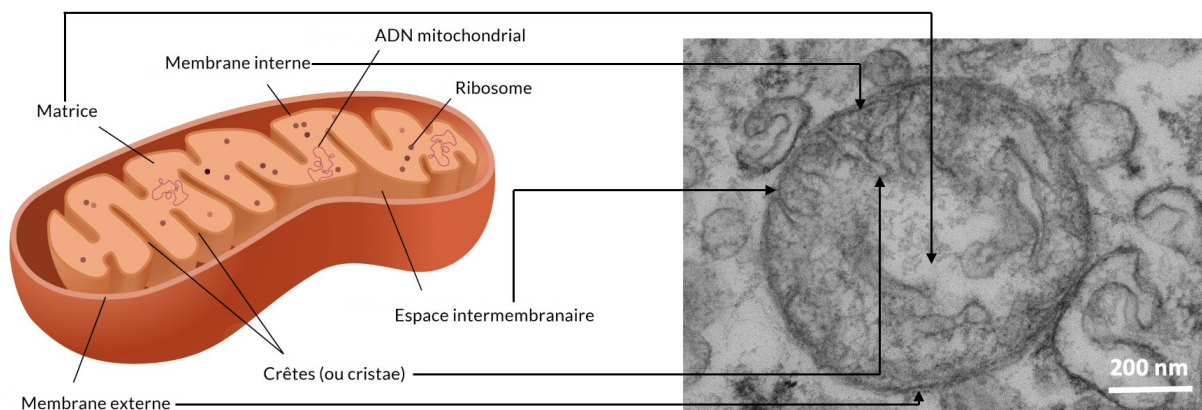


Figure 2. Structure de la mitochondrie.

Représentation schématique de la structure mitochondriale à gauche et image d'une mitochondrie capturée par microscopie électronique à transmission à droite. Les différentes structures de la mitochondrie sont indiquées par des flèches noires.

Sur le plan structural, comme montré dans la **Figure 2**, les mitochondries présentent une architecture hautement organisée, adaptée à leurs multiples rôles. Elles se composent de deux membranes distinctes : une membrane mitochondriale externe (MME) et une membrane mitochondriale interne (MMI), qui définissent deux compartiments séparés — l'espace

intermembranaire et la matrice [4]. La MME, perméable, agit comme une frontière entre la mitochondrie et le cytoplasme, facilitant le transport de petites molécules et abritant des protéines impliquées dans les signaux et la dynamique membranaire. À l'inverse, la MMI est hautement spécialisée, hébergeant la chaîne de transport d'électrons (CTE) et l'ATP synthase, essentiels à la phosphorylation oxydative qui sera discuté sous peu. Les replis de la MMI, appelés crêtes, augmentent considérablement sa surface, optimisant ainsi sa capacité à produire de l'ATP [41]. La matrice mitochondriale, enfermée par la membrane interne, constitue le centre névralgique de plusieurs processus métaboliques essentiels. Elle abrite le complexe pyruvate déshydrogénase, les enzymes du cycle de l'acide citrique, la voie de la β -oxydation des acides gras, ainsi que les enzymes impliquées dans l'oxydation des acides aminés. Ensemble, ces voies représentent les principaux mécanismes d'oxydation des substrats énergétiques, à l'exception de la glycolyse, qui se déroule dans le cytosol. La membrane interne des mitochondries, hautement sélective dans sa perméabilité, sépare les intermédiaires et les enzymes cytosoliques des processus métaboliques qui ont lieu dans la matrice. Malgré cette séparation, des systèmes de transport spécialisés permettent l'importation de substrats essentiels tels que le pyruvate, les acides gras et les acides aminés (ou leurs dérivés α -céto) dans la matrice, où ils alimentent le cycle de l'acide citrique. De plus, des transporteurs assurent l'échange de l'ADP et du phosphate inorganique (P_i) vers la matrice, tandis que l'ATP nouvellement synthétisé est exporté vers le cytosol [2]. De manière remarquable, les mitochondries des mammifères contiennent environ 1 200 protéines distinctes, chacune contribuant à la diversité fonctionnelle de l'organite. Cependant, les rôles d'environ 25 % de ces protéines restent partiellement ou totalement inconnus, soulignant la nécessité de poursuivre les recherches sur la biologie mitochondriale [42].

2.1.2.1 La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative (OXPHOS) représente l'étape finale de la production d'énergie chez les organismes aérobies, constituant le point de convergence ultime pour la dégradation oxydative des glucides, des lipides et des acides aminés. Ce processus est essentiel à la respiration cellulaire, car il exploite l'énergie libérée par les réactions d'oxydation pour produire de l'ATP. Chez les organismes non photosynthétiques, la phosphorylation oxydative est la principale source d'ATP dans des conditions normales. Chez les eucaryotes, ce processus vital se déroule dans les mitochondries et implique de grands complexes protéiques intégrés aux membranes mitochondriales. Les mécanismes responsables de la synthèse d'ATP dans les

mitochondries ont captivé et défié les biochimistes, restant un sujet de recherche majeur tout au long du XX^e siècle.

L'O₂PHOS a lieu à la membrane mitochondriale interne grâce à un groupe de complexes protéiques multi-domaines connus sous le nom de chaîne de transport d'électrons (CTE) et à l'ATP synthase [3]. La chaîne respiratoire mitochondriale est constituée d'une série de transporteurs d'électrons fonctionnant de manière séquentielle. La plupart de ces transporteurs sont des protéines intégrales de membrane dotées de groupes prosthétiques capables de transférer un ou deux électrons [2]. Comme illustré dans la **Figure 3** la CTE (complexes I-IV) oxyde l'hydrogène des glucides, des protéines et des graisses avec l'oxygène pour générer de l'eau. Au fur et à mesure que les électrons traversent les complexes I, III et IV, un gradient électrochimique induit par les protons se forme entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire. Ce gradient, également appelé force proton-motrice, est la source d'énergie potentielle pour la synthèse de l'ATP à l'ATP-synthase [43]. La majorité des électrons qui rentrent dans la CTE proviennent de l'activité des déshydrogénases, qui recueillent les électrons issus des voies cataboliques et les dirigent vers des accepteurs d'électrons universels : les nucléotides de nicotinamide (NAD^+ ou NADP^+) ou les nucléotides flaviniques (FMN ou FAD) [2].

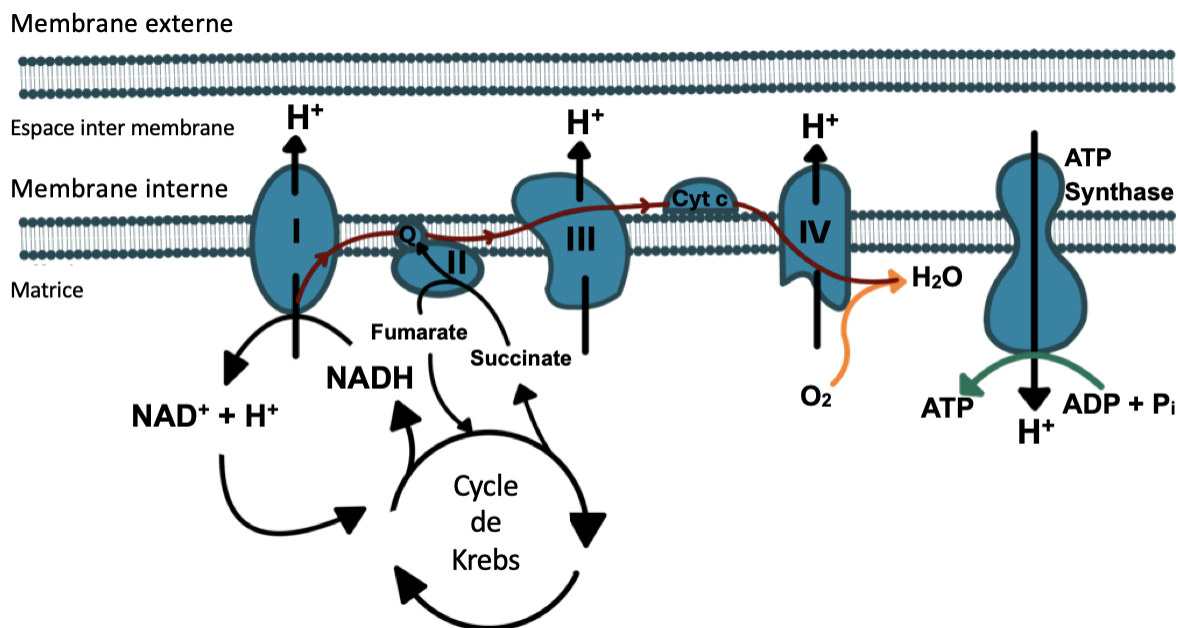


Figure 3. La chaîne de transport d'électrons mitochondriale.

Représentation de l'O₂PHOS dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. Les flèches rouges représentent le chemin des électrons dans la chaîne, la flèche orange représente la réduction d'oxygène au complexe IV, et la flèche verte représente la synthèse d'ATP pour finir le processus O₂PHOS.

Trois types de transferts d'électrons se produisent lors de la phosphorylation oxydative : (1) le transfert direct d'électrons, comme lors de la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} ; (2) le transfert sous forme de proton ($\text{H}^+ + \text{e}^-$) ; et (3) le transfert sous forme d'ion hydrure ($:\text{H}^-$), portant deux électrons [2]. Ces réactions de transfert d'électrons sont réalisées par les différents complexes protéiques de la chaîne de transport des électrons [2,3]. Parmi les acteurs clés de cette chaîne, on retrouve également des molécules spécialisées comme l'ubiquinone (coenzyme Q) et le cytochrome c (cyt c), qui jouent des rôles essentiels dans la transmission des électrons entre les complexes enzymatiques.

- **Ubiquinone (coenzyme Q).**

L'ubiquinone, également connue sous le nom de coenzyme Q ou simplement **Q**, est une benzoquinone liposoluble dotée d'une longue chaîne latérale isoprénoïde (**Figure 4**). Elle peut accepter un électron pour former le radical semi-quinone ($^*\text{QH}$, également appelé ubisémiquinone) ou deux électrons pour générer l'ubiquinol (QH_2). À l'instar des flavoprotéines, l'ubiquinone agit comme un pont entre les donneurs d'électrons à deux électrons et les accepteurs d'électrons à un électron [44].

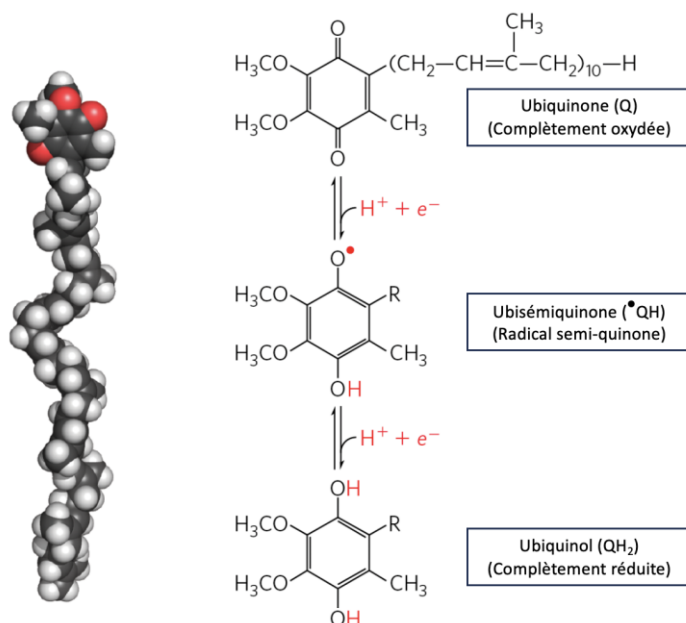


Figure 4. Ubiquinone (Coenzyme Q)

La réduction complète de l'ubiquinone nécessite deux électrons et deux protons, et s'effectue en deux étapes, en passant par l'intermédiaire du radical semi-quinone. Adaptée avec permission de [2].

Grâce à sa petite taille et à sa nature hydrophobe, l'ubiquinone n'est pas liée à des protéines spécifiques mais diffuse librement dans la partie hydrophobe de la bicouche lipidique de la membrane mitochondriale interne. Cette mobilité lui permet de transférer des équivalents réducteurs (électrons) entre les transporteurs d'électrons fixes présents dans la membrane. De plus, la capacité de l'ubiquinone à transporter à la fois des électrons et des protons en fait un acteur clé pour relier le transport des électrons à la translocation des protons, essentielle à la production d'énergie au cours de la phosphorylation oxydative [2,3].

- **Cytochromes.**

Les cytochromes sont des protéines dotées d'une forte capacité d'absorption de la lumière visible, une propriété attribuée à leurs groupes prosthétiques d'hème contenant du fer. On distingue trois classes principales de cytochromes dans les mitochondries : a, b et c, différenciées par leurs spectres d'absorption lumineux spécifiques. À l'état réduit (Fe^{2+}), ces cytochromes présentent trois pics d'absorption dans le spectre visible. Le pic le plus intense est située autour de 600 nm pour les cytochromes de type a [45], environ 560 nm pour ceux de type b [46], et près de 550 nm pour les cytochromes de type c [47]. Pour distinguer des cytochromes similaires au sein d'un même type, on utilise parfois leur longueur d'onde d'absorption maximale, comme dans le cas du cytochrome b562.

Les hèmes des cytochromes de type a et b sont solidement liés, mais de manière non covalente, aux protéines qui les accompagnent. En revanche, les hèmes des cytochromes de type c sont attachés de façon covalente à travers des résidus de cystéine (**Figure 5**). Le potentiel de réduction standard de l'atome de fer dans l'hème des cytochromes dépend des interactions spécifiques avec les chaînes latérales de la protéine, entraînant une variation de ce potentiel d'un cytochrome à l'autre [48].

Les cytochromes des types a et b, ainsi que certains de type c, sont des protéines intégrales de la membrane interne des mitochondries. Cependant, une exception notable est le cyt c, une protéine soluble qui interagit par des forces électrostatiques avec la surface externe de la membrane interne [2,49].

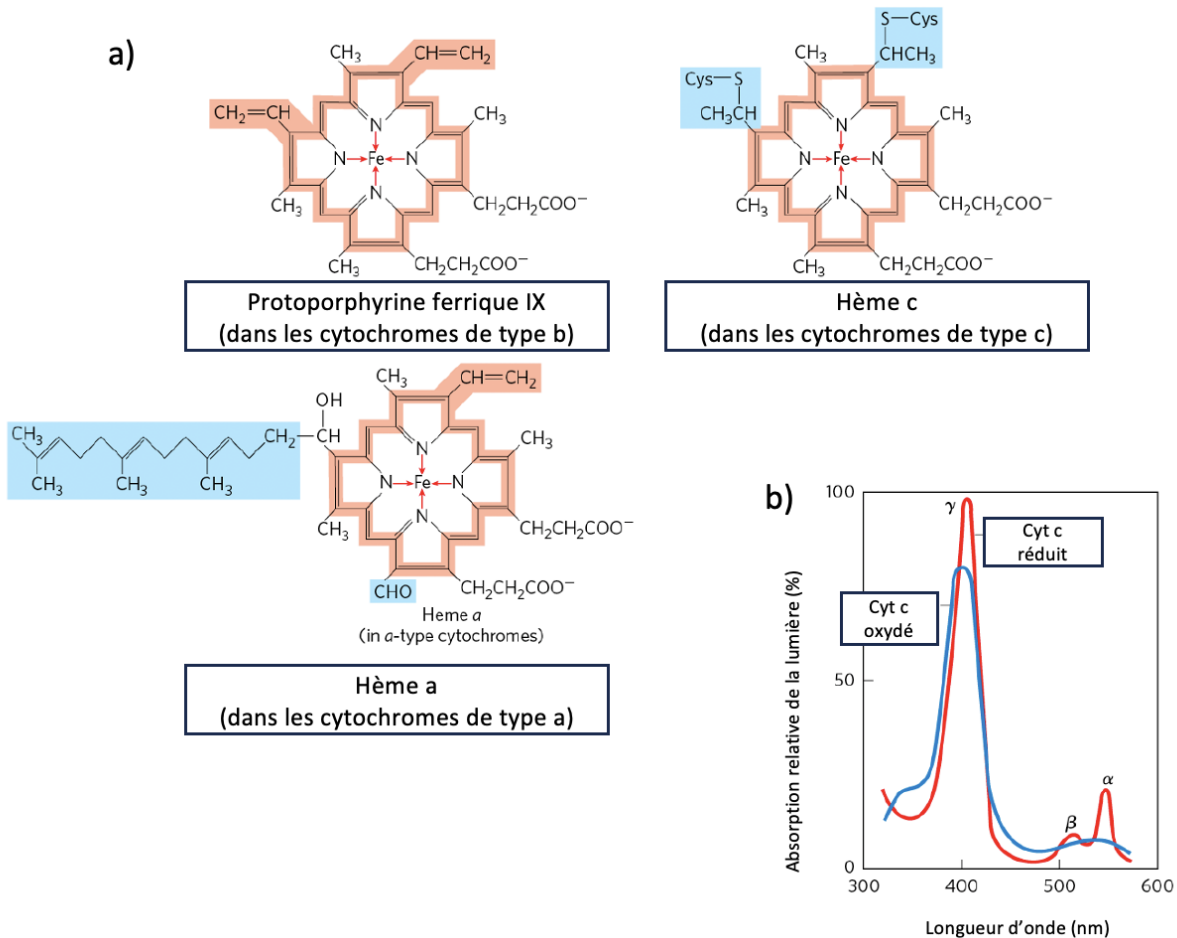


Figure 5. Groupes prosthétiques des cytochromes.

(a) Chaque groupe est composé de quatre anneaux à cinq membres contenant de l'azote, disposés en une structure cyclique appelée porphyrine. Les atomes d'azote coordonnent un ion fer central, qui peut être soit Fe^{2+} , soit Fe^{3+} . La protoporphyrine IX contenant du fer est une caractéristique des cytochromes de type b ainsi que de l'hémoglobine et de la myoglobine. Dans le cytochrome c, l'hème c est lié de manière covalente à la protéine via des liaisons thioéther formées avec deux résidus de cystéine. L'hème a, spécifique aux cytochromes de type a, possède une longue chaîne isoprénoïde attachée à l'un des anneaux. Le système de doubles liaisons conjuguées de l'anneau porphyrine (surligné en rouge clair) contient des électrons π délocalisés qui peuvent être facilement excités par des photons de lumière visible, ce qui explique la forte absorption de lumière par les hèmes et les composés similaires. (b) Les spectres d'absorption du cytochrome c (cyt c) présentent des caractéristiques distinctes selon qu'il est à l'état oxydé (bleu) ou réduit (rouge). La forme réduite affiche des pics α , β et γ bien marqués, qui sont clairement identifiés dans les spectres. Figure adaptée avec la permission de [2].

Nous allons maintenant explorer chaque complexe de la chaîne de transport des électrons (ETC), en examinant leur architecture moléculaire, les caractéristiques de leurs sites actifs et les réactions chimiques qu'ils catalysent. Cette approche structurale et mécanistique mettra en lumière la manière dont ces complexes protéiques collaborent pour assurer la production d'énergie cellulaire.

○ **Complexe 1 : NADH à Ubiquinone.**

Le Complexe I, également appelé NADH: ubiquinone oxydoréductase ou NADH déshydrogénase, est une grande enzyme multi-sous-unité essentielle à la CTE. Chez les mammifères, il est composé de 45 polypeptides, dont une flavoprotéine contenant du mononucléotide flavine (FMN) et au moins huit centres fer-soufre (Fe-S). Structuré en forme de L, le Complexe I comporte un bras intégré dans la membrane interne mitochondriale et un autre s'étendant dans la matrice (**Figure 6**). Sept sous-unités conservées dans chacun des bras sont indispensables à son activité [50,51].

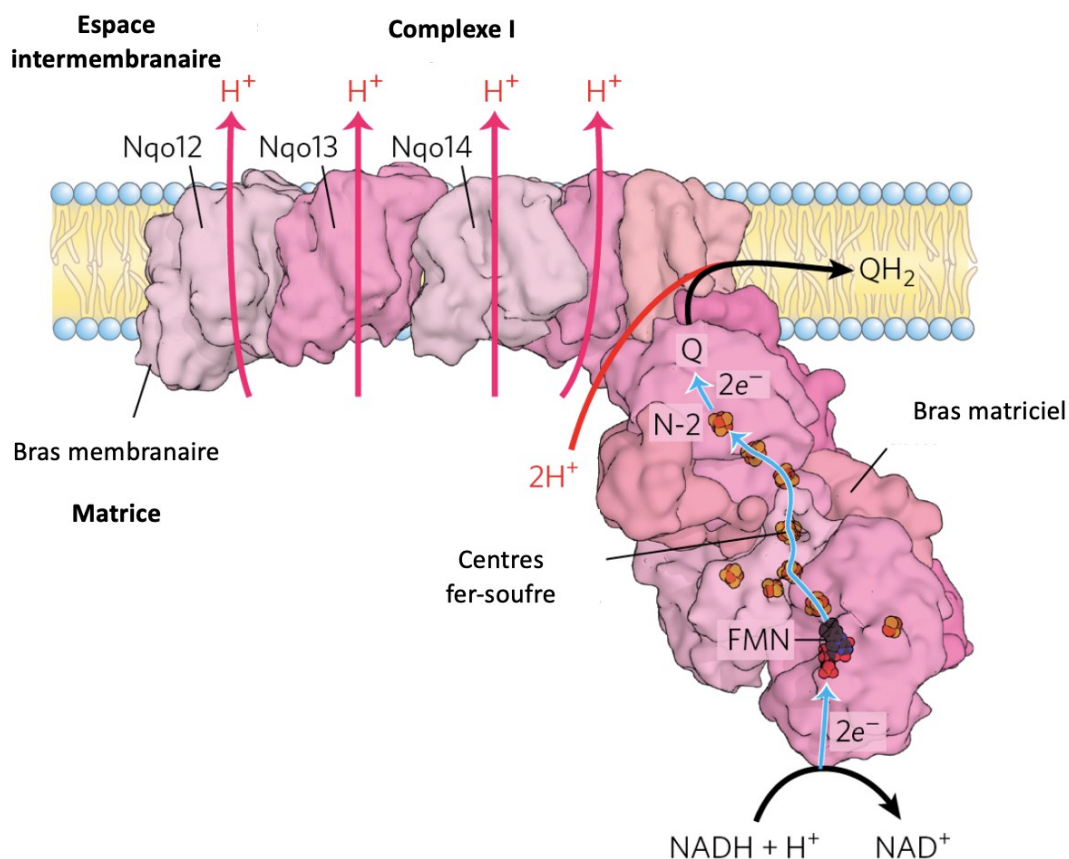
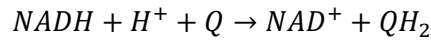


Figure 6. Complexe I : NADH à Ubiquinone.

Le complexe I transfère un ion hydruure du NADH au FMN, les électrons traversant les centres Fe-S jusqu'à N-2 dans le bras matriciel, pour finalement réduire l'ubiquinone en QH₂ dans le bras membranaire. La translocation des protons, déclenchée par des changements conformationnels induits par le flux d'électrons, génère un gradient électrochimique à travers la membrane mitochondriale interne. Trois sous-unités membranaires (Nqo12, Nqo13, Nqo14) ressemblent à des antiporteurs Na⁺-H⁺, suggérant un mécanisme similaire pour le déplacement des protons, tandis qu'un quatrième cheminement de protons se situe près du site de liaison de la Q. Figure adaptée avec permission de [2].

Le Complexe I couple deux processus fondamentaux :

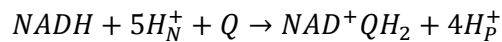
1. *Transfert d'électrons vers l'ubiquinone (Q) :*



Cette réaction exergonique implique le transfert de deux électrons et un proton de NADH ainsi qu'un proton depuis la matrice pour réduire l'ubiquinone en ubiquinol (QH_2).

2. *Pompage de protons à travers la membrane :*

Simultanément, le Complexe I transfère quatre protons depuis la matrice mitochondriale (côté négatif, N) vers l'espace intermembranaire (côté positif, P) :



Ce processus est vectoriel, créant un gradient électrochimique essentiel pour la synthèse d'ATP. Le pompage de protons est couplé indirectement à la réduction de l'ubiquinone. Bien que la réduction de Q ait lieu loin des sous-unités responsables du pompage de protons, elle induit des changements conformationnels à longue distance dans le bras transmembranaire. Ces changements coordonnent le déplacement simultané des quatre protons, permettant une utilisation efficace de l'énergie issue de la réduction de Q en petites unités exploitables [2,50].

Trois sous-unités membranaires, structurellement similaires à des antiporteurs $Na^+ - H^+$, semblent responsables du pompage de trois protons, tandis qu'une quatrième sous-unité proche du site de liaison de Q pompe le quatrième proton [2].

Plusieurs molécules inhibent le flux d'électrons entre les centres Fe-S et Q, bloquant ainsi la phosphorylation oxydative. Parmi elles : Amytal (un barbiturique), Roténone (un insecticide d'origine végétale) et Piéridine A (un antibiotique). Ces inhibiteurs interrompent les fonctions de transfert d'électrons et de pompage de protons du Complexe I, stoppant ainsi la production d'énergie [52].

Le couplage entre la réduction de Q et le pompage de protons illustre les stratégies efficaces de conversion énergétique des organismes vivants. En décomposant l'énergie exergonique issue de la réduction de Q en plus petites unités, le Complexe I garantit une utilisation précise et contrôlée de l'énergie.

○ Complexe II : Succinate à Ubiquinone.

Le complexe II, ou succinate déshydrogénase, est la seule enzyme du cycle de l'acide citrique intégrée dans la membrane interne mitochondriale. Il catalyse l'oxydation du succinate en fumarate, couplée à la réduction de l'ubiquinone (Q) en ubiquinol (QH₂), malgré la séparation totale de 40 Å entre les sites de transfert d'électrons [53].

Le complexe II est composé de quatre sous-unités protéiques (**Figure 7**):

- Sous-unités A et B : Sous-unités orientées vers la matrice qui abritent le site de liaison pour le succinate, le FAD et trois centres 2Fe-2S pour le transfert d'électrons.
- Sous-unités C et D : Protéines intégrales de la membrane avec trois hélices transmembranaires chacune. Elles contiennent l'hème b et un site de liaison pour l'ubiquinone (Q), qui agit comme l'accepteur final d'électrons.

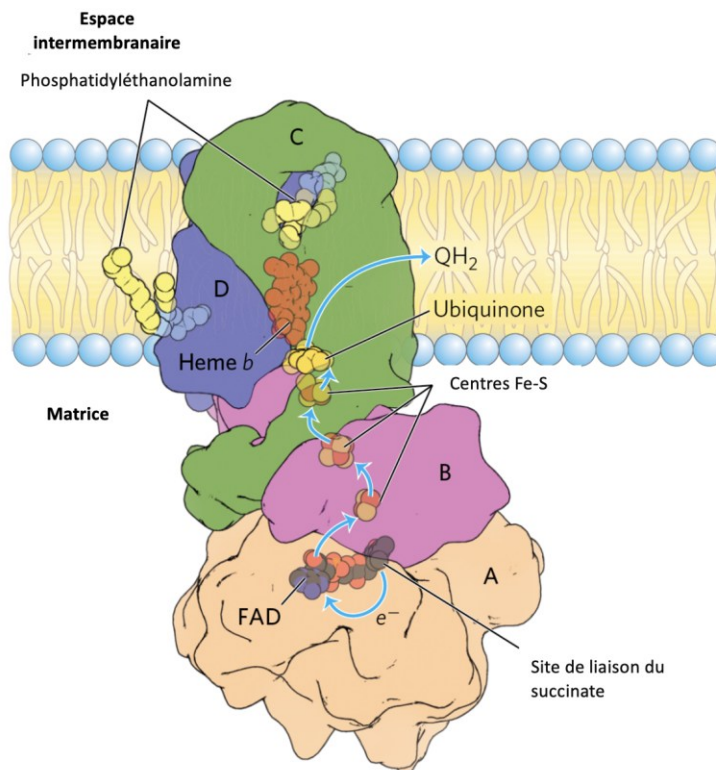


Figure 7. Complexe II : Succinate à Ubiquinone.

Ce complexe comprend deux sous-unités transmembranaires (C et D) et deux dans la matrice (A et B). Le site de liaison du succinate se trouve près du FAD dans la sous-unité A, tandis que les électrons transitent du succinate au FAD, puis via trois centres Fe-S (sous-unité B) jusqu'à l'ubiquinone. L'hème b, situé entre les sous-unités C et D, protège contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Deux phosphatidyléthanolamines sont étroitement liées à la sous-unité D. Figure adaptée avec permission de [2].

Le cheminement des électrons commence au site de liaison du succinate, passe par le FAD, et se propage à travers les centres Fe-S avant d'atteindre le site de liaison de l'ubiquinone. Bien que le transfert global d'électrons couvre une distance considérable, chaque étape individuelle reste inférieure à 11 Å, facilitant un transfert rapide [2].

Contrairement au complexe I, le complexe II ne contribue pas directement au pompage de protons à travers la membrane. Cependant, le QH₂ généré par le complexe II alimente le complexe III, qui, lui, entraîne la translocation des protons. L'activité du complexe II établit un lien entre le cycle de l'acide citrique et le transfert d'électrons mitochondrial, son fonctionnement dépendant de la disponibilité de la forme oxydée de l'ubiquinone (Q) [2,53].

L'hème b du complexe II ne participe pas directement au transfert d'électrons, mais joue un rôle clé en limitant les fuites d'électrons vers l'oxygène moléculaire. Cela permet de réduire la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que le peroxyde d'hydrogène et le radical superoxyde [53].

Des mutations dans les sous-unités du complexe II peuvent entraîner une production accrue de ROS, provoquant des dommages à l'ADN et une instabilité génomique, associées à des maladies telles que le paragangliome héréditaire (tumeurs bénignes de la tête et du cou). Des mutations près du site de liaison du succinate sont également liées à des altérations dégénératives du système nerveux central et à des tumeurs de la médullosurrénale [54].

- **Complexe III : Ubiquinone à Cytochrome C.**

Le complexe III, également appelé complexe cytochrome bc1 ou ubiquinone : cytochrome c oxydoréductase, transfère les électrons de l'ubiquinol (QH_2) au cytochrome c tout en pompant des protons à travers la membrane mitochondriale interne. Il fonctionne sous forme de dimère, chaque monomère étant constitué de trois protéines clés : le cytochrome b, le cytochrome c1 et la protéine Rieske à fer-soufre. Les monomères de cytochrome b forment une cavité centrale dans laquelle l'ubiquinone se déplace entre deux sites de liaison : Q_N du côté de la matrice et Q_P du côté de l'espace intermembranaire, facilitant ainsi le transfert d'électrons et de protons (**Figure 8**) [2,55].

La fonction de l'ubiquinone dans la conservation de l'énergie est expliquée par le cycle Q, qui décrit un mécanisme complexe de transfert d'électrons et de protons à travers le complexe III. Dans ce cycle, un QH_2 (ubiquinol) est d'abord oxydé au site actif Q_P situé sur une des deux sous-unités de Complexe III. L'oxydation de QH_2 entraîne la libération de deux protons (H^+) dans l'espace intermembranaire. Les électrons issus de cette oxydation sont séparés : un électron est transféré au cytochrome c, et l'autre est transféré au site actif Q_N de l'autre monomère du complexe, où il participe à la réduction d'une ubiquinone (Q) en QH_2 [2,55].

Ce processus implique plusieurs étapes complémentaires : d'abord, l'oxydation de deux molécules de QH_2 au site Q_P , libérant ainsi quatre protons (H^+) dans l'espace intermembranaire et réduisant deux molécules de cytochrome c (celles-ci servant de transporteurs d'électrons vers le complexe IV). Simultanément, au site Q_N , l'oxydation du QH_2 fournit deux électrons qui permettent la réduction de l'ubiquinone en ubiquinol, en utilisant deux protons de la matrice [2,55].

L'effet net du cycle Q est donc la conversion de l'ubiquinol (QH_2) en ubiquinone (Q), la réduction de deux molécules de cytochrome c, et la création d'un gradient de protons à travers la membrane interne mitochondriale. Ce gradient est essentiel pour la production d'ATP, car il génère un potentiel électrochimique qui est utilisé par ATP synthase pour la synthèse d'ATP. En résumé, le cycle Q assure non seulement le transfert d'électrons à travers le complexe III, mais aussi le pompage de protons, contribuant à l'établissement du gradient électrochimique nécessaire à la production d'énergie cellulaire.

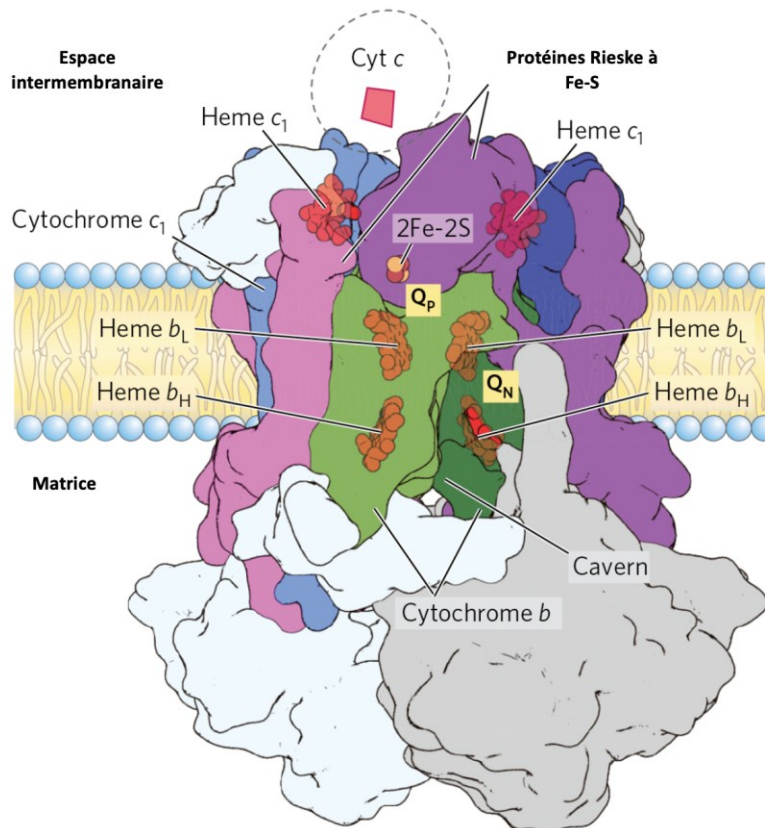


Figure 8. Complexe III : Ubiquinone à Cyt c.

Le complexe III bovin est un dimère de monomères identiques, chacun avec 11 sous-unités. Le noyau fonctionnel se compose de cytochrome b (vert), de la protéine fer-soufre Rieske (violet) et de cytochrome c1 (bleu), avec leurs hèmes et centres fer-soufre respectifs. Il possède deux sites de liaison pour l'ubiquinone, QN et QP, situés sur des côtés opposés de la membrane. L'antimycine A inhibe le flux d'électrons en se liant au site QN, tandis que la myxothiazol se lie au site QP. La structure dimérique forme des cavernes qui abritent les sites de liaison de l'ubiquinone, permettant aux intermédiaires de l'ubiquinone de se déplacer entre eux. Figure adaptée avec permission de [2].

○ **Complexe IV : Cytochrome C à O₂.**

Le complexe IV, également connu sous le nom de cytochrome oxydase, est la dernière enzyme de la chaîne de transport des électrons. Il transfère des électrons du cytochrome c à l'oxygène moléculaire, le réduisant en eau. Le complexe IV est une grande enzyme dimérique composée de 13 sous-unités par monomère, avec un poids moléculaire de 204 000 Dalton. Il contient deux ions cuivre (Cu_A) dans la sous-unité II et deux groupes hèmes (a et a₃) ainsi qu'un ion cuivre (Cu_B) dans la sous-unité I, formant un centre binucléaire qui facilite le transfert des électrons du cytochrome c à l'O₂ (**Figure 9**). Ce processus est couplé au pompage de protons, transférant quatre protons de la matrice vers l'espace intermembranaire pour chaque ensemble de quatre électrons transférés [56]. Cette enzyme contribue également au gradient électrochimique, favorisant la production d'énergie de la cellule. Une petite fraction des intermédiaires de la réduction de l'oxygène peut s'échapper, formant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui peuvent endommager les composants cellulaires [2].

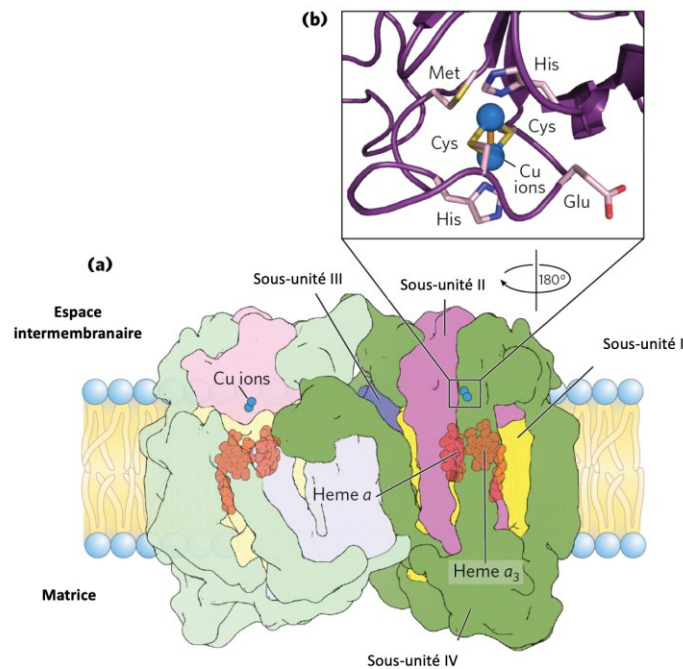


Figure 9. Complexe IV : Cyt c à O₂.

(a) Le complexe IV bovin est un dimère avec 13 sous-unités par monomère. La sous-unité I contient deux hèmes (a et a₃) et un ion cuivre (Cu_B), formant un centre binucléaire Fe-Cu. La sous-unité II possède un centre binucléaire Cu_A avec deux ions cuivre complexés avec des résidus Cys, situé du côté P. La sous-unité III est essentielle pour le mouvement des protons à travers la sous-unité II. Le rôle des autres sous-unités n'est pas entièrement compris. (b) Le centre binucléaire Cu_A contient deux ions cuivre (sphères bleues) partageant des électrons. Les ions sont Cu¹⁺Cu¹⁺ lorsqu'ils sont réduits et Cu^{1.5+}Cu^{1.5+} lorsqu'ils sont oxydés. Figure adaptée avec permission de [2].

La **Figure 10** montre le chemin suivi par les électrons dans le complexe IV. Le transfert d'électrons commence lorsque le Cyt c donne des électrons au centre binucléaire Cu_A de la sous-unité II. Les électrons passent ensuite à travers le groupe hème a jusqu'au centre Fe-Cu (hème a_3 et Cu_B) de la sous-unité I. L'oxygène se lie à l'hème a_3 et est initialement réduit en son dérivé peroxyde. Un total de quatre électrons, deux provenant du Cyt c et deux du centre Fe-Cu, réduisent l'intermédiaire peroxyde pour former deux molécules d'eau. En même temps, quatre protons sont consommés depuis la matrice pour former de l'eau, et quatre protons sont pompés dans l'espace intermembranaire, contribuant au gradient électrochimique.

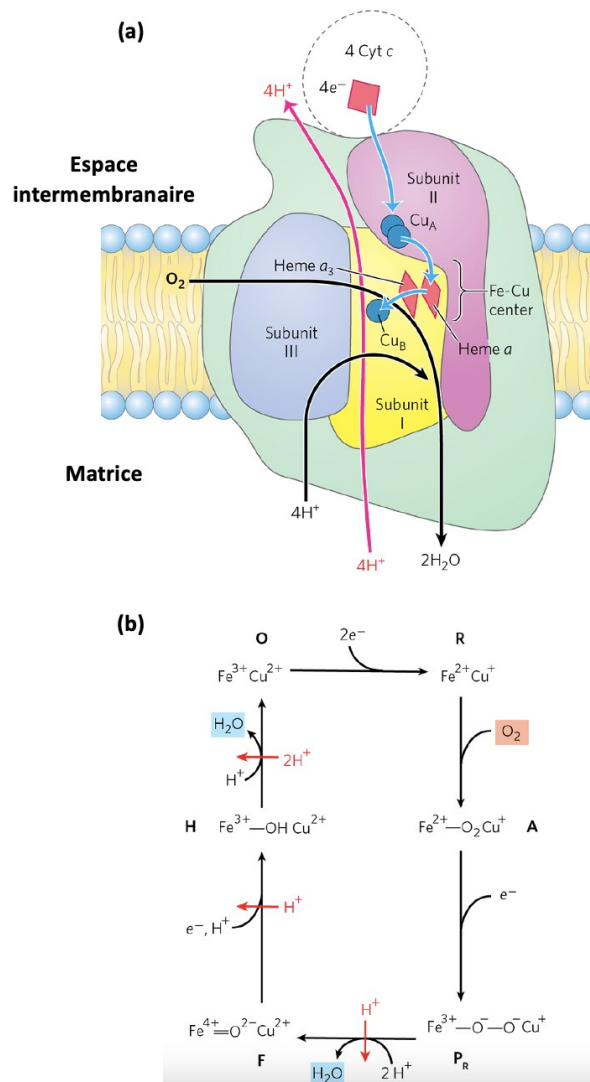


Figure 10. Transfert d'électrons au complexe IV.

(a) Le transfert d'électrons dans le Complexe IV bovin commence lorsque le cytochrome c donne des électrons au centre Cu_A . Les électrons passent à travers l'hème a jusqu'au centre Fe-Cu, où l'oxygène est réduit en eau. Quatre protons sont consommés depuis la matrice et quatre protons sont pompés dans l'espace intermembranaire. (b) Séquence simplifiée des étapes de transfert d'électrons et de pompage de protons. Figure adaptée avec permission de [2].

- **Complexe V : Synthèse d'ATP.**

La synthèse d'ATP dans les mitochondries est régie par le modèle de couplage chimiosmotique, proposé par Peter Mitchell. Ce modèle explique comment le gradient électrochimique de protons (force proton-motrice) à travers la membrane interne mitochondriale alimente la production d'ATP [2]. Les protons retournent dans la matrice via l'ATP synthase (Complexe V), composée de deux sous-unités principales : F_o , une sous-unité membranaire intégrale dotée d'un canal à protons, et F_1 , une sous-unité périphérique qui catalyse la synthèse d'ATP (**Figure 11**) [57]. Le passage des protons dans F_o provoque des changements conformationnels dans F_1 , permettant la libération de l'ATP lié à l'enzyme. En l'absence de gradient de protons, l'ATP reste fermement lié à l'enzyme et ne peut pas être libéré. L'ATP synthase fonctionne près de l'équilibre entre la formation et l'hydrolyse de l'ATP, avec une forte affinité pour l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire à cet équilibre. Le gradient de protons permet non seulement la libération de l'ATP, mais il couple également la synthèse d'ATP au transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire [2]. Ce mécanisme souligne le lien entre la bioénergétique et l'électrochimie.

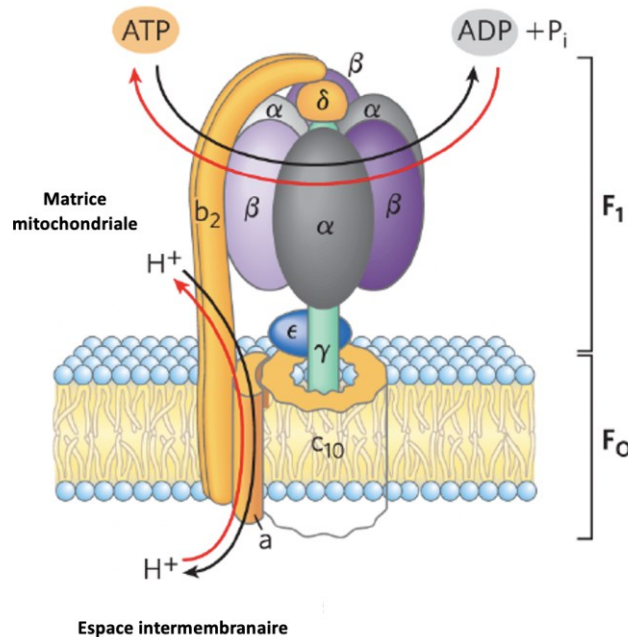


Figure 11. Complexe V (ATP-ase) : Synthèse d'ATP.

F_oF_1 ATPase/ATP synthase comprend un domaine intégral F_o avec plusieurs sous-unités c et un domaine périphérique F_1 composé de trois sous-unités α , trois sous-unités β et un axe central reliant les deux domaines. F_o fournit un canal à protons, permettant le flux de protons suivant le gradient électrochimique pour entraîner la synthèse d'ATP sur les sous-unités β de F_1 (flèches rouges). Cette réaction est essentielle à la phosphorylation oxydative. Figure adaptée avec permission de [2].

En résumé, la bioénergétique de la chaîne de transport des électrons mitochondriaux, comprenant la série complexe de réactions redox catalysées par les complexes protéiques, génère un gradient de protons à travers la membrane mitochondriale interne, qui alimente la synthèse de l'ATP. Le couplage du flux d'électrons au pompage des protons crée un gradient électrochimique, appelé force proton-motrice, essentiel à la production d'énergie cellulaire. Ce gradient et les processus redox associés offrent une compréhension approfondie de la manière dont l'énergie est transférée et convertie au sein des systèmes biologiques.

2.1.3 Principes classiques de la respiration mitochondriale

L'étude de l'activité mitochondriale repose historiquement sur des approches biochimiques fondamentales, notamment le système de classification des états respiratoires mitochondriaux proposé par Chance et Williams dans les années 1950 [58]. Cette nomenclature décrit l'évolution de la respiration mitochondriale selon les conditions expérimentales, en particulier la présence ou l'absence de substrats métaboliques et d'ADP, et permet d'évaluer à la fois la fonctionnalité de la chaîne respiratoire et le couplage avec la phosphorylation oxydative. L'état 1 correspond à la situation initiale où les mitochondries sont incubées en présence d'oxygène mais en absence de substrats oxydables ; il est caractérisé par une faible activité respiratoire. En état 2, un substrat est ajouté (tel que le pyruvate, le succinate ou le glutamate), permettant une activation partielle de la chaîne de transport d'électrons (CTE), bien que l'absence d'ADP limite la synthèse d'ATP. L'état 3 débute avec l'ajout d'ADP, déclenchant une respiration intense associée à la production d'ATP par l'ATP synthase. Ce stade représente l'activité mitochondriale maximale couplée. Enfin, une fois l'ADP converti en ATP, les mitochondries entrent en état 4, caractérisé par une respiration basale en l'absence de synthèse active d'ATP, souvent utilisée pour évaluer l'intégrité membranaire (fuite de protons) et l'efficacité du couplage [59].

