

Problème I : Etude d'ultramicroélectrodes

Les ultramicroélectrodes, de dimension au moins micrométrique ou encore plus petite, constituent une classe à part et permettent en particulier d'étudier certains processus fondamentaux de la biologie. Cet aspect est développé dans le problème à partir de deux exemples : la caractérisation d'une réponse d'un stress oxydatif au niveau d'une seule cellule vivante et l'exocytose vésiculaire d'adrénaline par les cellules chromaffines surrénales.

La procédure la plus commode pour la réalisation d'une ultramicroélectrode disque-plan, de rayon r , consiste à introduire dans la partie effilée d'un tube de verre (matière inerte) un fil de platine mince. On scelle ensuite l'ensemble en ramollissant le verre par léger chauffage. On fait ensuite apparaître le disque en coupant la pointe du capillaire, la surface plane étant ensuite obtenue par polissage. Ce type d'électrode est ensuite pour des mesures *in vitro* tel qu'en **I-3c** (voir Figure 3).

AVERTISSEMENT :

Aucune connaissance sur les ultramicroélectrodes et les processus biologiques étudiés n'est nécessaire pour traiter l'ensemble du problème. Certaines valeurs numériques exigées dans le problème pourront être obtenues à l'issue de calculs simplifiés.

Les différentes parties du problème sont largement indépendantes.

DONNEES à 298 K

- **Constantes :**

$$\text{Faraday : } F = 96500 \text{ C mol}^{-1} ; \quad \frac{RT}{F} \ln 10 = 0,06 \text{ V} ;$$

$$\text{Constante d'Avogadro : } N_A = 6 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} ; \quad \pi \approx 3$$

- **Potentiel standard (en volt) à 298 K et pH = 0 :**

$\text{O}_2(\text{g}) / \text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$	$\text{Ag}^+(\text{aq}) / \text{Ag}(\text{s})$	$\text{O}_2(\text{g}) / \text{H}_2\text{O}$
0,69	0,8	1,23

- **Surtension à vide anodique (en volt) sur Pt :**

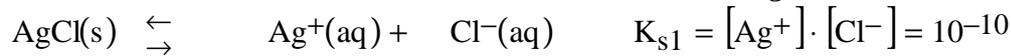
$$\eta(\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})/\text{O}_2(\text{g})) = +0,4 ; \quad \eta(\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2(\text{g})) = +0,7 ;$$

- **Surtension à videocathodique (en volt) sur Pt :**

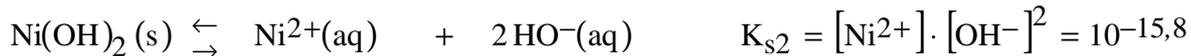
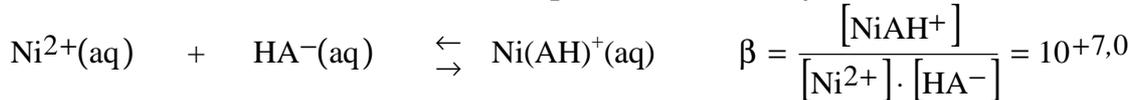
$$\eta(\text{O}_2(\text{g})/\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})) = -0,4 ; \quad \eta(\text{O}_2(\text{g})/\text{H}_2\text{O}) = -0,7 ;$$

- **Constantes d'équilibre en solution aqueuse :**

- *Solubilité du chlorure d'argent :*

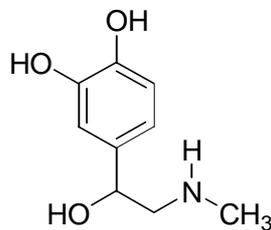


- *Constantes d'équilibre mettant en jeu l'ion Ni^{2+} :*



On négligera toute autre réaction faisant intervenir l'ion Ni^{2+} dans l'eau.

- *Constante d'acidité de l'adrénaline, notée H_2A :*



adrénaline H_2A

$$K_3 = \frac{[\text{H}_2\text{A}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{H}_3\text{A}^+]} = 10^{-8,7}$$

$$K_2 = \frac{[\text{HA}^-] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{H}_2\text{A}]} = 10^{-10,2}$$

$$K_1 = \frac{[\text{A}^{2-}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{HA}^-]} = 10^{-14,2}$$

I- Etude de la chronoampérométrie : intérêt des ultramicroélectrodes

I-1 Généralités sur les courbes intensité de courant-potentiel

Le montage expérimental permettant d'établir les courbes intensité-potentiel comporte en général trois électrodes dont une électrode indicatrice inattaquable (appelée également électrode de travail), d'aire suffisamment petite pour que les quantités d'espèces consommées soient négligeables, plongée dans une solution contenant un couple *Ox/Red* échangeant n faradays par mole, aux concentrations respectives $[\text{Ox}]$ et $[\text{Red}]$, représenté par le processus électrochimique (1), de potentiel standard $E^\circ_{\text{Ox/Red}}$:



Le schéma d'un tel montage à trois électrodes (voir Figure 1) (comprenant un potentiostat, milliampèremètre, noté mA, un millivoltmètre, noté mV) est le suivant :

