

Développement d'une méthode électrochimique pour l'imitation du métabolisme de composés pharmaceutiques modèles

par

Marc-André Lecours

Mémoire présentée au Département de chimie en vue
de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Avril 2017

Le 7 avril 2017

*Le jury a accepté le mémoire de monsieur Marc-André Lecours
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Pedro A. Segura
Directeur de recherche
Département de chimie

Professeure Gessie M. Brisard
Codirectrice de recherche
Département de chimie

Professeur Jean-Philippe Bellenger
Président-rapporteur
Département de chimie

Professeur Jean Lessard
Évaluateur interne
Département de chimie

SOMMAIRE

L'électrochimie (EC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) tend à devenir une technique de choix lors de l'étude et la prédiction des métabolites de différents types de substances. La possibilité de reproduire artificiellement par de l'instrumentation les étapes d'oxydation du métabolisme de médicaments est une des avenues intéressantes pour l'étude du devenir des contaminants émergents présents dans l'environnement. Avec l'utilisation de la spectrométrie de masse à haute résolution, l'étude des différents mécanismes impliqués dans la réaction électrochimique acquiert une nouvelle dimension. Le projet suivant vise à augmenter les connaissances sur les produits de transformation des composés émergents susceptibles d'être retrouvés dans l'environnement et sur les transformations électrochimiques de médicaments modèles. Une approche électrochimique avec potentiel contrôlé pour l'étude des produits de transformation de différents médicaments suivis d'une analyse par UPLC-QTOF-MS est présentée. Les résultats obtenus montrent les différentes réactions du métabolisme que le système a reproduit pour la carbamazépine, la lidocaïne, la phénacétine et le triméthoprim. Le choix de ces molécules est justifié par le fait que les produits de transformation sont bien connus. Une validation du montage expérimental est présentée avec la lidocaïne. Une application de la méthode sur le triméthoprim montre une bonne corrélation avec les métabolites rapportés de transformations biologiques par voie oxydative. Les résultats montrent le potentiel de la combinaison EC-LC-MS pour connaître rapidement les métabolites générés par les enzymes du CYP450. Une seconde approche vise plutôt à reproduire les conditions oxydantes issues des réactions avec les espèces réactives de l'oxygène. La réaction de Fenton supportée par électrochimie est appliquée sur la carbamazépine et le triméthoprim afin d'élargir la gamme de réactions réalisables par la méthode électrochimique. En utilisant l'électro-Fenton, des produits de transformation de la carbamazépine et du triméthoprim montrent des similitudes avec les produits obtenus par d'autres techniques oxydatives. La présente étude, réalisée sous la direction des Pr. Gessie M. Brisard et Pr. Pedro A. Segura, a permis de démontrer la ressemblance entre les produits issus de l'électrochimie et ceux issus de biotransformations pour la phénacétine, la lidocaïne et le triméthoprim. La méthode présentée pourrait aussi s'appliquer

à l'étude de pesticides, de nouveaux médicaments ou d'autres composés bioactifs. Pour les sciences environnementales, une prédiction rapide, par une approche EC-MS, des métabolites d'un nouveau contaminant suspecté permettrait d'obtenir une liste de composés possibles issus de transformations oxydatives, facilitant la détection lors des tests de dépistage en milieu naturel. Une partie de ces travaux a été présentée sous forme d'affiche lors de la 63^e conférence annuelle de l'American Society for Mass Spectrometry (ASMS) en juin 2015, à Saint-Louis dans le Missouri.

Mots clés : produit pharmaceutique, médicament, électrochimie, spectrométrie de masse, phénacétine, lidocaïne, triméthoprim, métabolite, électro-Fenton, temps de vol, trappe à ions, procédé d'oxydation, électrode tournante à disque et à anneau.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier les professeurs Pedro A. Segura et Gessie M. Brisard de m'avoir accordé leur confiance et permis d'amorcer un axe de recherche sur le devenir dans l'environnement de composés émergeants, soit les médicaments dans mon cas. Je les remercie de m'avoir laissé la liberté sur l'orientation du projet, pour leur disponibilité et pour leur soutien intellectuel.

Ensuite, je voudrais remercier mes collègues dans le groupe Segura pour le bon climat de travail. Je remercie également mes collègues du groupe Brisard pour leur soutien et les réflexions sur l'électrochimie. Merci d'avoir rendu le travail dans le laboratoire respectueux et agréable, de m'avoir supporté dans le bureau et pour tout l'aide reçu dans l'avancement de mon projet et de mes idées.

Je tiens aussi à remercier les différentes stagiaires qui ont fait avancer ma recherche et m'ont permis de me développer dans la transmission du savoir.

Je remercie René Gagnon, coordonnateur des laboratoires du département de chimie pour les apprentissages, les raisonnements profonds et les discussions plus légères. Je le remercie pour sa confiance quant à l'utilisation des divers appareils sous sa responsabilité. Je voudrais aussi remercier mes amis, mes parents et mes frères de m'avoir écouté, encouragé et soutenu dans la poursuite de mes études graduées.

Enfin, merci à la Faculté des sciences pour son soutien financier qui m'a permis de me concentrer sur mes études et d'aller présenter mes résultats dans un congrès d'envergure internationale (ASMS 2015) à Saint-Louis, au Missouri.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	II
REMERCIEMENTS	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
INTRODUCTION.....	11
CHAPITRE 1. NOTIONS THÉORIQUES.....	19
1.1 Électrochimie.....	19
1.1.1 Résistances	19
1.1.2 Le potentiel.....	22
1.1.3 Le courant.....	25
1.1.4 Étude sous régime diffusionnel	27
1.1.5 Étude sous régime de convection forcée	29
1.1.6 Electro-Fenton	31
1.2 Spectrométrie de masse	32
1.2.1 Ionisation par électronébulisation.....	34
1.2.2 Temps de vol	35
1.2.3 Trappe à ions linéaire	37
1.3 Description générale de XCMS.....	38
1.3.1 L'expérience	38
1.3.2 L'analyse statistique	39
CHAPITRE 2. MÉTHODE EXPÉRIMENTALE	41
2.1 Matériel.....	41
2.2 Électrochimie directe.....	41
2.2.1 Montage expérimental	41
2.2.2 Électrode de référence Ag/Ag ⁺	42
2.2.3 Étude sous régime diffusionnel	43

2.2.4 Étude en régime de conversion forcée.....	43
2.2.5 Électrochimie indirecte.....	44
2.3 Analyse LC-MS	44
2.3.1 Temps de vol	44
2.3.2 Trappe à ions	46
2.3.4 Paramètres XCMS	46
CHAPITRE 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	48
3.1 Dégradation directe.....	48
3.1.2 Lidocaïne	48
3.1.3 Triméthoprim	51
3.2 Convection forcée.....	55
3.2.1 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	55
3.2.2 Ferrocène	57
3.2.3 Phénacétine	59
3.2.4 DAP, TMT et triméthoprim	65
3.3 Dégradation indirecte	69
3.3.1 Carbamazépine	69
3.3.2 Triméthoprim	73
CONCLUSION	76
BIBLIOGRAPHIE	78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Comparaison du potentiel pour différentes électrodes de référence ⁽⁷²⁾	22
Tableau 2. Limites de potentiel de quelques solvants à 0,1 mA cm ⁻² et 25 °C classés en ordre croissant de la constante diélectrique ϵ (avec 100 mM TBAP sur une électrode de platine) ⁽⁶⁶⁾	23
Tableau 3. Limites de potentiel de quelques anions et cations d'électrolyte support ⁽⁶⁶⁾	24
Tableau 4. Caractéristiques des différents analyseurs de masse ⁽⁸³⁾	34
Tableau 5. Électrodes de travail utilisées en régime diffusionnel.	43
Tableau 6. Électrodes de travail utilisées en régime de convection forcée	43
Tableau 7. Paramètres de chromatographie utilisés pour la phénacétine et l'acétaminophène.	45
Tableau 8. Paramètres de chromatographie utilisés pour la lidocaïne et le triméthoprim.	45
Tableau 9. Paramètres XCMS utilisés lors de la dégradation indirecte par électro-Fenton.	47
Tableau 10. Fragmentation du PO307 sous 30 eV.	53
Tableau 11. Résultats de l'analyse différentielle effectuée avec XCMS-online.	70
Tableau 12. Fragmentation de BQM sous 30 eV par UHPLC-QqTOFMS.	72
Tableau 13. Mesures en masse exacte de triméthoprim et de ses deux produits d'oxydation d'intérêt, PO307 et PO325, par UHPLC-QqTOFMS sous 30 eV.	75

LISTE DES FIGURES

Figure 1. La composition du voltage dans une cellule électrochimique ⁽⁶⁶⁾	19
Figure 2. Mécanisme typique d'un transfert électronique à la surface de l'électrode ⁽⁶⁶⁾	21
Figure 3. Diagramme d'énergie d'une espèce électroactive qui subit une réduction ⁽⁶⁹⁾	26
Figure 4. Quelques types de voltampérogrammes modélisés selon le mécanisme à l'électrode : (A) réaction électrochimique réversible E, (B) réaction électrochimique irréversible E et (C) réaction électrochimique réversible couplée à une réaction chimique EC.....	28
Figure 5. Mode de transport à l'électrode: (a) transport par diffusion et (b) transport par convection forcée.....	30
Figure 6. Comparaison de la spectrométrie de masse avec la spectrophotométrie.	33
Figure 7. Vue schématisée d'une source ESI et du principe d'ionisation en mode positif ⁽⁸⁵⁾	35
Figure 8. Vue schématisée d'un spectromètre de masse de type quadripôle-temps de vol utilisé lors des expériences de masse exacte.	36
Figure 9. La trappe à ions utilisée lors des expériences de MS ⁿ (le deuxième détecteur est caché derrière la section centrale).....	38
Figure 10. La cellule électrochimique pour les études sous régime diffusionnel.....	42
Figure 11. Voltampérométrie cyclique de la lidocaïne sur électrode d'or de 2 mm de diamètre dans ACN:H ₂ O (99:1) + 100 mM TBAP (100 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.	48
Figure 12. Spectre de masse montrant la lidocaïne- <i>N</i> -déséthyle (Δm : 1,0 mDa).	49
Figure 13. Spectre de masse montrant le lidocaïne- <i>N</i> -oxyde (Δm : 0,9 mDa).	50
Figure 14. Réactions expliquant la formation des différents produits de la lidocaïne.	50
Figure 15. Chromatogramme des ions extraits, obtenu par UHPLC-QqTOFMS en mode ESI positif, après une heure d'électrolyse.	51
Figure 16. Voltampérométrie cyclique du triméthoprim sur électrode de carbone vitreux de 2 mm de diamètre dans ACN:H ₂ O (99:1) + 100 mM TBAP (50 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.....	52
Figure 17. Mécanisme de fragmentation MS-MS du α -hydroxytriméthoprim.....	54

Figure 18. Proposition de mécanisme d'oxydation du triméthoprim pour la formation de l' α -hydroxytriméthoprim.	54
Figure 19. Voltampérométrie cyclique du $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ sur électrode disque-anneau (disque de platine de 5 mm de diamètre) dans l'eau et 100 mM KNO_3 (10 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés. L'anneau de platine est maintenu à un potentiel constant de 0 V vs ECS.	56
Figure 20. Relation de Levich, entre 400 et 2500 RPM, pour le ferricyanure 1 mM dans l'eau et 100 mM KNO_3	57
Figure 21. Voltampérométrie cyclique à 450 RPM du ferrocène sur électrode disque-anneau (disque de platine de 5 mm de diamètre) dans $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ (99:1) + 100 mM TBAP (20 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés. L'anneau de platine est maintenu à un potentiel constant de -100 mV vs Ag/Ag^+	58
Figure 22. Mécanisme d'oxydation de la phénacétine, adapté de Nouri-Nigjeh et al. ⁽⁴⁹⁾	59
Figure 23. Voltampérométrie cyclique à 2500 RPM de la phénacétine sur électrode disque-anneau (disque de platine de 5 mm de diamètre) dans $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ (99:1) + 100 mM TBAP (50 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.	60
Figure 24. Voltampérométrie cyclique à 2500 RPM de la phénacétine sur électrode disque (5 mm de diamètre)-anneau (maintenue à un potentiel de 500 mV) dans $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ (99:1) + 100 mM TBAP (50 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés : capture de l'espèce oxydée à l'anneau.	61
Figure 25. Voltampérométrie cyclique à 2500 RPM de l'acétaminophène sur électrode disque-anneau (disque de platine de 5 mm de diamètre) dans $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ (99:1) + 100 mM TBAP (50 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.	61
Figure 26. Voltampérométrie cyclique à 2500 RPM de l'acétaminophène sur électrode disque (5 mm de diamètre)-anneau (maintenue à un potentiel de 300 mV) dans $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ (99:1) + 100 mM TBAP (50 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés : capture de l'espèce oxydée à l'anneau.	62
Figure 27. Schéma conceptuel des expériences. À gauche, l'expérience d'électrolyse: la phénacétine (■) donne l'acétaminophène (▼) via l'intermédiaire (●) qui subit une	

hydrolyse (▲). À droite, l'expérience de capture: la phénacétine (■) est oxydée au disque et l'intermédiaire (●) formé est réduit à l'anneau pour redonner la phénacétine (■).....	63
Figure 28. Chromatogramme de la phénacétine (RT 5,0) et son produit d'oxydation (RT 2,0).....	64
Figure 29. Spectre de masse obtenu avec le QqTOFMS montrant l'acétaminophène.	64
Figure 30. Voltampérométrie cyclique à 900 RPM du triméthoprimine sur le disque de carbone vitreux de 5 mm de diamètre dans ACN:H ₂ O (99:1) + 100 mM TBAP (50 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.	66
Figure 31. Photos montrant l'électrode avant et après l'électrolyse à 2500 mV vs Ag/Ag ⁺	66
Figure 32. 2,4-Diaminopyrimidine (DAP), triméthoprimine (TMP) et 3,4,5-triméthoxytoluène (TMT).	67
Figure 33. Voltampérométrie cyclique à 900 RPM de TMP, TMT et DAP sur le disque de carbone vitreux de 5 mm dans ACN:H ₂ O (99:1) + 100 mM TBAP (100 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.	67
Figure 34. Voltampérométrie cyclique à 900 RPM de TMP, TMT et DAP sur le disque de carbone vitreux de 5 mm dans ACN + 100 mM TBAP (100 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.....	68
Figure 35. Chromatogramme de l'ion extrait à m/z 253,0972 ± 0,005. Les pics correspondent aux différents isomères possibles de l'hydroxycarbamazépine.....	71
Figure 36. Chromatogramme du pic de base (BPC) de la carbamazépine après l'électro-Fenton.	71
Figure 37. Cinétique de dégradation de triméthoprimine de la réaction électro-Fenton.	73
Figure 38. Cinétique des produits issus de la réaction électro-Fenton sur le triméthoprimine....	74

INTRODUCTION

L'ère moderne se veut celle où la qualité de vie a le plus augmenté, ce qui se traduit par une espérance de vie accrue pour une majorité de la population. Cette population vieillissante a pour effet d'augmenter la demande et l'utilisation de produits pharmaceutiques de tous genres ^(1, 2). Suite à l'élimination de ces composés du corps humain, ils se retrouvent dans les systèmes de traitement des eaux usées. Or, ces systèmes ne sont pas conçus pour le traitement de ces molécules bioactives qui peuvent avoir des effets indésirables sur les populations de biote aquatique exposées ^(3, 4). Dans les normes de qualité de l'eau potable du Québec, les lois et règlements mentionnent certains pesticides comme le métolachlore et la simazine, mais les médicaments ou les produits de transformation apparaissant après les usines de traitement des eaux usées sont omis ⁽⁵⁾. Par conséquent, ces molécules pharmaceutiques entrent dans la classe des contaminants organiques émergents d'intérêt. Le terme émergent regroupe aussi les produits de soin personnel ⁽⁶⁾.

Les médicaments peuvent être séparés en différentes catégories selon les affections pour lesquelles ils sont utilisés. Les analgésiques sont couramment utilisés pour soigner la douleur présente dans presque toutes les maladies. L'acétaminophène et l'aspirine sont des analgésiques non narcotiques d'usage commun alors que la codéine et la morphine sont des narcotiques, puisqu'ils peuvent engendrer une dépendance. L'ibuprofène, le kétoprofène et le naproxène sont des anti-inflammatoires non stéroïdiens couramment employés ⁽⁷⁾. Les antibiotiques, dont l'amoxicilline et la pénicilline, sont une autre classe de médicaments couramment employés pour soigner différentes infections. Le triméthoprim (TMP) en conjonction avec le sulfaméthoxazole est utilisé pour soigner les infections urinaires dans toutes les populations, car son coût est faible et il est bien toléré ⁽⁸⁾. Pour les maladies cardiovasculaires, les médicaments contre l'hypertension permettent de diminuer la haute pression sanguine ⁽⁹⁾. Les stimulants du système nerveux central incluent la caféine, mais aussi d'autres composés de la famille des amphétamines prescrits pour contrer les troubles du déficit d'attention. Les hormones et autres estrogènes ont un impact important sur les communautés exposées, dû aux rôles dans la

différenciation des sexes ⁽¹⁰⁾ et les produits de cette classe ont été détectés après le traitement d'ozonation ⁽¹¹⁾. Un médicament contre l'épilepsie, la carbamazépine (CBZ), montre une présence importante dans divers milieux aquatiques à cause de la stabilité chimique du composé et de ses produits de transformation ⁽¹²⁾. Au niveau local, plusieurs produits de ces classes de médicaments ont été détectés dans la rivière Yamaska, dans le sud du Québec ⁽¹³⁾.

Lorsqu'un médicament est ingéré oralement par un humain, il va passer par l'estomac et se rendre au foie. Les cellules épithéliales contiennent une famille d'enzymes, appelée cytochrome P450, qui catalysent une grande variété de réactions et participent activement au métabolisme. En vue de l'élimination, les produits pharmaceutiques sont alors convertis en produits potentiellement réactifs ou dans le cas idéal, en produits moins toxiques. La phase I du métabolisme s'opère principalement par ces enzymes P450 et comprend principalement des réactions d'oxydation ⁽¹⁴⁾. Les réactions majeures impliquent l'hydroxylation de carbone, l'oxygénation d'hétéroatome ou la désalkylation d'hétéroatome. Le centre actif des enzymes du cytochrome P450 comporte un atome de fer au centre d'une porphyrine. L'amorce de la réaction est le transfert d'électron ou l'abstraction d'un proton par le centre actif de l'enzyme ⁽¹⁵⁾. Au début, ce centre actif contient du Fe(III) qui est réduit en Fe(II) par une réductase. Suit une cascade de réactions impliquant la réduction du dioxygène avec la formation d'un intermédiaire Fe(III)O-O radicalaire, qui est réduit (1 électron) par une réductase en Fe(III)O-O anion. L'abstraction de deux protons se fait par cette espèce avec une réaction d'oxydo-réduction (2 électrons) donnant de l'eau et Fe(IV)=O. Cette espèce oxyde (2 électrons) une liaison R-H en R-OH en redonnant du Fe(III). La phase II est la conjugaison, avec le glutathion (GSH) par exemple, des métabolites issus de la phase I ou du médicament lui-même, pour permettre le transport et l'élimination. L'acide glucuronique (glu) ressemble à un sucre et peut aussi se lier aux métabolites de phase I. De manière générale, les médicaments ont un caractère hydrophobe, afin de traverser les parois lipidiques des cellules. Les métabolismes de phase I et II ont pour effet de les rendre plus polaires. De plus, les cellules produisent constamment des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme sous-produits de l'activité métabolique ⁽¹⁶⁾. Ces ROS sont hautement réactives et agissent comme espèces électrophiles ou

agents oxydants. Les radicaux ou les molécules pro-oxydantes les plus importantes sont le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), l'hydroxyle radicalaire ($OH^{\bullet}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et certains oxydes d'azote, comme l'oxyde nitrique (NO) et le peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$)⁽¹⁷⁾. Les ROS sont susceptibles de participer aux transformations des médicaments, autant dans le milieu cellulaire et de manière plus générale au niveau de l'environnement par dégradation bactérienne ou par réaction photochimique avec la lumière du soleil.

L'étude du devenir des molécules au niveau de l'environnement, en ce qui a trait à leurs produits de dégradation et par le fait même, à leur persistance, est une des raisons qui motive le développement de méthodes de caractérisation rapides et efficaces. Certains composés subissent des transformations chimiques et biologiques une fois relargués dans le milieu naturel⁽¹⁸⁾. Il peut s'agir de réactions d'hydrolyse, de conversions microbiennes et de réactions catalysées par la lumière. Pour les contaminants émergents, il y a souvent très peu d'informations sur ce comportement environnemental qui permettent de bien comprendre les risques potentiels. La méthode classique consiste à extraire les produits de dégradation provenant de l'humain, *in vivo*, ou d'extraits cellulaires renfermant les enzymes du CYP450, *in vitro*^(19, 20). Cela nécessite une préparation de l'échantillon afin de retirer des composés inintéressants et d'en réduire la complexité au niveau de l'interprétation des résultats⁽²¹⁾. Une telle préparation est laborieuse. De plus, les produits de dégradation peuvent être présents à une faible concentration, rendant plus difficile le travail d'identification et de caractérisation⁽²²⁾. Les adduits formés à partir d'espèces générées électrochimiquement permettent d'obtenir les métabolites de phase II⁽²³⁾. L'électrochimie peut être employée pour la détection de différents médicaments⁽²⁴⁾, mais la spectrométrie de masse à haute résolution offre plus d'avantages en matière d'identification et de spécificité⁽²⁵⁾. Puisque la voie de dégradation par oxydation est importante aux niveaux microbien, humain et environnemental, le couplage EC-MS est une alternative permettant d'obtenir des produits de transformation par voie oxydative dans des solutions plus simples^(26, 27, 28, 29), facilitant l'interprétation et l'élucidation des structures chimiques⁽³⁰⁾.

Cette technique d'analyse, précédée d'une séparation des constituants de la solution par chromatographie liquide (LC), est populaire et s'inscrit dans une tendance généralisée pour la résolution de mélanges complexes. D'un point de vue purement analytique, la détection basée sur la spectrométrie de masse offre plus d'informations sur l'analyte que l'électrochimie. La quantification est basée sur l'intégration du signal de masse plutôt que sur la mesure d'un courant électrique. Lorsque couplé à un système de LC, l'instabilité de la ligne de base d'un détecteur électrochimique, due aux changements dans la composition du solvant, est évitée par l'utilisation du signal du spectromètre de masse ⁽³¹⁾. Plusieurs configurations instrumentales permettent le couplage des deux techniques ⁽³²⁾. La cellule électrochimique est placée avant le spectromètre de masse; le contenu de la cellule est pompé en continu pour être infusé dans la source. L'insertion d'une étape de chromatographie liquide permet la séparation des divers constituants de la cellule EC. La cellule est intégrée dans le système, soit entre l'injecteur et la colonne, soit entre la colonne et le détecteur. L'utilisation du détecteur UV-VIS avant la détection par spectrométrie de masse est possible dans les deux cas. Sans entrer dans les détails, le détecteur UV-VIS est utile pour la quantification et la détection de composés qui absorbent ce type de radiation électromagnétique et ne s'ionisant pas dans les conditions de la source. Le cas le plus simple est l'utilisation d'une cellule EC seule, son contenu étant prélevé et injecté dans un système LC puis détecté dans un spectromètre de masse. Bien que l'électrochimie soit souvent employée pour générer les métabolites, la combinaison des deux modes de détection permet d'élargir la gamme de concentrations d'une seule et même méthode analytique, avec la spectrométrie de masse pour les plus petites concentrations et le signal EC pour les plus grandes ⁽³³⁾.

Par sa prévalence dans l'environnement et par la stabilité de ses produits de transformation, la carbamazépine (CBZ) est un médicament étudié de façon extensive. Des études, utilisant la spectrométrie de masse, ont montré sa résistance au traitement d'ozonation dans les stations d'épuration et les produits de transformation sont retrouvés après traitement ⁽³⁴⁾. L'utilisation de la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) et d'expériences de fragmentation en série (MSⁿ) a permis l'élucidation de structure de ces produits ⁽³⁵⁾. Des études ont démontré que les

effets thérapeutiques nécessitent une bioactivation par les enzymes du cytochrome P450 ^(36, 37) afin de former l'époxyde et l'hydroxyle. Certaines techniques, comme l'utilisation de métalloporphyrines ⁽³⁸⁾ ou l'électrochimie ^(39, 40), permettent de préparer les métabolites de médicaments. Pour la CBZ, l'électrochimie peut aussi être employée comme méthode de détection du médicament et de ses métabolites ⁽⁴¹⁾. Une comparaison entre les produits d'oxydation issus de l'électrochimie et ceux obtenus suite à une dégradation par un champignon a aussi montré des voies de dégradation similaire entre les deux méthodes ⁽⁴²⁾. Les produits obtenus par électrochimie à partir de CBZ ont aussi été utilisés dans des tests d'évaluation de la toxicité ⁽⁴³⁾. L'utilisation de la réaction de Fenton, par voie chimique, a aussi montré une dégradation supérieure de la carbamazépine par rapport à une approche microbienne ⁽⁴⁴⁾.

L'acétaminophène, alias le Tylenol, est un analgésique utilisé à grande échelle par des populations de tous âges. C'est un médicament sécuritaire, mais qui peut causer des dommages au foie s'il y a surdose. Son métabolite *N*-hydroxyacétaminophène a démontré être plus toxique que l'acétaminophène même ⁽⁴⁵⁾. Mais dans le milieu physiologique, il est oxydé en *N*-acétyl-*p*-quinoneimine (NAPQI) qui est elle aussi toxique. L'utilisation de la chromatographie liquide couplée à un détecteur électrochimique a montré qu'il était possible d'obtenir la NAPQI, composé autrement difficile à isoler dans les expériences *in vivo* ⁽⁴⁶⁾. L'acétaminophène a remplacé la phénacétine, un autre analgésique qui était plus populaire. La surconsommation de phénacétine a démontré une toxicité élevée pour le rein et peut causer des tumeurs, ce qui a conduit à son remplacement par l'acétaminophène comme analgésique populaire. L'acétaminophène est le métabolite de la phénacétine dans une des voies de dégradation, l'autre voie étant associée à son effet toxique ⁽⁴⁷⁾. Plus récemment, des expériences d'électrochimie couplée à la spectrométrie de masse ont montré les produits issus du métabolisme et la formation d'adduits avec GSH ⁽⁴⁸⁾. La synthèse de l'acétaminophène peut être effectuée à partir de la phénacétine en utilisant une électrolyse pulsée ⁽⁴⁹⁾.

