



**HAL**  
open science

# Élaboration de nouvelles biopiles glucose/O<sub>2</sub>: cathodes enzymatiques à base des bilirubine oxydases issues de *Bacillus pumilus* et de *Magnaporthe oryzae*

Lise Edembe

## ► To cite this version:

Lise Edembe. Élaboration de nouvelles biopiles glucose/O<sub>2</sub>: cathodes enzymatiques à base des bilirubine oxydases issues de *Bacillus pumilus* et de *Magnaporthe oryzae*. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0034 . tel-01217258

**HAL Id: tel-01217258**

**<https://theses.hal.science/tel-01217258>**

Submitted on 19 Oct 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES  
CHIMIE PHYSIQUE

Par Lise EDEMBE

**Élaboration de nouvelles biopiles glucose/O<sub>2</sub> : Cathodes  
enzymatiques à base des bilirubine oxydases issues de  
*Bacillus pumilus* et de *Magnaporthe oryzae***

Sous la direction de : Nicolas MANO

Soutenue le 25 mars 2015

Membres du jury :

M. RICHETTI Philippe	Directeur de Recherche, CNRS	Président
M. LE GOFF Alan	Chargé de Recherche HDR, CNRS	Rapporteur
M. MAILLEY Pascal	Ingénieur de Recherche HDR, CEA	Rapporteur
M. MANO Nicolas	Chargé de Recherche HDR, CNRS	Directeur de thèse
M. BACKOV Rénal	Professeur, Université de Bordeaux	Invité



# **Titre : Élaboration de nouvelles biopiles glucose/O<sub>2</sub> : Cathodes enzymatiques à base des bilirubine oxydases issues de *Bacillus pumilus* et de *Magnaporthe oryzae***

## **Résumé :**

Nous avons montré les performances et les limitations en électrochimie des deux nouvelles BODs de *Bacillus pumilus* et de *Magnaporthe oryzae*. La BOD de *M. oryzae* commence à réduire l'O<sub>2</sub> à un potentiel de + 0,50 V vs. Ag/AgCl et *B. pumilus* à + 0,44 V vs. Ag/AgCl. La BOD de *M. oryzae* est peu sensible à la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel rédox mais est sensible au chlore, à l'urate et aux fortes température. La BOD de *B. pumilus* a une activité élevée en présence de chlore et à 50 °C mais est sensible à la concentration de phosphate dans l'hydrogel. Cette sensibilité est compensée par une meilleure stabilité en présence d'urate, ainsi elle ne perd que 9 % d'activité après 3 heures dans le sérum de veau. La BOD de *M. oryzae* immobilisée sans médiateur est plus performante que *B. pumilus*. Son utilisation dans des nouveaux carbones poreux contenant des nanoparticules d'or a mis en évidence l'effet des conditions de séchage des enzymes et de la méthode de synthèse des nanoparticules. Les meilleures performances sont obtenues pour un séchage à 25 °C sous vide et une synthèse séquentielle des nanoparticules. Nous avons combiné ces deux BODs dans une nouvelle cathode bi-enzymatique. Au ratio optimal de 50 %v de chaque BOD, elle opère à + 0,50 V vs. Ag/AgCl avec un courant de  $-0,86 \pm 0,01 \text{ mA.cm}^{-2}$  dans les conditions physiologiques. Elle a une forte activité à haute température et en présence de chlore et une stabilité intermédiaire en présence d'urate. Dans les mêmes conditions nous avons réalisé une cathode bi-enzymatique avec *B. pumilus* et la laccase de *Podospora anserina*. Elle est également plus performante que les cathodes mono-enzymatiques correspondantes.

**Mots clés :** Bilirubine oxydases, *Bacillus pumilus*, *Magnaporthe oryzae*, urate, matériaux carbonés poreux, nanoparticules d'or, cathode bi-enzymatique

---

# **Title : Development of new glucose/O<sub>2</sub> biofuel cells : Enzymatic cathodes based on bilirubin oxidases from *Bacillus pumilus* and *Magnaporthe oryzae***

## **Abstract :**

Here we showed the performances and the limits in electrochemistry of the two new BODs from *Bacillus pumilus* and *Magnaporthe oryzae*. The onset potential for the oxygen reduction with the BOD from *M. oryzae* is + 0.50 V vs. Ag/AgCl and with *B. pumilus* is + 0.44 V vs. Ag/AgCl. The BOD from *M. oryzae* is not sensitive to the concentration of sodium phosphate in redox hydrogel but is sensitive to chloride, urate and high temperatures. The BOD from *B. pumilus* has a high activity in the presence of chloride and at 50 °C, but is sensitive to the concentration of phosphate in the hydrogel. This sensitivity is offset by an improved stability in the presence of urate, so it loses only 9 % of activity after 3 hours in calf serum. The BOD from *M. oryzae* immobilized without mediator outperforms *B. pumilus*. Its use in new porous carbon materials containing gold nanoparticles showed the effect of enzymes drying conditions of the synthesis method of the nanoparticles. The best performance is obtained for a drying at 25 °C under vacuum and a sequential synthesis of nanoparticles. We combined these two BODs in a new bi-enzymatic cathode. At the optimal ratio of 50 %v of each BOD, it operates at + 0.50 V vs. Ag/AgCl with a current density of  $-0.86 \pm 0.01 \text{ mA.cm}^{-2}$  under physiological conditions. It has a high activity at high temperatures and in the presence of chloride and an intermediate stability in the presence of urate. Under the same conditions we conceived a bi-enzymatic cathode with *B. pumilus* and laccase *Podospora anserina*. It is also more efficient than the single-enzymatic corresponding cathodes.

**Keywords:** Bilirubine oxidases, *Bacillus pumilus*, *Magnaporthe oryzae*, urate, porous carbon materials, gold nanoparticles, bi-enzymatic cathode

---

## **Unité de recherche**

Centre de Recherche Paul Pascal, CRPP UPR-8641, CNRS Université de Bordeaux  
15 Avenue du Dr Albert Schweitzer, 33600 Pessac





## **REMERCIEMENTS**

Au terme de plus de trois ans passés au Centre de Recherche Paul Pascal j'ai pu voir se concrétiser mes travaux de recherche. Je voudrais remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à l'aboutissement de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier M. Philippe Richetti, directeur du CRPP, pour son accueil au sein de son unité de recherche et pour son soutien. Je le remercie également d'avoir bien voulu présider mon jury de thèse. Je remercie Messieurs Alan Le Goff et Pascal Mailley pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que pour leurs encouragements. J'adresse un remerciement particulier M. Rénal Backov qui, depuis le master de polymères et colloïdes, as toujours cru en moi et m'a motivée à faire une thèse malgré mes réserves. Aujourd'hui je suis heureuse d'avoir suivi tes conseils et je t'en suis très reconnaissante.

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans mon directeur de thèse M. Nicolas Mano que je remercie pour cette opportunité. Il s'est toujours montré disponible pour répondre aux différentes problématiques scientifiques auxquelles j'ai dû faire face. De plus, il a été d'une aide inestimable pour la bibliographie qui est particulièrement dense dans le domaine de l'électrochimie enzymatique. Je tiens également à le remercier pour son soutien et sa compréhension lors des périodes difficiles que j'ai pu traverser durant ces trois ans dans le cadre personnel.

Pendant ces trois années j'ai également pu compter sur le soutien et l'aide des membres de l'équipe biopiles et biocapteurs. Parmi les biologistes je pense tout d'abord à M<sup>me</sup> Claire Stines-Chaumeil, je la remercie pour sa sympathie et ses lumières en enzymologie. Je remercie Sébastien Gounel pour l'aide qu'il a pu m'apporter dans la compréhension des différentes techniques d'analyses spectroscopiques des enzymes et pour nos discussions qui ont contribué à orienter ma réflexion. Je remercie également M. Jad Rouhana pour sa bienveillance envers moi, ses nombreux conseils tant sur le plan personnel que professionnel ainsi que pour son aide dans l'étude des structures cristallines des enzymes.

Ma gratitude va également aux électrochimistes de l'équipe biopiles et biocapteurs. A mon arrivée j'ai pu travailler avec M. Emmanuel Suraniti qui s'est montré d'une extrême gentillesse. Avec lui j'ai notamment appris les rudiments de la réalisation des électrodes de cryogel de carbone qui m'ont beaucoup servies par la suite. Je remercie aussi M. Jérôme

## *Remerciements*

---

Roche pour son aide, ses conseils et son amabilité. Mes remerciements vont également à Aleksandar Karajic, actuellement doctorant de troisième année, pour sa sympathie et son humour ainsi qu'à Magdalena Murawska, actuellement doctorante de première année, pour les bons moments passés en sa compagnie. Grâce à Magdalena j'ai pu enrichir mon langage de jurons polonais et entretenir mon poids de forme avec ses délicieuses pâtisseries.

Je voudrais adresser un merci tout particulier à Marine Cadet, actuellement doctorante de troisième année, avec qui j'ai partagé le même bureau pendant plus de deux ans. Marine tu es une belle personne, d'une extrême générosité, plus qu'une collègue tu es devenue une véritable amie. Merci pour ton soutien sans faille cela m'a aidée à traverser les moments les plus difficiles, je ne saurais jamais assez t'exprimer ma gratitude et ma reconnaissance.

J'ai également pu compter sur le soutien et l'amitié de Karen Bertaux, technicienne CNRS. Toujours disponible, agréable et souriante, cela a été un vrai plaisir de travailler avec toi. Bonne chance à Montpellier avec ton petit bout.

J'ai eu la chance de travailler au sein d'une équipe pluridisciplinaire, de ce fait j'ai pu collaborer avec de nombreuses personnes de domaine divers. Je tiens donc à remercier les membres du service chimie : Xavier Brilland, Stéphanie Exiga, Frédéric Louerat, Mbolotiana Rajaoarivelo, pour leur disponibilité et leur gentillesse. Je tiens à remercier l'équipe MaFIC, en particuliers Simona Ungureau et Martin Depardieu pour la réalisation des matériaux carbonés poreux.

Je remercie également les membres des différents services du CRPP avec qui j'ai pu interagir que ce soit pour des questions techniques ou administratives : Béatrice Huynh-Tan, Nathalie Touzé (accueil) Philippe Barboteau, Jean-Yves Juanico (atelier mécanique) Nadine Laffargue (bibliothèque), Corinne Amengual, Elodie Mahieux (direction), Béatrice Dupin, Elisabeth Hortolland, Josiane Parzych (gestion) Anne Facq, Philippe Hortolland, Jean-Luc Laborde, Sandrine Maillet (informatique).

Je voudrais également remercier les membres du NSysA avec qui j'ai pu collaborer que ce soit dans le cadre de mes travaux de recherche ou dans le cadre des activités du club jeunes de la société chimique de France section Aquitaine dont j'ai pu être la vice-présidente pendant un an. Je citerai donc en particulier M. Alexander Kuhn, M. Neso Sojic, M. Laurent Bouffier, M. Dodzi Zigah, M. Stéphane Reculusa et M. Matthias Heim.

## Remerciements

---

Durant ces années de thèse au Centre de Recherche Paul Pascal de nombreuses personnes m'ont témoigné leur sympathie et leur amitié et je leur en suis reconnaissante. Je remercie en particulier M<sup>me</sup> Virginie Ponsinet qui assure le suivi des doctorants pendant les trois années de thèse. Sans ta bienveillance, ton aide et tes précieux conseils je n'aurais sans doute pas pu aller au bout de cette thèse.

Bien que le travail de recherche soit passionnant, le doctorat est une expérience éprouvante pour laquelle le soutien et l'amour des proches est primordial. C'est pourquoi je les remercie tous de m'avoir accompagnée tout au long de ces trois années que ce soit en France ou depuis l'étranger. Je remercie les membres de la chorale « Voix d'Afrique » toujours présents pour moi malgré mes nombreuses absences aux répétitions. Mon chouchou Thibaud, merci d'avoir été là pour moi. La team des polyméristes : Abla, Célia, Lucie nos déjeuners « filles sexy » vont me manquer. Vivien qui m'a aussi motivée à embarquer dans cette aventure qu'est la thèse. Le beau gosse par excellence Donald qui m'a soutenue et bien conseillée dans les moments les plus difficiles. Ma chère Vanessa toujours à l'écoute et motivante. Solange et Alexandre toujours optimistes et prêts à aider. Bien sûr je remercie ma *BFF* de vingt ans Ornella toujours prête à m'écouter me conseiller et me remonter le moral.

Enfin je voudrais remercier ma famille. Tout d'abord les toulousains : mon parrain et ma marraine ainsi que leurs enfants et ma « tatie » Colette. Je remercie Jérôme, le papa de mon fils et sa famille pour leur soutien. Je remercie mon fils Ayilé « monsieur sourire », tes sourires mon petit cœur illuminent ma vie à chaque instant. Je remercie mes sœurs : Anastasie, Eliane, Claude, Arielle merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir poussée le plus loin possible. Merci à mon père qui a toujours fait tout ce qu'il fallait pour moi de son vivant et m'a appris que l'on doit se battre dans la vie et ne jamais abandonner. Je sais que tu veille sur moi de là où tu te trouves et j'espère que tu es fier de moi. Un énorme merci à ma mère, tu es mon modèle, mon inspiration, une femme forte, battante et tellement généreuse j'espère te ressembler un jour.

Pour finir, je souhaite bon courage à tous les doctorants de l'équipe pour la fin de leur thèse que je sais qu'ils soutiendront brillamment.







## Liste des abréviations

### *A*

**ABTS** : 2,2'-azinodi-[acide 3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique]

**Abu62** : Acide 62 bleu

**AMP** : Adénosine mono phosphate

**ATP** : Adénosine triphosphate

### *B*

**BOD** : Bilirubine oxydase

### *C*

**CCG** : Cryogel de carbone

**CotA** : Endospore coat protein A

**CTAB** : Bromure de tétra décyl triméthyl ammonium

**CV** : Cyclovoltammogramme

### *D*

**DMP** : 2,6-diméthoxyphénol

### *E*

**EPPG** : Electrode de graphite pyrolytique à bord plan

**EPR** : Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique

### *F*

**FAD** : Flavine adénine dinucléotide

## ***G***

**GDH** : Glucose déshydrogénase

**GOx** : Glucose Oxydase

## ***H***

**HIPE** :

**HOPG** : Electrode en graphite pyrolytique hautement orienté

**HRP** : Peroxydase de raifort

## ***I***

**ITO** : Oxyde d'indium dopé à l'étain

## ***K***

**kDa** : kilo Daltons

## ***M***

**M-BOD** : *Magnaporthe oryzae*

**MCO** : Oxydase multi-cuivre

**MWNT** : Nanotube de carbone multi-paroi

## ***N***

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NADH/NAD<sup>+</sup>** : Nicotinamide adénine dinucléotide

**NADPH/NADP<sup>+</sup>** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**NaP** : Tampon phosphate de sodium

**NMP** : N-méthyl-2-pyrrolidone

## ***O***

**OCP** : Potentiel en circuit ouvert

## ***P***

**PAA** : Polyacrylamide

**P-BOD** : *Bacillus pumilus*

**PBS** : Tampon phosphate salin

**PBSE** : Acide (1-pyrène butanoïque, ester succinate)

**PDB** : Base de données de protéines

**PEGDGE** : Poly éthylène glycol diglycidyl éther

**PLA** : Poly acide lactique

**PVDF** : Poly fluorure de vinylidène

**PVI** : Poly vinyl imidazol

**PVP** : Poly vinyl pyridine

**PQQ** : Pyrroloquinoléine quinone

## ***R***

**RBBR** : Rémozol R bleu brillant

## ***S***

**SECM** : Microscopie électrochimique à balayage

**SDS** : Sodium dodecyl sulfate

**SGZ** : Syringaldazine

**SPGE** : Electrode en graphite spectroscopique

**SWNT** : Nanotubes de carbone à paroi simple

## ***T***

**TED** : Transfert électronique direct

**TEM** : Transfert électronique médié

**TEOS** : Orthosilicate de tétraéthyle





# Sommaire

<b>Introduction générale</b> .....	1
------------------------------------	---

## **Chapitre 1 : Les bilirubine oxydases dans les biopiles enzymatiques**

Introduction.....	9
1. Les piles à combustible.....	11
1.1. Principe d'une pile à combustible.....	11
1.2. Performances d'une pile à combustible.....	12
1.3. Limitations des piles à combustible.....	14
1.4. Conclusion intermédiaire.....	15
2. Les biopiles.....	15
2.1. Les biopiles microbiennes.....	17
2.1.1. Intérêt et applications des biopiles microbiennes.....	17
2.1.2. Les transferts d'électrons dans les biopiles microbiennes.....	18
2.1.3. Limitations des biopiles microbiennes.....	19
2.2. Les biopiles enzymatiques.....	20
2.2.1. Les enzymes.....	21
2.2.1.1. Caractéristiques structurales des enzymes.....	21
2.2.1.2. Classification et nomenclature des enzymes.....	24
2.2.1.3. Cinétique enzymatique.....	25
2.2.1.4. Facteurs influençant l'activité enzymatique.....	27
2.2.2. Les enzymes utilisées dans les biopiles.....	30
2.2.2.1. Les enzymes anodiques.....	30
2.2.2.2. Les enzymes cathodiques.....	32
2.2.3. Immobilisation des enzymes sur les électrodes.....	32
2.2.3.1. L'adsorption physique.....	33
2.2.3.2. La reconstitution de l'apoenzyme.....	34
2.2.3.3. L'immobilisation par encapsulation.....	34
2.2.3.4. Le greffage covalent.....	35
2.2.3.5. Immobilisation par réticulation.....	36

2.2.3.6. Immobilisation dans un hydrogel rédox.....	37
2.2.4. Intérêt et applications des biopiles enzymatiques.....	40
2.2.4.1. Travaux précurseurs sur les biopiles enzymatiques.....	40
2.2.4.2. Avantages des biopiles enzymatiques.....	40
2.2.4.3. Limitations des biopiles enzymatiques.....	41
2.2.4.4. Applications des biopiles enzymatiques.....	42
2.2.5. La biopile enzymatique glucose/O <sub>2</sub> .....	43
2.2.5.1. Problématique.....	43
2.2.5.2. La biopile enzymatique glucose/O <sub>2</sub> étudiée au CRPP.....	45
2.3. Conclusion intermédiaire.....	46
3. Les Bilirubine oxydases dans les biopiles enzymatiques.....	47
3.1. Identification et propriétés structurales des BODs.....	48
3.1.1. Identification et classification des BODs.....	48
3.1.2. Structure du site actif et réduction de l'O <sub>2</sub> dans les BODs.....	49
3.1.2.1. Structure du site actif des BODs.....	49
3.1.2.2. Mécanisme de réduction de l'O <sub>2</sub> dans les BODs.....	51
3.1.3. Propriétés spectroscopiques des BODs.....	51
3.1.3.1. La spectroscopie UV-visible.....	52
3.1.3.2. Spectroscopie de résonance paramagnétique.....	52
3.1.3.3. Spectroscopie de résonance Raman.....	53
3.2. Caractérisation biochimique et électrochimique.....	54
3.2.1. Etudes cinétiques avec différents substrats.....	54
3.2.2. Effet de la température, du pH et du chlore.....	55
3.2.3. Caractéristiques électrochimiques.....	56
3.3. Les BODs dans les applications médicales.....	57
3.3.1. Détection de la bilirubine avec la BOD libre.....	58
3.3.2. Biocapteurs pour la détection électrochimique de la bilirubine.....	59
3.4. Les BODs dans les cathodes à oxygène.....	60
3.4.1. Les différentes stratégies d'immobilisation des BODs à la cathode.....	61
3.4.1.1. Transfert électronique direct.....	61
3.4.1.2. Transfert électronique médié.....	63
3.4.1.3. Comparaison des stratégies d'immobilisation.....	64
3.4.1.4. L'immobilisation de BODs pour le transfert électronique direct.....	67

3.4.1.4.1. Etude du mécanisme de réduction de l'oxygène.....	67
3.4.1.4.2. Elaboration de cathodes pour l'amélioration de la réduction de l'O <sub>2</sub> .....	69
3.4.1.4.2.1. Les électrodes à base de carbone.....	69
3.4.1.4.2.2. Les électrodes à base nanotubes de carbone.....	71
3.4.1.4.2.3. Les électrodes d'or.....	74
3.4.1.4.2.4. Les cathodes à air.....	74
3.4.1.4.3. L'immobilisation de BODs pour le transfert électronique médié.....	76
3.4.1.4.4. Utilisation de médiateurs rédox en solution.....	76
3.4.1.4.5. Utilisation de médiateurs rédox immobilisés.....	78
3.5. Conclusion intermédiaire.....	82
Conclusion.....	82
Références bibliographiques du Chapitre I.....	85

## **Chapitre 2 : Etude des cathodes enzymatiques de *Bacillus pumilus* et *Magnaporthe oryzae***

Introduction .....	104
1. Etudes préliminaires sur les nouvelles BODs.....	106
1.1. Identification et production de nouvelles BODs.....	106
1.1.1. Identification de <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	106
1.1.2. Identification de <i>Bacillus pumilus</i> .....	106
1.2. Caractérisation des nouvelles BODs.....	107
1.2.1. Etudes spectroscopiques.....	107
1.2.2. Propriétés biochimiques des nouvelles BODs.....	108
1.2.2.1. Etudes cinétiques.....	108
1.2.2.2. Décoloration du Rémozol R bleu brillant.....	109
1.3. Influence des paramètres physiologiques.....	109
1.3.1. Etudes de thermostabilité.....	109
1.3.2. Stabilité en fonction du pH.....	110
1.3.3. Effet de l'urée.....	110
1.3.4. Effet du chlore.....	111
1.4. Etudes électrochimiques.....	111

1.4.1. Etude électrochimique de <i>B. pumilus</i> .....	111
1.4.2. Etude électrochimique de <i>M. oryzae</i> .....	112
1.5. Conclusion intermédiaire.....	112
2. Etude comparative des BODs de <i>B. pumilus</i> et de <i>M. oryzae</i> .....	113
2.1. Comparaison des structures cristallines .....	113
2.2. Comparaison des caractéristiques des deux nouvelles BODs en électrochimie .....	114
2.2.1. Etude des potentiels de réduction de l'oxygène .....	114
2.2.1.1. Résultats expérimentaux.....	114
2.2.1.2. Hypothèses .....	116
2.2.2. Comparaison des stratégies d'immobilisation.....	117
2.2.2.1. Résultats expérimentaux.....	118
2.2.2.2. Analyses des résultats et hypothèses .....	118
2.2.3. Effet de la température .....	121
2.2.3.1. Résultats expérimentaux.....	121
2.2.3.2. Analyse des résultats et hypothèses .....	122
2.2.4. Effet du chlore et de la conductivité des tampons de mesure .....	122
2.2.4.1. Résultats expérimentaux.....	122
2.2.4.2. Analyse de l'effet du chlore sur <i>M. oryzae</i> .....	124
2.2.4.3. Analyse de l'effet du chlore sur <i>B. pumilus</i> .....	126
2.2.4.4. Analyse de l'effet du chlore sur les potentiels rédox .....	127
2.2.4.5. Effet de la conductivité des tampons de mesure .....	129
2.2.5. Effet de la concentration en phosphate de sodium dans l'hydrogel .....	130
2.2.5.1. Résultats expérimentaux.....	131
2.2.5.2. Analyses des résultats et hypothèses .....	134
2.3. Conclusion intermédiaire .....	135
3. Etude de l'effet de l'urate sur la BOD de <i>Bacillus pumilus</i> .....	136
3.1. Introduction .....	136
3.2. Effet de l'urate sur les BODs .....	137
3.2.1. Résultats expérimentaux .....	139
3.2.1.1. Etudes dans les conditions physiologiques .....	139
3.2.1.2. Etudes dans le sérum .....	142
3.2.2. Discussion .....	142
3.2.2.1. Effet de la concentration en phosphate de sodium dans l'hydrogel.....	142