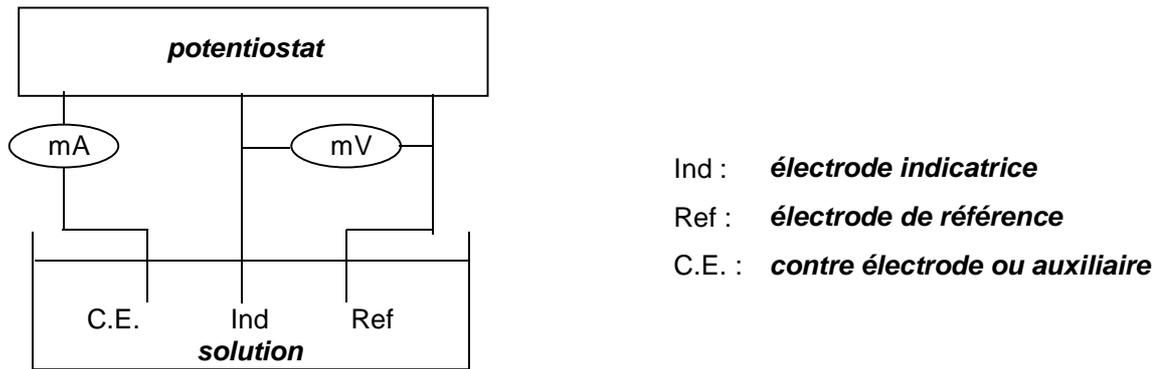


Figure 1 : Montage à trois électrodes

I-1a Justifier que l'électrode $\text{Ag(s)} \mid \text{AgCl(s)} \mid \text{KCl(aq)} (1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ est une électrode de référence. Déterminer son potentiel par rapport à l'électrode standard à hydrogène.

I-1b Pourquoi ne doit-il pas passer de courant au travers de l'électrode de référence ?

Indiquer les branches où l'intensité du courant est nulle ou non-nulle.

Préciser la nature du métal constituant l'électrode indicatrice inattaquable.

I-1c Qu'appelle-t-on un système rapide ? un système lent ?

Donner l'allure des courbes $i = f(E)$ correspondantes en rappelant la convention habituellement choisie pour le signe de l'intensité du courant qui traverse.

Qu'observe-t-on en imposant à l'électrode indicatrice des potentiels très élevé ou très faible ?

Indiquer clairement la réaction se produisant à l'électrode indicatrice ayant lieu pour chaque portion de courbes.

I-2 Modélisation

On se propose d'étudier dans cette question la relation existant entre l'intensité i et la concentration en réducteur Red , introduit seul en solution et appartenant au système électrochimique (1) considéré comme rapide. On applique à l'électrode indicatrice un potentiel supérieur au potentiel standard $E^\circ_{Ox/Red}$. Il s'établit alors un flux de matière, J_{Red} , qui s'accompagne d'un courant d'intensité i proportionnel à ce flux. On adopte en première approximation un profil de concentration linéaire dans une couche de solution, dite couche de diffusion, d'épaisseur δ_{dif} (voir Figure 2). On note $[Red]_{solution}$ et $[Red]_{électrode}$ les concentrations en réducteur, respectivement en solution et à proximité immédiate de la surface

de l'électrode. On supposera dans cette question que la couche de diffusion est de très faible épaisseur et indépendante du temps (solution agitée ou électrode tournante).

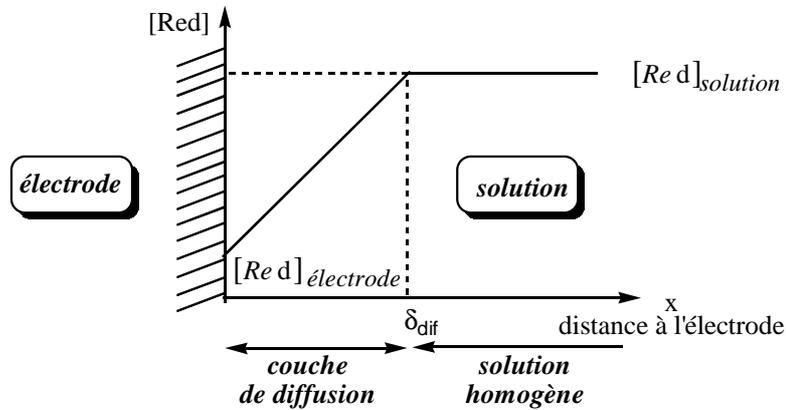


Figure 2 : Profil de concentration

Dans ces conditions et pour le système électrochimique (1), la relation entre l'intensité i et le flux J_{Red} est : $i = -n.F.A. J_{\text{Red}}$ avec A l'aire de l'électrode indicatrice.

I-2a En appliquant la première loi de Fick ($\vec{J} = -D_{\text{Red}} \text{grad}[\text{Red}]$), donner l'expression de l'intensité i en fonction de $[\text{Red}]_{\text{solution}}$ et $[\text{Red}]_{\text{électrode}}$, D_{Red} le coefficient de diffusion de l'espèce Red , A la surface de l'électrode et δ_{dif} .

I-2b Lorsque le potentiel auquel est porté l'électrode indicatrice est nettement supérieur au potentiel standard $E^\circ_{\text{Ox/Red}}$, l'intensité tend vers une valeur limite, noté i_{lim} , ce qui se traduit par l'existence d'un palier sur la courbe intensité-potentiel.

Quelle est alors la valeur de la concentration à proximité immédiate de la surface de l'électrode, $[\text{Red}]_{\text{solution}}$?

En déduire l'expression de i_{lim} pour une ultramicroélectrode disque-plan, de rayon r .