Le même groupe de recherche a produit par électrochimie plusieurs métabolites de la lidocaïne, un médicament utilisé contre l'arythmie cardiaque ou comme analgésique topique. Il a été

démontré que la réaction de la lidocaïne avec le peroxyde d'hydrogène généré électrochimiquement donne la lidocaïne-*N*-oxyde et que son oxydation à l'électrode génère la lidocaïne-*N*-déséthyle⁽⁵⁰⁾. Ces réactions seront utilisées pour valider la méthode et le montage expérimental au sein de notre laboratoire. L'utilisation d'une électrolyse pulsée a montré une dépendance des produits formés en fonction du temps de pulse utilisé⁽⁵¹⁾. Les métabolites hydroxylés de la lidocaïne ont été synthétisés en remplaçant l'eau par du peroxyde d'hydrogène⁽⁵²⁾.

Le triméthoprim (TMP) est un médicament antimicrobien utilisé pour le traitement d'infection des muqueuses et de la peau, en combinaison avec le sulfaméthoxazole. Au niveau pédiatrique, cette combinaison est largement utilisée pour guérir les infections urinaires⁽⁵³⁾ à faible coût⁽⁵⁴⁾. Des expériences *in vivo* chez l'enfant ont montré différents métabolites de phase I comme l' α -hydroxytriméthoprim, le 3-desméthyltriméthoprim et le 4-desméthyltriméthoprim ainsi que le 1-NO-TMP ou 3-NO-TMP résultant de l'oxydation de l'atome d'azote du cycle pyrimidine⁽⁸⁾. Une dégradation résultant du métabolisme oxydatif de bactérie nitrifiante a aussi permis d'observer l' α -hydroxytriméthoprim ainsi qu'un composé comptant deux atomes d'oxygène et d'hydrogène supplémentaires avec un m/z de 324, jamais rapporté auparavant⁽⁵⁵⁾. Par une étude en ligne couplant l'électrochimie à la spectrométrie de masse, un adduit avec le glutathion a été observé⁽⁵⁶⁾. Une méthode de détection par ampérométrie pulsée utilise une électrode de diamant dopée au bore pour détecter simultanément le triméthoprim et d'autres médicaments⁽⁵⁷⁾. Une électrode de carbone vitreux modifiée avec une porphyrine de manganèse a montré l'oxydation à 4 électrons du triméthoprim pour former un dérivé nitroso, en milieu aqueux⁽⁵⁸⁾. La minéralisation d'effluents de l'industrie pharmaceutique faisant intervenir l'électro-Fenton et un traitement par boue activée a montré une dégradation du triméthoprim en divers produits⁽⁵⁹⁾.

Dans le même ordre d'idée, l'électro-Fenton montre une minéralisation en CO₂ accrue des effluents des usines d'épuration des eaux usées par rapport à des techniques plus répandues comme le traitement par boue activée⁽⁶⁰⁾. Puisque l'électron est le réactif de la réaction, c'est

une méthode de dégradation qui a un côté vert vis-à-vis de l'environnement. Les réactifs de la réaction Fenton sont générés *in situ*, ce qui enlève le besoin de transporter et d'emmagasiner des réactifs comme le peroxyde d'hydrogène. Cette technique a montré une diminution du carbone organique totale de plus de 90% pour l'herbicide 2,4-D dans les eaux usées ⁽⁶¹⁾. L'espèce oxydante responsable, l'hydroxyle radicalaire, est plus oxydante que l'ozone et seulement le fluor gazeux le dépasse en termes de pouvoir oxydant ⁽⁶²⁾. L'hydroxyle radicalaire est aussi formé à la surface du diamant dopé en bore (BDD) et peut être combiné à la technique d'ozonation afin de traiter des effluents industriels. Pour l'oxydation électrochimique sur BDD, l'hydroxyle radicalaire a montré une diminution du carbone organique totale (COD) de 99.9% alors que l'ozonation ne le réduit que de 45% ⁽⁶³⁾. En combinant les deux techniques, la réduction totale est achevée en deux fois moins de temps, ce qui montre le potentiel de ce type de traitement.

L'étude des métabolites de différents types de substances n'est qu'une des nombreuses raisons qui motivent le développement de méthodes électrochimiques couplées à la spectrométrie de masse. En étant mieux informé des produits de transformation, il y aurait un meilleur suivi de la qualité des cours d'eau servant à alimenter les villes en eau potable et ce développement pourrait mener à une nouvelle réglementation. Puisque les traitements d'oxydation conventionnels se révèlent moins efficaces que les techniques électrochimiques mentionnées précédemment, il serait important d'éliminer les contaminants à la source. En utilisant un système en ligne d'électrochimie couplé à la spectrométrie de masse, les résultats sont plus faciles et rapides à obtenir, de sorte qu'une liste des métabolites ou contaminants potentiels est obtenue. Les champs d'application actuels ne sont pas limités à la métabolomique et incluent la lipidomique, la protéomique et la génomique ⁽⁶⁴⁾.

La présente étude, réalisée sous la direction des Pre. Gessie M. Brisard et Pr. Pedro A. Segura, a permis de démontrer le mimétisme de biotransformation de la phénacétine, de la lidocaïne et du triméthoprim. Une approche électrochimique avec potentiel contrôlé suivie d'une analyse par UPLC-QTOF-MS est présentée. Les résultats montrent le potentiel de la combinaison EC-

LC-MS pour connaître les métabolites générés par les enzymes du CYP450. Une seconde approche vise plutôt à reproduire les conditions oxydantes issues de réactions avec les espèces réactives de l'oxygène. En utilisant la réaction de Fenton assistée par électrochimie, des produits de transformation de la carbamazépine et du triméthoprimé montrent des ressemblances avec les produits obtenus par d'autres techniques oxydatives. La méthode présentée pourrait aussi s'appliquer à l'étude de pesticides ⁽⁶⁵⁾, de nouveaux médicaments ou d'autres composés bioactifs. Pour les sciences environnementales, une prédiction rapide des métabolites d'un nouveau contaminant suspecté, par une approche EC-MS, permettrait d'obtenir une liste de composés possibles issus de transformations oxydatives, facilitant la détection lors des tests de dépistage en milieu naturel.

CHAPITRE 1. NOTIONS THÉORIQUES

1.1 Électrochimie

1.1.1 Résistances

Le passage du courant dans une cellule électrochimique s'apparente à celui traversant une résistance dans un circuit électrique conventionnel et est régi par la loi d'Ohm qui relie de façon proportionnelle le potentiel au courant et à la résistance. La figure 1 montre les différentes composantes de la chute ohmique au sein du montage électrochimique. Au niveau du montage expérimental, toutes les composantes et les branchements du circuit engendrent une résistance. La source de tension utilisée, le potentiostat, est conçue pour minimiser les résistances internes. Le matériau d'électrode peut influencer le passage du courant dans le circuit. Les matériaux métalliques comme l'or, le platine, l'argent, le palladium, le titane ou le cuivre sont tous des conducteurs et n'auront pas un impact aussi significatif sur la résistance totale de la cellule. L'impact principal intervient entre les électrodes et est défini par le médium utilisé, c'est la chute ohmique liée aux conducteurs ioniques.

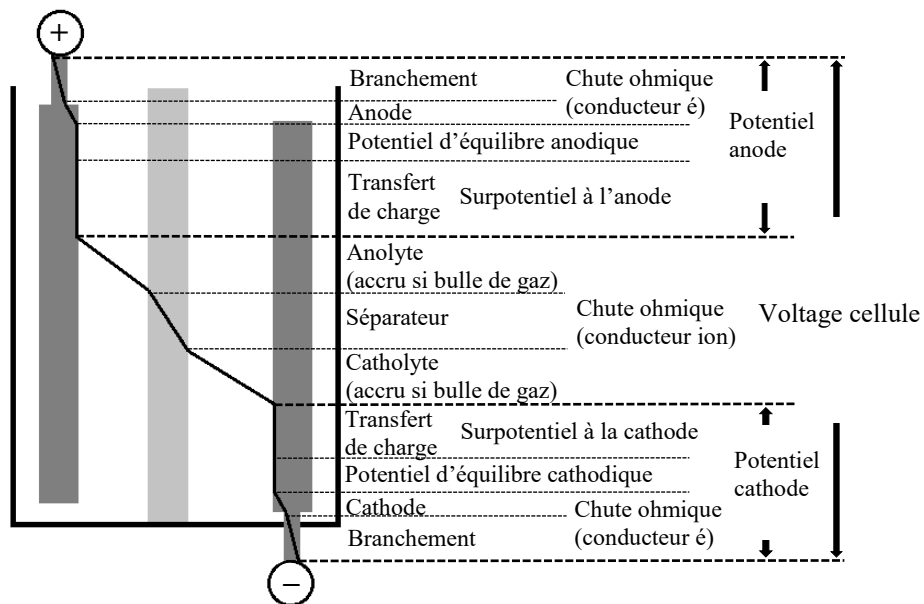


Figure 1. La composition du voltage dans une cellule électrochimique ⁽⁶⁶⁾.

Le solvant qui n'est pas assez conducteur nécessite l'addition d'électrolytes supplémentaires pour assurer une migration suffisante des espèces chargées en solution. En effet, pour que le courant circule dans un circuit, celui-ci doit être fermé pour former une boucle. Les électrons circulent au sein des conducteurs, mais en solution, c'est la migration des espèces chargées entre les électrodes, en suivant les lignes du champ électrique, qui provoque le passage du courant et permet de fermer le circuit. Par convention, la cathode est le siège de la réduction et se voit attribuer la charge négative; à l'anode s'opère l'oxydation et par convention la charge y est positive. En contrôlant le potentiel, ou la densité de courant, à la surface d'une seule des électrodes, la seconde acquiert la même valeur de potentiel, mais de polarité inverse.

Dans un système idéal comportant deux plaques parallèles, chacune ayant le même potentiel appliqué mais de polarité inverse, les lignes du champ électrique sont perpendiculaires à la surface et vont de l'anode vers la cathode. Dans le catholyte, le cation de l'électrolyte, chargé positivement, migre vers la cathode et, dans l'anolyte, l'anion, chargé négativement, migre vers l'anode. La viscosité du milieu va ralentir la migration, et induira une résistance supplémentaire qui peut parfois être compensée en augmentant la concentration en électrolytes ou la température. L'utilisation d'une membrane ou d'un pont salin, pour séparer les électrodes, augmente aussi la résistance au transfert de masse de même que toutes convections supplémentaires comme celle provoquée par le bullage d'un gaz en solution. De plus, la distance entre les électrodes ainsi que leur disposition dans l'espace peut jouer un rôle supplémentaire. La géométrie du système peut être optimisée afin de favoriser certaines applications. Si l'un s'intéresse à comprendre le comportement électrochimique à la surface de l'électrode, il faut limiter la convection au seul mouvement des espèces chargées sous l'influence du champ électrique. Si la conversion complète et rapide d'une espèce chimique est visée, l'utilisation d'électrode comportant une grande aire en plus d'une agitation forcée de la solution est à prévoir. Afin de réaliser des expériences de qualité, il est essentiel de minimiser les différentes composantes de la chute ohmique liée aux conducteurs ioniques. L'autre grande composante de la résistance est le processus électrochimique en jeu à la surface même de l'électrode. Cette résistance de transfert électronique dépend de la réaction elle-même et peut parfois dépendre du

matériau d'électrode employé. Certaines réactions électrochimiques nécessitent une adsorption à la surface du métal qui confère un alignement particulier au niveau moléculaire. Certains métaux ont un réseau cristallin qui favorise cet alignement et qui facilite le transfert de charge, ce qui réduit le surpotentiel qu'il est nécessaire d'appliquer pour que la réaction électrochimique ait lieu. En solution, au voisinage de l'électrode existe un champ électrique assez fort pour maintenir en place des couches successives d'anions et de cations, définies comme étant la couche de diffusion. L'agitation de la solution peut diminuer la distance qu'occupe cette couche, mais il existe toujours un mince film près de la surface de l'électrode qui demeure fixe. Le seul mode de transport dans la couche de Nernst est la diffusion sous l'effet du champ électrique. Le potentiel augmente dans cette couche en s'approchant de la surface de l'électrode ⁽⁶⁷⁾. Pour une molécule organique comportant des hétéroatomes et qui pénètre dans cette zone, l'effet du champ électrique est tel qu'un dipôle est généré au sein de la molécule. À proximité de la surface, il y a le transfert d'électron entre l'électrode et la molécule qui peut être réversible ou non.

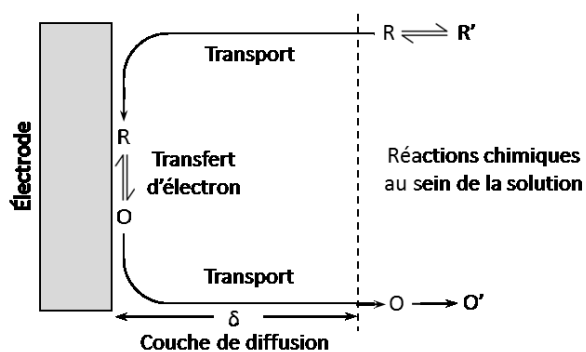


Figure 2. Mécanisme typique d'un transfert électronique à la surface de l'électrode ⁽⁶⁶⁾.

Comme le montre la figure 2, une espèce neutre sous sa forme réduite arrive du sein de la solution et entre dans la couche de diffusion. Après le transfert d'électron, elle quitte la couche de diffusion sous une forme oxydée qui peut ensuite réagir de nouveau au sein de la solution pour donner une autre espèce. Les processus impliqués dépendent du choix des solvants, du pH

⁽⁶⁸⁾, des électrolytes supports, du matériau d'électrode, de la température et du mode de transport au sein de la solution.

1.1.2 Le potentiel

Le potentiel appliqué à l'électrode de travail provient d'une source de tension. Pour obtenir une lecture juste du potentiel dans le système, il est nécessaire d'utiliser une troisième électrode qui sert de référence. Cette électrode a la particularité d'avoir sa propre réaction électrochimique réversible qui n'entre pas en jeu dans la réaction investiguée à l'électrode de travail. Le tableau 1 montre différentes électrodes de référence qui existent pour différentes applications. Dans un milieu aqueux, l'électrode à calomel saturé ou celle avec le couple Ag/AgCl sont souvent employées. Dans un milieu organique, l'utilisation d'une électrode Ag/Ag⁺ dans l'acétonitrile est privilégiée ainsi que l'utilisation d'une référence externe en effectuant la mesure du potentiel d'oxydation du couple ferrocène/ferrocénium ^(70, 71).

Tableau 1. Comparaison du potentiel pour différentes électrodes de référence ⁽⁷²⁾.

Électrode de référence	Abréviation	E vs ECS
Calomel saturé, KCl sat.	ECS	0
Argent/Chlorure d'argent, KCl sat.	Ag/AgCl	-0,047
Mercure/Sulfate mercurieux, K ₂ SO ₄ sat.	Hg/Hg ₂ SO ₄	0,41
Argent/Nitrate d'argent (10 mM), acétonitrile	Ag/Ag ⁺	0,3
Argent/Nitrate d'argent (100 mM), acétonitrile	Ag/Ag ⁺	0,36

Les limites de potentiel du système électrochimique sont influencées par le choix des solvants et des électrolytes supports ⁽⁷³⁾, mais pas par le choix de l'électrode de référence. Celle-ci change les valeurs de potentiel proprement dites, mais la plage de potentiel accessible par le système investigué demeure la même. Le tableau 1 montre que la concentration en ion argent influence le potentiel. Pour une solution dix fois plus concentrée, le potentiel augmente d'une valeur de 60 mV. Selon IUPAC, il est recommandé d'utiliser la même solution que celle du système

investigué, soit le même solvant et les mêmes électrolytes supports ⁽⁷¹⁾. Le tableau 2 classe différents solvants en fonction de la constante diélectrique et montre les limites de potentiel cathodique et anodique. Il n'y a pas de corrélation apparente entre les deux paramètres, les solvants présentant les limites de potentiel les plus étendues sont à privilégier afin d'augmenter la plage de potentiel accessible pour étudier le comportement de la molécule. Un choix judicieux du solvant pour certaines applications particulières est à prévoir. Par exemple, le caractère nucléophile du méthanol est exploité lors de réactions d'alkoxylation. La constante diélectrique influence la résistance ohmique du système, plus elle est grande, meilleure est la dissociation des électrolytes.

Tableau 2. Limites de potentiel de quelques solvants à 0,1 mA cm⁻² et 25 °C classés en ordre croissant de la constante diélectrique ϵ (avec 100 mM TBAP sur une électrode de platine) ⁽⁶⁶⁾.

Solvant	Abréviation	ϵ	Limite de potentiel (V)	
			Cathodique	Anodique
1,2-Diméthoxyéthane	-	3,5	-3,0	+0,7
Acide acétique (glacial)	HAc	6,2	-1,7	+2,0
Tétrahydrofurane	THF	7,6	-3,3	+2,1
Dichlorométhane	DCM	9,1	-1,7	+1,8
Pyridine	Py	12	-2,2	+3,3
Acétone	-	21	-1,6	+1,6
Acide hexaméthylphosphorique triamide	HMPA	30	-3,3	+1,1
Méthanol	MeOH	31,5	-2,2	+1,3
N-Méthylpyrrolidone	NMP	32	-3,3	+1,4
Nitrométhane	-	35,7	-2,4	+3,0
Acétonitrile	ACN	36,2	-2,6	+2,7
N,N-Diméthylformamide	DMF	36,7	-2,7	+1,5
N,N-Diméthylacetamide	DMA	38	-2,6	+1,3
Sulfolane	-	44	-2,3	+3,3
Diméthylsulfoxyde	DMSO	46,6	-2,7	+1,3
Propylènedicarbonate	PC	65,2	-1,9	+1,7
Eau	-	80	-2,9	+1,4
Acide sulfurique (85-96% wt)	-	100	-1,0	+2,1
Tétrahexylammoniumbenzoate	-	-	-1,2	+0,3
AlCl ₃ /NaCl/KCl (fondu à 150 °C)	-	-	-1,9	+1,0

Les solvants avec une petite constante diélectrique ($\epsilon < 13$) nécessitent une plus grande concentration en sels afin d'avoir une conductivité appréciable car les sels y sont mal dissociés. Afin de limiter les risques pour la santé associés à l'usage prolongé de certains solvants, la toxicité est aussi prise en compte. Les solvants présentant la plage de potentiel la plus grande sont dans l'ordre : sulfolane (5,6 V), pyridine (5,5 V), nitrométhane (5,4 V), tétrahydrofurane (5,3 V) et acétonitrile (5,3 V). Du lot, l'acétonitrile est le moins toxique et présente un potentiel anodique parmi les plus élevés de la liste. De plus, son utilisation courante dans les systèmes de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse assure sa compatibilité avec la méthode d'analyse privilégiée. La plage de potentiel accessible par le système est limitée par la première réaction électrochimique d'un des constituants du système, soit les matériaux d'électrodes, le solvant, les ions ou les gaz dissous en solution comme l'oxygène. Le tableau 3 montre les potentiels des réactions d'oxydation et de réduction pour une série d'anions et de cations, respectivement.

Tableau 3. Limites de potentiel de quelques anions et cations d'électrolyte support ⁽⁶⁶⁾.

Ion	Électrode	Utilisation	
		Dans l'eau	Dans l'acétonitrile
I ⁻	Pt anode	0,30	0,20
Br ⁻	“	0,85	0,70
Cl ⁻	“	1,10	1,15
F ⁻	“	2,6	-
ClO ₄ ⁻	“	1,5	2,6
[BF ₄] ⁻	“	-	3,1
[PF ₆] ⁻	“	-	3,2
Li ⁺	Hg cathode	-2,16	-1,8
Na ⁺	“	-1,95	-1,7
K ⁺	“	-2,03	-1,8
Rb ⁺	“	-1,98	-1,8
NH ₄ ⁺	“	-2,00	-1,7
N(CH ₃) ₄ ⁺	“	-2,65	-2,4
N(C ₂ H ₅) ₄ ⁺	“	-2,78	-2,5
N(C ₄ H ₉) ₄ ⁺	“	-2,87	-2,6
N(C ₂ H ₅) ₃ H ⁺	“	-1,83	-

L'électrolyte support employé dépend de l'expérience réalisée et de sa solubilité dans le solvant. La compatibilité chimique des différents constituants de l'expérience, la toxicité et le coût peuvent aussi influencer le choix de l'électrolyte. Les ions ont chacun leur propre réaction électrochimique qui intervient à un certain potentiel. Un anion perd sa charge négative, par une réaction d'oxydation, soit un transfert d'électron de l'anion vers l'électrode. À l'inverse, le cation subit la réaction de réduction, soit le transfert d'électron de l'électrode vers le cation. Pour les espèces monoatomiques comme le cation Ca^{2+} ou l'anion Cl^- , c'est l'énergie des orbitales atomiques qui est impliquée. Pour les molécules organiques neutres, l'orbitale moléculaire inoccupée de plus basse énergie (LUMO) reçoit les électrons lors de la réduction. Pour l'oxydation, c'est l'orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie (HOMO) qui est impliquée^(74, 75). À l'électrode, la HOMO est impliquée dans l'oxydation alors que la LUMO l'est pour la réduction. Les hydrocarbures saturés ne réagissent pas alors qu'une molécule comportant des hétéroatomes tels l'azote, l'oxygène ou le soufre, possède une activité électrochimique due au moment dipolaire induit dans la molécule. La présence d'électrons non appariés dans l'hétéroatome réduit le potentiel nécessaire pour oxyder la molécule. Une disponibilité accrue des électrons facilite l'oxydation. La première oxydation d'un cycle aromatique est souvent plus difficile que la seconde qui s'ensuit; l'ajout d'un alcool au cycle réduit le potentiel nécessaire pour l'ajout subséquent d'un second alcool. Le comportement électrodonneur de la fonction alcool enrichit le cycle aromatique et augmente la disponibilité des électrons⁽⁵²⁾.

1.1.3 Le courant

Il existe plusieurs façons de décrire le courant en fonction du mode de transport et de l'expérience. Le courant résultant d'une réaction électrochimique à l'électrode est proportionnel au nombre total de charges, exprimé en Coulombs, transféré pendant une seconde. Il est possible d'intégrer mathématiquement le courant en fonction du temps afin d'obtenir la charge totale transférée au système :

$$Q = \int_0^t i(t) \cdot dt \quad [1.1]$$

Le nombre total de charges Q est aussi proportionnel à la quantité de substance transformée à l'électrode selon la loi de Faraday :

$$m = \frac{Q \cdot M}{F \cdot n} \quad [1.2]$$

Où n est le nombre d'électrons, F est la constante de Faraday ($96\,485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$), m est la masse du composé transformé et M est sa masse molaire. Afin d'apprécier le comportement d'une substance électroactive à l'électrode, le courant lié au transfert de charge utilise une approche faisant intervenir l'énergie libre de Gibbs du travail électrochimique :

$$\Delta G = -nF\Delta E \quad [1.3]$$

Pour un système réversible, le ΔE est la différence de potentiel entre le couple rédox et une référence. Sur la plage de potentiel étudié, le transport de masse à l'électrode est assez rapide

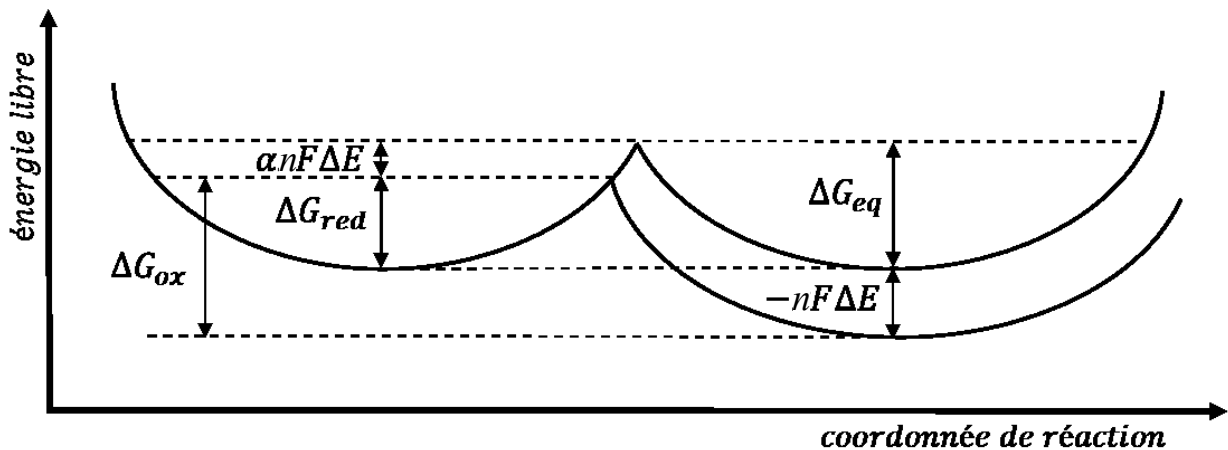


Figure 3. Diagramme d'énergie d'une espèce électroactive qui subit une réduction ⁽⁶⁹⁾.

La figure 3 montre l'énergie libre d'une espèce électro-active sous l'application d'un potentiel. L'application du potentiel a pour effet de diminuer la barrière énergétique conduisant à l'espèce sous sa forme réduite :

$$\Delta G_{red} = \Delta G_{eq} - \alpha nF\Delta E \quad [1.4]$$

De la même façon, la réaction inverse s'écrit :

$$\Delta G_{ox} = \Delta G_{eq} + (1 - \alpha)nF\Delta E \quad [1.5]$$

Où α est le coefficient de transfert de charge et sa valeur est entre 0 et 1. Pour les systèmes simples et réversibles, α est ordinairement égal à 0,5. Les équations de Butler-Volmer décrivent le courant cathodique (i_c) et anodique (i_a) induit par la réaction électrochimique :

$$i_c = -nFAC_{ox}^o k_{red} e^{\frac{-\alpha nF\Delta E}{RT}} \quad [1.6]$$

$$i_a = nFAC_{red}^o k_{ox} e^{\frac{(1-\alpha)nF\Delta E}{RT}} \quad [1.7]$$

Les équations 1.4 et 1.5 montrent la dépendance du potentiel dans l'activation de la réaction en regard de la barrière énergétique. La force motrice de la réaction est la diminution de ladite barrière suite à l'application du potentiel à l'électrode. Les équations 1.6 et 1.7 montrent la dépendance exponentielle du courant selon le potentiel appliqué. Un des avantages de l'électrochimie organique en regard de la synthèse organique conventionnelle est la possibilité de contrôler le potentiel à l'électrode pour activer une réaction.