Le rôle de l'ADP dans cette dynamique est fondamental, puisqu'il régule directement la vitesse de la respiration. Son entrée dans la matrice mitochondriale est assurée par des transporteurs spécifiques, comme l'ANT (Adenine Nucleotide Translocator), qui échange l'ADP cytosolique contre l'ATP matriciel [60]. La disponibilité d'ADP est donc un facteur limitant majeur dans l'activation transitoire de la chaîne respiratoire. De plus, les complexes de la chaîne respiratoire (CI–CIV) ne fonctionnent pas de manière totalement indépendante : ils peuvent s'organiser en supercomplexes ou « respirasomes », dont l'assemblage modifie la dynamique de transfert d'électrons, limite la diffusion latérale des quinones, et peut influencer la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La formation et la stabilité de ces supercomplexes sont aujourd'hui reconnues comme des éléments clés dans la régulation fine de l'activité mitochondriale, notamment dans des contextes pathologiques [61].

Enfin, il convient de mentionner l'importance de la dynamique mitochondriale – les processus de fission et de fusion – qui permet aux mitochondries de remodeler leur réseau, d'adapter leur morphologie à la demande énergétique, de réguler l'homéostasie calcique et de maintenir une population fonctionnelle. Ces mécanismes influencent directement l'efficacité de la respiration en modulant l'organisation des crêtes internes, la distribution des complexes enzymatiques et l'accessibilité des substrats [62].

L'ensemble de ces aspects – états respiratoires, rôle de l'ADP, formation de supercomplexes et dynamique structurale – constitue le socle des connaissances biochimiques sur lesquelles toute nouvelle approche, y compris électrochimique, doit s'appuyer pour interpréter les signaux

observés et évaluer l'activité mitochondriale de manière pertinente. Pour explorer ces processus plus en détail, nous passons maintenant au domaine de l'électrochimie, où les méthodes électrochimiques fournissent des outils précieux pour analyser les réactions redox, le flux de protons et la cinétique du transfert d'électrons impliqués dans les processus bioénergétiques, permettant une compréhension plus quantitative et mécanistique de la dynamique énergétique cellulaire.

2.2 Électrochimie

Comme expliqué dans la section 2.1, la plupart des réactions biologiques liées au métabolisme des organismes vivants impliquent des processus de transfert d'électrons entre différentes molécules. L'outil le plus puissant pour l'étude de ces transferts d'électrons est l'électrochimie. Cette discipline permet l'addition ou l'arrachement d'électrons des molécules ou ions qui arrivent très proches d'une surface métallique ou semi-conductrice [6]. Les événements clés se produisent fréquemment dans une très petite partie du volume total, généralement à la surface métallique ou à proximité, voire uniquement sur des sites actifs rares. Les molécules ou ions réactifs doivent être acheminés jusqu'aux zones de réaction, et ce processus de transport joue un rôle déterminant sur les vitesses de réaction [63].

Lorsqu'une réaction est déclenchée à une électrode, elle peut suivre un mécanisme impliquant une grande variété d'étapes chimiques, telles qu'un transfert de proton, une modification de liaisons chimiques, une élimination, un réarrangement ou un transfert d'électrons subséquent, que ce soit à l'électrode elle-même ou avec d'autres molécules ou ions. Les réactions aux électrodes sont régies par l'interaction entre les structures orbitales des ions et des molécules et les structures de bandes des matériaux conducteurs, semi-conducteurs et isolants [6]. Ces réactions sont également influencées par les interactions électrostatiques et les principes thermodynamiques. Dans le domaine de la chimie, l'électrochimie se distingue comme l'un des champs les plus complexes à aborder tant du point de vue théorique qu'expérimental. Cependant, après deux siècles de recherches scientifiques rigoureuses, une base solide de théories et de méthodologies expérimentales a été établie. En électrochimie biologique, ces principes sont particulièrement essentiels pour comprendre les processus redox complexes dans les systèmes vivants, tels que ceux impliquant des enzymes, des membranes ou des organelles comme les mitochondries.

Pour comprendre l'électrochimie, il faut d'abord maîtriser cinq concepts fondamentaux et interreliés [5,64]. 1) Le potentiel de l'électrode détermine la forme de l'analyte à la surface de l'électrode ; 2) La concentration de l'analyte à la surface de l'électrode peut différer de celle dans la solution en vrac ; 3) L'analyte peut participer à des réactions autres que l'oxydation ou la réduction ; 4) Le courant reflète la vitesse à laquelle l'analyte subit une oxydation ou une réduction ; 5) Le courant et le potentiel ne peuvent pas être contrôlés simultanément.

- *Le potentiel de l'électrode détermine la forme de l'analyte à la surface de l'électrode.*

Le potentiel appliqué à une électrode influence directement l'état chimique de l'analyte à sa surface. En effet, en fonction du potentiel, l'analyte peut exister sous une forme réduite ou oxydée, définissant ainsi la nature des processus électrochimiques en cours. Ce contrôle précis du potentiel est essentiel pour orienter les réactions électrochimiques dans des systèmes biologiques complexes, tels que l'étude des enzymes ou des organelles, comme les mitochondries.

- *La concentration de l'analyte à la surface de l'électrode peut différer de celle dans la solution en vrac.*

Lors d'une réaction électrochimique, la concentration de l'analyte à la surface de l'électrode peut changer sous l'effet de phénomènes tels que la diffusion, l'adsorption ou les réactions chimiques qui s'y produisent. Cette différence de concentration entre la surface de l'électrode et la solution en vrac joue un rôle crucial dans la cinétique des réactions, en particulier dans des environnements biologiques où les gradients de concentration influencent les processus métaboliques et électrochimiques.

- *L'analyte peut participer à des réactions autres que l'oxydation ou la réduction.*

Outre les réactions d'oxydation et de réduction, l'analyte peut s'engager dans des réactions secondaires, telles que le transfert de protons, la liaison avec d'autres molécules ou la modification de sa structure chimique. Ces réactions concurrentes peuvent affecter la réponse électrochimique globale et sont particulièrement pertinentes dans les études biologiques, où les analytes, comme les biomolécules, participent à des réseaux réactionnels complexes.

- *Le courant reflète la vitesse à laquelle l'analyte subit une oxydation ou une réduction.*

La loi de Faraday de l'électrolyse stipule que la quantité de substance produite à chaque électrode est directement proportionnelle à la quantité de charge qui traverse la cellule électrochimique. Ainsi, le courant mesuré lors d'une expérience électrochimique, qui représente le flux de charge par unité de temps, est lié à la quantité de matière transformée par oxydation ou réduction. Cette

relation dépend du nombre d'électrons transférés et de la constante de Faraday, permettant de relier les phénomènes électrochimiques aux quantités de substance impliquées. Le courant est fondamental pour quantifier les processus électrochimiques et évaluer des activités biologiques, telles que les réactions catalytiques d'enzymes ou le fonctionnement des chaînes de transport d'électrons dans les mitochondries.

- *Le courant et le potentiel ne peuvent pas être contrôlés simultanément.*

Dans les systèmes électrochimiques, le courant et le potentiel sont interdépendants, ce qui empêche leur contrôle simultané. Par conséquent, il est nécessaire de choisir un paramètre à réguler – soit le potentiel, soit le courant – afin d'étudier avec précision les processus électrochimiques en cours.

L'électrochimie englobe l'étude des processus impliquant le transfert d'électrons ainsi que la séparation des charges, qui se produisent à l'interface entre un électrolyte et une électrode, incluant des phénomènes tels que la formation de la double couche électrique. Bien que cette idée puisse sembler intuitive, l'analyse de ces processus à une interface isolée reste impossible en raison de l'absence d'outils adaptés pour étudier des interfaces individuelles. Par conséquent, il est nécessaire d'examiner les propriétés d'un ensemble d'interfaces, regroupées dans ce que l'on appelle une cellule électrochimique [6]. Normalement, ces systèmes sont définis comme deux surfaces conductrices, appelées « électrodes », séparées par au moins une phase électrolytique, un milieu conducteur ionique qui permet le transport des charges électriques via des ions plutôt que des électrons [65]. Une différence de potentiel électrique peut être mesurée entre les deux électrodes, représentant l'énergie disponible pour provoquer le flux de charges entre elles de manière externe. Ces deux surfaces conductrices sont appelées l'anode et la cathode. L'oxydation se produit à l'anode, tandis que la réduction a lieu à la cathode.

Il existe deux types de cellules électrochimiques : les cellules galvaniques et les cellules électrolytiques. Dans les cellules galvaniques, des réactions chimiques se déroulent spontanément, générant un flux d'électrons de l'anode vers la cathode à travers un conducteur externe. Leur fonction principale est de stocker l'énergie électrique, comme c'est le cas pour les batteries. En revanche, dans les cellules électrolytiques, les réactions aux électrodes ne se produisent pas de manière spontanée. Ainsi, une source externe d'énergie électrique est indispensable pour assurer leur fonctionnement. Dans ce travail, nous nous concentrerons sur

l'étude des réactions électrochimiques biologiques en utilisant des cellules électrolytiques comme celle montrée dans la **Figure 12**.

Dans les cellules électrolytiques, il est courant que seul le processus électrochimique se déroulant à l'une des électrodes soit d'intérêt. Cette électrode est alors appelée électrode de travail (ET). L'électrode où se produit la réaction opposée est nommée électrode auxiliaire (EA). Puisqu'un courant électrique circule entre l'ET et l'EA pour permettre le déroulement des réactions correspondantes, il est nécessaire d'ajouter une troisième électrode pour mesurer et/ou contrôler la tension du ET sans interférence des réactions ayant lieu à l'EA. Cette troisième électrode, appelée électrode de référence (ER), est composée de phases à composition constante et insensibles aux courants électriques, donc de potentiel constant. Cela garantit que toute modification dans la cellule électrochimique peut être attribuée exclusivement à l'ET.

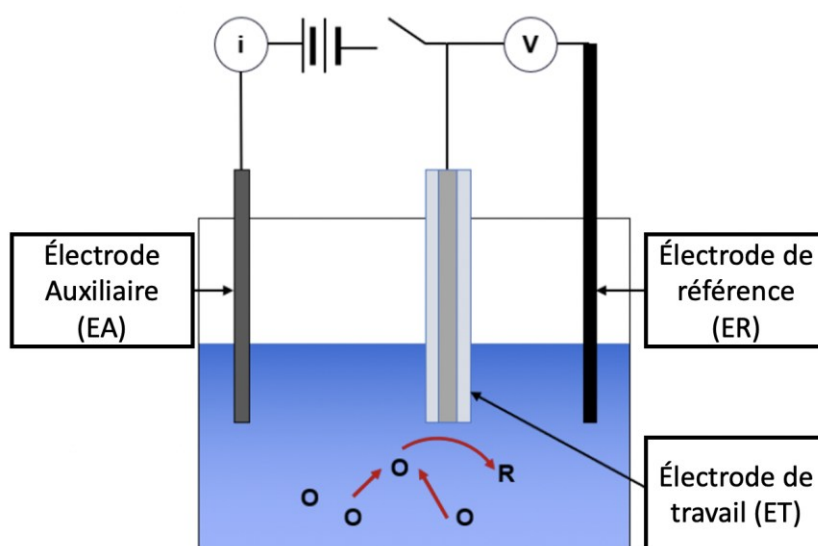


Figure 12. Cellule électrochimique électrolytique.

(V) représente la tension mesurée de manière externe entre l'électrode de travail et l'électrode de référence, qui sont connectées par un circuit à haute impédance afin d'empêcher les électrons de circuler vers ou depuis l'électrode de référence. Sous l'effet de cette tension, le courant généré (I) circule vers ou depuis l'électrode auxiliaire. Les flèches rouges dans la figure représentent les espèces oxydées (O) présentes dans la solution électrolytique qui se dirigent vers l'électrode de travail (anode) et les espèces réduites (R) résultantes.

Dans une cellule électrochimique, les réactions d'intérêt se produisent à l'interface électrode-électrolyte. Cette zone est connue sous le nom de double couche électrique. Du côté de la solution, cette région est supposée être constituée de plusieurs couches (**Figure 13**). La couche interne contient des molécules de solvant et parfois des ions spécifiquement adsorbés. Le lieu de

cette couche est appelé le plan de Helmholtz interne (PHI), situé à une distance x_1 , et il présente une densité de charge totale σ^i due aux ions spécifiquement adsorbés [6,66].

Les ions solvatés en solution ne peuvent approcher la surface de l'électrode qu'à une distance x_2 . Le lieu du centre des ions solvatés les plus proches est appelé le plan de Helmholtz externe (PHE). Les ions dans cette couche sont adsorbés de manière non spécifique [6].

Les ions non spécifiquement adsorbés sont répartis dans une région tridimensionnelle appelée la couche de diffusion, qui s'étend du PHE jusqu'au cœur de la solution électrolytique. Dans cette couche de diffusion, les ions se déplacent librement en raison de l'agitation thermique. La densité de charge excédentaire dans la couche de diffusion est σ^d . L'épaisseur de la couche de diffusion dépend de la concentration de l'électrolyte. Pour des concentrations supérieures à 10^{-2} M, l'épaisseur est inférieure à 100 Å [6].

La structure de la double couche électrique influence de manière significative les vitesses des processus électrochimiques. Cela s'explique par le fait que les espèces électroactives ne peuvent s'approcher de la surface de l'électrode que jusqu'au PHE. Par conséquent, le potentiel total ressenti par ces espèces est réduit par rapport à la différence de potentiel complète entre l'électrode et la solution en vrac, car une partie du potentiel est dissipée à travers la couche de diffusion [6].

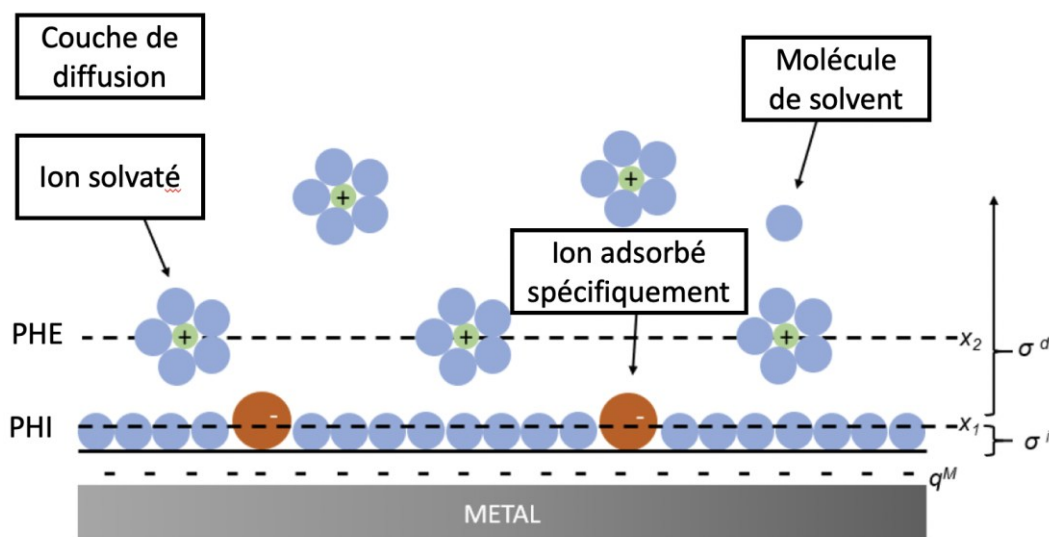


Figure 13 La couche double électrique

Une caractéristique essentielle de la double couche électrique est sa capacité, appelée capacité de double couche (C_{dl}), qui se forme à l'interface entre l'électrode conductrice et l'électrolyte liquide adjacent. À cette interface, deux couches de charges opposées se créent : une composée d'électrons à la surface de l'électrode et l'autre constituée d'ions dans l'électrolyte. Ces couches sont généralement séparées par une seule couche de molécules de solvant adhérant à la surface de l'électrode, jouant un rôle similaire à celui d'un diélectrique dans un condensateur classique. La quantité de charge électrique stockée dans cette double couche définit la capacité de double couche [66].

La capacité de la double couche joue un rôle essentiel dans les expérimentations électrochimiques, car elle intervient dans de nombreux processus. La plupart des stratégies expérimentales impliquent des variations au fil du temps du potentiel, de la structure interfaciale ou de la surface de l'électrode. Par conséquent, un courant de charge apparaît, contribuant au signal de fond contre lequel les courants faradiques, associés au transfert d'électrons, sont mesurés. Ce courant de charge interfère souvent avec la détection précise des courants faradiques. Lorsque les espèces électroactives sont présentes en faibles concentrations, le courant de charge peut dépasser considérablement le courant faradique, définissant fréquemment les limites de détection du système [6]. Au long de ce travail, nous reviendrons couramment au concept de capacité de la double couche et analyserons ses implications dans les méthodes électrochimiques utilisées.

Comme mentionné précédemment, les expériences électrochimiques se concentrent généralement sur les réactions se produisant à l'électrode de travail. Par exemple, dans la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} à la cathode, chaque ion réduit nécessite un électron, lequel est fourni à l'électrode par le circuit externe. La source de ces électrons est une autre espèce chimique en solution, oxydée à l'anode. Ce mouvement d'électrons de l'anode vers la cathode via le circuit externe constitue le courant. Étant donné que le transfert des électrons suit une relation strictement stœchiométrique dans les réactions électrochimiques, l'intensité du courant est directement proportionnelle à la vitesse de réaction [6,64].

En électrochimie, on dit souvent que l'on mesure ou contrôle le potentiel par rapport à l'électrode de référence, ce qui revient à dire que l'on peut mesurer ou contrôler l'énergie des électrons à l'électrode de travail. En polarisant l'électrode de travail à des potentiels plus négatifs, l'énergie des électrons augmente et, si la polarisation est suffisamment forte, les électrons peuvent atteindre un niveau d'énergie leur permettant d'être transférés vers des états électroniques vacants dans l'électrolyte, générant ce que l'on appelle un courant de réduction. De manière similaire, en appliquant un potentiel plus positif, un flux d'électrons provenant de la solution vers l'électrode peut être créé, produisant ainsi un courant d'oxydation [6].

Une étude expérimentale du comportement électrochimique consiste à manipuler certaines variables au sein d'une cellule électrochimique et à observer les variations d'autres paramètres, tels que le courant, le potentiel ou la concentration, en fonction du temps ou des variables contrôlées. Les paramètres clés dans les cellules électrochimiques peuvent être classés comme suit : les variables liées aux électrodes (par exemple, le matériau, la surface, la géométrie, l'état de surface), les variables de transfert de masse (par exemple, le mode de transport, les concentrations à la surface, les phénomènes d'adsorption), les variables liées à la solution (par exemple, la concentration en vrac des espèces électroactives, les concentrations d'autres espèces, les propriétés du solvant), les variables électriques (par exemple, le potentiel, le courant, la charge) et les variables externes (par exemple, la température, la pression, le temps) [6]. Les méthodes électrochimiques émergent de la manière de contrôler les variables.

2.2.1 Méthodes électrochimiques

Bien que les trois paramètres de base en électrochimie soient le potentiel, le courant et le temps, il existe de nombreuses conceptions expérimentales possibles. En général, les méthodes électrochimiques peuvent être divisées en techniques de volume, où une propriété de la solution dans la cellule est mesurée (par exemple, la conductivité de la solution), et en techniques interfaciales, où le courant, la charge et le potentiel dépendent des espèces présentes à l'interface entre l'électrode et la solution. Dans le cadre de ce travail, seules les techniques interfaciales sont prises en compte.

Les méthodes électrochimiques interfaciales peuvent être classées en grandes catégories en fonction de la manière dont les variables électriques sont contrôlées. Ces catégories incluent :

1. **Potentiométrie** : En potentiométrie, le courant (i) est nul, et le potentiel (E) est déterminé en fonction des concentrations. Puisqu'aucun courant ne circule dans cette expérience, aucune réaction faradique nette ne se produit, et le potentiel est fréquemment (mais pas toujours) gouverné par les propriétés thermodynamiques du système. De nombreuses variables, telles que la surface de l'électrode, le transfert de masse et la géométrie de l'électrode, n'affectent pas directement le potentiel.
2. **Voltampérométrie** : En voltampérométrie, le potentiel est contrôlé, généralement suivant une fonction spécifique du temps, et le courant résultant est mesuré en fonction du potentiel.
3. **Expériences galvanostatiques** : Dans les expériences galvanostatiques, le courant est contrôlé (généralement en fonction d'une fonction définie du temps), et le potentiel est suivi en fonction du temps.
4. **Coulométrie** : En coulométrie, le potentiel est maintenu constant à une valeur où une réaction électrochimique a lieu, et la charge totale passée est mesurée, généralement en intégrant le courant.

Dans cette étude, nous mettrons l'accent sur l'utilisation des techniques voltammétriques. L'utilisation de ces techniques se justifie par leur sensibilité exceptionnelle et leur grande polyvalence pour l'étude des processus électrochimiques. Ces techniques permettent un contrôle précis du potentiel de l'électrode à l'aide d'un potentiostat, ce qui rend possible l'analyse sélective des réactions rédox d'intérêt. De plus, la voltampérométrie fournit des informations détaillées sur la cinétique et les mécanismes des réactions électrochimiques, ainsi que sur la diffusion et l'adsorption des espèces à l'interface entre l'électrode et la solution.

Les techniques voltammétriques permettent de discriminer les processus non faradiques, comme les courants capacitifs, garantissant ainsi une mesure précise des courants faradiques associés

aux réactions rédox. Cela les rend indispensables pour caractériser les biomolécules, étudier l'activité enzymatique et explorer les voies de transfert d'électrons dans les systèmes biologiques.

En résumé, les techniques voltammétriques offrent une combinaison de sensibilité, de sélectivité et d'analyse mécanistique qui s'aligne parfaitement avec les objectifs de cette recherche. Nous nous concentrerons spécifiquement sur l'étude de la voltampérométrie cyclique (VC) et de la voltampérométrie à onde carrée (VOC). La voltampérométrie cyclique est largement utilisée pour étudier les propriétés redox des espèces électroactives, offrant des informations précieuses sur les mécanismes et la cinétique des réactions. La voltampérométrie à onde carrée, quant à elle, offre une sensibilité accrue et est particulièrement utile pour détecter de faibles concentrations d'analytes. Ces techniques sont complémentaires et permettent une analyse plus approfondie du système étudié. Examinons ces techniques séparément.

2.2.1.1 Voltampérométrie cyclique

Comme première étape pour comprendre la voltampérométrie cyclique, nous commencerons par étudier les méthodes d'analyse transitoire. Les méthodes transitoires sont fondamentales pour comprendre les techniques voltammétriques, car elles offrent des informations précieuses sur le comportement dynamique des systèmes électrochimiques. Ces méthodes se concentrent sur les variations temporelles du courant ou du potentiel, permettant ainsi aux chercheurs d'étudier la cinétique des réactions de transfert d'électrons, les processus de diffusion et les phénomènes d'adsorption à la surface de l'électrode. En analysant les réponses transitoires, il est possible d'extraire des paramètres clés, tels que les vitesses de réaction, les coefficients de diffusion et l'influence de la charge de la double couche. Cette compréhension est essentielle pour interpréter les données voltammétriques, où l'interaction entre le potentiel appliqué et le courant résultant est intrinsèquement dépendante du temps. En fin de compte, les méthodes transitoires constituent la base de l'analyse voltammétrique, permettant une compréhension approfondie des processus électrochimiques.

Considérons une impulsion de potentiel appliquée à une électrode de travail plane dans une cellule à trois électrodes contenant une solution stationnaire d'une espèce électroactive. La cellule est contrôlée de manière potentiostatique. Un générateur de fonctions produit une forme d'onde similaire à celle illustrée dans la **Figure 14(a)** qu'un potentiostat utilise pour piloter l'électrode de travail selon le programme de potentiel spécifié.

En général, il existe une plage de potentiels où aucun processus faradique ne se produit ; désignons par E_1 un potentiel dans cette plage. À l'inverse, à des potentiels plus négatifs, tels

que E_2 , les cinétiques de réduction de l'analyte deviennent si rapides que sa concentration en surface diminue pratiquement à zéro.

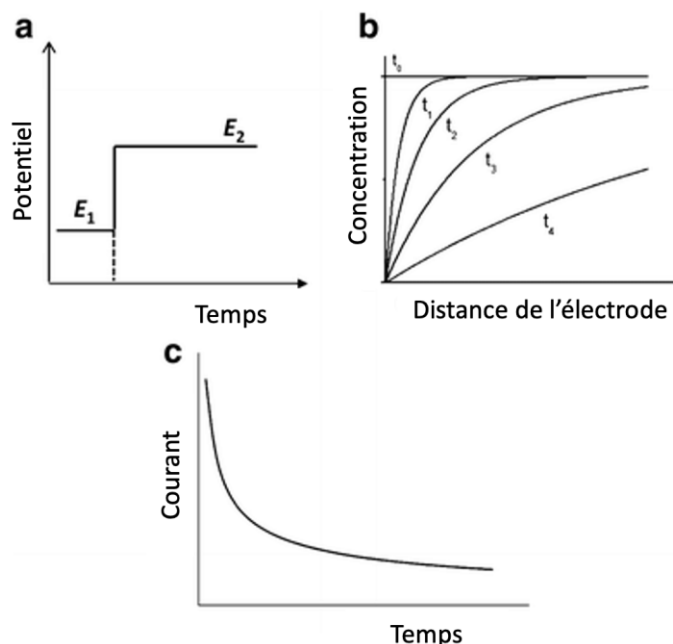


Figure 14. Chronoampérométrie

a) Forme d'onde pour une expérience par palier dans laquelle l'électro réactif est inactif à E_1 , mais est réduit à un taux limité par diffusion à E_2 . b) Profils de concentration pour différents instants de l'expérience. c) Courant en fonction du temps [67].

Lorsqu'un pas de potentiel est appliqué à E_2 , l'électrode commence immédiatement à réduire les molécules d'analyte à proximité. Cette réduction initiale exige un courant élevé, car le processus se déroule à la vitesse maximale permise par la cellule et l'instrumentation. Par la suite, un courant constant circule pour maintenir l'analyte dans un état complètement réduit à la surface de l'électrode.

Cette réduction crée un gradient de concentration qui entraîne une diffusion continue de l'analyte vers l'électrode. Comme l'analyte arrivant ne peut pas coexister avec l'électrode à E_2 , il est réduit dès son arrivée. Le flux d'analyte – et donc le courant – est proportionnel au gradient de concentration à la surface de l'électrode. Cependant, à mesure que la réduction se poursuit, la zone de déplétion s'épaissit, réduisant ainsi la pente du profil de concentration près de la surface de l'électrode. Par conséquent, le gradient et le courant diminuent avec le temps. Ces effets sont illustrés dans la **Figure 14(b-c)**. Ce genre d'expérience s'appelle chronoampérométrie [6].

En théorie, le comportement électrochimique complet d'un système peut être cartographié en appliquant une série de potentiels et en enregistrant les courbes courant-temps ($i - t$) correspondantes, comme décrit précédemment. Ces résultats pourraient ensuite être représentés sous forme d'une surface tridimensionnelle $i - t - E$. Cependant, cette approche est peu pratique en raison du travail laborieux de collecte et d'analyse des données, notamment à cause de la nécessité d'utiliser des valeurs de potentiel très rapprochées pour obtenir une résolution suffisante. De plus, il est difficile de distinguer différentes espèces à partir d'un ensemble de courbes $i - t$. Une méthode plus efficace consiste à balayer le potentiel en continu dans le temps et à enregistrer directement la courbe courant-potentiel ($i - E$) en une seule expérience [6]. Cette méthode est connue comme voltampérométrie.

Considérons un analyte (Red) dans un électrolyte au repos lors d'un balayage de potentiel. La **Figure 15(a)** illustre la variation du potentiel en fonction du temps, tandis que la **Figure 15(b)** montre la réponse correspondante. Le balayage commence à un potentiel initial E_i , qui est insuffisant pour oxyder l'analyte. À ce stade, seul un courant de charge est observé. Cependant, à mesure que le potentiel approche $E^{0'}$ (Le potentiel formel d'oxydation de l'analyte), l'oxydation débute et un courant faradique (où le transfert d'électrons a lieu) commence à circuler. Lorsque le potentiel devient de plus en plus positif, la concentration de l'analyte à la surface diminue, entraînant une augmentation du flux vers la surface de l'électrode et une élévation correspondante du courant. Une fois que le potentiel dépasse $E^{0'}$, la concentration de l'analyte à la surface devient pratiquement nulle.

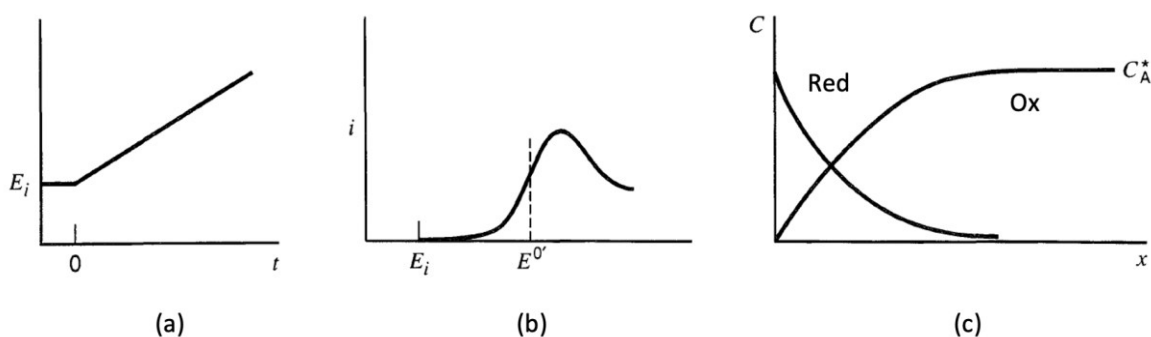


Figure 15. Voltampérométrie linéaire [6].

(a) Balayage ou rampe de potentiel linéaire commençant à E_i . (b) Courbe $i - E$ résultante. (c) Profils de concentration de l'analyte réduit et oxydé pour des potentiels au-delà du pic.

Considérons maintenant un scénario où le balayage de potentiel est inversé, comme illustré dans la **Figure 16(a)**. Près de la surface de l'électrode, il existe une concentration importante de

l'espèce analyte oxydée (Ox). Lorsque le potentiel s'approche, puis dépasse $E^{0'}$, l'équilibre électrochimique à la surface se déplace progressivement en faveur de la forme réduite de l'analyte (Red). Par conséquent, l'analyte subit à nouveau une réduction, générant un courant anodique. La réponse transitoire pendant l'inversion, montrée dans la **Figure 16(b)**, ressemble à celle observée lors du balayage direct en raison de processus similaires. Ce type d'expérience d'inversion est appelé voltampérométrie cyclique (VC) et constitue l'équivalent en balayage de potentiel de la chronoampérométrie à double étape de potentiel. La voltampérométrie cyclique est une technique très polyvalente, largement utilisée pour caractériser les réactions électrochimiques et diagnostiquer les mécanismes réactionnels [6].

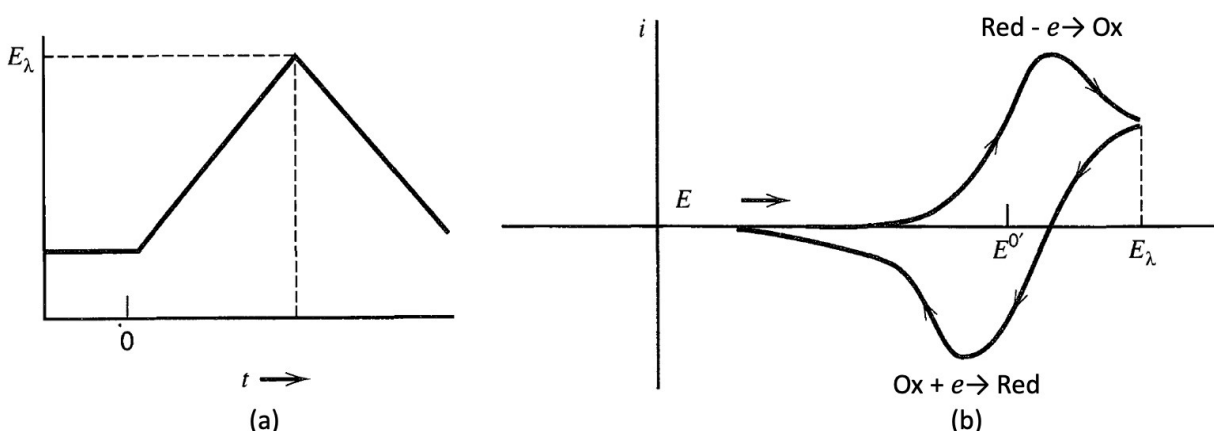


Figure 16. Voltampérométrie cyclique [6].

(a) Balayage de potentiel cyclique. (b) Voltampérogramme cyclique résultant.

Analysons maintenant pourquoi il y a des pics dans les voltampérogrammes cycliques. Comme exemple, considérons l'équilibre entre le ferrocène (Fc) et le ferrocenium (Fc^+), régi par l'équation de Nernst (**Équation 1**). Cette équation relie le potentiel d'une cellule électrochimique (E) au potentiel standard d'une espèce (E^0) ainsi qu'aux activités relatives de l'analyte sous ses formes oxydée (Ox) et réduite (Red) à l'équilibre. Dans l'équation de Nernst, F représente la constante de Faraday, R est la constante universelle des gaz, n est le nombre d'électrons impliqués dans la réaction, et T correspond à la température.

Équation 1. Équation de Nernst

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{(Red)}{(Ox)} = E^0 + 2.3026 \frac{RT}{nF} \log_{10} \frac{(Red)}{(Ox)}$$

Lors de l'application de l'équation de Nernst à l'oxydation monovalente de Fc en Fc^+ , les activités sont remplacées par leurs concentrations, car celles-ci sont plus facilement mesurables expérimentalement. De plus, le potentiel standard E^0 est remplacé par le potentiel formel $E^{0'}$ (mesuré dans les conditions expérimentales spécifiques), et la valeur de n est fixée à 1.

Équation 2. Équation de Nernst pour l'oxydation monovalente de ferrocène

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{F} \ln \frac{[Fc]}{[Fc^+]} = E^{0'} + 2.3026 \frac{RT}{nF} \log_{10} \frac{[Fc]}{[Fc^+]}$$

L'équation de Nernst est un outil précieux pour prédire comment un système réagit aux variations de concentration des espèces en solution ou aux changements de potentiel de l'électrode. Par exemple, si un potentiel $E = E^{0'}$ est appliqué à une solution contenant Fc l'équation de Nernst prédit que Fc sera oxydé en Fc^+ jusqu'à ce que les concentrations $[Fc^+]$ et $[Fc]$ s'équilibrent en devenant égales. De même, lors d'une expérience de Voltampérométrie cyclique (VC), au fur et à mesure que le potentiel est balayé, les concentrations des espèces près de la surface de l'électrode évoluent dans le temps, conformément à l'équation de Nernst.

Lorsque la solution contenant Fc est soumise à un balayage de potentiel vers des valeurs positifs, Fc est oxydé en Fc^+ à la surface de l'électrode. Ce processus génère un courant mesurable et provoque une diminution de Fc près de l'électrode. Le voltampérogramme cyclique résultant est présenté à la **Figure 17(H)**, accompagné des profils de concentration en fonction de la distance pour Fc (en bleu) et Fc^+ (en vert) à différents points du balayage. Les concentrations relatives de Fc et Fc^+ , en fonction de la distance par rapport à la surface de l'électrode, dépendent du potentiel appliqué et des dynamiques de déplacement des espèces entre la surface de l'électrode et la solution en vrac. Ces facteurs contribuent ensemble à la forme caractéristique des voltampérogrammes.

Lorsque le potentiel est balayé dans la direction positive (anodique) de A à D (**Figure 17(a-d)**), la concentration de Fc à proximité de l'électrode diminue, car il est oxydé en Fc^+ . Au point C, où le courant de pic anodique ($i_{p,a}$) est observé, le courant est principalement alimenté par la diffusion de Fc depuis la solution en vrac vers la surface de l'électrode. À mesure que le balayage

progressive, la région proche de l'électrode contenant le Fc^+ oxydé, appelée couche de diffusion, s'élargit. Cet élargissement ralentit le transport de Fc vers l'électrode, entraînant une diminution progressive du courant à mesure que le potentiel devient plus positif (C \rightarrow D).

Lorsque le balayage atteint le potentiel d'inversion au point D, le potentiel est inversé et le balayage se déplace dans la direction négative (cathodique). Pendant cette phase, le Fc^+ précédemment oxydé près de l'électrode est réduit en Fc , conformément à l'équation de Nernst. Aux points B et E, les concentrations de Fc et de Fc^+ à la surface de l'électrode sont égales, ce qui correspond au potentiel formel $E = E_{1/2}$. Ce potentiel se situe à mi-chemin entre les deux pics (C et F), fournissant un moyen simple d'estimer $E^{0'}$ pour un transfert électronique réversible. La séparation des deux pics résulte du transport limité par diffusion de l'analyte vers et depuis l'électrode.

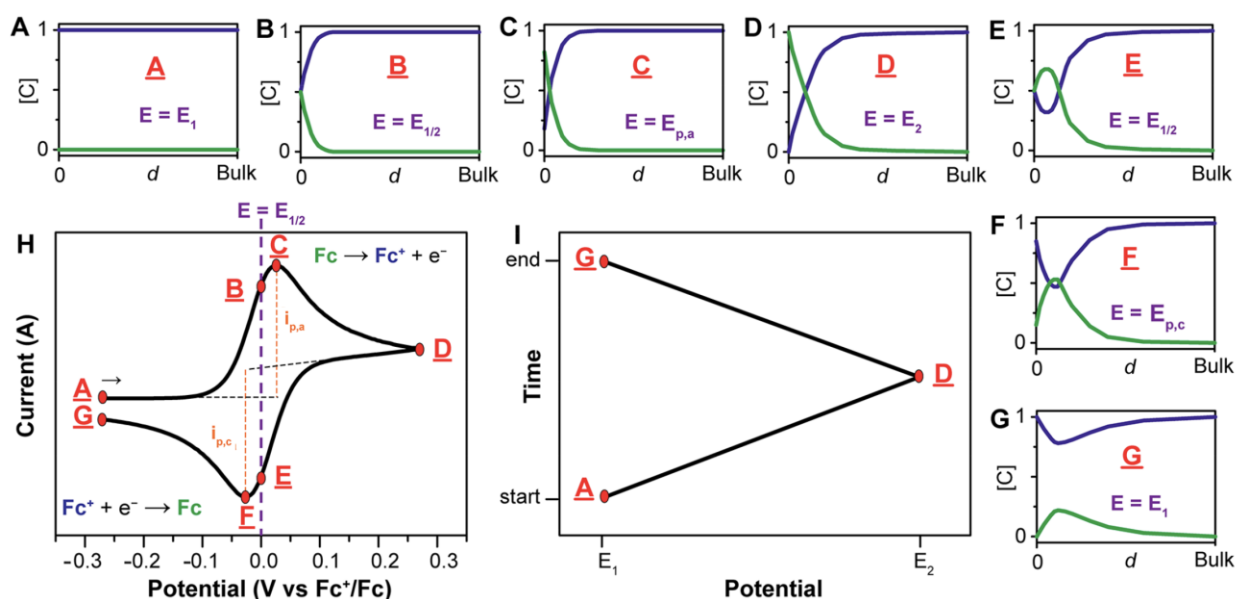


Figure 17. Profils de concentration de Fc et Fc^+ à l'interface électrode-électrolyte pendant une voltampérométrie cyclique.

(A–G) : Profils de concentration (mM) pour Fc (bleu) et Fc^+ (vert) en fonction de la distance depuis l'électrode à différents points au cours du voltampérogramme. (H) : Voltampérogramme de l'oxydation réversible d'une solution de Fc à 1 mM en Fc^+ , à une vitesse de balayage de 100 mV s^{-1} . (I) : Potentiel appliqué en fonction du temps pour une expérience générique de voltampérométrie cyclique, avec les potentiels initial, d'inversion et final représentés (A, D et G, respectivement). Figure adaptée avec permission de la référence [68].

Si le processus de réduction est à la fois chimiquement et électrochimiquement réversible, la différence entre les potentiels de pic anodique et cathodique, appelée séparation de pic à pic

(ΔE_p), est de 57 mV à 25 °C, soit $2.22 RT/F$. De plus, la largeur à mi-hauteur ($W_{1/2}$) du pic lors du balayage est d'environ 59 mV. La réversibilité chimique implique que l'analyte reste stable après réduction et peut être réoxydé sans subir de décomposition ou de réactions secondaires importantes[6]. Les analytes qui réagissent lors de processus chimiques homogènes, tels que la perte de ligands ou la dégradation après réduction, ne sont pas chimiquement réversibles.

La réversibilité électrochimique, quant à elle, fait référence à la cinétique de transfert d'électrons entre l'analyte et l'électrode. Lorsque le transfert d'électrons est rapide, l'équilibre Nernstien est établi presque instantanément après tout changement du potentiel appliqué, ce qui donne de petites valeurs de ΔE_p et des formes de pics caractéristiques. De tels systèmes sont dits électrochimiquement réversibles. En revanche, l'irréversibilité électrochimique se produit lorsque la cinétique du transfert d'électrons est lente, créant une barrière énergétique importante au transfert d'électrons. Dans ces cas, la réduction ou l'oxydation nécessite des potentiels plus extrêmes, ce qui entraîne des valeurs de ΔE_p plus grandes. Cette distinction entre réversibilité chimique et électrochimique est essentielle pour interpréter les données de voltampérométrie cyclique et comprendre le comportement de l'analyte étudié [68].

Il est essentiel de noter que les concepts électrochimiques abordés jusqu'à présent se concentrent principalement sur le transport de masse par diffusion, c'est-à-dire le déplacement des espèces sous l'influence d'un gradient de potentiel chimique, généralement un gradient de concentration. Cette simplification suppose que les autres formes de transport de masse, telles que la migration et la convection, sont négligeables. La migration fait référence au mouvement des particules chargées sous l'effet d'un champ électrique, ce qui peut influencer la distribution des ions près de l'électrode. La convection, quant à elle, concerne le brassage ou le transport hydrodynamique des espèces, qui peut perturber la couche de diffusion [67]. Pour minimiser ces effets et garantir la précision des mesures électrochimiques, on ajoute un électrolyte support en excès dans la solution afin de supprimer la migration en maintenant la neutralité électrique, et on évite l'agitation pour éliminer la convection. En contrôlant soigneusement ces variables, l'interprétation des processus dominés par la diffusion devient plus simple et fiable [6].

Bien que la voltampérométrie cyclique (VC) soit une technique puissante pour étudier le comportement électrochimique d'un système, la voltampérométrie à onde carrée (VOC) présente certains avantages dans des scénarios expérimentaux spécifiques. Les deux techniques reposent sur l'application de balayages de potentiel, mais la VOC utilise une forme d'onde plus complexe, composée de séries de pulsations d'onde carrée superposées à un potentiel en escalier. Cela permet une sensibilité accrue et une acquisition de données plus rapide par rapport

à la VC, en particulier pour les analytes à faible concentration ou lorsque des rapports signal/bruit élevés sont nécessaires. Dans la section suivante, nous explorerons les principes de la voltampérométrie à onde carrée, ses avantages par rapport à la voltampérométrie cyclique et ses applications spécifiques dans l'analyse électrochimique.

2.2.1.2 Voltampérométrie à onde carrée

La voltampérométrie à onde carrée (VOC) est une technique électrochimique avancée qui permet de mesurer les courants résultant de la réduction ou de l'oxydation des espèces analytiques en réponse à un balayage de potentiel composé de pulsations d'onde carrée. Contrairement à la voltampérométrie cyclique, où le potentiel est modifié de manière linéaire, la VOC applique des impulsions de potentiel superposées sur une pente de base, ce qui permet d'augmenter la résolution du signal et de réduire les effets de fond [69]. Cette méthode est particulièrement utile pour l'analyse des espèces à faibles concentrations, la détection de signaux rapides et l'amélioration du rapport signal/bruit. Dans cette section, nous explorerons les principes fondamentaux de la voltampérométrie à onde carrée, ses applications pratiques, ainsi que ses avantages par rapport à la voltampérométrie cyclique.

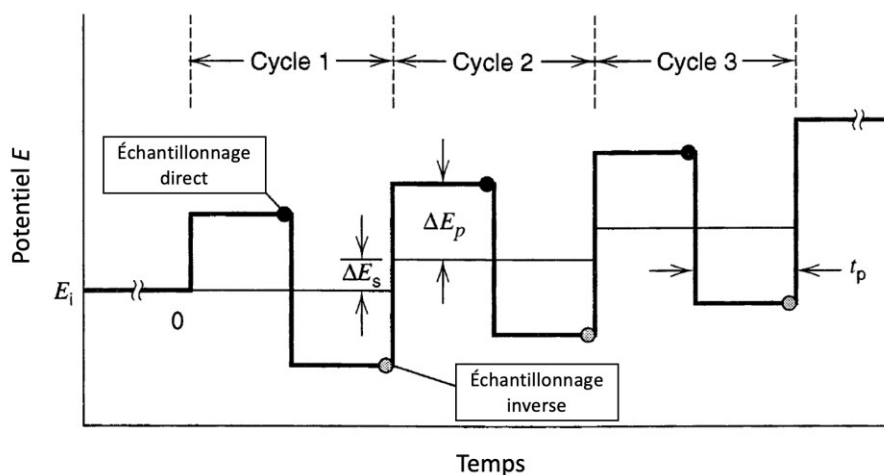


Figure 18. Fonction imposée dans la voltampérométrie à onde carrée.

La ligne en gras représente la forme d'onde de potentiel appliquée à l'électrode de travail. Les lignes plus claires indiquent l'escalier sous-jacent sur lequel l'onde carrée est superposée. Lors de chaque cycle, le courant direct est mesuré au moment indiqué par le point plein, tandis que le courant inverse est mesuré au moment marqué par le point ombré. Figure adaptée avec la permission de [6].

La VOC résulte de la procédure d'échantillonnage du courant. Si une réaction redox se déroule à partir de l'état dissous, le courant faradique diminue plus lentement que le courant capacitif. Les deux courants peuvent donc être séparés si la réponse est échantillonnée uniquement à la fin de chaque impulsion. L'onde utilisée en VOC (**Figure 18**) peut être interprétée comme un balayage de potentiel en escalier, où chaque pas est superposé à une double impulsion symétrique – une dans la direction avant et l'autre dans la direction inverse. Sur plusieurs cycles, ce motif forme une onde carrée bipolaire superposée au balayage en escalier, d'où le nom de la méthode [6,70,71].

La **Figure 18** illustre les principaux paramètres de la VOC. L'onde carrée est définie par sa hauteur d'impulsion (ΔE_p), mesurée par rapport au pas correspondant de l'escalier, et par sa largeur d'impulsion (t_p). Alternativement, la largeur d'impulsion peut être exprimée en termes de fréquence de l'onde carrée, f , où $f = \frac{1}{2t_p}$. Au début de chaque cycle, le potentiel de l'escalier est incrémenté d'une valeur ΔE_s , ce qui donne une vitesse de balayage de $v = \frac{\Delta E_s}{2t_p} = f\Delta E_s$. Le balayage commence à un potentiel initial (E_i), qui peut être maintenu pendant une durée arbitraire pour stabiliser le système [6].

Au cours de chaque cycle, le courant est échantillonné deux fois :

- Le courant direct (i_f) est mesuré à la fin de la première impulsion, qui correspond à la direction du balayage de l'escalier.
- Le courant inverse (i_r) est mesuré à la fin de la seconde impulsion, qui est opposée à la direction du balayage de l'escalier.