I-3 Etude des ultramicroélectrodes disque-plan, de rayon r

En régime de diffusion convective stationnaire (solution agitée ou électrode tournante), la couche de diffusion est maintenue constante au cours du temps. Au contraire, en régime de diffusion pure (pas de convection « mécanique » en solution, ce qui est le cas lors de mesure *in vitro*), l'épaisseur de la couche de diffusion, δ_{dif} , des espèces électroactives, ici Red , seul en

solution), dépend de la distance parcourue par diffusion pour une molécule. Pour une expérience de durée t , cette distance est donnée par :

$$\delta_{\text{dif}} = \sqrt{2D_{\text{R}} t}$$

On admet que :

- si $\delta_{\text{dif}} \ll r$, la couche de diffusion est approximativement plane ou linéaire ;
- si $\delta_{\text{dif}} > r$, la taille de la couche de diffusion ne pouvant pas physiquement dépasser la dimension de l'électrode, la diffusion devient alors sphérique et son épaisseur δ_{dif} est constante et approximativement égale à deux fois le rayon r de l'électrode. La courbe intensité-potentiel présente alors un palier comme dans le cas **I-2b**.

On peut alors considérer dans ce cas que le volume de solution affecté par le processus électrochimique, nommé *volume de solution sondée*, est une demi-sphère, de rayon δ_{dif} .

I-3a Avec une ultramicroélectrode de rayon $5 \mu\text{m}$, (et un coefficient de diffusion de l'espèce considérée $D_{\text{Red}} = 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$), quel est le temps de mesure au-delà duquel le volume sondé (couche de diffusion) est constant ?

I-3b Evaluer pour cette électrode le volume de solution sondée ? Conclusion.

I-3c- On considère une ultramicroélectrode disque-plan de rayon $5 \mu\text{m}$ distante de $1 \mu\text{m}$ d'une plaque de verre sur laquelle a été déposée une cellule vivante en solution aqueuse (voir Figure 3) :

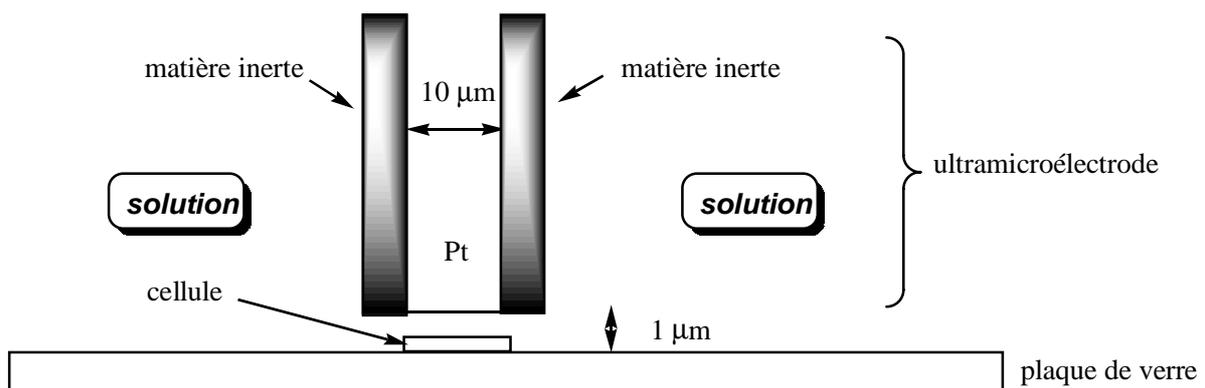


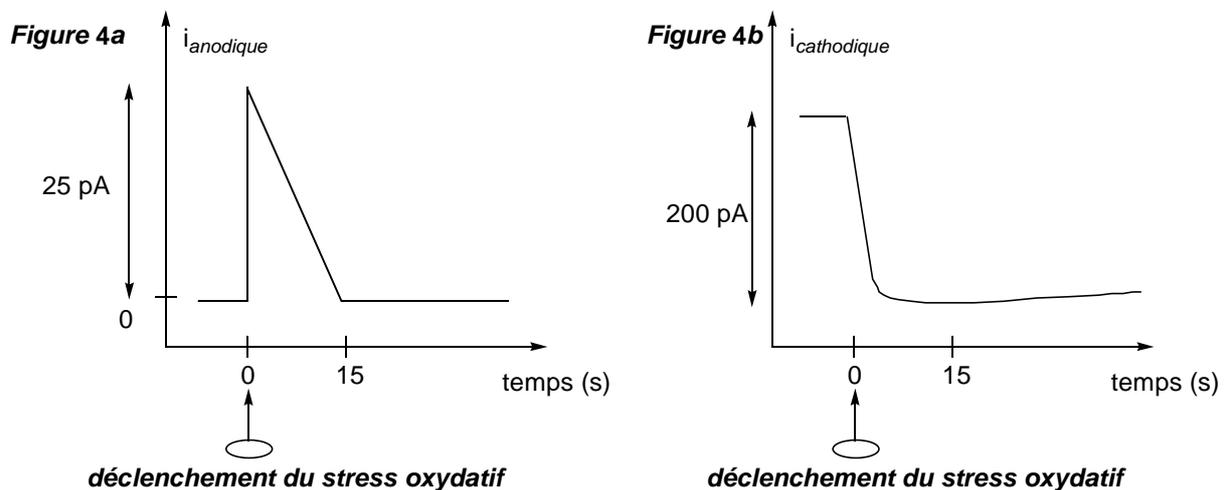
Figure 3 : Montage de mesure in vitro (l'échelle n'est pas respectée)

Quel est approximativement le volume de solution sondée dans ce cas précis ?

Une cellule subissant par exemple un stress oxydatif (voir partie II) libère jusqu'à 10 millions de molécules électroactives. Estimer alors la concentration à proximité immédiate de l'électrode.