1.1.4 Étude sous régime diffusionel

Pour étudier les phénomènes qui surviennent à la surface de l'électrode, le courant est enregistré en balayant à vitesse constante le potentiel d'électrode; c'est la voltampérométrie cyclique. Pendant ces expériences, la vitesse de balayage du potentiel est contrôlée à l'aide du potentiostat. Le courant résultant au pic, i_p , et l'effet de la vitesse de balayage, ν (en $V \cdot s^{-1}$), sont décrits par l'équation de Randles-Sevcik pour un système réversible:

$$i_p = 0.4463nFAC \left(\frac{nF\nu D}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} \quad [1.8]$$

Où A est l'aire de l'électrode (en cm^2), C est la concentration de l'espèce électro-active (en $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$), D est son coefficient de diffusion (en $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$), R est la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ V}\cdot\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) et T est la température (en K). L'équation 1.8 montre que le courant augmente selon la racine carrée de la vitesse de balayage. Elle montre aussi la dépendance du courant face au nombre d'électrons. Pour que cette relation soit valide, il faut que le seul mode de transport au sein de la solution soit la diffusion.

Une étude voltampérométrique à différentes vitesses de balayage permet une compréhension approfondie des mécanismes qui ont lieu à l'électrode^(66, 69). Une réaction électrochimique peut être réversible, E_{rev} , le voltampérogramme montre alors un pic à l'aller et un second pic de courant inverse au retour (cas A). Pour respecter le critère de réversibilité, la différence de potentiel entre le sommet du pic à l'aller et au retour doit être de 56,5 mV par électron. De plus, le ratio du courant des pics anodique et cathodique doit être égal à 1. Une réaction électrochimique peut être irréversible, E_{irrev} , dans quel cas aucun pic de retour n'est observé (cas B). Une réaction réversible peut aussi être couplée à une réaction chimique, $E_{rev}C$, comme l'addition d'eau, qui intervient sur le produit issu de la réaction électrochimique (cas C). Le voltampérogramme montre alors un pic de retour de moindre envergure que le pic à l'aller.

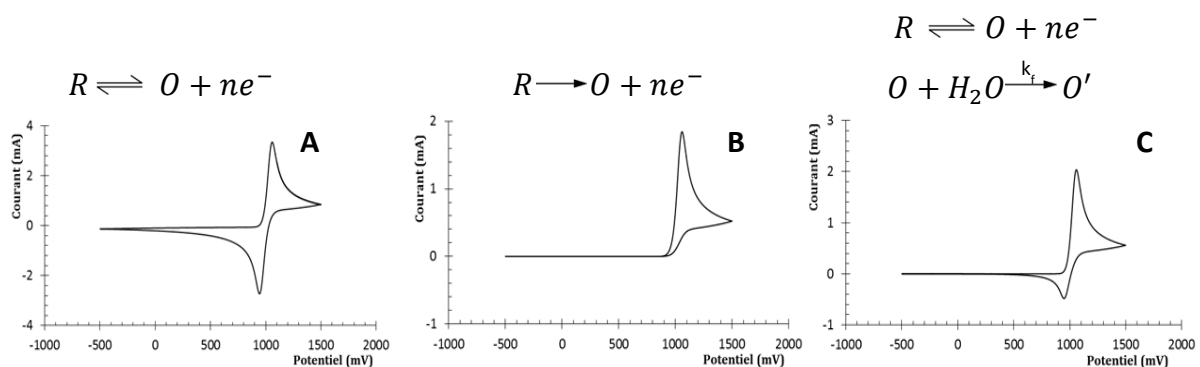


Figure 4. Quelques types de voltampérogrammes modélisés selon le mécanisme à l'électrode : (A) réaction électrochimique réversible E, (B) réaction électrochimique irréversible E et (C) réaction électrochimique réversible couplée à une réaction chimique EC.

De plus, l'intensité du courant observé pour le pic de retour varie en fonction de la vitesse de balayage. Plus celle-ci est grande, plus le pic de retour ressemble à celui observé lors d'une réaction réversible. Moins la vitesse de balayage est grande, plus le pic devient petit, jusqu'à disparaître complètement pour avoir l'air d'un comportement irréversible, si la constante de formation de la réaction chimique est trop grande pour les plages de vitesse accessibles par le potentiostat. La figure 4 illustre ces différents cas, qui représentent un aperçu des différents mécanismes rencontrés, car il existe une multitude de combinaisons possibles.

En plus de l'information au niveau mécanistique, une valeur du potentiel après le sommet du pic est utilisée pour effectuer l'électrolyse à potentiel constant, dite sous contrôle potentiostatique. C'est en conservant un potentiel donné pendant un temps prolongé que la concentration des produits augmente à des niveaux détectables par spectrométrie de masse. Pour maximiser la conversion de l'espèce électroactive pendant l'électrolyse, une convection supplémentaire est souhaitable afin d'amener constamment une solution fraîche vers la surface de l'électrode.

1.1.5 Étude sous régime de convection forcée

En faisant tourner l'électrode dans l'axe perpendiculaire à sa surface, la solution y est forcée par convection. Le mode de transport de la solution vers la surface de l'électrode influence l'allure du voltampérogramme comme le montre la figure 5. Pendant la voltampérométrie cyclique, comme la solution quitte le voisinage de la surface, elle ne peut être retransformée lors du balayage de retour et le pic de réduction est absent. Lorsque l'espèce électroactive réagit avec l'électrode tournante, le courant limite (i_l) apparaît quand la convection forcée de la solution occupe toute la surface disponible pour la réaction. Le traitement mathématique du courant pour ce type d'électrode est donné par la relation de Levich ⁽⁷⁶⁾ :

$$i_l = 0.620nFACD^{2/3}\nu^{-1/6}\omega^{1/2} \quad [1.9]$$

Où n est le nombre d'électrons, F est la constante de Faraday, A est l'aire de l'électrode, C est la concentration de l'espèce électroactive, D son coefficient de diffusion et ν est la viscosité cinématique. Ces valeurs demeurent constantes tout au long de l'expérience, c'est la vitesse de rotation ω qui varie. En faisant varier la vitesse de rotation, un graphique du courant en fonction de la racine carrée de ω donne une droite positive pour une réaction d'oxydation ou négative si c'est une réaction de réduction. En ajoutant une seconde électrode de travail en forme d'anneau, autour du disque, l'électrode tournante à disque et à anneau est obtenue. L'anneau peut être utilisé de différentes manières, mais le plus souvent il est maintenu à un potentiel permettant de détecter l'espèce formée au disque⁽⁷⁷⁾.

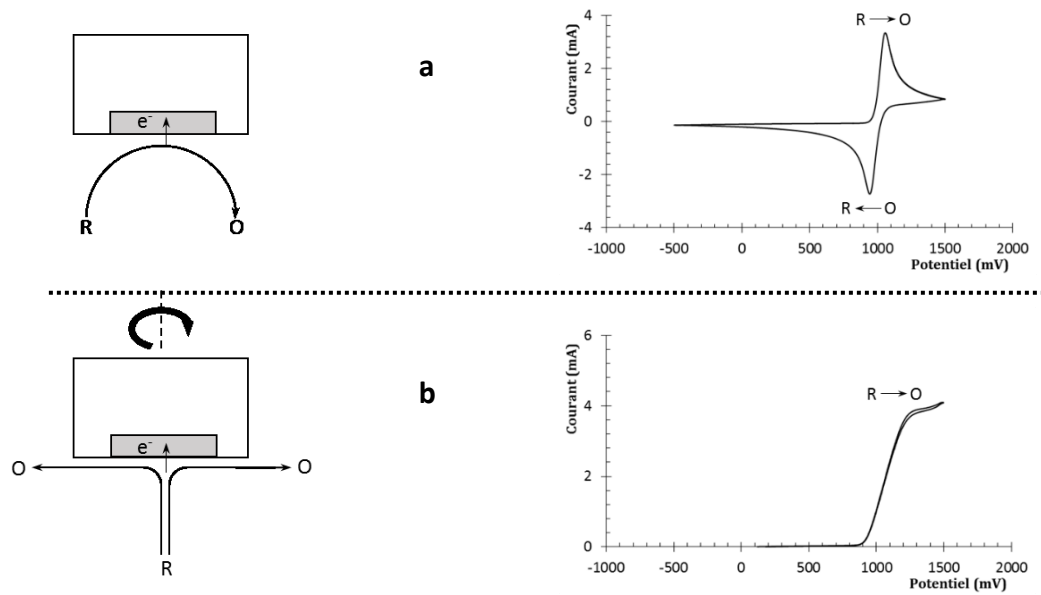


Figure 5. Mode de transport à l'électrode: (a) transport par diffusion et (b) transport par convection forcée.

Pour une réaction réversible, le ratio du courant à l'anneau i_a sur le courant au disque i_d donne le coefficient de capture N_{emp} :

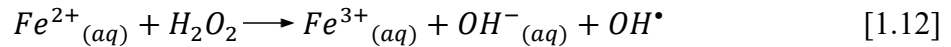
$$N_{emp} = -\frac{i_a}{i_d} \quad [1.10]$$

Ce coefficient de capture dépend de la géométrie du montage, soit le diamètre interne et externe de l'anneau ainsi que de la distance entre le disque et l'anneau. Lorsqu'une réaction électrochimique réversible est couplée à une réaction chimique irréversible, le coefficient de capture apparent, N_{app} , est moins grand que pour une réaction réversible non couplée à une réaction chimique. L'espèce formée au disque réagit chimiquement pendant son temps de transit jusqu'à l'anneau, ce qui explique la diminution observée. L'une des relations faisant intervenir la constante de vitesse k de cette réaction chimique permet de tracer un graphique du ratio des coefficients de capture empirique et apparent en fonction de l'inverse de la vitesse de rotation et d'obtenir la pente correspondant à k ⁽⁶⁶⁾:

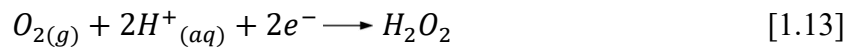
$$\frac{N_{emp}}{N_{app}} = 1 + 1.28 \left(\frac{v}{D} \right)^{1/3} \left(\frac{k}{\omega} \right) \quad [1.11]$$

1.1.6 Électro-Fenton

Une approche différente a aussi montré ^(62, 78) des ressemblances avec les produits issus du métabolisme oxydatif du monde vivant, c'est la réaction Fenton assistée par électrochimie ou plus simplement l'électro-Fenton. La réaction de Fenton fait intervenir le peroxyde d'hydrogène et le fer(II) :



L'élégance de cette méthode est que le peroxyde d'hydrogène est généré électrochimiquement *in situ*, en milieu acide, à partir de l'oxygène dissous :

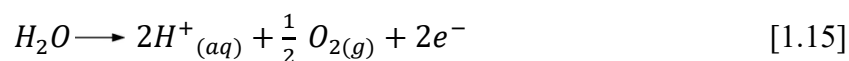


De plus, le fer(III), inactif pour la réaction de Fenton, est régénéré en fer(II) par réduction électrochimique :



Comme l'hydroxyle radicalaire, $\text{OH}^\bullet$, est hautement réactif, sa durée de vie en solution est éphémère. Dès que l'occasion se présente, il réagit sur un cycle aromatique ou même sur une liaison C-H aliphatique. En poussant la réaction assez longtemps, l'hydroxyle radicalaire oxyde pratiquement tous les carbones de la molécule pour conduire à une minéralisation quasi complète de la molécule en CO_2 . Il est donc nécessaire de pouvoir continuer à produire $\text{OH}^\bullet$ sur une longue durée pour assurer une conversion maximale de la molécule à dégrader.

Si elle n'est pas assistée par électrochimie, la réaction de Fenton nécessite l'ajout constant de peroxyde d'hydrogène au milieu réactionnel afin de continuer la production de radicaux hydroxyles. De plus, le fer(II) disparaît aussi de la solution au profit du fer(III), ce qui nécessite la régénération de ce catalyseur par voie chimique, souvent par l'ajout d'acide ascorbique. Comme le montrent les équations 1.13 et 1.14, ces deux problèmes disparaissent en remplaçant les voies chimiques par l'électrochimie. Ces deux réactions sont des réductions et ont lieu à la cathode. Par rapport à d'autres matériaux, le carbone vitreux montre un surpotentiel réduit vis-à-vis de la réaction produisant le peroxyde d'hydrogène par rapport à d'autres réactions, ce qui en fait un candidat idéal ^(79, 80). Le fait de pouvoir l'obtenir sous une forme poreuse, appelé carbone vitreux réticulé, ouvre la possibilité à une électrode poreuse aux gaz, maximisant la surface de contact et ainsi l'efficacité en termes de production de H_2O_2 ⁽⁸¹⁾. À l'anode, la principale réaction est l'électrolyse de l'eau en oxygène :



1.2 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode bien adaptée à l'analyse des composés pharmaceutiques. Ce mode de détection offre une sensibilité et une spécificité accrues par rapport à des méthodes spectroscopiques. La possibilité de la coupler avec la chromatographie liquide permet de résoudre des mélanges complexes en séparant ses divers constituants dans le temps, avant l'introduction dans le spectromètre de masse. À la figure 6, une analogie avec la

spectrophotométrie permet d'expliquer le fonctionnement général de ce type d'appareil. Dans un cas, l'échantillon est soumis à une onde électromagnétique et absorbe la lumière à une certaine longueur d'onde. Puis un système de fentes minces permet d'isoler cette longueur d'onde avant l'onde soit acheminée au capteur de lumière. Dans un spectromètre de masse, l'échantillon est ionisé dans la source de l'appareil avant d'être filtré par un système d'analyseurs de masse pour frapper le capteur. Le principe est d'utiliser des champs électriques ou magnétiques pour séparer les ions en fonction de leur rapport masse sur charge et est commun à toutes les différentes configurations ⁽⁸²⁾.

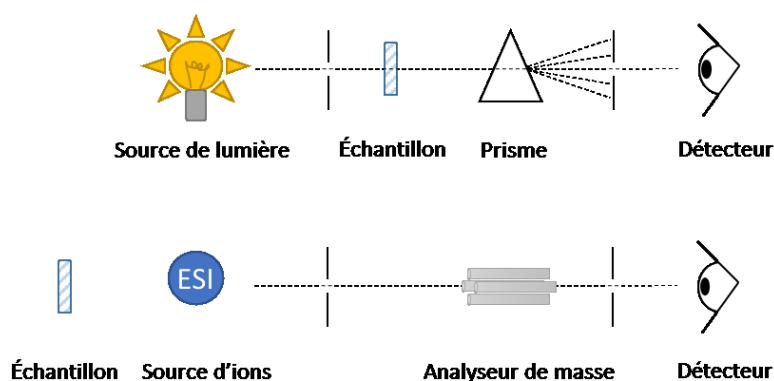


Figure 6. Comparaison de la spectrométrie de masse avec la spectrophotométrie.

Il existe plusieurs types d'analyseurs de masse et chacun possède ses forces et ses faiblesses qu'il faut considérer en fonction de l'application visée ⁽⁸³⁾. Comme le montre le tableau 4, certains sont mieux adaptés à la quantification, en raison de la linéarité et de la sensibilité, alors que d'autres permettent d'obtenir plus d'informations qualitatives en lien avec l'élucidation structurale d'un composé, soit par une résolution accrue ou par la possibilité d'effectuer des expériences de fragmentation en série ou spectrométrie de masse multiétapes (MS^n). D'après les caractéristiques de chacun des analyseurs de masse, il n'y en a aucun qui les possède toutes à la fois ; l'instrument parfait n'existe pas ⁽⁸⁴⁾. La trappe ionique linéaire-orbitrap offre la possibilité de faire la MS^n avec une résolution accrue. Le triple quadripôle offre une résolution limitante, mais sa grande linéarité couplée à sa sensibilité en fait un instrument de choix pour la quantification.

Tableau 4. Caractéristiques des différents analyseurs de masse⁽⁸³⁾.

Analyseur de masse	Abréviation	Limite m/z	Résolution (FWHM)	Linéarité	MS ⁿ	Sensibilité
Triple quadripôle	QqQ	4000	≥ 4000	1×10^7	MS ²	+++
Quadripôle-temps de vol	QToF	4500	$\sim 25\,000$	1×10^6	MS ²	++
Trappe ionique linéaire	LIT	4000	≥ 4000	1×10^4	MS ⁿ	++
Trappe ionique linéaire-Orbitrap		6000	$\geq 150\,000$	1×10^4	MS ⁿ	-

1.2.1 Ionisation par électronébulisation

Pour amener les composés de la phase liquide à la phase gazeuse sous forme d'ions, la technique d'ionisation par électronébulisation (ESI) est bien adaptée. Cette méthode d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse est considérée comme étant douce, puisqu'elle ne fragmente pas le composé et génère des molécules protonées ($[M+H]^+$), cationisées ($[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$) dans le mode positif et des molécules déprotonées ($[M-H]^-$) ou anionisées ($[M+HCO_2H-H]^-$, $[M+CH_3CO_2H-H]^-$) dans le mode négatif. La figure 7 montre la configuration de la source ESI fonctionnant en mode positif. Un ajustement de pH, par un additif volatil, de la solution entrante permet d'avoir les espèces sous forme chargée. Un voltage positif est appliqué sur le capillaire d'émission et un voltage négatif sur l'entrée du spectromètre de masse ; un champ électrique est généré entre les deux. Les ions chargés positivement seront attirés vers l'entrée du spectromètre de masse sous l'influence de ce champ électrique, laissant les espèces chargées négativement à l'extérieur. Il se crée un courant ionique qui permet au circuit électrique d'être fermé. Par rapport à la solution entrante, une séparation de charges se produit dans la source ESI. Un jet de gaz chaud permet l'évaporation du solvant dans les gouttelettes et

l'enrichissement en charges s'effectue^(85, 86). Puisque la solution est en contact avec le capillaire d'émission, des réactions d'oxydation de molécules électroactives se produisent⁽⁸⁷⁾.

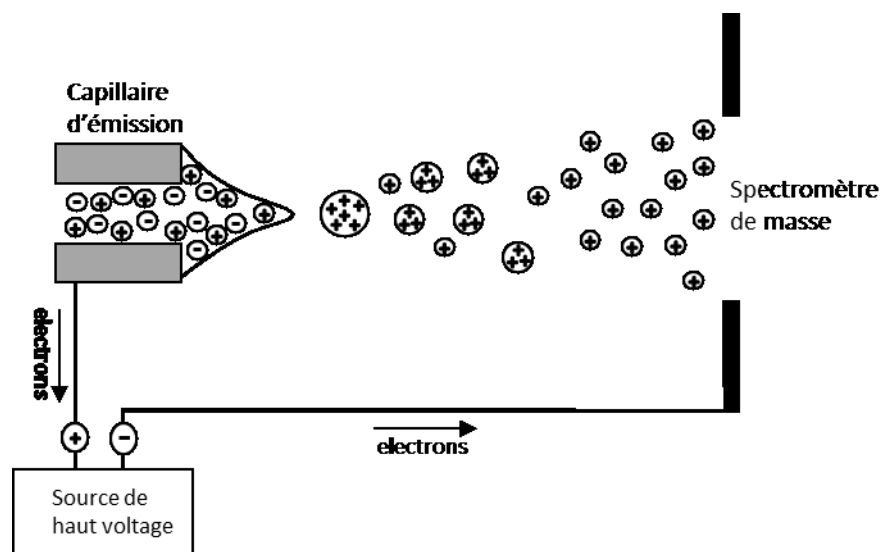


Figure 7. Vue schématisée d'une source ESI et du principe d'ionisation en mode positif⁽⁸⁵⁾.

1.2.2 Temps de vol

Le spectromètre de masse à temps de vol (TOFMS) est un instrument de haute résolution. Après avoir été ionisé par une méthode douce, comme l'ionisation par électrospray, le composé est introduit dans la partie sous vide de l'instrument pouvant ressembler au schéma de la figure 8. Le vide est nécessaire afin que le libre parcours moyen garantisse une trajectoire libre de toute collision non désirable et est d'autant plus important dans la chambre de vol. Le principe est de mesurer le temps que prend l'ion pour traverser l'instrument, ce qui nécessite de bien définir le temps initial de la mesure. L'ion traverse une série de lentilles électrostatiques, qui le guide de la source vers le premier quadripôle de travail. Ce-dernier peut opérer en mode balayage (*scan*) ou sélectionner un rapport masse sur charge de résolution unitaire pour se rendre dans la chambre de collision. En ayant un quadripôle (QTOFMS), on peut sélectionner un rapport masse sur charge à être fragmenté. Si l'énergie interne de l'ion dans la chambre de

collision est inférieure à la valeur à laquelle le composé se fragmente, l'ion va poursuivre sa course vers la chambre du temps de vol.

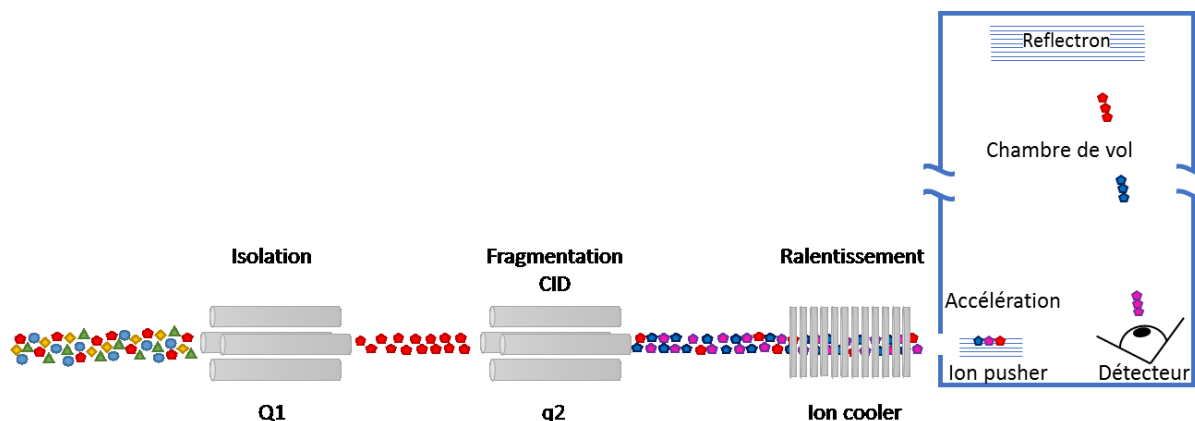


Figure 8. Vue schématisée d'un spectromètre de masse de type quadripôle-temps de vol utilisé lors des expériences de masse exacte.

Si l'ion est accéléré suffisamment dans la chambre de collision, les collisions avec le gaz présent transforment suffisamment d'énergie cinétique en énergie interne pour que le composé dépasse son seuil de fragmentation. Plusieurs nouveaux m/z , correspondant aux fragments, pourront être mesurés dans la chambre de vol. Une étape de ralentissement s'opère au moyen de lentilles électrostatiques afin de minimiser l'énergie cinétique de l'ion avant d'entrer dans la chambre de vol pour s'assurer que chacun reçoit la même poussée (voltage d'accélération). L'ion y est alors accéléré sous un voltage V et le temps t qu'il prend pour parcourir une certaine distance L est proportionnel à son rapport masse, m , sur charge z :

$$t = L \sqrt{\frac{m}{z} \frac{1}{2V}} \quad [1.16]$$

La formule 1.16 montre que si une multitude d'ions de m/z sont accélérés au même moment à l'entrée de la chambre de vol, les ions les plus légers voyageront plus rapidement vers le détecteur ⁽⁸⁶⁾. Puisque les différentes étapes d'isolation, de fragmentation et de mesure s'effectuent à différents endroits dans l'instrument, c'est une expérience résolue dans l'espace.

Par sa grande résolution, ce type d'instrument permet d'obtenir une masse exacte qui permet d'assigner la formule chimique d'un composé inconnu. La résolution est définie comme suit :

$$R_{(FWHM)} = \frac{m}{\Delta m} \quad [1.17]$$

Où m est la masse mesurée et Δm est la largeur du pic à la mi-hauteur⁽⁸⁶⁾.

1.2.3 Trappe à ions linéaire

La trappe à ions, comme son nom l'indique, permet de trapper, d'emmagasinier les ions dans un espace fini. Il existe plusieurs configurations qui permettent ce stockage. L'instrument, présenté à la figure 9, ressemble en tout point à un analyseur quadripolaire, mais plutôt que de laisser passer les ions au travers dans des trajectoires stables, la trappe à ions va les conserver dans la zone centrale. Pour y arriver, les deux sections quadripolaires situées aux extrémités sont sous un voltage direct plus élevé que la partie centrale, ce qui force les ions à rester dans cette zone de moindre énergie. Un voltage alternatif engendre un mouvement de rotation des ions, à la manière d'un quadripôle classique. Pour obtenir des orbites stables, un gaz de ralentissement est employé. La principale conséquence est que la trappe permet d'effectuer des opérations additionnelles dans le temps, et ce, dans le même espace ⁽⁸³⁾. Ainsi le stockage, l'isolation, la fragmentation puis l'éjection vers le détecteur ont lieu au même endroit dans l'instrument, mais à des temps différents ; l'expérience est dite résolue dans le temps. C'est cette caractéristique qui est commune aux technologies permettant la MSⁿ. Pour manipuler les ions trappés, une étape d'activation est nécessaire. Des radiofréquences sont ajustées pour provoquer des orbites excitées et induire des collisions avec le gaz de ralentissement, ce qui augmente l'énergie interne et provoque la fragmentation du composé parent ⁽⁸⁸⁾. L'éjection se fait dans le même axe que celui de la rotation dans les orbites, sur le côté de l'instrument via un voltage appliqué sur une électrode ayant la forme d'une petite fente. Puisque l'espace de stockage est d'un volume fini, la quantité d'ions piégés est elle aussi finie avant que n'apparaissent des effets indésirables liés

à la répulsion électrostatique entre les ions ; c'est l'effet d'espace-charge qui limite les performances en termes de sensibilité.