Le courant différentiel (Δ_i) est calculé comme $\Delta_i = i_f - i_r$. Bien que Δ_i fournisse des informations analytiques essentielles, les courants direct et inverse sont également précieux sur le plan diagnostique et sont conservés séparément. Ainsi, une expérience VOC produit trois voltampérogrammes : un pour le courant direct, un pour le courant inverse et un pour le courant différentiel, tous tracés en fonction du potentiel sur la marche correspondante de l'escalier [6,70,71].

Le paramètre t_p joue un rôle essentiel dans la définition de l'échelle de temps expérimentale pour la VOC, tandis que ΔE_p détermine l'espacement des points de données le long de l'axe des potentiels. Ensemble, ces paramètres définissent le temps total nécessaire pour effectuer un balayage complet. En général, ΔE_s est nettement inférieur à ΔE_p , qui représente l'amplitude de l'impulsion appliquée à chaque cycle. Cette relation garantit que la résolution des caractéristiques

voltammétriques le long de l'axe des potentiels est principalement déterminée par ΔE_p , qui définit l'étendue de l'interrogation dans chaque cycle.

Le paramètre temporel t_p est généralement modulé sur une large plage, de 1 à 500 ms (correspondant à une fréquence de 1–500 Hz). Les recommandations pratiques formulées suggèrent de fixer ΔE_s à $\frac{10}{n}$ mV et ΔE_p à $\frac{50}{n}$ mV, où n est le nombre d'électrons impliqués dans le processus redox. Par exemple, avec $\Delta E_s = 10$ mV et $t_p = 1-500$ ms, la vitesse de balayage varie de 5 V/s à 10 mV/s. Cette configuration permet d'enregistrer un voltampérogramme complet en un laps de temps court [6,70].

En VOC, la couche de diffusion n'est pas renouvelée au début de chaque cycle de mesure. Cela constitue une différence majeure par rapport à d'autres techniques de voltampérométrie par impulsions, où chaque cycle peut souvent être traité comme indépendant. En VOC, les conditions au début de chaque cycle sont déterminées par l'évolution cumulative de la couche de diffusion résultant de toutes les impulsions précédentes. Par conséquent, la modélisation théorique de la VOC devient beaucoup plus complexe, car elle doit tenir compte de la nature dépendante de l'historique de la couche de diffusion [6].

Cette complexité est encore accrue par le fait que l'état initial de la couche de diffusion pour chaque cycle dépend non seulement des détails de la forme d'onde appliquée, tels que l'amplitude des impulsions, la fréquence et la vitesse de balayage, mais également des cinétiques et des mécanismes des processus chimiques et électrochimiques couplés à l'électrode. Par exemple, des réactions de transfert d'électrons rapides peuvent produire des profils de couche de diffusion différents de ceux impliquant des cinétiques lentes ou des réactions chimiques secondaires telles que l'adsorption, la désorption ou la catalyse homogène en solution [6].

Examinons maintenant le cas où la réaction électrochimique $R \rightleftharpoons O + ne$ se déroule avec une cinétique réversible. Dans ce scénario, la solution contient initialement uniquement l'espèce R , sans O présent dans le volume de la solution. Avant le début du balayage en VOC la solution est homogénéisée, et le potentiel initial ΔE_i est fixé à une valeur bien inférieure à $E^{0'}$. Cela garantit que les profils de concentration des espèces redox sont uniformes au commencement de l'expérience.

Étant donné la rapidité de la technique VOC, le comportement du système est limité au régime de diffusion linéaire semi-infinie pour la plupart des électrodes, une condition que nous supposons valide dans cette analyse. Cette simplification permet une interprétation plus claire des gradients de concentration et des réponses en courant observées au cours de l'expérience.

La **Figure 19** illustre les transitoires de courant et les courants échantillonnés pour l'expérience en question. Aux premiers stades de l'application du potentiel en escalier, les courants sont faibles car le potentiel reste nettement plus négatif que $E^{0'}$, empêchant ainsi l'électrolyse. Dans cette région, l'impulsion directe ne pousse pas le système dans la plage de potentiel où une oxydation significative de R peut se produire.

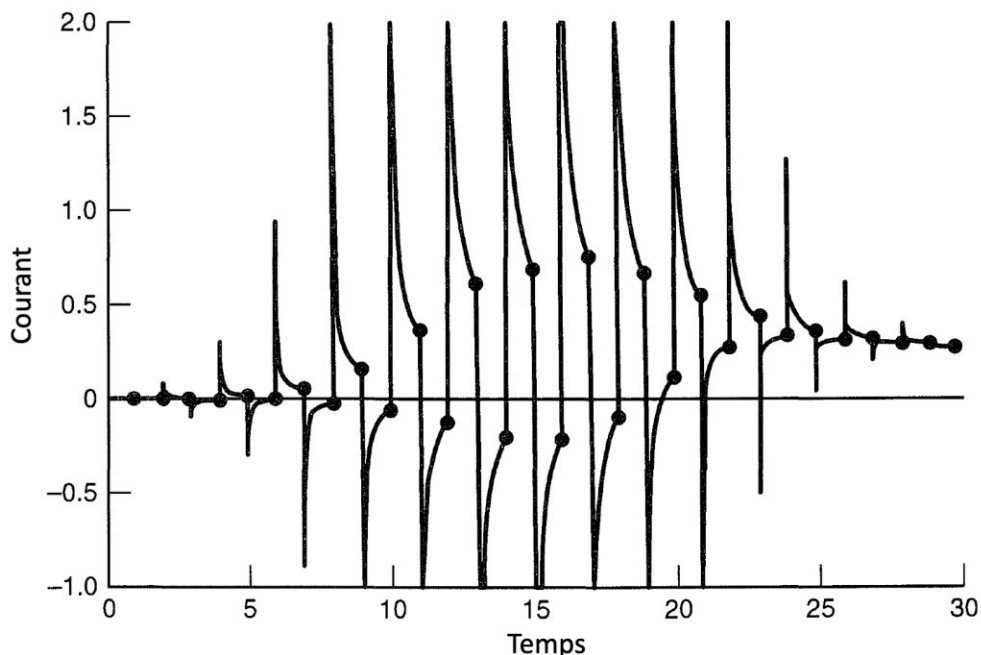


Figure 19. Transitoires de courant pour une expérience de VOC.

Réponse en courant au cours d'une expérience VOC pour un système réversible R/O où O est absent dans la solution en vrac, avec le balayage commençant à un potentiel nettement plus positif que $E^{0'}$. Les courants anodiques sont tracés vers le haut. Figure adapté avec permission de [6].

À mesure que le potentiel en escalier progresse vers $E^{0'}$, le système entre dans une région où le taux d'électrolyse devient fortement dépendant du potentiel. Dans cette phase intermédiaire, l'impulsion directe augmente considérablement le taux d'oxydation de R , tandis que l'impulsion inverse annule partiellement cette oxydation, entraînant un courant cathodique. Ce comportement reflète l'interaction dynamique entre oxydation et ré-réduction lorsque le potentiel en escalier approche et dépasse légèrement $E^{0'}$.

Vers la droite de la **Figure 19**, le potentiel en escalier devient nettement supérieur à $E^{0'}$, atteignant une plage où le taux d'électrolyse est contrôlé par la diffusion et largement indépendant

du potentiel. Ici, les impulsions directe et inverse ont un impact réduit sur le courant, ce qui conduit à des courants échantillonnés similaires. Le courant de l'impulsion directe diminue par rapport à la région intermédiaire en raison de l'électrolyse cumulative au fil de plusieurs cycles, ce qui appauvrit la couche de diffusion et ralentit l'arrivée de R à la surface de l'électrode. Cet effet d'appauvrissement explique la diminution continue des courants échantillonnés à l'extrémité positive du potentiel en escalier.

Le courant différentiel, représentant le signal net après soustraction des courants des impulsions inverses de ceux des impulsions directes, atteint un maximum près de $E^{0'}$ et diminue de part et d'autre, mettant en évidence la sensibilité du système aux variations de potentiel à proximité du potentiel formel. La **Figure 20** présente une représentation des voltampérogrammes qui résulteraient d'une expérience comme celle décrite. Les courants direct et inverse ressemblent à un voltampérogramme cyclique et offrent des informations diagnostiques similaires.

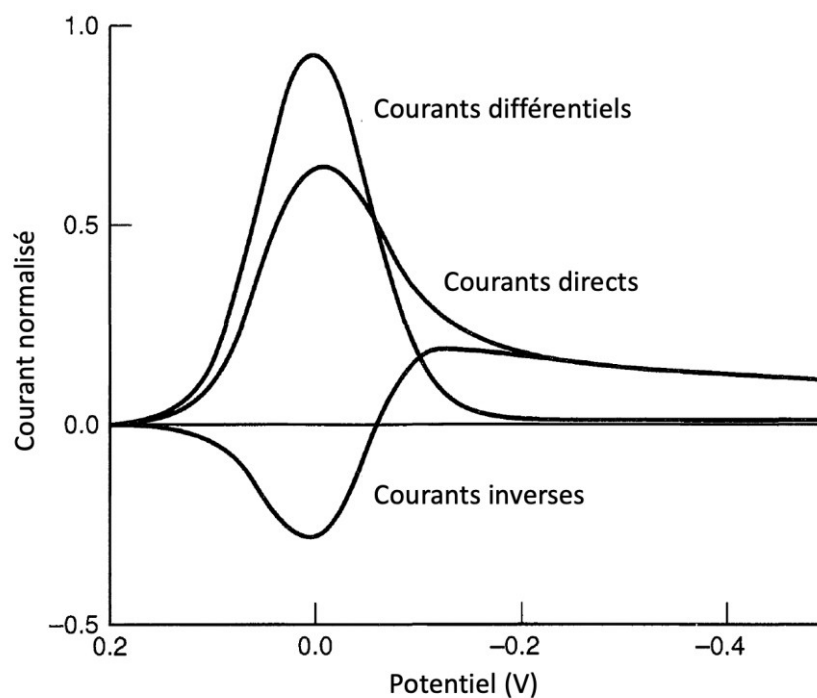


Figure 20. Voltampérogrammes en onde carrée pour le cas réversible R/O avec O absent de la solution [6].

Comparée à la plupart des méthodes à impulsion, la VOC offre une acquisition de données plus rapide tout en maintenant une résolution élevée, ce qui la rend particulièrement efficace. De plus, son efficacité temporelle est comparable à celle de la voltampérométrie cyclique, renforçant ainsi

son attractivité pour des usages analytiques et diagnostiques courants. La VOC est particulièrement utile pour l'analyse d'échantillons complexes contenant plusieurs analytes. Sa capacité à distinguer des signaux superposés repose sur le comportement indépendant de chaque analyte, avec un voltampérogramme résultant qui est la somme des réponses individuelles. Lorsque la séparation entre les potentiels de pic est suffisante, chaque analyte peut être quantifié de manière indépendante, même dans un mélange. Cela souligne le potentiel de la VOC pour une détection précise et sélective de plusieurs analytes, ce qui la rend essentielle dans l'analyse électrochimique moderne [5].

2.2.2 L'importance du matériel d'électrode

Le choix du matériau d'électrode est un facteur crucial dans la conception et l'optimisation des systèmes électrochimiques, car il influence significativement la sensibilité, la sélectivité et l'efficacité globale du processus. Les métaux comme le platine et l'or sont couramment utilisés en raison de leur excellente conductivité, de leur stabilité chimique et de leur capacité à faciliter une large gamme de réactions redox [72,73]. Cependant, leur coût élevé et leur susceptibilité à l'encrassement dans certains environnements peuvent limiter leur praticité pour des applications spécifiques. Alternativement, les oxydes métalliques et les composites métalliques mixtes offrent des propriétés catalytiques améliorées et une meilleure sélectivité pour certaines réactions, ce qui les rend idéaux pour des usages analytiques ou industriels ciblés [74]. Ces matériaux présentent souvent une durabilité accrue dans des environnements agressifs, élargissant ainsi leur champ d'application.

Les progrès récents ont mis en lumière le potentiel de matériaux émergents tels que le diamant dopé au bore et les polymères conducteurs, qui combinent stabilité et propriétés ajustables avec une grande résistance chimique [75]. Ces matériaux sont particulièrement précieux dans les systèmes nécessitant des rapports signal-bruit élevés ou des durées de fonctionnement prolongées dans des conditions extrêmes.

Dans le cadre de cette thèse, les matériaux à base de carbone se distinguent comme le choix optimal en raison de leur remarquable polyvalence et adaptabilité. Les électrodes en carbone, y compris le carbone vitreux, le carbone pyrolytique, et le graphène et ses dérivés, présentent une excellente conductivité électrique, une large fenêtre électrochimique et une bonne stabilité chimique [76–78]. De plus, leurs propriétés de surface peuvent être modifiées pour améliorer leurs performances dans des applications spécifiques, telles que l'électrochimie biologique. L'utilisation de matériaux à base de carbone répond aux exigences du système étudié, offrant un équilibre entre rentabilité et haute fonctionnalité. Cela en fait un composant indispensable pour faire progresser le domaine de la recherche électrochimique et de ses applications pratiques.

Parmi les matériaux carbonés, le graphène et ses dérivés, en particulier l'oxyde de graphène (GO), se sont imposés comme des candidats exceptionnels pour les applications électrochimiques avancées. Grâce à sa structure bidimensionnelle unique, sa conductivité électrique exceptionnelle (autour de 4.57×10^{-8} S/cm) et sa grande surface spécifique (autour de 2391 m²/g pour un feuillet individuel de graphène), l'oxyde de graphène offre des performances supérieures pour la détection électrochimique et les réactions redox complexes. De plus, ses groupes fonctionnels oxygénés confèrent des propriétés chimiques modulables, permettant une interaction spécifique avec diverses cibles analytiques et un potentiel de personnalisation sans égal. Ces caractéristiques font de l'oxyde de graphène un matériau clé dans le cadre de cette

thèse, offrant une plateforme idéale pour des études électrochimiques approfondies et des innovations technologiques.

2.2.2.1 L'Oxide de graphène

Les matériaux à base de graphène (MG) ont attiré une attention considérable au cours des dernières décennies en raison de leurs propriétés physico-chimiques intrinsèques et de leurs larges applications dans différents domaines tels que le stockage et la conversion d'énergie, la catalyse et les études biomédicales [12,79–81]. Parmi les MG, l'oxyde de graphène (GO) se distingue par ses propriétés uniques qui incluent une grande surface spécifique, une bonne résistance mécanique, une haute conductivité et une hydrophilie remarquable.

Le GO est une forme hautement oxydée de graphène à une seule couche qui contient des groupes fonctionnels oxygénés à la surface, réduisant les interactions π - π et empêchant l'empilement irréversible des feuillets et l'agglomération [12]. Les bords du GO sont riches en groupes qui donnent une charge négative dépendante du pH et une stabilité colloïdale, tandis que le plan basal est riche en groupes hydroxyles qui le rendent hydrophile et jouent un rôle important dans les propriétés physico-chimiques du matériau. Les groupes hydroxyles influencent également l'adhésion du GO aux surfaces cellulaires vivantes et ses effets physiologiques possibles [12,82]. Les régions non modifiées du GO restent hydrophobes, ce qui facilite ses interactions avec les biomolécules ou les médicaments par liaison π - π [83]. De plus, la fonctionnalisation du GO avec des molécules organiques peut être facilement réalisée pour améliorer ses interactions avec des entités d'intérêt [84]. Ces caractéristiques uniques font du GO un matériau prometteur pour diverses applications biomédicales telles que la livraison de médicaments et de gènes, la biosurveillance, la photothérapie, la thérapie multimodale du cancer et la théranostique.

Malgré son potentiel, des préoccupations concernant la toxicité du GO persistent, nécessitant des investigations supplémentaires. La toxicité du GO a été évaluée in vivo et in vitro au cours des dernières décennies, et les résultats sont contradictoires selon le modèle biologique étudié [85]. Le GO et le GO réduit (rGO), qui contient considérablement moins de groupes fonctionnels oxygénés, ont été utilisés avec succès pour la délivrance de médicaments [85–98], la délivrance de gènes [8], la régénération des tissus et des organes [9,87,99], l'amélioration de la transmission synaptique [10] et les biocapteurs [11]. Dans toutes ces études, la biocompatibilité des matériaux de GO semble remarquable. D'autres chercheurs ont également constaté que le GO semble

inoffensif pour certains organismes vivants comme certaines espèces d'algues et de plantes aquatiques [100,101].

En revanche, d'autres études ont montré que le GO peut être très toxique pour les mammifères comme les souris, les rats et les lapins [102,103], ainsi que pour les poissons zèbres [104–107]. Cela est particulièrement préoccupant car ce sont les principaux modèles animaux utilisés dans la recherche biomédicale. En particulier, le GO s'est avéré toxique pour le système nerveux [104,105], le système reproducteur [102,108,109], et il a été démontré qu'il peut entraver la photosynthèse et induire une cytotoxicité chez certaines algues [110].

Dans certains cas, les matériaux de GO se sont révélés suffisamment cytotoxiques pour être utilisés dans le développement de revêtements antimicrobiens en raison de leur impact sur les cultures bactériennes pures et sur les communautés bactériennes [111–113]. Ils ont même été utilisés comme antimicrobiens efficaces pour éradiquer les bactéries multirésistantes [114]. Cependant, l'effet du GO sur toutes les espèces de bactéries n'a pas encore été étudié, et le rôle de certaines bactéries environnementales dans la transformation et la biodégradation des matériaux de GO traités comme des déchets toxiques dans l'environnement n'est toujours pas bien compris et fait actuellement l'objet de discussions [115].

Ces résultats contradictoires indiquent plutôt que le GO pourrait être capable d'interagir de différentes manières avec différentes entités biologiques en fonction de la structure fondamentale de l'entité et du GO lui-même. Une caractérisation adéquate du GO et de son effet sur l'entité biologique spécifique est donc importante lors de l'utilisation de ce matériau pour des applications biologiques. Das *et al.* ont proposé que la densité des groupes fonctionnels oxygénés sur le GO est l'un des composants clés dans la médiation de la cytotoxicité cellulaire avec la taille des feuillets de GO, la netteté des bords et la fonctionnalisation du matériau [13]. Il est donc important de fabriquer des matériaux de GO adaptés à l'application biologique spécifique envisagée.

Actuellement, différentes stratégies peuvent être employées pour améliorer les caractéristiques de l'oxyde de graphène (GO) et promouvoir sa stabilité, sa biodisponibilité et sa biocompatibilité. Par exemple, la PEGylation peut améliorer la biocompatibilité, la solubilité et la stabilité du matériau dans des conditions physiologiques [14]. L'utilisation de copolymères tels que Pluronic F127 offre une stabilisation stérique [116]. Les interactions non covalentes, telles que les interactions π - π avec des molécules organiques aromatiques comme le 1-pyrènebutyrate, peuvent améliorer la stabilité aqueuse [117]. De plus, des peptides synthétiques tels que la poly-L-lysine peuvent être utilisés pour améliorer l'activité biologique du GO [99]. D'autres stratégies en plus de la fonctionnalisation peuvent être utilisées pour réduire la toxicité du GO, par exemple

Schmuck *et al.* [82] ont étudié l'efficacité de la lyophilisation et de la sonication pour réduire la toxicité du GO afin d'améliorer sa biocompatibilité environnementale. Cette polyvalence permet au GO d'être potentiellement utilisé dans une large gamme de dispositifs et de systèmes biomédicaux.

Dans le domaine de l'électrochimie, le GO a trouvé des applications telles que la réduction électrocatalytique du CO₂ [118], la surveillance électrochimique du mancozèbe [119], la dégradation électrocatalytique de l'acétaminophène [120], l'oxydation électrocatalytique de l'hydrazine [121], et la fabrication d'aptasenseurs pour la détection de la cocaïne [11]. Cependant, l'effet du GO sur les structures subcellulaires et leur réponse électrochimique directe n'a jamais été investigué. Cela est important car il a été prouvé que le GO peut être internalisé dans les cellules via l'endocytose et que son interaction avec les organites intracellulaires et les machineries déclenche des réponses cellulaires [122]. De plus, l'utilisation de plateformes électrochimiques pour l'étude des structures subcellulaires pourrait permettre une meilleure compréhension des phénomènes biochimiques fondamentaux et le développement d'outils simples permettant une évaluation directe de la fonction cellulaire.

2.3 Électrochimie mitochondriale

Comme nous étudierons dans cette section, l'exploration des principes électrochimiques au sein des systèmes mitochondriaux met en évidence leur rôle fondamental dans la compréhension des réactions redox biologiques, des gradients de protons et de la synthèse de l'ATP. En utilisant des méthodes électrochimiques les chercheurs ont dévoilé des détails complexes sur le transport des électrons et la dynamique du potentiel membranaire, établissant un pont entre la biochimie et la biophysique. Ces techniques fournissent des informations quantitatives sur l'énergétique et la cinétique des processus mitochondriaux, offrant une base pour étudier les dysfonctionnements associés à certaines maladies. Cette section se consacrera à un examen de la littérature sur l'électrochimie mitochondriale, mettant en lumière les découvertes clés, les méthodologies et les tendances émergentes qui approfondissent notre compréhension de ces processus bioénergétiques essentiels.

L'électrochimie des mitochondries a suscité un intérêt croissant au cours des deux dernières décennies, notamment après la découverte que des voltampérogrammes cycliques (VC) avec des pics rédox distincts peuvent être enregistrés à partir de mitochondries déposées sur des électrodes en graphite pyrolytique (PGE) [16]. Cette avancée a mis en lumière le potentiel des mitochondries en tant que bioélectrocatalyseurs dans diverses applications électrochimiques. Par exemple, leur capacité à oxyder complètement des biocarburants tels que le pyruvate a été exploitée dans des piles à biocarburant, où les mitochondries servent de bioanodes pour des systèmes de conversion d'énergie [19–21]. De plus, la sensibilité de la chaîne de transport d'électrons (CTE) à des inhibiteurs spécifiques, notamment les antibiotiques, les pesticides et les explosifs nitroaromatiques, a permis le développement de biocapteurs électrochimiques pour détecter ces composés nocifs [22–25,123,124].

2.3.1 Études fondamentaux sur l'électrochimie mitochondriale

Les premières recherches sur l'électrochimie mitochondriale ont jeté les bases de notre compréhension des processus rédox au sein de ces organites. Zhao *et al.* figurent parmi les premiers à avoir observé des pics voltammétriques dans les VC enregistrés à partir de mitochondries isolées dérivées de cellules HeLa et immobilisées sur des PGE. Les auteurs ont attribué ces pics à des espèces rédox-clés, notamment cyt c, Q, et le couple FAD/FADH₂. Ces molécules, intrinsèques à la CTE, agissent comme des navettes électroniques entre la MMI et l'électrode sous un potentiel appliqué [16].

Des études ultérieures ont affiné cette compréhension en mettant l'accent sur le rôle de la CoQ en tant que principal contributeur aux signaux rédox mitochondriaux [17,18]. Giroud *et al.* ont mené une analyse comparative de mitochondries isolées de levure, de pomme de terre et de cœur de bovin, et ont identifié CoQ comme la principale source d'activité électrochimique. Leurs résultats ont montré que la CoQ pure générerait des pics rédox similaires à ceux observés dans les mitochondries intactes, tandis que le cyt c pur seul ne produisait pas de signaux analogues comme montré dans la **Figure 21**. Cependant, l'élimination de la CoQ ou du cyt c des mitochondries entraînait une atténuation des signaux électrochimiques, indiquant que ces deux composants contribuent de manière synergique à l'activité rédox observée. Cette interdépendance met en évidence la nature intégrée de la CTE, où le cyt c et la CoQ jouent des rôles distincts mais complémentaires dans les processus de transfert d'électrons [17].

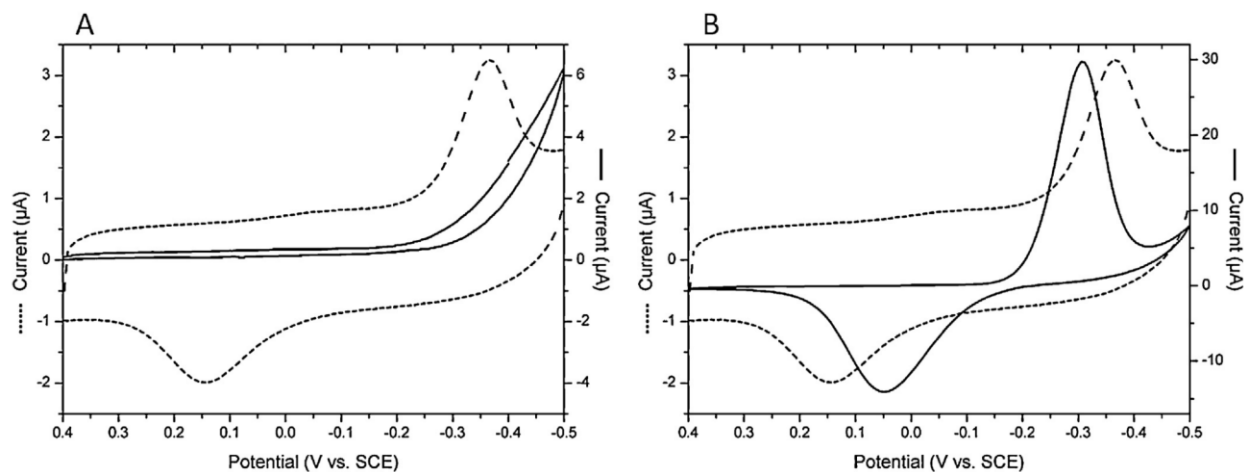


Figure 21. Signaux électrochimiques des mitochondries isolées, du cytochrome C et de la Coenzyme Q.

Voltampérométrie cyclique obtenue avec une électrode modifiée par le cytochrome c (A) et une électrode modifiée par la coenzyme Q10 (B), comparée au signal obtenu avec des électrodes modifiées par des mitochondries de levure (ligne pointillée), dans une solution contenant 100 mmol·L⁻¹ de phosphate, 100 mmol·L⁻¹ de nitrate et 100 mmol·L⁻¹ de pyruvate, à une vitesse de balayage de 10 mV·s⁻¹. Reproduit avec la permission de [17].

Les défis associés à l'élimination sélective de la CoQ sans perturber l'intégrité mitochondriale soulignent la complexité de l'étude de ces systèmes. Les enzymes de la CTE, telles que la cytochrome C oxydase (complexe IV), ont une forte affinité pour la CoQ et sont sensibles aux solvants utilisés pour les protocoles de déplétion de la CoQ. De plus, l'exposition des mitochondries à de fortes concentrations de KCl lors de l'élimination du cyt c ou de la CoQ entraîne une perturbation structurelle des mitochondries [44,125,126]. Ces limites nécessitent des considérations méthodologiques minutieuses pour préserver la fonctionnalité mitochondriale pendant les analyses électrochimiques.

Des recherches récentes ont mis en évidence l'impact significatif des méthodes d'isolement et de manipulation des mitochondries sur leurs propriétés électrochimiques et leur respiration [18]. En particulier, les processus de purification et la composition des tampons jouent des rôles cruciaux dans le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des mitochondries. Ces effets sont plus prononcés dans les mitochondries de levure, qui possèdent une paroi cellulaire robuste nécessitant des traitements enzymatiques ou mécaniques rigoureux pour leur isolation. La **Figure 22** présente les voltammogrammes cycliques de mitochondries saines et malsaines isolées de levures sauvages, avec et sans découplage par le DNP (2,4-dinitrophénol) obtenus par Koepke *et al.* Les mitochondries malsaines présentent les mêmes pics électrochimiques indépendamment de l'ajout de DNP. Ce résultat suggère que les mitochondries malsaines sont déjà découplées avant l'ajout de DNP. Ces traitements entraînent souvent des dommages structurels plus importants par rapport aux mitochondries de mammifères, qui sont généralement isolées avec un minimum de compromis sur leur intégrité [18].

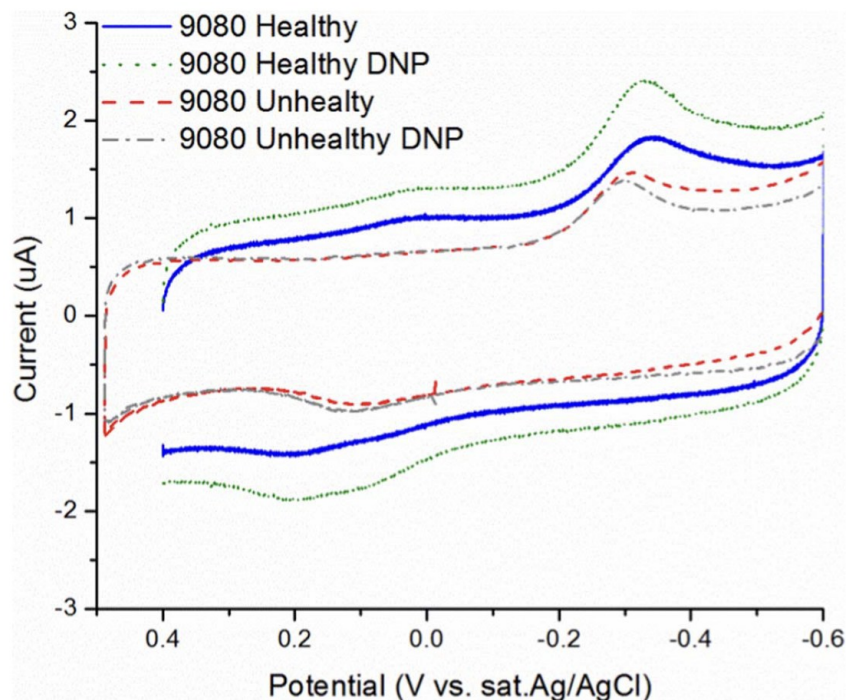


Figure 22. Effet des conditions de purification sur l'électrochimie mitochondriale.

Voltammogrammes cycliques représentatifs de mitochondries de levure de type sauvage (9080) isolées par des méthodes saines (bleu et vert) et non saines (rouge et gris), les deux étant découplées par le DNP (vert et gris). Reproduit avec la permission de [18].

Dans cette étude, les auteurs ont aussi utilisé des mutants de levure dépourvus de composants spécifiques de la CTE, tels que Δcyc3 (déficient en cyt c) et Δcox10 (déficient en complexe IV) [18]. Les voltampérogrammes cycliques enregistrés à partir de ces mutants ont montré une activité rédox significative malgré l'absence de cyt C et de complexe IV. Cette observation suggère que d'autres composants de la CTE ou des constituants mitochondriaux peuvent agir comme des donneurs d'électrons alternatifs dans ces systèmes. Néanmoins, les détails précis du mécanisme de transfert d'électrons restent des sujets de discussion.

2.3.2 Piles à combustible biologiques à base de mitochondries

Au-delà des études fondamentales, les propriétés électrochimiques des mitochondries ont suscité un intérêt croissant pour des applications technologiques, notamment dans le domaine émergent des piles à combustible biologiques. Arechederra et al. [21] ont démontré pour la première fois qu'il est possible d'immobiliser des mitochondries intactes à la surface d'une électrode de carbone, conservant leur fonctionnalité pour catalyser l'oxydation complète du pyruvate en dioxyde de carbone, comme confirmé par RMN-¹³C [21]. Cette preuve de concept a conduit à la conception de biopiles mitochondriales capables de convertir l'énergie chimique en énergie électrique avec une densité de puissance de 0,203 mW/cm², tel que montré dans la **Figure 23**.

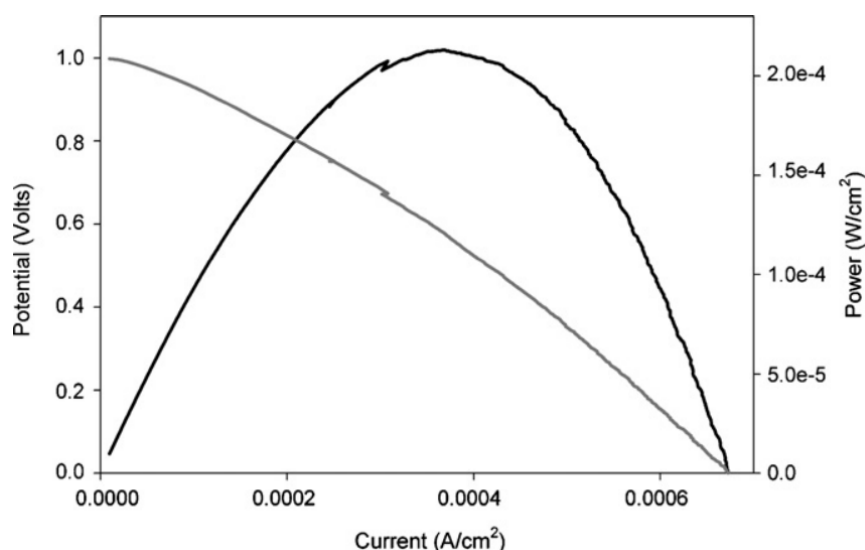


Figure 23. Courbe de puissance d'une biopile mitochondriale au pyruvate.

Courbe de polarisation représentative et courbe de puissance pour une biopile au pyruvate avec une bioanode modifiée par des mitochondries dans un carburant contenant 100 mM de pyruvate et un tampon phosphate à pH 7,15. Reproduit avec la permission de [21].

Dans une étude subséquente, les mêmes auteurs ont optimisé les conditions de fonctionnement de ces bioanodes mitochondriales, en soulignant l'importance de préserver l'intégrité structurale des organites [19]. Ils ont également mis en évidence que l'élimination de la compétition entre le transfert d'électrons vers l'oxygène (via le cytochrome c oxydase) et vers l'électrode améliore significativement les performances de la cellule. Dans une perspective comparative, Bhatnagar et al. ont positionné les piles mitochondriales comme un compromis prometteur entre les piles enzymatiques et microbiennes, en combinant la capacité de transformer une grande diversité de substrats — y compris le pyruvate, les acides gras et certains acides aminés — avec une efficacité énergétique et une densité de courant élevées [20]. Ces travaux mettent en lumière le potentiel des mitochondries non seulement comme catalyseurs naturels mais aussi comme

plateformes adaptables pour des dispositifs bioélectrochimiques exploitables dans des environnements contenant des mélanges complexes de carburants biologiques.

2.3.3 Biocapteurs électrochimiques à base de mitochondries

Les propriétés bioélectrochimiques uniques des mitochondries, en particulier leur capacité à catalyser la conversion de substrats métaboliques via la chaîne respiratoire, ont récemment été exploitées dans le développement de capteurs électrochimiques innovants. L'immobilisation des mitochondries sur une électrode permet non seulement la production d'énergie à partir de substrats comme le pyruvate, mais aussi la détection de composés toxiques ou biologiquement actifs. Germain et al. [24] ont démontré qu'une électrode avec des mitochondries inhibées pouvait servir de capteur de type "seuil" pour les explosifs nitroaromatiques, grâce à leur capacité à décatalyser l'effet inhibiteur d'oligomycine, ce qui réactive l'oxydation du pyruvate et induit une réponse mesurable **Figure 24**.

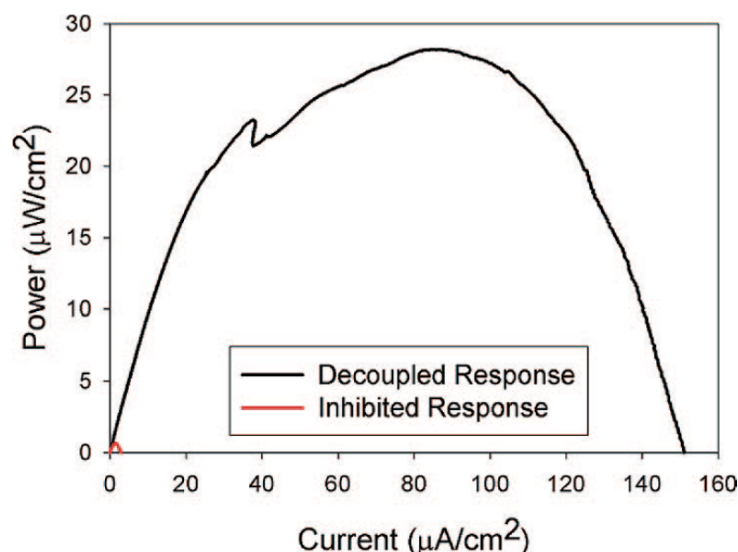


Figure 24. Capteur électrochimique d'explosifs à base de mitochondries.

Courbes de puissance représentatives pour l'inhibition par 1 μM d'oligomycine et le découplage par 1 μM de nitrobenzène d'une biopile pyruvate/air dans un carburant contenant 100 mM de pyruvate à température ambiante. Reproduit avec la permission de [24].

Ce concept a été approfondi par Arechederra et al. [25], qui ont évalué un large éventail d'inhibiteurs mitochondriaux et d'explosifs nitroaromatiques, confirmant que la réponse électrochimique permettait la détection de multiples explosifs via un mécanisme de découplage membranaire. Ces systèmes se distinguent par leur capacité à fonctionner sans source d'alimentation externe, ce qui ouvre la voie à des capteurs auto-alimentés.

Au-delà de la détection d'explosifs, les électrodes mitochondriales ont également été explorées pour la détection de pesticides, dont plusieurs inhibent la chaîne de transport d'électrons. Maltzman et al. [22] ont ainsi montré que l'ajout de pesticides comme l'atrazine, le paraquat ou le parathion provoquait une atténuation mesurable de la bioélectrocatalyse du pyruvate, avec des limites de détection compatibles avec les concentrations réglementaires. Cette approche indirecte, qui repose sur la mesure de la toxicité mitochondriale plutôt que sur l'identification directe du composé, suggère une capacité de détection large mais peu sélective. Dans une logique de miniaturisation et de portabilité, Wang et al. [23] ont transposé ces systèmes sur des dispositifs à base de papier intégrant des électrodes mitochondriales. Leur capteur, capable de détecter le malathion à des concentrations de l'ordre de 20 nM, montre le potentiel de ces dispositifs pour le monitoring sur site de contaminants environnementaux.

Enfin, l'électrochimie mitochondriale a également été proposée comme outil d'analyse pharmacologique et de criblage de molécules bioactives. Arechederra et al. [123] ont utilisé des mitochondries immobilisées sur des électrodes pour évaluer l'effet inhibiteur de différents analogues de sulfonamides sur plusieurs voies métaboliques. En mesurant la réponse électrochimique liée à l'oxydation de substrats comme le pyruvate, l'acétate ou le succinate, ils ont mis en évidence la capacité de certains composés à moduler sélectivement le métabolisme mitochondrial, ouvrant des perspectives pour la conception de molécules ciblant le métabolisme énergétique dans des contextes thérapeutiques comme l'obésité ou le diabète.

Ces travaux illustrent la polyvalence des mitochondries en tant qu'éléments biofonctionnels dans la conception de capteurs électrochimiques, que ce soit pour la détection environnementale, la biosécurité ou le développement pharmaceutique. Leur capacité à répondre à des signaux chimiques via des voies de métabolisme complexes en fait des candidats uniques pour des capteurs sensibles, auto-alimentés et potentiellement sélectifs, bien que des efforts restent nécessaires pour améliorer la stabilité, la reproductibilité et la miniaturisation de ces systèmes.

En conclusion, l'électrochimie mitochondriale s'est imposée comme un domaine de recherche dynamique, reliant la biologie fondamentale à des applications technologiques innovantes. Les avancées dans la compréhension du comportement électrochimique des mitochondries ont non seulement approfondi nos connaissances sur la dynamique de la CTE, mais ont également ouvert la voie au développement de dispositifs bio-inspirés pour les applications énergétiques et de détection. Ces découvertes mettent en évidence l'interaction complexe des composants mitochondriaux dans les processus rédox et soulignent le potentiel des mitochondries en tant qu'outils polyvalents dans la recherche bioélectrochimique. Toutefois, de nombreux défis

demeurent pour améliorer la sensibilité, la spécificité et la stabilité de ces technologies. La recherche continue dans ce domaine pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux de la bioénergétique cellulaire et de développer de nouvelles approches pour la gestion des maladies mitochondriales. En particulier, la question de l'identité de la molécule responsable et du mécanisme exact de transfert d'électrons entre la chaîne de transport des électrons (CTE) et la surface des électrodes reste un sujet de débat, soulignant la nécessité d'approfondir les investigations pour lever ces incertitudes fondamentales.

2.4 Électrochimie à l'échelle nanométrique

Comme nous le verrons dans les sections suivantes, l'électrochimie à l'échelle nanométrique est un outil d'une importance capitale pour l'étude des systèmes biologiques. Elle permet non seulement d'analyser ces systèmes dans un environnement confiné, offrant une précision accrue, mais elle ouvre également la possibilité d'étudier *in situ* les phénomènes biologiques. Ceci est rendu possible grâce à l'utilisation d'ultramicroélectrodes (UMEs) qui perturbent minimalement le système étudié, préservant ainsi son intégrité et assurant des mesures plus représentatives de son état naturel.

Les UMEs, c'est-à-dire des ultramicroélectrodes avec une dimension critique inférieure à 25 μm , ont été utilisées dans un grand nombre d'applications diverses depuis leur introduction en chimie électro analytique dans les années 1980 [26]. Ces électrodes miniaturisées ont révolutionné le domaine en permettant des analyses et des études à des échelles auparavant inaccessibles. Parmi ces applications figurent l'étude détaillée des réactions chimiques homogènes et hétérogènes [26,27], où les UMEs offrent une précision accrue pour examiner les mécanismes réactionnels et les processus cinétiques associés. Elles ont également permis la réalisation d'expériences avec des nanoparticules uniques [127,128], ouvrant la voie à la compréhension des propriétés électrochimiques à l'échelle nanométrique.

De plus, les UMEs ont trouvé des applications dans l'exploration de petits environnements tels que des cellules vivantes individuelles [29], ce qui a des implications significatives pour la bioélectrochimie et les études *in situ* des processus biologiques. L'imagerie électrochimique à haute résolution [30,31] est une autre application majeure, où la petite taille des UMEs permet d'obtenir des informations détaillées sur les surfaces et interfaces, améliorant ainsi la qualité et la résolution des images obtenues. Elles sont également essentielles pour l'étude des réactions électrochimiques dans des solutions de haute résistance ou se produisant sur des échelles de temps très courtes [115,116], situations où les électrodes conventionnelles seraient inadaptées en raison de limitations techniques.

Toutes ces applications sont rendues possibles grâce aux caractéristiques uniques des UMEs, notamment un taux élevé de transport de masse, qui augmente l'efficacité du transfert d'espèces électrochimiques vers la surface de l'électrode, de faibles effets capacitifs et résistifs, réduisant ainsi les interférences et le bruit de fond dans les mesures, et de faibles constantes de temps [32–34], permettant des réponses rapides aux changements des conditions expérimentales. Ces propriétés confèrent aux UMEs une sensibilité et une précision accrues pour détecter et analyser les phénomènes électrochimiques.

En raison du grand intérêt pour les UMEs et de leur potentiel pour des avancées scientifiques significatives, les chercheurs s'efforcent continuellement de démêler les principes fondamentaux sous-jacents qui déterminent la cinétique et la thermodynamique des réactions électrochimiques se produisant à ces structures [129–131]. Comprendre ces mécanismes est essentiel pour optimiser l'utilisation des UMEs et pour développer de nouvelles applications innovantes à l'avenir. Les efforts de recherche comprennent l'exploration des interactions à l'échelle moléculaire, l'amélioration des techniques de fabrication des UMEs et l'élaboration de modèles théoriques pour prédire et interpréter les comportements observés. Ainsi, les UMEs continuent de jouer un rôle central dans l'évolution de la chimie électroanalytique et de ses nombreuses applications connexes.

En outre, la capacité de la double couche (C_{dl}), associée à la résistance de la solution de travail (R_s), impose de nombreuses limitations aux expériences électrochimiques à l'échelle macroscopique [35]. Dans un système électrochimique, la capacité de la double couche (C_{dl}) et la résistance de la solution (R) sont souvent considérées ensemble dans les modèles de circuits équivalents, car elles influencent conjointement la dynamique du transfert de charge à l'interface électrode/électrolyte. La résistance de la solution représente l'opposition au passage du courant ionique dans l'électrolyte entre les électrodes, tandis que la capacité de la double couche provient de l'accumulation de charges opposées de part et d'autre de l'interface électrode-solution, formant un condensateur électrochimique. Ensemble, ces deux éléments forment un circuit de type RC, dont la constante de temps ($\tau = RC$) détermine la rapidité avec laquelle le système réagit à une perturbation électrique. Ainsi, cette association influence les mesures dynamiques, notamment dans les techniques à balayage rapide comme la voltampérométrie cyclique ou l'impédance électrochimique, où la réponse temporelle du courant dépend de la capacité de la double couche et de la résistance de la solution.

Les petites dimensions des UME réduisent significativement la C_{dl} , entraînant un faible produit $C_{dl}R_s$, qui représente la constante de temps sur laquelle le potentiel de l'électrode de travail peut être contrôlé. Un faible $C_{dl}R_s$ permet de réaliser des expériences à l'échelle de la nanoseconde, d'étudier les réactions de transfert d'électrons ultrarapides à l'électrode et de détecter des espèces intermédiaires de courte durée de vie [32,35]. Cela constitue une raison supplémentaire qui a motivé l'utilisation des UME.

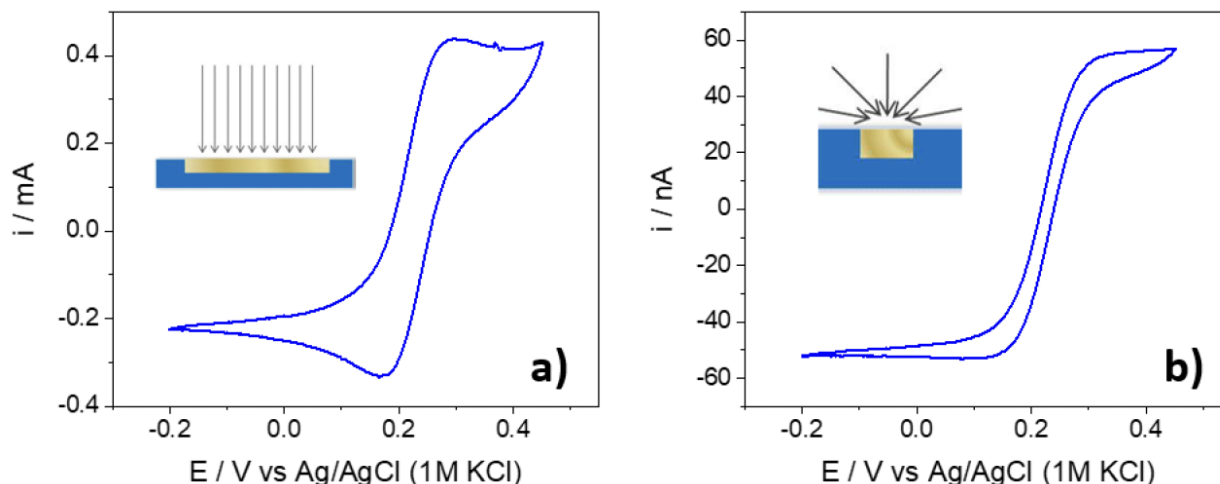


Figure 25. Diffusion vers la surface des macroélectrodes et des UME.

Voltampérogrammes cycliques d'une solution de 5 mM de Fe(CN)_6^{3-} et Fe(CN)_6^{4-} sur a) une macroélectrode et b) une ultramicroélectrode (UME). Les encadrés montrent les profils de diffusion correspondants.