II- Etude du stress oxydatif d'une cellule

Une cellule vivante, placée en solution aqueuse de $\text{pH} = 7$ et saturée en dioxygène O_2 est soumise à un stress « oxydatif ». On suit la concentration en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , produit par la cellule à la suite de ce stress à partir de mesures électrochimiques. Ces dernières sont obtenues suite à la mise en œuvre du montage présenté à la question **I-3c**. La « réponse » de la cellule au stress oxydatif est enregistrée à l'aide d'une ultramicroélectrode polarisée soit à $+0,6 \text{ V}$, soit à $-0,2 \text{ V}$, potentiels mesurés par rapport à une électrode $\text{Ag(s)} | \text{AgCl(s)} | \text{KCl(aq)} (1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$. Le courant est mesuré en picoAmpère, pA et ses variations en fonction du temps sont représentées sur les figures **4a** et **4b**.



Figures 4a et 4b : Mesures électrochimiques suite à un stress oxydatif (les échelles ne sont pas respectées)

II-1 Réactions aux électrodes

II-1a Quelles sont les demi équations électroniques concernées par l'expérience ?

II-1b Evaluer à 298K le potentiel standard apparent en fonction du pH, $E_{\text{app}}^{\circ}(\text{pH})$ pour chacune des espèces en solution.

Placer les courbes intensité-potential correspondantes sur un axe de potentiel dont l'origine est le potentiel de l'électrode de référence utilisée.

II-1c Vérifier que les potentiels appliqués à l'électrode indicatrice sont bien choisis.

II-2 Réponse biologique de la cellule

II-2a Que représente l'aire du pic de la Figure **4a** ? En déduire le nombre de mole de peroxyde d'hydrogène libéré par la cellule au cours du processus biologique.

II-2b Que dire qualitativement de la quantité de dioxygène consommé (Fig. **4b**) ? Conclure.

III- Etude de l'exocytose d'adrénaline

Une catécholamine, telle que l'adrénaline AH_2 , est aisément détectable par une technique électrochimique après stimulation de la cellule par des ions Ni^{2+} . Cette partie, indépendante des deux premières, porte donc sur l'étude des solutions aqueuses d'adrénaline en présence de sels de nickel Ni^{2+} .

III-1 Acido-basicité de l'adrénaline

III-1a- D'après la formule de l'adrénaline, quels sont les sites présentant en solution aqueuse des propriétés acides ou basiques ?

III-1b Sachant que la valeur de pK_2 de 10,2 est associée à l'une des fonctions phénol, établir le diagramme de prédominance des espèces en fonction du pH.

III-1c Expliquer la différence d'acidité observée entre les deuxième et troisième acidités.

III-2 Titrage d'une solution d'adrénaline par l'hydroxyde de sodium

III-2a Calculer le pH d'une solution aqueuse d'adrénaline à la concentration $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ introduite sous la forme de sel H_3A^+, Cl^- .

III-2b Peut-on titrer séparément par la soude les différentes acidités de l'adrénaline ?

III-3 Titrage d'une solution d'adrénaline en présence de sels de nickel (II)

III-3a Soit une solution S de H_3A^+, Cl^- à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ et de $Ni^{2+}, 2Cl^-$ à $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. En faisant l'hypothèse que le complexe $NiHA^+$ se forme à partir de cette solution, quelle serait la valeur de pH de cette solution ?

A l'aide d'un logiciel approprié la courbe de tirage de 10 mL de la solution S par la soude NaOH à $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a été simulée ainsi que le diagramme de distribution des variations des pourcentages de toutes les espèces solubles en quantité non négligeable, pourcentages rapportés à A total ou Ni total.

III-3b En exploitant la figure 5 (nature des espèces présentes, échelle des abscisses, rythme de variation des pourcentage) :

- indiquer si, l'hypothèse émise en **III-3a** est à retenir. Justifier votre réponse.
- Ecrire la réaction de titrage par la soude de H_3A^+ en présence de Ni^{2+} jusqu'au point P.

III-3c Quelle est la réaction au-delà du point P ?