3.2.2.2. Etude de l'augmentation de courant à l'ajout d'urate avec <i>B. pumilus</i> .....	145
3.2.2.2.1. Etude de la réduction de l'urate par <i>B. pumilus</i> .....	146
3.2.2.2.2. Identification du produit d'oxydation de l'urate .....	149
3.2.2.2.3. Utilisation de l'urate comme médiateur de <i>B. Pumilus</i> .....	151
3.3. Conclusion intermédiaire .....	154
4. Elaboration d'électrodes tridimensionnelles poreuses avec <i>M. oryzae</i> .....	155
4.1. Introduction .....	155
4.2. Hypothèse de travail.....	155
4.3. Synthèse de carbones poreux contenant des nanoparticules d'or .....	157
4.3.1. Synthèse du matériau inorganique poreux Si-HIPE.....	157
4.3.2. Synthèse de carbones poreux et de nanoparticules d'or à partir des Si-HIPE .....	158
4.4. Caractérisation des matériaux .....	159
4.4.1. Etude microscopique .....	159
4.4.2. Analyse élémentaire .....	160
4.4.3. Mesures de conductivité.....	161
4.5. Mesures électrochimiques .....	162
4.5.1. Mesures sur des électrodes séchées à 4 °C.....	162
4.5.1.1. Etude de la réduction de l'oxygène .....	162
4.5.1.2. Etude de la diffusion de l'oxygène dans les matériaux.....	164
4.5.1.3. Traitement des données .....	165
4.5.2. Mesures sur des électrodes séchées sous vide à 25 °C.....	169
4.5.2.1. Etude de la réduction de l'oxygène .....	169
4.5.2.2. Traitement des données .....	171
4.5.2.3. Analyse des résultats et hypothèses .....	173
4.5.3. Synthèse séquentielle des nano particules d'or .....	175
4.5.3.1. Etude de a réduction de l'O <sub>2</sub> .....	175
4.5.3.2. Etude de la diffusion de l'oxygène dans les matériaux.....	176
4.5.3.3. Traitement des données .....	177
4.6. Conclusion intermédiaire .....	179
Conclusion.....	180
Références bibliographiques du Chapitre II.....	182

## Chapitre 3 : Réalisation de cathodes bi-enzymatiques à base d'oxydases multi-cuivre

Introduction .....	187
1. Etude de la cathode bi-enzymatique <i>M-BOD/P-BOD</i> .....	189
1.1. Réalisation de la cathode bi-enzymatique <i>M-BOD/P-BOD</i> .....	189
1.1.1. Concept de la cathode bi-enzymatique.....	189
1.1.2. Préparation du mélange bi-enzymatique.....	190
1.2. Etude de la cathode bi-enzymatique à 30 %m de BOD totale dans l'hydrogel.....	190
1.2.1. Comparaison des densités de courant en fonction du ratio <i>M-BOD/P-BOD</i> .....	190
1.2.2. Comparaison des potentiels de début de réduction de l'O <sub>2</sub> en fonction du ratio <i>M-BOD/P-BOD</i> .....	191
1.2.2.1. Résultats expérimentaux.....	191
1.2.2.2. Analyse des résultats et hypothèses.....	193
1.2.3. Variation de la fraction massique de BOD totale dans l'hydrogel.....	194
1.2.4. Etude du dépôt de l'hydrogel bi-enzymatique 50 %v <i>M-BOD</i> / 50 %v <i>P-BOD</i> à 30 %m de BOD totale en deux étapes.....	195
1.2.4.1. Réalisation de la cathode bi-enzymatique en deux étapes.....	195
1.2.4.2. Influence du dépôt en deux étapes sur les densités de courant.....	195
1.2.4.3. Influence du dépôt en deux étapes sur les potentiels de début de réduction de l'O <sub>2</sub> ..	197
1.2.5. Tests d'activité en solution du mélange bi-enzymatique 50 %v <i>M-BOD</i> /50 %v <i>P-BOD</i> ... ..	198
1.2.6. Comparaison avec les cathodes mono-enzymatiques à 15 %m de BOD totale dans l'hydrogel.....	199
1.3. Conclusion intermédiaire .....	201
2. Comparaison de l'effet des paramètres physiologiques sur la cathode bi-enzymatique par rapport aux cathodes mono-enzymatiques.....	201
2.1. Etude de l'effet de la température.....	201
2.2. Etude de l'effet du chlore.....	203
2.3. Effet de la conductivité et de la composition du tampon de mesure.....	204
2.4. Etude de l'effet de la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel et de l'urate.....	206
2.5. Comparaison des comportements en TED et TEM.....	207
2.6. Répartition des enzymes sur l'électrode.....	209

2.7. Cathode bi-enzymatique avec une <i>B. pumilus</i> inactive.....	211
2.7.1. Obtention de la <i>B. pumilus</i> inactive.....	211
2.7.2. Etude de la cathode bi-enzymatique 50 %v M-BOD / 50 %v GF-BOD.....	212
2.8. La biopile à cathode bi-enzymatique <i>B. pumilus</i> / <i>M. oryzae</i> .....	213
2.8.1. Optimisation des taux de recouvrement aux électrodes.....	214
2.8.2. Comparaison avec les biopiles aux cathodes mono-enzymatique 100 %v P-BOD et 100 %v M-BOD.....	215
2.9. Conclusion intermédiaire.....	217
3. La cathode bi-enzymatique <i>Bacillus pumilus</i> / <i>Podospora anserina</i> .....	217
3.1. Caractéristiques de la laccase de <i>Podospora anserina</i> .....	218
3.1.1. Caractéristiques biochimiques.....	218
3.1.2. Etude des potentiels de réduction de l'O <sub>2</sub> et des caractéristiques structurales.....	219
3.2. Effet du chlore et de la température.....	221
3.2.1. Effet du chlore.....	221
3.2.2. Effet de la température.....	223
3.2.3. Biopile avec la cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD.....	224
3.3. Conclusion intermédiaire.....	225
Conclusion.....	226
Références bibliographiques du chapitre III.....	228
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>230</b>

## Matériels et méthodes

1. Produits chimiques et matériaux.....	235
1.1. Les enzymes.....	235
1.2. Les polymères rédox.....	235
2. Méthodes expérimentales.....	236
2.1. Tests d'activité en solution.....	236
2.2. Mesures électrochimiques.....	236
2.3. Préparation des électrodes avec un hydrogel rédox.....	237
2.4. Préparation des électrodes de cryogel de carbone.....	237

2.5. Préparation de la solution d'urate.....	238
2.6. Préparation des électrodes de papier de carbone.....	238
2.7. Préparation des biopiles.....	238
2.8. Synthèse de la silice poreuse (Si-HIPE) .....	239
2.9. Synthèse de la matrice de carbone poreux (C-HIPE) .....	240
2.10. Synthèse des nanoparticules d'or.....	240
2.11. Observations microscopiques des C-HIPE et Au@C-HIPE.....	241
2.12. Préparation des électrodes poreuses C-HIPE et Au@C-HIPE.....	241
Références bibliographiques.....	242

## **Liste des publications**

## **Liste des conférences**





## **Introduction générale**

Au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, la consommation énergétique mondiale a augmenté de façon considérable et avec l'arrivée des pays émergents la demande en énergie va ne va cesser de croître. Toutefois, la prise de conscience de la limite des ressources fossiles et des dommages irréversibles causés à l'environnement a conduit à considérer des solutions alternatives mettant en jeu des ressources renouvelables. Ces solutions résident dans l'utilisation d'organismes vivants capables de convertir l'énergie chimique issue de la biomasse en énergie électrique. Ces organismes qui sont des biomolécules telles que les micro-organismes ou encore les enzymes sont utilisés dans la réalisation de biopiles permettant de produire de l'énergie [1-3].

La tendance actuelle est à la miniaturisation des appareils électroniques afin de faciliter leur portabilité. Cela concerne aussi bien les appareils destinés à un usage récréatif (lecteurs mp3, téléphones etc.) que les dispositifs médicaux implantables (stimulateurs cardiaques, biocapteurs etc.). Idéalement, les dispositifs implantés pourraient être alimentés par des biopiles qui utiliseraient pour leur fonctionnement des substances naturellement présentes dans le corps humain (glucose, oxygène etc.). Les biopiles offrent donc des solutions autant en matière de production d'énergie renouvelable propre, que pour l'alimentation d'appareils miniatures et potentiellement implantables.

Dans cette optique les biopiles enzymatiques ont particulièrement attiré notre attention. Les enzymes sont des biomolécules biocompatibles qui sont pour la plupart très actives à 37 °C. De plus elles sont capables de catalyser des réactions spécifiques ce qui offre de grandes possibilités de miniaturisation [4]. Les biopiles enzymatiques sont donc idéales pour l'alimentation d'appareils médicaux implantables dans le corps humain tels que les biocapteurs [3]. Les capteurs à glucose notamment sont d'un intérêt particulier en raison de la gravité et de l'étendue du diabète à travers le monde.

Afin d'éviter les conséquences dramatiques liées à cette affection (maladies cardiaques, insuffisance rénale, dégénérescence nerveuse etc.) les patients diabétiques doivent mesurer régulièrement leur glycémie [5-6]. L'utilisation de biocapteurs à glucose implantés pourrait permettre de réaliser ce dosage régulier de manière simple et peu coûteuse. Ces capteurs seraient alimentés par des biopiles enzymatiques utilisant pour leur fonctionnement le glucose et l'oxygène présents dans le sang. Dans de telles biopiles le glucose est oxydé en gluconolactone à l'anode puis les électrons issus de cette réaction sont transférés à la cathode

où se produit la réduction de l'oxygène en eau. Les réactions d'oxydation du glucose et de réduction de l'oxygène sont catalysées par des enzymes spécifiques. De nombreuses biopiles glucose/O<sub>2</sub> ont été déjà réalisées [7-14] cependant elles restent limitées par la cathode en termes de stabilité et d'activité [15-16].

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour améliorer les performances des cathodes enzymatiques. On peut par exemple augmenter la surface spécifique de l'électrode [17-23] ou encore optimiser les processus de transferts électroniques, mais le plus intéressant reste encore d'arriver à identifier et produire de nouvelles enzymes cathodiques plus performantes [10, 24-25]. Les enzymes cathodiques les plus couramment utilisées sont les oxydases multi-cuivre dont il existe plusieurs sous classes comme les bilirubine oxydases, les laccases, les céruloplasmines, etc. La sous classe des bilirubine oxydases (BODs) a montré de meilleures performances dans les conditions physiologiques pour la réduction de l'O<sub>2</sub> en eau [26].

Jusqu'à présent les deux bilirubine oxydases fongiques issues de *Myrothecium verrucaria* et de *Trachyderma tsunodae* ont été particulièrement utilisées pour la réalisation de biocathodes enzymatiques. Cependant, l'attrait pour ces deux enzymes était principalement dû à leur disponibilité commerciale car elles montrent en définitive des limitations importantes du point de vue de l'activité et de la stabilité dans les conditions physiologiques [27-28].

Au vu de ces contraintes des recherches ont été menées afin d'identifier des bilirubine oxydases plus efficaces. Ces travaux ont conduit à l'identification et à la production dans notre laboratoire des BODs issues de *Magnaporthe oryzae* [29-30] et de *Bacillus pumilus* [31-32]. Nos travaux de thèse se sont donc orientés vers l'étude et l'optimisation des cathodes enzymatiques utilisant ces deux nouvelles BODs.

Dans le premier chapitre nous présenterons le concept des biopiles enzymatiques ainsi que les différentes enzymes utilisées pour leur réalisation. Ensuite nous nous intéresserons plus en détail aux bilirubine oxydases dont nous présenterons les propriétés structurales, électrochimiques et quelques exemples de leurs applications.

Le deuxième chapitre sera consacré à une étude plus poussée des deux nouvelles BODs de *Magnaporthe oryzae* et de *Bacillus pumilus*. Nous présenterons les résultats des travaux

précédents d'identification, de production et de caractérisation biochimique réalisés au Centre de Recherche Paul Pascal (CRPP). Puis, nous présenterons une étude électrochimique comparative de l'effet de différents paramètres sur les deux enzymes tels que le chlore, la température, etc. Par la suite nous présenterons deux études distinctes réalisées avec chaque enzyme : l'étude de l'effet de l'urate sur *Bacillus pumilus* et l'étude des performances de cathodes à base de nouveaux matériaux carbonés poreux contenant des nanoparticules d'or avec *Magnaporthe oryzae*.

L'étude comparative des deux enzymes mettra en évidence des caractéristiques complémentaires. Ainsi dans le troisième et dernier chapitre nous présenterons la réalisation d'une nouvelle cathode bi-enzymatique à base de *Bacillus pumilus* et de *Magnaporthe oryzae*. Nous présenterons d'abord le concept de la cathode bi-enzymatique puis les résultats des analyses de tolérance vis-à-vis des différents paramètres physiologiques : chlore, température, urate. Ensuite nous présenterons une comparaison des performances des biopiles réalisées avec les différents types de cathodes mono- et bi-enzymatiques. Enfin nous présenterons les résultats obtenus pour une cathode bi-enzymatique réalisée avec *Bacillus pumilus* et une nouvelle laccase identifiée dans *Podospora anserina* [33].

## Références bibliographiques

1. Katz, E., A.N. Shipway, and I. Willner, *Biochemical fuel cells*. Handbook of Fuel Cells Fundamentals, Technology and Applications; Vielstich, W., Gasteiger, H. A., Lamm, A., Eds. John Wiley and Sons, Ltd.: London, 2003. **1**: p. p 355.
2. Osman, M.H., A.A. Shah, and F.C. Walsh, *Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: enzymatic cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2011. **26**: p. 6.
3. Barton, S.C., J. Gallaway, and P. Atanassov, *Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices*. Chemical Reviews, 2004. **104**(10): p. 20.
4. Atanassov, P., et al., *Enzymatic biofuel cells*. Electrochemical Society Interface 2007. **16**(2): p. 28-31.
5. Heller, A. and B. Feldman, *Electrochemistry in Diabetes Management* Accounts of chemical research, 2010. **43**(7): p. 963-973.
6. Hammond, P., A. Liebl, and S. Grunder, *International survey of insulin pump users: Impact of continuous subcutaneous insulin infusion therapy on glucose control and quality of life*. Primary care diabetes, 2007. **1**(3): p. 143-146.
7. Shao, M., et al., *Optimization of a Membraneless Glucose/Oxygen Enzymatic Fuel Cell Based on a Bioanode with High Coulombic Efficiency and Current Density*. ChemPhysChem, 2013. **14**: p. 2260-2269.
8. Yehezkeli, O., et al., *Nano-engineered Flavin-Dependent Glucose Dehydrogenase/Gold Nanoparticle-Modified Electrodes for Glucose Sensing and Biofuel Cell Applications*. ACS Nano., 2011. **5**(3): p. 2385-9.
9. Luz, R.A.S., et al., *Enzyme Biofuel Cells: Thermodynamics, Kinetics and Challenges in Applicability*. ChemElectroChem, 2014: p. 1-28.
10. Zebda, A., et al., *Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes*. Nature Communication, 2011.
11. Reuillard, B., et al., *High power enzymatic biofuel cell based on naphthoquinone-mediated oxidation of glucose by glucose oxidase in a carbon nanotube 3D matrix*. Phys Chem Chem Phys, 2013. **15**: p. 4892-4896.
12. Cosnier, S., A. Le Goff, and M. Holzinger, *Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review*. Electrochemistry Communications 2014. **38** p. 19-23.
13. Cinquin, P., et al., *A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats*. PLoS ONE 2010. **5**(5): p. e10476.
14. Zebda, A., et al., *Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices*. Scientific reports, 2013 **3**(1516).
15. Heller, A., *Miniature biofuel cells*. Physical Chemistry Chemical Physics 2004. **6**: p. 209-216.
16. Mano, N., F. Mao, and A. Heller, *Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O<sub>2</sub> biofuel cell and its operation in a living plant*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**: p. 6588.
17. Reculosa, S., et al., *Design of catalytically active cylindrical and macroporous gold microelectrodes*. Advanced functional material, 2010. **21**: p. 691-698.
18. Minter, S.D., B.Y. Liaw, and M.J. Cooney, *Enzyme-based biofuel cells*. Current Opinion in Biotechnology, 2007. **18** p. 228-234.
19. Lau, C., et al., *Design of carbon nanotube-based gas-diffusion cathode for O<sub>2</sub> reduction by multicopper oxidases*. Advanced Energy Materials, 2012. **2**(1): p. 162-168.
20. Wen, H., et al., *Carbon fiber microelectrodes modified with carbon nanotubes as a new support of immobilization of glucose oxidase*. Microchimica Acta, 2011. **175** p. 283-289.
21. Boland, S. and D. Leech, *A glucose/oxygen enzymatic fuel cell based on redox polymer and enzyme immobilisation at highly-ordered macroporous gold electrodes*. The Analyst 2012. **137** p. 113-117.
22. Flexer, V., et al., *Porous mediator-free enzyme carbonaceous electrodes obtained through integrative chemistry for biofuel cells*. Energy and Environmental Science, 2011. **4**(6): p. 10.

23. Cosnier, S., M. Holzinger, and A. Le Goff, *Recent Advances in Carbon Nanotube-Based Enzymatic Fuel Cells*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2014. **2**(45): p. 1-6.
24. Flexer, V., et al., *Efficient direct electron transfer of soluble PQQ-glucose dehydrogenase on carbon cryogel electrodes at neutral pH*. *Analytical Chemistry* 2011. **83** p. 5721-5727.
25. Gupta, G., et al., *Direct electron transfer catalyzed by bilirubin oxidase for air breathing gas-diffusion electrodes*. *Electrochemistry Communications*, 2011. **13**: p. 3.
26. Mano, N. and L. Edembe, *Bilirubin oxidases in bioelectrochemistry: Features and recent findings*. *Biosensors and Bioelectronics* 2013. **50**: p. 478-485.
27. Mano, N., et al., *An oxygen cathode operating in a physiological solution*. *Journal of the American Chemical Society*, 2002. **124**(22): p. 7.
28. Mano, N., H.-H. Kim, and A. Heller, *On the relationship between the characteristics of bilirubin oxidases and O<sub>2</sub> cathodes based on their "wiring"*. *Journal of Physical Chemistry*, 2002. **106**: p. 7.
29. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae*: an attractive new enzyme for biotechnological applications*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012. **96**(6): p. 10.
30. Cadet, M., et al., *Design of a highly efficient O<sub>2</sub> cathode based on bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae**. *Chemical Physical Chemistry*, 2013: p. 4.
31. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2012. **35**(1): p. 7.
32. Mano, N. and F. Durand, *Bacillus pumilus bilirubin oxidase and applications thereof*. 2011.
33. Durand, F., S. Gounel, and N. Mano, *Purification and characterization of a new laccase from the filamentous fungus *Podospora anserina**. *Protein Expression and Purification* 2013. **88** p. 61-66.







# Chapitre 1 :

## Les bilirubine oxydases dans les biopiles enzymatiques

---



## Sommaire

Introduction .....	9
1. Les piles à combustible .....	11
1.1. Principe d'une pile à combustible .....	11
1.2. Performances d'une pile à combustible.....	12
1.3. Limitations des piles à combustible .....	14
1.4. Conclusion intermédiaire .....	15
2. Les biopiles .....	15
2.1. Les biopiles microbiennes .....	17
2.1.1. Intérêt et applications des biopiles microbiennes .....	17
2.1.2. Les transferts d'électrons dans les biopiles microbiennes.....	18
2.1.3. Limitations des biopiles microbiennes .....	19
2.2. Les biopiles enzymatiques .....	20
2.2.1. Les enzymes .....	21
2.2.1.1. Caractéristiques structurales des enzymes .....	21
2.2.1.2. Classification et nomenclature des enzymes.....	24
2.2.1.3. Cinétique enzymatique.....	25
2.2.1.4. Facteurs influençant l'activité enzymatique .....	27
2.2.2. Les enzymes utilisées dans les biopiles .....	30
2.2.2.1. Les enzymes anodiques.....	30
2.2.2.2. Les enzymes cathodiques.....	32
2.2.3. Immobilisation des enzymes sur les électrodes.....	32
2.2.3.1. L'adsorption physique .....	33
2.2.3.2. La reconstitution de l'apoenzyme .....	34
2.2.3.3. L'immobilisation par encapsulation.....	34
2.2.3.4. Le greffage covalent.....	35
2.2.3.5. Immobilisation par réticulation.....	36
2.2.3.6. Immobilisation dans un hydrogel rédox.....	37
2.2.4. Intérêt et applications des biopiles enzymatiques.....	40
2.2.4.1. Travaux précurseurs sur les biopiles enzymatiques.....	40
2.2.4.2. Avantages des biopiles enzymatiques.....	40
2.2.4.3. Limitations des biopiles enzymatiques .....	41
2.2.4.4. Applications des biopiles enzymatiques .....	42
2.2.5. La biopile enzymatique glucose/O <sub>2</sub> .....	43

2.2.5.1.	Problématique .....	43
2.2.5.2.	La biopile enzymatique glucose/O <sub>2</sub> étudiée au CRPP.....	45
2.3.	Conclusion intermédiaire .....	46
3.	Les Bilirubine oxydases dans les biopiles enzymatiques .....	47
3.1.	Identification et propriétés structurales des BODs.....	48
3.1.1.	Identification et classification des BODs .....	48
3.1.2.	Structure du site actif et réduction de l'O <sub>2</sub> dans les BODs.....	49
3.1.2.1.	Structure du site actif des BODs .....	49
3.1.2.2.	Mécanisme de réduction de l'O <sub>2</sub> dans les BODs .....	51
3.1.3.	Propriétés spectroscopiques des BODs .....	51
3.1.3.1.	La spectroscopie UV-visible.....	52
3.1.3.2.	Spectroscopie de résonance paramagnétique.....	52
3.1.3.3.	Spectroscopie de résonance Raman .....	53
3.2.	Caractérisation biochimique et électrochimique .....	54
3.2.1.	Etudes cinétiques avec différents substrats .....	54
3.2.2.	Effet de la température, du pH et du chlore.....	55
3.2.3.	Caractéristiques électrochimiques .....	56
3.3.	Les BODs dans les applications médicales .....	57
3.3.1.	Détection de la bilirubine avec la BOD libre .....	58
3.3.2.	Biocapteurs pour la détection électrochimique de la bilirubine .....	59
3.4.	Les BODs dans les cathodes à oxygène .....	60
3.4.1.	Les différentes stratégies d'immobilisation des BODs à la cathode .....	61
3.4.1.1.	Transfert électronique direct .....	61
3.4.1.2.	Transfert électronique médié .....	63
3.4.1.3.	Comparaison des stratégies d'immobilisation .....	64
3.4.1.4.	L'immobilisation de BODs pour le transfert électronique direct .....	67
3.4.1.4.1.	Etude du mécanisme de réduction de l'oxygène.....	67
3.4.1.4.2.	Elaboration de cathodes pour l'amélioration de la réduction de l'O <sub>2</sub> .....	69
3.4.1.4.2.1.	Les électrodes à base de carbone.....	69
3.4.1.4.2.2.	Les électrodes à base nanotubes de carbone .....	71
3.4.1.4.2.3.	Les électrodes d'or .....	74
3.4.1.4.2.4.	Les cathodes à air .....	74
3.4.1.4.3.	L'immobilisation de BODs pour le transfert électronique médié.....	76

3.4.1.4.4. Utilisation de médiateurs rédox en solution.....	76
3.4.1.4.5. Utilisation de médiateurs rédox immobilisés.....	78
3.5. Conclusion intermédiaire .....	82
Conclusion.....	82
Références bibliographiques du Chapitre I.....	85

## **Introduction**

Les piles à combustible classiques utilisant l'hydrogène, les alcools (méthanol, éthanol) ou encore des hydrocarbures comme le méthane ont été longtemps employées pour fournir de l'énergie. Or, la production d'hydrogène est fortement consommatrice d'énergie et polluante. Quant aux piles utilisant des hydrocarbures ou des alcools elles rejettent des monoxydes de carbone toxiques ou encore des gaz à effet de serre. De plus, les piles à combustible utilisent comme catalyseurs des métaux nobles qui sont rares, chers et polluants.