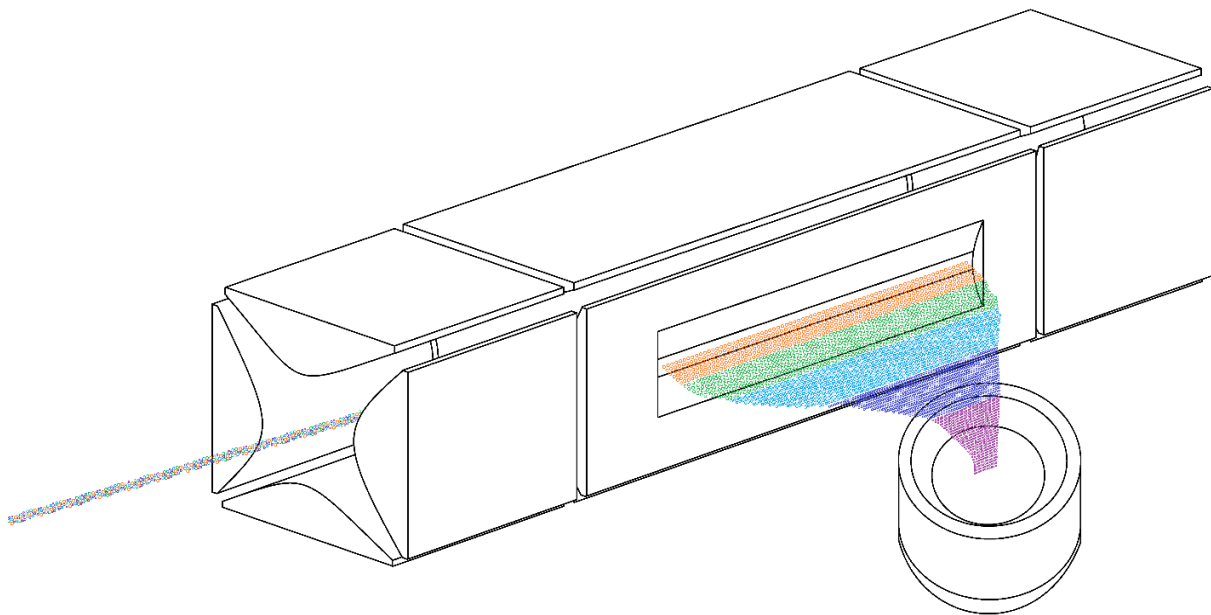


Figure 9. La trappe à ions utilisée lors des expériences de MS^n (le deuxième détecteur est caché derrière la section centrale).

De plus, le fait d'avoir toutes les expériences au même endroit fait en sorte que le système est plus lent par rapport aux expériences résolues dans l'espace plutôt que le temps. Néanmoins, les informations qualitatives qu'offrent les expériences de spectrométrie de masse à étapes multiples permettent l'élucidation structurale, surtout si des données provenant d'expériences en haute résolution leur sont couplées.

1.3 Description générale de XCMS

1.3.1 L'expérience

XCMS Online est une plateforme de traitement de données pour les expériences de spectrométrie de masse en haute résolution, qui permet de comparer deux séries d'échantillons pour en faire ressortir les différences⁽⁸⁹⁾. Cet outil peut être utilisé en métabolomique non ciblée, en comparant les différences entre des échantillons de contrôle et des échantillons ayant été

soumis à des paramètres d'expériences différents. Par exemple, deux groupes d'échantillons, l'un recevant l'ozonation et l'autre ne recevant rien^(90, 91). Ou encore, pour observer les produits de transformation suite à une réaction électrochimique en comparant les groupes avant et après l'électrolyse. Afin d'assurer la réussite de l'expérience, il est primordial d'avoir de bons échantillons, au moins trois, qui ont subi exactement les mêmes actions.

1.3.2 L'analyse statistique

L'utilisation de la plateforme XCMS nécessite le téléversement des fichiers d'acquisition du spectromètre de masse. Il faut ensuite configurer les paramètres de l'analyse statistique qui sera effectuée. L'option «ppm» donne la déviation tolérable du m/z sur des scans consécutifs. Les «min» et «max peak width» donne la largeur minimale et maximale, en seconde, du pic de chromatographie. L'option «mzdiff» est la différence minimale de m/z , au sein d'un même pic chromatographique, pour être considéré comme dû à deux produits distincts. «S/N threshold» est le ratio du signal au bruit qu'il faut minimalement, pour être considéré comme un pic. La méthode d'intégration 1 est moins exacte mais plus robuste face au bruit de fond, car elle utilise les données filtrées. La méthode d'intégration 2 utilise les données réelles, donc plus exactes, mais est plus sensible au bruit de fond. Les options «prefilter peaks» et «prefilter intensity» sont liées, l'une donne le minimum de fois qu'un pic doit être retrouvé dans les expériences. Si les produits de transformation sont présents dans tous les réplicats, le nombre du «prefilter peaks» peut-être égale au nombre de réplicats. Le nombre de «prefilter intensity» donne l'intensité minimale que devrait avoir ce pic. Le «noise filter», comme son nom l'indique, permet d'écarter les pics ayant une intensité plus faible que cette valeur. L'option «mzwid» donne la largeur minimale pour que plusieurs produits soient réunis sous une même identité. L'option «minfrac» est la fraction minimale des échantillons nécessaires pour en faire un groupe valide. L'option «bw» est la déviation du temps de rétention acceptable en seconde. Le test statistique «Welch t-test» est utilisé lorsque les variances ne sont pas égales. La «p-value threshold» est la valeur qui permet au résultat d'être considéré comme significatif. De façon succincte, c'est une valeur qui permet de savoir avec un certain pourcentage de certitude que les résultats affichés ne sont

pas simplement dus au hasard. Le «fold change threshold» fixe la valeur pour qu'un résultat soit considéré comme significatif; c'est le nombre de fois que l'intensité observée a changé.

CHAPITRE 2. MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

2.1 Matériel

Le tétrabutylammonium perchlorate (TBAP) provient de TCI America. L'acétaminophène, la carbamazépine, la 2,4-diaminopyrimidine, le ferricyanure de potassium, le ferrocène, la lidocaïne, la phénacétine, le 3,4,5-triméthoxytoluène, le sulfate de fer (II) et le sulfate de sodium proviennent de Sigma-Aldrich. Tous ces produits ont une pureté supérieure ou égale à 98%. Le triméthoprime provient de Santa-Cruz Biotechnology (Dallas, É.-U.). L'eau est purifiée en utilisant un système de filtration Milli-Q. L'acétonitrile, l'eau, le méthanol et l'acide formique utilisés en UPLC proviennent de Fisher Scientific et sont de grade «Optima LC/MS».

2.2 Electrochimie directe

2.2.1 Montage expérimental

Une cellule de verre à trois compartiments, chacun contenant sa propre électrode, est utilisée autant pour les expériences de voltampérométrie cyclique que pour les électrolyses. La contre-électrode, une grille de platine enroulée et reliée à un fil de platine, est séparée de l'électrode de travail par un fritté de verre, de type fin. L'électrode de référence est préparée selon la procédure décrite à la section Électrode de référence Ag/Ag^+ . L'électrode de référence communique avec le compartiment central de travail via un capillaire de Luggin placé juste sous la surface de l'électrode de travail. Pour éliminer les réactions de réduction avec l'oxygène dissous, le compartiment de l'électrode de travail, soit le compartiment anodique, est maintenu sous atmosphère d'azote. Le compartiment cathodique est ouvert à l'air et contient de l'oxygène dissous. L'azote passe dans un bulleur contenant de l'acétonitrile afin de limiter l'évaporation pendant les expériences prolongées. Le débit doit être ajusté afin d'obtenir un bullage modéré pour limiter les phénomènes de convection indésirables. Puisque la combinaison de solvant et d'électrolyte support est toujours la même, les voltampérométries cycliques utilisent les potentiels limites de +2000 et -2200 mV vs Ag/Ag^+ ; cela représente la fenêtre de travail du

système utilisé. À noter que certains matériaux d'électrodes pourraient changer la plage de potentiel accessible.

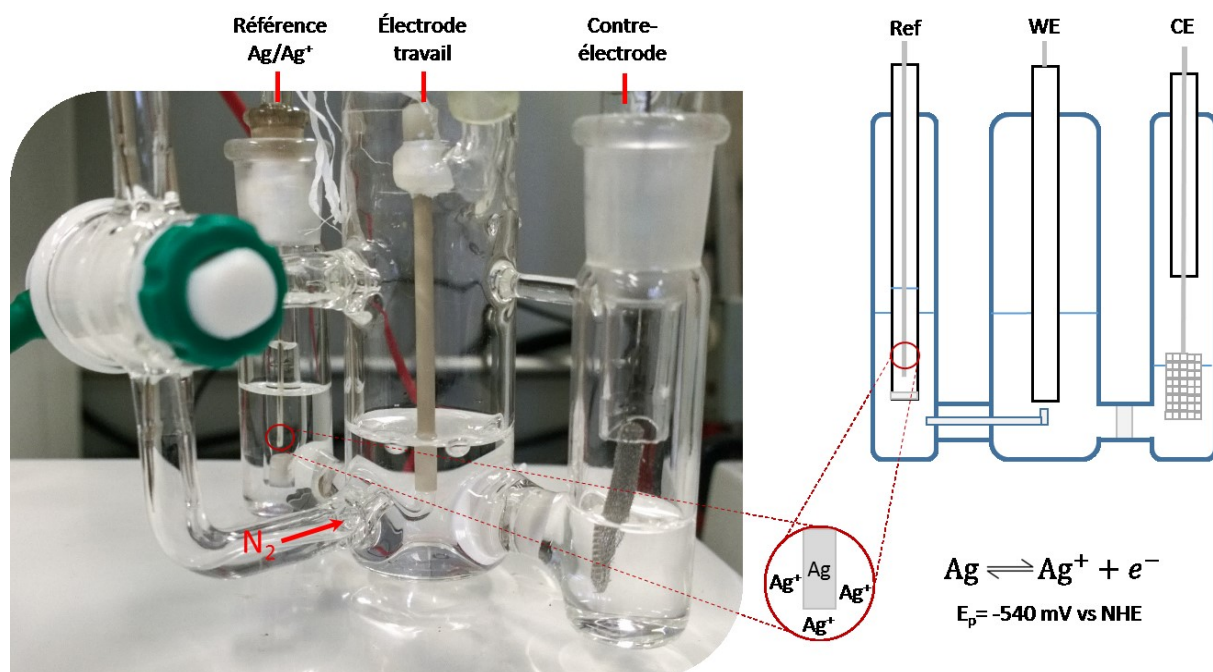


Figure 10. La cellule électrochimique pour les études sous régime diffusionnel.

2.2.2 Électrode de référence Ag/Ag⁺

La référence est préparée le jour de l'analyse et se compose de 1 mL d'une solution ACN:H₂O (99:1) avec 100 mM en TBAP auquel est ajouté 1 mM AgNO₃. Le fritté de type fin doit être mouillé en laissant s'écouler par gravité cette solution. Un fil d'argent est frotté avec du papier sablé fin afin d'exposer une surface d'argent fraîche en enlevant la couche d'oxyde qui donne un éclat jaunâtre au métal. Le fil est rincé avec ACN:H₂O (99:1) avant d'être plongé dans la solution de référence pour former le couple Ag/Ag⁺. On s'assure que le compartiment de référence est bien scellé afin d'éviter la solution de Ag⁺ de diffuser dans le compartiment central de travail. Après utilisation, le tout est rincé plusieurs fois avec ACN. Le fritté est rincé en laissant s'écouler 2 mL d'ACN par gravité.

2.2.3 Étude sous régime diffusionnel

Les expériences de voltampérométrie cyclique sont réalisées dans un régime purement diffusionnel, donc la solution n'est pas agitée. La solution est 10 mM en substrat dissous dans ACN:H₂O (99:1) avec 100 mM en TBAP. Cette même solution est agitée pendant les expériences d'électrolyse, afin d'augmenter l'apport en composé électro-actif à la surface de l'électrode de travail et favoriser un taux de conversion plus élevé. Pour ne pas risquer d'abîmer le capillaire de Luggin, l'utilisation d'un petit barreau magnétique de type «grain de riz» est privilégiée. Plusieurs électrodes de travail sont utilisées telles que présentées au tableau 5.

Tableau 5. Électrodes de travail utilisées en régime diffusionnel.

Matériau	Diamètre	Utilisation
Or	2 mm	Voltampérométrie
Platine	2 mm	Voltampérométrie
Carbone vitreux	2 mm	Voltampérométrie
Or	6 mm	Électrolyse
Carbone vitreux	7 mm	Électrolyse

2.2.4 Étude en régime de conversion forcée

Un système d'électrode tournante à disque et à anneau, le modèle MSR Electrode Rotator, est couplé à un bipotentiostat AFCBP1 de la compagnie Pine Research Instrumentation. L'électrode de travail consiste en un disque de 5 mm du matériau encastré dans du téflon entouré d'un anneau de platine d'un diamètre interne de 6,5 mm et d'un diamètre externe de 7,5 mm.

Tableau 6. Électrodes de travail utilisées en régime de convection forcée

Matériau	Diamètre	Utilisation
Platine	5 mm	Voltampérométrie/Électrolyse
Carbone vitreux	5 mm	Voltampérométrie/Électrolyse

Afin d'éviter le frottement induit par le mouvement de rotation de l'électrode, le compartiment de l'électrode de travail n'est plus étanche. Les réactions de réduction de l'oxygène sont plus difficiles à éliminer, mais un apport d'azote supplémentaire, orienté de façon perpendiculaire à l'électrode tournante, permet de minimiser ce problème.

2.2.5 Electrochimie indirecte

L'électrolyse est réalisée avec un potentiostat/galvanostat (EG&G model 273A, Princeton Applied Research), dans une cellule à un compartiment et deux électrodes. L'électrode de carbone vitreux de 7 mm, décrite au tableau 5, est utilisée. La contre-électrode est un grillage de platine. La solution pour l'Électro-Fenton contient 50 mM Na₂SO₄, 0,1 mM FeSO₄ dans de l'eau acidifiée à pH 2,7 par l'ajout de H₂SO₄ concentré. Le composé à être oxydé est ajouté à 0,2 mM. Une densité de courant de 1 mA/cm² est appliquée pendant 30 minutes en mode galvanostatique. Le temps de réaction et la densité de courant sont optimisés afin de limiter la formation de bulle à la contre-électrode et pour viser une diminution du signal de 70% en LC-MS. Si le temps d'électrolyse est trop long, les produits formés seront dégradés et ne seront plus détectables.

2.3 Analyse LC-MS

2.3.1 Temps de vol

L'analyse sur les échantillons dilués 1:1000 se fait sur un UPLC Shimadzu couplé à un spectromètre de masse à temps de vol Bruker MaXis utilisant une source à ionisation par électro-nébulisation (ESI) en mode positif. Les paramètres MS sont les suivants : voltage du capillaire 3500 V, voltage de la plaque d'entrée «End Plate Offset» -500V, temps de ralentissement de l'ion «Ion Cooler» 35 μ s et RF de 55 Vpp, avec une fenêtre de balayage m/z de 100 à 700. Pour l'analyse LC-MS, le gaz nébulisant est l'azote à 200°C sous un débit de 9 L/min. Une colonne C₁₈ en phase inverse Acquity HSS-T3, 50 x 2,1mm, 1,8 μ m, est utilisée sous un débit de 500 μ L/min. Le solvant A est H₂O avec 0,1% d'acide formique ; le solvant B est l'acétonitrile avec

0,1% d'acide formique. Entre 0,1 et 2 μL , de l'échantillon dilué, est injecté et résolu chromatographiquement selon les gradients des tableaux 7 et 8. Le volume d'injection peut être ajusté en fonction de l'expérience et de l'échantillon afin d'obtenir un signal d'une intensité visée de 2×10^5 pour les espèces les plus abondantes. Un système de contournement à la source ESI permet de conserver les composés éluant entre 1 et 7 minutes pour la phénacétine, le reste étant rejeté, via une valve, avant d'atteindre l'appareil. Le sel utilisé, le TBAP, lors des expériences d'électrochimie demeure assez concentré pour saturer le détecteur de l'appareil, et nécessite l'utilisation du système de contournement susmentionné. L'élaboration de chaque méthode de chromatographie nécessite l'injection du TBAP (50 ng/mL) afin de déterminer son temps d'élution et d'ajuster le temps d'activation de la valve de contournement à 1 minute avant son temps de rétention. La quantification est basée sur une courbe standard d'acétaminophène dans l'eau (10 à 500 ng/mL) préparée la journée de l'analyse.

Tableau 7. Paramètres de chromatographie utilisés pour la phénacétine et l'acétaminophène.

Temps (min)	Gradient (%B)
0	2
2,5	10
6,0	45
8,0	98
10,0	98
11,5	2
15,0	2

Tableau 8. Paramètres de chromatographie utilisés pour la lidocaïne et le triméthoprim.

Temps (min)	Gradient (%B)
0	5
8,0	30
10,0	98
12,0	98
13,5	5
17,0	5

Les expériences avec la lidocaïne et celles avec le triméthoprimé utilisent la même méthode de séparation, soit le gradient présenté au tableau 8. Pour les expériences de MS², un segment de temps comprenant le pic de l'analyte est créé et la fenêtre d'isolation de l'ion précurseur est de 1,0 Da. Les énergies de collision (entre 10 et 30 eV) sont optimisées pour chacun afin de viser 10% en intensité relative de l'ion précurseur.

2.3.2 Trappe à ions

L'analyse par spectrométrie de masse en tandem multi étapes (MSⁿ) du triméthoprimé se fait sur une trappe à ion linéaire Thermo Finnigan avec une source à ionisation par électro-nébulisation (ESI) en mode positif. Le précipité formé lors des électrolyses à +2500 mV est dissous dans 2 mL ACN:H₂O (1:1) et infusé directement via la source ESI. Le débit de la seringue est de 50 µL/min. Les expériences d'échanges H/D sont répétées en remplaçant H₂O par D₂O. Les paramètres MS sont les suivants : voltage de l'aiguille 4000 V, voltage du capillaire 10 V et une fenêtre de balayage *m/z* de 80 à 700. Le gaz nébulisant est l'azote à 250°C sous un débit de 30 L/min et le gaz auxiliaire est l'azote sous un débit de 5 L/min. L'hélium est utilisé comme gaz de collision et de ralentissement, à une pression de 1,5 mTorr. Pour les expériences MSⁿ, la fenêtre d'isolation de l'ion précurseur est de 1,0 Da. Les énergies de collision varient entre 20 et 40 eV.

2.3.4 Paramètres XCMS

Les expériences de dégradation indirecte par électro-Fenton donnent une multitude de produits. La plateforme XCMS permet une analyse détaillée des données brutes afin de mettre en lumière les principaux produits formés. Les paramètres utilisés, présentés au tableau 9, pour effectuer l'analyse statistique de deux séries de données sont les mêmes indépendamment du composé dégradé.

Tableau 9. Paramètres XCMS utilisés lors de la dégradation indirecte par électro-Fenton.

Option	Valeur
méthode	centWave
ppm	10
min. peak width	10
max. peak width	30
mzdiff	0,01
S/N threshold	6
integration	1
prefilter peaks	3
prefilter intensity	100
noise filter	100
mzwid	0,015
minfrac	0,5
bw	5
statistical test	Welch t-test
p-value threshold	0,001
fold change threshold	1,5

CHAPITRE 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Dégradation directe

3.1.2 Lidocaïne

Dans le but de valider le montage d'électrochimie, des tests sont réalisés avec la lidocaïne afin de reproduire les résultats obtenus par un autre groupe de recherche ^(50, 52). Les réactions ciblées sont la N-déalkylation et la N-oxydation de la lidocaïne, mais en utilisant une cellule électrochimique à deux compartiments plutôt qu'un seul. Le choix de la lidocaïne est motivé par le fait que ce composé a déjà été étudié précédemment par électrochimie et que les résultats sont plus facilement interprétables.

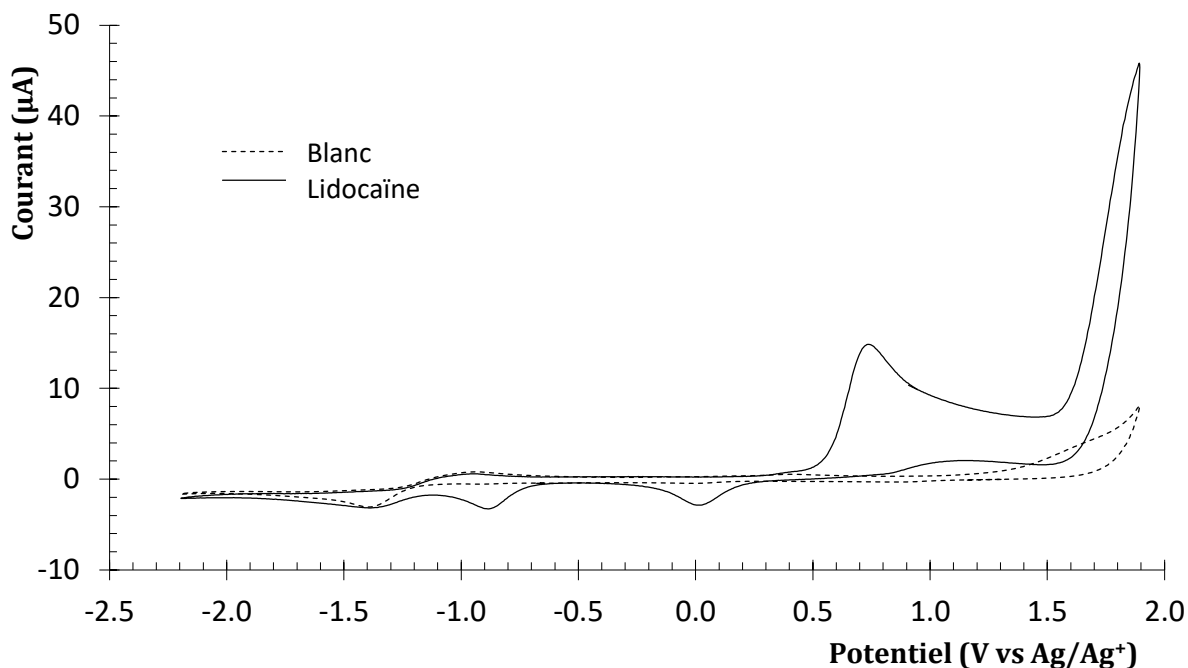


Figure 11. Voltampérométrie cyclique de la lidocaïne sur électrode d'or de 2 mm de diamètre dans $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ (99:1) + 100 mM TBAP (100 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.

La voltampérométrie cyclique est utilisée pour déterminer les potentiels à appliquer pendant l'électrolyse. À la figure 11, le voltampérogramme de la lidocaïne sur l'or montre un pic d'oxydation à 750 mV vs Ag/Ag⁺, et un pic de réduction à -900 mV. D'après les résultats tirés de la littérature ⁽⁵⁰⁾, le pic à 750 mV correspond à la réaction de *N*-déalkylation. Un pic de réduction de nature inconnue est observé à 0 mV, il se pourrait que ce soit le cation Ag⁺ qui soit réduit à l'électrode de travail suite à une contamination du milieu réactionnel par la solution de l'électrode de référence.

Suite à l'électrolyse à un potentiel constant de 1000 mV vs Ag/Ag⁺, les analyses par UHPLC-QqTOFMS de la solution diluée de l'électrolyse montre que la lidocaïne-*N*-déséthyle (figure 12) ainsi que le lidocaïne-*N*-oxyde (figure 13) ont été formés dans le système électrochimique. En appliquant le potentiel de +1000 mV à l'électrode de travail, la contre-électrode acquiert un potentiel semblable mais de polarité opposée, soit -1000 mV. La figure 14 montre que pendant l'électrolyse, il y a une réaction sur l'électrode de travail qui conduit à la formation de la lidocaïne-*N*-déséthyle et une réaction à la contre-électrode qui permet la formation du peroxyde d'hydrogène qui migre dans le compartiment anodique pour réagir avec la lidocaïne et former le lidocaïne-*N*-oxyde ⁽⁵¹⁾.

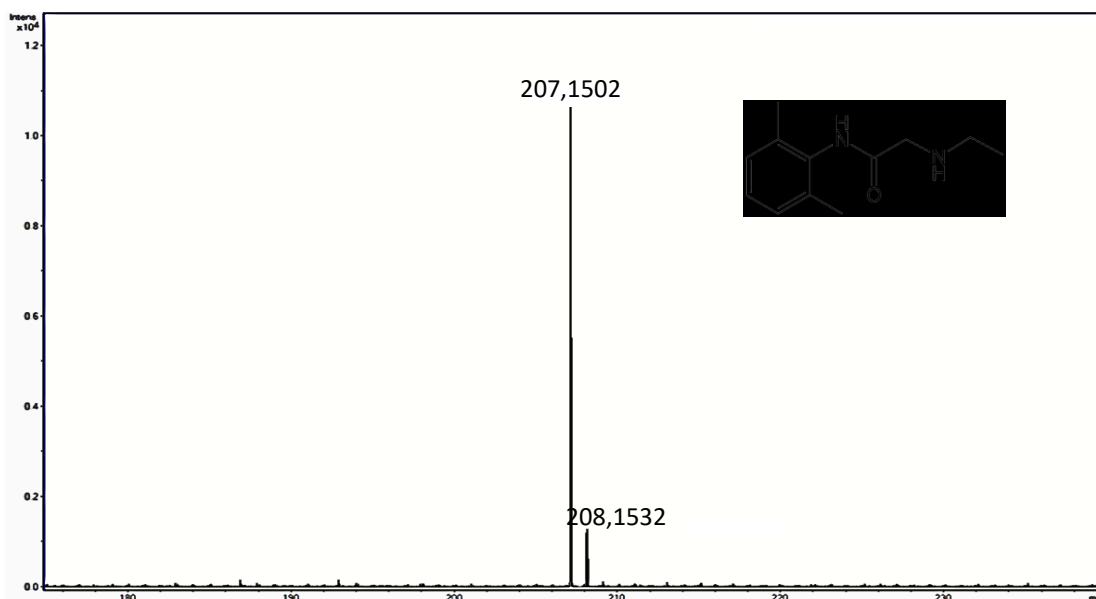


Figure 12. Spectre de masse montrant la lidocaïne-*N*-déséthyle (Δm : 1,0 mDa).