De plus, la réduction de la taille des électrodes dans les UME permet à la diffusion radiale de devenir la forme dominante de transport de masse vers leur surface (**Figure 25**). Ce phénomène facilite la surveillance des courants à l'état stationnaire, simplifiant ainsi l'utilisation des UME dans des conditions où les variations de potentiel sont défavorables [26]. Le transport de masse plus rapide aux UME, comparé à celui des électrodes macroscopiques, contribue également à l'étude des cinétiques de transfert d'électrons rapides en utilisant des expériences à l'état stationnaire. Comme montré dans la **Figure 25**, la diffusion radiale permet d'obtenir voltampérogrammes avec des courants limite au lieu de pics car les processus électrochimiques dans des UME sont limités seulement par le transport de masse (et le taux de transfert d'électrons pour un système spécifique) et non par la formation d'une couche de diffusion.

Enfin, en raison de leurs dimensions réduites, les UME et les nanoélectrodes offrent la possibilité d'étudier des processus et des phénomènes fondamentaux intéressants. Parmi ceux-ci figurent la structure de la double couche, le transport de masse au sein d'une couche de diffusion dont les dimensions sont comparables à celles de la double couche, les réactions de molécules sur des surfaces de taille similaire, et même les effets de taille quantique associés aux petites nanoélectrodes [26,32,33,35].

Ainsi, les propriétés uniques des UME—depuis leur faible capacité de double couche et leur faible résistance en solution, jusqu'à leur transport de masse efficace et leur petite taille—en font des outils essentiels pour surmonter les limitations des expériences électrochimiques macroscopiques. Elles jouent un rôle central dans l'évolution de la chimie électroanalytique, non

seulement en permettant des analyses plus précises et plus rapides, mais aussi en ouvrant de nouvelles perspectives pour la recherche fondamentale et appliquée.

2.4.1 Géométrie des UME

La forme idéale d'une microélectrode, du point de vue d'un flux uniforme de transport de masse des analytes vers la surface de l'électrode et d'une densité de courant uniforme à l'interface métal/solution, est une hémisphère parfaite entourée d'une gaine plate au niveau du bord de l'hémisphère, comme celle présentée à la **Figure 26(a)** [35]. Il a été démontré que, bien que la diffusion soit tridimensionnelle et rapide pour toutes les UME, la géométrie de l'électrode affecte drastiquement le profil de diffusion de l'analyte vers la surface de l'électrode. Par conséquent, la valeur du courant à l'état stationnaire est décrite par différentes équations selon la géométrie de l'électrode.

La **Figure 26** illustre l'hémisphère parfaite, le disque encastré et le disque en retrait, accompagnés des équations qui décrivent la valeur du courant à l'état stationnaire (i_{ss}) en fonction de la géométrie de l'électrode [131–135].

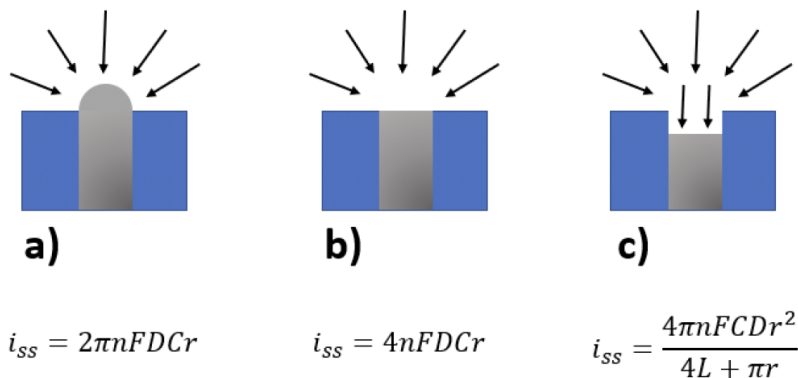


Figure 26. Géométrie des UMEs.

a) hémisphère parfait ; b) disque incrusté ; et c) disque encastré. Dans les équations, F représente la constante de Faraday, D le coefficient de diffusion de l'analyte étudié, C la concentration de l'analyte, et r le rayon de l'UME.

Cependant, dans le cadre de ce travail, on a choisi d'utiliser des électrodes coniques. Cette décision est motivée par les avantages uniques que présentent les électrodes coniques pour certaines applications. En effet, les électrodes coniques, en raison de leur forme effilée et de leur petite dimension à l'apex, permettent une résolution spatiale supérieure et sont particulièrement adaptées aux mesures électrochimiques dans des espaces localisés et confinés. Cela est

essentiel pour des études in situ des structures internes des cellules vivantes, où une perturbation minimale du système est requise.

De plus, la géométrie conique combine une diffusion radiale vers l'apex de l'électrode et une diffusion plane vers le reste de la surface [136]. Cette caractéristique peut être exploitée pour étudier des processus électrochimiques spécifiques ou pour interagir avec des analytes dans des environnements particuliers. Bien que la modélisation de la diffusion et de la densité de courant soit plus complexe pour les électrodes coniques, les possibilités qu'elles offrent en termes de sensibilité et de spécificité justifient leur utilisation.

Ainsi, l'adoption des électrodes coniques dans ce travail vise à tirer parti de leurs propriétés uniques pour avancer dans la compréhension des processus électrochimiques dans des conditions difficiles à atteindre avec des géométries d'électrodes plus traditionnelles.

Les UME de géométrie conique figurent parmi les moins utilisées en raison de leur comportement complexe, même sous des conditions électrochimiques simples. La particularité de diffusion dépendante de la position chez les électrodes coniques rend leur utilisation difficile pour des expériences quantitatives. Pour remédier à cela, certains chercheurs ont recours à des simulations numériques par éléments finis afin de développer des expressions analytiques décrivant le comportement voltammétrique des UME coniques isolées en fonction de leur rayon de base, de leur rapport d'aspect et de l'épaisseur de leur gaine isolante [137,138]. Ces expressions ont également été employées pour étudier des réseaux d'UME coniques présentant un comportement qualitativement similaire à celui des UME coniques individuelles [139]. Par ailleurs, d'autres études numériques ont montré que les électrocatalyseurs de forme conique avec des diamètres d'apex inférieurs à 140 nm possèdent un champ électrique élevé à la pointe, ce qui augmente la concentration locale des cations de l'électrolyte et améliore l'activité électrocatalytique [28,140,141].

La majorité des travaux sur les UME coniques se concentrent sur des électrodes isolées avec des rapports d'aspect compris entre 1 et 3. Selon Dickinson *et al.* [136], ces électrodes sont idéales pour des applications nécessitant de maximiser la densité de courant moyenne extraite de la surface de l'électrode, comme en microscopie électrochimique à balayage (SECM) et en catalyse. Toutefois, les UME coniques longues non isolées, avec des rapports d'aspect plus élevés et des apex très fins, pourraient présenter un intérêt pour des applications impliquant des mesures électrochimiques dans des espaces localisés et confinés, nécessitant une haute résolution spatiale, comme les études in situ des structures internes des cellules vivantes. De plus, en raison de leurs dimensions, de leur forme et de leur transfert de masse amélioré, ces UME ont le potentiel de devenir des outils précieux pour réaliser des études de relations structure–propriétés avec une ou quelques nanoparticules, ou pour servir de surfaces modèles d'électrocatalyseurs de forme conique ou dendritique [28,140,141]. Cependant, on constate un

manque d'études électrochimiques dédiées aux UME coniques individuelles, en particulier celles ayant des rapports d'aspect élevés. De plus, les expressions numériques dérivées jusqu'à présent concernent principalement des cônes parfaits et/ou avec des rapports d'aspect faibles (< 5) [136–138].

Dans ce travail, le comportement des ultramicroélectrodes (UME) sera exploré en tant qu'outils potentiels pour étudier l'électrochimie des réactions hautement confinées qui se déroulent au niveau de la chaîne de transport des électrons (CTE) des mitochondries. Ces réactions, qui se produisent dans des environnements nanométriques complexes et à l'intérieur des membranes mitochondriales, présentent des défis uniques en raison de leur échelle réduite et de leur dynamique rapide. Les UME, grâce à leur petite taille et leur capacité à minimiser les limitations de diffusion, offrent une opportunité unique de sonder ces processus avec une résolution spatiale et temporelle exceptionnelle.

2.4.2 Modélisation numérique du transfert d'électrons aux électrodes coniques

Dans l'étude des phénomènes électrochimiques à l'échelle nanométrique, la modélisation numérique s'impose comme un outil essentiel pour comprendre les profils de concentration des espèces, la distribution des flux, ainsi que la réponse en courant d'électrodes aux géométries complexes. Cette approche permet de compléter les observations expérimentales et d'extraire des paramètres fondamentaux qui seraient autrement inaccessibles.

Parmi les méthodes numériques disponibles, la méthode des éléments finis (FEM, « finite element method ») est particulièrement bien adaptée à la résolution des équations différentielles partielles qui décrivent les processus de transport et de réaction aux interfaces électrochimiques. La FEM repose sur la discrétisation du domaine d'étude en un ensemble de petits éléments (maillage), à l'intérieur desquels les équations sont résolues localement, puis assemblées globalement pour obtenir une solution approximative du problème [142]. Cette méthode est particulièrement puissante dans des systèmes où les géométries sont irrégulières ou asymétriques, comme c'est le cas pour les micro- et nanoélectrodes coniques utilisées dans cette étude.

Dans le cas de la diffusion d'espèces électroactives vers une électrode de très petite taille, les gradients de concentration peuvent être extrêmement localisés, rendant une résolution fine du domaine proche de l'électrode essentielle. La FEM permet d'ajuster la densité du maillage à ces zones critiques et d'obtenir une solution stable même en présence de fortes variations spatiales. En électrochimie, les modèles FEM sont souvent formulés à partir de la deuxième loi de Fick en régime stationnaire, pour décrire le transport diffusif :

Équation 3. Deuxième loi de Fick

$$\nabla \cdot (D_i \nabla C_i) = 0$$

Où D_i est le coefficient de diffusion de l'espèce i , et C_i sa concentration locale.

Les réactions électrochimiques à la surface de l'électrode sont introduites via des conditions aux limites basées sur l'équation de Butler–Volmer, qui relie la densité de courant à la surtension et aux concentrations des espèces à l'interface :

Équation 4. Équation de Butler-Volmer

$$i_{loc} = nFk_0 \left(C_A \exp \left(\frac{(n - \alpha_c)F\eta}{RT} \right) - C_B \exp \left(\frac{-\alpha_c F\eta}{RT} \right) \right)$$

où n est le nombre d'électrons transférés lors de la réaction étudiée, F est la constante de Faraday $96\,489 \text{ C mol}^{-1}$, k_0 est la constante de vitesse hétérogène, C_A et C_B sont les concentrations des espèces réduites et oxydées à la surface de l'électrode, respectivement, α_c est le coefficient de

transfert cathodique, η est la surtension à l'électrode de travail, R est la constante universelle des gaz, et T est la température absolue en Kelvin.

Le courant total est ensuite obtenu par intégration spatiale de la densité de courant sur toute la surface active. Pour tenir compte de la nature ouverte du système, des éléments infinis sont souvent ajoutés à la périphérie du domaine afin d'étendre la solution vers le volume de la solution, simulant ainsi une diffusion sans confinement artificiel.

Dans le cadre de ce travail, la modélisation numérique a été utilisée pour simuler des électrodes coniques à différents rapports d'aspect (H) et rayons de courbure (ROC), reproduisant les géométries observées expérimentalement. Ces simulations ont permis de mieux comprendre l'effet de la géométrie de l'UME sur les flux diffusifs et la réponse en courant, en particulier dans les conditions où la diffusion est radiale et non linéaire.

3 Objectifs

3.1 Objectif général

L'objectif général de ce travail a été de développer une plateforme bioélectrochimique améliorée pour la caractérisation directe de mitochondries isolées provenant de cellules humaines, et ce, dans des conditions physiologiques. Cette plateforme vise à fournir une méthode plus précise et fiable pour étudier la fonction mitochondriale, en conservant l'intégrité et l'activité des mitochondries pendant les analyses. En développant une telle approche, nous espérons contribuer à une meilleure compréhension des rôles essentiels que jouent les mitochondries dans la santé humaine et les maladies, ouvrant ainsi la voie à des applications potentielles en diagnostic et en recherche biomédicale.

3.2 Objectifs particuliers

1. *Optimiser le processus de purification et immobilisation de mitochondries de lignées cellulaires humaines sur des électrodes de matériaux de carbone, notamment de carbone vitreux (GCE), graphite pyrolytique (PGE) et oxide de graphène obtenu par exfoliation électrochimique de graphite (EGO).*

Cet objectif vise à perfectionner les méthodes permettant d'isoler des mitochondries de haute qualité à partir de lignées cellulaires humaines, en maximisant leur pureté et leur viabilité. Il s'agit également de développer des protocoles efficaces pour immobiliser ces mitochondries sur différentes surfaces d'électrodes à base de carbone. En explorant des matériaux tels que le carbone vitreux, le graphite pyrolytique et l'oxyde de graphène obtenu par exfoliation électrochimique de graphite, nous cherchons à identifier les conditions optimales d'immobilisation qui préservent l'activité mitochondriale et assurent une interface stable entre les mitochondries et l'électrode pour les études électrochimiques ultérieures.

2. *Évaluer la réponse électrochimique de mitochondries isolées immobilisées sur différentes électrodes à base de carbone, y compris les électrodes en GCE, les électrodes en PGE et les PGE modifiées avec EGO, le tout dans des conditions physiologiques pour conserver la fonction mitochondriale.*

L'objectif ici est de caractériser et de comparer les signaux électrochimiques obtenus à partir de mitochondries isolées et immobilisées sur divers types d'électrodes à base de carbone. En effectuant des mesures dans des conditions physiologiques, nous visons à maintenir l'intégrité fonctionnelle des mitochondries pendant les expériences. Cette évaluation permettra de déterminer comment le choix du matériau d'électrode influence la qualité et la sensibilité des réponses électrochimiques, afin d'identifier les configurations les plus efficaces pour la détection et l'analyse de l'activité mitochondriale.

3. Examiner les défis pratiques pour atteindre des mesures électrochimiques robustes et reproductibles de la fonction mitochondriale.

Cet objectif consiste à identifier et à surmonter les obstacles pratiques qui pourraient entraver la fiabilité des mesures électrochimiques. Cela inclut le choix d'une technique qui permette une bonne résolution des signaux et garantir aux mitochondries des conditions adéquates pour maintenir leur activité. En abordant ces défis, nous cherchons à établir des protocoles standardisés qui garantissent des résultats cohérents et significatifs, essentiels pour des applications à long terme en recherche et en diagnostic.

4. Étudier les effets de l'oxyde de graphène soniqué pendant différents temps sur la respiration mitochondrial en utilisant des techniques électrochimiques et des essais métaboliques.

L'objectif est d'analyser les produits générés lors de la sonication de l'oxyde de graphène obtenu par exfoliation électrochimique de graphite (EGO). Nous explorerons comment les propriétés de l'EGO soniqué peuvent influencer l'activité mitochondriale lorsqu'il est utilisé comme matériau d'électrode. En combinant des méthodes électrochimiques avec des essais métaboliques, nous évaluerons l'impact des produits de sonication de l'EGO sur la respiration mitochondriale, afin de comprendre les interactions possibles entre le matériau et les organites, et d'assurer que l'EGO et ses produits sont compatibles avec une fonction mitochondriale saine.

5. *Utiliser des inhibiteurs spécifiques des différents éléments de la chaîne de transport des électrons (CTE) pour déterminer quelle molécule est responsable de la communication entre la CTE et les surfaces des électrodes.*

Cet objectif vise à élucider les mécanismes par lesquels les électrons sont transférés des mitochondries aux électrodes. En appliquant des inhibiteurs spécifiques qui ciblent différents complexes ou transporteurs au sein de la CTE, nous évaluerons les changements dans les signaux électrochimiques pour déterminer quelles sont les molécules responsables du transfert d'électrons vers la surface des électrodes.

6. *Proposer des stratégies pour optimiser l'interface électrode-mitochondries, y compris la fabrication sur mesure de l'EGO et l'utilisation d'ultramicroélectrodes, en vue d'applications futures dans les études bioélectrochimiques de la fonction et des dysfonctionnements mitochondriaux.*

L'objectif est de développer des méthodes innovantes pour améliorer l'interaction entre les électrodes et les mitochondries. Cela comprend la fabrication sur mesure de l'EGO pour optimiser ses propriétés électriques et chimiques. En affinant l'interface électrode-mitochondries, nous visons à créer des outils plus précis pour étudier les fonctions mitochondriales normales et pathologiques, ce qui pourrait avoir des implications importantes pour la recherche sur les maladies liées aux dysfonctionnements mitochondriaux.

7. *Explorer le comportement théorique des ultramicroélectrodes (UME) pour évaluer leur potentiel dans l'étude de réactions électrochimiques confinées à l'échelle nanométrique.*

Cet objectif consiste à mener des simulations numériques et des analyses théoriques pour comprendre comment les UME interagissent avec des systèmes électrochimiques de très petite échelle. En modélisant le comportement des UME, nous pourrions déterminer leur aptitude à détecter et à analyser des réactions électrochimiques hautement confinées. Cette exploration théorique servira de base pour de futures expériences visant à utiliser les UME dans l'étude détaillée des processus bioénergétiques à l'échelle nanométrique.

4 Méthodologie

4.1 Culture cellulaire et purification mitochondriale

Deux tampons de travail différents ont été utilisés pour les expériences avec les mitochondries : la Solution de Purification des Mitochondries (MPS), qui permet une purification des mitochondries avec un minimum de dommages, et la Solution d'Essai pour Mitochondries (MAS), qui contient tous les substrats nécessaires à la respiration mitochondriale. Voici la composition de chaque solution tampon :

Solution de Purification des Mitochondries (MPS) : 250 mM de saccharose (réactif pour biologie moléculaire de Sigma), 20 mM de HEPES (solution stérile 1M de Multicell), 10 mM de KCl (qualité analytique à 99 % de Fisher Bioreagents), 0,5 mM de $MgCl_2$ (pur de Thermo Scientific), 1 mM d'EDTA (>99 % de Sigma Aldrich), 1 mM d'EGTA (qualité biologie moléculaire de Millipore Sigma), comprimés d'un cocktail d'inhibiteurs de protéines contenant : 15 $\mu g\ mL^{-1}$ de leupeptine, 5 $\mu g\ mL^{-1}$ d'aprotinine, 1 $mg\ mL^{-1}$ de pepstatine A et 1 mM de PMSF (de Roche Diagnostics).

Solution d'Essai pour Mitochondries (MAS) : 70 mM de saccharose (réactif de biologie moléculaire de Sigma), 220 mM de mannitol (grade réactif à 98 % de Bioshop), 10 mM de KH_2PO_4 (grade laboratoire de Fisher Scientific), 5 mM de $MgCl_2$ (pur de Thermo Scientific), 2 mM de HEPES (solution stérile 1M de Multicell), 1 mM d'EGTA (qualité biologie moléculaire de Millipore Sigma), 2 mM d'acide malique (réactif plus >99 % de Sigma Aldrich), 10 mM d'acide pyruvique (98 % de Sigma Aldrich) et 10 mM d'acide succinique (grade analytique de Fisher Bioreagents).

Les HeLa et HEK 293 (numéro ATCC CRL-1573) ont été cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) enrichi avec 10 % de sérum fœtal bovin inactivé par la chaleur, 1 % de pénicilline-streptomycine et 1 % de L-glutamine, à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO_2 . Les lignées cellulaires HeLa et HEK293 ont été choisies en raison de sa croissance rapide.

Les mitochondries provenant des cellules cultivées ont été isolées selon deux protocoles selon les besoins expérimentales. Pour la majorité des expériences, le protocole 1 (illustré dans la **Figure 27**) a été suivi :

Les cellules HeLa ou HEK293 ont été resuspendues à une concentration de 70 millions de cellules par mL dans une solution tampon MPS froide et hypotonique. Après une incubation de 30 minutes pour provoquer un gonflement des cellules, celles-ci ont été lysées en les passant 50 fois à travers une aiguille de calibre 27 gauge. Les fractions nucléaires ont été éliminées par deux centrifugations (800 g, 20 min, 4 °C), et la fraction mitochondriale a été récupérée par centrifugation du surnageant post-nucléaire à 8000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Le culot

mitochondrial obtenu a été lavé avec 200 μ L de MPS et centrifugé à nouveau à 8000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Le culot mitochondrial final a été resuspendu dans du tampon MAS froid à une concentration de 400 mg/mL (basée sur le poids humide du culot).

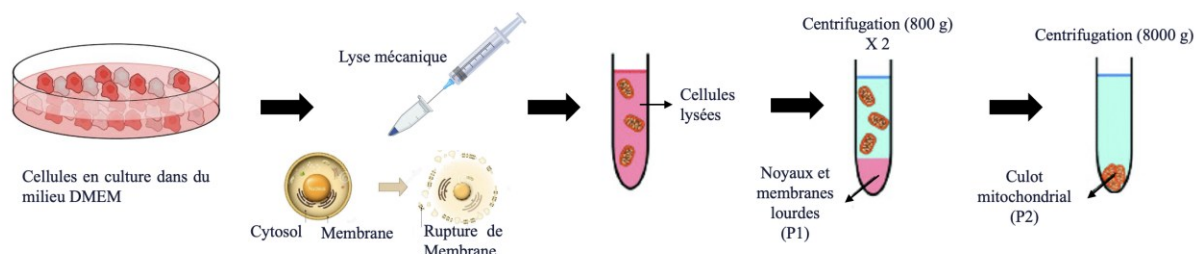


Figure 27. Protocole de purification mitochondriale classique.

Les cellules en cultures ont été lysées mécaniquement avec une syringe. Le lysat cellulaires on été centrifugés à bas et haute vitesse pour séparer les différents composants cellulaires. Les culots P1, P2 et le surnageant finale ont été utilisées pour caractérisation par microscopie en fluorescence.

Pour les expériences électrochimiques pour déterminer la source initiale des électrons lors des processus d'oxydation, le protocole 2 (illustré dans la **Figure 28**) a été suivi :

Isolement des mitochondries à l'aide de billes magnétiques

Le kit d'isolement des mitochondries (humain, Miltenyi Biotec) a été utilisé pour isoler des mitochondries intactes et viables à partir de cellules humaines. Ce kit comprend un tampon de lyse, un tampon de séparation concentré, un tampon de stockage, des colonnes LS pour la séparation magnétique et des MicroBeads Anti-TOM22 (des anticorps monoclonaux conjugués à des billes magnétiques). La lyse cellulaire a été fait comme dans le protocole 1 (**Figure 27**) mais en utilisant le tampon de lyse fourni au lieu du tampon MPS. Le lysat cellulaire a ensuite été incubé dans le tampon de séparation avec des MicroBeads Anti-TOM22 pendant 1 heure à 4°C sous agitation douce. Après incubation, le lysat a été passé à travers une colonne LS pré-rincée placée dans un champ magnétique. Les mitochondries marquées magnétiquement ont été retenues dans la colonne, tandis que les composants cellulaires non marqués ont été éliminés par lavage. Les mitochondries ont été éluées en retirant la colonne du champ magnétique et en la rinçant. Les mitochondries isolées pouvaient être utilisées immédiatement ou resuspendues dans le tampon de stockage et conservées sur glace pour une utilisation ultérieure (**Figure 28**).

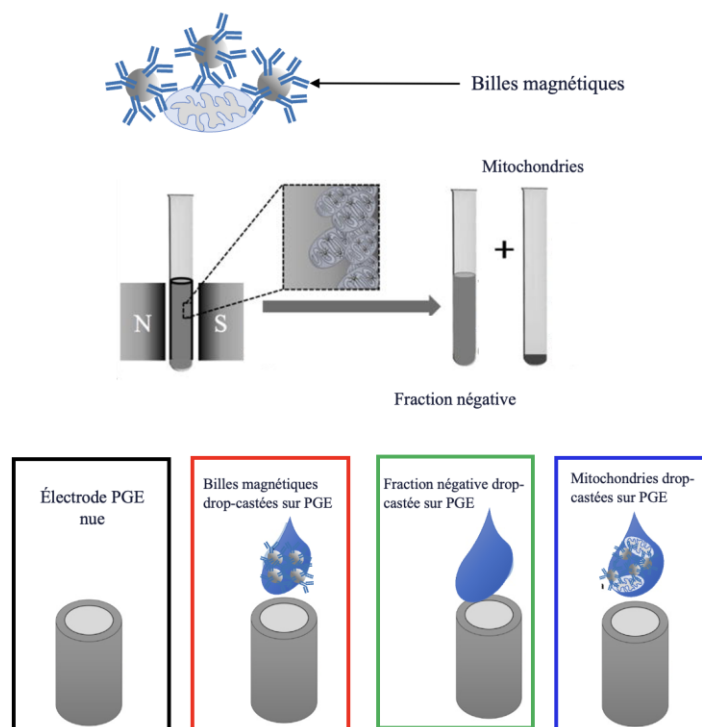


Figure 28. Immuno-purification des mitochondries avec des billes magnétiques.

Isolement des mitochondries par immuno-purification avec des billes magnétiques marquées avec un anticorps spécifique aux mitochondries humaines. Avec l'aide d'un aimant, les mitochondries marquées ont été séparées du reste de structures cellulaires pour obtenir des fractions mitochondriales d'haute pureté. Des électrodes PGE nues, avec les billes magnétiques, avec la fraction négative, et avec des mitochondries marquées ont été préparées pour obtenir des voltampérogrammes cycliques.

Après n'importe quelle procédure de purification, les protéines mitochondriales dans la suspension finale ont été quantifiées à l'aide du dosage colorimétrique DC de protéines de Bio-Rad®, en utilisant des suspensions d'albumine sérique bovine (BSA) pour la calibration. En général, les mitochondries ont été conservées dans le tampon MAS à 4 °C pendant la nuit, puis utilisées pour des analyses Seahorse ou déposées par goutte sur des électrodes pour des expériences électrochimiques le jour suivant.

La microscopie électronique en fluorescence a été utilisée pour optimiser le processus de purification et la microscopie à transmission (MET) a été utilisée pour vérifier que la structure des mitochondries était préservée après la purification et pour évaluer les interactions entre l'EGO et les mitochondries.

4.2 Microscopie en fluorescence

Pour suivre les différentes étapes de la purification, les mitochondries et les noyaux cellulaires ont été marqués avant la lyse en ajoutant directement des colorants perméables dans le milieu de culture des cellules. Les mitochondries ont été marquées avec le MitoTracker Red CMXRos (50 nM, réf. M7512, ThermoFisher), tandis que les noyaux ont été marqués avec le colorant Hoechst 33258 (10 µg/ml, réf. H3569, ThermoFisher) pendant 20 minutes à 37 °C. Des aliquots de 50 µl ont été prélevés aux étapes clés de la purification, placés sur une lame de microscope, et recouverts d'une lamelle.

Les images en épifluorescence ont été acquises en utilisant les mêmes paramètres d'intensité pour les mitochondries (rouge), les noyaux (bleu) et le contraste de phase, à l'aide d'un microscope droit Nikon Eclipse 800 équipé d'un objectif 20x. Les fichiers image ont été enregistrés au format TIFF 16 bits.

Pour l'analyse, le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) a été utilisé pour visualiser les colorations, ajuster le contraste et la luminosité, appliquer des couleurs artificielles, et recadrer les images afin de mieux illustrer les structures étudiées.

4.3 Microscopie électronique à transmission

Pour l'imagerie en microscopie électronique à transmission (MET), les mitochondries ont été isolées comme décrit précédemment et resuspendues dans un tampon MAS avec 0,17 µg de feuillet d'oxyde d'EGO par µg de protéine mitochondriale. Les suspensions ont été incubées pendant deux heures, puis centrifugées à 8000 g pendant 20 minutes à 4 °C.

Les échantillons ont été fixés pendant la nuit dans du glutaraldéhyde à 2,5 %, préparé dans un tampon cacodylate 0,05 M (pH 7,4) à 4 °C, pour préserver leur intégrité structurale. Après la fixation, les échantillons ont été lavés trois fois pendant 5 minutes dans un tampon cacodylate 0,05 M (pH 7,4) supplémenté avec 3 % de saccharose, à 4 °C. Une post-fixation a été réalisée à l'aide d'un mélange 1:1 de tétraoxyde d'osmium à 2 % et de ferrocyanure de potassium à 2 %, tous deux préparés dans de l'eau distillée. Ce mélange a été appliqué aux échantillons pendant 1 heure à 4 °C, sous agitation constante, afin d'améliorer le contraste des membranes et de fixer les lipides. La post-fixation a été suivie de trois lavages dans de l'eau distillée, chacun durant 5 minutes à température ambiante, avec agitation, pour éliminer les fixateurs résiduels. Les échantillons ont ensuite été colorés avec de l'acétate d'uranyle à 1 % dans de l'eau distillée pendant 30 minutes à température ambiante, protégés de la lumière, avec une agitation constante. Cette étape permet d'améliorer la densité électronique et le contraste des structures cellulaires et subcellulaires. Un lavage final de 5 minutes dans de l'eau distillée, sous agitation, a été effectué pour éliminer l'excès de colorant.

Une déshydratation progressive a été réalisée à l'aide d'une série d'éthanol, les échantillons étant incubés pendant 30 minutes dans des solutions de concentrations croissantes : 25 %, 50 %, 75 %, 95 %, 100 %, et une deuxième étape à 100 %. La déshydratation a été effectuée à température ambiante, sous agitation douce pour éviter d'endommager les échantillons.

Pour la préparation de l'inclusion, les échantillons ont été pré-infiltrés avec de la résine SPURR en utilisant des mélanges progressifs d'acétone et de résine SPURR dans des ratios de 3:1, 1:1 et 1:3. Chaque étape a duré 2 heures à température ambiante, sous agitation constante, pour assurer une pénétration complète de la résine. Après la pré-infiltration, les échantillons ont été immergés dans de la résine SPURR pure pendant deux périodes consécutives : 2 heures non couverts à température ambiante, puis 3 heures supplémentaires non couverts à température ambiante sous agitation constante. Les échantillons infiltrés ont été transférés dans des capsules BEEM et polymérisés à 60 °C pendant 48 heures pour créer des blocs durcis adaptés à la coupe.

Des sections ultra-fines (~90 nm) ont été obtenues à l'aide d'un ultramicrotome Leica UC7 et placées sur des grilles en cuivre de 200 mailles pour la coloration et l'imagerie. Les sections ont été colorées avec de l'acétate d'uranyle dans de l'éthanol à 50 % pendant 15 minutes, suivies d'une coloration avec du citrate de plomb pendant 5 minutes pour améliorer le contraste et la densité électronique. L'imagerie MET a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à

transmission Hitachi H-7100 fonctionnant à 75 kV. Les images ont été capturées avec une caméra AMT XR111 pour visualiser l'ultrastructure des échantillons avec une haute résolution.

4.4 Synthèse de l'oxide de graphène

L'oxyde de graphène a été synthétisé par exfoliation électrochimique d'une feuille de graphite, comme décrit dans le protocole développé par une étudiante de notre laboratoire, Yuting Lei [7]. Plus précisément, une feuille de graphite (7,5 cm × 2 cm × 0,05 cm) et une maille de platine (6 cm²), immergées dans une solution électrolytique de H₂SO₄ 0,1 M, ont été connectées à une alimentation en courant continu. La distance entre les deux électrodes était de 6 cm, et la différence de potentiel entre elles était de 10 V. Les feuillets d'oxyde de graphène ainsi produits (nommés EGO) ont été collectés par filtration sous vide à l'aide d'une membrane MF-Millipore avec une taille de pore de 0,22 µm, puis lavés plusieurs fois avec de l'eau Millipore pour éliminer les résidus d'acide. Les feuillets d'EGO ont ensuite été dispersés dans de l'eau par ultrasonication pendant 90 minutes. Enfin, la dispersion a été lyophilisée, et les feuillets d'EGO ont été stockés pour une utilisation ultérieure.

Des suspensions fraîches d'EGO, à une concentration de 0,4 mg/mL, ont été préparées en soniquant les feuillets d'EGO dans de l'eau pendant trois heures. Afin d'évaluer l'effet du temps de sonication des suspensions sur la respiration mitochondriale et les tests électrochimiques, ces dernières ont été soumises à une sonication supplémentaire pour un total de 3, 12, 20, 40 et 60 heures. Les échantillons ont été nommés EGO-xh, où x indique la durée totale de sonication en heures.

4.5 Caractérisation des produits de sonication de l'oxyde de graphène

Pour la caractérisation, les différentes suspensions d'EGO ont été ultracentrifugées à 4500 g pendant 2 heures à température ambiante afin de récupérer les poudres. Les poudres ont été séchées à 37 °C pendant une nuit avant toute caractérisation. La caractérisation physico-chimique des feuillets EGO-xh a été réalisée par microscopie électronique à balayage (MEB), spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS), spectrophotométrie UV-vis et microscopie électronique en transmission à haute résolution (HR-TEM) et la microscopie électronique en transmission en mode balayage (STEM) des surnageants après centrifugation.

L'analyse par MEB a été réalisée à l'aide d'un microscope TESCAN VEGA3, équipé d'une cathode chauffée au tungstène et d'un canon à émission de champ. La tension d'accélération était fixée à 20 keV et les images ont été prises en mode électron secondaire pour observer la topographie. Les échantillons ont été préparés en déposant une goutte de suspension soniquée du matériau exfolié sur du papier de cuivre avant de la placer sur la platine du microscope. Ce microscope MEB est doté d'une chambre spacieuse mesurant 285 mm (L) x 340 mm (P), d'une platine motorisée à 5 axes compucentrique, d'un système intégré de suspension active contre les vibrations, d'une caméra de visualisation de la chambre et d'une pompe turbomoléculaire pour une évacuation rapide.

L'analyse par XPS a été réalisée à l'aide de l'instrument Quantes de PHI-ULVAC, équipé d'une source monochromatique d'aluminium (Al) émettant des rayons X à 1486,6 eV et d'un faisceau micro-focalisé de 100 μm de diamètre. Les échantillons, sous forme de poudre, ont été caractérisés selon deux protocoles complémentaires. Les spectres d'enquête ont été enregistrés sur une plage d'énergie de 0 eV à 1350 eV avec une taille de pas de 1 eV et un temps de pose de 50 ms par pas, sur un total de 4 balayages, avec une énergie de passage de 280 eV. Les spectres à haute résolution ont été acquis sur des plages d'énergie spécifiques à chaque élément analysé, avec une taille de pas de 0,1 eV, un temps de pose de 50 ms par pas et un nombre de balayages ajusté pour optimiser le rapport signal/bruit, en utilisant une énergie de passage de 55 eV. L'analyseur a été calibré à l'aide de la référence argent (Ag 3d_{5/2}) à 368,25 eV, atteignant une résolution de 0,55 eV (FWHM). Les données collectées ont été traitées et analysées à l'aide du logiciel CasaXPS (version 2.3.26rev1.0W). Les rapports C/O ont été déterminés à partir de l'aire sous les spectres à haute résolution C 1s et O 1s après soustraction de la ligne de base de type Shirley et en utilisant les facteurs de sensibilité atomique correspondants.

Les mesures de spectrophotométrie UV-vis ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 60 UV-vis d'Agilent Technologies, dans une plage de longueurs d'onde de 190 à 500 nm, avec une vitesse de balayage de 600 nm min⁻¹.

La microscopie électronique en transmission à haute résolution (HR-TEM) et la microscopie électronique en transmission en mode balayage (STEM) ont été réalisées en mode champ clair

à différents grossissements à l'aide d'un microscope électronique Thermo Scientific Talos F200X G2, fonctionnant à 200 keV. Un volume de 10 μL de la suspension d'EGO correspondante a été déposé sur une grille en cuivre (300 mailles) avec un substrat en SiO_2 à l'aide de la méthode de dépôt par goutte (drop-casting), suivi d'un séchage à température ambiante.

Les mesures XPS et SEM ont été réalisées par Safa Chaaben, une étudiante de doctorat dans notre groupe de recherche.

4.6 Essais métaboliques (Seahorse)

Toutes les mesures Seahorse ont été effectuées à l'aide de l'analyseur de flux extracellulaire Agilent Seahorse XFe96. Le taux de consommation d'oxygène (OCR) des mitochondries isolées a été mesuré dans un format de plaque à 96 puits. Pour minimiser la variabilité, les mitochondries ont été diluées 10 fois dans un tampon MAS froid, puis déposées directement à une concentration finale de 10 µg ou 20 µg de protéines mitochondriales par puits et gardées pendant la nuit à 4 °C. Le lendemain, la plaque de culture cellulaire a été centrifugée à 2000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Enfin, la plaque a été transférée dans un incubateur exempt de CO₂ et maintenue pendant 1 heure pour sécher les mitochondries, comme fait pour les analyses électrochimiques, avant de commencer l'analyse. Le volume de chaque puits a été ajusté avec du tampon MAS pour atteindre un volume initial de 162 µL par puits.

Pour les mesures d'OCR des mitochondries en présence d'EGO, les puits de la plaque de culture cellulaire ont étéensemencés avec des suspensions d'EGO soniquées pendant différents temps et laissées sécher dans un incubateur sans CO₂ à 37 °C. Une fois les puits séchés, les mitochondries purifiées ont été ajoutées comme décrit précédemment. Après centrifugation, les plaques ont été conservées à 4 °C pendant la nuit et transférées le lendemain dans un incubateur sans CO₂ à 37 °C pendant 1 heure avant les mesures.

Pour toutes les expériences Seahorse, les ports A, B, C et D de la cartouche Agilent Seahorse ont été chargés respectivement avec 40 mM d'ADP, 40 µM d'Oligomycine (OM), 10 µM de Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazine (FCCP) et 10 µM de mélange Roténone / Antimycine A (RAA). La concentration finale de chaque drogue dans les puits était 4 mM ADP, 4 µM OM, 1 µM FCCP et 1 µM RAA.

4.7 Microscopie électronique à balayage des mitochondries déposées sur les électrodes

Des électrodes en carbone sérigraphiées (SPEs) modèle 110 de Metrohm ont été choisies pour ces observations en raison de leur géométrie qui facilite la préparation des échantillons, laquelle implique plusieurs étapes d'immersion en solution. EGO-60h, quantum dots d'oxyde de graphène (GOQD) et les mitochondries ont été déposés par drop-casting sur les électrodes sérigraphiées, selon le protocole suivant :

Les SPEs modifiées avec des mitochondries ont d'abord été incubées toute la nuit à 4 °C dans une solution contenant 2,5 % de glutaraldéhyde diluée dans un tampon cacodylate 0,2 M avec du saccharose, à pH 7,4, afin de stabiliser les membranes mitochondriales. Après cette étape de fixation, elles ont été lavées à température ambiante par immersion dans le même tampon cacodylate 0,2 M contenant du saccharose, à pH 7,4, pendant 5 minutes. Cette étape a été répétée trois fois. Pour améliorer le contraste et préserver l'ultrastructure, les échantillons ont ensuite été post-fixés pendant 1 heure à température ambiante dans une solution à 1 % de tétroxyde d'osmium préparée dans le tampon cacodylate 0,2 M avec saccharose à pH 7,4.

Après la post-fixation, les échantillons ont été rapidement rincés deux fois à l'eau distillée avant de procéder à la déshydratation.

La déshydratation a été réalisée par immersion des échantillons dans une série de solutions d'éthanol de concentrations croissantes : 25 %, 50 %, 75 %, 95 % puis deux fois dans l'éthanol pur (100 %), pendant 5 minutes à chaque étape. Les échantillons ont ensuite été conservés dans l'éthanol pur jusqu'à leur traitement par séchage au point critique (Leica EM CPD300).

Le séchage au point critique a été effectué pour éviter l'effondrement structurel, par échange au CO₂. La procédure incluait l'immersion des échantillons dans l'éthanol pur, la mise en rotation d'un agitateur magnétique à 50 %, une vitesse d'entrée rapide du CO₂, 12 cycles d'échange, et une étape de chauffage et de vidange rapide du gaz. Une fois terminé, la chambre a été ventilée et les échantillons séchés ont été récupérés pour l'étape de métallisation.

Enfin, pour améliorer la qualité des images MEB, une fine couche conductrice de 2 nm d'or a été déposée sur les échantillons à l'aide d'un métalliseur par pulvérisation cathodique (Leica EM ACE600).

Les images MEB ont été acquises à l'aide d'un microscope électronique à balayage Hitachi Regulus8220 à ultra-haute résolution, fonctionnant à 10 keV.

4.8 Analyses électrochimiques

Pour les expériences électrochimiques, trois types d'électrodes différentes ont été considérées : carbone vitreux (GCE), graphite pyrolytique orienté sur le plan de bord (PGE) et EGO-xh déposé sur PGE. Avant les mesures, les GCE et PGE ont été polies à l'aide de poudre d'alumine de 1 μm et 0,3 μm . Les électrodes ont ensuite été rincées à l'eau milli Q et à l'éthanol à 70%. Enfin, elles ont été soniquées pendant 5 minutes dans de l'eau milli Q, rincées à l'éthanol à 70% et laissées sécher.

Pour les expériences avec EGO-xh, un dépôt de 85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ d'EGO-xh (à une concentration de 0,4 mg/mL) a été déposé sur le PGE propre et laissé sécher à température ambiante. Pour l'électrochimie des mitochondries, un dépôt équivalent à 495 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de protéines mitochondriales a été déposé sur GCE, PGE ou PGE/EGO-xh et laissé sécher pendant une heure. Les électrodes fonctionnalisées par des mitochondries ont été utilisées directement comme électrodes de travail lors des études électrochimiques.

Toutes les mesures électrochimiques ont été réalisées dans une cellule électrochimique à trois électrodes utilisant une électrode de référence Ag/AgCl (1 M KCl) et un fil de platine comme auxiliaire (**Figure 29(b)**). Une solution MAS saturée à l'azote, supplémentée en 4 mM d'adénosine diphosphate (ADP), a été utilisée comme électrolyte (sauf pour les expériences initiales qui ont été fait dans du PBS). Toutes les mesures ont été effectuées avec un potentiostat Autolab PGSTAT 101. La voltampérométrie cyclique (VC) (à 20 mV/s, entre -0.8 et 0.8 V) et la voltampérométrie à onde carrée (VOC) à une fréquence de 40 Hz, avec un potentiel de pas de 2 mV et une amplitude de modulation de 40 mV, ont été utilisées pour caractériser le comportement électrochimique des mitochondries isolées. Toutes les données VOC ont été soustraites de la ligne de base à l'aide du logiciel MATLAB en utilisant le code montré dans la section 4.6. La déconvolution des signaux VOC a été effectuée avec le logiciel Origin Lab.

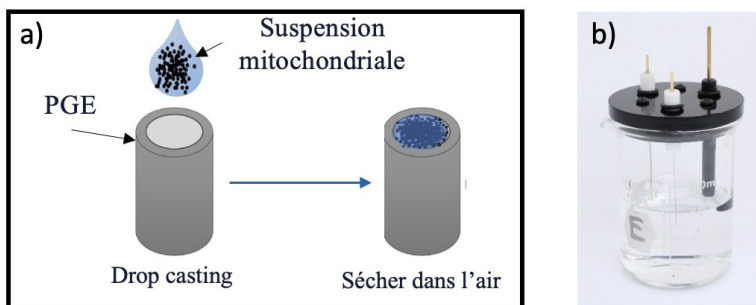


Figure 29. Drop-casting et cellule électrochimique

a) Les mitochondries en suspension ont été drop-castées sur des électrodes PGE et laissées sécher dans l'air avant de faire les mesures électrochimiques. b) Cellule électrochimique à trois électrodes utilisée pour les expériences d'électrochimie mitochondriale.

4.9 Code Matlab pour soustraction de la ligne base des VOCs

Le code suivant a été développé par Andrea Khoury, une stagiaire d'été au sein de notre groupe de recherche.

```
% Define the variables for the datasets
xData1 = PGE1EGO60hmitosSWV2. ("PotentialAppliedV");
yData1 = PGE1EGO60hmitosSWV2. ("WE1CurrentA");

% Define the voltage range
voltageRange = [-0.8, 0.8];

% Remove NaN values and filter by voltage range for all datasets
validIndices1 = ~isnan(yData1) & xData1 >= voltageRange(1) & xData1 <= voltageRange(2);
cleanXData1 = xData1(validIndices1);
cleanYData1 = yData1(validIndices1);

% Normalize datasets
normalizedYData1 = normalizeData (cleanXData1, cleanYData1); % Use the function created below

% Extract new data points after baseline normalization
normalizedDataPoints1 = table (cleanXData1, normalizedYData1);

% Save the command window text of normalized data points to a file
diary ('normalizedDataPoint1.txt');
disp(normalizedDataPoints1);
diary off;

% Function to normalize data
function normalizedYData = normalizeData (cleanXData, cleanYData)
    % Find the lowest points for baseline calculation
    rangeA = cleanXData >= -0.65 & cleanXData <= -0.45;
    [~, minIndexA] = min (cleanYData (rangeA));
    xMinA = cleanXData (rangeA);
    yMinA = cleanYData (rangeA);
    lowestPointA_X = xMinA (minIndexA);
    lowestPointA_Y = yMinA (minIndexA);

    rangeB = cleanXData >= 0.35 & cleanXData <= 0.45;
    [~, minIndexB] = min (cleanYData (rangeB));
    xMinB = cleanXData (rangeB);
    yMinB = cleanYData (rangeB);
    lowestPointB_X = xMinB (minIndexB);
    lowestPointB_Y = yMinB (minIndexB);

    % Specify the potential ranges for baseline calculation
    range1 = cleanXData >= -0.8 & cleanXData <= lowestPointA_X;
    range2 = cleanXData >= lowestPointB_X & cleanXData <= 0.8;

    % Perform spline fits to determine the baseline for the specified ranges
```



```

splineFit1 = fit (cleanXData(range1), cleanYData(range1),
'smoothingspline');
splineFit2 = fit (cleanXData(range 2), cleanYData(range 2),
'smoothingspline');

% Evaluate the spline fits across the specified ranges
baselineSpline1 = feval(splineFit1, cleanXData (range1));
baselineSpline2 = feval(splineFit2, cleanXData (range 2));
% Find the indices of the points at -0.6 and 0.2
point1 = find (cleanXData >= lowestPointA_X, 1);
point2 = find (cleanXData <= lowestPointB_X, 1, 'last');

% Extract the coordinates of these points
x1 = cleanXData (point1);
y1 = cleanYData (point1);
x2 = cleanXData (point2);
y2 = cleanYData (point2);

% Create a straight line connecting these two points
straightLineIndices = cleanXData > x1 & cleanXData < x2;
baselineStraightLine = interp1 ([x1, x2], [y1, y2],
cleanXData (straightLineIndices));

% Combine the spline fits and the straight line
baseline = cleanYData; % initialize with original data size
baseline (range1) = baselineSpline1;
baseline (straightLineIndices) = baselineStraightLine;
baseline (range 2) = baselineSpline2;

% Subtract the baseline from the cleaned yData to normalize it
normalizedYData = cleanYData - baseline;
end

```

4.10 Fabrication, caractérisation et fonctionnalisation d'ultramicroélectrodes coniques

Les UME (ultramicroélectrodes) coniques en tungstène ont été fabriquées par une technique de gravure électrochimique connue sous le nom de méthode du « drop-off » avec un régime de ménisque dynamique, comme décrit dans notre travail précédent [143]. Pendant ce processus de gravure, une différence de potentiel a été appliquée entre les deux électrodes (voir **Figure 30(a)**) pour la fabrication des UME en utilisant un potentiostat/galvanostat (Autolab PGSTAT 101). Sous l'effet du potentiel, un ménisque se forme à l'interface air-solution autour de l'anode en tungstène. Ce ménisque provoque une distribution non homogène des ions WO_4^{2-} et OH^- et un taux de gravure différent le long du fil de tungstène, conduisant à un effet de rétrécissement. Lorsque la masse de la partie inférieure devient supérieure à la résistance à la traction du fil, celle-ci se détache dans la solution électrolytique, et des UMEs coniques sont obtenus.