La bioénergie renouvelable est un des moyens permettant d'atténuer la crise énergétique actuelle tout en réduisant largement les effets néfastes de la production d'énergie sur l'environnement. Aussi, des efforts considérables sont consacrés au développement de systèmes produisant de l'électricité à partir de ressources renouvelables sans émission nette de dioxyde de carbone. Les biopiles offrent cette technologie alternative en convertissant en énergie électrique l'énergie issue de la biodégradation des matières organiques. Ces réactions sont catalysées par des biomolécules qui peuvent être des micro-organismes entiers (biopiles microbiennes) ou des enzymes isolées (biopiles enzymatiques).

Les enzymes possèdent des avantages remarquables par rapport aux catalyseurs chimiques des piles à combustible classiques. Elles sont en effet biocompatibles, ont une sélectivité spécifique et une plus grande activité à des températures plus faibles. Ces caractéristiques font des biopiles enzymatiques des dispositifs de choix pour l'alimentation d'appareils médicaux implantables dans le corps humain comme les capteurs à glucose. L'utilisation des enzymes offre effectivement des possibilités de miniaturisation du fait de la spécificité des réactions catalysées. Ainsi, le combustible et l'oxydant peuvent être introduits dans un compartiment unique, alors que dans les piles classiques il est nécessaire de les séparer par une membrane.

Cependant, la plupart des biopiles sont pour l'heure limitées par la réduction de l'oxygène à la cathode. L'optimisation des performances de la cathode passe notamment par l'identification et la production de nouvelles enzymes aux propriétés améliorées. Les oxydases multi-cuivre sont les enzymes les plus couramment utilisées dans les cathodes enzymatiques. Les bilirubine oxydases qui appartiennent à cette famille ce sont montrées plus performantes que les catalyseurs inorganiques dans les conditions physiologiques.

Dans ce premier chapitre nous rappellerons au préalable le concept d'une pile à combustible avant de nous intéresser aux biopiles. Puis, nous mettrons un accent particulier sur les biopiles enzymatiques et les différentes enzymes qui y sont couramment utilisées.

Enfin nous présenterons les bilirubine oxydases, leurs propriétés structurales et électrochimiques avant de donner des exemples de leurs applications au cours des dernières années.

## 1. Les piles à combustible

Le concept de pile à combustible a été introduit en 1839 avec les travaux indépendants de Grove et de Schœnbein [1-3]. A l'instar des batteries, les piles à combustible sont des dispositifs permettant de convertir de l'énergie chimique en énergie électrique. Contrairement aux batteries, l'énergie électrique est produite tant que les réactifs chimiques sont fournis à chaque électrode.

### 1.1. Principe d'une pile à combustible

La réaction électrochimique globale fait intervenir l'oxydation à l'anode d'un combustible réducteur par exemple l'hydrogène, le méthanol, etc. Cette réaction est couplée à la réduction à la cathode d'un oxydant par exemple l'oxygène d'où le terme de « pile à combustible ».

Ces réactions génèrent un flux d'électrons de l'anode vers la cathode à travers un circuit électrique externe *via* une résistance. Le flux d'électrons ainsi généré est compensé par un flux d'ions positifs qui sont généralement des protons ou des cations de métaux alcalins tels que  $\text{Li}^+$  ou  $\text{Na}^+$  [4]. Ce flux d'ions positifs se fait à travers une membrane perméable aux ions séparant les deux compartiments (Figure I.1.1).

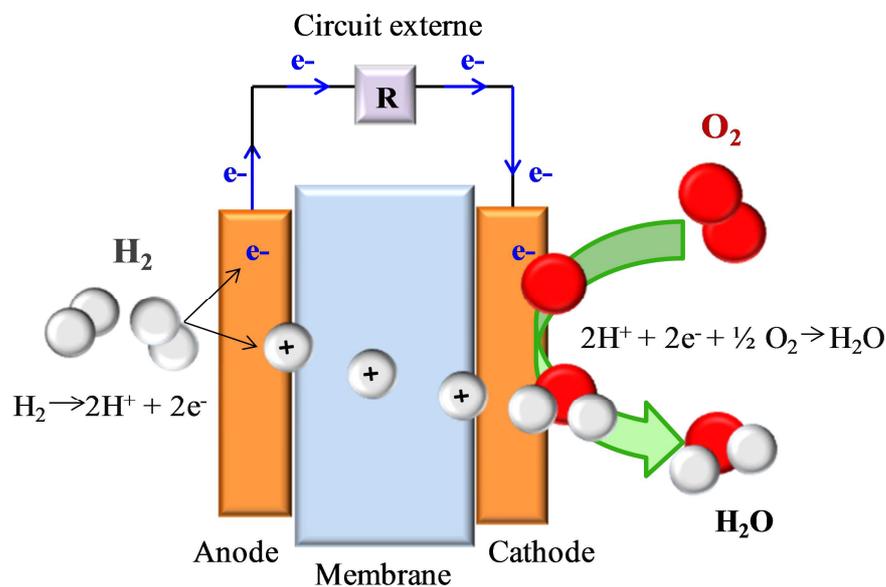
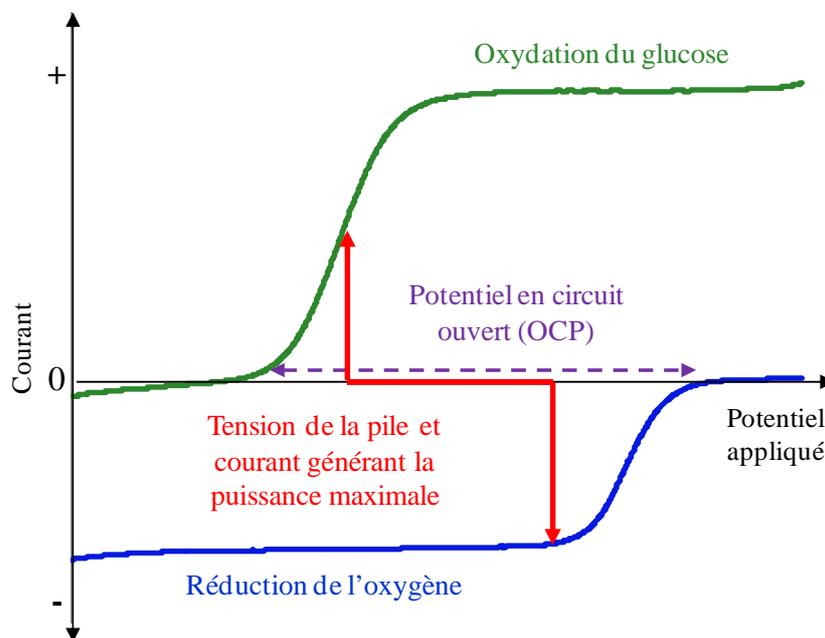


Figure I.1.1. Principe d'une pile à combustible, exemple de la pile à hydrogène.

## 1.2. Performances d'une pile à combustible

En général l'efficacité d'une pile à combustible est déterminée par trois paramètres : la puissance extractible (P), la tension entre les deux électrodes (V) et le courant issu du flux d'électrons (I). L'étude des demi-réactions aux électrodes se fait par voltammétrie. Cette technique permet de suivre l'évolution du courant en fonction du potentiel de l'électrode.

Les courbes de polarisation générées par voltammétrie permettent d'analyser les performances de chaque électrode (Figure I.1.2). Ces courbes sont réalisées à faible vitesse de balayage ( $< 10 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de façon à obtenir des courants à l'état quasi-stationnaire.



**Figure I.1.2.** Courbes de polarisation d'une anode (verte) et d'une cathode (bleue) et caractéristiques déterminant le rendement d'une pile à combustible.

Ces courbes mettent en évidence plusieurs paramètres importants tels que les potentiels d'oxydation et de réduction, les courants maximums anodique et cathodique, mais également l'OCP théorique (violet) qui donne une mesure de la tension maximale associée à la pile. Sur la base de ces données de demi-pile il est possible d'identifier l'électrode limitant la réaction électrochimique et par conséquent le courant de la pile.

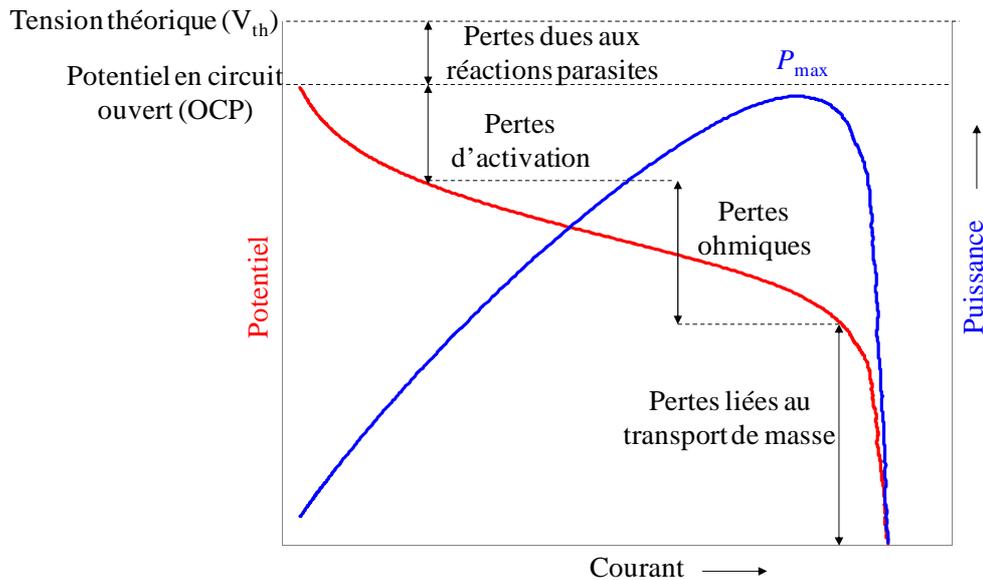
En mesurant simultanément le potentiel et le courant produit par la pile, la puissance peut être directement calculée par l'équation I.1.1.a:

$$P = V \times I \quad (\text{Equation I.1.1.a})$$

La tension  $V$  de la pile dépend de la différence de potentiel entre l'anode ( $E_a$ ) et la cathode ( $E_c$ ) mais également des pertes irréversibles de surtension ( $\eta$ ) :

$$V = E_a - E_c - \eta \quad (\text{Equation I.1.1.b})$$

Trois types de pertes majeures contribuent à la surtension : les pertes d'activation, les pertes ohmiques et les pertes liées au transport de masse, donc au gradient de concentration (Figure I.1.3) [5-6].



**Figure I.1.3.** Variations typiques de la tension et de la puissance d'une pile à combustible en fonction de la densité de courant.

Sur la figure I.1.3 on observe qu'aux faibles courants les pertes d'activation dominent. Elles sont liées aux limitations cinétiques du transfert d'électrons à l'interface des électrodes. Les pertes d'activation peuvent être réduites par l'amélioration de la catalyse à l'électrode, l'augmentation de la surface d'électrode et l'optimisation des conditions de fonctionnement comme la température.

Les pertes ohmiques sont dues à la résistance au transport de charges à travers les différents composants de la pile, y compris les résistances de contact. Elles comprennent à la fois les résistances ioniques et électroniques à travers les collecteurs de courant, les électrolytes, la membrane séparatrice et les électrodes, ainsi que les interfaces entre ces composants. Pour minimiser les pertes ohmiques, la membrane doit avoir une faible

résistance, l'espacement entre les électrodes doit être optimal et les composants doivent être bien en contact. On peut également augmenter la conductivité de la solution en modifiant sa composition.

Les pertes de concentration sont provoquées par la résistance au transport de masse ce qui conduit à des gradients de concentration, notamment au voisinage de la surface de l'électrode. Ces pertes ont tendance à être dominantes aux densités de courant élevées. Elles peuvent être réduites par une bonne homogénéisation des solutions permettant une meilleure diffusion des réactifs à l'électrode.

Il existe également des pertes dues à des réactions parasites telles que l'adsorption des espèces en solution à la surface des électrodes. Ces espèces peuvent être impliquées ou non dans la réaction électrochimique.

Le courant de la pile est contrôlé par la taille des électrodes, la perméabilité aux ions et la vitesse de transport à travers la membrane séparatrice, et en particulier la vitesse de transfert des électrons à la surface des électrodes respectives.

Ces différents paramètres influent sur la puissance de la pile à combustible. De ce fait, améliorer l'efficacité de la pile revient à maximiser les valeurs de  $V$  et  $I$ . Les piles à combustibles sont capables de fournir des densités de puissance importantes de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  et ce avec une stabilité élevée.

### **1.3. Limitations des piles à combustible**

Malgré des densités de puissance élevées les piles à combustible présentent des inconvénients majeurs liés à la nature de leurs catalyseurs et de certains de leurs combustibles. Pour accélérer les cinétiques de réactions ces piles utilisent en effet des catalyseurs inorganiques contenant souvent des métaux nobles ou des terres rares. Ces catalyseurs tels que le platine sont rares, chers et polluants. De plus leur fonctionnement est optimal à des températures élevées comprises entre  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  et  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  minimum [7-8].

En outre, la membrane semi-perméable conductrice ionique séparant les compartiments anodique et cathodique peut être chère, se dégrader et augmenter la résistance interne de la pile. Enfin, du point de vue environnemental les combustibles utilisés, tel que l'hydrogène, ne sont pas toujours obtenus par des voies chimiques écologiques et les températures de fonctionnement élevées des piles induisent la production de gaz à effet de serre.

#### **1.4. Conclusion intermédiaire**

Les performances relevées pour les piles à combustible montrent qu'elles sont indéniablement efficaces pour produire de grande quantité d'énergie. Cependant, leurs principales limitations résident dans les coûts des matériaux tels que les catalyseurs et les membranes, ainsi que dans la pollution directe ou indirecte générée par leur utilisation.

Les biopiles présentées dans la deuxième partie de ce chapitre offrent une alternative aux piles à combustible inorganiques classiques. Elles sont en effet capables d'utiliser des combustibles et des catalyseurs issus de sources naturelles qui sont abondants, peu chers, moins polluants et permettent un fonctionnement dans des conditions moins extrêmes.

## **2. Les biopiles**

Une pile à combustible biologique ou biopile est le résultat de la combinaison de deux technologies : les piles à combustible et la biotechnologie. Comme les piles à combustible classiques, elles sont constituées d'une anode et d'une cathode séparées ou non par une membrane sélective au passage des cations. Contrairement aux piles à combustible inorganiques classiques qui reposent sur l'utilisation de combustibles fossiles et/ou de catalyseurs métalliques rares, coûteux et polluants, les biopiles utilisent des biocombustibles abondants et variés et des catalyseurs biologiques.

Ces catalyseurs sont pour la plupart soit des micro-organismes entiers on parle alors de « biopiles microbiennes », soit des protéines isolées c'est le cas des « biopiles enzymatiques ». En général dans les cathodes des biopiles, l'oxygène est l'accepteur d'électrons le plus approprié. Il a un en effet potentiel élevé, il est largement disponible, peu coûteux et non toxique.

L'utilisation de biocatalyseurs offre des avantages significatifs en termes de coût par rapport aux catalyseurs traditionnels. De plus les biopiles sont capables de fonctionner à pH neutre et à faible température (ambiante ou physiologique). Ce qui est avantageux dans les applications où générer des températures élevées est difficile, ou lorsque des conditions de réaction extrêmes ne sont pas souhaitables [5, 7-9].

On distingue trois types de biopiles :

- ✓ les biopiles utilisant un combustible primaire (généralement un déchet organique) et générant de la matière telle que l'hydrogène, qui est ensuite utilisée comme combustible secondaire dans une pile à combustible conventionnelle de type  $H_2/O_2$  par exemple;
- ✓ les biopiles produisant de l'électricité directement à partir d'un combustible organique tel que le glucose, en utilisant soit des enzymes ou des micro-organismes complets;
- ✓ les biopiles hybrides, combinant l'utilisation de systèmes photochimiques actifs et des fragments biologiques, elles récoltent l'énergie solaire et la convertissent en énergie électrique.

L'étude des biopiles a fait l'objet de nombreuses revues au cours des dernières décennies [1, 4-17]. Dans le présent manuscrit nous nous intéresserons en particulier au deuxième type de biopiles.

Les biocatalyseurs utilisés dans ce type de biopile peuvent être libres en solution ou immobilisés à la surface des électrodes. Ils peuvent être associés à des médiateurs rédox, qui sont en général des molécules artificielles donneuses ou acceptrices d'électrons. Ces médiateurs peuvent être utilisés par de nombreux biocatalyseurs à la place de leurs oxydants ou réducteurs naturels. Les médiateurs rédox ont un large éventail de structures et de propriétés, y compris une large gamme de potentiels rédox [6-9]. Ces médiateurs servent de navettes d'électrons entre le biocatalyseur et l'électrode. Ils permettent d'accélérer la vitesse de transfert des électrons et d'augmenter la puissance de la pile.

Les biopiles sont donc des systèmes capables de convertir directement l'énergie chimique en énergie électrique *via* des réactions électrochimiques utilisant des voies biochimiques [5-6, 9]. Les biopiles peuvent être utilisées essentiellement pour:

- ✓ l'alimentation d'appareils implantables comme les pacemakers qui nécessitent une puissance de  $1 \mu W$  [18]: c'est le cas pour les micro-piles implantées dans les tissus humains ou animaux, ou les piles plus grandes implantées dans les vaisseaux sanguins;
- ✓ la production d'énergie à partir de la biomasse fournissant des combustibles et des oxydants ambiants principalement les végétaux, les eaux usées et autres déchets organiques;
- ✓ la production d'énergie grâce à l'utilisation de combustibles classiques : l'hydrogène, le méthanol, les alcools supérieurs...

## 2.1. Les biopiles microbiennes

Les biopiles microbiennes utilisent comme biocatalyseurs des micro-organismes tels que les levures ou les bactéries. Elles produisent de l'électricité tout en réalisant la biodégradation des matières organiques ou des déchets. Les combustibles complexes tels que les glucides, sont plus efficacement consommés dans les biopiles microbiennes, car elles mettent en jeu une cascade de réactions enzymatiques permettant en général l'oxydation complète du substrat en dioxyde de carbone et en eau [19-20].

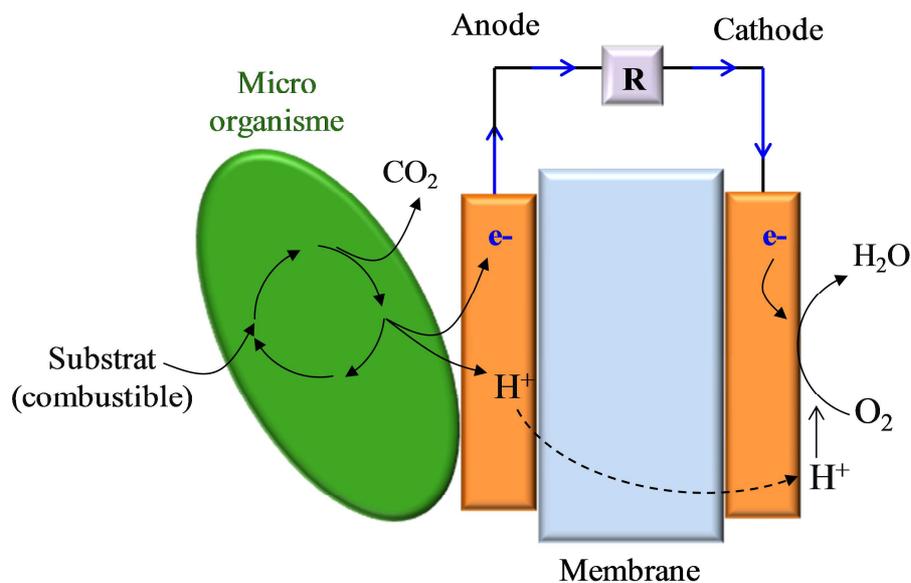


Figure I.2.1. Principe de fonctionnement d'une biopile microbienne.

Le micro-organisme utilisé peut être soit une espèce spécifique isolée ou une culture mixte. Il peut être immobilisé directement sur les électrodes ou utilisé dans une suspension. Le système peut aussi être inoculé avec une culture mixte d'une solution de nutriments dans des conditions spécifiques lui permettant de former un biofilm sur l'électrode.

### 2.1.1. Intérêt et applications des biopiles microbiennes

Le premier exemple de micro-organisme utilisé pour générer de l'électricité a été rapporté en 1910 par Potter avec *E. coli* sur des électrodes de platine [21]. Par la suite Cohen a rapporté en 1931 un système de biopiles microbiennes électriquement connectées en série [22].

Dans les années 1960, le programme spatial américain s'est intéressé à l'élaboration de biopiles microbiennes afin d'éliminer les déchets au cours de vols spatiaux prolongés et de produire de l'énergie. Récemment sont apparues des biopiles utilisant des organelles telles que les mitochondries [23-26] ou encore des organismes phototrophes utilisant l'énergie lumineuse pour produire de l'électricité [27-31].

Outre la production d'électricité, les biopiles microbiennes ont une large gamme d'applications [11, 13, 32]. Elles peuvent être utilisées pour la production d'hydrogène à partir de la biomasse sans émission de carbone dans l'écosystème. Elles peuvent aussi être utilisées pour le traitement des eaux usées et également servir comme biocapteurs.

Un intérêt majeur des biopiles microbiennes est en effet la possibilité de fonctionner à l'aide de divers combustibles tels que le dihydrogène, les alcools (méthanol, éthanol, glycérol etc.), les aldéhydes, les acides organiques (acide lactique, gluconique, etc.) et les glucides (glucose, fructose, etc.). Les micro-organismes sont capables de se régénérer, de croître et de s'adapter à leur environnement [5]. Les biopiles microbiennes sont également résistantes à l'empoisonnement lié aux substances présentes dans leur milieu environnemental [8]. Ces propriétés font des biopiles microbiennes des systèmes robustes, avec une durée de vie élevée. Kim et al. par exemple ont rapporté en 2003 une biopile microbienne fonctionnant pendant 5 ans en utilisant les eaux usées d'une usine de transformation d'amidon [33].

### **2.1.2. Les transferts d'électrons dans les biopiles microbiennes**

En raison de la nature vivante des organismes les biopiles microbiennes ont une période initiale transitoire de croissance bactérienne et d'adaptation au mécanisme d'échange d'électrons avec l'électrode, ce qui induit un temps de réponse long. L'enveloppe externe de la majorité des espèces microbiennes est une membrane composée de lipides, de peptidoglycanes et de lipopolysaccharides non-conducteurs qui entravent le transfert direct d'électrons à l'anode.

L'amélioration des performances de ces biopiles est un défi majeur, elle peut être réalisée grâce à l'utilisation de médiateurs rédox. Introduits pour la première fois par Benetto et al. dans les années 1980 [34], les médiateurs rédox peuvent être libres en solution ou immobilisés sur l'électrode. Ils doivent pouvoir être transportés à travers les membranes cellulaires des micro-organismes et être non toxiques [8, 13].