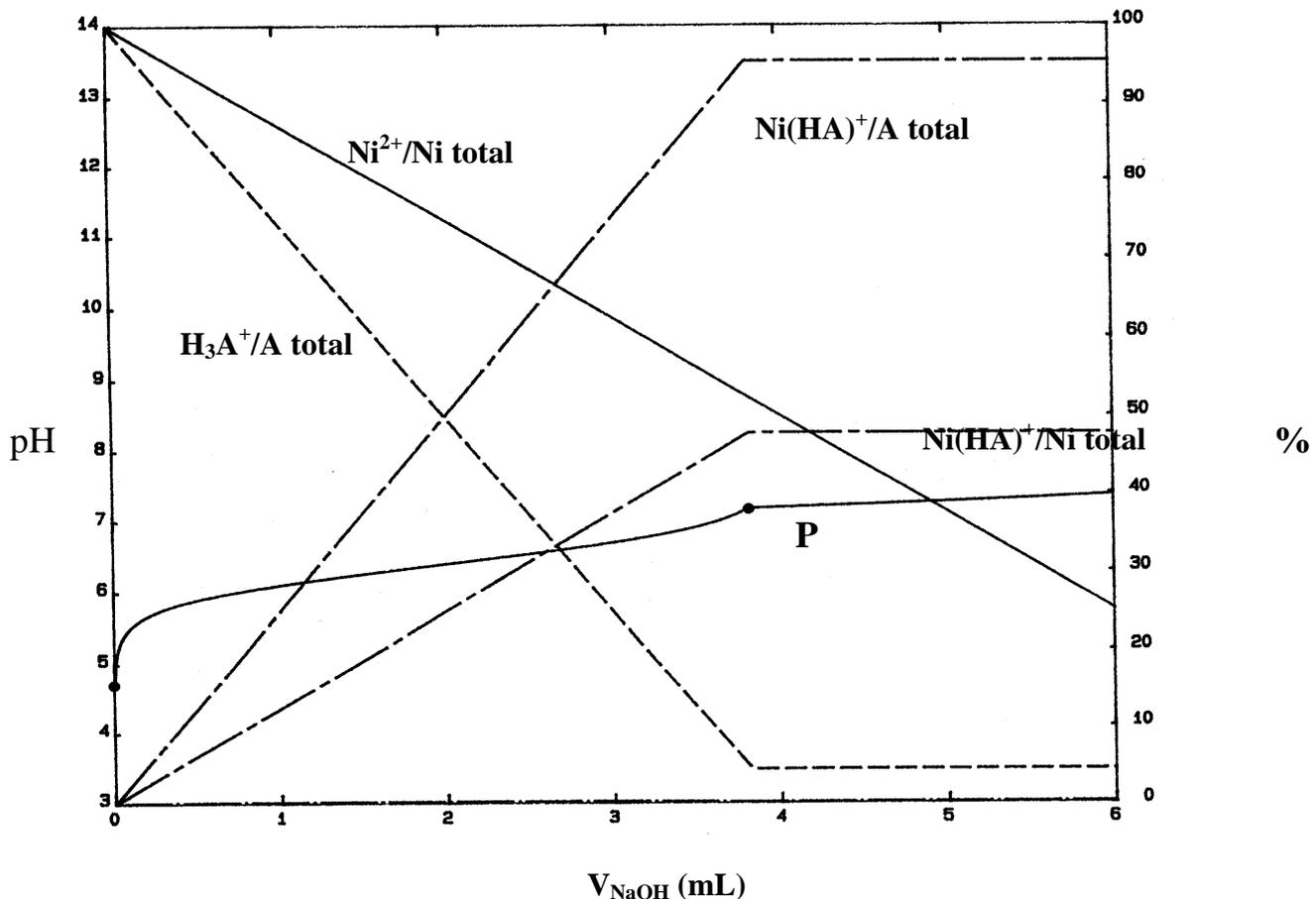


Figure 5 : Dosage de H_3A^+ , Cl^- à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ et de Ni^{2+} , 2Cl^- à $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ par la soude NaOH à $0,5 \text{ mol L}^{-1}$

Correction :

I- Courbe intensité-potentiel : Intérêt des ultramicroélectrodes

I-1 Généralités sur les courbes intensité de courant-potentiel

I-1a Le potentiel de l'électrode d'argent est :

$$E_{\text{AgCl}/\text{Ag}} = E_{\text{AgCl}/\text{Ag}}^{\circ} + \frac{R \cdot T \cdot \ln 10}{F} \cdot \log \frac{1}{[\text{Cl}^-]}$$



avec $\frac{R \cdot T \cdot \ln 10}{F} = 0,06 \text{ V à } 298\text{K}$

et $E_{\text{AgCl}/\text{Ag}}^{\circ} = E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^{\circ} + 0,06 \cdot \log K_s(\text{AgCl}) = 0,2 \text{ V}$

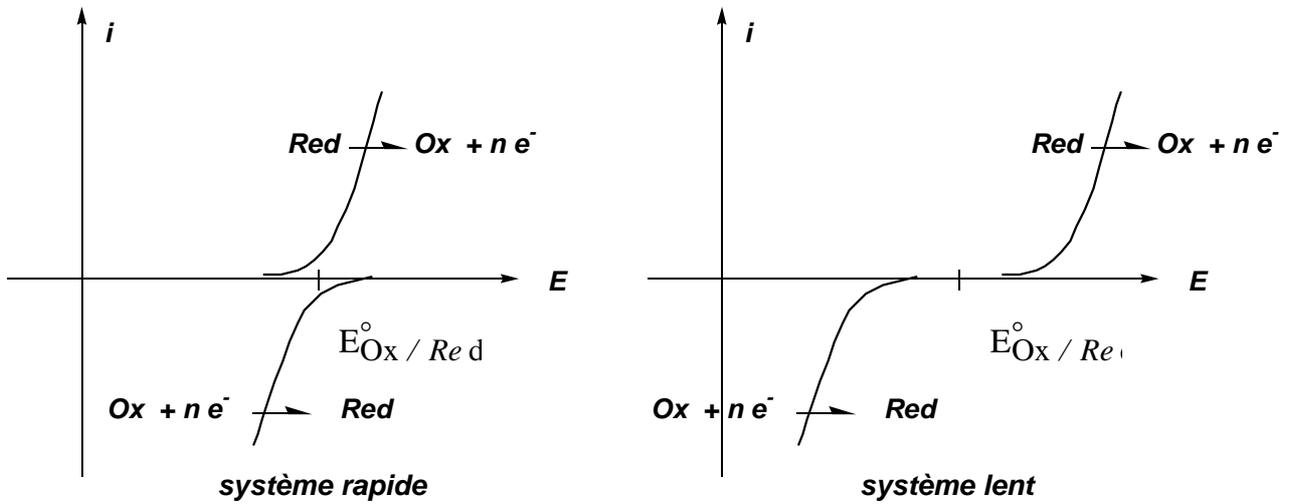
La concentration en ion chlorure est fixée par celle de KCl (on néglige la concentration des ions chlorure provenant de la dissolution de AgCl(s) dans l'eau).

I-1b S'il passe du courant dans l'électrode d'argent, il y a consommation ou production d'ions chlorure, donc détérioration de l'électrode d'argent et variation de son potentiel.