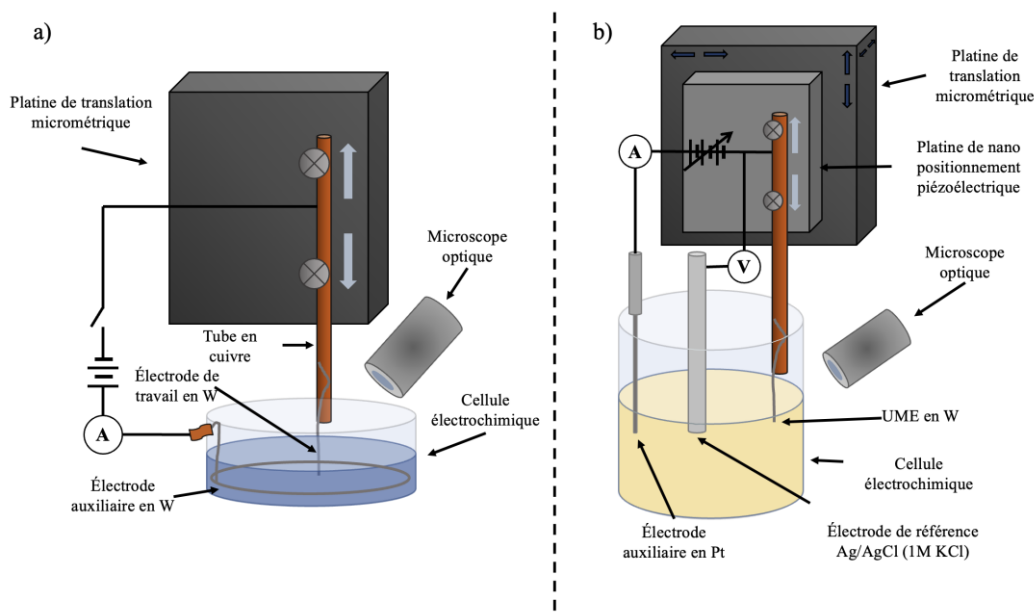


Figure 30. Montage expérimental pour la fabrication et caractérisation d'ultramicroélectrodes.

Montage expérimental pour : a) la préparation des UME coniques pointues en tungstène ; et b) la caractérisation électrochimique des UME. Figure adaptée avec la permission de [143].

Pour la fonctionnalisation des UME avec du carbone, la procédure a débuté par le revêtement d'une longueur de 2,5 mm des électrodes en tungstène. Ce revêtement a été réalisé par trempage dans un photorésist (AZP4330-RS, Clariant, Sommerville, NJ), en utilisant une platine de translation micrométrique standard (NFL5DP20, course de 5,0 mm, Thorlabs) pour assurer un contrôle précis de l'immersion et une application uniforme du photorésist sur la surface des

électrodes. Cette étape de trempage est essentielle pour garantir que la couche de photorésist soit homogène, ce qui affectera directement la qualité du revêtement carboné final après pyrolyse.

Une fois le revêtement au photorésist effectué, les électrodes en tungstène ont été soumises à un processus de pyrolyse dans un four tubulaire à une température élevée de 1000 °C pendant une durée de 3 heures. La pyrolyse a été réalisée en atmosphère inerte pour prévenir toute oxydation indésirable, en utilisant un mélange de gaz d'argon et d'hydrogène (Ar : H₂) dans une proportion de 95:5, avec un débit de 0,5 LTPM (**Figure 31**). Ce mélange gazeux assure un environnement réducteur léger, favorisant la conversion du photorésist en une couche de carbone homogène sans formation d'oxydes. La température élevée et la durée prolongée du traitement thermique permettent de décomposer le photorésist et de le transformer en une couche de carbone pyrolytique adhérente et conductrice sur la surface des électrodes [135].

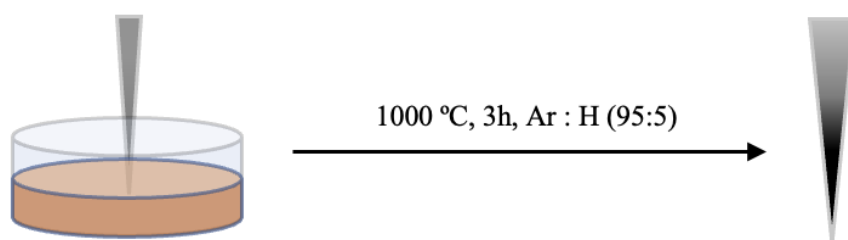


Figure 31. Fonctionnalisation des UMEs avec du carbone.

Revêtement par trempage des UME coniques en tungstène avec du photorésist pour obtenir des UME coniques en carbone pyrolytique.

Ce procédé de fonctionnalisation par pyrolyse du photorésist garantit que les UME en tungstène possèdent une surface revêtue de carbone de haute qualité, améliorant ainsi leurs propriétés électrochimiques pour des applications ultérieures. L'utilisation précise de la platine de translation micrométrique et le contrôle rigoureux des conditions de pyrolyse sont essentiels pour reproduire fidèlement ce revêtement et obtenir des électrodes aux performances optimales.

Les électrodes fonctionnalisées et non fonctionnalisées ont été utilisées comme électrodes de travail dans une cellule électrochimique à trois électrodes (**Figure 30(b)**), et leur réponse électrochimique a été obtenue par voltampérométrie cyclique en présence de 5 mM de [Fe(CN)₆]³⁻ + 5 mM de [Fe(CN)₆]⁴⁻ dans une solution de KCl 0,5 M, en fonction de la profondeur du cône dans la solution.

Dans cette étude, deux paramètres géométriques sont utilisés pour caractériser les électrodes coniques à micro- et nanodimension : le rapport d'aspect (H) et le rayon de courbure de l'apex des électrodes coniques.

H est défini comme le rapport entre la hauteur effective du cône (h) et le rayon de la base du cône (a) (**Figure 32**). Ce paramètre permet de comparer des électrodes de tailles différentes en

normalisant leur géométrie verticale. Des valeurs élevées de H correspondent à des électrodes plus allongées, ce qui influence la distribution du champ électrique et la diffusion des espèces électrochimiques.

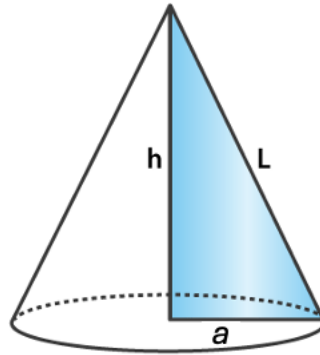


Figure 32. Géométrie des électrodes coniques

h est la hauteur du cône, a le rayon de la base du cône, et L la hauteur latérale du cône.

Le ROC décrit la courbure à l'extrémité de l'électrode. Un ROC petit correspond à une pointe plus aiguë (plus "pointue"), alors qu'un ROC élevé indique une extrémité plus arrondie. Cette courbure peut avoir un impact significatif sur la distribution du champ électrique local et donc sur la sensibilité de l'électrode.

4.11 Simulations numériques de dynamique de fluides

Le profil de concentration des espèces électroactives, les magnitudes du flux total à l'état stationnaire et les courants limités par diffusion à l'état stationnaire de cônes avec des rapports d'aspect (H) de 3 à 22 et un rayon de courbure (ROC) de 0 à 107 nm ont été simulés en utilisant le module d'électroanalyses du solveur par éléments finis COMSOL Multiphysics®. Le modèle contient un domaine axisymétrique 2D entouré d'une région concentrique avec des éléments infinis pour étendre la solution en vrac dans le modèle à l'infini (**Figure 33(a)**). Les géométries des électrodes ont été reproduites en tenant compte du ROC et de H de chaque UME. Des maillages triangulaires, définis pour être plus denses à la surface de l'électrode, ont été utilisés pour toutes les simulations (**Figure 33(b)**).

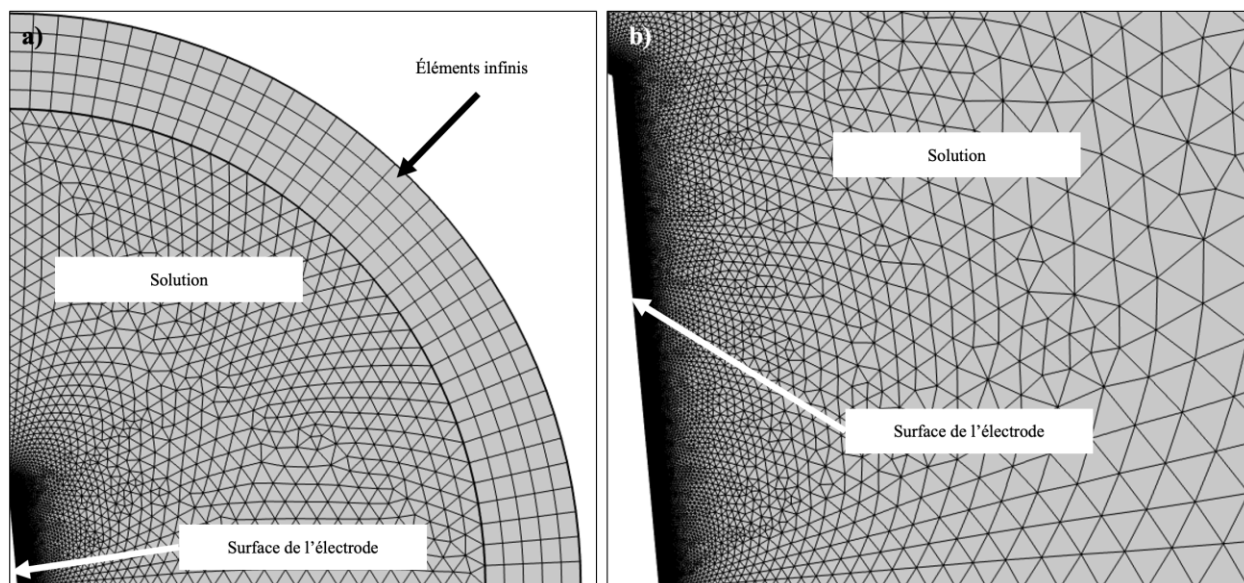


Figure 33. Exemple de maillage pour les simulations numériques.

a) Le domaine axisymétrique 2D entouré d'une région concentrique avec des éléments infinis pour étendre la solution en volume du modèle à l'infini est présenté. b) Gros plan des maillages triangulaires qui ont été définis pour être plus denses près de la surface de l'électrode. Des schémas de maillage similaires ont été utilisés pour toutes les simulations.

En raison de la présence d'une grande quantité de sel inerte, la contribution de la migration au transport de masse peut être exclue des simulations. Le champ électrique est considéré comme négligeable, et le potentiel de l'électrolyte peut alors être supposé être $\Phi_l = 0$. L'équation du domaine est la deuxième loi de Fick à l'état stationnaire (**Équation 3**), qui décrit le transport des espèces électroactives du volume de la solution électrolytique à la surface de l'électrode par diffusion.

À la frontière de l'électrode, l'espèce réactive est oxydée ou réduite via un transfert d'électron. La densité de courant pour une telle réaction est donnée par l'équation de Butler-Volmer (**Équation 4**).

Le flux des espèces réactives et des produits est proportionnel à la densité de courant, conformément aux lois de Faraday sur l'électrolyse, ce qui est exprimé dans la condition de frontière de surface de l'électrode :

Équation 5. Loi de Faraday sur l'électrolyse

$$-\mathbf{n} \cdot \mathbf{J}_i = \frac{\nu_i i_{loc}}{nF}$$

où i_{loc} est la densité de courant locale retirée de l'électrode en raison de la réaction, et ν_i est le coefficient stœchiométrique de la réaction. Le courant total a été obtenu en intégrant la densité de courant locale sur la surface de l'électrode.

5 Résultats et discussion

5.1 Purification mitochondriale

La méthode de purification mécanique utilisée dans cette étude comporte un risque de rupture des structures intracellulaires, telles que les noyaux, ce qui peut libérer de la chromatine, une substance visqueuse capable d'agréger les composants cellulaires et de réduire la pureté des fractions mitochondriales finales. Pour remédier à ce problème, la première étape de la purification mitochondriale a consisté à optimiser le nombre de coups de syringe auxquels les cellules ont été soumises. La microscopie par fluorescence a été utilisée pour suivre le processus et évaluer son efficacité.

Des images de microscopie par fluorescence ont été prises à des étapes clés : avant la lyse des cellules, après la lyse, à partir du premier culot (P1, fraction nucléaire), du second culot (P2, fraction mitochondriale) et du surnageant final. Deux colorants fluorescents distincts ont été utilisés : le Hoechst blue, qui marque spécifiquement les noyaux, et le MitoRed, qui cible sélectivement les mitochondries.

Comme montré dans la **Figure 34(a)**, avant la lyse, la microscopie par fluorescence a révélé des structures nucléaires et mitochondriales clairement définies à l'intérieur de cellules intactes, comme attendu pour les deux colorants. Après la lyse, la plupart des cellules ont été désagrégées, laissant apparaître des noyaux et des mitochondries libres dispersés dans l'échantillon. Dans la fraction P1 (premier culot), correspondant principalement aux noyaux, des noyaux isolés ainsi que des mitochondries provenant de cellules non lysées ont été observés. Pour la fraction P2 (second culot), riche en mitochondries, une faible coloration de chromatine a été détectée avec le colorant Hoechst, tandis que le MitoRed indiquait une présence importante de mitochondries. Enfin, comme attendu, aucun signal fluorescent significatif n'a été détecté dans le surnageant final, confirmant une séparation efficace des différents composants cellulaires.

Afin d'optimiser le protocole de purification, nous avons testé différents nombres de passages des cellules à travers l'aiguille : 45, 60, 80 et 120. Après 60 passages (**Figure 34(b)**), une quantité significative de chromatine libre a commencé à être visible dans la fraction P1, indiquant que la lyse excessive des noyaux libère de la chromatine qui pourrait contaminer les fractions ultérieures. Lorsque le nombre de passages atteignait 80 (**Figure 34(c)**) et 120 (**Figure 34(d)**), une présence excessive de chromatine a été détectée même dans la fraction P2, compromettant ainsi la pureté des fractions mitochondriales obtenues. Ces résultats suggèrent qu'il est optimal de limiter le nombre de passages de 45 à 60, garantissant ainsi une lyse suffisante des cellules pour isoler les mitochondries tout en minimisant la libération de chromatine et la contamination des fractions mitochondriales. Toutes les purifications suivantes ont été faites avec 50 passages.

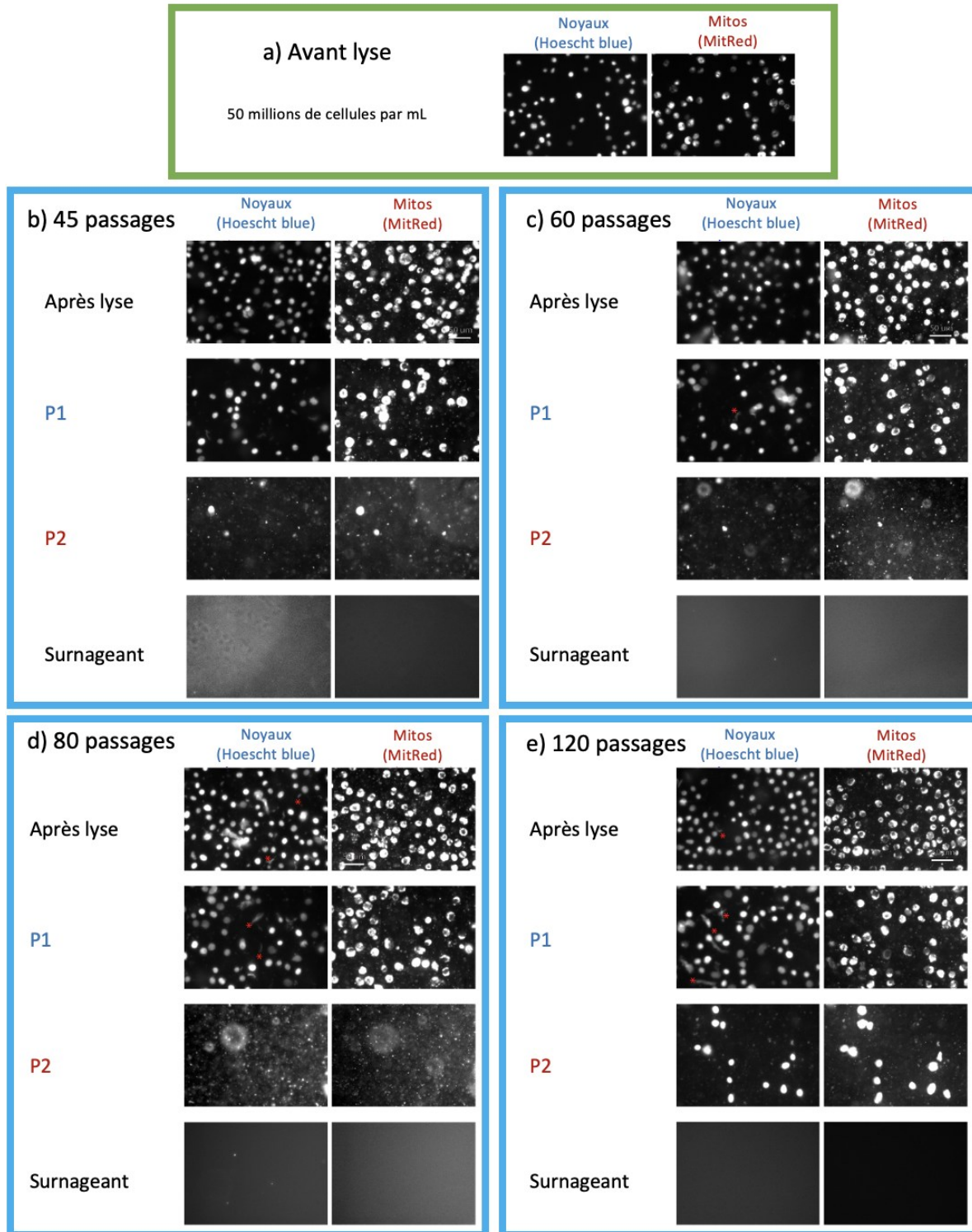


Figure 34. Optimisation de la purification mitochondriale par microscopie de fluorescence.

a) Cellules resuspendues à 50 millions par mL avant la lyse ; b) Fractions cellulaires après 45 passages des cellules à travers l'aiguille ; c) Fractions cellulaires après 60 passages des cellules à travers l'aiguille ; d) Fractions cellulaires après 80 passages des cellules à travers l'aiguille ; e) Fractions cellulaires après 120 passages des cellules à travers l'aiguille. Les étoiles rouges dans les images représentent la chromatine brisée libre dans les échantillons à cause de la rupture nucléaire.

Après la purification des mitochondries, la microscopie électronique en transmission (MET) a été utilisée pour évaluer l'intégrité des mitochondries. La **Figure 35** confirme que les mitochondries conservent leur intégrité structurelle globale, sans signes visibles de dommages. Les crêtes mitochondriales bien définies sont clairement observées, attestant de la préservation de l'architecture interne. Une observation plus détaillée dans la **Figure 35(b)** met en évidence la structure caractéristique à double membrane, confirmant encore l'état intact des mitochondries purifiées. Cependant, d'autres entités biologiques sont également visibles sur l'image dans la **Figure 35(a)**, ce qui s'explique par le fait que la méthode d'isolement utilisée repose sur la centrifugation différentielle, produisant des fractions enrichies en mitochondries mais non totalement exemptes d'autres composants cellulaires.

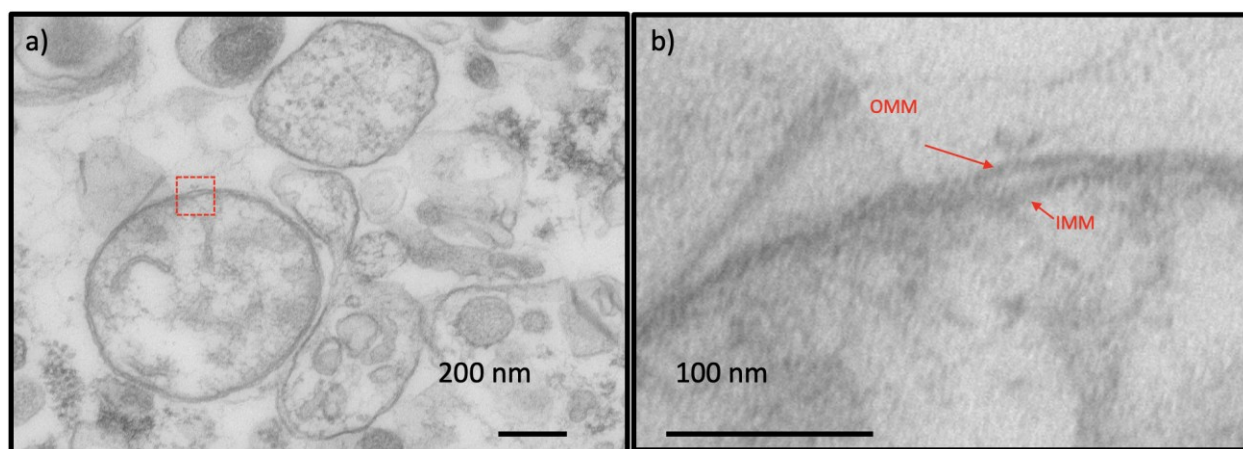


Figure 35. Microscopie électronique en transmission des mitochondries isolées.

a) Mitochondrie isolée ou les crêtes et la double membrane peut être apprécié ; b) magnification de la zone dans le carré rouge en a). La structure caractéristique de la double membrane est confirmée.

Cette évaluation détaillée de l'intégrité mitochondriale, réalisée par microscopie à fluorescence et microscopie électronique à transmission (MET), souligne l'efficacité du protocole de purification pour isoler des mitochondries intactes et structurellement saines. Ces résultats constituent une base solide pour les analyses électrochimiques qui suivront, où la fonctionnalité et l'activité des mitochondries purifiées seront évaluées. La préservation de l'intégrité mitochondriale est essentielle pour garantir que les signaux électrochimiques observés reflètent fidèlement leurs processus biologiques et biochimiques, permettant ainsi des observations fiables sur leur comportement redox et leurs interactions avec l'EGO.

5.2 Confirmation de la présence des mitochondries sur la surface des électrodes

Afin de valider l'immobilisation des mitochondries sur les électrodes, une analyse en microscopie électronique à balayage (MEB) a été réalisée (**Figure 36**). Pour ces observations, des électrodes en carbone sérigraphié (SPE) ont été choisies en raison de leur géométrie plane, facilitant les étapes successives de préparation impliquant des immersions dans différentes solutions (voir détails dans la méthodologie).

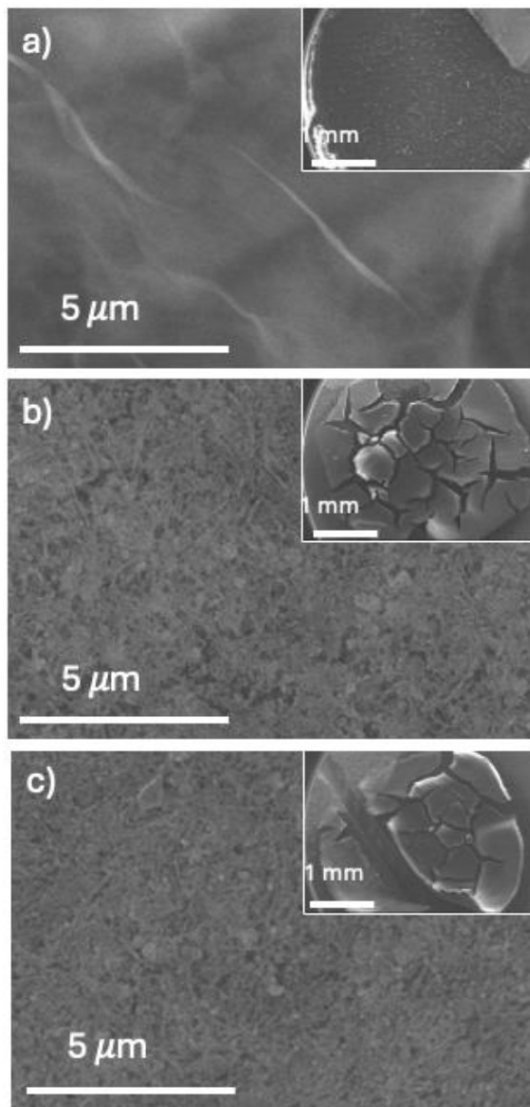


Figure 36. Microscopie électronique à balayage des mitochondries immobilisées sur des électrodes.

Images MEB des électrodes en carbone sérigraphié modifiées avec EGO-60h : (a) avant l'ajout des mitochondries, montrant les feuillets de EGO à la surface ; (b) après l'ajout et le séchage des mitochondries ; (c) après une immersion dans l'électrolyte de travail pendant 20 minutes.

Les images présentées dans les panneaux (a–c) de la **Figure 36** comparent une électrode modifiée uniquement avec du EGO soniqué pendant 60 heures (EGO-60h) (a), la même électrode après l'ajout et le séchage des mitochondries (b), et enfin après une immersion dans l'électrolyte de travail pendant 20 minutes (c). La présence d'une matrice biologique dans les images (b) et (c), ainsi que des structures arrondies compatibles avec la morphologie mitochondriale, confirment la bonne immobilisation des mitochondries à la surface de l'électrode même après l'immersion des électrodes dans l'électrolyte de travail. Les encadrés dans les images mettent en évidence la formation d'une couche biologique épaisse qui reste adhérente même après manipulation de l'électrode, témoignant de la forte interaction entre les mitochondries et la surface modifiée.

Il est important de noter que, bien que le protocole d'immobilisation inclue une étape de séchage avant l'imagerie ou les mesures électrochimiques, la morphologie sphérique des mitochondries est globalement préservée à la surface de l'électrode, comme le montrent les **Figures 31 (b–c)**. Cette observation suggère que le processus de séchage n'entraîne pas d'effondrement structural majeur ni de perturbation significative de la membrane externe des mitochondries. Le maintien de leur forme arrondie indique que les organites conservent un certain degré d'intégrité structurelle malgré l'exposition à des conditions de séchage à l'air, ce qui est essentiel pour garantir que les signaux électrochimiques restent représentatifs d'une activité biologique pertinente.

5.3 Mesures électrochimiques et validation avec des essais métaboliques (SeaHorse) de mitochondries purifiées

L'étude des signaux électrochimiques mitochondriaux offre des informations essentielles sur les processus redox et la bioénergétique qui sous-tendent les fonctions cellulaires. En intégrant les mitochondries sur des surfaces d'électrodes, il devient possible de mesurer directement leur activité électrochimique, permettant ainsi d'explorer leur capacité de phosphorylation oxydative, l'efficacité de la chaîne de transport d'électrons et leurs interactions avec des matériaux externes. Cette section se concentre sur la caractérisation électrochimique des mitochondries isolées à partir de deux lignées cellulaires distinctes : HeLa et HEK293.

Les expériences initiales ont été réalisées avec des mitochondries isolées de cellules HeLa, une lignée issue d'un carcinome cervical humain, dans du PBS [144]. Ces tests ont permis de caractériser leur comportement redox et le comparer avec ce qui a été obtenu dans la littérature. Cependant, malgré des résultats intéressants, des limitations ont été observées, notamment en termes de reproductibilité et d'intensité des signaux électrochimiques.

À la suite de ces observations, les expériences ont été étendues aux mitochondries issues de cellules HEK293, dérivées de cellules rénales embryonnaires humaines[145]. Ces mitochondries ont montré une activité électrochimique significativement plus élevée et une meilleure stabilité, ce qui a facilité leur utilisation pour des analyses détaillées. En conséquence, les mitochondries HEK293 sont devenues le système modèle principal pour la caractérisation électrochimique dans cette étude.

Dans les sections suivantes, les méthodologies et résultats pour chaque lignée cellulaire seront présentés, en commençant par les tests sur les mitochondries HeLa, suivis par ceux réalisés avec les mitochondries HEK293, pour mettre en évidence les différences dans leur comportement électrochimique et leur interaction avec les matériaux d'électrodes.

5.3.1 Électrochimie de mitochondries des cellules HeLa

La **Figure 37(a)** présente les voltampérogrammes cycliques typiques des électrodes en graphite pyrolytique nu dans une solution PBS à 100 mM. À 0,1 V et -0,02 V, on observe respectivement des pics d'oxydation et de réduction, caractéristiques du comportement rédox des surfaces carbonées en raison de la présence de groupes fonctionnels oxygenés dans la structure du matériau. À -0,5 V, une onde de réduction est visible, attribuée à la présence de traces d'oxygène dans la solution de travail. Cette onde est plus marquée lors du premier cycle, ce qui indique que l'oxygène est consommé à la surface de l'électrode pendant les cycles suivants. Le PBS a été utilisée comme électrolyte dans ces premières expériences pour pouvoir comparer nos signaux avec ceux obtenues par d'autres groupes de recherche qui ont aussi utilisé du PBS. Cependant, dans des expériences ultérieurs la solution tampon MAS a été utilisé pour donner aux mitochondries les meilleures conditions possibles pour maximiser leur activité.

La **Figure 37(b)** montre le voltampérogramme obtenu avec une électrode PGE fonctionnalisée avec des mitochondries. Lors du premier cycle, on observe une augmentation nette du courant à 0,62 V lors du balayage anodique, ce qui correspond au signal électrochimique des mitochondries. De plus, au cours du premier cycle, l'onde cathodique à -0,5 V semble plus prononcée. Considérant que l'électrolyte est saturé avec N_2 , cela pourrait correspondre à la réduction d'oxygène qui est présent dans la suspension mitochondriale déposée sur l'électrode, non saturée en N_2 avant le dépôt.

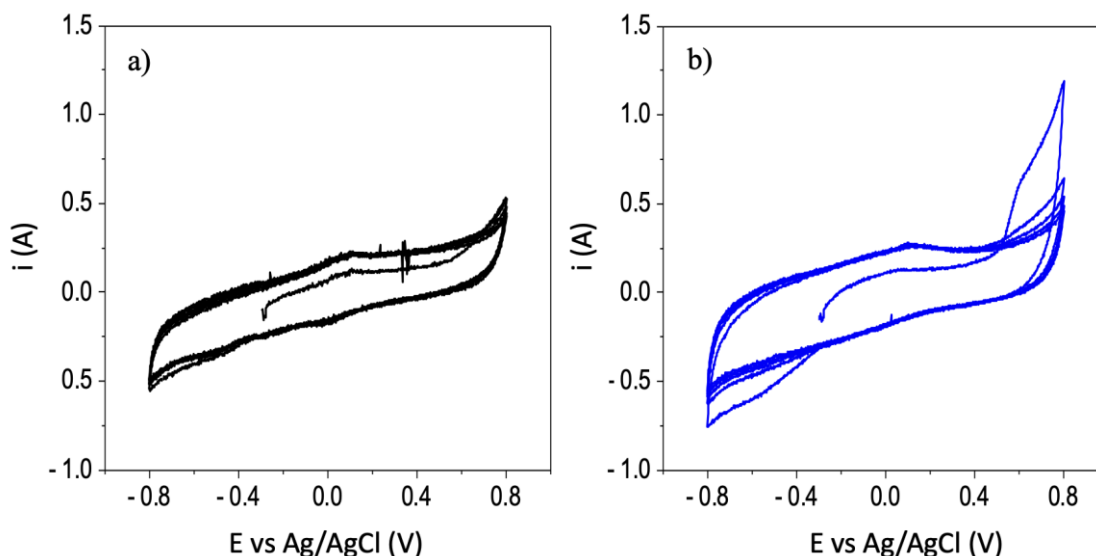


Figure 37. Voltampérogrammes de PGE et des mitochondries sur PGE.

Voltampérogrammes cycliques à $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ dans du PBS à 100 mM pour : a) une électrode en graphite pyrolytique nue, et b) une électrode en graphite pyrolytique sur laquelle ont été déposés, par drop-casting, trois fois $5 \mu\text{L}$ d'une suspension de mitochondries à 200 mg/mL dans du PBS.

Le fait que le signal d'oxydation ne soit observé que pendant le premier cycle pourrait être lié à l'absence de substrats dans la solution de travail pour maintenir la chaîne de transport des électrons mitochondriale active. Lors de l'oxydation, des électrons seraient transférés de la mitochondrie à l'électrode, ce qui signifie que l'apport d'électrons des voies métaboliques doit être constant pour stimuler l'activité des complexes protéiques de la CTE. De plus, un détachement de la couche mitochondriale de l'électrode a été observé ce qui pourrait également expliquer pourquoi le signal n'est présent que lors du premier cycle. Ce détachement pourrait réduire le contact entre les mitochondries et l'électrode, limitant ainsi le transfert d'électrons lors des cycles suivants.

Comme première confirmation du fait que les pics d'oxydation et de réduction observées dans les voltampérogrammes correspondent aux mitochondries, différentes charges de suspensions mitochondriales ont été déposées sur l'électrode de graphite pyrolytique. Comme le montre la **Figure 38**, le pic d'oxydation présente une forte dépendance par rapport à la concentration de mitochondries, ce qui indique que le signal provient de celles-ci. La concentration mitochondriale "1X" utilisée pour ces expériences correspond à une densité de 28,29 mg/cm². Des concentrations équivalentes à 2X et 3X ont également été testées.

Dans le cas de l'onde de réduction, la dépendance vis-à-vis de la concentration est moins évidente, ce qui indique que ce signal provient très probablement de la réduction des traces d'oxygène présentes dans la suspension déposée sur les électrodes.

Étant donné que la purification des mitochondries a été réalisée par centrifugation différentielle, séparant les composants cellulaires selon leur taille, les signaux électrochimiques observés dans les voltampérogrammes pourraient également provenir des lysosomes ou d'autres structures cellulaires de taille similaire aux mitochondries. Pour écarter la possibilité que d'autres structures cellulaires soient la source du pic d'oxydation, une expérience supplémentaire a été réalisée. L'expérience consistait en l'isolement des organites par immuno-purification avec des billes magnétiques marquées avec un anticorps spécifique aux mitochondries humaines, ce qui permet d'obtenir des fractions mitochondriales de haute pureté [146].

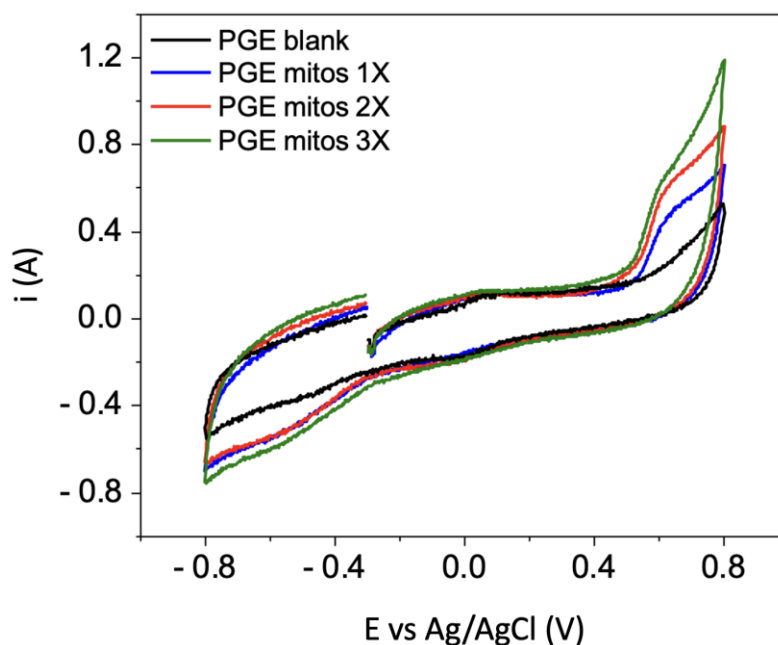


Figure 38. Signaux électrochimiques en fonction de la charge mitochondriale.

Voltampérogrammes cycliques de différentes charges de mitochondries déposées par drop-casting sur des électrodes de graphite pyrolytique. Les voltampérogrammes ont été enregistrés dans une solution de PBS saturée avec N_2 , à 100 mM. La vitesse de balayage était 20 mVs^{-1} .

La **Figure 39** montre qu'une fraction de mitochondries de haute pureté continue de présenter le pic d'oxydation obtenu à partir de celles isolées par centrifugation différentielle, ce qui confirme que les mitochondries sont la source des signaux électrochimiques observés. Les billes magnétiques avec les anticorps ont également été testés, de même que les fractions négatives obtenues lors de l'isolement des mitochondries par immuno-purification. Comme le montre la **Figure 39**, aucun des voltampérogrammes ne présente une onde anodique comme celle observée avec les mitochondries.

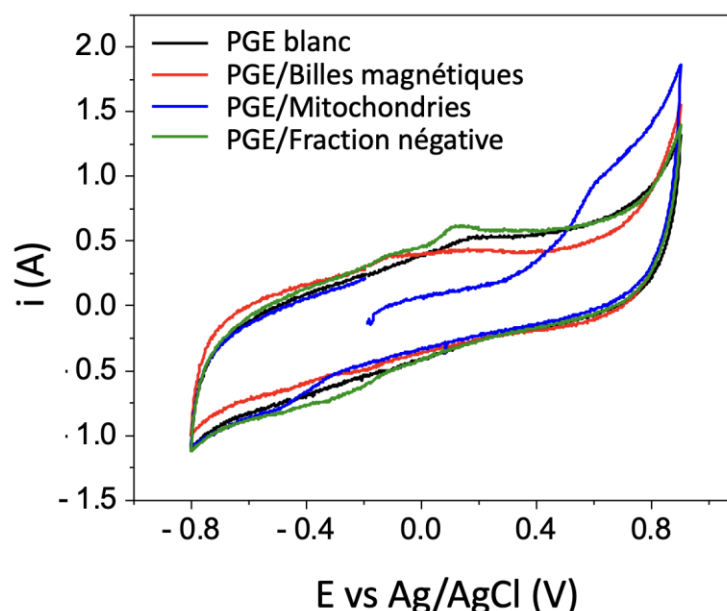


Figure 39. Voltampérogrammes cycliques des mitochondries isolées par immuno-purification.

Voltampérogramme cyclique d'une électrode PGE nue (courbe noire). VC de la même électrode sur laquelle a été déposée une suspension mitochondriale immuno-purifiée (courbe bleue). VC des billes magnétiques (courbe rouge), et la fraction négative (courbe verte). Expériences réalisées dans du PBS saturé avec N_2 à 100 mM à une vitesse de balayage de $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Même si l'intégrité structurales des mitochondries a été testé par MTE, il est nécessaire de s'assurer qu'elles restent fonctionnelles après la purification pour valider les résultats électrochimiques obtenus. Pour ce faire, dans ce travail on a utilisé des essais métaboliques.

Comme expliqué dans la **section 2.1.2**, l'accepteur final d'électrons de la CTE mitochondriale est l'oxygène, et sa réduction génère de l'eau (voir **Figure 3**, flèche orange). Ainsi, l'activité de la CTE est couramment suivie en mesurant la consommation d'oxygène mitochondriale. La technique d'analyse Seahorse est largement utilisée pour évaluer la fonction mitochondriale en mesurant le taux de consommation d'oxygène (OCR) des cellules ou des mitochondries isolées. Cette méthode fournit des informations détaillées sur la respiration mitochondriale en analysant la manière dont l'OCR réagit à différentes conditions métaboliques et interventions pharmacologiques.

Lors d'une expérience typique avec l'analyseur Seahorse, des composés spécifiques sont injectés de manière séquentielle pour explorer différents aspects de la fonction mitochondriale. Par exemple, l'ajout d'ADP stimule la synthèse d'ATP, ce qui entraîne une augmentation du taux de consommation d'oxygène (OCR), car les mitochondries utilisent l'oxygène pour produire de l'ATP via la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Ensuite, l'injection d'oligomycine (OM), un inhibiteur de l'ATP synthase, réduit l'OCR en bloquant la synthèse d'ATP. Cela permet d'isoler la respiration mitochondriale non liée à la production d'ATP.

L'étape suivante consiste à introduire un agent découplant, tel que le trifluorométhoxyphénylhydrazone (FCCP), qui augmente l'OCR en dissipant le gradient de protons à travers la membrane mitochondriale interne (MMI). Cette dissipation élimine le gradient électrochimique nécessaire à la production d'ATP, obligeant les complexes de la chaîne de transport des électrons (CTE) à accélérer leur activité pour tenter de rétablir le gradient perdu. Ce processus, bien que stimulant une consommation accrue d'oxygène, n'aboutit pas à une production efficace d'ATP. Enfin, des inhibiteurs spécifiques comme la roténone et l'antimycine A, ciblant respectivement les complexes I et III de la CTE, sont ajoutés pour arrêter complètement la respiration mitochondriale, provoquant une chute marquée de l'OCR.

Cette méthodologie progressive permet d'identifier les défauts spécifiques au sein de la CTE, de mesurer les réponses mitochondriales et d'évaluer la santé et l'efficacité des mitochondries dans diverses conditions expérimentales.

Dans la **Figure 40(a)**, on a mesuré l'OCR des mitochondries isolées de cellules HeLa (équivalent à 10 µg de protéine mitochondriale) et évalué leur réponse à divers agents pharmacologiques tels que décrits précédemment. Il est clair que l'OCR répond bien aux différents agents pharmacologiques comme attendu. Ces variations de l'OCR reflètent l'activité respiratoire mitochondriale sous les conditions expérimentales établies et sert pour évaluer les modifications fonctionnelles induites par les traitements.

Dans la **Figure 40(b)**, on a comparé la respiration basale des mitochondries isolées de cellules HeLa et de cellules HEK293, ainsi que leur réponse à l'ajout de Roténone et d'Antimycine A, inhibiteurs respectifs des complexes I et III de la CTE. Les mitochondries des cellules HeLa présentaient une respiration basale moyenne d'environ 20 pmol/min, tandis que celles des cellules HEK293 affichaient une respiration basale significativement plus élevée, avoisinant les 80 pmol/min. La différence notable dans les taux de respiration basale suggère que les mitochondries des cellules HEK293 ont une activité oxydative intrinsèquement plus élevée comparée à celles des cellules HeLa. Cette augmentation de l'activité respiratoire peut être attribuée à plusieurs facteurs, tels qu'une efficacité accrue des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire, ou des différences métaboliques inhérentes entre les lignées cellulaires.

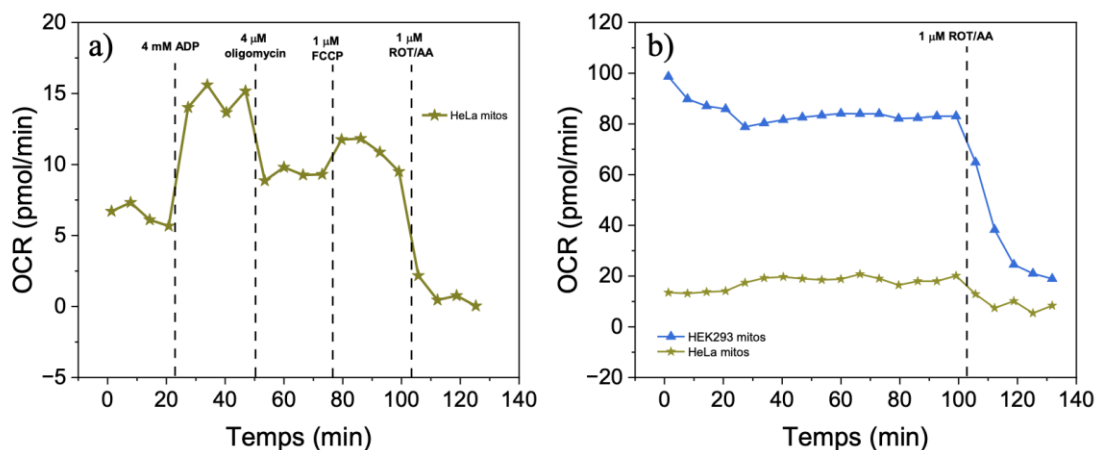


Figure 40. Taux de consommation d'oxygène de mitochondries de cellules HeLa et HEK293.

a) OCR des mitochondries isolées de cellules HeLa et la réponse aux différents agents pharmacologiques ; b) comparaison de l'OCR basal et sa réponse à des inhibiteurs des complexes I et III de la CTE pour des mitochondries isolées de cellules HeLa comparées avec celles de cellules HEK293.

Compte tenu de ces résultats, les cellules HEK293 sont privilégiées pour les expériences ultérieures. Leur taux de respiration basale supérieur offre plusieurs avantages : il permet une meilleure résolution dans la détection des variations d'activité mitochondriale, améliore la sensibilité des tests bioénergétiques, et garantit une fiabilité accrue des données obtenues. L'utilisation des mitochondries provenant des cellules HEK293 optimisera ainsi la qualité des analyses fonctionnelles et facilitera l'interprétation des effets des différents traitements expérimentaux.

En conclusion, même si les premiers indices de communication mitochondries-électrode ont été obtenues avec des cellules HeLa, les mitochondries isolées des cellules HEK293 ont été utilisées pour toutes les expériences subséquentes en raison de leur activité respiratoire élevée, ce qui rend cette lignée cellulaire plus adaptée aux études approfondies sur la bioénergétique mitochondriale. Aussi la solution tampon MAS sera désormais utilisée pour donner aux mitochondries les conditions le plus pareils à celles dans lesquelles elles se trouvent dans une cellule vivante.

5.3.2 Électrochimie de mitochondries des cellules HEK293

L'étude du comportement électrochimique des mitochondries a généralement été réalisée à l'aide d'électrodes de travail à base de carbone, telles que les électrodes de graphite pyrolytique (PGE) [16] et le papier carbone [17,18,23,124]. Ces matériaux se sont avérés biocompatibles ; cependant, des signaux faibles sont obtenus avec les PGE, et les forts courants capacitifs du papier carbone entravent l'étude détaillée des organelles, dont la structure entraîne des courants faradiques de faible intensité. Pour cette section, nous avons utilisé des électrodes GCE, PGE et PGE/EGO pour comparaison.