Néanmoins, certains microbes peuvent utiliser des composés naturels y compris des métabolites microbiens comme médiateurs endogènes. Les acides humiques, l'anthraquinone, les oxanions du soufre et le thiosulfate ont tous la capacité de transférer des électrons de l'intérieur de la membrane de la cellule vers l'anode. Certains microbes sont également capables de transférer des électrons directement à l'anode en formant un biofilm à la surface de l'électrode et en assurant le transfert d'électrons par conduction directement à travers la membrane. Ces microbes sont opérationnellement stables et montrent une efficacité coulombique élevée [13].

Les performances d'une biopile peuvent être évaluées par la mesure du rendement coulombique. Il est défini comme le rapport de la quantité de charge (en coulombs) transférée du substrat à l'anode, sur la charge théorique maximale produite si la totalité du substrat est oxydé [35]. Ce rendement dépend à la fois du nombre de micro-organismes, de l'efficacité de leur métabolisme et de la surface des électrodes collectant les électrons. Les principales causes de baisse de rendement coulombique sont :

- ✓ l'apparition de réactions « parasites » aux électrodes ne donnant pas lieu à la production de courant;
- ✓ l'accumulation de la biomasse;
- ✓ le mélange des réactifs anodiques et cathodiques, en particulier dans les systèmes sans membrane séparatrice [36].

### **2.1.3. Limitations des biopiles microbiennes**

La puissance et le rendement coulombique sont affectés de façon significative par le type de micro-organismes utilisé, la configuration de la biopile et les conditions de fonctionnement. Les défis actuels visent à améliorer les performances et réduire les coûts de fabrication et d'exploitation des biopiles microbiennes.

La commercialisation des biopiles microbiennes reste en effet peu envisageable à ce jour, en raison de leur coût élevé. Elles utilisent souvent comme catalyseurs cathodiques des métaux nobles et des membranes séparatrices commerciales à base de Nafion® [9, 37]. De plus, en raison du faible taux de transport des électrons à travers la membrane, les biopiles microbiennes génèrent des densités de puissance moins importantes que les piles à combustible classiques (plusieurs milliers de  $\text{mW}\cdot\text{m}^{-2}$ ).

Le retrait de la membrane permettrait d'obtenir des puissances plus élevées. Cependant, les piles devraient être conçues de manière à avoir une haute sélectivité de réactions, afin d'éviter les pertes de rendement coulombique en raison des transferts de substrats d'une électrode à l'autre, notamment le transfert d'oxygène à l'anode. Quelques exemples de biopiles microbiennes sans membranes ont été rapportés suite aux travaux de Jang et collaborateurs. En 2004 cette équipe a développé une biopile pour le traitement continu des eaux usées, fonctionnant pendant 4 semaines avec un courant stable de 2 mA [38]. Puis Liu et Logan ont réalisé une biopile dans un agencement tubulaire sans membrane, en utilisant une cathode à air avec du papier carbone [39]. Un autre dispositif a été développé par Rabaey et al. dans lequel l'anode est dans une matrice en graphite granulaire et logée dans un tube, le tout recouvert d'une cathode de graphite tissée [40].

Néanmoins, des dispositifs sans membrane peuvent être obtenus plus aisément avec les biopiles enzymatiques. Ces biopiles présentent une meilleure sélectivité et permettent d'envisager la miniaturisation des systèmes,

## **2.2. Les biopiles enzymatiques**

Contrairement aux biopiles microbiennes dans lesquelles des organismes entiers servent de biocatalyseurs, les biopiles enzymatiques utilisent des enzymes isolées de leur organisme d'origine et parfois purifiées. Les enzymes utilisées dans les biopiles appartiennent à la famille des oxydoréductases. Elles sont capables de catalyser les réactions d'oxydation et de réduction.

Les biopiles enzymatiques courantes fonctionnent grâce à l'oxydation à l'anode d'alcools (éthanol, méthanol...) ou de sucres (glucose, fructose...) et la réduction à la cathode d'oxygène ou de peroxydes [1, 4, 9-10, 17, 32, 41-43]. Avant de nous intéresser plus en détail aux biopiles enzymatiques, il nous semble approprié de revenir sur quelques notions d'enzymologie.

### 2.2.1. Les enzymes

Les enzymes sont des protéines catalysant les réactions chimiques se produisant chez les êtres vivants. Les enzymes sont synthétisées par les cellules qui les utilisent. Ces catalyseurs biologiques sont capables à faible concentration d'accroître la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier le résultat.

Une enzyme est spécifique d'une réaction donnée. Elle catalyse toujours la même transformation se produisant sur les mêmes corps chimiques initiaux appelés substrats pour former un produit. Grâce aux interactions géométriques et physiques avec les substrats (interactions hydrophobes, liaisons ioniques, liaisons hydrogène...), les enzymes peuvent discriminer des formes chimiques très proches tels que les énantiomères [44].

#### 2.2.1.1. Caractéristiques structurales des enzymes

##### ✓ Les protéines

Les protéines sont des polymères d'acides aminés qui ont tous la même structure de base : une fonction amine ( $-\text{NH}_2$ ) et une fonction acide carboxylique ( $-\text{COOH}$ ) situées aux extrémités d'une chaîne carbonée ( $\mathbf{R}$ ) qui identifie les acides aminés. Les acides aminés sont classés selon les propriétés de cette chaîne latérale en quatre groupes : acide, basique, hydrophile (polaire) et hydrophobe (apolaire).

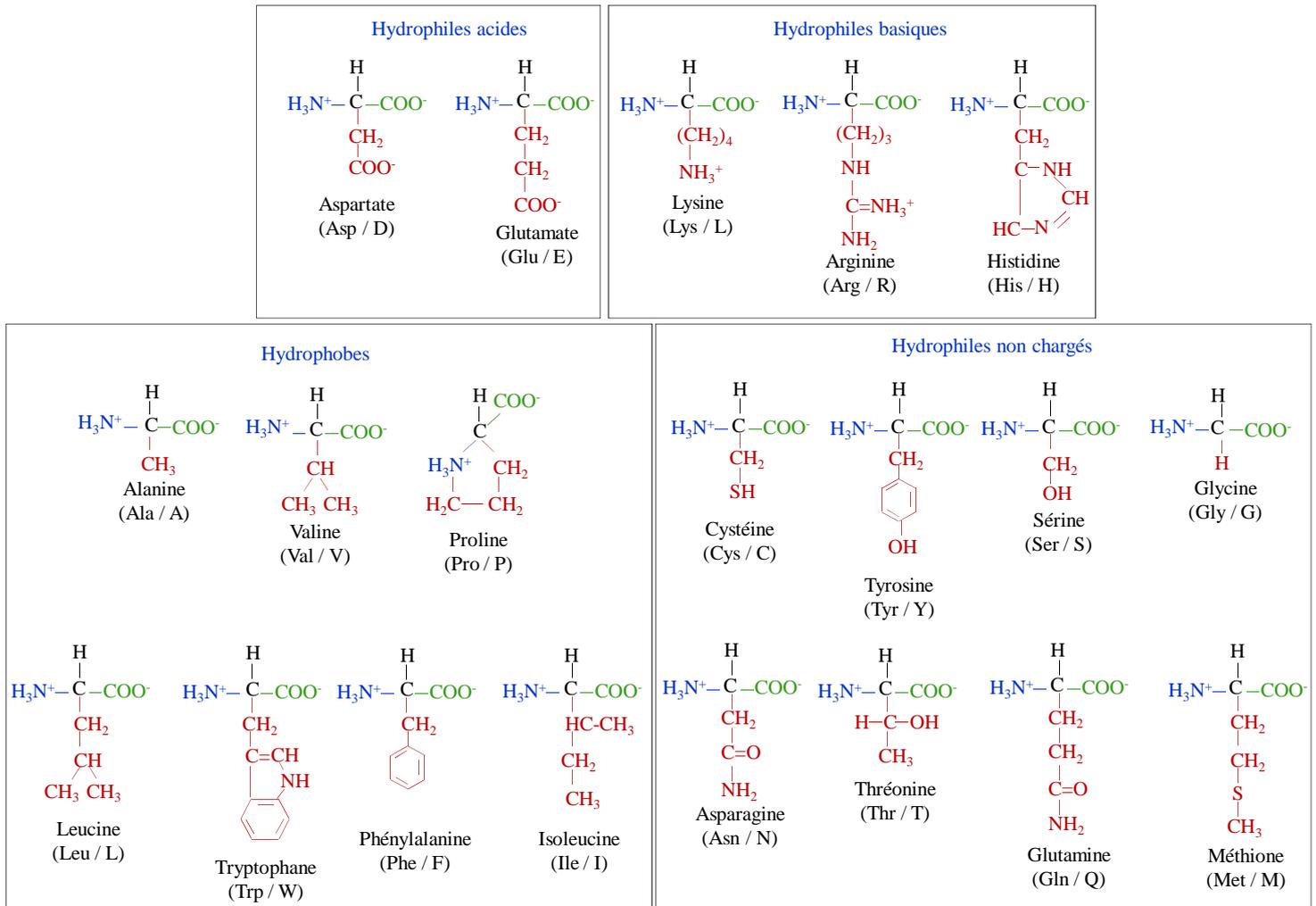


Figure I.2.2. Structures des vingt acides aminés naturels.

Au sein de la protéine ces acides aminés sont reliés par des liaisons peptidiques (-CO-NH) et forment des polypeptides (Figure I.2.3):

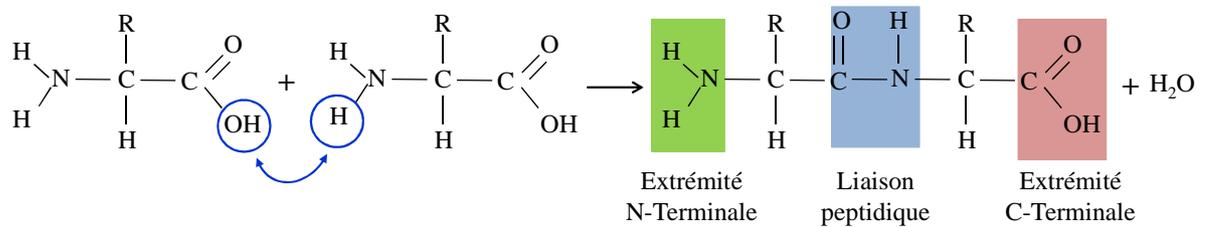
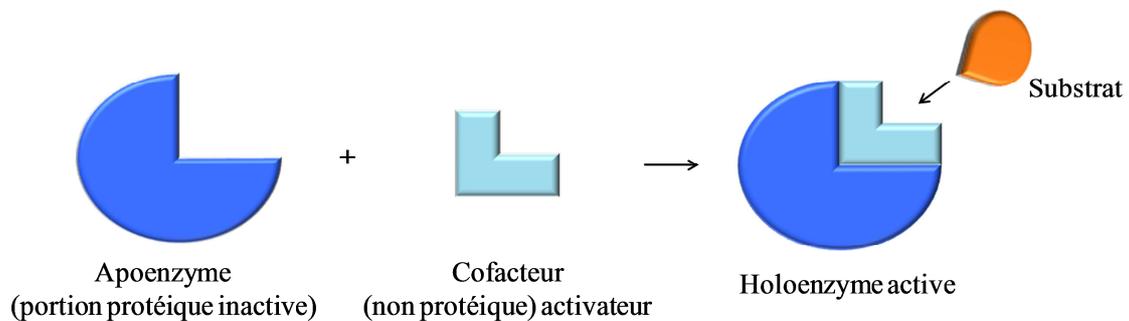


Figure I.2.3. Formation de la liaison peptidique entre deux acides aminés.

Les chaînes polypeptidiques se replient sur elles-mêmes selon une conformation tridimensionnelle déterminée par leur séquence en acides aminés. Puis elles s'agencent les unes par rapport aux autres pour former la protéine.

### ✓ Apoenzyme et cofacteur

Les enzymes peuvent présenter plusieurs types structuraux. Une enzyme peut être uniquement protéique on parle d'apoenzyme, ou associée à une partie non protéique indispensable à son activité appelée cofacteur. Ces cofacteurs interviennent dans la réaction chimique pour transporter un substrat, accepter un produit, ou participer à la structure de l'enzyme. Ces deux parties apoenzyme et cofacteur qui sont inactives séparément, forment ensemble l'holoenzyme qui est active (Figure I.2.4).



**Figure I.2.4.** Reconstitution de l'holoenzyme active à partir de l'apoenzyme et du cofacteur.

Il existe deux types de cofacteurs : les ions métalliques minéraux (Cu, Zn...) et les molécules organiques appelées coenzymes. Les coenzymes sont en général des vitamines ou des dérivés de vitamines, elles agissent comme relais d'électrons. On retrouve dans la structure de la plupart des coenzymes le nucléotide adénosine mono phosphate (AMP), ce qui est le cas pour l'ATP, le coenzyme A, la FAD et  $\text{NAD}^+$ .

Les coenzymes peuvent être fortement liés à l'apoenzyme par des liaisons de type covalent, on parle de coenzymes activateurs ou groupements prosthétiques. Ces derniers sont régénérés par l'enzyme en fin de réaction. D'autres cofacteurs liés par des liaisons de type électrostatiques ou hydrogène sont labiles. Ces cofacteurs se dissocient de leur apoenzyme et diffusent en solution où ils sont régénérés par d'autres enzymes, ils sont appelés cosubstrats ou coenzymes transporteurs [44].

Certaines enzymes peuvent posséder à la fois une coenzyme et un cofacteur minéral [45]. Ces cofacteurs se situent dans une poche de la zone interne hydrophobe de la protéine, qui constitue le site actif où se fixe le substrat et où se déroule la réaction catalytique [46].

### 2.2.1.2. Classification et nomenclature des enzymes

Les enzymes peuvent être désignées par leurs nomenclatures fonctionnelle ou officielle [44-45, 47]. La nomenclature fonctionnelle tient compte de deux types de spécificités : le nom du substrat et le nom de la réaction catalysée par l'enzyme suivi du suffixe *-ase* par exemple glucose oxydase, L-lactate-déshydrogénase, etc.

Lorsque l'enzyme catalyse un transfert entre deux substrats ils sont tous les deux désignés. On indique d'abord le nom du substrat donneur de radicaux puis celui du substrat accepteur du radical libéré, suivi du nom du radical échangé, du type de réaction et du suffixe *-ase* par exemple : ATP-glucose-phosphotransférase, glutamate pyruvate aminotransférase.

En 1961 l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB) a codifié la désignation et la classification des enzymes sous une nomenclature officielle, qui précise et complète la nomenclature fonctionnelle. Toutes les enzymes actuellement connues sont répertoriées sous un numéro de classification systématique à 4 nombres séparés par des points et précédés de « EC » soit EC X1.X2.X3.X4 :

- ✓ X1 : le premier nombre pouvant varier de 1 à 6 désigne la classe de l'enzyme qui dépend du type de réaction catalysée (Tableau I.2.1) :

<b>E.C.X1</b>	<b>Classification</b>	<b>Réaction catalysée</b>
<b>E.C.1</b>	Oxydoréductases	Transfert d'électrons, d'hydrogène et fixation d'oxygène
<b>E.C.2</b>	Transférases	Transfert d'atomes ou de groupes d'atomes
<b>E.C.3</b>	Hydrolases	Rupture de liaison, fixation de radicaux H ou OH issus de H <sub>2</sub> O
<b>E.C.4</b>	Lyases	Rupture de liaisons C-C, C-O, C-N
<b>E.C.5</b>	Isomérases	Isomérisation
<b>E.C.6</b>	Ligases	Formation de liaison carbone- métalloïde en utilisant l'énergie de l'ATP

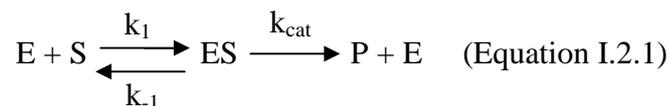
**Tableau I.2.1.** Classification des enzymes en fonction du numéro E.C.X1.

- ✓ X2 : le deuxième nombre désigne la sous-classe de l'enzyme qui est définie selon le mécanisme de la réaction. Dans le cas des oxydoréductases on distingue les déshydrogénases qui transfèrent les atomes d'hydrogène, les monooxygénases qui transfèrent  $\frac{1}{2} O_2$ , les dioxygénases qui transfèrent l' $O_2$  etc ;
- ✓ X3 : le troisième nombre désigne la nature de la molécule servant d'accepteur dans le cas d'un transfert ;
- ✓ X4 : le quatrième nombre est un numéro d'ordre de l'enzyme dans le groupe et dans le sous-groupe.

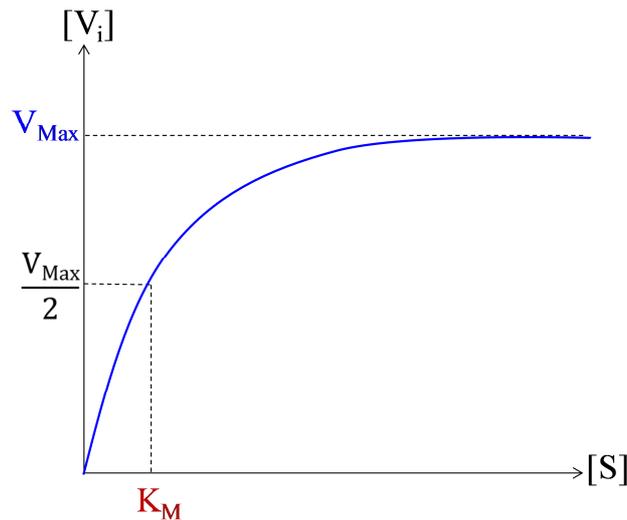
Par exemple la glucose oxydase identifiée par le numéro EC.1.1.3.4 est une oxydoréductase (1) agissant sur les groupes CH-OH des donneurs (1) et dont l'accepteur d'électrons est l'oxygène (3). La bilirubine oxydase identifiée par le numéro EC.1.3.3.5 est une oxydoréductase (1) agissant sur les groupes CH-CH des donneurs (3) avec l'oxygène comme accepteur d'électrons (3) [47].

### 2.2.1.3. Cinétique enzymatique

Dans les cas les plus simples en présence d'un substrat (S) une enzyme (E) va catalyser une réaction chimique pour donner un produit (P) en passant par la formation d'un complexe réversible enzyme-substrat (ES) (Equation I.2.1) :



La mesure de l'activité enzymatique est donnée par sa vitesse de réaction dans les conditions initiales notée  $V_0$ . Cette vitesse est mesurée en faisant varier la concentration de substrat [S] à concentration d'enzyme [E] constante. La courbe  $V_i = f([S])$  obtenue tend vers une valeur maximale  $V_{Max}$  (Figure I.2.5).



**Figure I.2.5.** Représentation graphique de l'évolution de la vitesse de la réaction enzymatique avec la concentration en substrat.

La relation entre la concentration du substrat et la vitesse de réaction d'une enzyme est exprimée par l'équation de Michaelis-Menten (Equation I.2.2) :

$$V_o = V_{Max}[S] / (K_M + [S]) \quad (\text{Equation I.2.2})$$

où  $K_M$  est la constante de Michaelis-Menten qui correspond à la concentration de substrat pour  $V_i = \frac{1}{2}V_{Max}$  c'est-à-dire lorsque la moitié des molécules d'enzyme sont saturées par le substrat. Le  $K_M$  indique l'affinité de l'enzyme pour son substrat à laquelle il est inversement proportionnel. Ainsi, plus sa valeur est faible plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est importante.

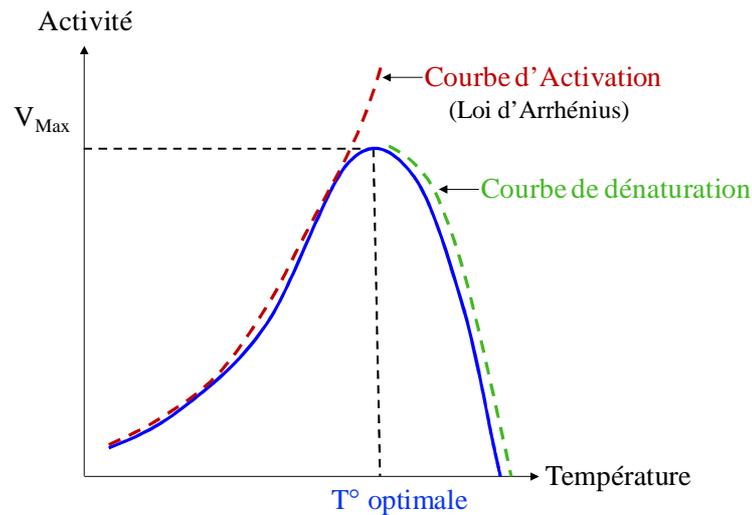
La constante catalytique  $k_{cat}$  indique la vitesse de transformation du substrat en produit. Elle représente le « turn-over » de l'enzyme c'est-à-dire le nombre de molécules de substrat transformées par molécule d'enzyme et par unité de temps lorsque l'enzyme est saturée par le substrat.

Avec les constantes  $K_M$  et  $k_{cat}$  il est possible d'évaluer et de comparer l'activité d'une enzyme par rapport à différents substrats. Ces constantes permettent également de comparer l'efficacité des enzymes entre elles grâce au rapport  $k_{cat}/K_M$ .

#### 2.2.1.4. Facteurs influençant l'activité enzymatique

##### ✓ La température

La température a deux effets sur la réaction enzymatique. Soit elle l'accélère en fournissant l'énergie nécessaire pour franchir la barrière due à l'énergie d'activation. Soit elle entraîne la dénaturation progressive de l'enzyme et donc sa désactivation [46]. La résultante de ces deux effets se traduit par l'existence d'une température optimale (Figure I.2.6).



**Figure I.2.6.** Effet de la température sur l'activité enzymatique, activation et dénaturation thermique.

En deçà de la température optimale (courbe en tirets rouges), la cinétique de la réaction enzymatique suit une loi d'Arrhenius (Equation I.2.3). De ce fait dans cette gamme de température la vitesse est multipliée par 2 tous les 10 °C.

$$k = A e^{\frac{-Ea}{RT}} \quad (\text{Equation I.2.3})$$

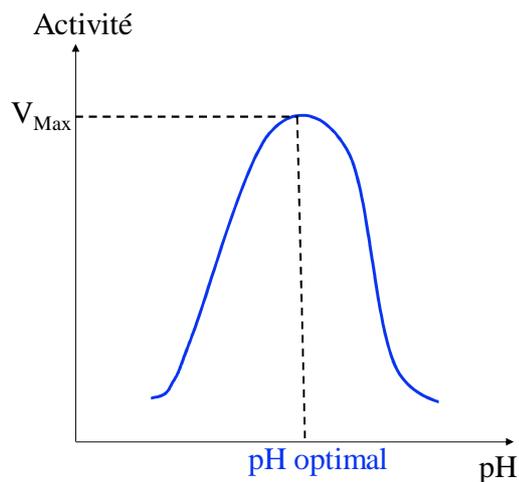
avec  $k$  la constante de vitesse,  $A$  le facteur pré-exponentiel,  $Ea$  l'énergie d'activation ( $J \cdot mol^{-1}$ ),  $T$  la température (K),  $R$  la constante des gaz parfaits ( $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$ ).

La température optimale de la plupart des enzymes est proche de celle de leur milieu cellulaire (enzymes mésophiles). Néanmoins certains organismes adaptés à des conditions de vie extrêmes, comme les bactéries des eaux thermales, ont des enzymes dont la température optimale avoisine les 100 °C (enzymes thermophiles) [44, 46].

### ✓ Le pH

Les enzymes, comme toutes les protéines, sont des molécules amphotères contenant un grand nombre de groupes acides et basiques principalement situés sur leur surface. Les charges sur ces groupes peuvent varier en fonction du pH de leur environnement.