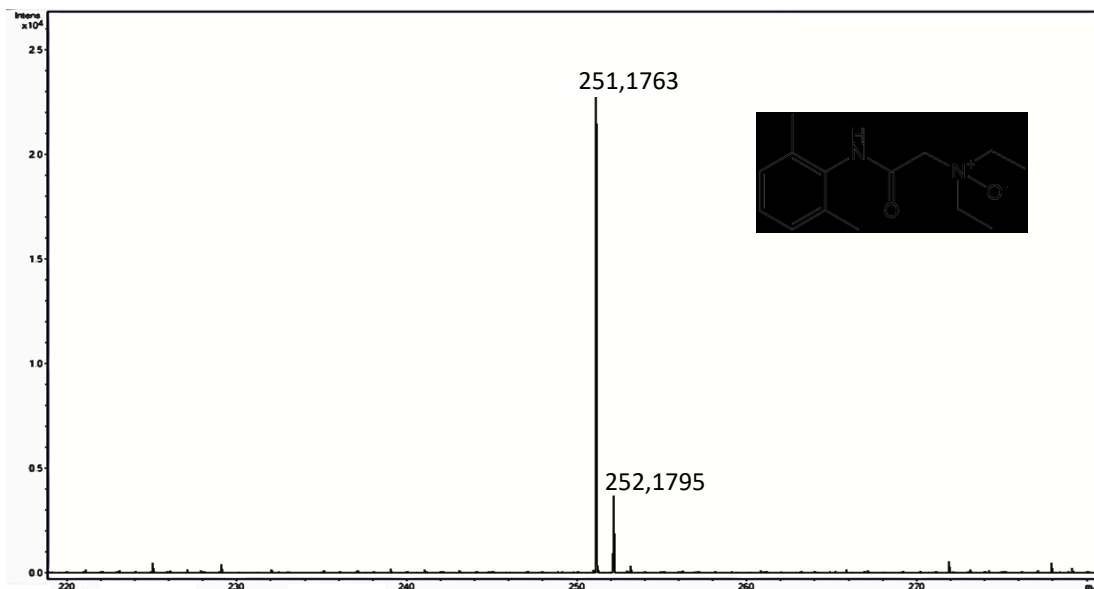


Figure 13. Spectre de masse montrant le lidocaïne-*N*-oxyde (Δm : 0,9 mDa).

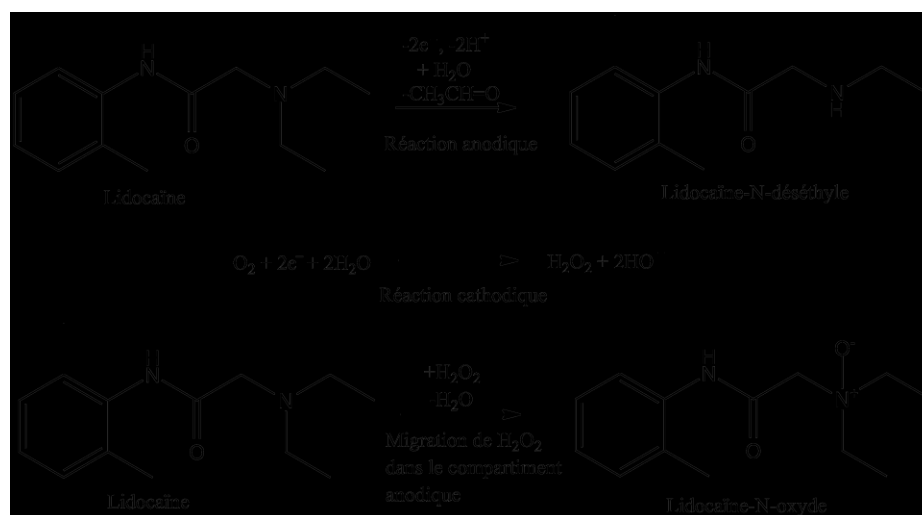


Figure 14. Réactions expliquant la formation des différents produits de la lidocaïne.

À la figure 15, le chromatogramme montre la lidocaïne à un temps de rétention de 4,3 minutes. Puisque la colonne utilisée est une phase inverse et que les principales interactions en jeux sont de nature hydrophobe, l'ordre d'élution des composés donne une information quant à la polarité de chacun des produits. La lidocaïne-*N*-deséthyle, qui élue à 2,9 minutes, devrait être moins hydrophobe que la lidocaïne alors que le lidocaïne-*N*-oxyde élue à 5,5 minutes. De plus, l'ordre

d'élution est cohérent avec ce qui avait été rapporté ⁽⁵¹⁾. Dans leur chromatogramme, la 4-hydroxylidocaïne éluée environ 5 minutes avant le lidocaïne-*N*-oxyde. L'utilisation de la spectrométrie de masse à haute résolution vient confirmer les résultats obtenus par Nouri-Nigieh et ses collaborateurs ⁽⁵¹⁾, permettant de valider le système électrochimique employé pour reproduire diverses réactions métaboliques catalysées par des enzymes du cytochrome P450.

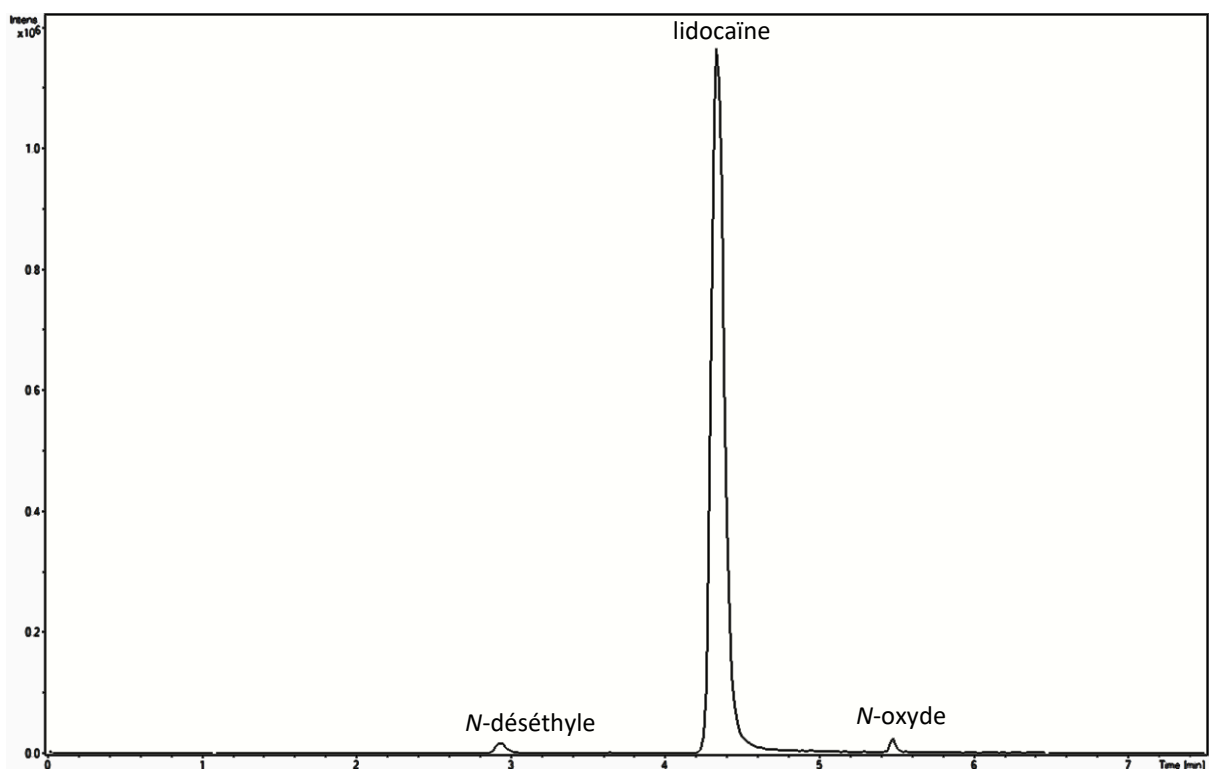


Figure 15. Chromatogramme des ions extraits, obtenu par UHPLC-QqTOFMS en mode ESI positif, après une heure d'électrolyse.

3.1.3 Triméthoprim

De par son utilisation étendue, le triméthoprim est un composé d'intérêt émergent qui n'a pas été étudié par des expériences électrochimiques dans un solvant aprotique. Des expériences avaient montré la formation d'un adduit avec GSH suite à l'oxydation électrochimique ⁽⁵⁶⁾. À la

figure 16, la voltampérométrie cyclique du triméthopime, dans un milieu sans agitation, révèle deux potentiels d'oxydation à 900 et 1150 mV.

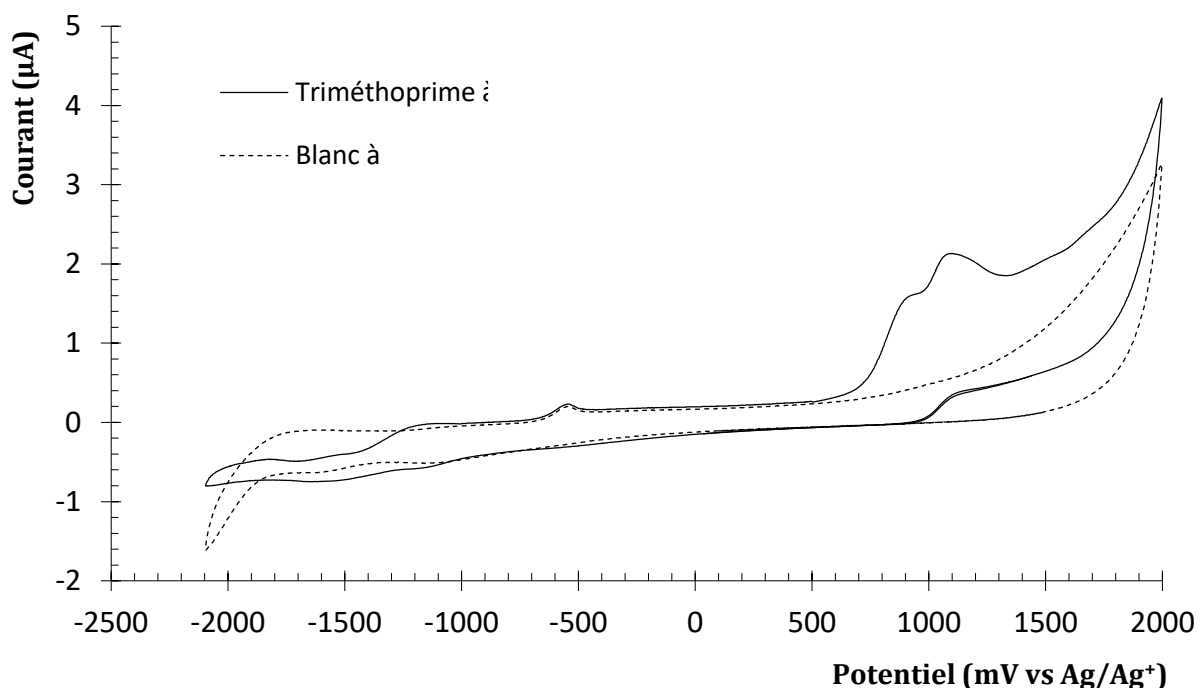


Figure 16. Voltampérométrie cyclique du triméthopime sur électrode de carbone vitreux de 2 mm de diamètre dans ACN:H₂O (99:1) + 100 mM TBAP (50 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.

Les électrolyses ont été effectuées sur trois matériaux différents, soit l'or, le platine et le carbone vitreux, sans montrer de différence. Contrairement aux expériences de voltampérométrie cyclique, la solution est agitée pendant les électrolyses afin de maximiser l'apport en réactif à la surface de l'électrode. D'une part, le potentiel appliqué pendant l'électrolyse est de 1050 mV, soit entre les deux pics d'oxydation observés par voltampérométrie cyclique. Pendant ces expériences, une couche se forme à la surface de l'électrode, peu importe le matériau d'électrode, jusqu'à former de petits flocons qui précipitent au fond de la cellule. À la fin de l'électrolyse, la cellule est placée dans le bain sonore pendant 1 minute dans le but de décoller le précipité de la paroi de verre et de faciliter son transfert. L'échantillon a été dilué 1:1000 dans

l'eau et les analyses par LC-MS n'ont montré aucun produit de réaction. Une tentative d'isoler ce précipité, en vidant d'abord la cellule et en dissolvant le précipité dans le méthanol, n'a montré que le triméthoprime par infusion directe sur le spectromètre de masse.

D'autre part, le potentiel appliqué pendant l'électrolyse a été de 1500 mV, soit après le deuxième pic d'oxydation du triméthoprime. Après 1 heure d'électrolyse, la solution acquiert une teinte légèrement beige. Celle-ci est diluée 1:1000 dans l'eau et les analyses par LC-MS ont montré la présence d'un produit d'oxydation en ESI en mode positif ayant un rapport m/z de 307.1403 Da (que nous avons appelé produit d'oxydation 307 ou PO307). La fragmentation de ce composé sous une énergie de 30 eV donne les fragments présentés au tableau 10, les mêmes que rapportés par un autre groupe en utilisant une approche différente par dégradation microbienne⁽⁵⁵⁾. L'exactitude sur la masse (Δm) en mDa, calculée par la soustraction de la masse théorique par la masse mesurée, montrent des valeurs inférieures à 1 mDa. En rapportant cette différence par rapport à la masse théorique, les valeurs obtenues en ppm sont inférieures à 5 ppm, critère de définition pour qu'une mesure de masse soit considérée comme exacte⁽⁸⁶⁾.

Tableau 10. Fragmentation du PO307 sous 30 eV.

m/z mesuré	I_{rel} (%)	Formule chimique	m/z théorique	Δm (mDa)	Δm (ppm)
307,1403	3	$C_{14}H_{19}N_4O_4$	307,1401	0,2	0,7
289,1286	11	$C_{14}H_{17}N_4O_3$	289,1295	-0,9	-3,1
274,1055	22	$C_{13}H_{14}N_4O_3$	274,1060	-0,5	-1,8
259,0825	100	$C_{12}H_{11}N_4O_3$	259,0826	-0,1	-0,4
243,0875	58	$C_{12}H_{11}N_4O_2$	243,0877	-0,2	-0,8

La figure 17 illustre la réaction de fragmentation s'opérant dans le spectromètre de masse et correspondant à la première perte de masse de PO307. La première perte de masse de m/z 307 à m/z 289 correspond à une perte d'eau, soit 18,01 Da. Une perte d'eau correspond souvent au départ d'un hydroxyle dans la molécule, en laissant derrière une insaturation supplémentaire. En regardant la molécule, le seul site disponible pour répondre à ce critère est le carbone faisant le pont entre les deux cycles aromatiques.

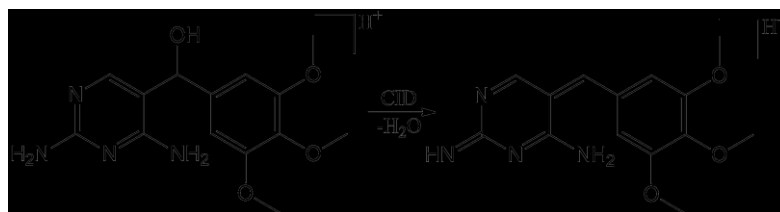


Figure 17. Mécanisme de fragmentation MS-MS du α -hydroxytriméthoprim.

À la figure 18, un mécanisme de réaction est proposé pour expliquer la formation par électrochimie de PO307. L'intermédiaire (R) a la même structure que l'espèce réactive conduisant à l'adduit GSH rapporté précédemment ⁽⁵⁶⁾.

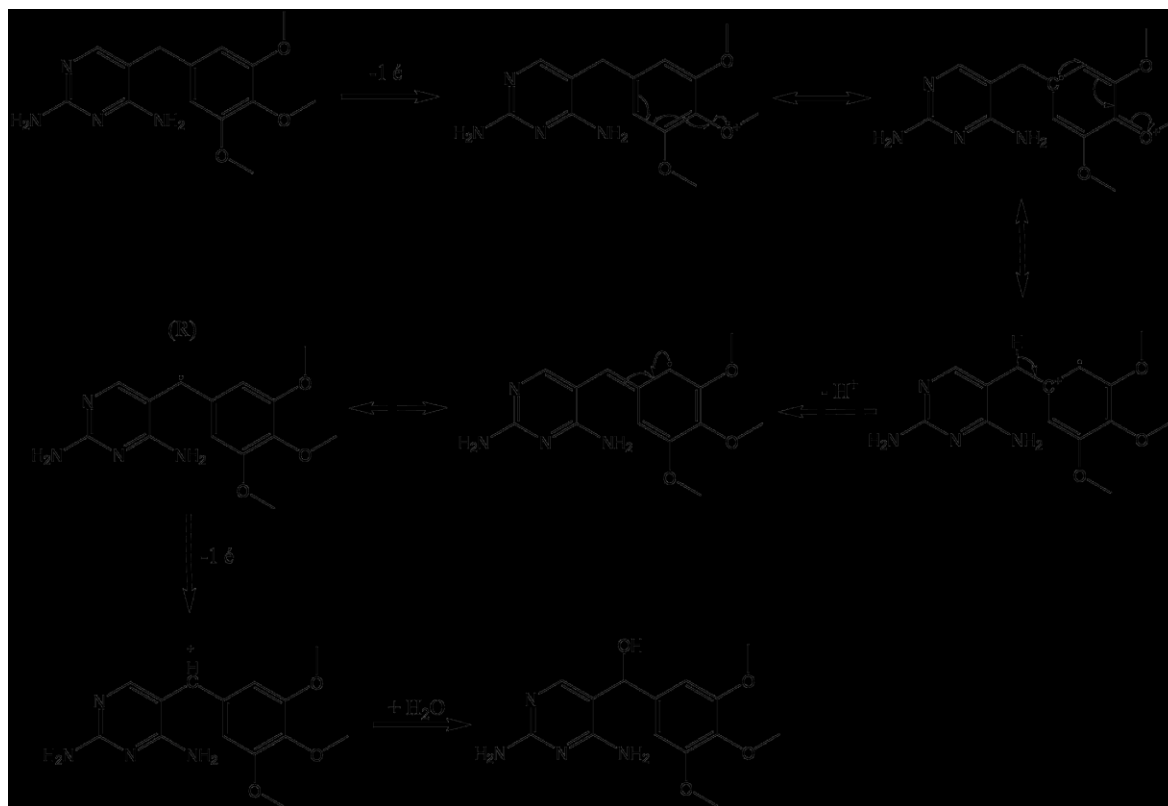


Figure 18. Proposition de mécanisme d'oxydation du triméthoprim pour la formation de l' α -hydroxytriméthoprim.

N'ayant pas de GSH dans la solution, l'attaque nucléophile de glutathion sur le carbone entre les deux cycles est remplacée par celle d'une molécule d'eau. De plus, une expérience dans les

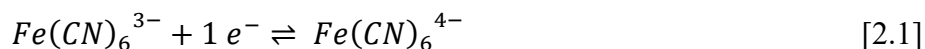
boues activées contenant des bactéries nitrifiantes a aussi montré la formation de α -hydroxytriméthoprimine. Ce groupe a effectué des expériences d'échange proton-deutérium afin d'appuyer leur proposition de structure ⁽⁵⁵⁾. La technique de l'échange proton-deutérium permet une étude de la structure du composé en augmentant la masse des fragments contenant des protons échangeables tels les acides carboxyliques, les alcools et les amines primaires et secondaires. Le nombre de protons échangeables mesurés sont les mêmes, soit 4 pour le triméthoprimine et 5 pour α -hydroxytriméthoprimine, les fragments sont les mêmes, mais la technique pour obtenir le produit est complètement différente. L'électrochimie montre une fois de plus la possibilité de reproduire artificiellement des réactions issues du métabolisme oxydatif.

3.2 Convection forcée

3.2.1 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$

L'électrode tournante à disque et à anneau permet une étude des mécanismes d'oxydation à l'électrode. Si la réaction électrochimique est réversible, il est possible de réduire, ou d'oxyder, une espèce électroactive au disque et de faire la réaction inverse à l'anneau. Le mode de transport par convection forcée diffère du mode de transport par diffusion. Dans le but de valider le montage avec l'électrode tournante, la relation de Levich doit être vérifiée. Celle-ci stipule que le courant observé au disque est proportionnel à la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode.

L'expérience a lieu dans l'eau, avec KNO_3 à 100 mM et $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1 mM et consiste à réduire le ferricyanure, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, en ferrocyanure, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ selon la réaction suivante :



Le coefficient de capture, le ratio entre le courant à l'anneau et celui au disque, dépend de la géométrie de l'électrode, c'est-à-dire les diamètres du disque et de l'anneau ainsi que la distance

entre le disque et l'anneau. Selon sa géométrie, l'électrode utilisée pour les expériences devrait avoir un coefficient de capture, $N_{géo}$, de 0,25, et ce indépendamment de la vitesse de rotation. À l'anneau, le potentiel appliqué permet de réoxyder le ferrocyanure en ferricyanure. La vitesse de balayage est maintenue constante tout au long de l'expérience et la vitesse de rotation est le paramètre qui varie. La figure 19 montre le voltampérogramme à différentes vitesses de rotation.

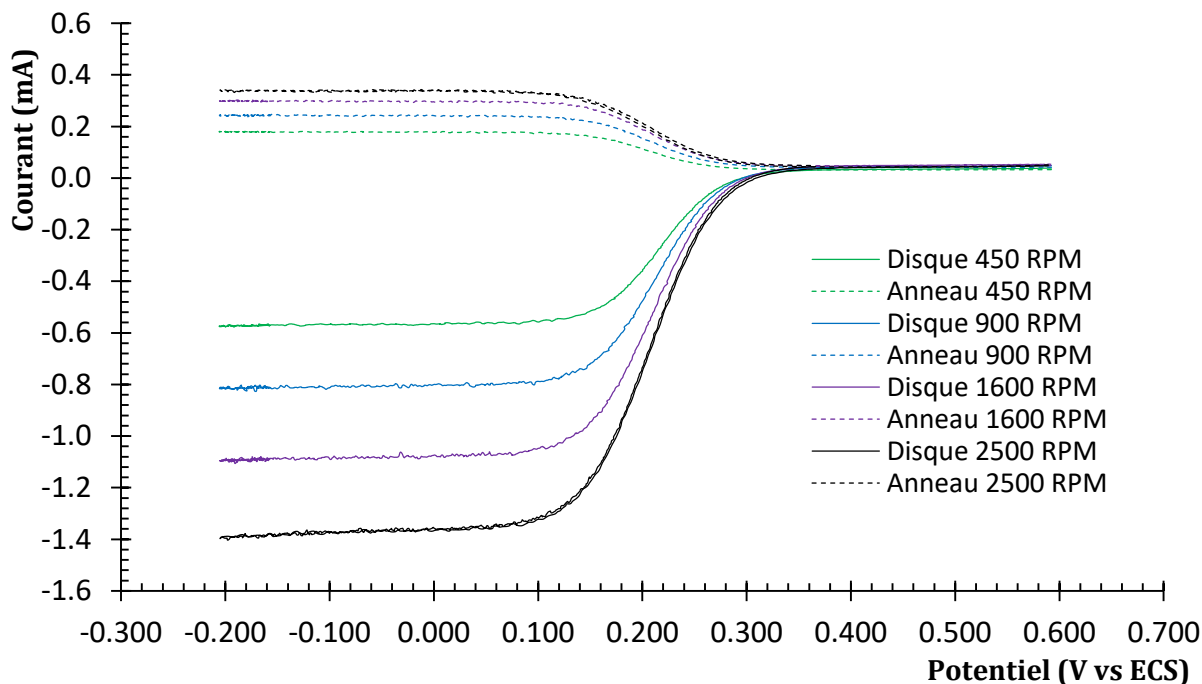


Figure 19. Voltampérométrie cyclique du Fe(CN)_6^{3-} sur électrode disque-anneau (disque de platine de 5 mm de diamètre) dans l'eau et 100 mM KNO_3 (10 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés. L'anneau de platine est maintenu à un potentiel constant de 0 V vs ECS.

Les courants enregistrés qui ont une valeur négative résultent de la réduction ayant lieu au disque alors que ceux avec une valeur positive résultent de l'oxydation à l'anneau. Les courants utilisés dans le calcul du coefficient de capture sont lus à 0 V. La valeur moyenne du coefficient de capture, N_{app} , entre 400 et 2500 RPM est de $(0,23 \pm 0,02)$. Cette valeur est sensiblement la même que celle fournie par le fabricant de l'instrument, soit 0,25. La figure 20 montre la relation de Levich correspondant à l'expérience effectuée à la figure 19. Le coefficient de détermination,

R^2 , est de 0,999, ce qui démontre bien le comportement linéaire du courant en fonction de la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode. À noter que la courbe a une pente négative, car la réaction électrochimique investiguée au disque est une réduction, donc tous les courants enregistrés sont négatifs. Si l'expérience avait plutôt été effectuée en utilisant le ferrocyanure, la réaction serait une oxydation au disque et la pente serait positive tous comme les courants enregistrés au disque.

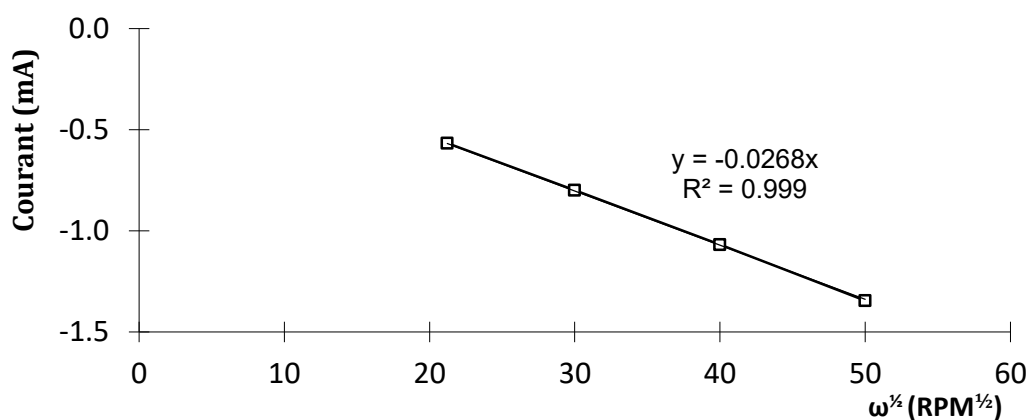
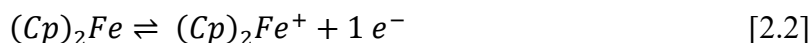


Figure 20. Relation de Levich, entre 400 et 2500 RPM, pour le ferricyanure 1 mM dans l'eau et 100 mM KNO_3 .

Ces deux résultats, le coefficient de capture et la relation de Levich, permettent de valider le montage d'électrode tournante à disque et à anneau utilisé lors des expériences de convection forcée.