La voltampérométrie cyclique et la voltampérométrie à ondes carrées ont été utilisées pour évaluer la réponse électrochimique des isolats mitochondriaux immobilisés sur les différents matériaux d'électrode. La charge mitochondriale déposée sur les électrodes a été optimisée, avec un dépôt optimal de $0,495 \text{ mg/cm}^2$ de protéines mitochondriales, soit une quantité 10 fois inférieure à celle rapportée dans les études précédentes de la littérature. Les électrodes en graphite pyrolytique (PGE) et en carbone vitreux (GCE) ont été sélectionnées en raison de leur stabilité, de leur biocompatibilité et de leur utilisation bien établie dans les études bioélectrochimiques. L'oxyde de graphène exfolié électrochimiquement (EGO) a été choisi pour ses grandes tailles de feuillets et sa faible densité de défauts, comme rapporté par Lei et al. [7], qui améliorent la conductivité électrique et offrent une surface optimisée pour le transfert d'électrons. Pour les expériences avec EGO, la charge de matériau a été optimisée et on a déterminé un dépôt optimal de $85 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$ d'EGO-xh (à une concentration de $0,4 \text{ mg/mL}$). Les voltampérogrammes cycliques présentés dans la **Figure 41(b)** montrent les caractéristiques typiques des matériaux carbonés, mais aucun pic ou signal pouvant être attribué aux mitochondries sur GCE, PGE et PGE/EGO-60h (les voltampérogrammes des matériaux nus sont montrés dans la **Figure 41(a)**).

Ces observations diffèrent des résultats obtenus par Zhao *et al.* [16], qui ont détecté de faibles signaux redox réversibles provenant de mitochondries isolées de cellules HeLa et déposées sur PGE. L'absence de tels signaux dans nos voltampérogrammes pourrait s'expliquer par la source des mitochondries isolées [17], qui, dans ce travail, proviennent d'une autre lignée cellulaire humaine.

Cependant, comme le montre la **Figure 41(d)**, l'utilisation d'une technique plus sensible, telle que la voltampérométrie à ondes carrées (VOC), révèle plusieurs pics sur les voltampérogrammes des mitochondries déposées sur les électrodes carbonées. Les potentiels de pic et les intensités dépendent de la nature de l'électrode. La VOC des mitochondries sur GCE présente deux petits pics à 0 et 0,2 V. Comparé à la VOC des mitochondries sur GCE, un nouveau pic (Pic I) apparaît à -0,28 V pour les mitochondries sur PGE (voir le signal déconvolué dans la **Figure 42(a)**). D'autre part, l'ensemble du signal pour PGE/EGO-60h/mitochondries est décalé de 200 mV vers des

potentiels plus négatifs en comparaison avec les deux autres électrodes, et un pic supplémentaire à 0,16 V apparaît dans la VOC (voir le signal déconvolué dans la **Figure 42(b)**). Cela suggère que la présence de l'EGO améliore le transfert d'électrons des mitochondries vers l'électrode, indiquant un avantage à l'utiliser comme matériau de support pour l'électrochimie directe des mitochondries isolées.

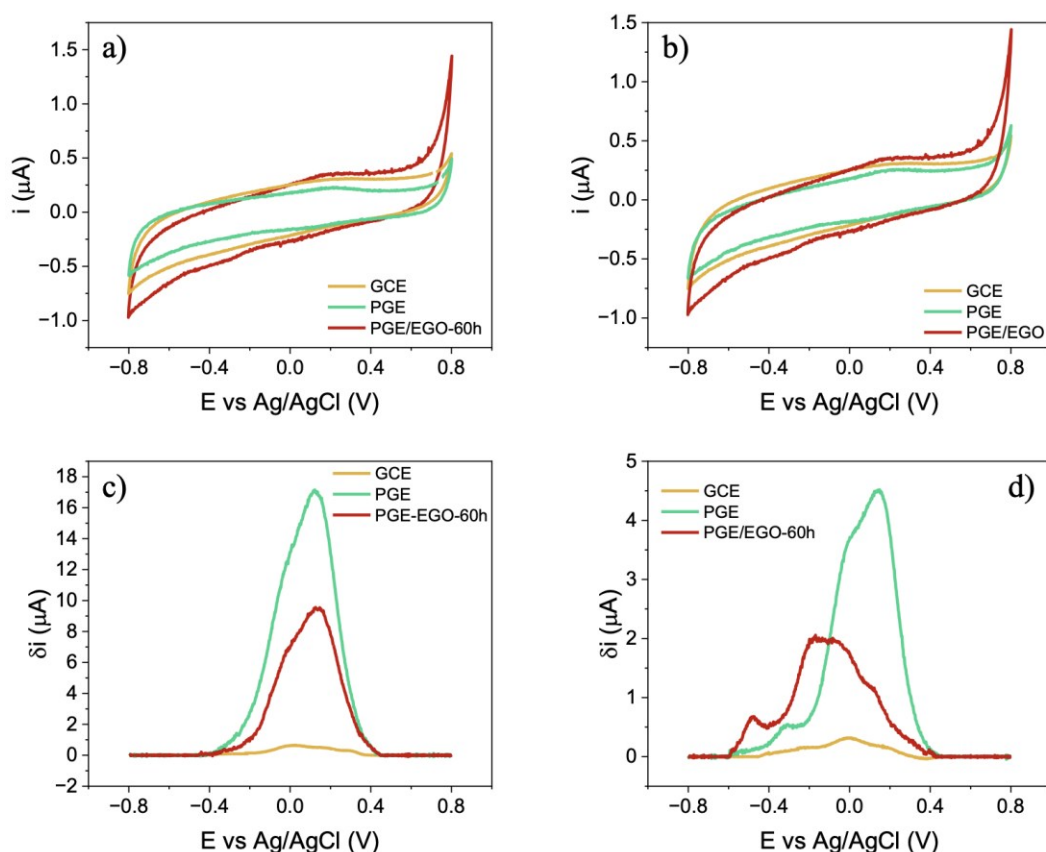


Figure 41. Voltampérométrie cyclique et voltampérométrie à onde carrée des mitochondries isolées.

a) Voltampérométrie cyclique à 20 mVs⁻¹ des différentes électrodes nues; b) Voltampérométrie cyclique à 20 mVs⁻¹ des mitochondries drop-castées sur les différentes électrodes; c) Voltampérométrie à onde carrée des électrodes nues; d) Voltampérométrie à onde carrée des mitochondries drop-castées sur les différentes électrodes. L'électrolyte de travail pour toutes les mesures a été MAS saturé avec N₂.

Les VOC des électrodes nues GCE, PGE et PGE/EGO dans une solution tampon MAS sont présentées dans la **Figure 41(c)**, et ses signaux déconvolués dans l'**annexe 1**. En comparant les VOC enregistrées avec et sans mitochondries, il est conclu que les pics II et III sont liés aux processus redox propres aux électrodes en carbone impliquant les groupes fonctionnels oxygénés, tandis que les pics I et IV devraient être associés aux mitochondries.

D'autre part, le pic I dans les **Figures 36(a-b)** se trouve à -0,28 V et -0,48 V pour PGE/mitochondries et PGE/EGO-60h/mitochondries, respectivement. D'après la littérature, ce pic pourrait être associé au couple FAD/FADH₂ [16], au CoQ [17,18] ou au cyt C [147], qui sont tous des éléments clés de la CTE. Le pic IV dans la **Figure 42(b)** est situé à 0,16 V. Dans les travaux de Giroud *et al.* [17] et de Koepke *et al.* [18], l'oxydation du CoQ a été attribuée aux pics trouvés à 0,172 V - 0,222 V, 0,276 V et 0,134 V sur les VCs de mitochondries isolées de levure, de pomme de terre et de cœur bovin, respectivement. Il est important de noter que Zhang *et al.* [147] ont également trouvé un pic à -0,3 V en étudiant la réponse électrochimique du cytochrome C3 actif immobilisé sur du carbone vitreux par voltampérométrie à ondes carrées, ainsi qu'un autre pic à -0,5 V correspondant au cytochrome C3 en solution. Tous les potentiels des pics référencés dans la littérature ont été convertis à l'électrode de référence Ag/AgCl pour faciliter la comparaison.

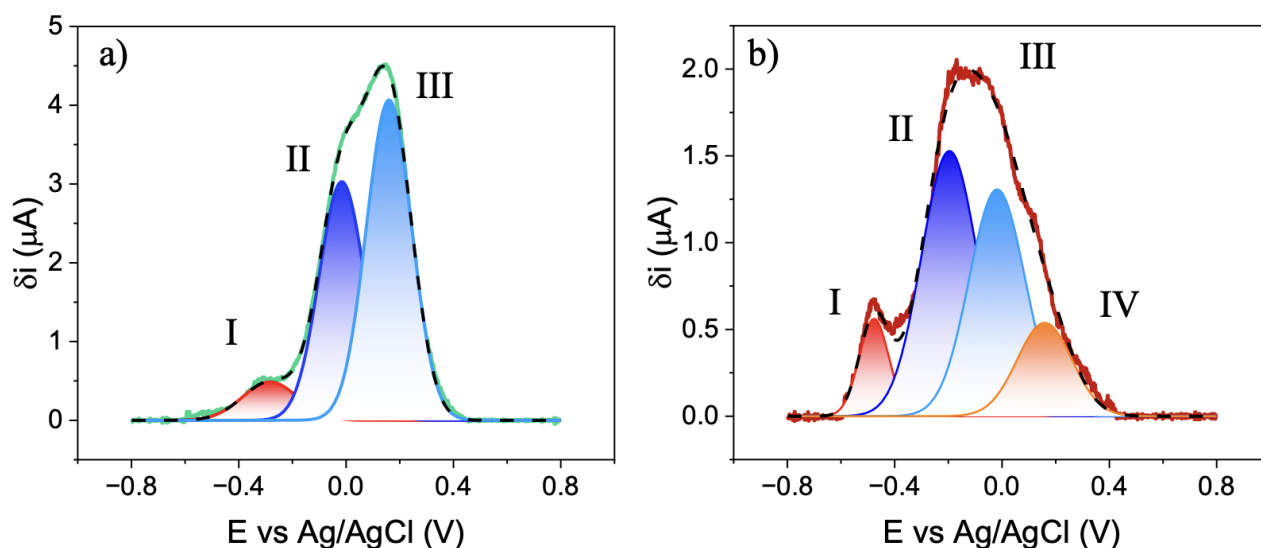


Figure 42. Déconvolution des signaux électrochimiques mitochondriaux par VOC.

a) Déconvolution du VOC des mitochondries drop-castées sur une électrode PGE ; b) Déconvolution du VOC des mitochondries drop-castées sur une électrode PGE-60h.

Dans la section 5.2.1 on a établi qu'il est possible d'obtenir des signaux électrochimiques à partir de mitochondries isolées. Cependant, la complexité des processus étudiés, combinée avec la diversité des sources de mitochondries et des électrodes utilisées dans différentes études, rend l'identification de l'origine des signaux électrochimiques difficile. Afin de vérifier que les pics I et IV sont bien associés à la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (ETC) et de déterminer leur origine, des inhibiteurs spécifiques ciblant les complexes protéiques impliqués dans l'OXPPOS ont été utilisés. Avant le dépôt sur l'électrode, les mitochondries isolées ont été

exposées pendant une nuit à un mélange de Roténone-Antimycine A (RAA) à 1 μM ou à l'oligomycine (OM) à 4 μM pour inhiber spécifiquement les complexes I et III, ou l'ATP synthase (Complexe V), respectivement. La **Figure 43** présente les VOC obtenus.

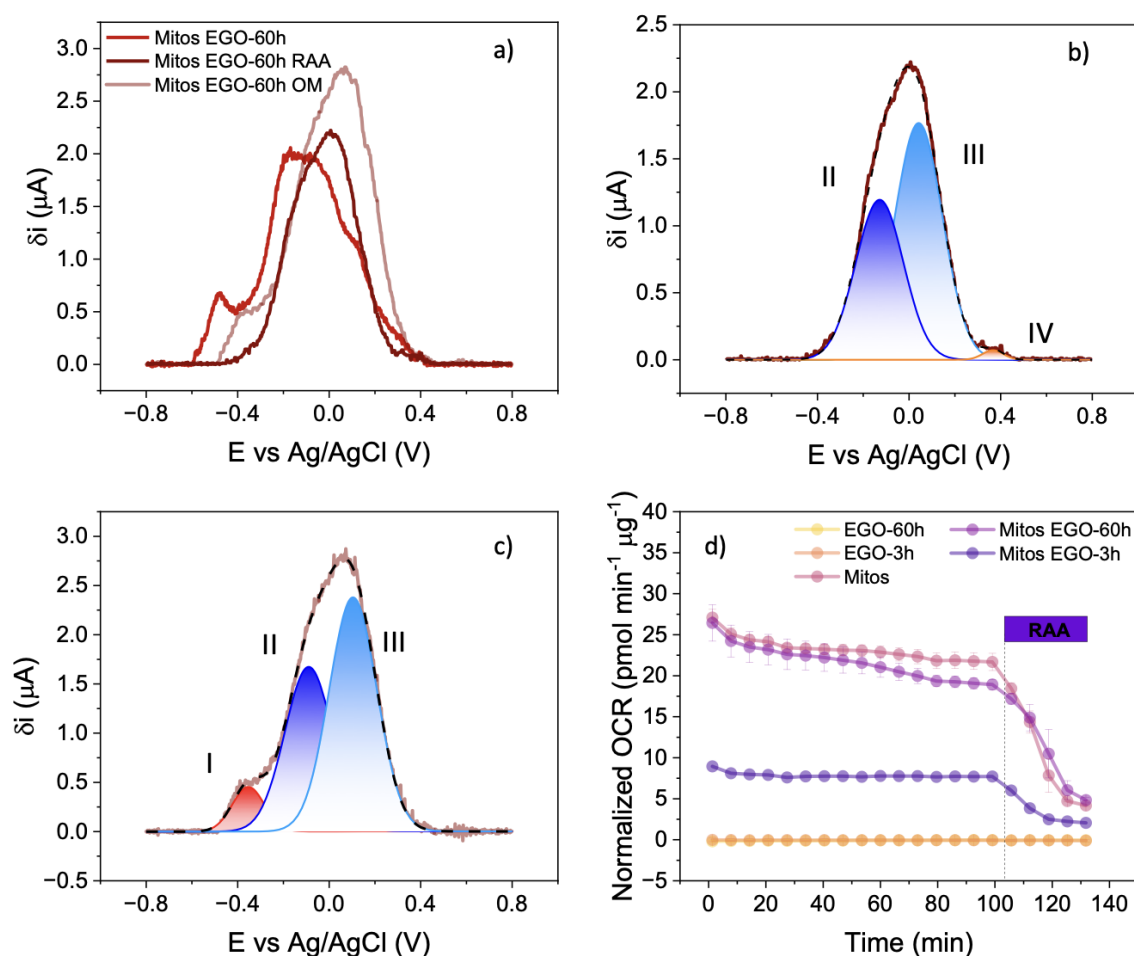


Figure 43. VOC et analyse Seahorse des mitochondries en présence d'inhibiteurs spécifiques.

a) Voltampérogrammes à onde carrée de mitochondries déposées sur PGE/EGO-60h, après soustraction de la ligne de base, seules et en présence d'oligomycine (OM) et du mélange roténone-antimycine A (RAA). Données non soustraites présentées dans l'annexe 2. Les voltampérogrammes carrés des pics déconvolués de mitochondries déposées sur PGE/EGO-60h sont montrés en présence de RAA (b) et d'OM (c). Le tampon MAS a été utilisé comme électrolyte de travail. L'analyse Seahorse des mitochondries isolées (20 μg de protéines mitochondriales), seules et en présence de EGO-3h et EGO-60h, est montrée en (d). Les données moyennes \pm écart type de 3 réplicats techniques sont présentées.

Comme attendu, en présence de RAA, qui bloque l'O₂PHOS, le pic I disparaît et l'intensité du pic IV diminue de 96 %. L'inhibition des complexes I et III empêche le flux d'électrons vers la fin de la chaîne de transport d'électrons (ETC). Par conséquent, le cyt c et les complexes IV et V ne reçoivent plus d'électrons et ne peuvent plus participer à la respiration mitochondriale ni au

transfert d'électrons de l'organite vers l'électrode. Ces résultats ne permettent pas d'exclure complètement la CoQ comme étant responsable du transfert d'électrons des mitochondries vers l'électrode. Cependant, ils suggèrent que, dans les lignées cellulaires humaines, le cyt c pourrait être la principale source des signaux électrochimiques obtenus à partir des mitochondries isolées. Ces observations concordent avec les études de Zhang *et al.* [147] sur l'électrochimie du cyt c sur des matériaux carbonés, ainsi qu'avec celles de Zhao *et al.* [16] sur l'électrochimie des mitochondries issues d'une autre lignée cellulaire humaine. En effet, le cyt c est considéré comme étant faiblement lié à la membrane interne mitochondriale (IMM) [49], tandis que les autres éléments de la CTE, tels que les complexes I à V, possèdent de nombreux segments transmembranaires et présentent une organisation supramoléculaire complexe [148]. De plus, la CoQ est une molécule hydrophobe intégrée dans la zone lipophile de la membrane interne mitochondriale comme expliqué dans la section 2.1.2.1 [149] ce qui représente une barrière énergétique extra pour que la molécule puisse arriver à la surface de l'électrode. Il convient néanmoins de souligner que la structure repliée des crêtes mitochondriales limite potentiellement la diffusion du cytochrome c vers la surface de l'électrode. En effet, les jonctions de crêtes peuvent compartimenter le cytochrome c dans des invaginations fermées, le rendant moins accessible, même si la membrane externe est perméable. Cette organisation architecturale constitue une limite importante à prendre en compte dans l'interprétation des signaux électrochimiques.

Par ailleurs, le complexe II reste non affecté par le mélange RAA, et le tampon MAS contient du succinate qui alimente continuellement les mitochondries en FADH_2 . Ainsi, les électrons peuvent toujours circuler du FADH_2 au complexe II, puis du complexe II à la CoQ. La baisse d'intensité du pic IV dans la **Figure 43(b)** suggère qu'à un potentiel suffisamment élevé, la CoQ pourrait contribuer de manière minimale au signal du pic IV, qui n'est pas complètement supprimé en présence de RAA.

Avec l'ajout d'OM, le potentiel du pic I se déplace positivement d'environ 120 mV, donnant lieu à un pic qui devient plus convolué avec le pic II (**Figures 37(a) et 37(c)**). Cette réponse est attendue, car l'OM ne désactive pas complètement la chaîne de transport d'électrons (ETC), mais inhibe uniquement la respiration liée à l'ATP. Certains protons peuvent encore fuir de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale, permettant ainsi aux complexes I à IV de continuer à fonctionner pour la formation du gradient électrochimique. Cependant, l'inhibition du complexe V entraîne une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire, ce qui provoque une diminution du pH à l'interface mitochondrie-électrode à cause de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe, ce qui facilite la diffusion de protons de l'espace intermembranaire vers la surface de l'électrode. Selon l'équation de Nernst (**Équation 6**), cette baisse de pH explique le déplacement du potentiel du pic I vers des valeurs plus positives.

Équation 6. Équation de Nernst pour un processus dépendant du pH.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[Ox][H^+]^m}{[Red]} \right)$$

Où

E est le potentiel d'électrode,

E^0 est le potentiel standard,

R est le constant universelle des gaz,

T est la température,

n est le nombre d'électrons transférés,

F est la constante de Faraday,

$[Ox]$ et $[Red]$ sont les concentrations des espèces oxydée et réduite, respectivement,

$[H^+]$ est la concentration de protons, et

m est la quantité de protons impliqués dans la réaction

En parallèle, le pic IV semble disparaître des VOCs après l'ajout d'OM. De manière similaire, les pics II et III sont également décalés vers des potentiels plus positifs en raison de la modification locale du pH, et le pic III devient convolué avec le pic IV. Cela peut être observé par l'intensité de courant plus élevée du pic III dans la **Figure 43(a)**.

Pour valider les données électrochimiques présentées dans la **Figure 43(a)**, l'OCR des isolats mitochondriaux a été mesuré par la technique d'analyse Seahorse. La **Figure 43(d)** illustre la respiration basale des mitochondries isolées seules et en présence d'EGO soniqué pendant 3 et 60 heures. Comme expliqué dans la section précédente, l'injection du mélange RAA inhibe spécifiquement les complexes I et III, entrave le transport des électrons et donc la réduction de l'oxygène. Cette interruption est observée dans la diminution de l'OCR, comme le montre la **Figure 43(d)**. Cela se rapporte aux données électrochimiques de la **Figure 43(b)**. Ces résultats valident que les signaux électrochimiques observés dans la **Figure 42** proviennent de la CTE, plus précisément au niveau du cyt c. Ils confirment également que les méthodes électrochimiques peuvent être utilisées pour évaluer l'activité de la chaîne de transport des électrons dans les mitochondries humaines isolées dans des conditions similaires à celles physiologiques.

Il est intéressant de noter que l'OCR basal des mitochondries en présence de EGO-3h est inférieur de 65 % à celui enregistré en présence de EGO-60h. Ces deux observations indiquent clairement que le temps de sonication de l'EGO a une influence directe sur l'activité de la CTE.

L'OCR basal des mitochondries seules et en contact avec EGO-60h est identique au début des mesures, mais commence à diverger après environ 40 minutes. Plus précisément, l'OCR diminue en présence de EGO au fil du temps, et par conséquent, une exposition prolongée des mitochondries à l'EGO n'est pas recommandée. Lors des études électrochimiques, les mitochondries étaient en contact avec l'EGO pendant moins d'une heure avant les mesures. La diminution de la respiration mitochondriale basale observée avec EGO-3h, par rapport à EGO-60h et aux mitochondries seules, suggère que des temps de sonication plus longs sont moins préjudiciables à la respiration mitochondriale.

5.3.3 Effet du temps de sonication des suspensions d'EGO sur la respiration mitochondriale

D'après la section 5.2.2, il est clair que le comportement électrochimique des mitochondries dépend de l'électrode utilisée. Bien que l'utilisation de l'EGO semble avantageuse pour enregistrer des signaux électrochimiques provenant de mitochondries isolées, il est essentiel de considérer son effet sur la respiration mitochondriale.

Une facette intéressante de l'étude de l'électrochimie mitochondriale réside dans le potentiel de ces systèmes électrochimiques à développer des connaissances fondamentales sur la communication entre les mitochondries et l'électrode, et, plus important encore, à évaluer la fonction mitochondriale. Cela pourrait conduire au développement de plateformes électrochimiques pour le diagnostic des maladies liées aux mitochondries.

La **Figure 44(a)** présente les VOCs de mitochondries isolées déposées par drop-casting sur des électrodes PGE modifiées avec des EGO provenant de suspensions soniquées pendant différents temps. Les VOCs non soustraits sont fournis dans l'**annexe 3**, et les VOCs déconvolués se trouvent dans l'**annexe 4**. L'aire sous les quatre pics est représentée dans la **Figure 44(b)**.

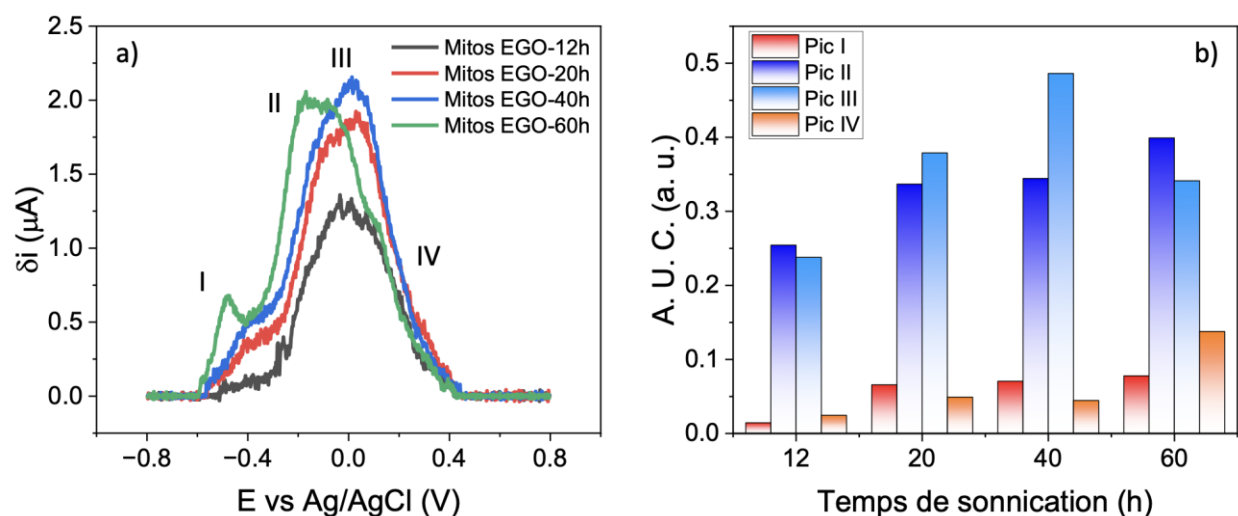


Figure 44. Effet de la sonication de l'EGO sur les signaux électrochimiques mitochondriaux.

a) VOCs avec soustraction de la ligne de base de mitochondries déposées par drop-casting sur une PGE modifiée avec de l'EGO soniqué pendant différents temps, dans un tampon MAS. Données originales dans la l'annexe 3 ; b) Surface sous la courbe des pics déconvolués dans a). Plus le temps de sonication est long, plus la surface des pics associés aux mitochondries est grande.

Les pics I et IV, associés aux mitochondries, présentent des tendances claires en fonction du temps de sonication des suspensions. La surface sous le pic I augmente avec le temps de

sonication, et son potentiel se déplace de -0,39 V à -0,48 V. Ce déplacement négatif des valeurs de potentiel suggère un transfert d'électrons amélioré entre les mitochondries et la surface de l'électrode lorsque la suspension d'EGO subit une sonication plus longue. De même, l'intensité du pic IV augmente et le potentiel de pic se déplace de 0,29 V à 0,16 V. Ce schéma soutient davantage l'hypothèse selon laquelle des temps de sonication plus longs facilitent les processus de transfert d'électrons impliquant les mitochondries sur la surface de l'électrode.

L'aire sous les pics II et III, associés à l'EGO, augmente également initialement avec le temps de sonication jusqu'à 40 heures, indiquant une contribution accrue des signaux de l'EGO. Cependant, à 60 heures, une diminution de ces aires sous le pic est observée, probablement en raison du chevauchement de ces pics d'EGO avec les signaux mitochondriaux de plus en plus marqués. De plus, les potentiels de pic pour ces signaux liés à l'EGO se déplacent vers des valeurs plus négatives : de -0,09 V à -0,20 V pour le pic II et de 0,10 V à -0,02 V pour le pic III. Les VOCs de l'EGO déposé par drop-casting sur des électrodes PGE sans mitochondries sont inclus dans l'annexe 5.

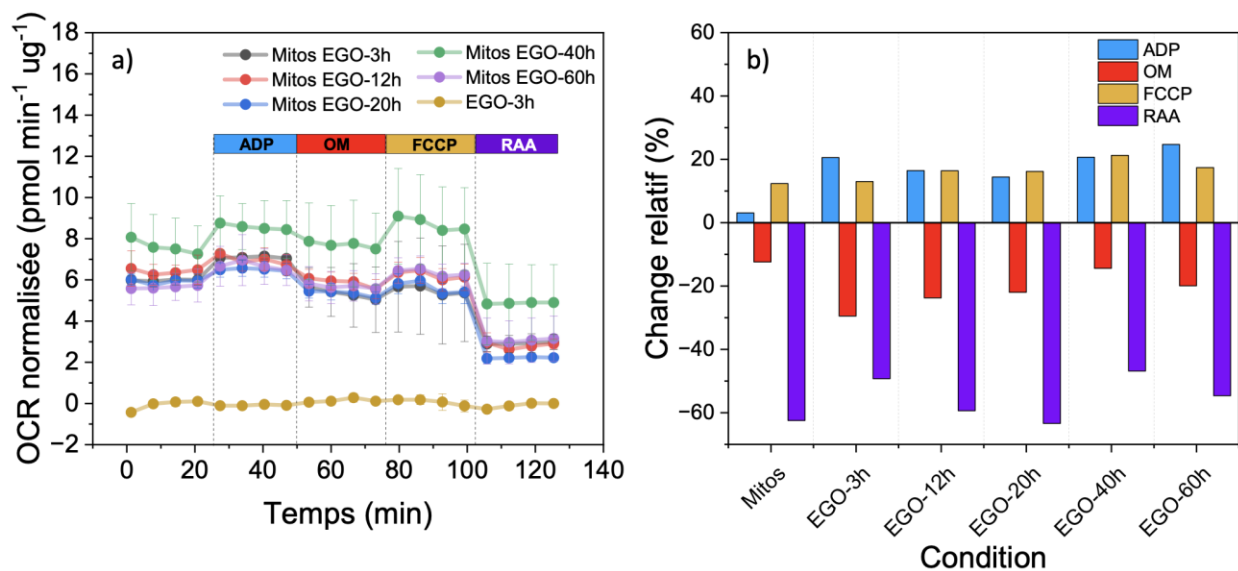


Figure 45. Effet de la sonication de l'EGO sur les réponses Seahorse des mitochondries isolées.

a) Analyse Seahorse de mitochondries isolées en présence d'EGO soniqué pendant différents temps. La moyenne des données \pm écart-type de 5 réplicats techniques est présentée. b) Changements relatifs dans la réponse de la respiration mitochondriale à l'injection d'ADP en tant que substrat et de différents médicaments affectant la CTE. Les changements relatifs dans la respiration mitochondriale ont été calculés en fonction des valeurs d'OCR les plus basses ou les plus élevées observées à l'étape précédente.

La **Figure 45(a)** présente les résultats Seahorse de mitochondries isolées seules et en présence d'EGOs soniqués pendant différents temps. Divers médicaments ont été injectés au cours de l'expérience pour évaluer la réponse de la respiration mitochondriale. Dans tous les cas, et

comme prévu, l'ajout de substrat ADP entraîne une augmentation de l'OCR. Après l'injection d'OM, l'OCR diminue car l'OXPHOS dépendant de la synthèse d'ATP a été arrêté. Lors de l'injection de l'agent découplant trifluorométhoxyphénylhydrazone (FCCP), qui modifie la perméabilité aux protons de la MMI une augmentation de l'OCR est observée. Cela s'explique par le fait que les protons peuvent se déplacer librement à travers la membrane, augmentant l'activité des complexes I-IV et l'OCR. Enfin, après l'injection d'un mélange de roténone et d'antimycine A (RAA), il y a un arrêt complet de la respiration mitochondriale et une chute de l'OCR est observée. L'absence de distinction dans la respiration basale pour les différentes conditions de la **Figure 45(a)** peut être attribuée à la concentration mitochondriale plus faible utilisée dans cette expérience par rapport à celle de la **Figure 43(d)**, ce qui réduit la sensibilité pour détecter des différences subtiles. Dans la **Figure 43(d)**, la concentration mitochondriale plus élevée améliore la résolution de ces variations, permettant des distinctions plus claires dans la respiration basale. Cependant, la grande quantité de mitochondries requise pour de telles expériences pose des défis expérimentaux importants, car obtenir des isolats mitochondriaux en quantité et qualité constantes peut être à la fois chronophage et techniquement exigeant.

Bien que le profil de respiration mitochondriale semble qualitativement similaire pour tous les EGOs, la **Figure 45(b)** montre que la réponse relative de l'OCR à l'ADP et à chaque inhibiteur varie en fonction de leur temps de sonication. Pour l'ADP, un changement relatif d'environ 20 % est observé en présence d'EGO, indiquant une perméabilité accrue des mitochondries au substrat. Le changement relatif le plus élevé a été trouvé pour 60 heures de sonication. Cela suggérerait que l'EGO interagit avec la MME, permettant une diffusion plus rapide de l'ADP à travers la MMI et vers la matrice mitochondriale où il sert de substrat pour le complexe V afin de synthétiser l'ATP. Un effet cohérent et similaire est observé pour l'OM, illustré par le changement relatif négatif et élevé en présence d'EGO par rapport aux mitochondries seules.

Pour le FCCP, il n'y a pas de différence significative entre la réponse relative en présence et en absence d'EGO. Cela indique que les mitochondries sont dans un état couplé (la MMI reste inchangée) même après exposition aux différents EGOs. Aucune différence considérable n'est non plus observée pour la réponse à la RAA, car ces drogues arrêtent simplement la CTE. La consommation catalytique d'oxygène par l'EGO lui-même peut être écartée puisque la réponse de l'OCR reste nulle en l'absence de mitochondries, comme le montrent la **Figure 44(a)**. Ces résultats sont en accord avec les expériences électrochimiques où une activité plus élevée de l'OCR a été détectée lorsque les mitochondries étaient en contact avec l'EGO soniqué pendant des temps plus longs (**Figure 44(a)**).

5.4 Caractérisation des produits de la sonication de l'EGO et son interaction avec les mitochondries

La section 5.2.2 met en évidence que le temps de sonication des suspensions joue un rôle crucial en influençant de manière significative la respiration mitochondriale et, par conséquent, les signaux électrochimiques qui en résultent. Cette observation souligne l'importance de caractériser les différents EGOs afin d'acquérir une compréhension approfondie de la manière dont le matériau interagit avec les mitochondries isolées. La **Figure 46** illustre les images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) des feuillets d'EGO, permettant de visualiser les changements structuraux liés aux variations des temps de sonication. On constate clairement que des durées de sonication prolongées entraînent une diminution significative de la taille des feuillets. Ces feuillets de plus petite taille peuvent offrir une interface accrue entre l'EGO et les membranes des organites, ce qui aurait pour effet de faciliter la réponse électrochimique, comme le montre la **Figure 44(a)**.

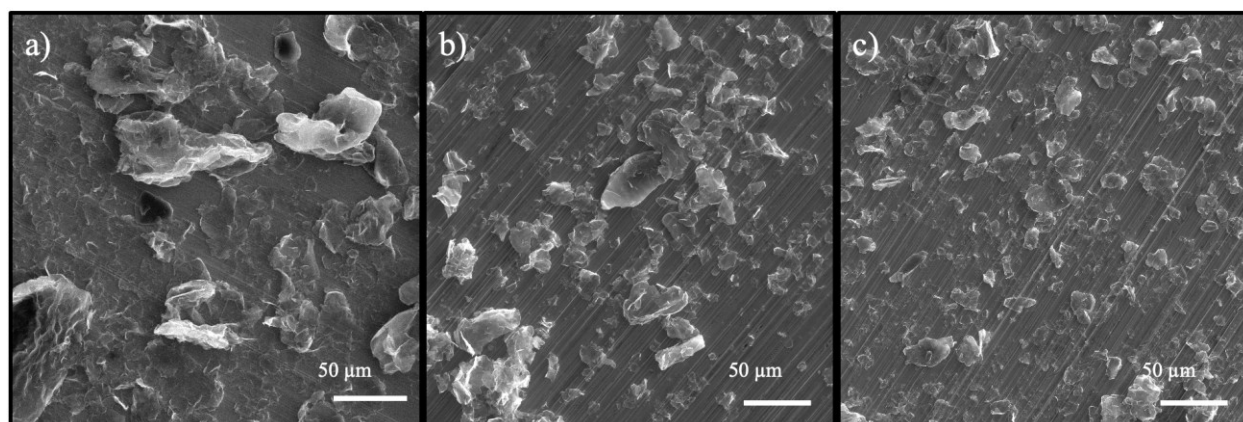


Figure 46. Imagerie MEB des feuillets d'EGO soniqués pendant différents temps.

Images MEB d'EGO soniqué pendant 3h (a), 20h (b), et 60h (c). La taille des feuillets devient de plus en plus petite avec le temps de sonication.

Les spectres XPS présentés dans la **Figure 47** mettent en évidence que des temps de sonication plus longs conduisent à la formation de feuillets d'EGO présentant une réduction significative des groupes fonctionnels oxygénés. Cette diminution des groupes oxygénés s'accompagne d'une augmentation des domaines de carbone sp^2 disponibles dans le plan basal des EGOs. Ces domaines élargis permettent de renforcer les interactions des feuillets avec les biomolécules des membranes mitochondriales via des liaisons π - π , ce qui favorise une meilleure adhésion des mitochondries à la surface de l'électrode [83,122]. Cette adhésion accrue est un facteur clé pour améliorer l'efficacité des mesures électrochimiques. Par ailleurs, l'augmentation de la conductivité électrique des EGOs et des électrodes associées constitue un autre avantage majeur, car elle permet d'améliorer le transfert d'électrons entre les organites et la surface de

l'électrode. Cela se traduit par une communication électrochimique plus efficace, facilitant l'obtention de signaux plus nets et plus reproductibles lors des expériences électrochimiques [7]. Ces caractéristiques mettent en évidence l'importance de la modulation des propriétés des EGOs par sonication pour optimiser les performances des systèmes bioélectrochimiques.

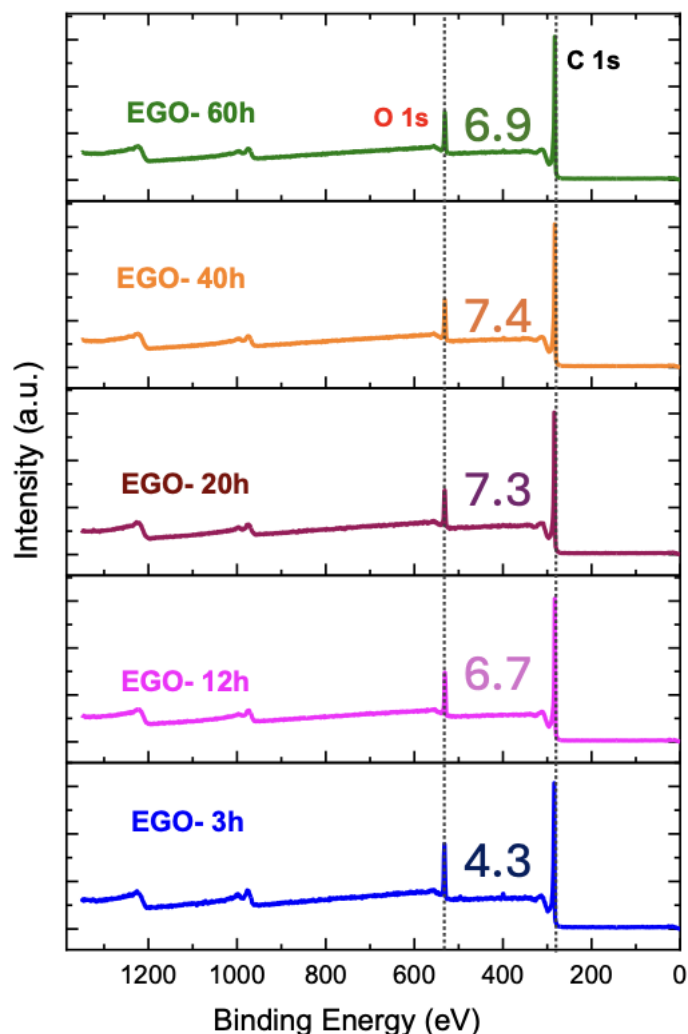


Figure 47. Spectres XPS des EGOs soniqués pendant différents temps.

Spectres de relevé XPS des EGOs soniqués pendant a) 3 h, b) 20 h, c) 40 h et d) 60 h. La valeur du rapport C/O pour chaque EGO est indiquée à côté du spectre correspondant.

Examinons de manière plus approfondie la nature de l'interaction entre les feuillets d'EGO et les mitochondries isolées. La **Figure 48** illustre les images MET des mitochondries isolées, seules et en présence d'EGO soumis à une sonication de 3 ou 60 heures. Ces images ne révèlent pas d'interaction évidente entre les mitochondries et les feuillets de graphène présentés dans la **Figure 46**, mais certains indices visuels suggèrent une influence notable de l'EGO sur les organites. Notamment, en présence d'EGO-3h et d'EGO-60h, les membranes mitochondriales

apparaissent significativement plus sombres par rapport aux mitochondries seules. Ce contraste accru est particulièrement frappant dans les images prises à plus fort grossissement, comme le montrent les **Figures 40(b), (d) et (f)**. Ces images révèlent que, même en présence de l'EGO, les structures des membranes mitochondriales interne (MMI) et externe (MME) demeurent bien définies, ce qui indique que l'intégrité des membranes est globalement préservée.

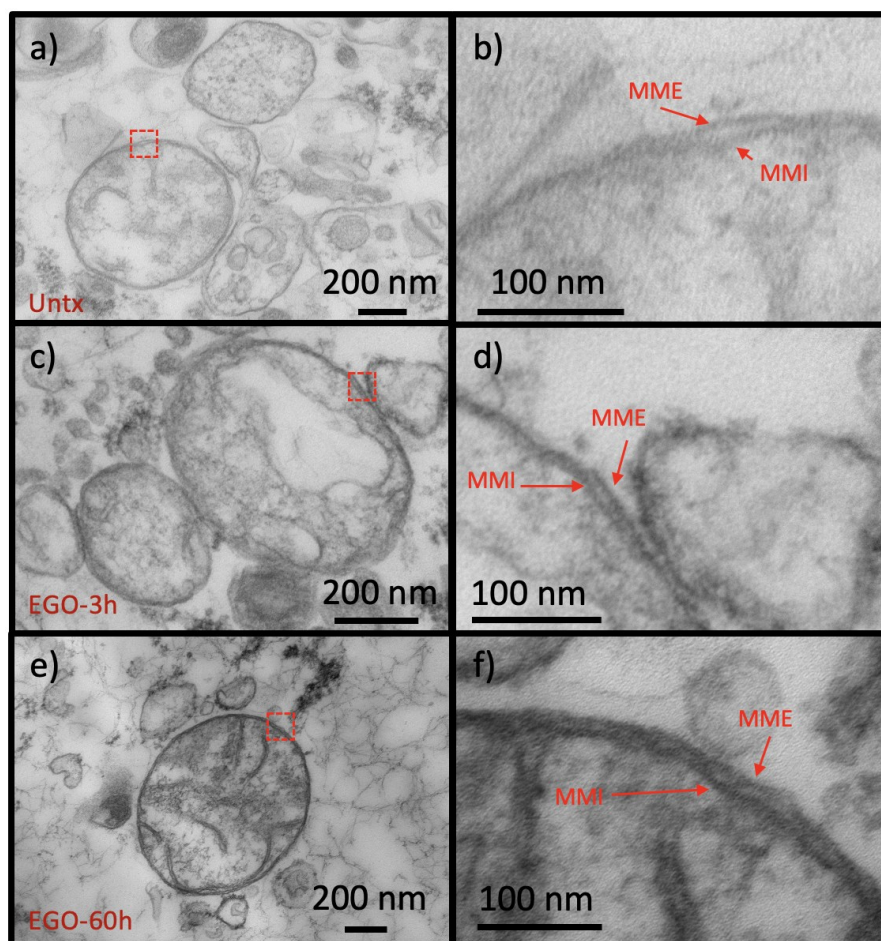


Figure 48. Images MET de l'interaction des mitochondries isolées avec l'EGO

Images MET des mitochondries isolées seules (Untx) (a), et en contact avec des EGOs soniqués pendant 3 h (c) et 60 h (e). (b), (d) et (f) sont les gros plans correspondants des zones encadrées en pointillés dans a, c et e, permettant d'observer les détails des membranes mitochondriales.

En revanche, les mitochondries qui ne sont pas exposées à l'EGO affichent un contraste nettement réduit et une apparence légèrement floue, suggérant une différence dans l'interaction avec l'environnement immédiat. Plus particulièrement, les mitochondries mises en contact avec l'EGO-60h présentent un espace intermembranaire à la fois plus sombre et plus flou comparativement à celles exposées à l'EGO-3h ou aux mitochondries seules. Ce phénomène pourrait indiquer une infiltration plus marquée du matériau dans l'espace intermembranaire. Ces

observations soulignent l'impact potentiel de la durée de sonication des feuillets d'EGO sur leur interaction avec les membranes mitochondriales, et suggèrent que des facteurs tels que la taille et les propriétés de surface des feuillets d'EGO jouent un rôle essentiel dans ces interactions.

Les résultats obtenus de la caractérisation de l'EGO, après avoir été soumis à des temps de sonication variés, suggèrent fortement que d'autres particules nanométriques issues des suspensions d'EGO interagissent de manière significative avec les membranes mitochondriales. Il a été précédemment rapporté que la sonication prolongée des matériaux à base de graphène en suspension conduit à la formation de points quantiques d'oxyde de graphène (GOQD), qui présentent une absorption caractéristique dans l'ultraviolet [150,151]. Afin d'étudier la formation de ces GOQD, les suspensions d'EGO utilisées pour les expériences d'électrochimie mitochondriale ont été soumises à une centrifugation, dans le but de précipiter et d'éliminer les grands feuillets d'EGO, et les spectres UV-vis du surnageant ont été enregistrés. Les spectres, tels que présentés dans la **Figure 49 (a)**, révèlent deux pics distincts à 202 et 263 nm, confirmant ainsi la présence de GOQD. De plus, l'intensité de ces pics augmente proportionnellement avec le temps de sonication, ce qui indique une concentration plus élevée de ces particules. Les **Figures 45(b-c)** présentent les images MET des particules présentes dans les surnageants de EGO-40h et EGO-60h. On y observe à la fois des feuillets de EGO (dimensions supérieures à 20 nm) et des points quantiques de graphène oxydé (GOQDs, de 20 nm ou moins) dans les deux figures. Cependant, la suspension EGO-40h contient des feuillets plus grands et plus abondants que celle de EGO-60h. Ces observations sont cohérentes avec les résultats de spectroscopie UV-vis, où l'intensité croissante des pics avec le temps de sonication indique une concentration plus élevée de GOQDs. La **Figure 49d** montre une image MET à haute résolution (HR-TEM) d'un GOQD issu du surnageant EGO-60h, dont l'image en médaillon confirme un paramètre de maille de 0,204 nm — en accord avec les valeurs précédemment rapportées pour les GOQDs [152]. Ces observations sont en accord avec les images obtenues par microscopie électronique à transmission (MET) de la **Figure 48**, où l'on observe des membranes plus sombres et une infiltration accrue de structures nanométriques dans l'espace intermembranaire, corrélée à l'augmentation du temps de sonication. Liao *et al.* [153] ont démontré que la taille des particules d'oxyde de graphène est étroitement corrélée à leur interaction avec la membrane cellulaire : les particules de plus petite taille présentent des interactions électrostatiques plus fortes avec la bicouche lipidique. L'interaction des GOQD avec les mitochondries altère probablement la perméabilité de la MME, facilitant ainsi la diffusion de l'ADP dans la matrice mitochondriale, comme le suggèrent les résultats de la **Figure 45(b)**. Cependant, la perméabilité de la MMI ne semble pas être affectée, car la respiration mitochondriale reste inchangée, comme le montrent les expériences d'analyse Seahorse, en particulier la réponse au FCCP dans la **Figure 45(b)**. L'EGO pourrait jouer un rôle similaire à celui de la digitonine, qui est utilisée pour perméabiliser la MME, permettant à des substrats tels que le pyruvate d'accéder aux mitochondries tout en

préservant l'intégrité de la MMI et en maintenant la consommation d'oxygène (OCR) [154]. En termes de communication électrochimique entre l'organite et les électrodes, la perméabilisation de la membrane par les GOQD pourrait faciliter la diffusion du cyt c de la MMI vers la surface de l'électrode, et agir éventuellement comme une navette pour la cyt c.

Par ailleurs, il est également possible que les GOQD interagissent avec les jonctions des crêtes mitochondriales, qui sont connues pour compartimenter le cytochrome c à l'intérieur de structures en forme de sacs [155]. Ces jonctions régulent l'accessibilité du cyt c en limitant sa diffusion vers l'espace intermembranaire. En perturbant localement ces structures, les GOQD pourraient ainsi permettre au cyt c de quitter plus facilement les crêtes et de diffuser vers la surface de l'électrode, augmentant ainsi la probabilité de son oxydation électrochimique. Ce mécanisme potentiel représente une hypothèse intéressante, mais qui mériterait des études complémentaires pour être confirmé.