Pour chaque enzyme il existe un pH optimal (Figure I.2.7). Aux valeurs extrêmes de pH il se produit une dénaturation de la protéine par modification de l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés. Cela conduit à une modification de la répartition des charges et des besoins en liaison hydrogène de la protéine, et donc à une modification de l'équilibre des forces faibles non liantes qui maintiennent sa conformation [44]. Aux valeurs intermédiaires, le pH influe sur l'activité en modifiant l'état d'ionisation du site actif et celui du substrat. Ces modifications vont avoir des effets sur la conformation de la protéine et/ou la disponibilité des fonctions chimiques de l'enzyme et/ou du substrat, permettant la fixation stéréospécifique.

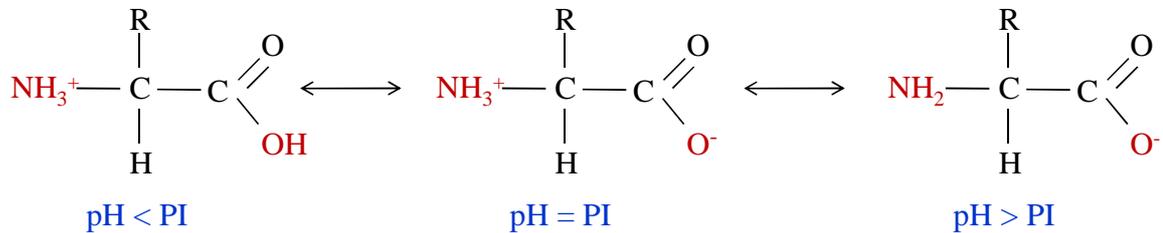


**Figure I.2.7.** Effet du pH sur l'activité enzymatique.

Le pH optimal de la plupart des enzymes est proche de la neutralité. Certaines enzymes ont des pH optimum extrêmes c'est le cas de la pepsine (pH 2) ou encore de la trypsine (pH 9) [46]. Il a été constaté qu'en général à 2 unités du pH optimum l'activité est réduite près de 100 fois, mais parfois cette gamme est beaucoup plus restreinte [44].

Les enzymes ont un point isoélectrique (PI) défini comme le pH où la molécule est sous sa forme zwitterionique (ion mixte) sa charge globale est alors nulle. Si  $\text{pH} < \text{PI}$ , la charge globale est positive car la molécule a tendance à conserver ses protons ou à capter ceux

provenant du milieu acide. Si  $\text{pH} > \text{PI}$ , la charge globale est négative car la molécule a tendance à céder ses protons au milieu basique (Figure I.2.8).



**Figure I.2.8.** Acide aminé sous forme zwitterionique ( $\text{pH} = \text{PI}$ ) et ionisée ( $\text{pH} < \text{PI}$  ou  $\text{pH} > \text{PI}$ ).

### ✓ La force ionique

La solubilité d'une protéine est fonction de la concentration en sels dissouts exprimée par la force ionique qui est définie par l'équation I.2.4 :

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i Z_i^2 \quad (\text{Equation I.2.4})$$

où  $c_i$  représente la concentration de chaque espèce ionique  $i$  et  $Z_i$  leur charge électrique.

Pour une force ionique donnée la solubilité dépend de la nature des sels en solution. A faible force ionique, elle augmente avec la concentration en sels qui se lient directement aux protéines augmentant ainsi les interactions avec l'eau et les répulsions entre protéines [44].

Les sels sont classés selon la série de Hofmeister (Figure I.2.9). A concentration égale, certains sels favorisent la solubilisation des protéines on parle de « salting-in », alors que d'autres favorisent leur précipitation ou « salting-out » [48-49]. Selon la nature des sels présents dans les tampons de mesure une même enzyme peut avoir une activité différente. L'activité de l'enzyme varie en fonction de l'effet des sels sur sa solubilité, sa stabilité, la compétition avec le substrat sur le site actif, l'inhibition des cofacteurs etc.

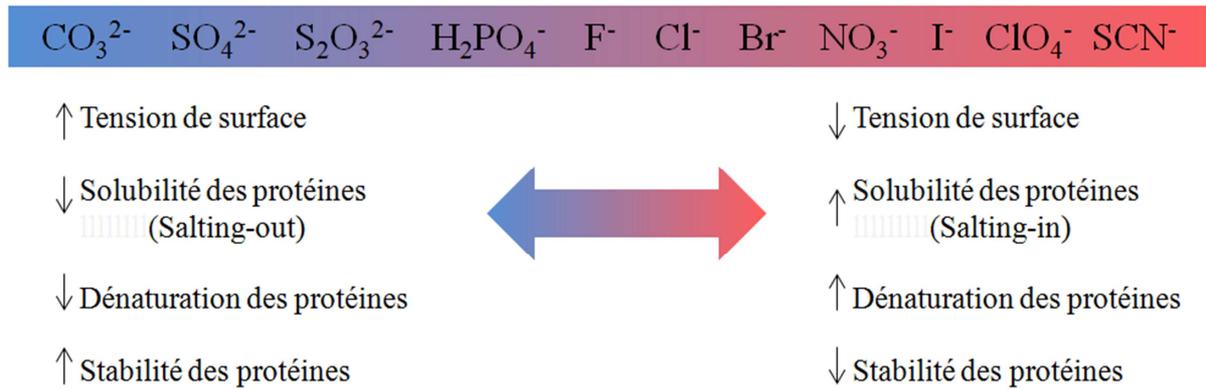


Figure I.2.9. Classement des sels selon la série de Hofmeister.

## 2.2.2. Les enzymes utilisées dans les biopiles

La variété de réactions pouvant être catalysées par les enzymes offre un large éventail de substances organiques utilisables comme combustibles dans les biopiles. Aussi, différentes enzymes anodiques et cathodiques ont été utilisées dans les biopiles enzymatiques.

### 2.2.2.1. Les enzymes anodiques

Les enzymes anodiques peuvent être classées selon le type de cofacteurs rédox associés. On retrouve les enzymes dites PQQ-dépendantes qui ont un coenzyme PQQ lié à l'enzyme de façon covalente. On distingue également les enzymes possédant comme cofacteur un nicotinamide adénine dinucléotide (NADH/NAD<sup>+</sup>) ou le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH/NADP<sup>+</sup>). Ces enzymes ont leur centre rédox généralement lié de façon non covalente et capable de diffuser loin de l'enzyme, permettant ainsi un transfert d'électrons efficace de l'enzyme à l'électrode.

Les enzymes anodiques regroupent aussi celles ayant comme cofacteur une flavine adénine dinucléotide (FAD). Le potentiel rédox de la FAD est réducteur ce qui est idéal pour la partie anodique d'une biopile. Ce cofacteur est étroitement lié et profondément enfoui dans la structure protéique. Cependant, l'importante distance entre le site actif de l'enzyme et la surface de l'électrode (> 21 Å pour la GOx par exemple) rend difficile les transferts électroniques directement de l'enzyme à l'électrode [50]. La GOx et la GDH sont les enzymes anodiques les plus couramment utilisées, leurs différentes caractéristiques ont été détaillées dans une revue en 2011 par Ferri et al. [51].

Parmi les enzymes anodiques on peut citer également les hydrogénases utilisées pour la réalisation de biopiles enzymatiques  $H_2/O_2$ , qui ont également été récemment passées en revue [52]. Les hydrogénases sont des enzymes métalliques possédant dans leur site actif un atome de fer et un atome de nickel. Ces enzymes sont constituées de deux sous-unités globulaires avec le site actif [NiFe] profondément enfoui dans la sous-unité la plus large.

Le tableau I.2.2 présente quelques exemples d'enzymes anodiques utilisées dans les biopiles enzymatiques.

Coenzyme	Substrat	Enzyme	Produit	Références
PQQ	Aldéhyde	Aldéhyde déshydrogénase	Acétate	[20, 53-55]
NAD <sup>+</sup> / PQQ	Glucose	Glucose déshydrogénase	Glucose-6-phosphate	[51, 56-60]
	Alcool	Alcool déshydrogénase	Aldéhyde	[20, 53-55, 61-62]
	Fructose	Fructose déshydrogénase	5-déhydro-D-fructose	[63-65]
	Lactate	Lactate déshydrogénase	Pyruvate	[66-68]
FAD	Glucose	Glucose oxydase	Gluconolactone + peroxyde	[51, 69-75]
	Glucose	Glucose déshydrogénase	Gluconolactone	[51, 60, 76-77]
	Pyranose	Pyranose déshydrogénase	Pyranos-2-ulose	[78-80]
FAD/Hème	Cellobiose	Cellobiose déshydrogénase	Cellobiono-1,5-lactone	[81-83]
NiFe	Hydrogène	Hydrogénase	Protons	[52, 84-85]

**Tableau I.2.2.** Exemple d'enzymes anodiques utilisées dans les biopiles enzymatiques, classées en fonction du coenzyme.

#### 2.2.2.2. Les enzymes cathodiques

Les enzymes utilisées dans les cathodes biologiques sont généralement des oxydases multi-cuivre. Elles sont capables de catalyser plus efficacement que le platine la réduction à quatre électrons de l'O<sub>2</sub> en eau et elles ont une spécificité élevée pour cette réaction [86-88]. Les exemples incluent les laccases végétales et fongiques [58, 69, 73, 75, 89] ainsi que les bilirubines oxydases [90].

Dans le cas de la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> les enzymes cathodiques couramment utilisées sont les peroxydases telles que la microperoxydase [61, 66, 91] et la peroxydase de raifort (HRP) [92-93]. En plus des oxydases multi-cuivre et des peroxydases, la tyrosinase [94] et la cytochrome oxydase [95] ont également été utilisées à la cathode.

#### 2.2.3. Immobilisation des enzymes sur les électrodes

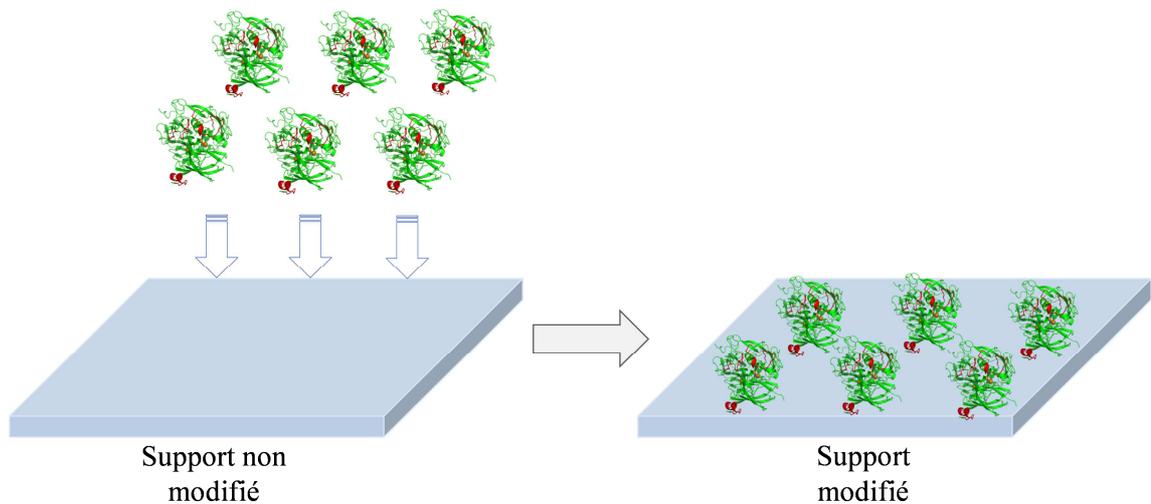
L'immobilisation des enzymes en présence ou non de médiateurs rédox offre de nombreux avantages, tels que l'amélioration du transfert électronique et de la stabilité à long terme [96]. Cependant, l'immobilisation peut aussi affecter la stabilité et/ou l'activité de l'enzyme. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend de la nature et de la force des liaisons à l'électrode, des conditions d'immobilisation, du degré de confinement et des conditions dans lesquelles les réactions enzymatiques se produisent dans une électrode en fonctionnement.

Chaque méthode d'immobilisation a ses avantages et ses inconvénients [17, 97-98]. Le procédé d'immobilisation doit donc être choisi avec soin pour éviter la dénaturation des enzymes et la perte de liberté structurelle requise pour leur activité [41-42]. Les principales techniques d'immobilisation sont :

- ✓ l'adsorption physique ;
- ✓ la reconstitution de l'apoenzyme ;
- ✓ l'encapsulation ;
- ✓ le greffage covalent ;
- ✓ l'immobilisation par réticulation ;
- ✓ l'immobilisation dans un hydrogel rédox.

### 2.2.3.1. L'adsorption physique

La méthode d'immobilisation la plus simple et la moins coûteuse est l'adsorption physique (Figure I.2.10). Elle peut se faire en présence de médiateurs diffusant en solution ou co-adsorbés avec l'enzyme [5]. Les enzymes sont retenues à la surface du support grâce à des liaisons de Van der Waals et des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles). Les enzymes non adsorbées sont ensuite éliminées par lavage.



**Figure I.2.10.** Immobilisation des enzymes par adsorption physique.

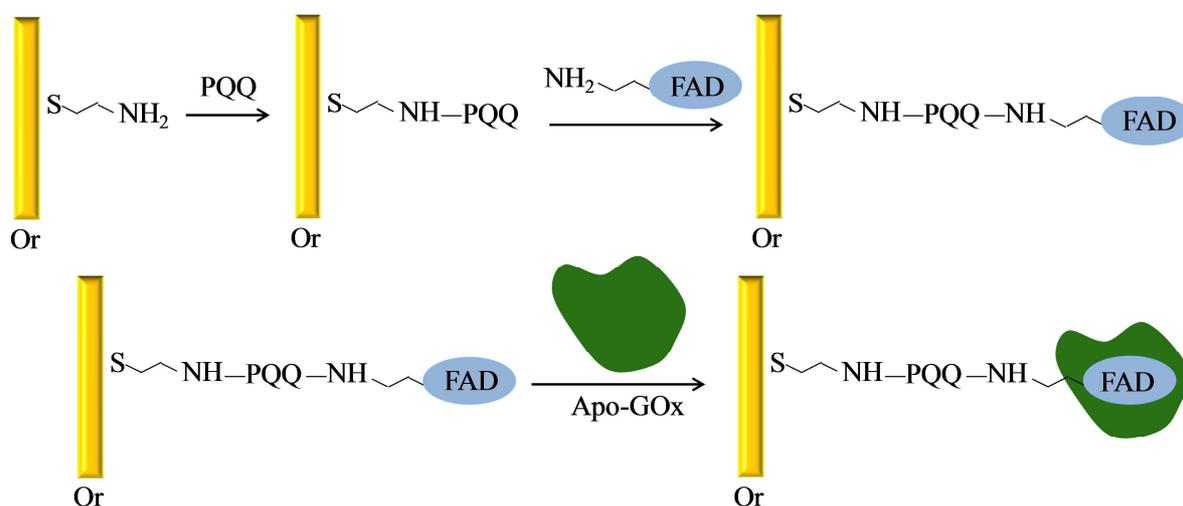
L'adsorption des protéines sur une surface fonctionnalisée est réversible. Ainsi la modification du pH, de la force ionique, de la concentration en substrat ou de la température, permet de les séparer aisément du support. Cette technique est particulièrement simple et économique.

Cependant, si les forces de liaison (principalement électrostatiques) entre l'enzyme et le support sont trop faibles, les enzymes peuvent se désorber et contaminer la solution. Par contre si elles sont trop fortes, il peut se produire une dénaturation de l'enzyme pendant le processus d'immobilisation [5, 41].

### 2.2.3.2. La reconstitution de l'apoenzyme

Ce concept a été introduit en 1996 par Willner et al. [99] avec la glucose oxydase. La méthode consistait à reconstituer l'enzyme après le greffage de son centre actif sur une électrode d'or (Figure I.2.11).

D'abord une première sous-couche à base de cystamine est liée à une électrode d'or rugueuse, puis cette couche de base réagit avec la PQQ. La surcouche de PQQ résultante est ensuite mise en présence de N-(2-aminoéthyl)-FAD pour donner une couche de PQQ/FAD. Le traitement de cette couche avec l'apo glucose oxydase conduit à la reconstitution d'une monocouche dense de GOx, connectée électriquement à l'électrode.



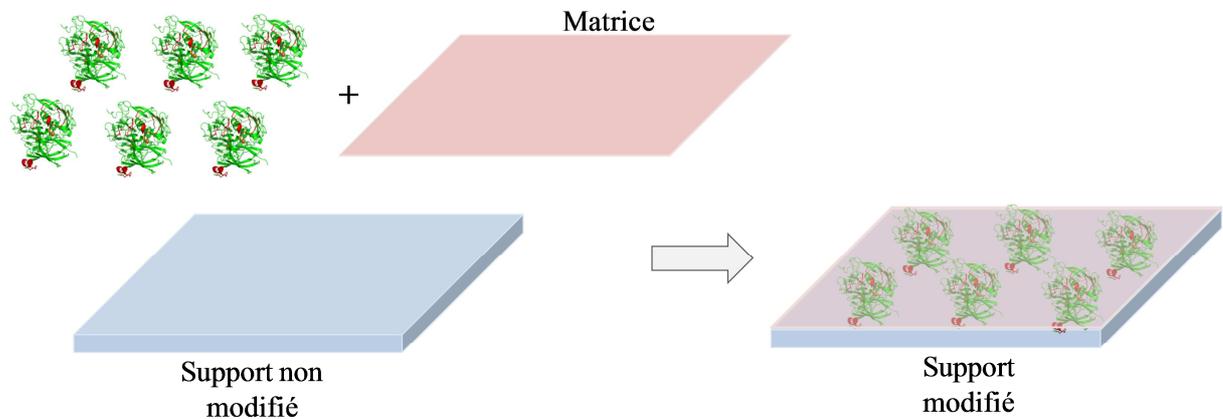
**Figure I.2.11.** Reconstitution de la glucose oxydase sur une monocouche de PQQ/FAD greffée sur une électrode d'or.

Ce système permet d'obtenir une cinétique électrochimique rapide entre l'électrode et l'enzyme. Dans leur revue sur les biopiles Osman et al. ont rapporté de nombreux autres exemples de ce type d'immobilisation [5].

### 2.2.3.3. L'immobilisation par encapsulation

L'encapsulation au sein d'une matrice permet d'éviter le relargage des enzymes et/ou des médiateurs dans le mélange réactionnel, tout en autorisant la diffusion de petites molécules à travers la matrice (Figure I.2.12). L'encapsulation est une procédure qui ne lie pas

chimiquement les enzymes. Elles sont immobilisées physiquement et la structure doit permettre un degré de mobilité suffisant des enzymes.

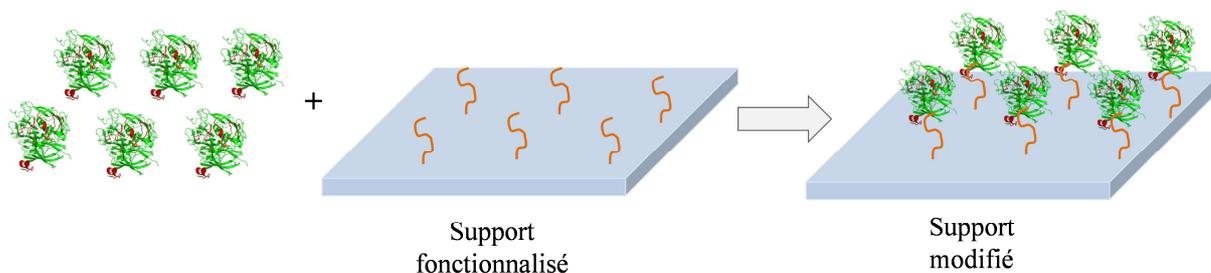


**Figure I.2.12.** Immobilisation des enzymes par encapsulation.

Les matrices peuvent être classées en plusieurs catégories. On distingue les matrices inorganiques (gels de silice, oxydes métalliques), les matrices organiques (chitosan, Nafion® et alginate), les polymères synthétiques (polyacrylamide, polyuréthanes...), et enfin les matériaux composites (pâte de carbone) [5, 100]. Les enzymes peuvent être également encapsulées dans des matrices de polymères conducteurs électroniques [101-104]. L'encapsulation est une méthode très largement utilisée car elle permet de maintenir la fixation irréversible de l'enzyme et sa stabilité, tout en offrant une bonne efficacité catalytique. Toutefois, une perte d'activité de l'enzyme immobilisée est souvent constatée.

#### 2.2.3.4. Le greffage covalent

Des enzymes isolées peuvent être liées de manière covalente à des supports poreux tels que la cellulose, la céramique et les oxydes métalliques [97-98]. L'immobilisation se fait par l'intermédiaire de différents groupes fonctionnels présents à la fois sur le support et sur l'enzyme (Figure I.2.13). Ces groupements enzymatiques ne doivent pas être essentiels à l'activité catalytique. Les groupes fonctionnels concernés sont les amines, les acides carboxyliques, les hydroxyles, les résidus phénoliques (tyrosine) et les groupements imidazoles présents sur les histidines [5].

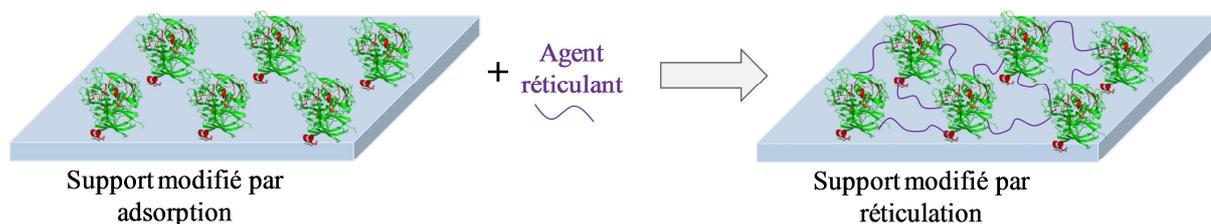


**Figure I.2.13.** Immobilisation des enzymes par greffage covalent.

L'immobilisation se fait en trois étapes : activation du support, couplage de la protéine, et rinçage afin d'éliminer toutes les protéines qui auraient pu s'adsorber sur le support. Les conditions expérimentales pour ce type d'immobilisation sont importantes, car elles déterminent le niveau de rétention de l'activité enzymatique.

### 2.2.3.5. Immobilisation par réticulation

L'immobilisation des enzymes par réticulation consiste à créer des liaisons covalentes intermoléculaires entre les groupes actifs des enzymes de manière à former des agrégats tridimensionnels (Figure I.2.14). Les enzymes sont adsorbées sur un support, puis traitées par un agent chimique hydrosoluble bi ou multifonctionnel comme le glutaraldéhyde. Les enzymes sont alors susceptibles de réagir sur les groupements fonctionnels libres, en formant des liaisons chimiques fortes permettant d'obtenir un réseau enzymatique tridimensionnel et insoluble. Les enzymes sont ensuite encapsulées dans un gel qui les réticule.



**Figure I.2.14.** Immobilisation des enzymes par réticulation.

Cette technique est simple à mettre en œuvre mais le choix du degré de réticulation peut influencer les propriétés physiques. Dans la plupart des cas, les produits sont en effet

gélatineux, difficiles à filtrer et présentent une faible résistance mécanique et une faible activité enzymatique [97].

### 2.2.3.6. Immobilisation dans un hydrogel rédox

Une méthode d'immobilisation conjointe de l'enzyme avec un médiateur dans un hydrogel rédox soluble a été développée par Heller et collaborateurs au début des années 1990. L'utilisation d'hydrogels rédox permet d'améliorer les transferts électroniques entre l'enzyme et l'électrode et d'éviter le relargage du médiateur en solution. En utilisant ce procédé Heller et son équipe ont pu mettre au point des biocapteurs et par la suite des biopiles miniatures [89, 105-108].