3.2.2 Ferrocène

Dans les expériences en milieu non aqueux, le ferrocène est recommandé par IUPAC comme référence externe pour rapporter le potentiel lorsque l'électrode de référence utilisée n'est pas conventionnelle :



Connelly et Geiger⁽⁹²⁾ ont rapporté le potentiel $E_{1/2}$ du ferrocène, dans différents solvants et électrolytes support, comme étant 380 mV vs ECS. Selon la figure 21, le ferrocène a un potentiel de demie vague de 140 mV vs Ag/Ag⁺.

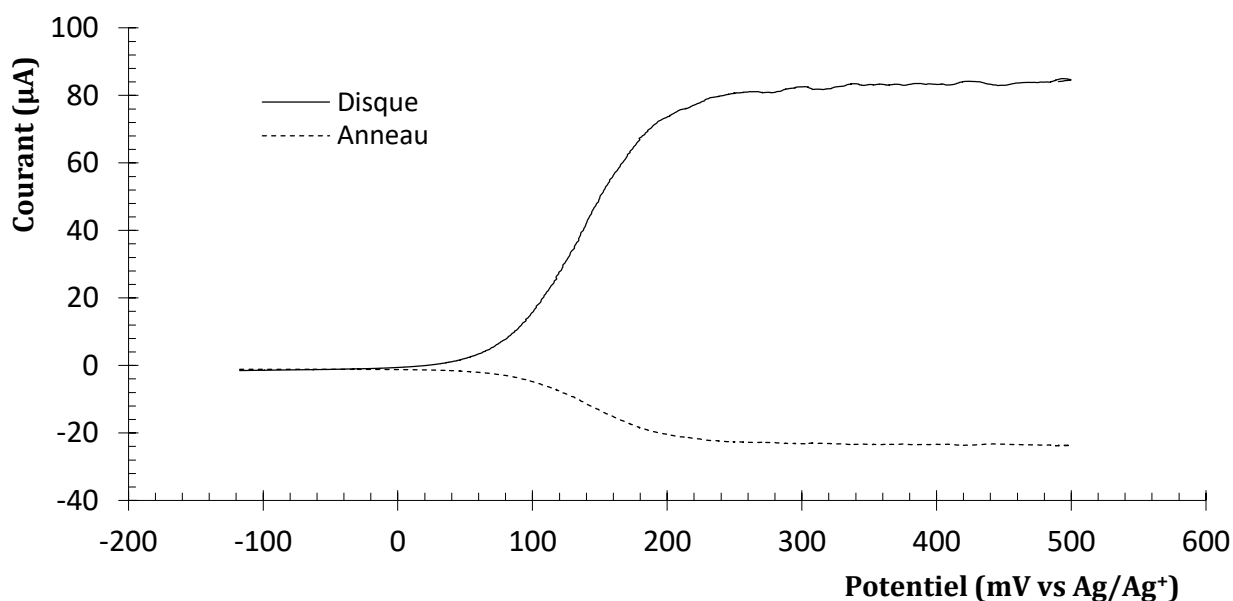


Figure 21. Voltampérométrie cyclique à 450 RPM du ferrocène sur électrode disque-anneau (disque de platine de 5 mm de diamètre) dans ACN:H₂O (99:1) + 100 mM TBAP (20 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés. L’anneau de platine est maintenu à un potentiel constant de -100 mV vs Ag/Ag⁺.

En utilisant les valeurs de potentiels présentés dans le tableau 1, il est possible de comparer le potentiel selon différentes électrodes de référence. Ainsi, pour l’électrode Ag/Ag⁺ dans l’acétonitrile avec une concentration en AgNO₃ de 10 mM, la différence est de 300 mV et de 360 mV avec AgNO₃ à 100 mM. Il n’est pas possible d’obtenir la valeur lorsque la concentration en AgNO₃ est de 1 mM, soit la concentration utilisée lors des expériences. En analysant les deux potentiels et leur concentration correspondante, l’hypothèse voulant qu’une concentration dix fois moins élevée implique une diminution de 60 mV est plausible. En utilisant la valeur de 300 mV pour rapporter le potentiel par rapport à ECS, la valeur de 440 mV vs ECS est obtenue pour le couple ferrocène/ferrocénium. En utilisant plutôt la valeur extrapolée

de 240 mV pour 1 mM AgNO₃, le potentiel du couple est 380 mV vs ECS, exactement le même que celui rapporté par Connelly et Geiger. Cela permet de valider la référence utilisée ainsi que les potentiels rapportés.

Puisque les conditions d'expérience sont sensiblement toujours les mêmes, ce résultat est important pour rapporter les potentiels observés de façon formelle, par rapport au couple ferrocène/ferrocénium. Ainsi, pour toutes les expériences effectuées dans ACN:H₂O (99:1) et 100 mM TBAP, il suffit d'ajouter 140 mV au potentiel mesuré par rapport au couple Ag/Ag⁺ pour rapporter le potentiel par rapport au couple ferrocène/ferrocénium.

3.2.3 Phénacétine

En se basant sur des résultats rapportés dans la littérature où le groupe utilise l'électrolyse pulsée afin de transformer la phénacétine en acétaminophène ⁽⁴⁹⁾, l'expérience d'électrolyse à potentiel constant sur le disque et l'anneau a pour but de démontrer la possibilité de coupler deux réactions électrochimiques en série sur ce type d'électrode.

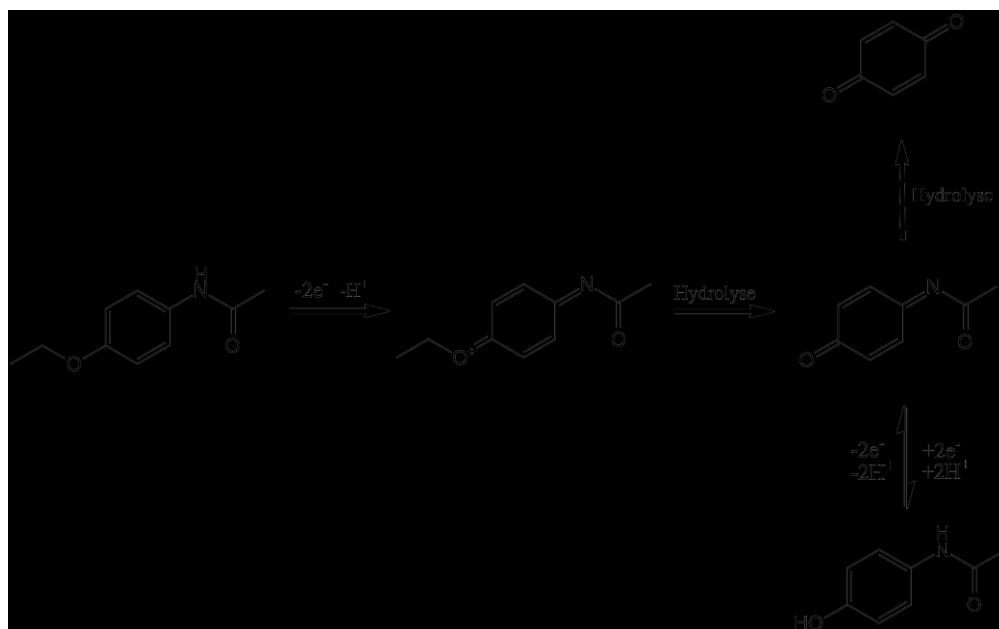


Figure 22. Mécanisme d'oxydation de la phénacétine, adapté de Nouri-Nigjeh et al. ⁽⁴⁹⁾.

À la figure 22, le mécanisme rapporté précédemment pour la phénacétine montre qu'une première réaction d'hydrolyse conduit à un composé neutre qui peut être réduit en acétaminophène. Dans un deuxième temps, l'expérience a pour but de mesurer la constante de vitesse de la réaction d'hydrolyse. Pour y arriver, le potentiel au disque est balayé pour obtenir le courant limite et le potentiel à l'anneau est maintenu constant à une valeur fixe permettant la réaction inverse et du même coup la détection de l'espèce produite au disque. En utilisant la phénacétine comme produit de départ, il devrait être possible de mesurer la constante de vitesse de la première hydrolyse. En utilisant plutôt l'acétaminophène comme produit initial, la constante de vitesse de la seconde hydrolyse pourrait être mesurée.

Les figures 23 et 24 montrent respectivement le courant au disque et à l'anneau. L'apparition d'un courant à l'anneau à la figure 24 suggère que le mécanisme proposé par Nouri-Nigjeh et ses collaborateurs n'est pas juste. Selon la figure 22, l'oxydation de la phénacétine est censée être irréversible, mais le courant mesuré à l'anneau permet de conclure à une réaction réversible couplée à une réaction chimique. La figure 24 montre la réduction du cation N-acétyl-iminoquinonoïde, avant la réaction d'hydrolyse, pour redonner la phénacétine.

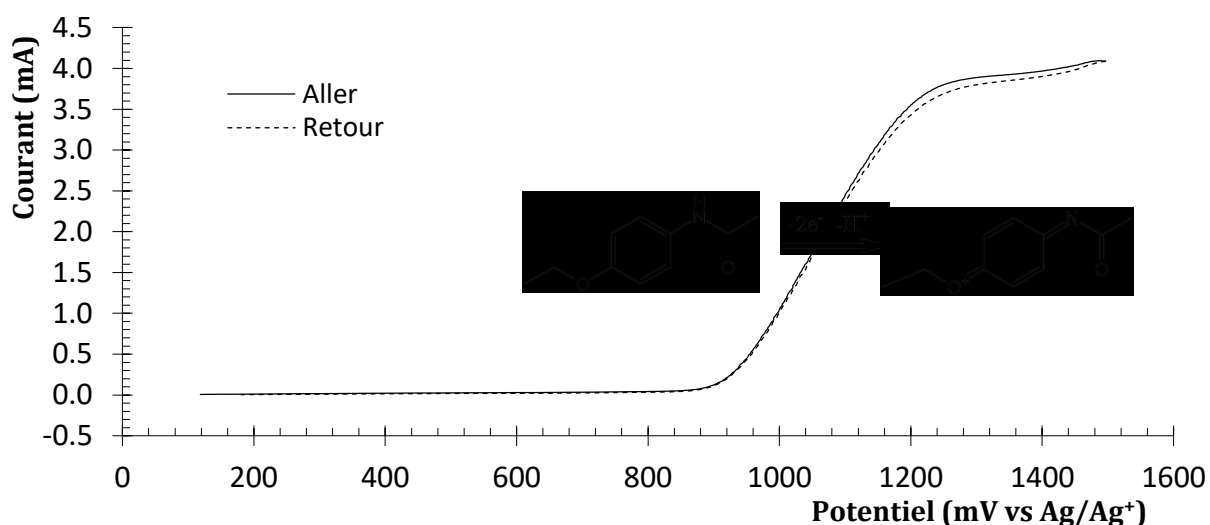


Figure 23. Voltampérométrie cyclique à 2500 RPM de la phénacétine sur électrode disque-anneau (disque de platine de 5 mm de diamètre) dans ACN:H₂O (99:1) + 100 mM TBAP (50 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.

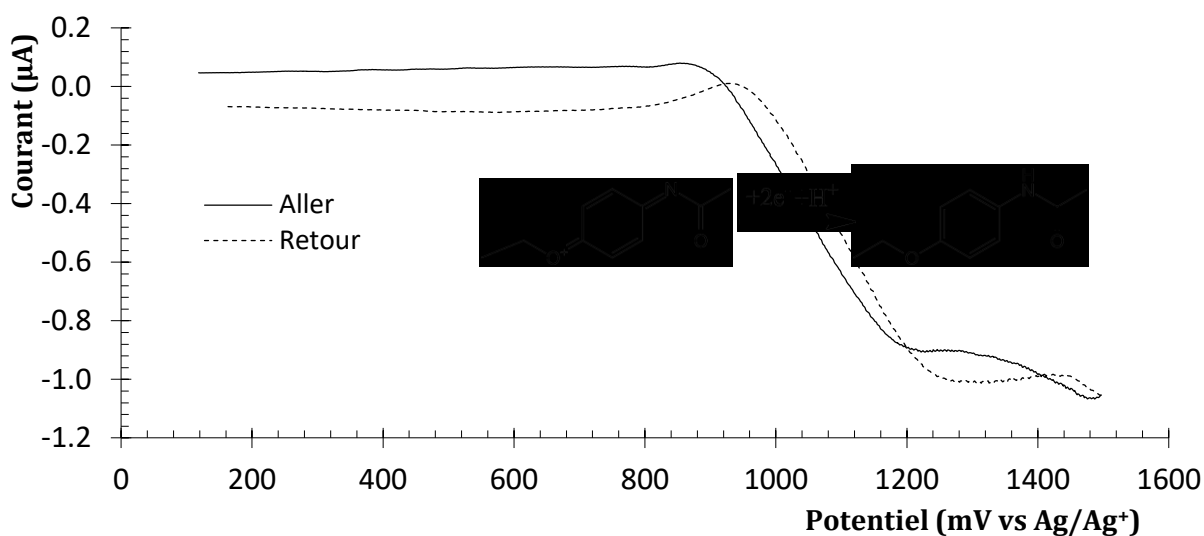


Figure 24. Voltampérométrie cyclique à 2500 RPM de la phénacétine sur électrode disque (5 mm de diamètre)-anneau (maintenue à un potentiel de 500 mV) dans ACN:H₂O (99:1) + 100 mM TBAP (50 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés : capture de l'espèce oxydée à l'anneau.

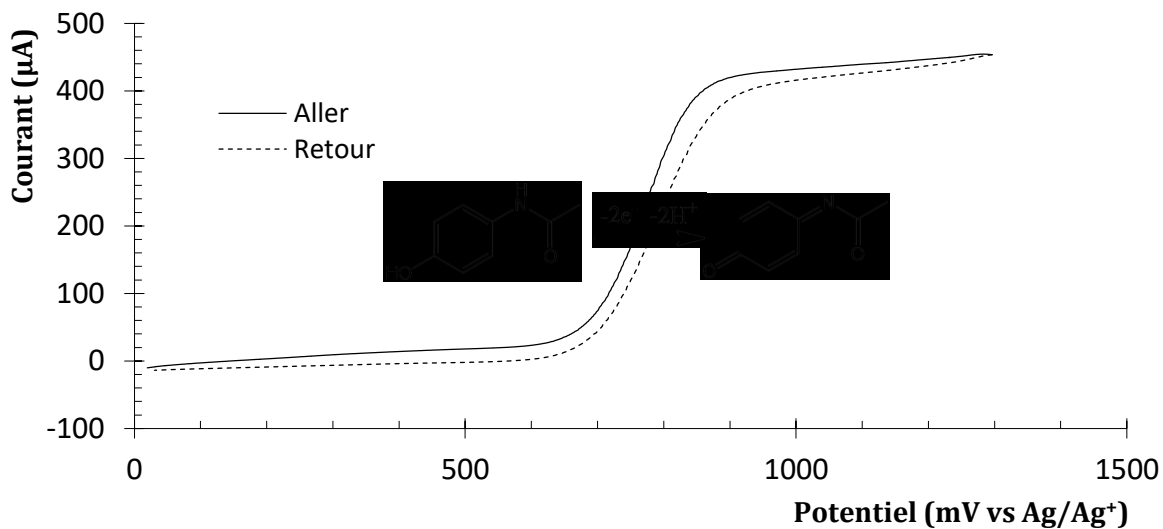


Figure 25. Voltampérométrie cyclique à 2500 RPM de l'acétaminophène sur électrode disque-anneau (disque de platine de 5 mm de diamètre) dans ACN:H₂O (99:1) + 100 mM TBAP (50 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.

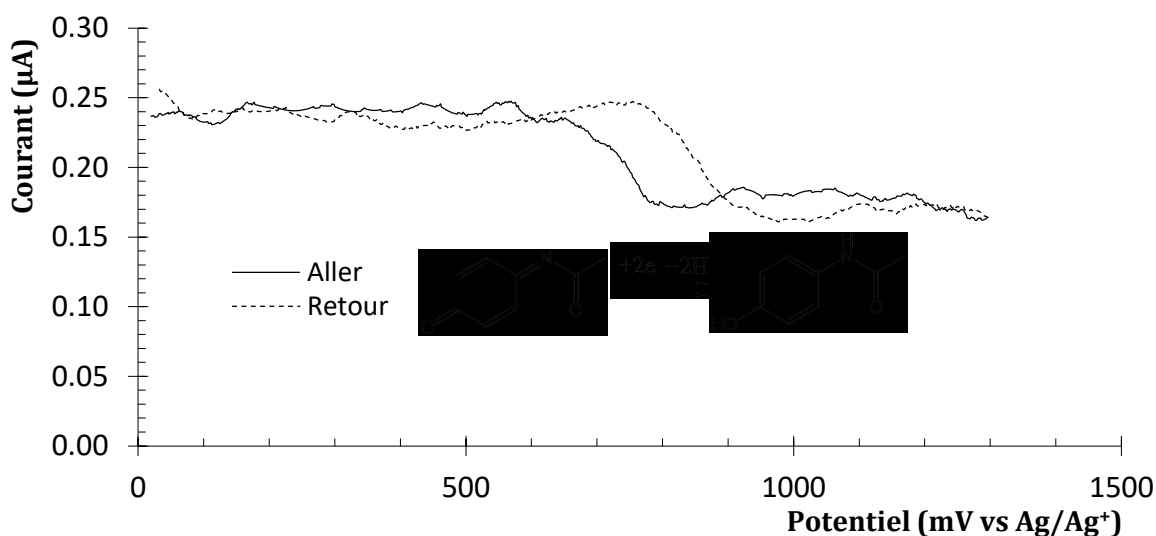


Figure 26. Voltampérométrie cyclique à 2500 RPM de l'acétaminophène sur électrode disque (5 mm de diamètre)-anneau (maintenue à un potentiel de 300 mV) dans ACN:H₂O (99:1) + 100 mM TBAP (50 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés : capture de l'espèce oxydée à l'anneau.

Pour l'acétaminophène, la même observation a lieu aux figures 25 et 26, mais la réaction avait déjà été démontrée comme réversible par le passé ⁽⁹³⁾. De plus, la figure 25 montre un potentiel de demi-vague pour l'acétaminophène de 750 mV vs Ag/Ag⁺ alors que la figure 23 montre que le potentiel de demi-vague pour la phénacétine est de 1080 mV. Cela signifie que dans les conditions d'électrolyse, l'acétaminophène formé peut être oxydé de nouveau au disque, ce qui diminue le rendement de la réaction.

Ces expériences ont été effectuées à une vitesse de rotation de 2500 RPM, la vitesse maximale pouvant être atteinte par le montage d'électrode tournante à disque et à anneau. Des vitesses de rotation plus faibles n'ont pas montré de courant à l'anneau. Selon l'équation 1.11, il faut avoir des mesures à plusieurs vitesses de rotation afin de tracer le graphique et en extraire la pente pour obtenir la constante de vitesse. Pendant le transit du disque vers l'anneau, le composé subit la réaction d'hydrolyse et n'est plus détectable à l'anneau à faible vitesse de rotation (composé en vert à la figure 27). Des expériences dans une boîte à gant sans présence d'eau permettraient

de diminuer la disparition de l'espèce détectée à l'anneau. Cela permettrait possiblement d'obtenir un courant à l'anneau qui soit plus important à des vitesses de rotation réduites.

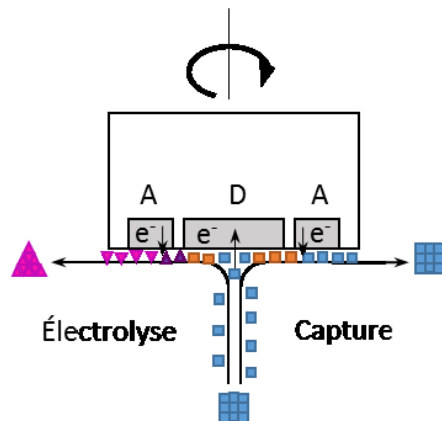


Figure 27. Schéma conceptuel des expériences. À gauche, l'expérience d'électrolyse: la phénacétine (■) donne l'acétaminophène (▼) via l'intermédiaire (●) qui subit une hydrolyse (▲). À droite, l'expérience de capture: la phénacétine (■) est oxydée au disque et l'intermédiaire (●) formé est réduit à l'anneau pour redonner la phénacétine (■).

En effectuant une électrolyse à potentiel constant au disque (+1100 mV) et à l'anneau (+300 mV), soit les conditions des expériences de capture, aucun pic correspondant à l'acétaminophène n'est observé. Par contre, l'électrolyse à potentiel constant au disque (+1100 mV) et à l'anneau (-1000 mV) a permis la transformation de la phénacétine en acétaminophène. Le rendement de réaction de 10% était comparable à ce qui avait été obtenu par électrolyse pulsée. À noter que l'agitation de la solution par l'électrode tournante à disque et à anneau provoque l'évaporation du milieu réactionnel, rendant la quantification moins véritable. À la figure 28, l'analyse par UPLC-QqTOFMS permet d'identifier l'acétaminophène à un temps de rétention (RT) de 2,0 minutes et la phénacétine à un RT de 5,0 minutes. Le système de contournement à la source du spectromètre de masse permet d'éliminer les signaux entre 0 et 1 minute et entre 5,5 et 10 minutes qui sont dus aux électrolytes supports provenant de l'étape électrochimique. Dans la solution de travail, il est intéressant de constater que le pic de phénacétine à RT 5,0 min contient des masses correspondantes exactement à celles de l'acétaminophène. Afin de démontrer que la chromatographie n'est pas en cause, une solution

d'acétaminophène n'a montré aucun pic à RT 5,0 min. L'explication de la présence d'acétaminophène dans le pic de phénacétine est qu'il se produit dans la source ESI le même type de réaction que dans la cellule électrochimique. Plus de travail serait nécessaire pour bien comprendre l'implication des différents voltages de la source ESI en vue de maximiser ce type de réaction secondaire. À la figure 29, les masses extraites à 2,0 minutes montrent l'acétaminophène et ses adduits de H^+ et Na^+ . Ce sont des espèces formées dans la source ESI.

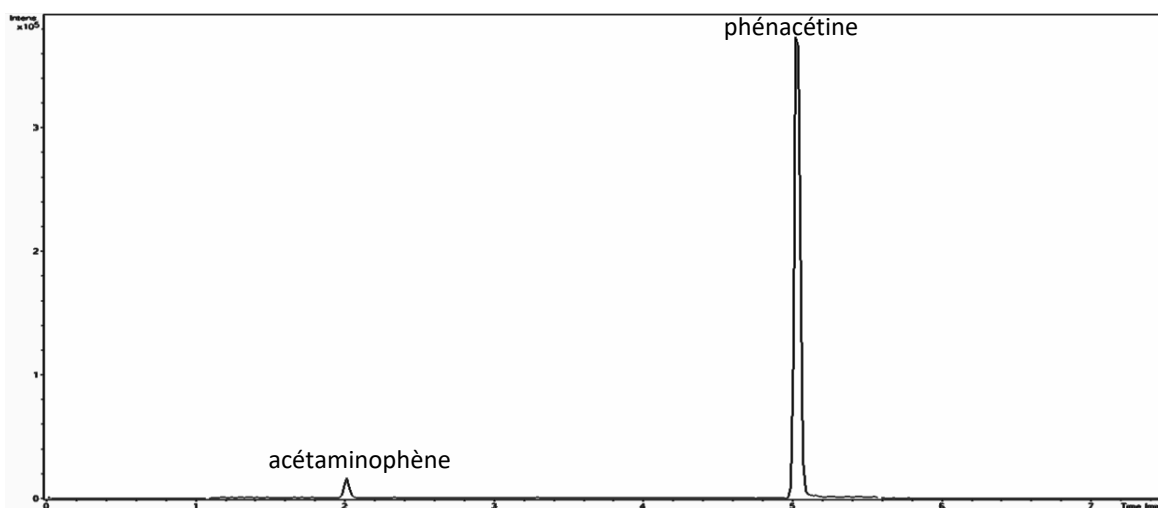


Figure 28. Chromatogramme de la phénacétine (RT 5,0) et son produit d'oxydation (RT 2,0).

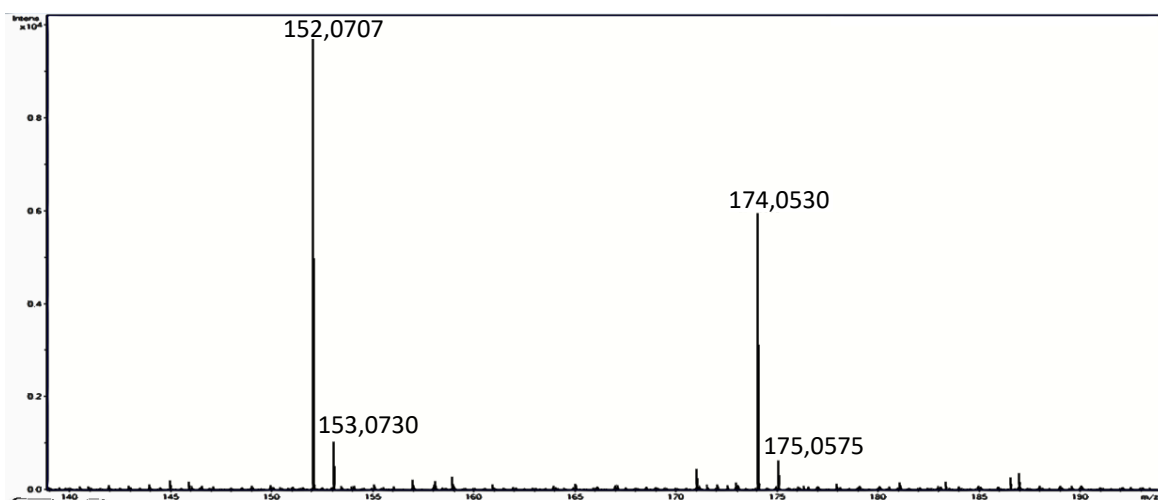


Figure 29. Spectre de masse obtenu avec le QqTOFMS montrant l'acétaminophène.