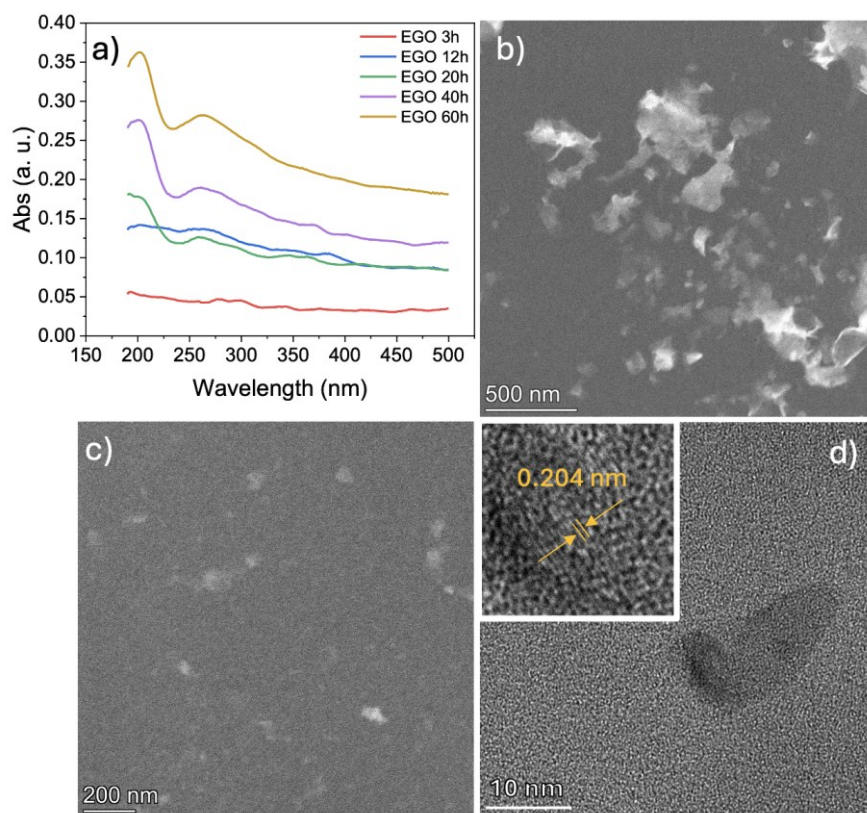


Figure 49. Caractérisation des surnageants d'EGO soniqué pendant différents temps.

a) Spectres UV-Vis des GOQD générés par sonication d'EGO pendant différentes durées. Des temps de sonication plus longs produisent des concentrations plus élevées de GOQD ; b-c) Images STEM des feuillets d'EGO et des GOQD présents dans les surnageants de b) EGO-40h et c) EGO-60h ; d) Image HR-TEM d'un GOQD présent dans le surnageant de EGO-60h. L'encadré montre une image à plus fort grossissement avec l'espacement des plans atomiques (d-spacing).

Dans les deux dernières sections on a démontré le potentiel de l'utilisation de l'oxyde de graphène obtenu par exfoliation électrochimique du graphite (EGO) en tant que plateforme polyvalente pour l'immobilisation et la caractérisation électrochimique d'isolats mitochondriaux dans des conditions physiologiques et sans couches d'immobilisation supplémentaires. Des signaux mitochondriaux ont été détectés de manière fiable sur des électrodes en graphite pyrolytique (PGE) et des PGE modifiées avec de l'EGO, tandis que les électrodes en carbone vitreux (GCE) n'ont pas permis d'obtenir de signaux mesurables. Les propriétés structurales de l'EGO, telles que la taille des feuillets et le degré d'oxydation, se sont avérées critiques pour moduler l'activité électrochimique mitochondriale. Des temps de sonication plus longs des suspensions d'EGO ont produit des points quantiques d'oxyde de graphène (GOQD) qui interagissent avec les membranes mitochondriales et facilitent le transfert d'électrons entre la chaîne de transport des électrons (CTE) et la surface de l'électrode.

Les essais métaboliques ont confirmé que les mitochondries exposées à de l'EGO soniqué pendant une période plus longue présentaient une respiration basale plus élevée, ce qui se traduit par une biocompatibilité améliorée pour les études électrochimiques. Les études avec inhibiteurs ont identifié le cytochrome C comme le médiateur électronique primaire le plus probable entre la CTE et l'électrode, renforçant ainsi l'EGO en tant qu'outil potentiel pour sonder la fonction mitochondriale. Bien que les résultats soulignent la promesse de l'EGO pour les applications bioélectrochimiques, des défis subsistent dans l'amélioration de la résolution des signaux et de la sensibilité pour permettre des analyses quantitatives.

Bien que des progrès significatifs aient été réalisés, des défis subsistent, notamment en ce qui concerne l'amélioration de la résolution et de la sensibilité des signaux pour permettre des analyses quantitatives précises. Pour aller plus loin, il est essentiel d'explorer l'optimisation des configurations d'électrodes, en particulier l'utilisation d'ultramicroélectrodes, qui pourraient offrir des avantages significatifs dans l'étude des fonctions mitochondriales. La section suivante abordera la fabrication et la caractérisation de ces ultramicroélectrodes, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles perspectives dans l'analyse électrochimique des mitochondries.

5.5 Ultramicroélectrodes pour l'électrochimie d'entités individuelles

Pendant ma maîtrise, j'ai développé une expertise dans la fabrication et la caractérisation électrochimique d'ultramicroélectrodes (UMEs) coniques en tungstène, des outils miniaturisés présentant un potentiel unique pour sonder des processus électrochimiques à l'échelle microscopique [143]. Dans ce travail on a fonctionnalisé ces électrodes coniques avec du carbone pyrolytique pour les rendre plus biocompatibles et pour éviter l'oxydation du tungstène. Ces électrodes, grâce à leur petite taille, offrent des avantages cruciaux, notamment une réduction des courants capacitifs et une amélioration de la résolution spatiale, rendant possible l'étude de phénomènes localisés et d'échantillons de petite taille. Cependant, pour maximiser leur potentiel dans des applications complexes, comme l'analyse des mitochondries isolées, une compréhension approfondie des mécanismes de transport de masse vers leur surface est essentielle. C'est pourquoi, au cours de mon doctorat, je me suis concentré sur des simulations numériques afin d'élucider les principes fondamentaux qui régissent leur comportement électrochimique. Cette section explorera en détail le processus de fabrication, les caractéristiques électrochimiques, et les résultats des simulations numériques des ultramicroélectrodes coniques, tout en mettant en lumière leurs implications pour l'analyse bioélectrochimique.

5.5.1 Caractérisation des UMEs coniques fonctionnalisées

Après la fabrication et la fonctionnalisation des UMEs avec du carbone pyrolytique, leur caractérisation a été réalisée à l'aide de la microscopie électronique à balayage (MEB), de techniques électrochimiques et de simulations numériques. La **Figure 50** présente des images détaillées des électrodes obtenues. Le panneau a) montre l'image d'une électrode en tungstène à faible grossissement, révélant sa morphologie générale. Le panneau b) illustre une électrode en tungstène modifiée avec du carbone pyrolytique, également à faible grossissement, où l'on observe un changement de couleur dû à la présence du dépôt de carbone. Les panneaux c) et d) montrent des images des mêmes électrodes à fort grossissement, mettant en évidence des détails plus fins. Pour l'électrode en tungstène (panneau c), une surface lisse est visible, tandis que l'électrode en tungstène modifiée par du carbone pyrolytique (panneau d) présente une rugosité accrue, confirmant l'ajout de la couche de carbone pyrolytique. Ces observations soulignent l'impact de la fonctionnalisation sur la surface des UMEs.

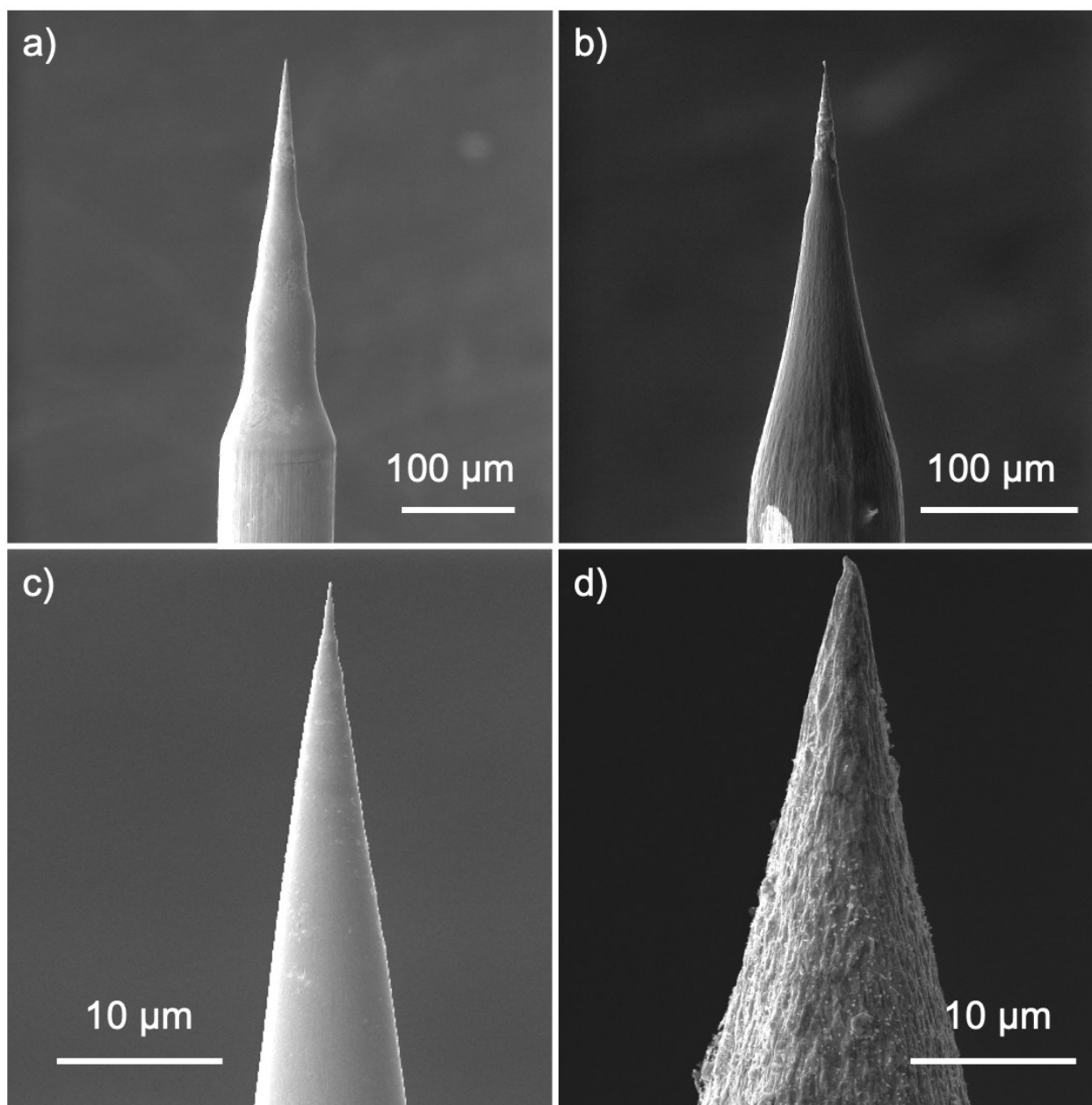


Figure 50. UMEs en Tungstène vs Tungstène/Carbone pyrolytique.

Le panneau (a) montre une électrode de tungstène à faible grossissement, tandis que le panneau (b) illustre une électrode de tungstène/carbone pyrolytique également à faible grossissement. Les panneaux (c) et (d) présentent respectivement des images à haute résolution de l'électrode de tungstène et de l'électrode de tungstène/carbone pyrolytique. Une modification de la couleur est visible après la fonctionnalisation avec du carbone pyrolytique, accompagnée d'une augmentation notable de la rugosité dans les images obtenues à haute résolution.

Afin de confirmer la correcte fonctionnalisation des UMEs, une caractérisation électrochimique a été réalisée dans une solution de H_2SO_4 0,5 M, mettant en évidence le comportement des UMEs sous des conditions de polarisation anodique. Les voltammogrammes cycliques obtenus permettent d'analyser la réponse électrochimique des électrodes en tungstène brut et revêtu, fournissant des informations clés sur la stabilité des surfaces, l'efficacité du revêtement en carbone et la passivation de l'électrode.

Les voltampérogrammes cycliques présentés dans le panneau a) de la **Figure 51** illustrent le comportement électrochimique d'un fil de tungstène dans une solution de H_2SO_4 0,5 M à une vitesse de balayage de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Deux pics d'oxydation proéminents sont observés à 0.47 V et 0.70 V, correspondant respectivement à la formation de WO_2 et de WO_3 , les oxydes de tungstène les plus stables thermodynamiquement, comme rapporté dans la littérature [156–158]. Lors du balayage inverse, le courant chute à presque 0 A pour des potentiels inférieurs à 1.2 V, indiquant que la polarisation anodique passivise efficacement la surface du tungstène. Cette passivation est confirmée lors des cycles suivants, où un courant minimal est enregistré en dessous de 1.2 V, ce qui montre que la surface du tungstène devient inactive. En revanche, le voltampérogramme cyclique du panneau b) montre la réponse électrochimique d'une ultramicroélectrode (UME) conique en tungstène fonctionnalisée avec du carbone pyrolytique, dans les mêmes conditions expérimentales. Contrairement au fil de tungstène non revêtu, l'UME ne présente pas les pics d'oxydation caractéristiques des oxydes de tungstène. Cette absence de pics d'oxydation témoigne de la qualité et de l'uniformité du revêtement en carbone, qui empêche efficacement l'interaction directe de la surface du tungstène avec l'électrolyte, la protégeant ainsi de l'oxydation.

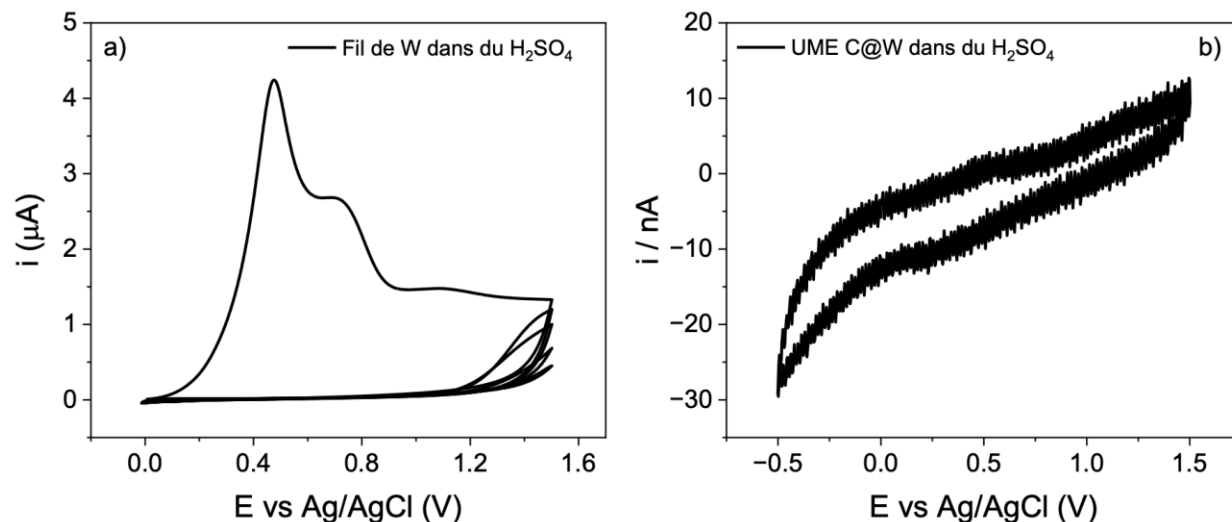


Figure 51. VC des UMEs en tungstène vs tungstène/carbone pyrolytique.

Le panneau a) montre les voltampérogrammes cycliques d'un fil de tungstène dans une solution de 0,5 M H_2SO_4 à une vitesse de balayage de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Le panneau b) présente les voltampérogrammes cycliques dans les mêmes conditions, d'une UME conique en tungstène fonctionnalisée avec du carbone pyrolytique. L'UME conique a été immergée de $2 \mu\text{m}$ dans la solution.

Les électrodes coniques fonctionnalisées avec du carbone pyrolytique ont été caractérisées de manière similaire à celles en W/WO_2 rapportées dans notre travail précédent [143]. Des voltampérogrammes cycliques ont été enregistrés à différentes profondeurs des électrodes dans une solution contenant 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ + 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ dans du KCl 0,5 M. La surface latérale géométrique (LSA) a été calculée à partir des images MEB, et la surface électroactive (ESA) a été calculée séparément à partir des courants anodiques et cathodiques.

La **Figure 52(a)** montre l'image MEB d'une électrode fonctionnalisée avec du carbone pyrolytique, ayant une valeur de H de 9,13 et un ROC de 110 nm. La **Figure 52(b)** présente les voltampérogrammes enregistrés à l'état stationnaire à différentes profondeurs, où l'on peut constater que les courants limitants dépendent de la profondeur de l'électrode dans la solution, ce qui est attendu en raison de l'augmentation de la surface exposée. L'encadré de la **Figure 52(b)** montre un voltampérogramme en forme de pic, correspondant au signal électrochimique de l'électrode après que le ménisque formé à l'interface air-solution a recouvert plus de $100 \mu\text{m}$ de longueur de l'électrode, augmentant ainsi la surface exposée à la solution et montrant par conséquent le comportement généralement observé avec des macroélectrodes.

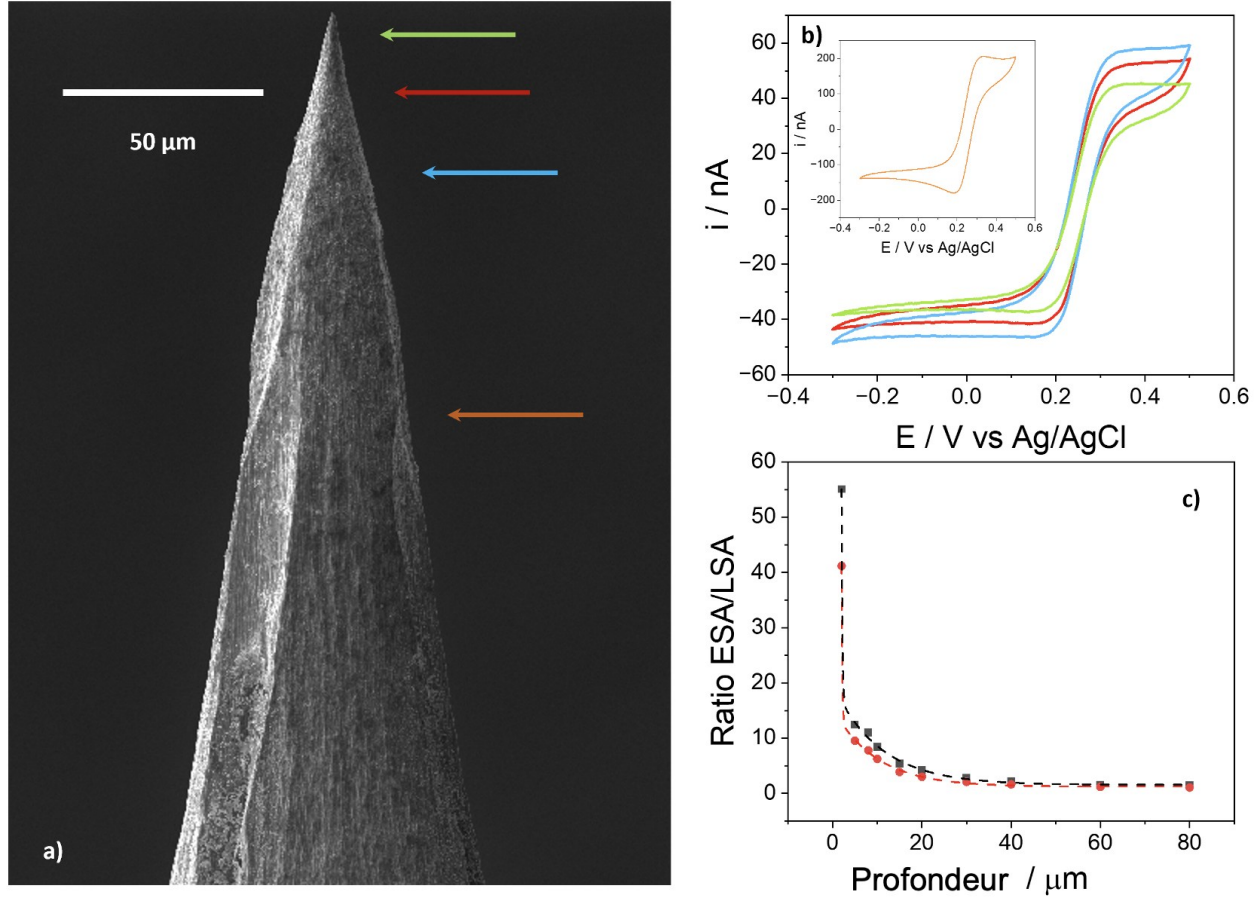


Figure 52. Caractérisation électrochimique des nanoélectrodes coniques.

a) Image MEB d'une UME conique en carbone pyrolytique avec $H = 9,13$ et $ROC = 110$ nm. b) Voltampérogrammes cycliques enregistrés à différentes profondeurs de l'électrode dans une solution de 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-} + 5$ mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$ dans du KCl 0,5 M. Vitesse de balayage : $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. La couleur de chaque voltampérogramme correspond à la flèche indiquée en a. c) Rapport ESA/LSA calculé à partir des courants limitants anodiques (courbe noire) et cathodiques (courbe rouge).

Zoski et Mirkin [138] ont proposé une équation qui met en corrélation le courant à l'état stationnaire, i^{ss} , avec H pour des ultramicroélectrodes coniques parfaites ($ROC = 0$) sans couche isolante et avec des rapports d'aspect, H inférieurs à 3:

Équation 7. Courant à l'état stationnaire pour des électrodes coniques avec rapports d'aspect inférieurs à 3

$$i_{cone}^{ss} = i_{disk}^{ss} (1 + qH^p)$$

Où,

Équation 8. Courant à l'état stationnaire pour des électrodes coniques avec rapports d'aspect inférieurs à 3 modifié

$$i_{cone}^{ss} = 4nFDCa(1 + qH^p)$$

Avec $q = 0.30661$ and $p = 1.14466$ for $H \leq 3$.

Où n représente le nombre d'électrons transférés pendant le processus ($n = 1$) ; F est la constante de Faraday ($96\,485\text{ C mol}^{-1}$) ; D est le coefficient de diffusion ($0,667 \times 10^{-5}\text{ cm}^2\text{ s}^{-1}$ pour l'espèce réduite, et $0,718 \times 10^{-5}\text{ cm}^2\text{ s}^{-1}$ pour l'espèce oxydée) ; et C est la concentration des espèces oxydées et/ou réduites en solution ($5 \times 10^{-6}\text{ mol cm}^{-3}$).

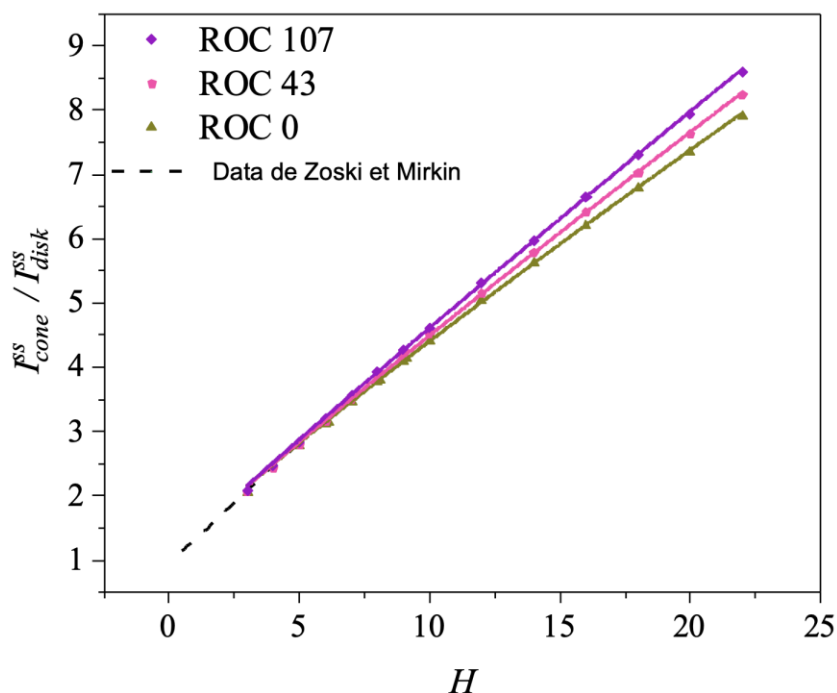


Figure 53. Courants à l'état stationnaire normalisés pour des UME avec différents ROC et H, obtenus à partir de simulations COMSOL Multiphysics®.

Courants à l'état stationnaire normalisés pour des ultramicroélectrodes avec des rapports d'aspect, H, compris entre 3 et 22 et des ROC entre 0 et 100, obtenus à partir de simulations COMSOL Multiphysics®. Les lignes pleines correspondent à l'ajustement de l'équation $i_{cone}^{ss} = i_{disk}^{ss}(1 + qH^p)$ avec les coefficients respectifs. La courbe en pointillés représente les données dérivées de l'équation proposée par Zoski et Mirkin[138] pour un rapport d'aspect inférieur à 3.

Cependant, les électrodes coniques développées dans ce travail sont très aiguës avec des valeurs de H entre 6 et 22, ce qui est nécessaire pour pouvoir étudier des réactions biologiques confinées dans des espaces aussi petits que les crêtes de la CTE mitochondriale. Les courants à l'état stationnaire des cônes fins, i_{cone}^{ss} , ont donc été simulés pour des valeurs de H allant de 3

à 22, complétant le travail de Zoski et Mirkin [138], i_{cone}^{ss} a été normalisé par le courant d'un disque de même diamètre que la base du cône, i_{disk}^{ss} . La **Figure 53** montre le courant normalisé en fonction du rapport d'aspect pour un cône parfait ($ROC = 0$). L'ajustement de ces données montre que l'équation proposée par Zoski et Mirkin peut être réécrite comme suit :

Équation 9. Courant à l'état stationnaire pour des électrodes coniques avec rapports d'aspect entre 3 et 22

$$i_{cone}^{ss} = 4nFDCa(1 + qH^p)$$

Avec $q = 0.41722$ and $p = 0.90954$ for $3 \leq H \leq 22$ et $ROC = 0$.

Cependant, comme le montre la **Figure 53**, les valeurs de q et p augmentent légèrement avec le ROC , ce qui peut être compris en termes de modification progressive de la géométrie des UME vers une électrode semi-hémisphérique mais avec un rapport d'aspect très élevé [138]. Par conséquent, les différentes valeurs de q et p , présentées dans le **Tableau 1**, ont été prises en compte lors du calcul des valeurs de a pour chaque UME simulé dans la modélisation numérique dans la prochaine section.

Tableau 1. Valeurs des coefficients q et p pour des UME avec différents ROC.

<i>ROC</i>	<i>q</i>	<i>p</i>
0	0.41722	0.90954
12	0.41114	0.91872
43	0.40485	0.93384
68	0.40232	0.94252
100	0.40016	0.95190
107	0.39977	0.95381

À partir des équations antérieures, il est possible de calculer le radius des électrodes coniques, a , et en utilisant l'**Équation 10** on peut calculer l'aire électrochimiquement active (ESA) :

Équation 10. Aire électrochimiquement active des électrodes coniques

$$ESA = \pi al$$

Où l est la hauteur oblique du cône.

La surface géométrique latéral (LSA) des électrodes a été calculé à partir de ses mesures obtenues par imagerie MEB et les ratios ESA/LSA ont été calculés. La **Figure 52(c)** montre que le ratio augmente exponentiellement lorsque la profondeur des électrodes dans la solution est

inférieure à 15 μm . La différence entre les valeurs de l'ESA et de la LSA est cohérente avec l'effet de la géométrie des électrodes, qui conduit à une amélioration du transfert de masse au niveau de l'apex de l'électrode, accélérant ainsi la vitesse de réaction.

Pour étudier le comportement du transfert de masse vers la surface de l'électrode d'une façon plus générale, nous avons utilisé la modélisation numérique comme outil dont les résultats sont discutés dans la prochaine sous-section.

5.5.2 Modélisation numérique des processus électrochimiques sur des UMEs

Les profils de concentration simulés et les flux totaux des espèces électroactives à proximité des UME en solution à l'état stationnaire sont présentés dans la **Figure 54(a-c)**. Dans ces simulations, nous avons fait varier les valeurs de H (la hauteur des électrodes) et de ROC (le rayon de courbure) des UME afin d'étudier leur influence sur le comportement électrochimique.

Comme prévu, le gradient de concentration est plus élevé près de l'apex des électrodes. Cela s'explique par le fait que la géométrie conique des UME favorise une accumulation des espèces électroactives à la pointe de l'électrode. La trajectoire du flux dans cette région est principalement radiale, ce qui signifie que les espèces électroactives se dirigent directement vers l'apex. En s'éloignant de l'apex vers la base des électrodes coniques, la trajectoire du flux devient progressivement semblable à une diffusion planaire, indiquant que les espèces électroactives se répartissent de manière plus uniforme sur ces surfaces.

Par conséquent, un flux plus élevé d'espèces actives est établi à l'apex de l'électrode. Cette augmentation du flux au niveau de la pointe favorise une intensification des réactions électrochimiques dans cette zone spécifique. Cela se manifeste visuellement par la variation relative de la taille des flèches à chaque interface électrode/électrolyte dans les **Figures 46(a-c)**, où les flèches plus grandes à l'apex illustrent l'augmentation du flux total. Ainsi, les simulations confirment que la configuration géométrique des UME influence significativement le profil de concentration et le flux des espèces électroactives, en particulier au niveau de l'apex des électrodes coniques.

Dans la **Figure 54(d)**, l'amplitude du flux total est illustrée en fonction de la hauteur des UME. On y constate une augmentation rapide du flux pour des hauteurs inférieures à $2\ \mu\text{m}$. Cette augmentation devient presque constante à des hauteurs plus élevées, ce qui reproduit la tendance expérimentale observée pour le rapport ESA/LSA rapporté dans la **Figure 52(c)**.

Cette évolution indique que lorsque la hauteur de l'UME est inférieure à $2\ \mu\text{m}$, le flux total croît rapidement, probablement en raison de la proximité de l'apex de l'électrode où le gradient de concentration est le plus élevé. À mesure que la hauteur augmente au-delà de $2\ \mu\text{m}$, le flux tend à se stabiliser et à devenir presque constant. Cela suggère que, pour des hauteurs supérieures, l'influence de l'apex sur le flux total diminue, et le flux est moins affecté par la variation de la hauteur.

Ainsi, les simulations numériques confirment les résultats expérimentaux concernant le rapport ESA/LSA présentés dans la **Figure 52(c)**. La corrélation entre l'amplitude du flux total et la hauteur des UME met en évidence l'impact significatif de la géométrie des électrodes sur le comportement électrochimique, en particulier en ce qui concerne le transport de masse des

espèces électroactives. Cette concordance entre les données expérimentales et les simulations renforce la compréhension des mécanismes de diffusion associés aux UME coniques.

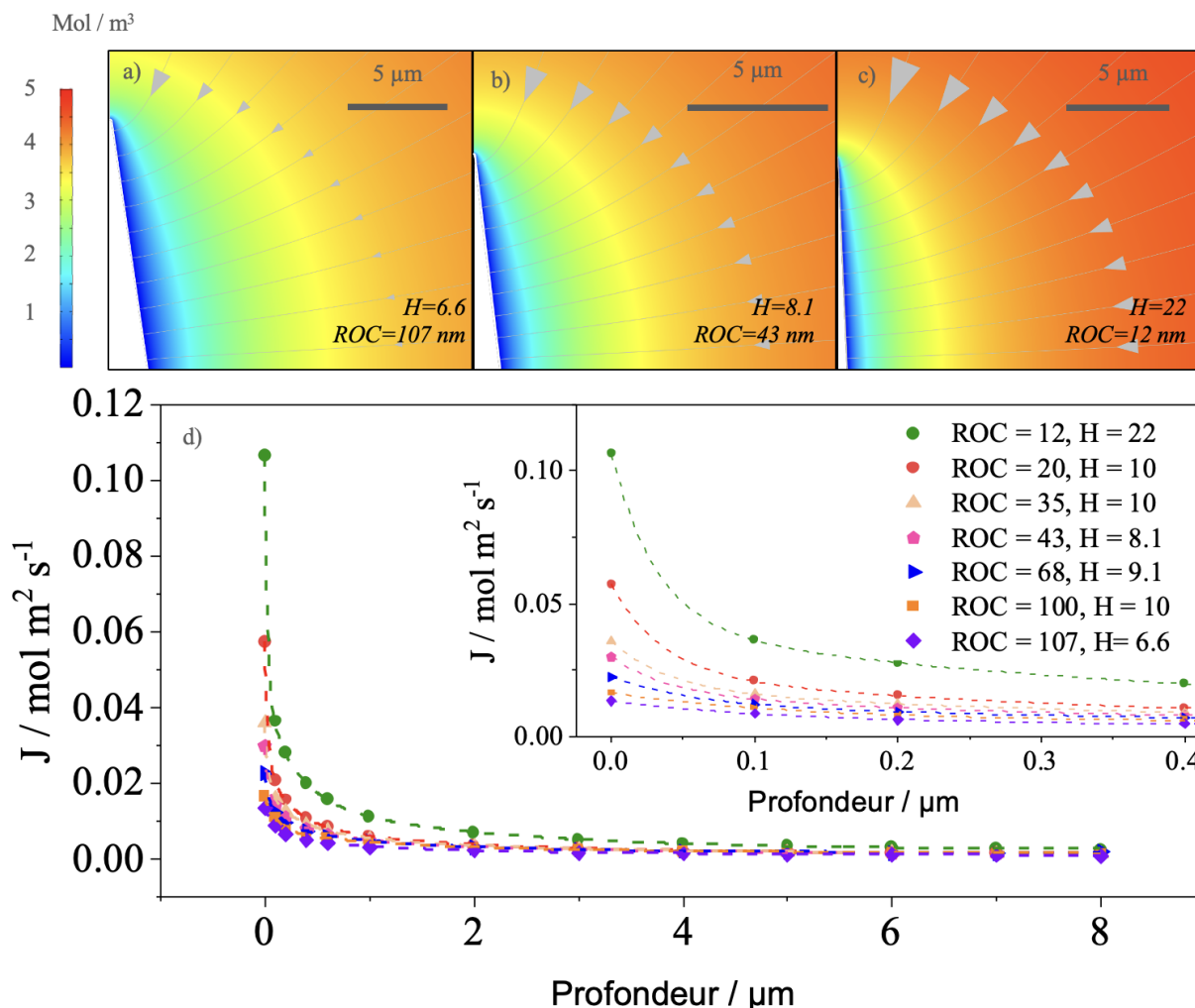


Figure 54. Profils de concentration et flux vers la surface de nanoélectrodes coniques.

Profil de concentration de l'espèce réduite présenté sous forme de carte colorée dans la zone environnante de trois UMEs avec ROC et H différentes (a-c). Les lignes grises représentent la trajectoire du flux, et les flèches indiquent l'amplitude totale du flux à cet emplacement. (d) L'amplitude totale du flux en fonction de la hauteur de l'électrode. Figure adaptée avec permission de [143].

Les simulations numériques ont fourni une description quantitative de l'effet de la profondeur, du ROC et de H sur l'amplitude du flux total. Cependant, d'autres facteurs pourraient également contribuer aux valeurs plus élevées de l'ESA observées expérimentalement. Ceux-ci incluent : i) la rugosité de la surface des électrodes ; ii) les propriétés électriques à l'apex de taille nanométrique des UME ; et iii) le ménisque formé à l'interface liquide-air entourant les électrodes. Fait intéressant, comme illustré à la **Figure 52(c)**, les rapports ESA/LSA montrent des valeurs constantes (entre 1 et 2) lorsque la profondeur est supérieure à $30 \mu\text{m}$, indiquant que la rugosité

de la surface n'est pas le principal paramètre contribuant aux valeurs plus élevées de l'ESA. Au lieu de cela, il a été précédemment rapporté [28,141] que les électrocatalyseurs en forme conique ont une densité d'électrons libres plus élevée à leur surface et un champ électrique plus fort induit par la haute courbure que ceux formés par des surfaces quasi-planaires. Par exemple, des simulations sur des nanofilaments d'or ont révélé une augmentation d'un ordre de grandeur du champ électrique à mesure que le rayon de la pointe diminue de 100 à 10 nm, et une augmentation de la concentration des cations adsorbés sur les surfaces des catalyseurs (sites actifs) [141]. Cette concentration de réactifs induite par le champ est censée augmenter la concentration locale des espèces réactives (CO_2 dans la réf. [28]) et accélérer la vitesse de réaction de la réduction du CO_2 .

Dans une étude récente, Dong et al. [159] ont utilisé des simulations numériques pour étudier les facteurs affectant la fabrication des pointes de tungstène. Ils ont montré que la distribution du champ électrique change avec le processus de gravure, conduisant à la modification de la trajectoire de migration des ions. Ils ont utilisé la densité de courant comme indicateur de la distribution des ions sur les fils de tungstène pendant tout le processus de gravure et ont constaté que la densité de courant maximale est située aux extrémités pointues des fils et finalement à l'apex de la pointe [159]. Dans le présent travail, on pense qu'une augmentation du champ électrique à l'apex des UME augmente la concentration locale des ions K^+ [141], augmentant ainsi la concentration locale des anions ferri-ferrocyanure par des effets électrostatiques.

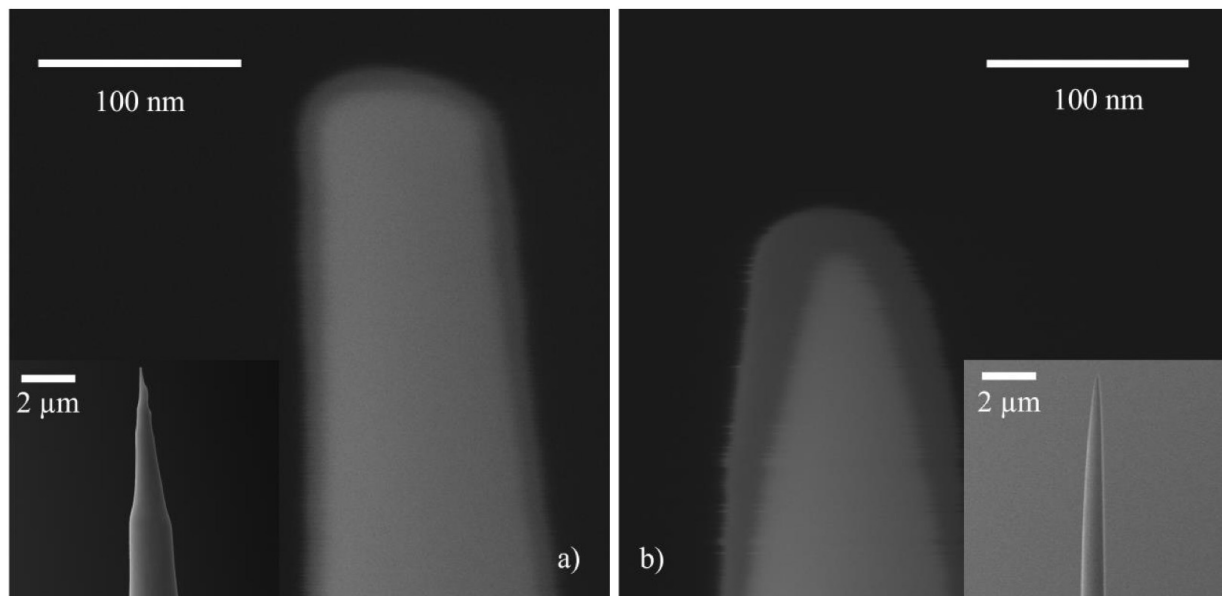


Figure 55. Images MEB de la couche d'oxyde de W sur deux UME avec différents ROC et H.

a) $H = 8$ et $\text{ROC} = 65$ nm, et b) $H = 22$ et $\text{ROC} = 12$ nm après les mesures électrochimiques. On observe la formation de couches d'oxyde d'une épaisseur de 9 et 20 nm à l'apex des UME, et les paramètres géométriques finaux sont : a) $H = 8,01$ et $\text{ROC} = 74$ nm ; b) $H = 22,02$ et $\text{ROC} = 32$ nm. Figure adaptée avec permission de [143].

Dans notre travail antérieur portant sur des nanoélectrodes coniques de tungstène, des images de microscopie électronique à balayage (MEB) de deux UME, prises après les expériences électrochimiques, ont montré des différences notables au niveau de l'apex des électrodes. Plus précisément, il a été observé que l'apex de l'électrode possédant un rayon de courbure (ROC) plus petit était recouvert d'une couche d'oxyde plus épaisse comparée à celle de l'électrode avec un ROC plus grand (**Figure 55**). Cette observation suggère que l'électrode avec un ROC plus petit subit une oxydation plus prononcée à son apex, probablement en raison de son activité électrochimique plus élevée dans cette région.

La réactivité accrue de l'UME à apex plus aigu, attribuée à une densité d'électrons libres plus élevée à sa surface, constitue une preuve indirecte de l'existence d'un tel effet de champ électrique. Ainsi, ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle les propriétés électriques à l'apex des UME influencent significativement leur comportement électrochimique.

Ces observations mettent en évidence l'impact du rayon de courbure sur la formation de la couche d'oxyde et, par extension, sur la réactivité de l'électrode. L'augmentation de l'épaisseur de la couche d'oxyde à l'apex de l'UME à ROC plus petit suggère que les conditions électrochimiques locales sont modifiées en raison de l'effet de champ électrique associé à la haute courbure. Cela affecte le taux de formation de l'oxyde et pourrait également influencer d'autres réactions électrochimiques se produisant à la surface de l'électrode.

Enfin, les valeurs d'ESA rapportées ici peuvent être surestimées en raison du ménisque à l'interface liquide-air entourant les UME. Néanmoins, les tendances trouvées pour ESA/LSA en fonction de la profondeur devraient être valables pour les raisons suivantes : i) les voltampérogrammes cycliques ont été enregistrés dans le sens de l'immersion, c'est-à-dire en commençant avec l'apex des UME touchant la surface de la solution électrolytique ; ii) pour chaque profondeur, une série de 6 ou 10 voltampérogrammes cycliques se chevauchant ont été enregistrés ; iii) une augmentation soudaine de la taille du ménisque suivie du mouillage de l'ensemble de l'électrode conique était clairement visible au microscope optique et se reflétait par un saut instantané de l'intensité du courant.

La voltampérométrie cyclique et les simulations numériques indiquent que le rayon de courbure a une influence plus forte sur la vitesse de réaction que le rapport d'aspect. La **Figure 56(a)** montre la variation de l'amplitude du flux en fonction de la profondeur pour des UME avec différents ROC et une valeur fixe de $H = 10$. L'amplitude du flux augmente drastiquement à mesure que la profondeur de l'électrode diminue en dessous de $2\ \mu\text{m}$ et qu'elle se rapproche de l'apex des UME. Il est montré également qu'en général, l'amplitude du flux est plus élevée pour les UME avec des valeurs de ROC plus faibles. Par exemple, le flux à l'apex d'une UME avec un ROC de 50 est 1,8 fois supérieur à celui d'une UME avec un ROC de 100. En revanche, pour des UME

avec une valeur fixe de $ROC = 20$ mais différents rapports d'aspect, comme le montre la **Figure 56(b)**, le flux d'une UME avec $H = 22$ n'est que 1,2 fois supérieur à celui d'une UME avec $H = 10$. Bien que les deux paramètres influencent l'amplitude du flux à l'apex des UME, le ROC a un effet plus important.

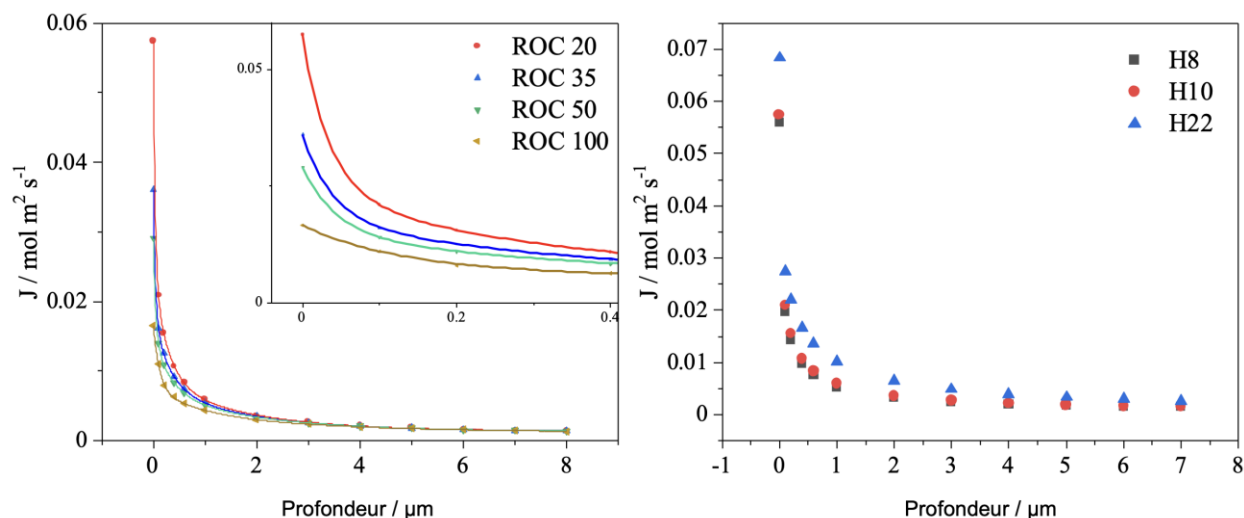


Figure 56. Flux en fonction du ROC et de H des UME.

Amplitude du flux en fonction de la hauteur pour des UME avec : a) H constant = 10 (encart : gros plan), et b) ROC constant = 20.

En résumé dans cette section, on propose une analyse électrochimique, accompagnée de simulations, du transfert de masse au niveau UME aiguës non isolées, présentant une large gamme de rapports d'aspect et de rayons de courbure. Des simulations numériques nous ont permis d'obtenir des expressions analytiques décrivant la relation entre les courants à l'état stationnaire et la géométrie des UME coniques à haut rapport d'aspect ($H > 3$). Ces expressions peuvent être appliquées à des UME fabriquées avec d'autres matériaux, à condition que les valeurs de H et de ROC se situent dans les plages étudiées ici.

La surface électroactive (ESA) de la portion de l'UME immergée dans l'électrolyte a été déterminée à partir du courant limitant. Il a été constaté que, pour des profondeurs inférieures à $15 \mu\text{m}$, cette surface est sensiblement plus grande que la surface latérale géométrique (LSA). La variation du rapport ESA/LSA en fonction de la profondeur s'explique par une amélioration du transfert de masse et une accélération du taux de réaction électrochimique à l'apex des UME coniques individuelles. Plus précisément, les rapports ESA/LSA obtenus expérimentalement sont en accord avec les profils de concentration simulés et avec la variation du flux total des espèces électroactives à l'interface électrode/électrolyte.