#### ✓ Principe de la méthode

Dans ce procédé l'enzyme est associée à un polymère, sur lequel sont greffés des centres rédox à base de métal de transition. En raison d'une entropie de mélange faible entre l'enzyme et le polymère, ce dernier est conçu de façon à être polycationique. L'enzyme étant polyanionique à pH neutre si sa fraction massique est assez élevée pour que sa charge nette soit suffisamment négative pour équilibrer la charge positive du polymère rédox, il se forme un adduit électrostatique hydrosoluble.

La formation de cet adduit de conductivité électronique faible, permet d'éviter toute séparation de phase. Cet adduit est réticulé sur la surface de l'électrode à l'aide d'un réticulant chimique tel que le poly éthylène glycol diglycidyl éther (PEGDGE). Le polymère ainsi réticulé gonfle au contact de l'eau pour former un hydrogel (Figure I.2.15). La diffusion des ions, des électrons ainsi que des réactifs et des produits biologiques hydro solubles se fait rapidement dans les hydrogels rédox.

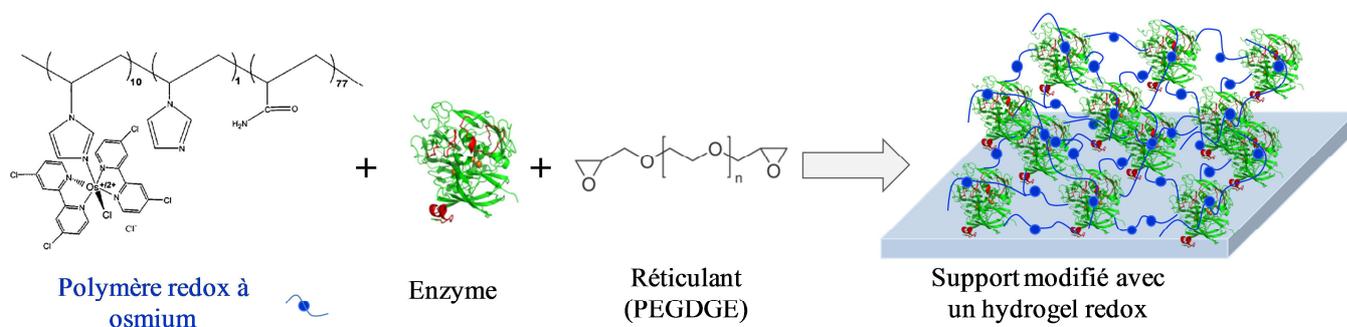


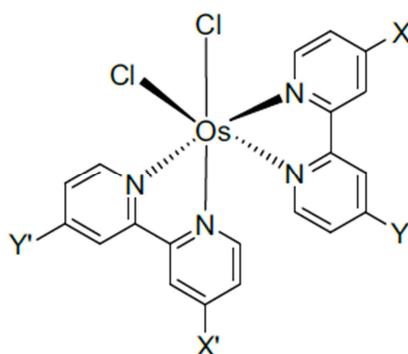
Figure I.2.15. Immobilisation des enzymes dans un hydrogel rédox.

Dans l'hydrogel les enzymes sont liées par covalence et connectées électriquement à l'électrode par un réseau rédox. On a de ce fait une connexion électrique efficace des enzymes quelle que soit leur orientation sur l'électrode. La conduction électronique est principalement contrôlée par un transfert d'électrons qui se fait par collision entre les centres rédox du polymère qui sont réduits et oxydés.

Pour chaque enzyme il existe un ratio optimal pour lequel la meilleure densité de courant peut être obtenue. Une fraction massique excessive d'enzyme peut diminuer la densité de courant, car à la différence du polymère rédox l'enzyme est un isolant électronique. Par ailleurs, lorsque la fraction massique du polymère rédox est trop importante le flux d'électrons est réduit en raison de la plus faible quantité de molécules d'enzyme [105, 109].

### ✓ Structure des polymères rédox

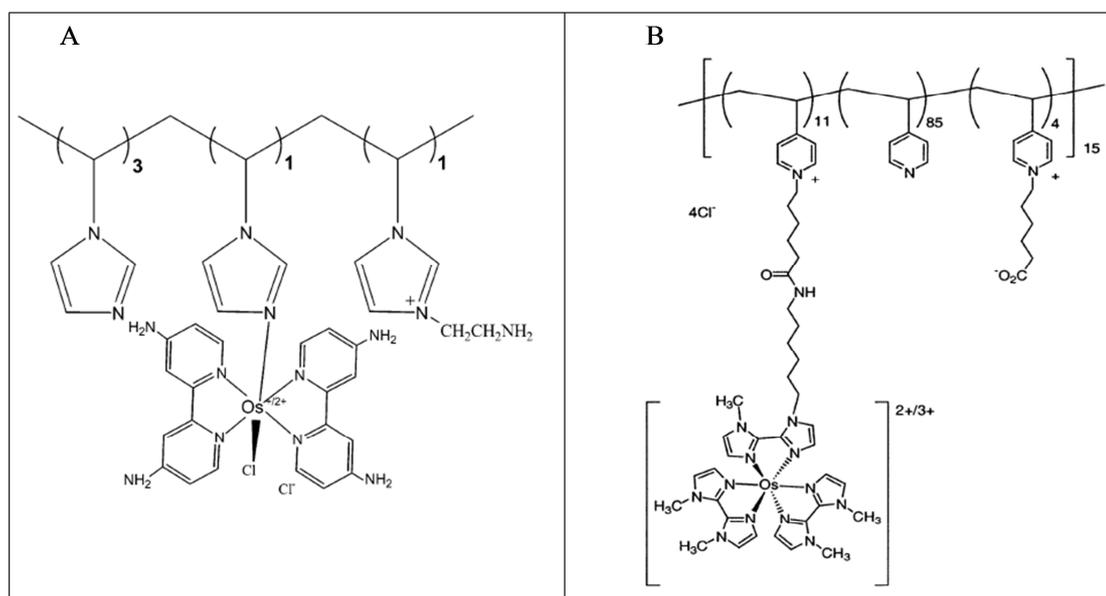
Les polymères les plus couramment utilisés sont le poly-vinylimidazole, le polyacrylamide, la poly-allylamine et le poly-vinylpyridine. Les centres rédox sont généralement des complexes d'osmium (Figure I.2.16) ou de ruthénium [110]. Les complexes d'osmium sont particulièrement utilisés car leur potentiel rédox peut être facilement modulé en fonction du choix des substituants [111]. Ainsi les potentiels rédox des hydrogels peuvent être adaptés à une combinaison spécifique enzyme/réaction [112-113].



**Figure I.2.16.** Exemple d'un complexe d'osmium avec deux ligands chloro et deux ligands bipyridine sur lesquels il est possible de greffer des groupements en position X ou Y.

Les complexes d'osmium peuvent être liés de manière flexible au squelette du polymère par l'intermédiaire d'une chaîne carbonée appelée « espaceur » (Figure I.2.17) [82, 114]. Ces

espaceurs offrent plus de mobilité aux médiateurs, ce qui améliore le transfert d'électrons par collisions et par conséquent les cinétiques de transfert d'électrons entre l'enzyme et l'électrode. L'efficacité du transfert électronique est donc corrélée à la longueur de l'espaceur dont l'optimum est compris entre 8 et 15 atomes [113-115].



**Figure I.2.17.** Structure du PVI-[Os(4,4'-diamino-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> avec le squelette du polymère directement coordonné au complexe d'osmium (A). Structure du PVP-[Os(N,N'-dialkyl-2,2'-biimidazole)<sub>3</sub>]<sup>2+/3+</sup> avec le squelette du polymère coordonné au complexe d'osmium *via* un espaceur de 13 atomes [116].

### ✓ Intérêt de l'immobilisation dans un hydrogel rédox

L'immobilisation conjointe des médiateurs rédox permet d'éviter leur diffusion d'une électrode à l'autre. En effet, en l'absence de membrane le médiateur rédox anodique réduirait le médiateur rédox cathodique. De plus, si le médiateur anodique diffusait vers la cathode il y serait oxydé. De même si le médiateur cathodique diffusait vers l'anode il y serait réduit et au final la puissance de sortie serait nulle [108].

Les polymères contenant des médiateurs rédox à base de complexes métalliques ont été utilisés notamment dans l'immobilisation de la GOx [70, 75, 115], des laccases [106, 117-118] et des bilirubine oxydases [90]. Dans nos travaux nous avons opté pour ce procédé d'immobilisation de l'enzyme avec un médiateur dans un hydrogel rédox. Cette méthode

permet en effet d'augmenter le courant en piégeant plusieurs molécules d'enzyme dans un réseau tridimensionnel, mais également d'accroître la stabilité apparente.

## **2.2.4. Intérêt et applications des biopiles enzymatiques**

### **2.2.4.1. Travaux précurseurs sur les biopiles enzymatiques**

Les premières biopiles enzymatiques ont été rapportées par Yahiro et al. en 1964. Trois biopiles ont été réalisées avec des anodes à base de glucose oxydase, de D-amino acide oxydase, et d'alcool déshydrogénase. La réduction de l'O<sub>2</sub> dans les trois cas se faisait sur une électrode à base de feuille de platine. Des trois dispositifs la biopile glucose/O<sub>2</sub> était la plus performante malgré une densité de courant faible de 30 nA.cm<sup>-2</sup> à 285 mV vs. Ag/AgCl [119].

Bien que la biopile soit opérationnelle, elle présentait une faible stabilité et des mécanismes de transfert d'électrons peu efficaces. Les recherches sur les piles utilisant des électro catalyseurs métalliques à la place des enzymes ont donc été poursuivies. Cependant, ces catalyseurs ne permettaient pas une oxydation complète et étaient affectés par des problèmes de passivation à basse température. Ces différentes limitations n'ont pas encouragé l'approfondissement des travaux dans ce sens.

Par la suite, la recherche sur les biopiles enzymatiques a été relancée dans les années 1980 avec l'étude de l'alcool déshydrogénase pour l'oxydation du méthanol. Ces investigations ont continué jusqu'à la fin des années 1990, lorsque Palmore et Whitesides ont montré que l'oxydation complète du méthanol en dioxyde de carbone pouvait être réalisée avec une cascade enzymatique. Cette cascade enzymatique mettait en jeu l'alcool déshydrogénase, la formaldéhyde déshydrogénase et la formiate déshydrogénase [120].

### **2.2.4.2. Avantages des biopiles enzymatiques**

Du fait de la sélectivité des enzymes leur immobilisation sur les électrodes permet de garantir la spécificité des deux demi-réactions anodique et cathodique, et d'éviter que les substrats/produits de l'une n'interfèrent avec l'autre [82]. Cette propriété particulière a conduit à la conception de biopiles sans membrane permettant d'obtenir une simplicité structurale, un coût réduit et une plus grande possibilité de miniaturisation.

La première biopile miniature sans membrane a été conçue en 2001 par Heller et collaborateurs. Cette biopile glucose/O<sub>2</sub> était constituée de deux fibres de carbone de 7 µm de diamètre enduites d'un hydrogel à base de polymère rédox et d'enzyme (GOx et laccase). La biopile fonctionnait à 0,4 V vs. Ag/AgCl avec une densité de puissance à 140 µW.cm<sup>-2</sup> [89].

Le fait d'immobiliser de la GOx dans un hydrogel rédox a permis d'accroître la durée de vie jusqu'à une semaine dans les conditions physiologiques [108, 121]. En comparaison la biopile au méthanol de Palmore utilisant l'enzyme en solution ne fonctionnait que pendant 8 heures. Par la suite, la même équipe a démontré dans une série de publications une augmentation du potentiel de fonctionnement de la biopile. Ils ont pu obtenir des potentiels suffisamment importants susceptibles d'alimenter de petits appareils électroniques [108, 122] jusqu'à 0,78 V vs. Ag/AgCl dans du tampon 20 mM citrate à pH 5 [123].

Ces travaux ont confirmé que les enzymes peuvent fournir une sélectivité suffisante pour la réalisation de systèmes sans membrane. Même si au final seules quelques biopiles enzymatiques sans membrane ont été reportées [5].

#### 2.2.4.3. Limitations des biopiles enzymatiques

Les systèmes enzymatiques comme les microbiens présentent l'avantage d'utiliser des catalyseurs biologiques, non polluants et renouvelables, tout en apportant une excellente spécificité. Cependant les biopiles enzymatiques ont deux limitations majeures liées à leur stabilité et leur puissance (Tableau I.2.3).

Type de pile	Puissance maximale	Durée de vie maximale
Piles à combustible	~ 100 mW.cm <sup>-2</sup>	Plusieurs mois (~ 1 an)
Biopiles microbiennes	~ 100 µW.cm <sup>-2</sup>	Plusieurs années (~ 5ans)
Biopiles enzymatiques	~ 1 mW.cm <sup>-2</sup>	Quelques jours (~ 30 jours)

Tableau I.2.3. Comparaison des puissances et des durées de vie des différents types de piles.

Lors d'un fonctionnement dans un environnement extérieur à son micro-organisme d'origine, l'enzyme perd en stabilité et sa durée de vie diminue. La stabilité peut néanmoins être allongée à quelques jours pour une enzyme immobilisée.

De plus, en raison d'un faible taux de transfert d'électrons entre le site actif de l'enzyme et l'électrode, les densités de courant restent moindres par rapport aux piles à combustibles classiques [124]. Même si les densités de courant peuvent être amplifiées en utilisant plusieurs couches d'enzymes sur une électrode, les biopiles enzymatiques les plus performantes n'ont permis d'obtenir que des densités de puissance de l'ordre du  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  [20, 63, 125-126].

#### 2.2.4.4. Applications des biopiles enzymatiques

L'utilisation de biopiles enzymatiques reste néanmoins extrêmement intéressante pour l'alimentation de dispositifs électriques portables nécessitant de faibles puissances et facilement rechargeables. C'est le cas des téléphones mobiles, des lecteurs MP3, des capteurs etc [127].

Dans cet ordre d'idée en 2007 la société japonaise de multimédia Sony en collaboration avec l'équipe du Professeur Kenji Kano a proposé un prototype de biopile enzymatique glucose/ $\text{O}_2$ . Ces biopiles utilisaient un couple GDH/diaphorase à l'anode et une BOD à la cathode, elles délivraient une densité de puissance d'environ  $1,5 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ . La connexion en série de quatre de ces biopiles, a permis l'alimentation d'un baladeur numérique (Figure I.2.18) [128].



Figure I.2.18. Biopiles enzymatiques Sony alimentant un lecteur MP3 [128].

Les biopiles enzymatiques présentent également un grand intérêt pour des applications biomédicales. Elles peuvent être utilisées pour alimenter des dispositifs miniatures implantables dans l'organisme. Ces appareils peuvent alors utiliser comme carburants des éléments présents dans le corps humain comme le glucose ou les acides organiques. C'est le cas notamment des capteurs à glucose alimentés par des biopiles glucose/O<sub>2</sub>.

### **2.2.5. La biopile enzymatique glucose/O<sub>2</sub>**

#### **2.2.5.1. Problématique**

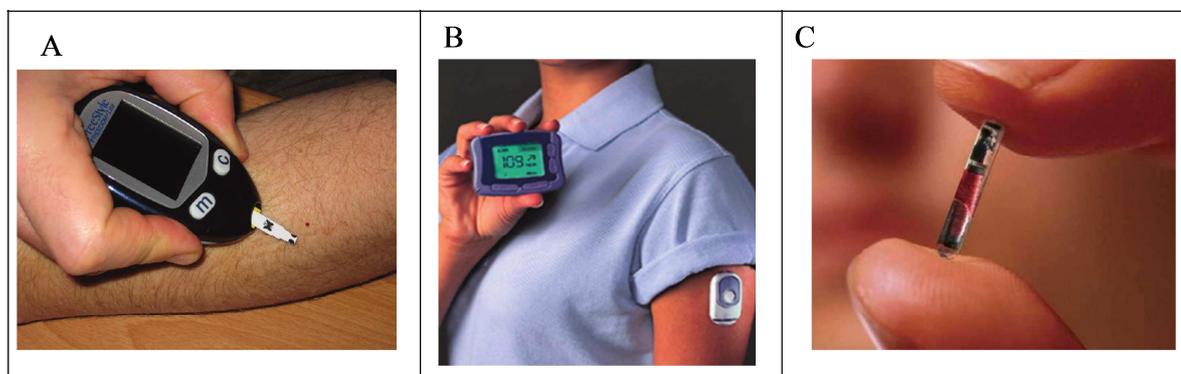
Actuellement, des centaines de millions de personnes dans le monde souffrent du diabète. Cette maladie se caractérise par un excès permanent de glucose dans le sang par rapport aux taux normaux qui sont compris entre 4,4 mM et 6,6 mM [129]. Sans traitement approprié le diabète peut avoir de graves conséquences : accidents vasculaires cérébraux, maladies cardiaques, amputations, cécité, insuffisance rénale, dégénérescence nerveuse, etc [130]. Afin de prévenir les complications inhérentes à cette maladie, les patients doivent tester leur glycémie quotidiennement voir même plusieurs fois par jour.

Le nombre de tests de glycémie réalisés annuellement dépasse largement le nombre combiné de toutes les autres analyses chimiques et biochimiques réalisées dans le monde. De plus, les frais médicaux engagés par les patients diabétiques sont quatre fois supérieurs à ceux des patients non diabétiques [122, 130].

Hammond et collaborateurs ont étudié l'impact du contrôle régulier de la glycémie chez des patients traités par perfusion continue d'insuline sous-cutanée. Leurs travaux ont mis en évidence l'intérêt d'une vérification continue de la glycémie chez les patients diabétiques. Ils ont en effet constaté que des mesures fréquentes (quatre à cinq mesures par jour), sont nécessaires pour atteindre un contrôle optimal de la glycémie chez les patients diabétiques traités intensivement [131].

Le défi actuel est donc de permettre aux patients diabétiques de doser régulièrement leur glycémie de manière simple et peu coûteuse. De ce fait, il s'avère indispensable de concevoir des biocapteurs à glucose efficaces et idéalement implantables. Ces dispositifs devraient alors être alimentés par des biopiles miniatures, capables de fonctionner en continu pendant de longues périodes et fournissant des puissances faibles mais suffisantes (~ 3  $\mu$ W) [116, 129].

Le premier glucomètre portable le Reflectance Meter® a été commercialisé en 1969 par le groupe Ames (racheté par Bayer). Cet appareil de la taille d'une petite radio portative pesait 1,2 kg et était destiné à une utilisation en milieu hospitalier. Puis en 1981 la même entreprise a développé le premier indicateur de glycémie à usage personnel, le Glucometer I® [132]. Par la suite des capteurs à glucose plus petits ont été développés entre 1991 et 2000, mais ils ne permettaient pas un contrôle continu de la glycémie [130, 132]. Il existe de nos jours des capteurs à glucose permanents et autonomes tels que le Guardian Real-Time® (Medtronic), le DexCom Seven Plus® (Novalab), le Freestyle Navigator® (Abbott Diabetes Care). Mais la taille de leur batterie reste le facteur limitant leur implantation dans le corps humain (Figure I.2.19).



**Figure I.2.19.** Evolution de la taille des capteurs à glucose : bande micro coulométrique Freestyle® développée par Adam Heller et commercialisée dans les années 2000 (A) [130], taille actuelle des capteurs à glucose Freestyle Navigator® (B) [130], dimension souhaitée équivalente à celle de la puce d'identification radio fréquence (RFID) VeriChip® de Applied Digital (C) [133].

En vue d'alimenter de tels capteurs de nombreuses biopiles à glucose ont déjà été développées [17, 134-135]. On peut citer notamment les travaux de Cosnier et collaborateurs [136-139] qui ont récemment rapporté pour la première fois, une biopile glucose/O<sub>2</sub> implantée dans un mammifère (Figure I.2.20). Cette biopile basée sur des électrodes de nanotubes de carbone, utilisait la GOx pour l'oxydation du glucose et une laccase pour la réduction de l'oxygène. Implantée dans la cavité abdominale d'un rat, la biopile générait une densité de puissance 193,5  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  à 0,57 V [140].

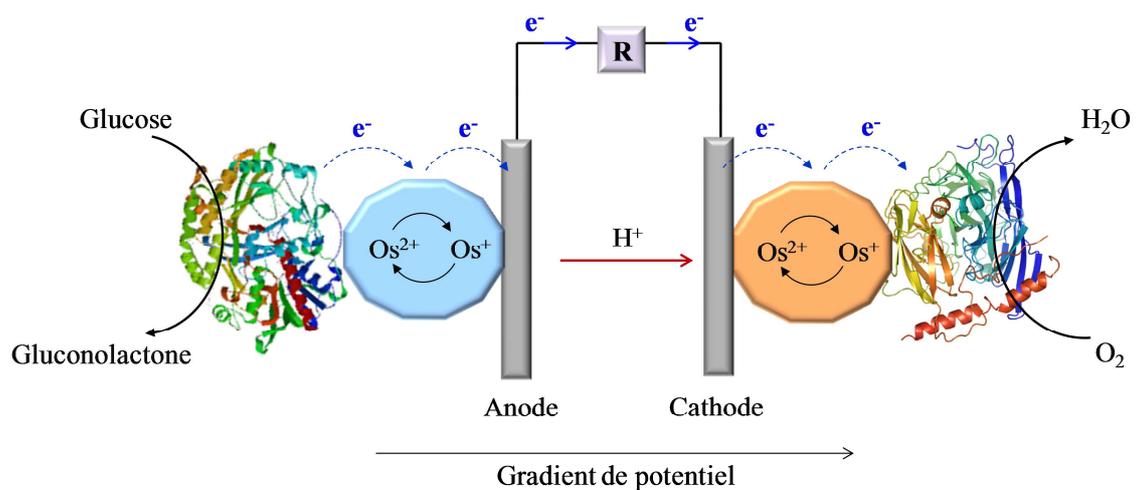


**Figure I.2.20.** Biopile implantable développée par Cosnier et al.[141].

Les biopiles enzymatiques sans membrane telle que celle conçue par Heller en 2001 [89], offrent grâce à leur petite taille, la possibilité d'alimenter des biocapteurs à glucose implantables. Aussi, nos travaux de recherche se sont orientés vers l'amélioration des performances de ce type de biopiles dont quelques-unes ont déjà été rapportées [70, 75, 105, 108, 112, 121, 142-144].

### 2.2.5.2. La biopile enzymatique glucose/O<sub>2</sub> étudiée au CRPP

Les biopiles glucose/O<sub>2</sub> étudiées au CRPP utilisent le plus souvent à l'anode la GOx ou la glucose déshydrogénase, pour oxyder le glucose en gluconolactone. La réduction de l'O<sub>2</sub> en eau est assurée à la cathode par des oxydases multi-cuivre en particulier les laccases et les bilirubine oxydases. Les enzymes immobilisées sur les électrodes peuvent être associées ou non à des médiateurs rédox qui sont des polymères rédox à base d'osmium (Figure I.2.21).



**Figure I.2.21.** Principe de la biopile enzymatique glucose/O<sub>2</sub> sans membrane avec les enzymes et les polymères rédox immobilisés sur les électrodes.

Le bilan réactionnel théorique de la biopile enzymatique glucose/O<sub>2</sub> est le suivant :



Dans les conditions physiologiques pour des électrodes de même dimension, il a été constaté que les densités de courant anodiques sont supérieures aux densités de courant cathodiques. La cathode est aussi l'électrode la moins stable dans le sérum ou implantée dans un organisme vivant [108, 121]. La cathode est donc la partie limitante dans les biopiles enzymatiques glucose/O<sub>2</sub>.

### 2.3. Conclusion intermédiaire

Par l'utilisation de biocatalyseurs et de combustibles d'origine naturelle, les biopiles offrent une excellente alternative aux piles à combustible inorganiques classiques. Bien que les puissances générées soient plus faibles et que la stabilité reste à améliorer, les biopiles enzymatiques en particulier amènent par leur spécificité de substrat, la possibilité d'obtenir des systèmes miniatures permettant d'alimenter des dispositifs implantables comme les biocapteurs.