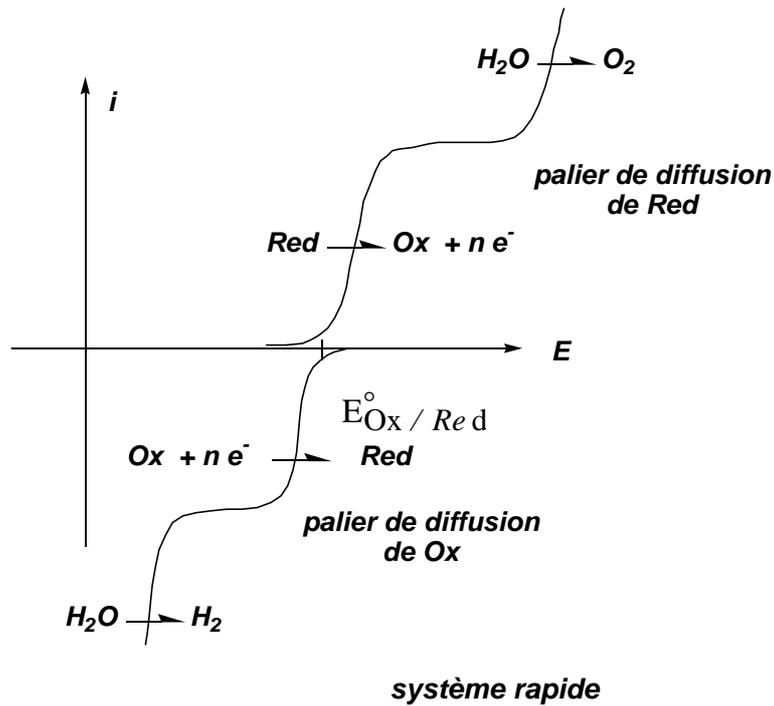
L'intensité de courant traversant la branche du millivoltmètre est nulle (impédance d'entrée supposée infinie), alors que l'intensité de la branche traversant le milliampèremètre est non-nulle.

Le métal de l'électrode indicatrice inattaquable est un métal noble, servant de conducteur métallique. On choisit habituellement le platine.

I-1c Un système rapide est un système pour lequel il existe une zone de potentiel à cheval sur $E_{\text{Ox}/\text{Red}}^{\circ}$ où on peut à la fois oxyder le réducteur et réduire l'oxydant. Pour un système lent, cette zone n'existe pas. Par rapport au cas précédent, la branche anodique est décalée vers la droite, la branche cathodique vers la gauche, l'écart étant la surtension.



I-1d On observe aux potentiels très élevé ou très faible, soit des paliers de diffusion lorsque l'espèce qui réagit est en solution, soit l'oxydation (intensité anodique) du solvant eau en oxygène ou sa réduction (intensité cathodique) en dihydrogène.



Allure de la courbe i-E pour un système rapide, Ox et Red, espèces en solution

I-2 Modélisation

I-2a $J_{Red} \approx -D_R \frac{[Red]_{solution} - [Red]_{électrode}}{\delta}$ pour un profil de concentration linéaire et

une épaisseur de couche de diffusion, δ , très faible.

On en déduit : $i_{\text{cathodique}} \approx + n \cdot F \cdot A \cdot D_R \frac{[Red]_{\text{solution}} - [Red]_{\text{électrode}}}{\delta}$

I-2b Lorsque le potentiel est nettement supérieur au potentiel d'oxydoréduction $E_{Ox/Red}$, l'intensité tend vers une valeur limite car la concentration au voisinage de l'électrode de *Red* tend vers 0 :

$$i_{\text{cathodique}}^{\text{lim}} \approx + n \cdot F \cdot A \cdot D_R \frac{[Red]_{\text{solution}}}{\delta}$$

L'expression de i_{lim} pour une électrode disque-plan, de rayon r est :

$$i_{\text{cathodique}}^{\text{lim}} \approx + n \cdot F \cdot \pi \cdot r^2 \cdot D_R \frac{[Red]_{\text{solution}}}{\delta}$$

I-3 Etude des ultramicroélectrodes disque-plan, de rayon r

I-3a Le temps de mesure au-delà duquel le volume sondé est constant vaut :

$$2 \cdot r > \sqrt{2D_R t}$$

$$\text{d'où } t < \frac{2 \cdot r^2}{D_R} = \frac{2 \cdot (5 \cdot 10^{-6})^2}{10^{-5} \cdot 10^{-4}} = 50 \text{ ms}$$

I-3b Le volume de solution sondée vaut :

$$. \vartheta = \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \delta_{\text{diff}}^3 \right) = \frac{1}{2} \cdot \left[\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (2 \cdot r)^3 \right] = 2 \cdot 10^{-18} \text{ m}^3 = 2 \cdot 10^{-15} \text{ L}$$

Ce volume de solution est très faible !