Les UME, qui ont été fabriquées par gravure électrochimique de fils de tungstène, suivie d'une fonctionnalisation au carbone pyrolytique, ont le potentiel de devenir un outil précieux pour mener des études sur des structures biologiques submicroniques (comme des organites individuels ou d'autres éléments ultrastructuraux de cellules vivantes) nécessitant une résolution spatiale élevée.

6 CONCLUSIONS

Dans cette étude qui porte sur l'étude électrochimique des mitochondries isolées de lignées cellulaires humaines on a porté une attention particulière à l'optimisation du protocole de purification des mitochondries afin de garantir l'intégrité structurelle et fonctionnelle des organites isolés. En contrôlant soigneusement le processus de lyse mécanique des cellules et en surveillant les étapes clés à l'aide de la microscopie à fluorescence et de la microscopie électronique à transmission (MET), nous avons établi des conditions optimales minimisant la rupture des noyaux et la libération de chromatine, susceptibles de contaminer les fractions mitochondriales. Limiter le nombre de passages des cellules à travers l'aiguille de seringue entre 45 et 60 s'est avéré essentiel pour préserver la pureté des mitochondries tout en assurant une lyse cellulaire efficace. Les images MET ont confirmé que les mitochondries purifiées conservaient leur structure caractéristique à double membrane et des crêtes bien définies, attestant de leur état intact. Cette optimisation rigoureuse du processus de purification a permis de s'assurer que les analyses électrochimiques ultérieures étaient menées sur des mitochondries fonctionnellement compétentes, offrant ainsi une base solide pour interpréter fidèlement leurs processus biologiques et biochimiques.

Cette étude met en évidence le potentiel de l'oxyde de graphène obtenu par exfoliation électrochimique du graphite (EGO) en tant que plateforme polyvalente pour l'immobilisation et la caractérisation électrochimique directe de mitochondries isolées de cellules humaines dans des conditions physiologiques. En utilisant différents matériaux carbonés comme électrodes de support, nous avons démontré avec succès l'immobilisation et la caractérisation électrochimique des mitochondries sans nécessiter de couches d'immobilisation supplémentaires. Des signaux électrochimiques mitochondriaux fiables ont été détectés sur des électrodes en graphite pyrolytique (PGE) et sur des PGE modifiées avec de l'EGO, tandis que les électrodes en carbone vitreux (GCE) n'ont pas permis d'obtenir de signaux mesurables. La présence de l'EGO s'est avérée avantageuse, car les signaux mitochondriaux étaient décalés vers des potentiels plus négatifs, indiquant une communication plus aisée entre les organites et les électrodes.

Les propriétés structurelles de l'EGO, telles que la taille des feuillets et le degré d'oxydation, se sont révélées critiques pour moduler l'activité électrochimique mitochondriale. L'étude de l'effet du temps de sonication des suspensions d'EGO sur l'activité électrochimique des mitochondries isolées a montré que des temps de sonication plus longs généraient des points quantiques d'oxyde de graphène (GOQD). Ces GOQD interagissent avec les membranes mitochondriales,

facilitant le transfert d'électrons entre la chaîne de transport des électrons (CTE) et la surface de l'électrode. Les mitochondries exposées à de l'EGO soniqué pendant des durées plus longues ont présenté une respiration basale plus élevée, comme confirmé par l'analyse Seahorse. En effet, la respiration mitochondriale basale était significativement plus élevée pour les mitochondries exposées à de l'EGO soniqué pendant 60 heures comparé à celles exposées à de l'EGO soniqué pendant seulement 3 heures. De plus, le taux de consommation d'oxygène (OCR) des mitochondries a répondu plus efficacement aux médicaments lorsqu'elles avaient été exposées à des EGO soniqués pendant des périodes prolongées.

Ces résultats suggèrent que la biocompatibilité de l'EGO pour l'électrochimie directe des mitochondries peut être améliorée en prolongeant le temps de sonication des suspensions d'EGO. Cependant, il est important de noter que l'activité de la CTE mitochondriale peut être affectée par l'EGO, et qu'il existe un effet direct du temps de sonication de la suspension d'EGO sur la respiration mitochondriale, comme en témoignent les variations de l'OCR et sa réponse aux inhibiteurs. Par conséquent, une prudence particulière est requise lors de l'utilisation de ces matériaux pour l'électrochimie directe des mitochondries.

Des études utilisant des inhibiteurs spécifiques ont identifié le cytochrome c comme le médiateur électronique primaire le plus probable entre la CTE et l'électrode, renforçant ainsi le potentiel de l'EGO en tant qu'outil pour sonder la fonction mitochondriale. L'utilisation d'inhibiteurs ciblant spécifiquement les complexes de la CTE suggère que la coenzyme Q pourrait ne pas être responsable de la communication entre l'organite et les électrodes, et que le complexe IV pourrait être impliqué dans ce processus en remplaçant l'oxygène par la surface de l'électrode en tant que dernier accepteur d'électrons. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour élucider le mécanisme exact du transfert électronique de la membrane mitochondriale interne (MMI) vers les surfaces conductrices.

Bien que ces résultats soulignent la promesse de l'EGO pour les applications bioélectrochimiques, des défis subsistent quant à l'amélioration de la résolution des signaux et de la sensibilité, afin de permettre des analyses plus précises et quantitatives de la fonction mitochondriale. Compte tenu des faibles signaux faradiques de la CTE mitochondriale, les recherches futures devraient explorer l'optimisation des configurations d'électrodes, telles que l'utilisation d'ultramicroélectrodes (UME), et affiner davantage la composition et les propriétés structurales de l'EGO. Cette approche contribuera à faire progresser la compréhension du dysfonctionnement mitochondrial et de son rôle dans les maladies, tout en améliorant l'utilité des

techniques électrochimiques pour évaluer la santé mitochondriale, en particulier en ce qui concerne la chaîne de transport des électrons.

Parallèlement, nous avons également proposé une analyse électrochimique, appuyée par des simulations numériques, du transfert de masse au niveau d'ultramicroélectrodes (UME) coniques non isolées, présentant une large gamme de rapports d'aspect et de rayons de courbure. Les simulations numériques nous ont permis de dériver des expressions analytiques décrivant la relation entre les courants à l'état stationnaire et la géométrie des UME coniques à haut rapport d'aspect. Ces expressions peuvent être appliquées à des UME fabriquées avec n'importe quels matériaux, à condition que les valeurs de H et de rayon de courbure (ROC) se situent dans les plages étudiées.

La surface électroactive (ESA) de la portion de l'UME immergée dans l'électrolyte a été déterminée à partir du courant limitant. Il a été constaté que, pour des profondeurs inférieures à 15 μm , cette surface est sensiblement plus grande que la surface latérale géométrique (LSA). La variation du rapport ESA/LSA en fonction de la profondeur s'explique par une amélioration du transfert de masse et une accélération du taux de réaction électrochimique à l'apex des UME coniques individuelles. Plus précisément, les rapports ESA/LSA obtenus expérimentalement sont en accord avec les profils de concentration simulés et avec la variation du flux total des espèces électroactives à l'interface électrode/électrolyte.

Les UME ont été fabriquées par gravure électrochimique de fils de tungstène, suivie d'une fonctionnalisation au carbone pyrolytique. Les UME coniques à haut rapport d'aspect ont le potentiel de devenir des outils précieux pour mener des études sur les relations structure-propriétés avec une ou plusieurs nanoparticules, ou pour réaliser des mesures sur des structures biologiques submicroniques (telles que des organites individuels ou d'autres éléments ultrastructuraux de cellules vivantes) nécessitant une résolution spatiale élevée. L'utilisation d'UME pourrait ainsi pallier les défis liés à la faible intensité des signaux faradiques observés avec les mitochondries, en améliorant la sensibilité et la précision des mesures électrochimiques.

En combinant les avantages offerts par l'EGO et les UME, il serait possible de développer des plateformes électrochimiques innovantes pour l'étude approfondie de la fonction mitochondriale et des dysfonctionnements associés. De telles plateformes pourraient offrir une meilleure compréhension des mécanismes bioénergétiques au niveau cellulaire et contribuer au développement de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques pour les maladies liées aux mitochondries.

En conclusion, ce travail apporte une contribution significative au domaine de l'électrochimie mitochondriale en démontrant le potentiel de l'EGO pour faciliter la communication entre les mitochondries et les électrodes, et en explorant l'utilisation des UME pour améliorer la sensibilité des mesures électrochimiques. Les résultats obtenus ouvrent de nouvelles perspectives pour l'étude des mitochondries et des processus bioénergétiques, tout en soulignant l'importance de poursuivre les recherches pour optimiser les matériaux et les configurations d'électrodes dans ce contexte.

7 Perspectives et travaux futurs

En s'appuyant sur les bases établies dans cette étude, les travaux futurs viseront à repousser les limites de l'électrochimie mitochondriale en se concentrant sur des mesures à l'échelle de l'organite individuel, une approche complémentaire et parfois supérieure aux méthodes classiques telles que Seahorse ou Oroboros, qui reposent sur des mesures de populations cellulaires entières et sur des paramètres indirects tels que le pH ou la consommation d'oxygène.

Dans un premier temps, la plateforme actuelle à base de macroélectrodes modifiées avec de l'oxyde de graphène électro-réduit (EGO) offre déjà des perspectives prometteuses. Grâce à sa compatibilité avec des mesures directes du transfert d'électrons entre la chaîne de transport d'électrons (CTE) et l'électrode, cette plateforme pourrait être utilisée pour étudier les contributions individuelles des complexes de la CTE. Des approches génétiques, consistant à éliminer ou inhiber sélectivement des protéines spécifiques de la CTE dans des mitochondries isolées, permettraient de déterminer quels complexes ou cofacteurs redox interagissent électrochimiquement avec l'électrode, et ainsi mieux comprendre la nature du couplage électrochimique observé.

En parallèle, cette plateforme peut être exploitée pour comparer directement les signaux électrochimiques de mitochondries isolées issues de cellules saines et de modèles pathologiques. Cette comparaison pourrait révéler des altérations du comportement redox caractéristiques de certaines maladies (neurodégénératives, métaboliques, etc.), contribuant ainsi à l'identification de biomarqueurs électrochimiques spécifiques ou à la classification fonctionnelle des mitochondries en contexte pathologique.

Pour approfondir l'analyse à haute résolution, les travaux futurs porteront également sur l'utilisation des ultramicroélectrodes (UME) développées dans le cadre de cette thèse. Grâce à leur taille nanométrique et leur haute résolution spatiale, ces électrodes permettront de réaliser un scanning de la surface mitochondriale, en s'appuyant sur des techniques comme la microscopie électrochimique à balayage (SECM) ou la microscopie électrochimique à cellule de balayage (SECCM). Ces approches permettront de cartographier l'activité électrochimique de la membrane externe ou interne des mitochondries individuelles, fournissant une image locale des flux d'électrons et des éventuelles zones de dysfonctionnement.

Une piste audacieuse mais prometteuse consiste à utiliser les UME en carbone comme microaiguilles afin de sonder l'intérieur des mitochondries, voire de percer les membranes pour étudier les compartiments internes tels que la matrice ou l'espace intermembranaire. Cette approche ouvrirait la voie à une électrochimie intra-compartimentale, permettant d'analyser localement la répartition des cofacteurs redox, l'activité enzymatique ou encore les gradients électrochimiques, avec une précision jusqu'ici inégalée.

Enfin, une extension naturelle de cette approche consistera à réaliser des mesures directement dans les cellules vivantes, en utilisant les UME pour traverser la membrane plasmique et atteindre les mitochondries in situ. Cela permettrait de s'affranchir des artefacts liés à l'isolement ou à la purification, qui peuvent altérer le métabolisme mitochondrial, tout en conservant l'intégrité du contexte cellulaire. Une telle stratégie offrirait une lecture électrochimique directe et dynamique de l'état bioénergétique mitochondrial dans des conditions physiologiques, ce que les approches actuelles peinent à offrir.

Ces orientations futures placent l'électrochimie comme une méthodologie complémentaire aux techniques biochimiques traditionnelles, mais dotée d'un potentiel unique pour explorer la complexité redox des mitochondries à l'échelle individuelle, compartimentale et cellulaire. En combinant ces innovations technologiques avec des modèles pathologiques pertinents, il sera possible de faire progresser à la fois la recherche fondamentale et les applications cliniques dans le domaine de la bioénergétique mitochondriale.

8 BIBLIOGRAPHIE

- [1] P.N. Bartlett, *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications* - Philip N. Bartlett - Google Libros, Wiley, West Sussex, 2008.
- [2] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 8th ed., W. H. Freeman, New York, 2021.
- [3] R. Guo, J. Gu, S. Zong, M. Wu, M. Yang, *Biomed J* 41 (2018) 9–20.
- [4] T.G. Frey, C.A. Mannella, *Trends Biochem Sci* 0004 (2000) 319–324.
- [5] D. Harvey, *Analytical Chemistry 2.0*, 2010.
- [6] A.J. Bard, L.R. Faulkner, H.S. White, *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*, Third edition, John Wiley and Sons, Ltd, 2022.
- [7] Y. Lei, B.D. Ossoinon, J. Chen, J. Perreault, A.C. Tavares, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 887 (2021) 115084.
- [8] M. Hoseini-Ghahfarokhi, S. Mirkiani, N. Mozaffari, M.A. Abdolahi Sadatlu, A. Ghasemi, S. Abbaspour, M. Akbarian, F. Farjadian, M. Karimi, *Int J Nanomedicine* 15 (2020) 9469–9496.
- [9] K. Ghosal, P. Mondal, S. Bera, S. Ghosh, *FlatChem* 30 (2021) 100315.
- [10] S. Keshavan, S. Naskar, A. Diaspro, L. Cancedda, S. Dante, *Acta Biomater* 65 (2018) 363–375.
- [11] Y. Lei, B.D. Ossoinon, P.L. Trahan, J. Chen, J. Perreault, A.C. Tavares, *ACS Appl Mater Interfaces* 15 (2023) 35580–35589.
- [12] S. Yadav, A.P. Singh Raman, H. Meena, A.G. Goswami, Bhawna, V. Kumar, P. Jain, G. Kumar, M. Sagar, D.K. Rana, I. Bahadur, P. Singh, *ACS Omega* 7 (2022) 35387–35445.
- [13] S. Das, S. Singh, V. Singh, D. Joung, J.M. Dowding, D. Reid, J. Anderson, L. Zhai, S.I. Khondaker, W.T. Self, S. Seal, *Particle & Particle Systems Characterization* 30 (2013) 148–157.
- [14] E. Demirel, E. Karaca, Y. Yuksel Durmaz, *Eur Polym J* 124 (2020) 109504.

- [15] R. Teixeira-Santos, S. Belo, R. Vieira, F.J.M. Mergulhão, L.C. Gomes, *Biomolecules* 2023, Vol. 13, Page 1571 13 (2023) 1571.
- [16] J. Zhao, F. Meng, X. Zhu, K. Han, S. Liu, G. Li, *Electroanalysis* 20 (2008) 1593–1598.
- [17] F. Giroud, T.A. Nicolo, S.J. Koepke, S.D. Minteer, *Electrochim Acta* 110 (2013) 112–119.
- [18] S.J. Koepke, J.J. Watkins, S.D. Minteer, *J Electrochem Soc* 163 (2016) H292–H298.
- [19] R.L. Arechederra, K. Boehm, S.D. Minteer, *Electrochim Acta* 54 (2009) 7268–7273.
- [20] D. Bhatnagar, S. Xu, C. Fischer, R.L. Arechederra, S.D. Minteer, *Physical Chemistry Chemical Physics* 13 (2011) 86–92.
- [21] R. Arechederra, S.D. Minteer, *Electrochim Acta* 53 (2008) 6698–6703.
- [22] S.L. Maltzman, S.D. Minteer, *Analytical Methods* 4 (2012) 1202–1206.
- [23] T. Wang, R.C. Reid, S.D. Minteer, *Electroanalysis* 28 (2016) 854–859.
- [24] M.N. Germain, R.L. Arechederra, S.D. Minteer, *J Am Chem Soc* 130 (2008) 15272–15273.
- [25] M.N. Arechederra, C.N. Fischer, D.J. Wetzal, S.D. Minteer, *Electrochim Acta* 56 (2010) 938–944.
- [26] R.M. Wightman, *Anal Chem* 53 (1981) 1125A–1134A.
- [27] M.M. Collinson, P.J. Zambrano, H. Wang, J.S. Taussig, *Langmuir* 15 (1999) 662–668.
- [28] C. Chen, Y. Pang, F. Zhang, J. Zhong, B. Zhang, Z. Cheng, *J Mater Chem A Mater* 6 (2018) 19621–19630.
- [29] J.A. Lundqvist, F. Sahlin, M.A.I. Åberg, A. Strömberg, P.S. Eriksson, O. Orwar, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 10356–10360.
- [30] T.E. Lin, S. Rapino, H.H. Girault, A. Lesch, *Chem Sci* 9 (2018) 4546–4554.
- [31] D.J. Comstock, J.W. Elam, M.J. Pellin, M.C. Hersam, *Anal Chem* 82 (2010) 1270–1276.
- [32] S.M. Oja, M. Wood, B. Zhang, *Anal Chem* 85 (2013) 473–486.
- [33] S.M. Oja, Y. Fan, C.M. Armstrong, P. Defnet, B. Zhang, *Anal Chem* 88 (2016) 414–430.
- [34] J.L. Conyers, H.S. White, *Anal Chem* 72 (2000) 4441–4446.

- [35] N.M. Nanoparticles, R.W. Murray, R.W. Murray, *Chem Rev* 108 (2008) 2688–2720.
- [36] R.R.Usarov, U.T.Asatov, *American Journal Of Applied Science And Technology* 2 (2022) 26–31.
- [37] R. Hanson, *Biochem Educ* 18 (1990) 194–196.
- [38] B. Testa, S.D. Krämer, *Chem Biodivers* 4 (2007) 257–405.
- [39] H.S. Raper, <https://doi.org/10.1152/Physrev.1928.8.2.245> 8 (1928) 245–282.
- [40] N.L. Frantz, G. Brakoniecki, D. Chen, D.A. Proshlyakov, *Anal Chem* 93 (2021) 1360–1368.
- [41] A.K. Kondadi, A.S. Reichert, *Annu Rev Biophys* 53 (2024) 147–168.
- [42] M. Giacomello, A. Pyakurel, C. Glytsou, L. Scorrano, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 21:4 21 (2020) 204–224.
- [43] W. Ji, X. Tang, W. Du, Y. Lu, N. Wang, Q. Wu, W. Wei, J. Liu, H. Yu, B. Ma, L. Li, W. Huang, *Chem Soc Rev* 51 (2022) 71–127.
- [44] L. Szarkowska, *Arch Biochem Biophys* 113 (1966) 519–525.
- [45] P.M. Callahan, G.T. Babcock, *Biochemistry* 22 (1983) 452–461.
- [46] K.A. Davis, Y. Hatefi, K.L. Poff, W.L. Butler, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 325 (1973) 341–356.
- [47] W.D. BUTT, D. KEILIN, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 156 (1962) 429–458.
- [48] M. Rivera, R. Seetharaman, D. Girdhar, M. Wirtz, X. Zhang, X. Wang, S. White, *Biochemistry* 37 (1998) 1485–1494.
- [49] P. Bernardi, G.F. Azzone, *Journal of Biological Chemistry* 256 (1981) 7187–7192.
- [50] J. Hirst, *Annu Rev Biochem* 82 (2013) 551–575.
- [51] R. Baradaran, J.M. Berrisford, G.S. Minhas, L.A. Sazanov, *Nature* 494 (2013) 443–448.
- [52] A.H.V. Schapira, *Exp Neurol* 224 (2010) 331–335.
- [53] F. Sun, X. Huo, Y. Zhai, A. Wang, J. Xu, D. Su, M. Bartlam, Z. Rao, *Cell* 121 (2005) 1043–1057.
- [54] K. Harada, T. Yahata, M. Onizuka, T. Ishii, A.A. Ibrahim, E. Kikkawa, Y. Gondo, K. Ando, *Stem Cells* 41 (2023) 39–49.
- [55] S. Iwata, J.W. Lee, K. Okada, J.K. Lee, M. Iwata, B. Rasmussen, T.A. Link, S. Ramaswamy, B.K. Jap, *Science* (1979) 281 (1998) 64–71.

- [56] T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Science* (1979) 272 (1996) 1136–1144.
- [57] J.P. Abrahams, A.G.W. Leslie, R. Lutter, J.E. Walker, *Nature* 1994 370:6491 370 (1994) 621–628.
- [58] (n.d.).
- [59] E.; Gnaiger, T.; Arnould, D.; Detraux, J. Storder, M. Preprint, *MitoFit Preprint* (2019) 1–40.
- [60] E. Pfaff, M. Klingenberg, *Eur J Biochem* 6 (1968) 66–79.
- [61] N. V. Dudkina, R. Kouřil, K. Peters, H.P. Braun, E.J. Boekema, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797 (2010) 664–670.
- [62] B. Westermann, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010 11:12 11 (2010) 872–884.
- [63] U. Bruno-Mota, I.N. Rodriguez-Hernández, R. Doostkam, P. Soucy, F. Navarro-Pardo, G. Orozco, A. Yurtsever, A.C. Tavares, *Electrochim Acta* 402 (2022) 139524.
- [64] L.R. Faulkner, *J Chem Educ* 60 (1983) 262–264.
- [65] D. Skoog, D. West, J. Holler, S. Crouch, in: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th ed., Brooks/Cole, Cengage Learning, 2013, pp. 442–648.
- [66] J. Wu, *Chem Rev* 122 (2022) 10821–10859.
- [67] R. Seeber, C. Zanardi, G. Inzelt, *ChemTexts* 2 (2016) 1–16.
- [68] N. Elgrishi, K.J. Rountree, B.D. McCarthy, E.S. Rountree, T.T. Eisenhart, J.L. Dempsey, *J Chem Educ* 95 (2018) 197–206.
- [69] L. Ramaley, M.S. Krause, *Anal Chem* 41 (1969) 1365–1369.
- [70] J.G. Osteryoung, R.A. Osteryoung, *Anal Chem* 57 (1985) 101–110.
- [71] A. Peroff, <https://Pineresearch.Com/Shop/Kb/Software/Methods-and-Techniques/Voltammetric-Methods/Square-Wave-Voltammetry/> (2023).
- [72] S. Dong, J. Li, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 42 (1997) 7–13.
- [73] Y. Kwon, K.J.P. Schouten, M.T.M. Koper, *ChemCatChem* 3 (2011) 1176–1185.
- [74] P. Kannan, G. Maduraiveeran, *Biosensors* 2023, Vol. 13, Page 542 13 (2023) 542.
- [75] C.P. Sousa, F.W.P. Ribeiro, T.M.B.F. Oliveira, G.R. Salazar-Banda, P. de Lima-Neto, S. Morais, A.N. Correia, *ChemElectroChem* 6 (2019) 2350–2378.

- [76] Y.M. Hassan, (2018).
- [77] D. Sridharan, S.P. Manoharan, N. Palaniswamy, *Bioelectrochemistry* 82 (2011) 135–139.
- [78] K. Herkendell, *Catalysts* 2021, Vol. 11, Page 278 11 (2021) 278.
- [79] R.G. Bai, R. Tuvikene, *Handbook of Carbon-Based Nanomaterials* (2021) 551–571.
- [80] B. Anegebe, I.H. Ifijen, M. Maliki, I.E. Uwidia, A.I. Aigbodion, *Environmental Sciences Europe* 2023 36:1 36 (2024) 1–34.
- [81] B. Zhang, P. Wei, Z. Zhou, T. Wei, *Adv Drug Deliv Rev* 105 (2016) 145–162.
- [82] J. Schmuck, W. Rondan, U. Reno, J. Vasquez, L. Regaldo, A.M. Gagneten, A. Champi, *Diam Relat Mater* 145 (2024) 111145.
- [83] V. Georgakilas, M. Otyepka, A.B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K.C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril, K.S. Kim, *Chem Rev* 112 (2012) 6156–6214.
- [84] Y. Lei, L. dos S. Madalena, B.D. Ossnonon, F.E.B. Junior, J. Chen, M.R.V. Lanza, A.C. Tavares, *Molecules* 27 (2022) 7629.
- [85] A.M.L. Oliveira, M. Machado, G.A. Silva, D.B. Bitoque, J.T. Ferreira, L.A. Pinto, Q. Ferreira, *Nanomaterials* 2022, Vol. 12, Page 1149 12 (2022) 1149.
- [86] F. Sahne, M. Mohammadi, G.D. Najafpour, *ACS Biomater Sci Eng* 5 (2019) 2595–2609.
- [87] Y.D. Yashaswini, A. Prabhu, S. Anil, J. Venkatesan, *J Drug Deliv Sci Technol* 64 (2021) 102624.
- [88] J. Tian, Y. Luo, L. Huang, Y. Feng, H. Ju, B.Y. Yu, *Biosens Bioelectron* 80 (2016) 519–524.
- [89] G. Shim, M.G. Kim, J.Y. Park, Y.K. Oh, *Adv Drug Deliv Rev* 105 (2016) 205–227.
- [90] A. Ghaemi, S. Javadi, M.K. Heidari, H. Rashedi, F. Yazdian, M. Omid, Z. Tavakoli, M. Sheikhpour, *Wound Medicine* 31 (2020) 100193.
- [91] N. Mauro, C. Scialabba, S. Agnello, G. Cavallaro, G. Giammona, *Materials Science and Engineering: C* 107 (2020) 110201.
- [92] X.T. Zheng, X.Q. Ma, C.M. Li, *J Colloid Interface Sci* 467 (2016) 35–42.
- [93] S. Kazemi, M. Pourmadadi, F. Yazdian, A. Ghadami, *Int J Biol Macromol* 186 (2021) 554–562.
- [94] N. Ma, B. Zhang, J. Liu, P. Zhang, Z. Li, Y. Luan, *Int J Pharm* 496 (2015) 984–992.

- [95] J. Gupta, A. Prakash, M.K. Jaiswal, A. Agarrwal, D. Bahadur, *J Magn Magn Mater* 448 (2018) 332–338.
- [96] G. Shim, J.Y. Kim, J. Han, S.W. Chung, S. Lee, Y. Byun, Y.K. Oh, *Journal of Controlled Release* 189 (2014) 80–89.
- [97] G. Shim, J.Y. Kim, J. Han, S.W. Chung, S. Lee, Y. Byun, Y.K. Oh, *Journal of Controlled Release* 189 (2014) 80–89.
- [98] P. Gao, M. Liu, J. Tian, F. Deng, K. Wang, D. Xu, L. Liu, X. Zhang, Y. Wei, *Appl Surf Sci* 378 (2016) 22–29.
- [99] S.R. Shin, B. Aghaei-Ghareh-Bolagh, X. Gao, M. Nikkhah, S.M. Jung, A. Dolatshahi-Pirouz, S.B. Kim, S.M. Kim, M.R. Dokmeci, X. Tang, A. Khademhosseini, *Adv Funct Mater* 24 (2014) 6136–6144.
- [100] S.P. Irazusta, M.S. Ferreira, P.J. Balsamo, L. Solano De Almeida, H.J. Ceragioli, *Research, Society and Development* 10 (2021) e459101520377–e459101520377.
- [101] T. Malina, A. Lamaczová, E. Maršálková, R. Zbořil, B. Maršálek, *Chemosphere* 291 (2022) 132739.
- [102] E. Hashemi, O. Akhavan, M. Shamsara, M. Daliri, M. Dashtizad, A. Farmany, *Colloids Surf B Biointerfaces* 146 (2016) 770–776.
- [103] M. Ema, M. Gamo, K. Honda, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 85 (2017) 7–24.
- [104] Z. Cao, M. Su, H. Wang, L. Zhou, Z. Meng, G. Xiong, X. Liao, H. Lu, *Chemosphere* 270 (2021) 128611.
- [105] Z. Cao, M. Su, H. Wang, L. Zhou, Z. Meng, G. Xiong, X. Liao, H. Lu, *Chemosphere* 270 (2021) 128611.
- [106] G. Audira, J.S. Lee, P. Siregar, N. Malhotra, M.J.M. Rolden, J.C. Huang, K.H.C. Chen, H.S. Hsu, Y. Hsu, T.R. Ger, C. Der Hsiao, *Environmental Pollution* 278 (2021) 116907.
- [107] J. Sun, Q. Zhou, X. Hu, *Ecotoxicol Environ Saf* 180 (2019) 269–279.
- [108] O. Akhavan, E. Ghaderi, E. Hashemi, E. Akbari, *Carbon N Y* 95 (2015) 309–317.
- [109] S. Xu, Z. Zhang, M. Chu, *Biomaterials* 54 (2015) 188–200.
- [110] S. Du, P. Zhang, R. Zhang, Q. Lu, L. Liu, X. Bao, H. Liu, *Chemosphere* 164 (2016) 499–507.

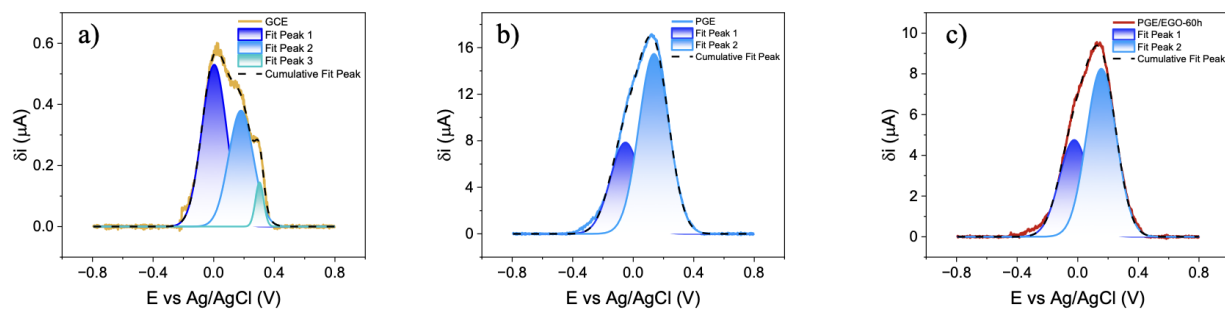
- [111] I. Sengupta, P. Bhattacharya, M. Talukdar, S. Neogi, S.K. Pal, S. Chakraborty, *Colloid Interface Sci Commun* 28 (2019) 60–68.
- [112] Z. Guo, C. Xie, P. Zhang, J. Zhang, G. Wang, X. He, Y. Ma, B. Zhao, Z. Zhang, *Science of The Total Environment* 580 (2017) 1300–1308.
- [113] Z. Guo, C. Xie, P. Zhang, J. Zhang, G. Wang, X. He, Y. Ma, B. Zhao, Z. Zhang, *Science of The Total Environment* 580 (2017) 1300–1308.
- [114] X. Wu, S. Tan, Y. Xing, Q. Pu, M. Wu, J.X. Zhao, *Colloids Surf B Biointerfaces* 157 (2017) 1–9.
- [115] D.D. Simeonova, K. Pollmann, A. Bianco, D. Lièvremon, *MSphere* 9 (2024).
- [116] B.J. Hong, O.C. Compton, Z. An, I. Eryazici, S.T. Nguyen, *ACS Nano* 6 (2012) 63–73.
- [117] Y. Xu, H. Bai, G. Lu, C. Li, G. Shi, *J Am Chem Soc* 130 (2008) 5856–5857.
- [118] M. Li, C. Yan, R. Ramachandran, Y. Lan, H. Dai, H. Shan, X. Meng, D. Cui, F. Wang, Z.X. Xu, *Chemical Engineering Journal* 430 (2022) 133050.
- [119] J.A. Buledi, N. Mahar, A. Mallah, A.R. Solangi, I.M. Palabiyik, N. Qambrani, F. Karimi, Y. Vasseghian, H. Karimi-Maleh, *Food and Chemical Toxicology* 161 (2022) 112843.
- [120] Q. Zhang, B.X. Wang, Y.L. Zhou, J. ming Hong, Y.B. Yu, *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 161 (2022) 110443.
- [121] M.E. Uddin, N.H. Kim, T. Kuila, S.H. Lee, D. Hui, J.H. Lee, *Compos B Eng* 79 (2015) 649–659.
- [122] B. Zhang, P. Wei, Z. Zhou, T. Wei, *Adv Drug Deliv Rev* 105 (2016) 145–162.
- [123] R.L. Arechederra, A. Waheed, W.S. Sly, C.T. Supuran, S.D. Minteer, *Bioorg Med Chem* 21 (2013) 1544–1548.
- [124] T. Wang, S.D. Minteer, *J Electrochem Soc* 163 (2016) H1047–H1052.
- [125] G. Ayala, A. Nascimento, A. Gómez-Puyou, A. Darszon, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 810 (1985) 115–122.
- [126] S. Mishra, R. Mishra, *Int J Proteomics* 2015 (2015) 1–12.
- [127] Y. Li, J.T. Cox, B. Zhang, *J Am Chem Soc* 132 (2010) 3047–3054.
- [128] S. Chen, A. Kucernak, *Journal of Physical Chemistry B* 108 (2004) 13984–13994.
- [129] S. Chen, A. Kucernak, *Journal of Physical Chemistry B* 106 (2002) 9396–9404.

- [130] H. Hua, Y. Liu, D. Wang, Y. Li, *Anal Chem* 90 (2018) 9677–9681.
- [131] C.G. Zoski, *Electroanalysis* 14 (2002) 1041–1051.
- [132] M. V. Mirkin, F.R.F. Fan, A.J. Bard, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 328 (1992) 47–62.
- [133] D.W.M. Arrigan, *Analyst* 129 (2004) 1157–1165.
- [134] M. Kulakov, I. Luzinov, K.G. Kornev, *Langmuir* 25 (2009) 4462–4468.
- [135] A. Hermans, R.M. Wightman, *Langmuir* 22 (2006) 10348–10353.
- [136] E.J.F. Dickinson, I. Streeter, R.G. Compton, *Journal of Physical Chemistry B* 112 (2008) 4059–4066.
- [137] K. Leonhardt, A. Avdic, A. Lugstein, I. Pobelov, T. Wandlowski, M. Wu, B. Gollas, G. Denuault, *Anal Chem* 83 (2011) 2971–2977.
- [138] C.G. Zoski, M. V. Mirkin, *Anal Chem* 74 (2002) 1986–1992.
- [139] S. Daniele, E. De Faveri, I. Kleps, A. Angelescu, *Electroanalysis* 18 (2006) 1749–1756.
- [140] J. Jiao, R. Lin, S. Liu, W.C. Cheong, C. Zhang, Z. Chen, Y. Pan, J. Tang, K. Wu, S.F. Hung, H.M. Chen, L. Zheng, Q. Lu, X. Yang, B. Xu, H. Xiao, J. Li, D. Wang, Q. Peng, C. Chen, Y. Li, *Nat Chem* 11 (2019) 222–228.
- [141] M. Liu, Y. Pang, B. Zhang, P. De Luna, O. Voznyy, J. Xu, X. Zheng, C.T. Dinh, F. Fan, C. Cao, F.P.G. De Arquer, T.S. Safaei, A. Mepham, A. Klinkova, E. Kumacheva, T. Filleter, D. Sinton, S.O. Kelley, E.H. Sargent, *Nature* 537 (2016) 382–386.
- [142] K.-J. Bathe, *Wiley Encyclopedia of Computer Science and Engineering* (2008) 1–12.
- [143] U. Bruno-Mota, I.N. Rodriguez-Hernández, R. Doostkam, P. Soucy, F. Navarro-Pardo, G. Orozco, A. Yurtsever, A.C. Tavares, *Electrochim Acta* 402 (2022) 139524.
- [144] J.R. Masters, *Nature Reviews Cancer* 2002 2:4 2 (2002) 315–319.
- [145] A.A. Stepanenko, V. V. Dmitrenko, *Gene* 569 (2015) 182–190.
- [146] M.B. Eriksen, A.D. Minet, D. Glinborg, M. Gaster, *J Clin Endocrinol Metab* 96 (2011) E1298–E1302.
- [147] D. Zhang, G.S. Wilson, K. Niki, *Anal Chem* 66 (1994) 3873–3881.

- [148] J. Vonck, E. Schäfer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793 (2009) 117–124.
- [149] G. Lenaz, R. Fato, G. Formiggini, M.L. Genova, *Mitochondrion* 7 (2007) S8–S33.
- [150] L. Lu, Y. Zhu, C. Shi, Y.T. Pei, *Carbon N Y* 109 (2016) 373–383.
- [151] S. Zhuo, M. Shao, S.T. Lee, *ACS Nano* 6 (2012) 1059–1064.
- [152] B. Karimi, B. Ramezanzadeh, *J Colloid Interface Sci* 493 (2017) 62–76.
- [153] K.H. Liao, Y.S. Lin, C.W. MacOsco, C.L. Haynes, *ACS Appl Mater Interfaces* 3 (2011) 2607–2615.
- [154] A.E. Vercesi, C.F. Bernardes, M.E. Hoffmann, F.R. Gadelha, R. Docampo, *Journal of Biological Chemistry* 266 (1991) 14431–14434.
- [155] L. Scorrano, M. Ashiya, K. Buttle, S. Weiler, S.A. Oakes, C.A. Mannella, S.J. Korsmeyer, *Dev Cell* 2 (2002) 55–67.
- [156] M. Anik, K. Osseo-Asare, *J Electrochem Soc* 149 (2002) B224.
- [157] M. Anik, *Corros Sci* 52 (2010) 3109–3117.
- [158] M. Anik, *Electrochim Acta* 54 (2009) 3943–3951.
- [159] C. Dong, G. Meng, S.E. Saji, X. Gao, P. Zhang, D. Wu, Y. Pan, Z. Yin, Y. Cheng, *RSC Adv* 10 (2020) 24280–24287.

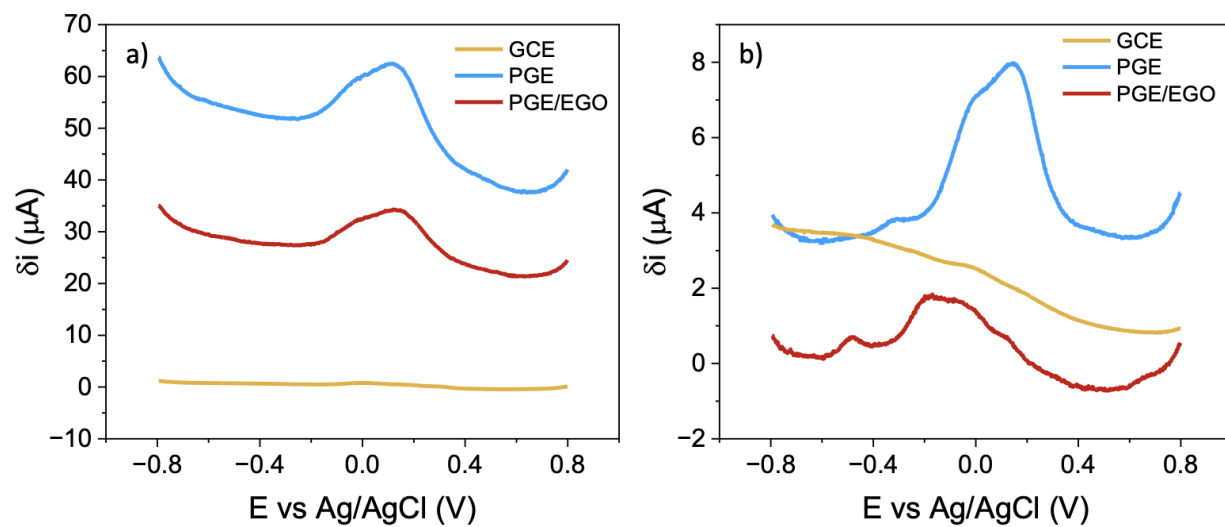
9 ANNEXES

9.1 Annexe 1



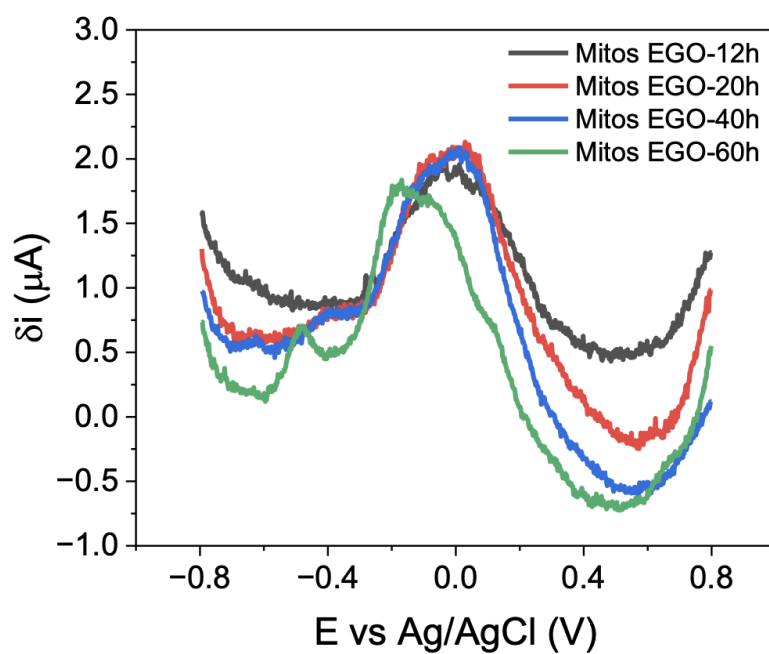
Déconvolution du signal des voltampérogrammes à ondes carrées après soustraction de la ligne de base pour des électrodes en carbone vitreux (GCE), en graphite pyrolytique (PGE) et des PGE modifiées avec de l'oxyde de graphène soniqué pendant 60 h (PGE/EGO-60h) dans un tampon MAS.

9.2 Annexe 2



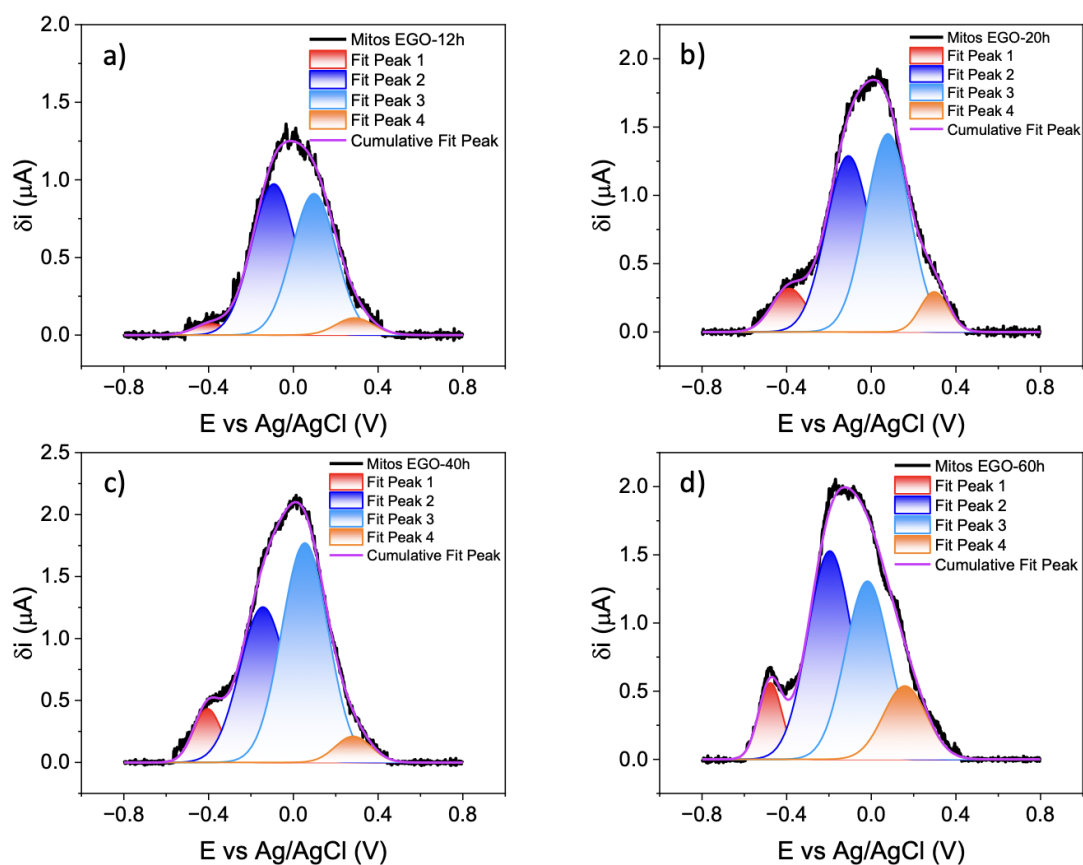
Voltampérogrammes à ondes carrées avant la soustraction de la ligne base de a) électrodes non modifiées : GCE, PGE et PGE/EGO-60h dans un tampon MAS, et b) mitochondries déposées par drop-casting sur les électrodes GCE, PGE et PGE/EGO-60h dans un tampon MAS.

9.3 Annexe 3



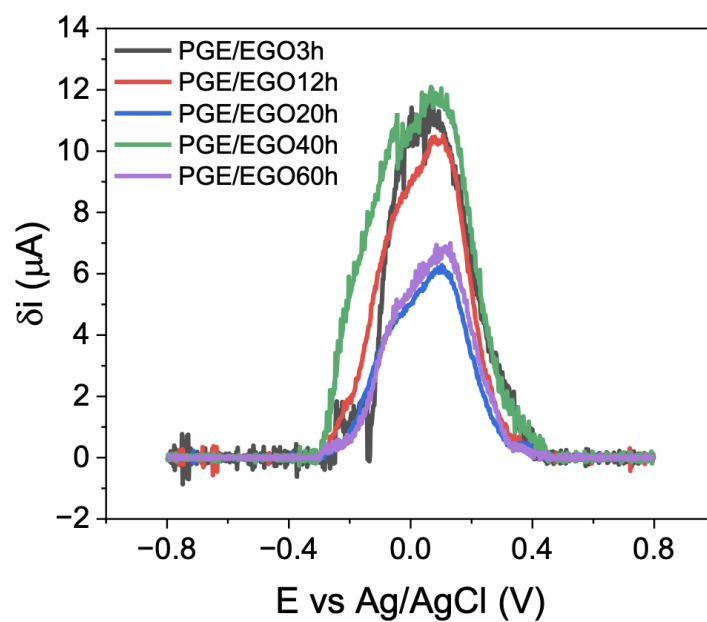
Voltampérogrammes à ondes carrées de mitochondries déposées par drop-casting sur des électrodes PGE/EGO soniquées pendant différentes durées dans un tampon MAS.

9.4 Annexe 4



Déconvolution et fitting des pics des voltampérogrammes à ondes carrées (VOC) de mitochondries déposées par drop-casting sur des électrodes PGE modifiées avec EGO soniqué pendant a) 12 h, b) 20 h, c) 40 h et d) 60 h. Le tampon MAS a été utilisé comme électrolyte de travail.

9.5 Annexe 5



Voltampérogrammes à ondes carrées (VOC) des EGO déposés par drop-casting sur des électrodes PGE, et soniqués pendant différents temps dans un tampon MAS.