Les biocapteurs à glucose implantables font l'objet de nombreuses recherches du fait de la gravité du diabète et de l'importance croissante de la population touchée par cette maladie. Des biopiles glucose/O<sub>2</sub> miniatures qui pourraient alimenter ce type de capteurs ont été réalisées. Cependant, leurs performances restent limitées par la cathode.

Aussi, nos travaux de recherche se sont articulés autour de l'étude et de l'optimisation des cathodes enzymatiques pour les biopiles glucose/O<sub>2</sub>. Nous nous sommes intéressés en particulier aux cathodes à base de bilirubine oxydases, car ces enzymes ont montré d'excellentes performances dans les conditions physiologiques.

Il a en effet été démontré que les BODs immobilisées sur la surface des électrodes sont plus efficaces que le platine pour la réduction à quatre électrons de l'O<sub>2</sub> en eau dans les conditions physiologiques [109, 143]. Cette particularité en fait des enzymes prometteuses

pour l'élaboration de cathodes à oxygène dans les biopiles et les dispositifs médicaux implantables [145-154].

La dernière partie de ce chapitre présente une étude détaillée des bilirubine oxydases et des différents travaux déjà réalisés avec ces enzymes.

### **3. Les Bilirubine oxydases dans les biopiles enzymatiques**

Les bilirubine oxydases (BODs) sont des oxydases multi-cuivre ou multi copper oxydases (MCOs). Ces enzymes possèdent quatre domaines de cuivre appelés cuivre de type 1, cuivre de type 2 et cuivre de type 3. Cette famille d'enzymes a été largement étudiée en raison de leur utilisation dans de nombreuses applications biotechnologiques telles que le blanchiment de la pâte à papier, la décoloration des colorants synthétiques, la synthèse de polymères complexes, l'assainissement des sols pollués, les biopiles et les biocapteurs [9, 155-156].

Ces enzymes sont en effet capables d'oxyder de multiples substrats tels que les phénols, l'ascorbate, la bilirubine et divers ions métalliques. Elles catalysent également la réduction concomitante à quatre électrons de l'oxygène en eau, ce qui en fait des enzymes de choix pour les cathodes enzymatiques [86].

Les MCOs sont constituées de plusieurs sous classes : les ascorbate oxydases (EC 1.10.3.3) [157-162], les céruloplasmines (EC 1.16.3.1) [163-164], les bilirubine oxydases (EC 1.3.3.5) [165-166], et les laccases (EC 1.10.3.2) [167-170]. Les laccases ont été énormément utilisées dans les applications industrielles principalement en raison de leur large spécificité de substrats, leur facilité de clonage et d'expression, et leur grande activité catalytique [171-172].

Tarasevich et collaborateurs [173] ont été les premiers d'une longue série de chercheurs à utiliser les laccases pour la réalisation de cathodes enzymatiques pour la réduction de l'oxygène [106, 117, 174-175]. Cependant, la plupart des laccases ont une mauvaise stabilité en présence de chlore et un pH optimum acide ce qui limite considérablement leur utilisation dans les conditions physiologiques [176].

En 1981, Tanaka et Murao [177] ont découvert les bilirubine oxydases. D'abord utilisées pour la détection de la bilirubine qu'elles sont capable d'oxyder [178], ces enzymes sont depuis 2001 intégrées aux cathodes enzymatiques pour la réduction de l'oxygène [179].

Contrairement aux laccases les BODs ont entre autres caractéristiques, une activité et une stabilité élevées à pH neutre et une grande tolérance au chlore. Ces propriétés font des BODs d'excellents candidats pour la réduction de l'O<sub>2</sub> dans les conditions physiologiques [176].

### 3.1. Identification et propriétés structurales des BODs

#### 3.1.1. Identification et classification des BODs

Les BODs ont été identifiés dans divers champignons et bactéries [176]. Les BODs fongiques ont été identifiées dans *Pleurotus ostreatus* [180], *Trachyderma tsunodae* [165, 181], *Myrothecium verrucaria* [177, 182-184], et surexprimées dans *Aspergillus sojae* [180-181], *Penicillium janthinellum* [185-186]. Plus récemment une nouvelle BOD fongique a été identifiée dans le pyriculariose du riz de *Magnaporthe oryzae* [187].

Des BODs bactériennes ont été identifiées dans la CotA de *Bacillus subtilis* [188], de *Bacillus licheniformis* [189], et de *Bacillus pumilus* [190-191]. Ces dernières initialement classées comme des laccases, ont été reclassées comme BODs car elles peuvent oxyder la bilirubine.

Les séquences d'acides aminés obtenues pour différentes BODs sont comparées au tableau I.3.1, elles mettent en évidence les quatre domaines de cuivre caractéristiques des MCOs. Les chiffres 1, 2 et 3 correspondent aux sites de coordination pour les cuivres de types 1, 2 et 3. Les acides aminés que l'on suppose impliqués dans les liaisons entre les cuivres sont représentés en rouge.

		2	3		3	3		1	2	3		3	1	3	1	1
CotA <i>B. subtilis</i>	104	VHLHG	151	WYHDH	419	HPIHLHL	491	HCH	ILE	HEDYDM						
BOD <i>M. verrucaria</i>	131	VHLHG	170	WYHDH	436	HPIHIHL	494	HCH	NLI	HEDHDM						
CotA <i>B. pumilus</i>	102	VHLHG	149	WYHDH	419	HPIHLHL	491	HCH	ILE	HEDYDM						
CotA <i>B. licheniformis</i>	102	VHLHG	149	WYHDH	418	HPIHLHL	490	HCH	ILE	HEDYDM						
BOD <i>M. oryzae</i>	118	VHLHG	157	WYHDH	424	HPIHIHL	480	HCH	NLI	HEDHDM						
CotA <i>B. sp. HR03</i>	104	VHLHG	151	WYHDH	419	HPIHLHL	491	HCH	ILE	HEDYDM						
CotA <i>T. tsunodae</i>	84	IHWHG	128	WYHSH	417	HPFHLHG	474	HCH	IDF	HLEAGF						
CotA <i>P. ostreatus</i>	97	IHWHG	128	WYHSH	417	HPFHLHG	474	HCH	IDW	HLEIGL						

**Tableau I.3.1.** Alignement de séquences d'acides aminés des sites potentiels de coordination des cuivres des différentes BODs : CotA de *B. subtilis* (accession de P07788), BOD de *M. verrucaria* (accession Q12737), CotA de *B. pumilus* (accession A8FAG9), CotA de *B. licheniformis* (accession Q65MU7), CotA de *Bacillus sp. HR03* (accession B9W2C5), BOD de *M. oryzae* (accession EDJ95889) et de la BOD de *T. tsunodae* (accession O611263) et de la BOD de *P. ostreatus* (accession Q9UVY4). Les numéros 1, 2 et 3 correspondent aux sites de coordination pour les cuivres de type 1, 2 et 3. Les acides aminés que l'on suppose être impliqués dans la liaison cuivrique sont représentés en rouge [176].

Nous pouvons constater que les liaisons entre les cuivres mettent en jeu principalement des histidines. De plus, les acides aminés autour des sites de liaison des cuivres sont hautement conservés d'une enzyme à l'autre.

Malgré leur appartenance à la même famille les BODs se différencient des laccases par leur affinité pour la bilirubine. Cependant l'origine de cette différence d'affinité n'a pour le moment pas pu être déterminée. L'analyse approfondie des structures cristallines de ces enzymes pourrait mettre en évidence des caractéristiques structurales, qui seraient susceptibles d'expliquer cette différence d'affinité pour la bilirubine.

### 3.1.2. Structure du site actif et réduction de l'O<sub>2</sub> dans les BODs

#### 3.1.2.1. Structure du site actif des BODs

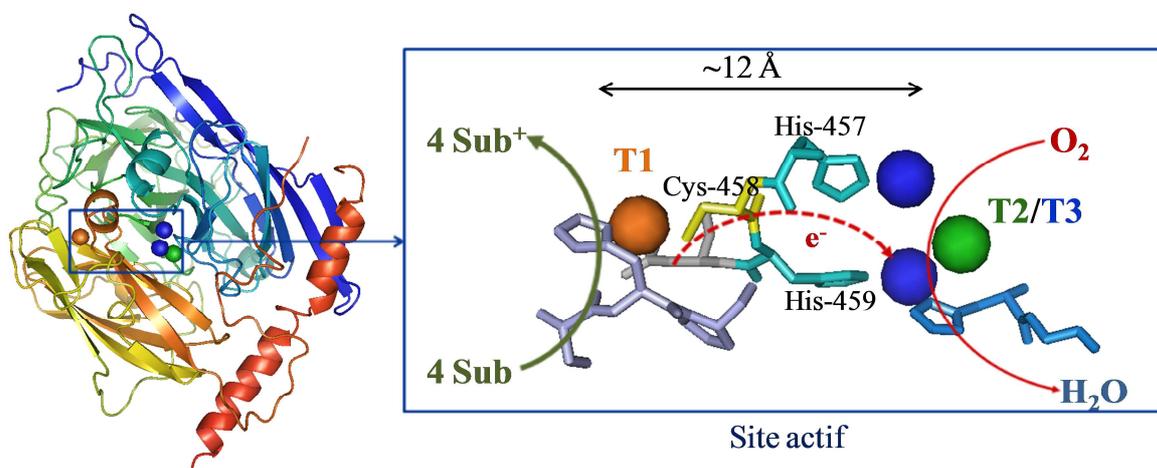
Bien que de multiples structures cristallines de CotA soient disponibles, seules les structures de deux BODs ont pu être obtenues. Les premières structures cristallines des BODs ont été rapportées en 2010 pour *M. verrucaria* [192] qui est la BOD la plus étudiée en raison

de sa disponibilité commerciale [176, 193-194]. Ces structures ont par la suite été affinées par Cracknell et al. en 2011 [195]. Plus récemment la structure de la BOD de *M. oryzae* a été rapportée [196]. L'analyse des structures cristallines a permis notamment d'étudier le site actif des BODs.

Les BODs sont des oxydases multi cuivre, elles ont au sein de leur site actif, quatre cuivres  $\text{Cu}^{2+/+}$ . On retrouve un cuivre de type 1 (T1), dit « cuivre bleu » et un centre trinuécléaire (T2/T3) constitué d'un centre cuivrique de type 2, et d'une paire d'ions cuivriques de type 3.

Ces quatre cuivres sont liés par une triade d'acides aminés Histidine-Cystéine-Histidine (His-Cys-His) (Figure I.3.1). Le centre trinuécléaire T2/T3 est distant du T1 d'environ 12 à 14 Å [197] permettant ainsi une connexion électronique par transfert intra protéique [198].

Au sein de ce site actif se produit l'oxydation des divers substrats spécifiques aux BODs, avec la réduction concomitante de l'oxygène en eau. Différents mécanismes de cette réaction ont été proposés [199-201] même si la voie électronique exacte n'a pas encore été déterminée. Toutefois, on suppose que le cuivre T1 accepte des électrons provenant d'un substrat organique de l'enzyme et les relaie vers le site de réduction de l'oxygène (Figure I.1.3).

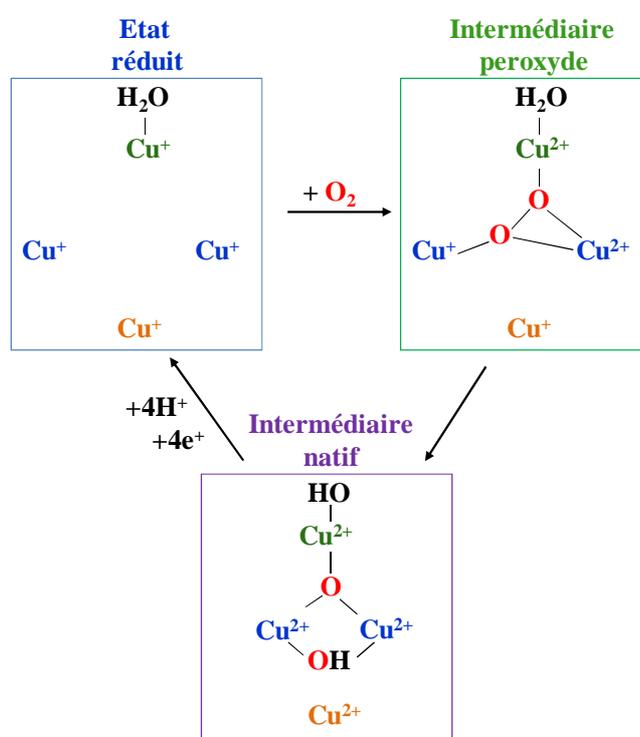


**Figure I.3.1.** Représentation de *M. oryzae* (code PDB 2L9Y) et zoom de son site actif avec PyMol.

Les flèches représentent les échanges d'électrons et les réactions d'oxydoréduction.

### 3.1.2.2. Mécanisme de réduction de l'O<sub>2</sub> dans les BODs

Un mécanisme de réaction généralement accepté pour la réduction d'O<sub>2</sub> par le centre trinucéaire comporte deux transferts à deux électrons à partir d'une enzyme entièrement réduite (Figure I3.2). Dans la première étape, l'O<sub>2</sub> est réduit par deux électrons, formant un intermédiaire peroxyde. Cette étape est suivie d'un second transfert de deux électrons, conduisant à un clivage de la liaison O-O et la formation d'un second intermédiaire, dit intermédiaire natif. Le cycle catalytique est achevé lors de la réduction de l'intermédiaire natif par un total de quatre électrons, régénérant une enzyme complètement réduite [196, 202].



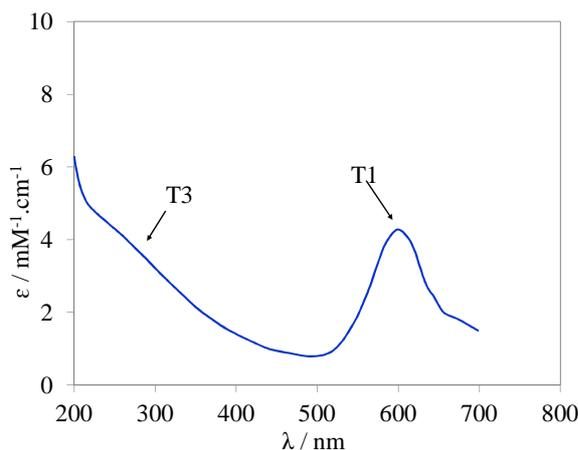
**Figure I.3.2.** Mécanisme de réduction de l'oxygène dans le site actif des BODs, avec le cuivre T1 (orange), le cuivre T2 (vert) et la paire d'ions cuivreux T3 (bleu).

### 3.1.3. Propriétés spectroscopiques des BODs

Les quatre cuivres du site actif des BODs sont classés en fonction de leurs propriétés magnétiques et optiques [86, 201]. L'analyse de ces propriétés magnétiques et optiques se fait couramment en combinant les données obtenues par spectroscopie UV-visible, spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (EPR) et par spectroscopie de résonance Raman.

### 3.1.3.1. La spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible consiste à suivre, en fonction de la longueur d'onde, l'absorbance d'un rayonnement par des molécules ou ions complexes, susceptibles de subir une ou plusieurs transitions électroniques. Le spectre UV-visible des MCOs montre deux bandes caractéristiques : une intense bande de transition à 600 nm caractérisant le cuivre T1 et un large épaulement à ~ 330 nm caractérisant la paire d'ions cuivrriques T3 (Figure I.3.3).

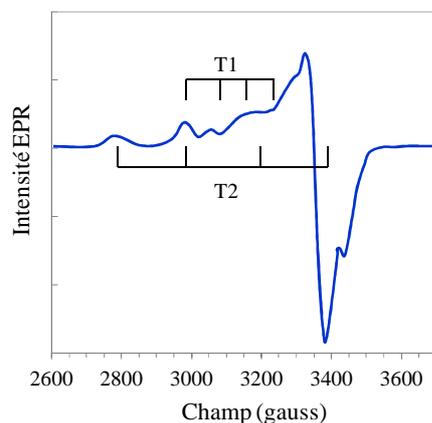


**Figure I.3.3.** Spectre UV-visible de *B. pumilus* purifiée. Mesure avec 50 nM d'enzyme dans du tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 4 à 37 ° C [190].

La bande à 600 nm correspond au transfert de charge de la cystéine (Cys-S) au cuivre T1  $\text{Cu}^{2+}$ , ce qui donne la couleur bleue généralement observée dans les MCOs. Les deux cuivres T3 sont couplés de façon antiferromagnétique par l'intermédiaire d'un pont hydroxyle. L'épaulement observé à ~ 330 nm correspondant au transfert de charge du  $\text{OH}^-$  au  $\text{Cu}^{2+}$ .

### 3.1.3.2. Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique

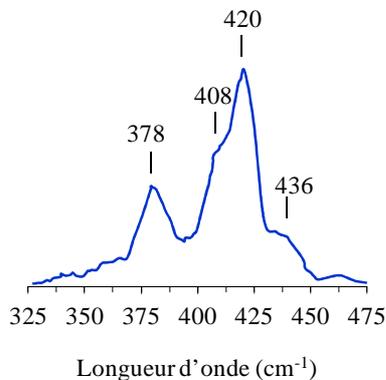
La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique permet la détection d'entités paramagnétiques possédant des électrons non appariés. Les cuivres T1 et T2 sont actifs en EPR alors que les deux cuivres T3 ne le sont pas, en raison de leur forte interaction antiferromagnétique (Figure I.3.4).



**Figure I.3.4.** Spectre de résonance paramagnétique de *B. pumilus* purifiée, mesure à 9,65 GHz dans l'azote liquide à 77 °K [190].

### 3.1.3.3. Spectroscopie de résonance Raman

La spectroscopie de résonance Raman permet de mesurer les fréquences des vibrations de liaisons au sein d'une molécule. Lorsque la fréquence excitatrice est proche des fréquences de transition électronique des liaisons atomiques, cela se traduit par une augmentation d'intensité sur le spectre Raman.



**Figure I.3.5.** Spectre de résonance Raman de *B. pumilus* purifiée, mesure dans l'azote liquide à 77 °K, excitation laser à 568,2 nm avec une puissance incidente de 25 mW [190].

Le spectre Raman permet d'identifier uniquement le cuivre T1 des MCOs. Après une excitation à 600 nm on distingue des bandes caractéristiques du T1 entre 350 et 500  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux modes d'élongation des liaisons atomiques entre le T1 et ses quatre ligands. Le centre trinuécléaire n'est pas observé en raison d'une forte fluorescence ne permettant pas de réaliser une excitation à 300 nm [201].

## 3.2. Caractérisation biochimique et électrochimique

### 3.2.1. Etudes cinétiques avec différents substrats

Les BODs peuvent catalyser l'oxydation des substrats usuels permettant de caractériser les laccases comme le 2,2'-Azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) (ABTS), la syringaldazine (SGZ), ou le 2,6-diméthoxyphénol (DMP). De plus elles sont capables de catalyser l'oxydation de la bilirubine conjuguée et/ou non conjuguée [203]. Le tableau I.3.2 récapitule les paramètres cinétiques obtenus pour cinq BODs à leur pH optimal [166, 187, 190, 204-205].

Enzymes		<i>B. subtilis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>M. verrucaria</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>M. oryzae</i>
Substrats						
<b>ABTS</b>	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	124	31,7	250	6,5	429
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	322	391,3	115	83	664
	$k_{\text{cat}}/K_M$	2,6	12	0,5	12,8	1,5
	pH	4	3	6,5	4	4
<b>SGZ</b>	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	18	45		4	26
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	80	116	nd	100	14
	$k_{\text{cat}}/K_M$	4,4	2,6		23	0,5
	pH	7	6,2		7	7
<b>2,6-DMP</b>	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	216	822		56	
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	29	57		28	nd
	$k_{\text{cat}}/K_M$	0,1	0,07	nd	0,5	
	pH	7	6,8		7	
<b>Bilirubine conjuguée</b>	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	15	35	120	0,3	18
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	nd	67	117	nd	29
	$k_{\text{cat}}/K_M$		1	1		1,6
	pH	7	4,8	5,5	8	3,6
<b>Bilirubine non conjuguée</b>	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	8	22	370		
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )		70	94,3		
	$k_{\text{cat}}/K_M$	nd	3	0,3	nd	nd
	pH	7	7,2	8		

**Tableau I.3.2.** Comparaison des paramètres cinétiques de *B. pumilus* [190], *B. licheniformis* [204, 206], *B. subtilis* [207], *M. verrucaria* [166] et *M. oryzae* [187].

Nous pouvons constater des différences évidentes d'affinités pour les substrats entre les BODs. La compréhension de ces disparités pourrait être possible grâce à une étude des structures cristallines des enzymes, combinée à de la modélisation moléculaire. Cependant les structures cristallines ne sont pas disponibles pour toutes les enzymes.

### 3.2.2. Effet de la température, du pH et du chlore

Nos travaux de recherche sur les BODs se font dans l'optique de leur utilisation dans des biocathodes implantées. Ces enzymes doivent donc montrer une certaine stabilité dans les conditions physiologiques : 37 °C, pH 7,2 à 20 mM phosphate et 140 mM NaCl.

#### ✓ Effet de la température

L'étude de l'effet de la température sur l'activité des BODs a montré un maximum d'activité en solution à 40 °C pour *M. verrucaria*, à 60 °C pour *M. oryzae* et à 80 °C pour les CotA. De toutes les MCOs les enzymes bactériennes CotA ont généralement la thermostabilité la plus élevée, avec des demi-vies supérieures à 100 min à 80 °C [176]. Pour les laccases il a été émis l'hypothèse selon laquelle une meilleure thermostabilité serait relative à une structure plus compacte de la protéine, et/ou des cuivres plus profondément enfouis à l'intérieur des enzymes [208].

Parmi les BODs fongiques *M. oryzae* est l'une des plus stable, avec une demi-vie supérieure à 300 min à 37 °C et à 70 min à 60 °C [187]. A titre de comparaison, pour les autres BODs fongiques rapportées, la demi-vie de l'enzyme native de *M. verrucaria* est seulement de 15 min à 60 °C et est portée à 90 min pour la protéine recombinée produite dans *Pichia pastoris* [209]. Quant à la BOD de *T. tsunodae* elle perd 50 % de son activité après 90 min à 37 °C [190].

#### ✓ Effet du pH

Les laccases sont capables de réduire l'oxygène à un potentiel élevé avec une activité maximale dans la gamme de pH allant de 4 à 5, mais la plupart sont inactives à pH 7 [9]. Contrairement aux laccases les BODs sont plus stables et plus actives à pH neutre [105, 179].

Par exemple, après une incubation de 8 jours dans les conditions physiologiques *M. oryzae* ne perd que 15 % de son activité initiale [187]. Il a été également montré dans les conditions physiologiques que *T. tsunodae* ne perd que 5 % d'activité par jour sur une électrode opérant à 0,3 V vs. Ag/AgCl à 300 tr.min<sup>-1</sup> [109].

#### ✓ Effet du chlore

La plupart des MCOs sont inhibées par le chlore, les laccases y sont particulièrement sensibles. On suppose comme pour les F<sup>-</sup> que les anions Cl<sup>-</sup> se lient au cuivre T2 et inhibent le transfert d'électrons du T1 au T3 [210]. Par contre les BODs semblent moins sensibles au chlore que les laccases. La BOD de *B. pumilus* en particulier conserve un courant élevé au-delà de 140 mM de chlore [190].