En se basant sur des résultats antérieurs utilisant plutôt l'électrolyse pulsée ⁽⁴⁹⁾, la mimique de la biotransformation de la phénacétine en acétaminophène a été effectuée sur une électrode tournante à disque et à anneau, dans une cellule électrochimique à compartiments séparés puis quantifiée par spectrométrie de masse. Ces résultats démontrent la faisabilité d'utiliser une électrode tournante à disque et à anneau comme outil de synthèse et cette technique permet de combiner deux réactions électrochimiques en série. Cette utilisation originale pour effectuer une série de réactions passant par le mécanisme ECE n'est pas répertoriée dans la littérature. Par contre, la mesure des constantes de vitesse des réactions d'hydrolyse a échoué, car le courant à l'anneau n'apparaissait qu'à la vitesse de rotation maximale applicable au système. Les expériences de capture à l'anneau ont permis de confirmer que la réaction électrochimique de l'acétaminophène est réversible. Le courant mesuré à l'anneau pour la phénacétine suggère un mécanisme d'oxydation réversible couplée à une réaction chimique plutôt que le mécanisme irréversible proposé par Nourih-Nigjeh et ses collaborateurs.

3.2.4 DAP, TMT et triméthoprim

La présence de deux pics d'oxydation pour le triméthoprim a été observée lors d'expériences précédentes. Le but de cette expérience est de déterminer le potentiel d'oxydation de chacune des fonctions oxydables sur le triméthoprim. À l'anode, le produit obtenu forme une couche à sa surface et agit comme un isolant, restreignant ainsi le contact électrique entre la solution et l'électrode. La figure 30 montre la réduction du courant observée en fonction du nombre de cycles pendant la voltampérométrie cyclique en utilisant l'électrode tournante à disque et à anneau. Dans de telles conditions, un problème majeur est la difficulté à maintenir une surface propre et reproductible ⁽⁹⁴⁾. De plus, l'isolation électrique engendrée réduit le nombre de charges transférées et la quantité de produits formés est alors négligeable. La figure 31 montre l'électrode avant et après une électrolyse d'une heure ; l'apparition d'un précipité orangé y est montrée. Afin d'investiguer davantage le comportement de passivation lors de l'oxydation du triméthoprim, mis de l'avant par les expériences en convection forcée, il a été décidé d'étudier les deux parties aromatiques de cette molécule : une contenant trois éthers méthyliques et l'autre

deux amines primaires sur une pyrimidine, un hétérocycle à six membres comprenant deux atomes d'azote.

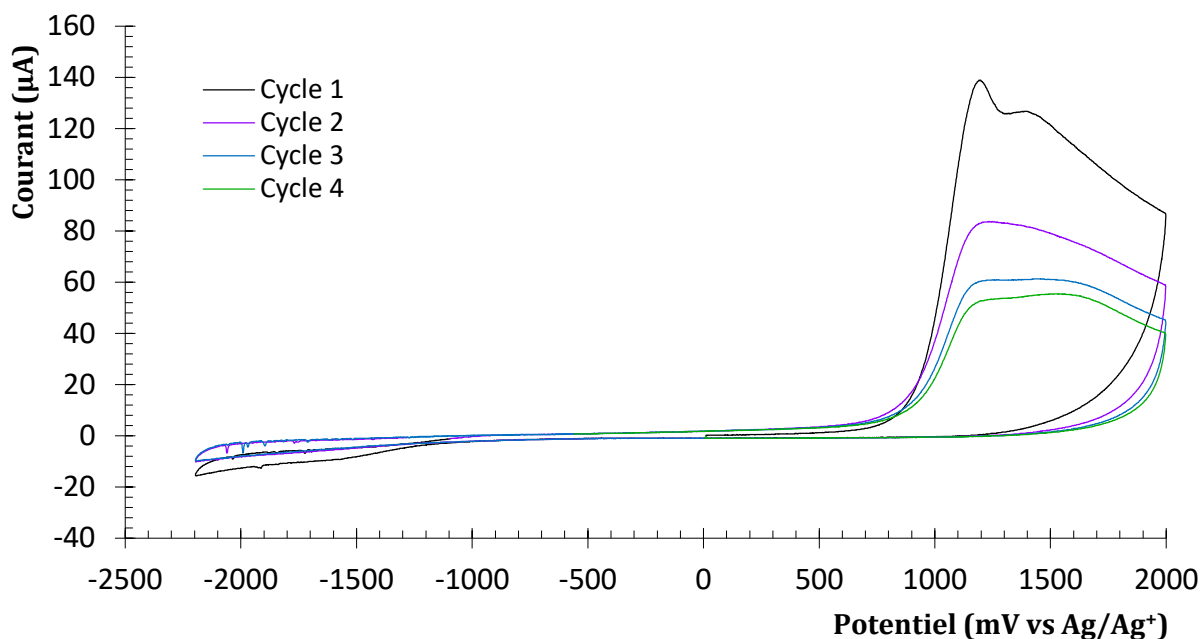


Figure 30. Voltampérométrie cyclique à 900 RPM du triméthoprim sur le disque de carbone vitreux de 5 mm de diamètre dans ACN:H₂O (99:1) + 100 mM TBAP (50 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.

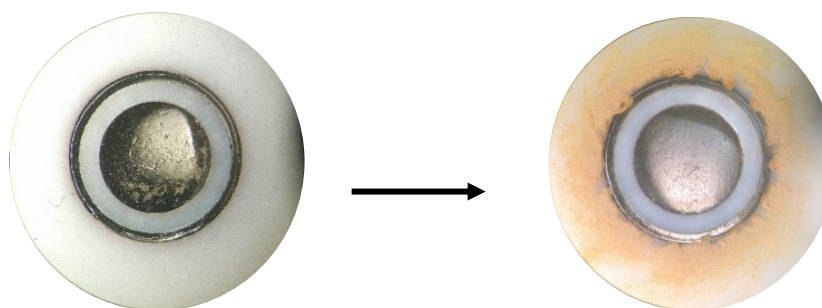


Figure 31. Photos montrant l'électrode avant et après l'électrolyse à 2500 mV vs Ag/Ag⁺.

Le 3,4,5-triméthoxytoluène (TMT) et la 2,4-diaminopyrimidine (DAP) ont été choisis comme composés modèles pour réaliser cette étude. Chacun des composés est soumis aux mêmes

conditions d'expérience dans le but de révéler des similitudes ou des différences et d'associer un comportement à la fonction électroactive associée.

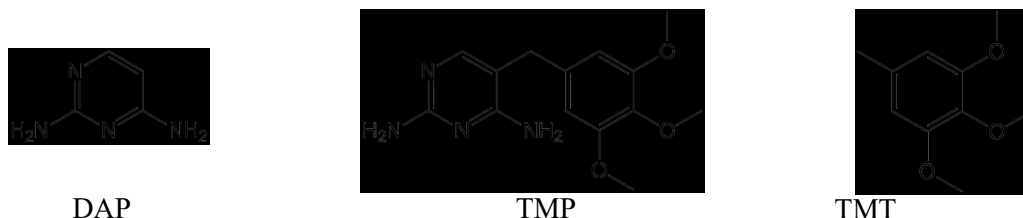


Figure 32. 2,4-Diaminopyrimidine (DAP), triméthoprim (TMP) et 3,4,5-triméthoxytoluène (TMT).

En comparant les potentiels d'oxydation des différentes espèces, la figure 33 révèle que le DAP est le plus facile à oxyder. De plus, le TMT montre plusieurs pics qui ont un potentiel voisin de celui du deuxième pic de TMP. Le premier pic du TMP se trouve à un potentiel légèrement supérieur à celui du DAP.

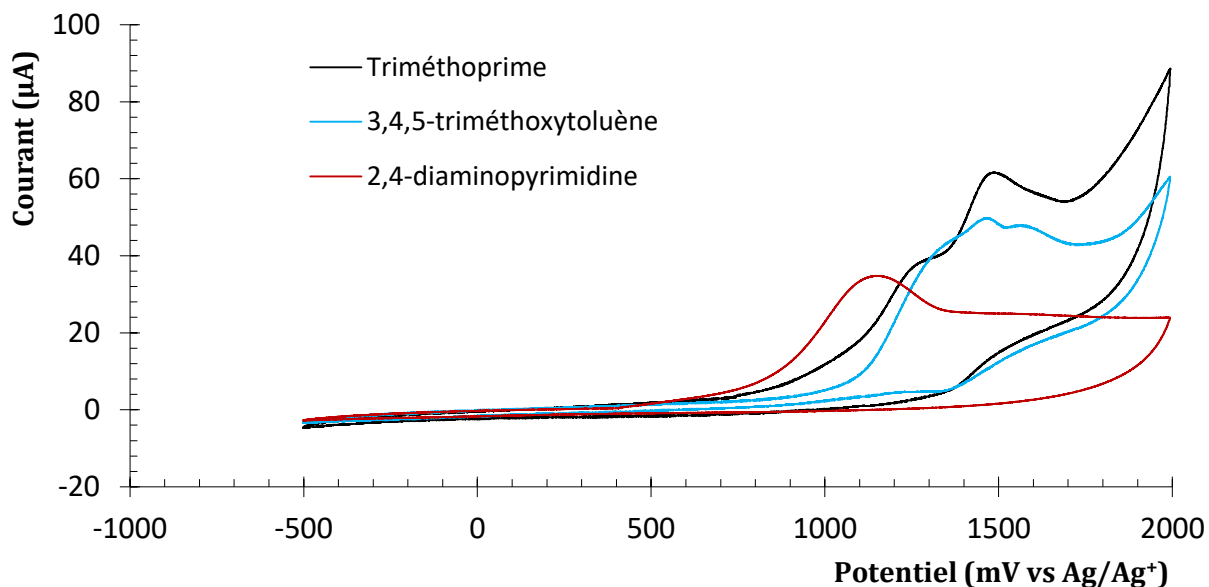


Figure 33. Voltampérométrie cyclique à 900 RPM de TMP, TMT et DAP sur le disque de carbone vitreux de 5 mm dans ACN:H₂O (99:1) + 100 mM TBAP (100 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.

La figure 34 montre des similitudes entre le comportement du triméthopprime et du DAP. Le potentiel d'oxydation au premier pic est de +1300 mV pour les deux composés, alors que celui du 3,4,5-triméthoxytoluène est légèrement décalé à +1400 mV. Le triméthopprime montre un second pic d'oxydation à +2500 mV, qui est aussi présent à +2950 mV pour le DAP ; ce comportement est absent pour le TMT. De plus, l'allure du voltampérogramme demeure la même en fonction du nombre de cycles. L'explication la plus logique veut que ces réactions à haut potentiel redonnent l'activité de la surface en retirant la couche de passivation qui se forme lors la réaction à 1300 mV. Pour cette raison, le balayage de retour est différent et montre un courant plus élevé qu'à l'aller, donnant lieu à une hystérèse tant pour le TMP que pour le DAP. La fenêtre de potentiel couverte par cette boucle d'hystérèse est plus large pour le triméthopprime que pour le 2,4-diaminopyrimidine.

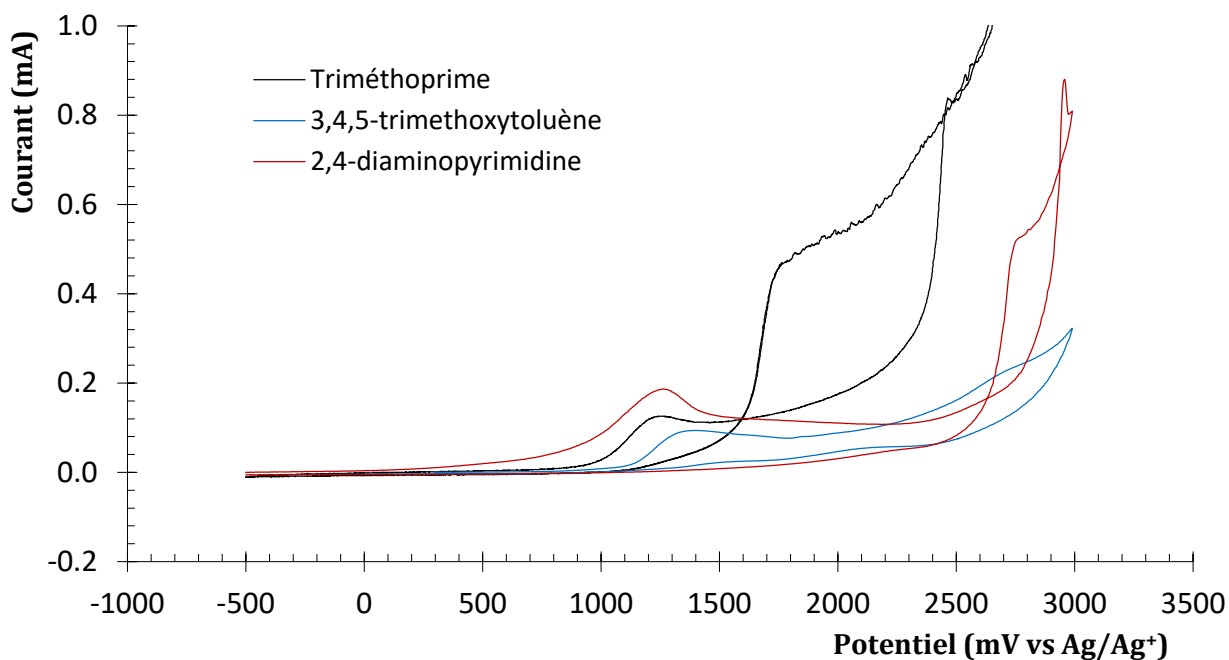


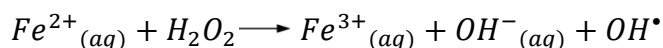
Figure 34. Voltampérométrie cyclique à 900 RPM de TMP, TMT et DAP sur le disque de carbone vitreux de 5 mm dans ACN + 100 mM TBAP (100 mV/s) dans une cellule à compartiments séparés.

Par les résultats obtenus, il est possible d'associer le premier pic d'oxydation du triméthopprime à son hétérocycle (DAP) et le second pic au TMT ⁽⁹⁵⁾. De plus, la passivation est liée à l'hétérocycle, puisque des boucles d'hystérèse sont présentes pour DAP et TMP alors que ce comportement est absent pour le TMT. D'après le mécanisme proposé précédemment pour l'oxydation du triméthopprime à la figure 18, l'acidité du milieu augmente par la libération de proton. Cela pourrait avoir comme effet de protoner et de désactiver le triméthopprime qui arrive à la surface de l'électrode, empêchant la continuité de la réaction électrochimique.

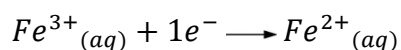
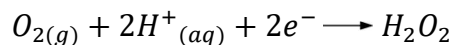
3.3 Dégradation indirecte

3.3.1 Carbamazépine

Les cellules produisent constamment des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène comme sous-produits de l'activité métabolique. Une voie pour étudier ces produits de transformation est l'emploi de la réaction de Fenton soutenue par électrochimie pour produire l'hydroxyle radicalaire. Les expériences de dégradation indirecte sont effectuées dans une cellule à un seul compartiment en maintenant un apport constant d'oxygène à la solution. La solution est acidifiée à pH 2,7 par ajout d'acide sulfurique. L'expérience est réalisée en mode galvanostatique à 5 mA/cm² sur une électrode de carbone vitreux de 7 mm de diamètre. La réaction de Fenton fait intervenir le peroxyde d'hydrogène et le fer(II) et s'effectue au sein de la solution selon l'équation 1.12:



Les réactifs de Fenton sont formés électrochimiquement *in situ*. Le peroxyde d'hydrogène est généré, en milieu acide, à partir de l'oxygène dissous selon l'équation 1.13 et le fer(III) est régénéré en fer(II) selon l'équation 1.14:



La carbamazépine est choisie en raison de sa prévalence marquée dans les eaux de surface⁽⁶⁾ et parce que ses produits issus de transformations oxydatives sont bien connus^(3,4), ce qui facilite l'interprétation des résultats. Le milieu réactionnel est dilué 1:1000 dans l'eau. Les analyses UPLC-QqTOFMS des produits de la carbamazépine, générés avec le montage électro-Fenton et la réaction avec OH•, montrent la formation de plusieurs produits de transformation, ce qui nécessite un traitement de données particulier. Cette technique a déjà été appliquée pour la détection de produits issus de l'ozonation de la lévofloxacine au sein de notre groupe de recherche⁽⁹⁰⁾. L'analyse des produits du système électro-Fenton nécessite une comparaison entre un triplicata de solutions avant et après électrolyse. L'utilisation de la plateforme XCMS-Online permet de mettre en relief les principaux produits présents après l'électrolyse par une analyse statistique présentée dans le tableau 11. Les plus importants sont le 1-(2-benzaldéhyde)-4-hydro-(1,3)-quinazoline-2-one ou BQM et deux composés avec une formule chimique suggérant la présence d'un ou deux groupements hydroxyles: C₁₅H₁₂O₂N₂ (hydroxycarbamazépine avec *m/z* 253,0972) et C₁₅H₁₂O₃N₂ (dihydroxycarbamazépine avec *m/z* 269,0921). Pour l'hydroxycarbamazépine, les pics [M+H]⁺ et [M+Na]⁺ sont séparés par plus de 0,3 min, suggérant la présence d'isomères.

Tableau 11. Résultats de l'analyse différentielle effectuée avec XCMS-online.

Pics (<i>m/z</i>)	TR (min)	Fold change	p-value	Intensité (hauteur du pic)	Formule chimique (nom)	Différence de formule avec carbamazépine	Δ <i>m</i> (mDa)
237,1023	6,82	4,14	0,000002	1209570	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O (CBZ)	-	-0,1342
251,0814	4,80	101,53	0,002037	63862	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ (BQM)	+O -2H	0,1436
273,0633	4,78	66,40	0,004201	29399	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ (BQM)		0,0558
253,0972	5,01	97,28	0,000137	55719	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	+O	-0,0126
275,0793	5,36	67,59	0,001878	26282			-0,1845
269,0921	4,78	5,48	0,003601	3120	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₃	+2O	-0,0251

Dans le tableau 11, le « fold change » donne une idée de l'augmentation ou la diminution de la hauteur du pic correspondant. La « p-value » renseigne sur la certitude que le résultat n'est pas simplement le fruit du hasard. À la figure 35, le chromatogramme de l'ion extrait correspondant

à l'hydroxycarbamazépine indique que plusieurs isomères sont présents et que leur nombre correspond aux différents sites d'hydroxylation possibles dans la molécule.

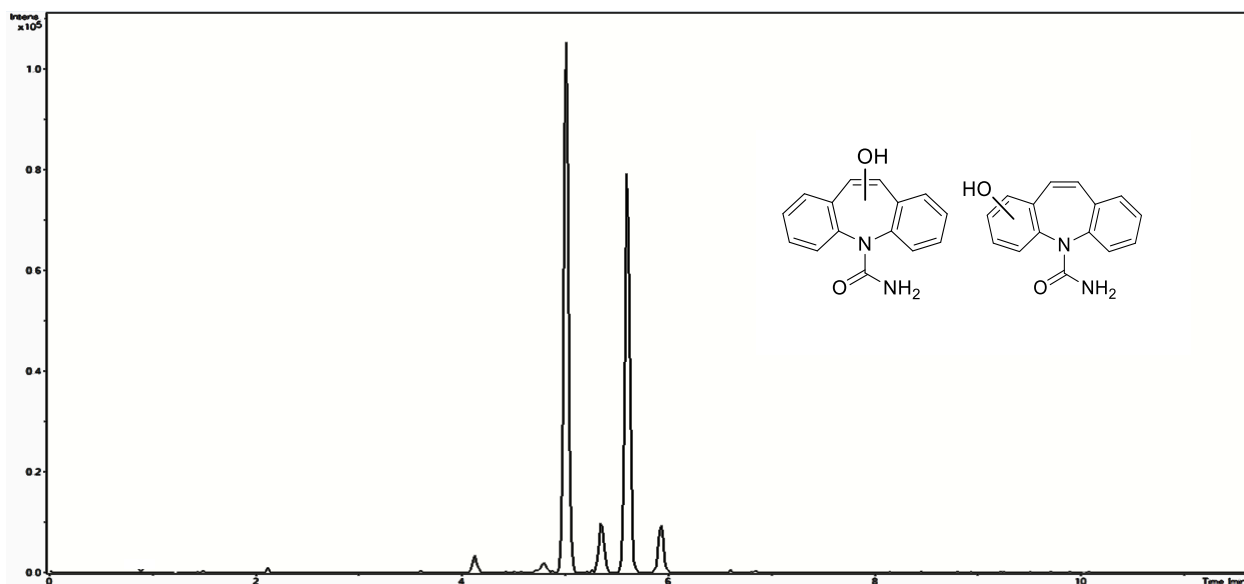


Figure 35. Chromatogramme de l'ion extrait à m/z 253,0972 $\pm$ 0,005. Les pics correspondent aux différents isomères possibles de l'hydroxycarbamazépine.

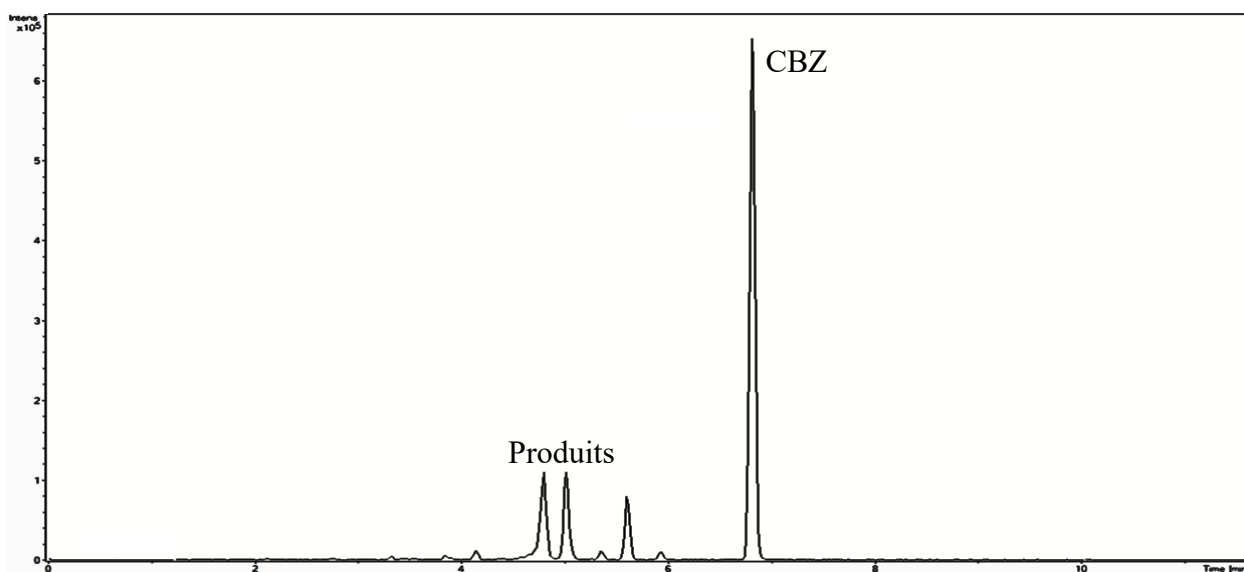


Figure 36. Chromatogramme du pic de base (BPC) de la carbamazépine après l'électro-Fenton.

Une comparaison des aires sous la courbe pour la carbamazépine, entre avant et après l'électro-Fenton, montre une diminution de 70%. Un temps de réaction trop long fait disparaître complètement la carbamazépine, mais aussi tous ses produits de transformation. De plus, la fragmentation de BQM, présenté au tableau 12, permet de confirmer son identité par comparaison des transitions m/z 251,0810→208,0750 et m/z 251,0812→180,0805 avec les transitions m/z 250,9→207,9 et m/z 250,9→180,0 rapportées par un autre groupe ⁽³⁴⁾.

Tableau 12. Fragmentation de BQM sous 30 eV par UHPLC-QqTOFMS.

Ion précurseur (m/z)	Formule chimique	Ions produits (m/z)	I_{rel} (%)
251,0810	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ (BQM)	223,0863	4
		208,0752	53
		195,0674	12
		180,0805	100

Ces résultats soulignent le manque de sélectivité de la réaction Fenton assistée par électrochimie pour reproduire les réactions d'oxydation catalysées par les enzymes du cytochrome P450. Ils montrent aussi une ressemblance avec les produits de transformation issus d'autres techniques d'oxydation comme l'ozonation^(3,4). Puisque les produits peuvent être séparés par chromatographie liquide, il est possible d'isoler les pics d'intérêt dans le but d'étudier les ions produits par fragmentation et d'y associer les structures correspondantes. Il serait alors possible de générer des listes de composés susceptibles de se retrouver dans des échantillons environnementaux, sans la complexité additionnelle liée à tous les autres composés susceptibles d'être présents dans la matrice. Les deux méthodes électrochimiques présentées dans cet ouvrage sont des outils qui permettent d'étudier les produits de transformation de molécules avec un modèle simplifié. La complexité qui se retrouve à l'échelle de l'environnement est nettement supérieure à ce modèle et les résultats obtenus électrochimiquement devraient être validés en les recherchant, par exemple, à même les effluents d'une station d'épuration.

3.3.2 Triméthoprim

Précédemment, le triméthoprim a été étudié par une dégradation directe et a montré la formation de α -hydroxytriméthoprim. Un groupe a aussi montré sa formation en utilisant l'électro-Fenton mais dans un montage légèrement différent, utilisant une contre-électrode en diamant dopé en bore (BDD)⁽⁹⁶⁾. Afin de connaître si d'autres produits peuvent être obtenus, la même approche que pour la carbamazépine est employée pour l'étude de dégradation du triméthoprim par électro-Fenton. Une caractérisation des différents produits issus de réactions avec l'hydroxyle radicalaire est détaillée et l' α -hydroxytriméthoprim a été détecté. Une courbe de calibration de triméthoprim permet sa quantification en fonction du temps. Pour les produits de transformation, il n'était pas possible d'obtenir suffisamment d'information pour élucider leur structure. Une méthode en chromatographie liquide semi-préparatoire a été tentée, mais il n'a pas été possible d'obtenir une quantité appréciable de produits pour une identification en résonance magnétique nucléaire. La quantification n'étant pas possible, l'aire sous la courbe est rapportée.