I-3c- Le volume de solution sondée est dans ce cas :

$$\vartheta = (\pi \cdot r^2) \times 1 = \left[\pi \cdot (5 \cdot 10^{-6})^2 \right] \times 10^{-6} = 75 \cdot 10^{-18} \text{ m}^3 = 75 \cdot 10^{-15} \text{ L}$$

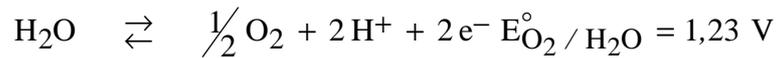
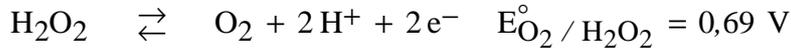
La concentration à proximité immédiate de l'électrode vaut :

$$C = \frac{10 \cdot 10^6}{6 \cdot 10^{23} \cdot 75 \cdot 10^{-15}} = 75 \cdot 10^{-18} \text{ m}^3 = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

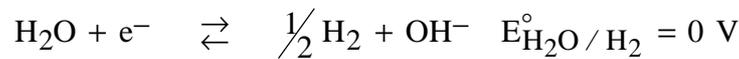
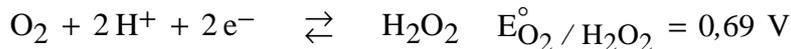
II- Etude du stress oxydatif d'une cellule

II-1 Réactions aux électrodes

II-1a Les réactions électrochimiques possibles à l'anode sont :



Les réactions possibles à la cathode sont :



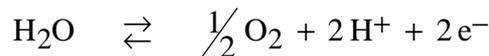
II-1b En tenant compte du pH et des surtension :

- Les réactions possibles à l'anode sont :



$$E_{\text{app}}^\circ = E_{\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2}^\circ - 0,06\text{pH} = 0,69 - 0,06 \times 7 = 0,27 \text{ V}$$

$$E = E_{\text{app}}^\circ + 0,4 = 0,67 \text{ V}$$

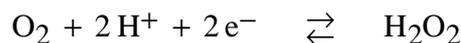


$$E_{\text{app}}^\circ = E_{\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}}^\circ - 0,06 \cdot \text{pH} = 1,23 - 0,06 \times 7 = 0,81 \text{ V}$$

$$E = E_{\text{app}}^\circ + 0,7 = 1,51 \text{ V}$$

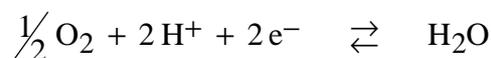
On en déduit que l'hydroperoxyde d'hydrogène est oxydé à 0,8V/ENH (= 0,6 + 0,2) alors que l'eau ne peut être oxydée en dioxygène.

- Les réactions possibles à la cathode sont :



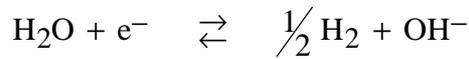
$$E_{\text{app}}^\circ = E_{\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2}^\circ - 0,06 \cdot \text{pH} = 0,69 - 0,06 \times 7 = 0,27 \text{ V}$$

$$E = E_{\text{app}}^\circ - 0,4 = -0,13 \text{ V}$$



$$E_{\text{app}}^{\circ} = E_{\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}}^{\circ} - 0,06 \cdot \text{pH} = 1,23 - 0,06 \times 7 = 0,81 \text{ V}$$

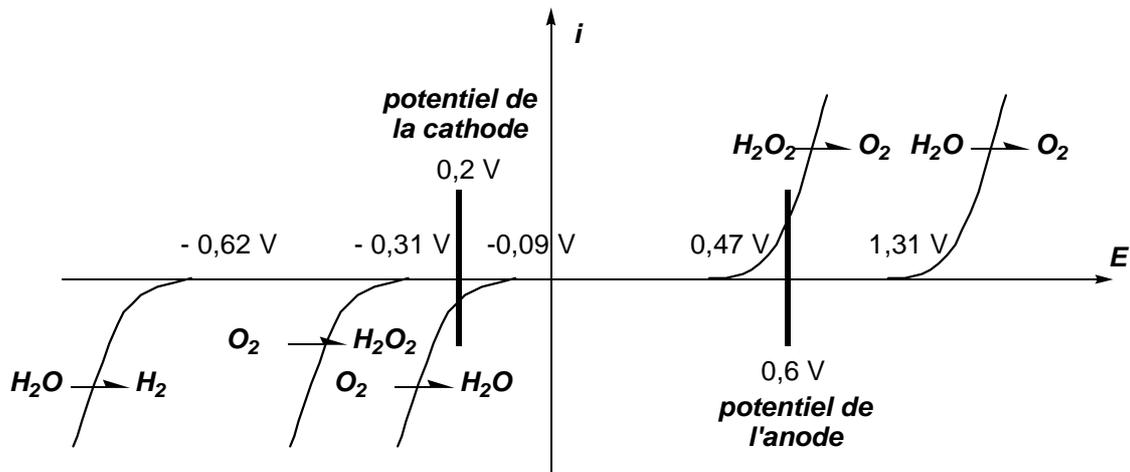
$$E = E_{\text{app}}^{\circ} - 0,7 = 0,11 \text{ V}$$



$$E_{\text{app}}^{\circ} = E_{\text{H}_2\text{O} / \text{H}_2}^{\circ} - 0,06 \cdot \text{pH} = 0 - 0,06 \times 7 = -0,42 \text{ V}$$

$$E < -0,42 \text{ V}$$

A 0 V/ENH (= -0,2 + 0,2), seul le dioxygène est réduit en eau.



Allure des courbes i - E

II-1c Les potentiels sont donc bien choisis :

- à l'anode, on suivra la concentration en peroxyde d'hydrogène ;
- à la cathode, la concentration en dioxygène

II-2 Etude de la réponse biologique de la cellule

II-2a L'aire du pic correspond au nombre de charges échangées au cours de l'expérience, soit le nombre de molécules ayant réagi, la réaction électrochimique étant :



On en déduit le nombre de moles d'hydroperoxyde oxydé :

$$N_{\text{H}_2\text{O}_2} = \frac{1}{4} \cdot \frac{(i_{\text{anodique}} \times t)}{1,6 \cdot 10^{-19}} = \frac{1}{4} \cdot \frac{(25 \cdot 10^{-12} \times 15)}{1,6 \cdot 10^{-19}} = 4,5 \cdot 10^8 \text{ mol}$$

II-2b La cellule continue à consommer le dioxygène alors que le stress a cessé (chute de l'intensité cathodique de 200 pA et remontée lente). En outre la quantité de dioxygène consommée est très importante puisque le courant cathodique présente une chute de 200 pA.