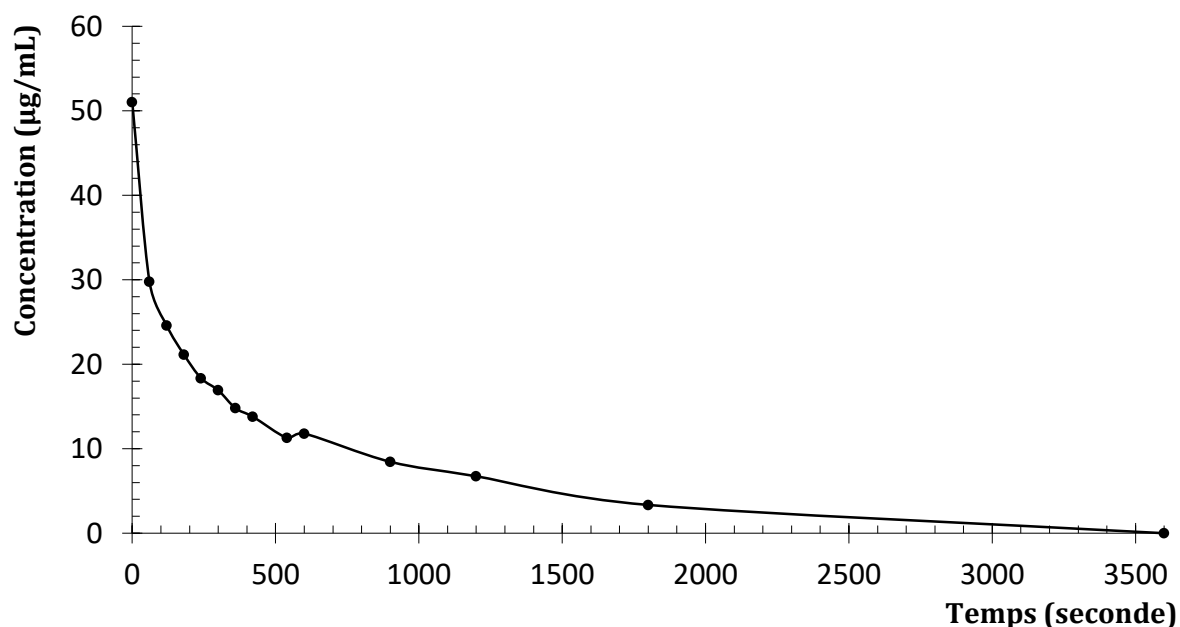


Figure 37. Cinétique de dégradation de triméthoprim de la réaction électro-Fenton.

La figure 37 montre la cinétique de dégradation de TMP en fonction du temps. Après une heure de réaction, le composé a pratiquement disparu. La figure 38 montre plutôt la cinétique d'apparition de différents produits issus de la dégradation de TMP. Il y a d'abord apparition des produits qui atteignent leur concentration maximale vers 750 secondes, soit un peu plus de 12 minutes. Après ce maxima, la dégradation des produits formés conduit à une disparition totale après une heure, à l'exception du produit ayant un m/z 237,0978. Les produits de transformation présentés dans la cinétique sont ceux qui étaient apparents dans le chromatogramme du pic de base (BPC).

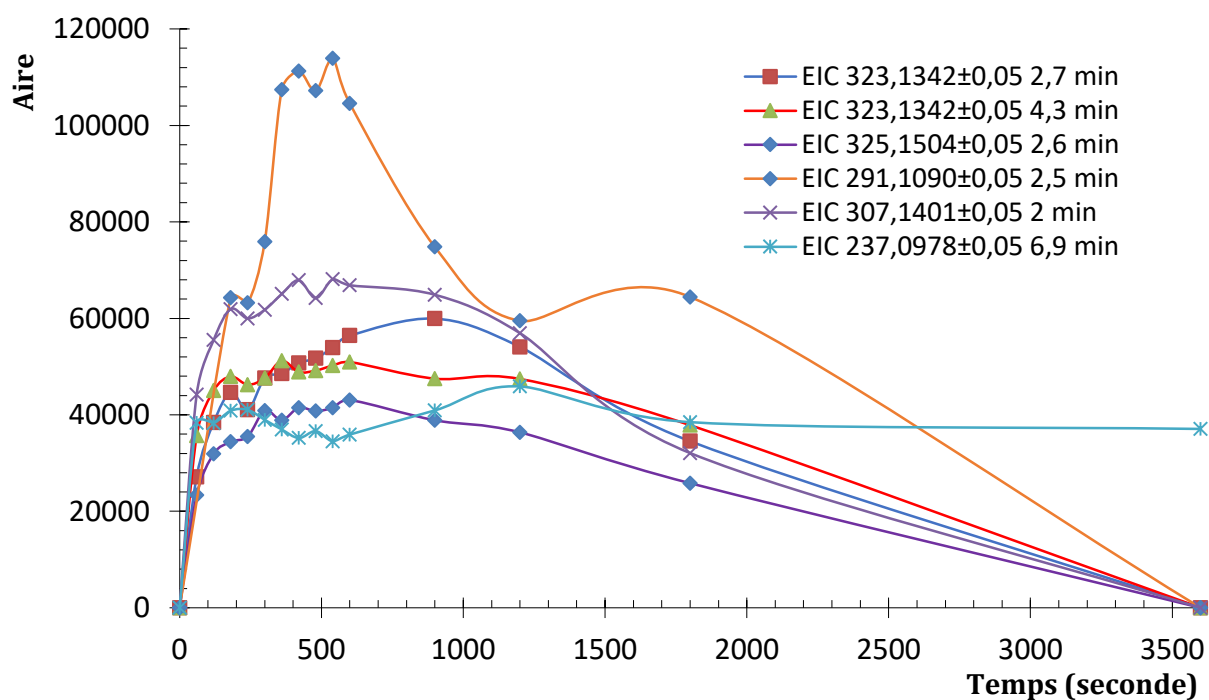


Figure 38. Cinétique des produits issus de la réaction électro-Fenton sur le triméthoprine.

À la figure 38, il est possible de constater la présence d'un composé ayant le même m/z que l' α -hydroxytriméthoprine à 307,1401 Da. De plus, les ions produits par fragmentation sont les mêmes que ceux obtenus précédemment par une dégradation directe. Un autre produit d'intérêt est celui ayant un m/z 325,1501 Da, qui a été nommé PO325. Il a aussi été retrouvé dans les expériences de dégradation de triméthoprine dans les boues contenant des bactéries nitrifiantes

et les ions produits par fragmentation, présentés au tableau 13, sont aussi les mêmes que ceux rapportés précédemment ⁽⁵⁵⁾.

Tableau 13. Mesures en masse exacte de triméthoprine et de ses deux produits d'oxydation d'intérêt, PO307 et PO325, par UHPLC-QqTOFMS sous 30 eV.

Composition élémentaire	<i>m/z</i> théorique	<i>m/z</i> mesuré	Δm (mDa)	DBE
C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₃	291,1452 (Triméthoprine)	291,1456	0,4	7,5
C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₄	307,1401 (PO307)	307,1403	0,2	7,5
C ₁₄ H ₁₇ N ₄ O ₃	289,1295	289,1286	-0,9	8,5
C ₁₃ H ₁₄ N ₄ O ₃	274,1060	274,1055	-0,5	9,0
C ₁₂ H ₁₁ N ₄ O ₃	259,0826	259,0825	-0,1	9,5
C ₁₂ H ₁₁ N ₄ O ₂	243,0877	243,0875	-0,2	9,5
C ₁₄ H ₂₁ N ₄ O ₅	325,1506 (PO325)	325,1501	-0,5	6,5
C ₁₃ H ₁₈ N ₃ O ₄	280,1292	280,1285	-0,7	6,5
C ₁₂ H ₁₃ O ₄	221,0808	221,0806	-0,2	6,5
C ₁₀ H ₁₃ O ₃	181,0859	181,0861	-0,2	4,5

Contrairement aux expériences précédentes par convection forcée qui ont mis en lumière la passivation de l'électrode, la présente étude ne fait pas intervenir de réaction entre le triméthoprine et la surface de l'électrode. Les réactions conduisant à ces produits de transformation s'opèrent au sein de la solution sous l'attaque de l'hydroxyle radicalaire. Pour isoler un maximum de produits, il faut arrêter la réaction avant que ne s'amorce leur dégradation. La réaction électro-Fenton montre une fois de plus la possibilité de reproduire certaines réactions qui se produisent dans le métabolisme d'une molécule par les enzymes du cytochrome P450.

CONCLUSION

Les expériences ont porté sur l'électrochimie, directe et indirecte, afin de générer des produits d'oxydation de composés organiques d'intérêt environnemental. La LC-MS a permis d'élucider les produits de transformation de la carbamazépine, la lidocaïne, la phénacétine et le triméthoprim. Il est important de souligner le caractère rapide et pratique de ce mode de préparation en comparaison avec des méthodes *in vivo*, plus longues et laborieuses. Ces méthodes ont toutefois l'avantage d'être plus appropriées quant à la prédiction des métabolites, car elles utilisent directement les enzymes du CYP450. Par rapport à la réaction de Fenton assistée électrochimiquement, l'électrochimie dite directe est plus sélective dans la mesure où les conditions de réaction vont dicter les produits formés. En imposant le potentiel à une valeur fixe, seulement la réaction correspondante a lieu de façon majoritaire. L'obtention des mêmes produits d'oxydation de la lidocaïne qu'un autre groupe de recherche a permis la validation du montage. L'électrolyse à potentiel constant sur une électrode tournante à disque et à anneau a montré des taux de conversion similaires à ceux obtenus par électrolyse pulsée et démontré la faisabilité de coupler des réactions électrochimiques différentes au disque et à l'anneau comme outil de synthèse. Le produit d'oxydation du triméthoprim, PO307, a été identifié comme étant l' α -hydroxytriméthoprim et avait déjà été observé par des groupes de recherche utilisant d'autres méthodes d'oxydation. Un mécanisme pour la réaction électrochimique a été proposé. Le triméthoprim avait la caractéristique de former un film de passivation à la surface de l'électrode, rendant le contrôle de la réaction plus difficile que pour les médicaments précédents. En utilisant deux composés représentant les différentes fonctions électro-actives de la molécule du triméthoprim, le comportement de passivation a pu être associé à son entité 2,4-diaminopyrimidine. Les expériences d'électrochimie indirecte par électro-Fenton sont beaucoup moins sélectives dans la mesure où une multitude de produits d'oxydation étaient observés. Pour la carbamazépine, un produit d'oxydation retrouvé dans des expériences d'ozonation a aussi été observé par électro-Fenton en plus des isomères hydroxylés. Pour le triméthoprim, le même produit d'oxydation, PO307, a été observé pour les méthodes directes et indirectes. Un autre composé issu du métabolisme de bactérie, PO325, a été seulement

observé dans les expériences d'électrochimie indirecte. Les méthodes directes et indirectes montrent chacune des avantages et des inconvénients. La méthode directe est plus sélective mais plus laborieuse. La méthode indirecte s'affranchit des problèmes liés à la modification de la surface en cours d'expérience. Une limitation des expériences effectuées est le temps passé entre la synthèse et l'analyse par spectrométrie de masse, car seulement les produits stables peuvent être détectés. En ayant recours à une cellule à débit continu dont l'effluent est amené directement au spectromètre de masse, l'analyse des produits d'oxydation est plus directe et rapide. En résumé, des méthodes électrochimiques accompagnées d'analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ont permis de générer des produits de transformation de composés pharmaceutiques qui sont les mêmes que les métabolites rapportés pour des techniques *in vivo*. Afin de pallier à une zone grise dans le règlement sur la qualité de l'eau potable et par le fait même protéger nos sources d'eau douce où vit une panoplie d'organismes aquatiques, il serait intéressant d'étendre ces expériences d'oxydation par électrochimie à d'autres contaminants. Des listes de produits possibles pour chaque composé permettraient un suivi plus adéquat des cours d'eau servant à alimenter les grandes agglomérations en eau potable. Avec des expériences évaluant la toxicité de certains métabolites, rendus disponibles par les expériences d'électrochimie décrites dans le présent texte, il serait possible d'obtenir assez d'arguments pour mettre à jour le règlement sur la qualité de l'eau potable afin d'y inclure de nouveaux contaminants. L'effet de cette modification à la loi serait de forcer les stations d'épuration à rendre plus performants les procédés de traitement des eaux usées. Enfin, on trouverait moins de médicaments dans les milieux naturels, il y aurait moins de perturbation dans les populations affectées et il devrait y avoir un impact positif au niveau de la santé publique, car l'eau potable serait exempte de molécules bioactives.

BIBLIOGRAPHIE

1. W.C. LI, *Environmental pollution*, **187**, 193 (2014).
2. P. HOWARD, R. TWYXCROSS, J. SHUSTER, M. MIHALYO et A. WILCOCK, *Journal of pain and symptom management*, **44**, 763 (2012).
3. A.B.A. BOXALL, *EMBO reports*, **5**, 1110 (2004).
4. M. PERA-TITUS, V. GARCIA-MOLINA, M.A. BANOS, J. GIMÉNEZ et S. ESPLUGAS *Applied Catalysis B: Environmental*. **47**, 219 (2004).
5. Gouvernement du Québec, *Règlement sur la qualité de l'eau potable*, 38 (2015).
6. S.D. RICHARDSON et T.A. TERNES, *Analytical chemistry*, **83**, 4614 (2011).
7. E.A. SANDILANDS et D. NICHOLAS-BATEMAN, *Specific substances*, **44**, 185 (2016).
8. L. VAN HAANDEL, J.L. GOLDMAN, R.E. PEARCE et J.S. LEEDER, *Chemical research in toxicology*, **27**, 211 (2014).
9. G. SIEST, E. JEANNESSON et S. VISVIKIS-SIEST, *Clinica chimica acta*, **381**, 26 (2007).
10. K.A. KIDD, P.J. BLANCHFIELD, K.H. MILLS, V.P. PALACE, R.E. EVANS, J.M. LAZORCHAK et R.W. FLICK, *Proceedings of the national academy of sciences*, **104**, 8897 (2007).
11. P.A. SEGURA, P. KAPLAN et V. YARGEAU, *Chemistry central journal*, **7**, 74 (2013).
12. E. DE LAURENTIIS, S. CHIRON, S. KOURAS-HADEF, C. RICHARD, M. MINELLA, V. MAURINO, C. MINERO et D. VIONE, *Environmental science & technology*, 2012, **46**, 8164 (2012).
13. V. YARGEAU, A. LOPATA et C. METCALFE, *Water quality research journal of Canada*, **42**, 231 (2007).
14. F.P. GUENGERICH, *Chemical research in toxicology*, **14**, 611 (2001).
15. J.T. GROVES et Y.Z. HAN, *Cytochrome P450, structure, mechanism, and biochemistry*. chapitre 1, New York : De Montellano PRO (ed). Plenum Press (1995).
16. M.L. URSO et P.M. CLARKSON, *Toxicology*, **189**, 41 (2003).
17. B. GILLHAM, D.K. PAPACHRISTODOULOU et J.H. THOMAS, *Biochemical basis of medicine*. Chapitre 33, Oxford : Butterworth-Heinemann (1997).

18. J. KLAUSEN, M.A. MEIER et R.P. SCHWARZENBACH, *Journal of chemical education*, **74**, 1440 (1997).
19. W. LOHMANN et U. KARST, *Analytical and bioanalytical chemistry*, **391**, 79 (2008).
20. S. JAHN, A. NAUMANN, J. ROSCHER, K. HENSE, R. ZAZZERONI et U. KARST, *Journal of chromatography A*, **1218**, 9210 (2011).
21. U.A. ARGIKAR, J. GOMEZ, D. UNG, H.P. PARKMAN et S. NAGAR, *Drug metabolism and disposition*, **38**, 1295 (2010).
22. G.G. WILBER et G. WANG, *Journal of the air & waste management association*, **47**, 690 (1997).
23. L. BÜTER, M. VOGEL et U. KARST, *Trends in analytical chemistry*, **70**, 74 (2015).
24. EL-MAALI et N. ABO, *Bioelectrochemistry*, **64**, 99 (2004).
25. A.A. BLETSOU, J. JEON, J. HOLLENDER, E. ARCHONTAKI et N.S. THOMAIDIS, *Trends in analytical chemistry*, **66**, 32 (2015).
26. G. DIEHL et U. KARST, *Analytical and bioanalytical chemistry*, **373**, 390 (2002).
27. U. JURVA, H.V. WIKSTRÖM, L. WEIDOLF et A.P. BRUINS, *Rapid communications in mass spectrometry*, **17**, 800 (2003).
28. U. BUSSY et M. BOUITITA, *Chemical research in toxicology*, **27**, 1652 (2014).
29. S. JAHN et U. KARST, *Journal of chromatography A*, **1259**, 16 (2012).
30. T. HOFFMANN, D. HOFMANN, E. KLUMPP et S. KÜPPERS, *Analytical and bioanalytical chemistry*, **399**, 1859 (2011)
31. U. KARST, *Angewandte chemie international edition*, **43**, 2476 (2004).
32. W. LOHMANN, R. DÖTZER, G. GÜTTER, S.M. VAN LEEUWEN et U. KARST, *Journal of the American society for mass spectrometry*, **20**, 138 (2009).
33. H. DEJMKOVA, J. KWIECIEN, K. CIZEK, J. CERMAK, E. VRANOVA, P. MALA, J. ZIMA et J. BAREK, *International journal of electrochemical science*, **9**, 139 (2013).
34. D.C. MCDOWELL, M.M. HUBER, M. WAGNER, U. VON GUNTEN et T.A. TERNES, *Environmental science & technology*, **39**, 9014 (2005).
35. A. GARCIA-AC, P.A. SEGURA, L. VIGLINO, A. FÜRTÖSM, C. GAGNON, M. PRÉVOST et S. SAUVÉ, *Journal of chromatography A*, **1216**, 8518 (2009).

36. L. BERTILSSON et T. TOMSON, *Clinical pharmacokinetics*, **11**, 177 (1986).
37. R.E. PEARCE, G.R. VAKKALAGADDA et J.S. LEEDER, *Drug metabolism and disposition*, **30**, 1170 (2002).
38. J. BERNADOU et B. MEUNIER, *Advanced synthesis & catalysis*, **346**, 171 (2004).
39. H. FABER, H. LUTZE, P.L. LAREO, L. FRENSEMEIER, M. VOGEL, T.C. SCHMIDT et U. KARST, *Journal of chromatography A*, **1343**, 152 (2014).
40. T. JOHANSSON, L. WEIDOLF et U. JURVA, *Rapid communications in mass spectrometry*, **21**, 2323 (2007).
41. J.G. TEIXEIRA, A. VEIGA, A.J.P. CARVALHO et D.M. TEIXEIRA, *Electrochimica Acta*, **108**, 51 (2013).
42. B. SEIWERT, N. GOLAN-ROZEN, C. WEIDAUER, C. RIEMENSCHNEIDER, B. CHEFETZ, Y. HADAR et T. REEMTSMA, *Environmental science & technology*, **49**, 12342 (2015).
43. L. ZHU, B. SANTIAGO-SCHÜBEL, H. XIAO, B. THIELE, Z. ZHU, Y. QIU, H. HOLLERT et S. KÜPPERS, *Chemosphere*, **131**, 34 (2015).
44. V.M. MONSALVO, J. LOPEZ, M. MUNOZ, Z.M. DE PEDRO, J.A. CASAS, A.F. MOHEDANO et J.J. RODRIGUEZ, *Chemical engineering journal*, **264**, 856 (2015).
45. M.W. GEMBORYS, G.W. GRIBBLE et G.H. MUDGE, *Journal of medicinal chemistry*, **21**, 988 (1978).
46. D.J. MINER et P.T. KISSINGER, *Biochemical pharmacology*, **28**, 3285 (1979).
47. J.A. HINSON, *Environmental health perspectives*, **49**, 71 (1983).
48. W. LOHMANN et U. KARST, *Analytical and bioanalytical chemistry*, **386**, 1701 (2006).
49. E. NOURI-NIGJEH, R. BISCHOFF, A. P. BRUINS et H. P. PERMENTIER, *Analyst*, **136**, 5064 (2011).
50. E. NOURI-NIGJEH, H. P. PERMENTIER, R. BISCHOFF et A. P. BRUINS, *Analytical chemistry*, **82**, 7625 (2010).
51. E. NOURI-NIGJEH, H. P. PERMENTIER, R. BISCHOFF et A. P. BRUINS, *Analytical chemistry*, **83**, 5519 (2011).

52. E. NOURI-NIGJEH, A. P. BRUINS, R. BISCHOFF et H. P. PERMENTIER, *Analyst*, **137**, 4698 (2012).
53. P.A. SEGURA, M. FRANÇOIS, C. GAGNON et S. SAUVÉ, *Environmental health perspectives*, **117**, 674 (2009).
54. P.A. SEGURA, H. TAKADA, J.A. CORREA, K. EL SAADI, T. KOIKE, S. ONWONA-AGYEMAN, J. OFOSU-ANIM, E. B. SABI, O.V. WASONGA, J.M. MGHALU, A.M. SANTOS, B. NEWMAN, S. WEERTS et V. YARGEAU, *Environment international*, **80**, 89 (2015).
55. P. EICHHORN, P.L. FERGUSON, S. PÉREZ et D.S. AGA, *Analytical chemistry*, **77**, 4176 (2005).
56. K.G. MADSEN, J. OLSEN. C. SKONBERG, S.H. HANSEN et U. JURVA, *Chemical research in toxicology*, **20**, 821 (2007).
57. P.F. PEREIRA, W. PEREIRA DA SILVA, R.A. ABARZA MUNOZ et E.M. RICHTER, *Journal of electroanalytical chemistry*, **766**, 87 (2016).
58. L. RAJITH, A.K. JISSY, K.G. KUMAR et A. DATTA, *Journal of physical chemistry*, **115**, 21858 (2011).
59. D. MANSOUR, F. FOURCADE, I. SOUTREL, D. HAUCHARD, N. BELLAKHAL et A. AMRANE, *Journal of the Taiwan institute of chemical engineers*, **53**, 58 (2015).
60. P.V. NIDHEESH et R. GANDHIMATHI, *Desalination*, **299**, 1 (2012).
61. M.A. OTURAN, *Journal of applied electrochemistry*, **30**, 475 (2000).
62. E. BRILLAS, I. SIRÉS et M.A. OTURAN, *Chemical reviews*, **109**, 6570 (2009).
63. M.A. GARCIA-MORALES, G. ROA-MORALES, C. BARRERA-DIAZ, B. BILYEU et M.A. RODRIGO, *Electrochemistry communications*, **27**, 34 (2013).
64. H. OBERACHER, F. PITTERL et J.-P. CHERVET, *LC GC Europe*, 2015, **28**, 2 (2015).
65. A.K. ABDESSALEM, N. BELLAKHAL, N. OTURAN, M. DACHRAOUI et M.A. OTURAN, *Desalination*, **250**, 450 (2009).
66. A.J. BARD et M. STRATMANN, *Encyclopedia of Electrochemistry*. chapitres 1 et 2, Weinheim : Wiley-VCH, **8** (2004).
67. J.B. SPERRY et D.L. WRIGHT, *Chemical society reviews*, **35**, 605 (2008).

68. R.F. MICHELLI et P.J. ELVING, *Journal of the American chemical society*, **90**, 1989 (1968).
69. A.J. FRY, *Synthetic organic electrochemistry*. chapitre 2, New York : John Wiley & Sons (1989).
70. A.W. BOTT, *Current Separations*, **14**, 64 (1995).
71. G. GRITZNER et J. KUTA, *Pure and applied chemistry*, **56**, 461 (1984).
72. L. MEITES, *Handbook of Analytical Chemistry*. chapitre 5, New York : McGraw Hill (1963).
73. Y. MUGNIER, E. LAVIRON, *Journal of electroanalytical chemistry*, **110**, 375 (1980).
74. M.A. ISCHAY et T.P. YOON, *European journal of organic chemistry*, 3359 (2012).
75. J. YOSHIDA, K. KATAOKA, R. HORCAJADA et A. NAGAKI, *Chemical reviews*, **108**, 2265 (2008).
76. V.G. LEVICH, *Physicochemical hydrodynamics*. chapitre 2, New Jersey : Englewood Cliffs (1962).
77. J. HERRANZ, A. GARSUCH et H.A. GASTEIGER, *The journal of physical chemistry C*, **116**, 19084 (2012).
78. U. JURVA, H.V. WIKSTRÖM et A.P. BRUINS, *Rapid communications in mass spectrometry*, **16**, 1934 (2002).
79. C. OLOMAN et A.P. WATKINSON, *The Canadian journal of chemical engineering*, **53**, 268 (1975).
80. C. OLOMAN et A.P. WATKINSON, *Journal of applied electrochemistry*, **9**, 117 (1979).
81. T. HARRINGTON et D. PLETCHER, *Journal of the electrochemical society*, **146**, 2983 (1999).
82. E. GELPI, *Journal of mass spectrometry*, **43**, 419 (2008).
83. J.J. CALVETE, *Methods in molecular biology*, 61 (2014).
84. C. BRUNNÉE, *International journal of mass spectrometry and ion processes*, **76**, 125 (1987).
85. P. KEBARLE et L. TANG, *Analytical chemistry*, **65**, 972 (1993).

86. J.H. GROSS, *Mass spectrometry second edition*. chapitres 2 et 3, New York : Springer heidelberg dordrecht, (2010).
87. S. PLATTNER, R. ERB, J.P. CHERVET et H. OBERACHER, *Analytical and bioanalytical chemistry*, **406**, 213 (2014).
88. J.C. SCHWARTZ, M.W. SENKO et J.E.P. SYKA, *Journal of the American society for mass spectrometry*, **13**, 659 (2002).
89. R. TAUTENHAHN, G.J. PATTI, D. RINEHART et G. SIUZDAK, *Analytical chemistry*, **84**, 5035 (2012).
90. P.A. SEGURA, K. SAADI, A. CLAIR, M.A. LECOURS et V. YARGEAU, *Water science & technology*, **72**, 1578 (2015).
91. S. POIRIER-LARABIE, P.A. SEGURA et C. GAGNON, *Science of the total environment*, **557-558**, 257 (2016).
92. N.G. CONNELLY et W.E. GEIGER, *Chemical Reviews*, **96**, 877 (1996).
93. D. J. MINER, J. R. RICE, R. M. RIGGIN et P. T. KISSINGER, *Analytical chemistry*, **53**, 2263 (1981).
94. H. LUND et O. HAMMERICH, *Organic Electrochemistry: Fourth Edition, Revised and Expanded*. chapitre 5, New York : Marcel Dekker, 243 (2001).
95. Y. JI, W. XIE, Y. FAN, Y. SHI, D. KONG et J. LU, *Chemical engineering journal*, **286**, 16 (2016).
96. F.C. MOREIRA, S. GARCIA-SEGURA, R. BOAVENTURA, E. BRILLAS et V. VILAR, *Applied Catalysis B: Environmental*, **160-161**, 492 (2014).