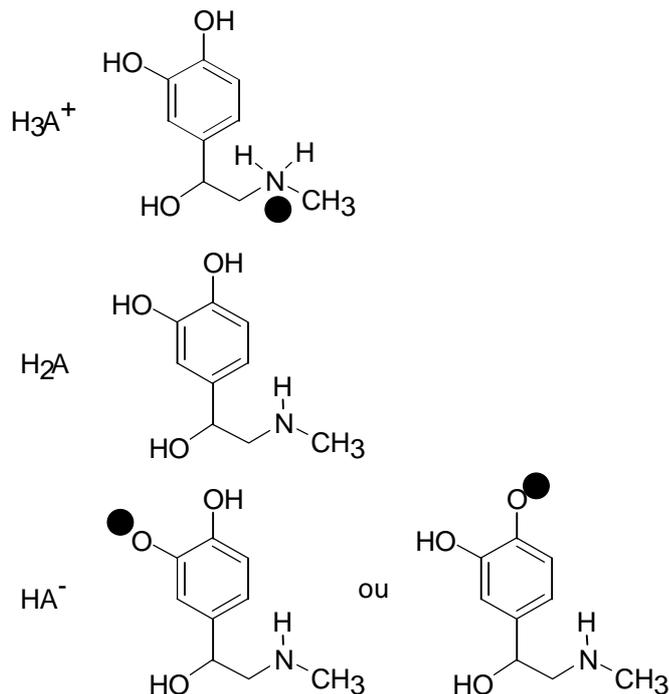
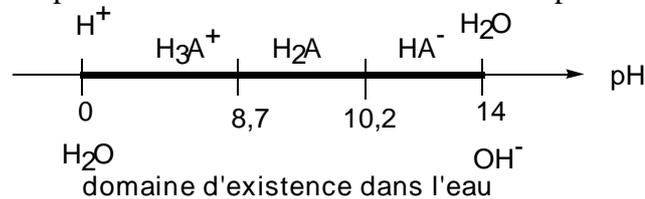
III- Etude de l'exocytose d'adrénaline

III-1 Acido-basicité de l'adrénaline

III-1a L'adrénaline présente 2 protons acides ($-\text{OH}_{\text{acide}}$ des fonctions phénol).

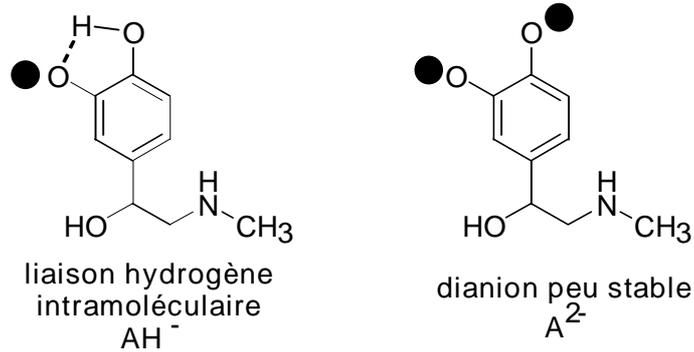
Le doublet non-liant de l'azote est basique au sens de Lewis.

III-1b Le diagramme de prédominance est selon une échelle en pH :



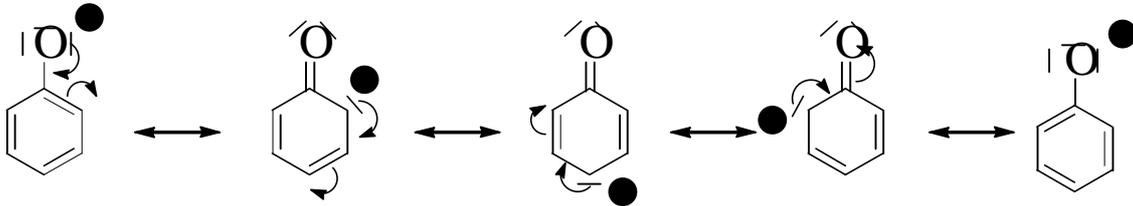
On n'observera que la première et deuxième acidité dans l'eau.

III-1c La différence entre la deuxième et troisième acidité est due à la stabilisation par liaison hydrogène intramoléculaire de AH^- , inexistante dans A^{2-} :



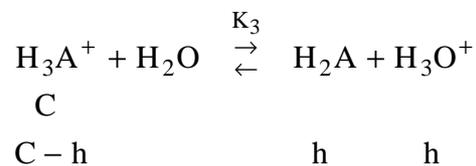
Stabilité des bases conjuguées de AH_2 et AH

A remarquer que chacune de ces espèces est stabilisée par mésomérie :



III-2 Titrage d'une solution d'adrénaline par l'hydroxyde de sodium

III-2a Supposons que la solution est acide par H_3A^+ (on néglige l'acidité de l'eau) :



Supposons que l'acide H_3A^+ est faiblement dissocié, soit :

$$[H_3A^+] \approx C = 0,1 \text{ mol} \cdot L^{-1},$$

on en déduit alors :

$$pH \approx \frac{1}{2}p(K \cdot C) \approx 4,85$$

III-2b Il n'est pas possible de titrer séparément par la soude les différentes acidités de l'adrénaline car la différence de pK est inférieure à 4.