### 3.2.3. Caractéristiques électrochimiques

Du point de vue électrochimique les caractéristiques clés des MCOs sont les potentiels rédox des cuivres T1 et T2/T3. Le potentiel rédox du cuivre T1 est modulé par la nature de sa coordination. Par exemple les différents travaux réalisés sur *M. verrucaria* qui possède une méthionine faiblement coordonnée [156, 193] ont permis d'estimer le potentiel rédox de son cuivre T1 à environ ~ 0,69 V vs. Ag/AgCl [156, 211] ou à plus de 0,40 V vs. Ag/AgCl à pH 7 [109, 179, 193, 211-214]. Pour *T. tsunodae*, qui a une phénylalanine non coordonnée [109, 215], le potentiel rédox de son cuivre T1 a été estimé à plus de 0,69 V vs. Ag/AgCl à pH 7 [211, 216].

Seuls quelques travaux ont reporté les valeurs des potentiels rédox des cuivres T2/T3, étant donné que ceux-ci sont profondément enfouis dans la protéine. En 2006, Gorton et al. ont montré que le potentiel rédox du cuivre T2 de *M. verrucaria* et *T. tsunodae* était d'environ 0,58 V vs. Ag/AgCl [211]. En 2008, Ivnitsky et al. ont montré que les valeurs des potentiels rédox des cuivres T1 et T2/T3 de *M. verrucaria* étaient dépendantes du procédé d'immobilisation sur l'électrode et du pH du tampon de mesure [217]. Sakurai et al. ont rapporté dans une série de publications les caractérisations biochimiques et l'activité électrochimique de plusieurs mutants de *M. verrucaria* [193-194, 209, 218]. Ces travaux ont mis en évidence l'influence des mutations sur les cuivres et notamment sur les potentiels rédox.

Les différentes caractéristiques des BODs que nous estimons les plus prometteuses pour la cathode, sont présentées dans le tableau I.3.3.

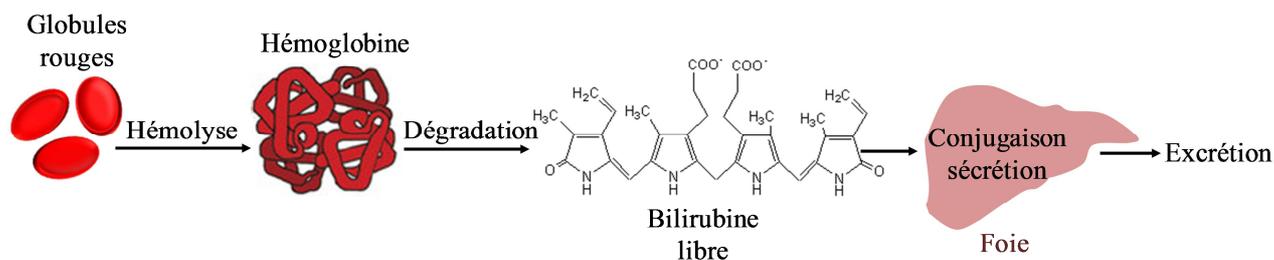
	<i>M. verrucaria</i> [183, 193, 212, 219]	<i>T. tsunodae</i> [109, 215, 219]	<i>B. pumilus</i> [220]	<i>M. oryzae</i> [221]
<b>Poids moléculaire (kDa)</b>	66	64	60	63,7
<b>Structure cristallographique</b>	PDB : 2XLL	Non disponible	Non disponible	PDB : 2L9Y
<b>Potentiel rédox du T1 (vs. Ag/AgCl)</b>	> 0,40 V	> 0,50 V	~ 0,42 V	~ 0,48
<b>Ligand axial du T1</b>	Met	Phe	Met	Met
<b>Potentiel rédox du T2/T3 (vs. Ag/AgCl)</b>	~ 0,58 V	~ 0,58 V	nd	nd
<b>Point isoélectrique</b>	4,20	4,20	5,83	5,23

**Tableau I.3.3.** Comparaison des caractéristiques électrochimiques des BODs que nous estimons les plus prometteuses pour la cathode.

### 3.3. Les BODs dans les applications médicales

Les BODs ont été utilisées d'abord dans le domaine médical pour la détection de la bilirubine dans le sérum humain [176]. La bilirubine est un pigment jaune de la bile, elle est issue du métabolisme de l'hémoglobine. Celui-ci se fait à partir de la dégradation des globules rouges par les cellules réticulo-endothéliales.

On retrouve la bilirubine dans le sérum sous deux formes biologiques : la forme libre (toxique) encore appelée bilirubine non conjuguée et la forme conjuguée (non toxique). Cette dernière résulte de la conjugaison de la forme libre à l'acide glucuronique. Cette réaction est catalysée dans le foie par une enzyme hépatique, la glucuronyl transférase [222].



**Figure I.3.6.** Métabolisme et excrétion de la bilirubine.

La bilirubine conjuguée est connue pour être un meilleur indicateur de la fonction hépatique et est utilisée dans le diagnostic de l'ictère et de l'hyper bilirubinémie [223-226]. La détection de la bilirubine libre est plus particulièrement réalisée chez les nouveau-nés, dont le foie n'est pas encore assez mature pour la transformer en bilirubine conjuguée.

L'accumulation de bilirubine entraîne une jaunisse, cette maladie affecte environ 60 à 80 % des nouveau-nés [227-228]. De plus, une concentration de bilirubine supérieure aux niveaux normaux sériques qui sont compris entre  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  M peut causer des lésions cérébrales ou même la mort des nouveau-nés [229].

### 3.3.1. Détection de la bilirubine avec la BOD libre

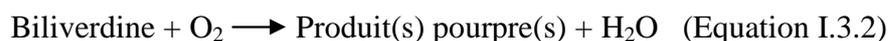
Deux méthodes ont été couramment utilisées pour mesurer le niveau de bilirubine dans le sang : le suivi de la réaction diazoïque et la spectrophotométrie directe [230]. Les mesures par spectrophotométrie étaient réalisées en suivant la décroissance de l'absorbance à 450 nm, lors de l'oxydation de la bilirubine par la BOD libre en solution [225, 231-233].

Les procédures diazoïques consistaient à suivre la réaction de la bilirubine avec un réactif diazoïque tel que l'acide p-diazobenzène sulfonique. Cette réaction conduit à la formation de pigments azoïques violets ayant un pic d'absorption à 540 nm [222]. Cependant cette méthode n'était pas fiable car elle dépendait de nombreux paramètres tels que la concentration et le type de réactif diazoïque, le pH du mélange réactionnel etc [230].

Par conséquent, il était nécessaire de trouver une méthode qui soit à la fois fiable, reproductible et facilement accessible. Aussi, un procédé enzymatique a été développé en utilisant la bilirubine oxydase, vu que cette enzyme est capable de catalyser l'oxydation de la bilirubine en biliverdine (Equation I.3.1) [177, 183, 234].



Cette réaction est suivie d'une oxydation supplémentaire de la biliverdine en produits pourpres de nature(s) inconnue(s) (Equation I.3.2) [232, 235]:



### 3.3.2. Biocapteurs pour la détection électrochimique de la bilirubine

Les BODs de *M. verrucaria* et de *T. tsunodae* ont été utilisées pour la détection électrochimique de la bilirubine [236]. En 1990, Wang et al. décrivent une électrode à base d'une matrice graphite-époxy incorporant la BOD de *M. verrucaria* et la peroxydase de raifort [237]. La limite de détection de cette électrode était de 4  $\mu\text{M}$  et la courbe de calibration linéaire jusqu'à  $1 \times 10^{-4}$  M.

En 1995, Shoham et al. ont rapporté un biocapteur à bilirubine, basé sur l'auto assemblage multicouche de *M. verrucaria* sur des électrodes d'or. Conservée à 4 °C l'électrode montrait une durée de vie de plus de trois mois [234].

En 1996, Li et al. ont mis au point un biocapteur de fluorescence à base de *M. verrucaria* sur une fibre optique. Le capteur enregistrait la consommation d' $\text{O}_2$  au cours de l'oxydation de la bilirubine en biliverdine avec une limite de détection de  $4,4 \times 10^{-7}$  M [238]. La même année, Fortuney et al. ont développé une électrode de platine modifiée par un adduit réticulé de *M. verrucaria*, d'albumine sérique bovine et de glutaraldéhyde [239]. La concentration de bilirubine était déterminée en suivant l'augmentation de la concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  résultant de la réaction enzymatique. Cependant la littérature ne rapporte pas clairement la formation de peroxyde d'hydrogène au cours de cette réaction. Les biocapteurs montraient une augmentation linéaire du courant jusqu'à 300  $\mu\text{M}$  et une limite de détection de 0,7  $\mu\text{M}$ .

En 2000, Klemm et al. ont réalisé la détection indirecte de la bilirubine *via* le suivi de sa réaction d'oxydation en biliverdine catalysée par *M. verrucaria* en présence d' $\text{O}_2$  [235]. La diminution en  $\text{O}_2$  était enregistrée en utilisant une électrode à oxygène. Cette méthode était sans interférences, rapide (< 3 min), et l'électrode modifiée conservait près de 80 % de son activité initiale après 30 mesures successives.

Par la suite, Andreu et al. ont rapporté une méthode pour le dosage de la bilirubine directe (somme de la bilirubine conjuguée et de la bilirubine non conjuguée), par réaction avec *M. verrucaria* [240]. La procédure était basée sur les variations de fluorescence se produisant au cours de la réaction enzymatique de la BOD avec la bilirubine, lorsque la solution était excitée à 240 nm et l'émission mesurée à 440 nm. Une réponse linéaire jusqu'à 7 mg.L<sup>-1</sup> de bilirubine directe a été obtenue. Dans les conditions optimales la précision pour la bilirubine libre et conjuguée était respectivement de 3,4 % et 3,0 %.

En 2011, Kim et al. ont décrit un biocapteur ampérométrique médié. Le capteur était basé sur l'immobilisation de *M. verrucaria* sur des nanoparticules d'or, en présence de 1 mM de ferricyanure [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> servant de médiateur [241]. Le biocapteur avait une limite de détection de 1,4 nM et était stable pendant deux jours.

En 2013, Wang et al. ont développé une électrode composite faite de nanotubes de carbone multi-parois, de graphène et de nanoparticules d'or sur laquelle *M. verrucaria* a été immobilisée par adsorption [242]. Ce dispositif a montré une réponse linéaire de 1,33 µM à 71,56 µM et une limite de détection de 0,34 µM.

Plus récemment Pundir et al. ont élaboré une électrode composite avec *M. verrucaria* immobilisée de manière covalente sur de la zircone revêtue de nano particules de silice. Le capteur avait une limite de détection de 0,1 nM [243].

### 3.4. Les BODs dans les cathodes à oxygène

Les BODs peuvent être utilisées pour la réalisation de cathodes enzymatiques car elles sont capables de catalyser la réduction de l'oxygène en eau (Figure I.3.2). Grâce à cette caractéristique particulière Tsujimura et al. ont pu rapporter en 2001, le premier exemple de réduction de l'oxygène avec *M. verrucaria*. L'étude a été réalisée dans du tampon phosphate à pH 7 contenant du chlore, en utilisant l'ABTS et *M. verrucaria* en solution [179]. L'électrode opérait à - 0,17 V vs. Ag/AgCl et produisait -0,5 mA.cm<sup>-2</sup> de courant pendant 2 heures.

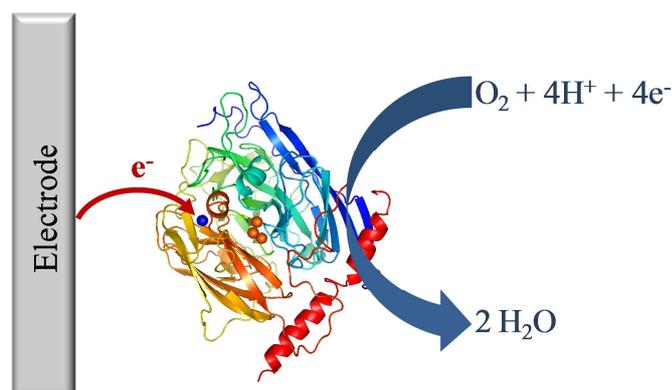
Dès lors, les BODs ont fait l'objet d'un intérêt croissant pour ce type d'application, notamment avec les BODs fongiques de *M. verrucaria* et de *T. tsunodae*. Principalement en raison de leur disponibilité commerciale, plus de 150 articles sur des cathodes utilisant ces BODs ont été publiés.

### 3.4.1. Les différentes stratégies d'immobilisation des BODs à la cathode

Le transfert d'électrons dans les électrodes enzymatiques peut se faire selon deux processus, dépendants de la stratégie d'immobilisation des enzymes sur l'électrode. Ces stratégies sont appelées transfert électronique direct (TED ou direct electron transfert : DET) et transfert électronique médié (TEM ou mediated electron transfert : MET).

#### 3.4.1.1. Transfert électronique direct

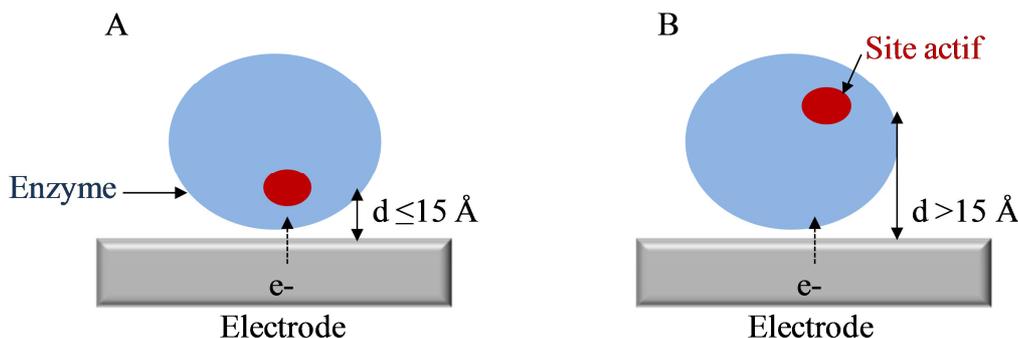
Le premier processus est le transfert électronique direct (Figure I.3.7.). Cette méthode consiste à connecter directement l'enzyme sur la surface de l'électrode [244].



**Figure I.3.7.** Transfert électronique direct entre le site actif de la BOD de *M. oryzae* et l'électrode.

Le mécanisme réactionnel du transfert électronique direct peut être décomposé en trois étapes successives donnant une réaction globale à quatre électrons. Ces étapes sont relatives aux transferts d'électrons entre l'électrode et la BOD, suivis des transferts au sein de l'enzyme et enfin entre l'enzyme et l'oxygène.

Dans les oxydases multi-cuivre au moins une partie du centre rédox est idéalement situé à proximité de la périphérie de la protéine [50]. Par exemple en 2002 Piontek et al. ont montré sur la laccase de *Trametes versicolor* que le T1 est situé à environ  $\sim 6,5$  Å de la surface de l'enzyme [197]. Aussi l'orientation de l'enzyme à la surface de l'électrode affecte son activité électrochimique (Figure I.3.8.).



**Figure I.3.8.** Orientations extrêmes possibles d'une enzyme sur une électrode. Site actif situé à moins de 15 Å de l'électrode (A) et site actif situé à plus de 15 Å de l'électrode (B).

Si l'enzyme est orientée de sorte que son site actif soit proche de la surface de l'électrode (Figure I.3.8.A) un transfert électronique efficace par effet tunnel directement entre l'électrode et le site actif peut être envisagé.

En effet, d'après la théorie de Marcus le transfert d'électron dépend de la distance entre le donneur et l'accepteur [245]. Cette distance influe sur l'énergie de réorganisation qui correspond au coût énergétique des réorganisations moléculaires internes du donneur, de l'accepteur et du solvant lors du transfert d'électron. Selon l'équation de Marcus-Hush la vitesse de transfert des électrons dépend de l'énergie de réorganisation et de l'enthalpie libre d'activation de Gibbs (Equation I.3.3).

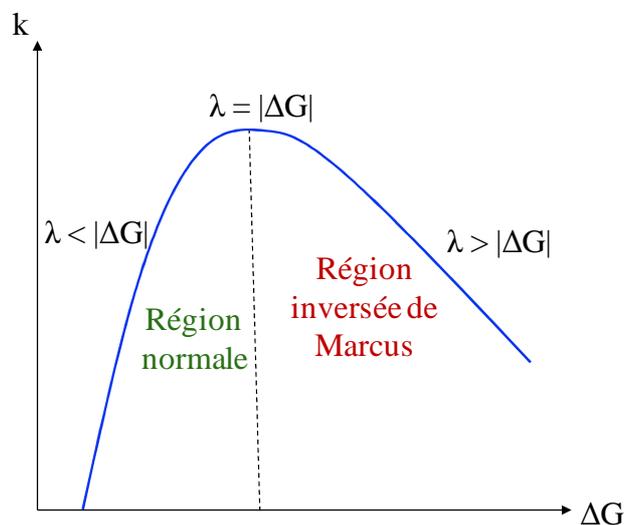
$$k = A \exp \left[ - \left( \frac{(\lambda + \Delta G)^2}{4\lambda k_B T} \right) \right] \quad (\text{Equation I.3.3})$$

avec  $k$  la constante de vitesse de transfert d'électron,  $A$  le facteur pré-exponentiel ( $s^{-1}$ ),  $\Delta G$  l'énergie libre d'activation de Gibbs ( $J \cdot mol^{-1}$ ),  $\lambda$  l'énergie de réorganisation ( $J \cdot mol^{-1}$ ),  $T$  la température (K) et  $k_B$  la constante de Boltzmann ( $J \cdot K^{-1}$ ).

Or l'enthalpie libre d'activation de Gibbs est liée à la force électromotrice  $\Delta E$  (Equation I.3.4):

$$\Delta G = - nF\Delta E \quad (\text{Equation I.3.4})$$

avec  $F$  la constante de Faraday ( $J.V^{-1}.mol^{-1}$ ). On considère donc que  $\Delta G$  correspond à la force électromotrice. En fonction de la valeur de l'énergie de réorganisation  $\lambda$  on retrouve trois régimes de transfert d'électrons représentés sur la Figure I.3.9 :

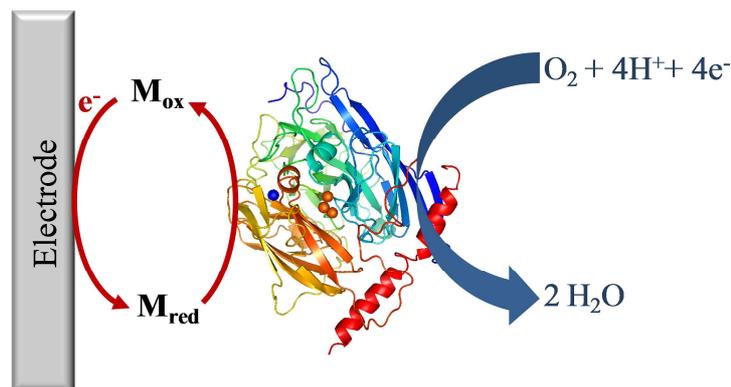


**Figure I.3.9.** Vitesse de transfert d'électrons en fonction de la force électromotrice.

Ainsi, plus les espèces rédox sont proches meilleur sera le transfert électronique. Cependant, une distance trop courte ne permet pas d'obtenir une force électromotrice  $\Delta G$  suffisante pour transférer les électrons de façon optimale (Figure I.3.9). Un transfert direct d'électrons se fera efficacement sur une distance de  $\sim 15 \text{ \AA}$  maximum [1].

#### 3.4.1.2. Transfert électronique médié

Dans le second processus dit transfert électronique médié les électrons sont transférés de l'électrode jusqu'à l'enzyme par l'intermédiaire d'un médiateur rédox (Figure I.3.10.). Ces médiateurs peuvent être par exemple des ferrocènes, des complexes de ruthénium, des complexes d'osmium etc.

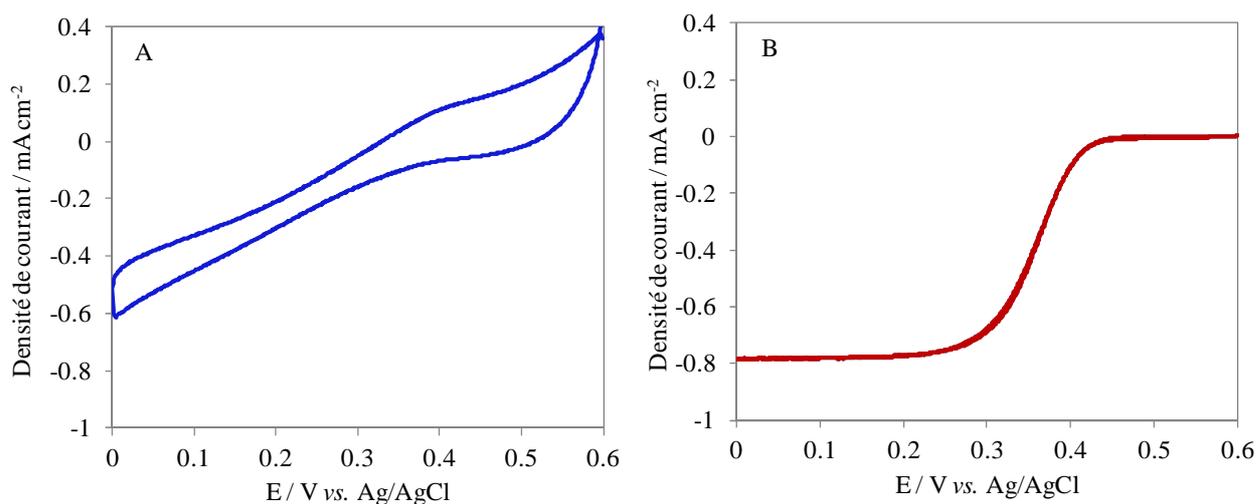


**Figure I.3.10.** Schéma du transfert électronique médié entre le site actif de la BOD de *M. oryzae* et l'électrode, avec  $M_{ox}$  (médiateur à l'état oxydé) et  $M_{red}$  (médiateur à l'état réduit).

Le mécanisme réactionnel peut être ici décomposé en cinq étapes successives donnant une réaction globale à quatre électrons. On considère les transferts électroniques d'abord entre l'électrode et le médiateur, puis entre les centres rédox du médiateur, ensuite entre le médiateur et la BOD, suivi des transferts au sein de l'enzyme et enfin entre l'enzyme et l'oxygène.

### 3.4.1.3. Comparaison des stratégies d'immobilisation

La différence de connexion entre les deux systèmes est illustrée sur la figure I.3.11 pour une électrode modifiée avec la BOD de *B. pumilus* immobilisée en TED sur cryogel de carbone (Figure I.3.11.A) et une électrode modifiée en TEM avec la même BOD et un polymère rédox à base d'osmium (Figure I.3.11.B).



**Figure I.3.11.** Comparaison qualitative des CVs à  $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  des électrodes modifiées avec la BOD de *Bacillus pumilus*, immobilisée en TED sur cryogel de carbone (A) et en TEM dans un hydrogel rédox (B) avec le PAA-PVI-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine) $_2$ Cl] $^{+2+}$  sur carbone vitreux. Rotation de l'électrode à  $500 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$  dans du tampon phosphate salin (20 mM, pH 7,2 à 140 mM NaCl), sous 1 atm  $\text{O}_2$  à  $37^\circ\text{C}$ .

#### ✓ Le transfert électronique direct

L'immobilisation d'enzymes rédox directement sur l'électrode présente un fort intérêt notamment du fait de sa simplicité. De plus, si l'enzyme est correctement orientée et son centre rédox suffisamment proche de la surface de l'électrode, cette stratégie peut permettre de réduire les surtensions souvent observées en TEM.

Cependant Leech et al. ont rapporté qu'il n'est possible d'immobiliser en TED que 5 % des enzymes connues [81]. En outre, la densité de courant est souvent limitée car une seule couche d'enzyme est immobilisée sur la surface de l'électrode.

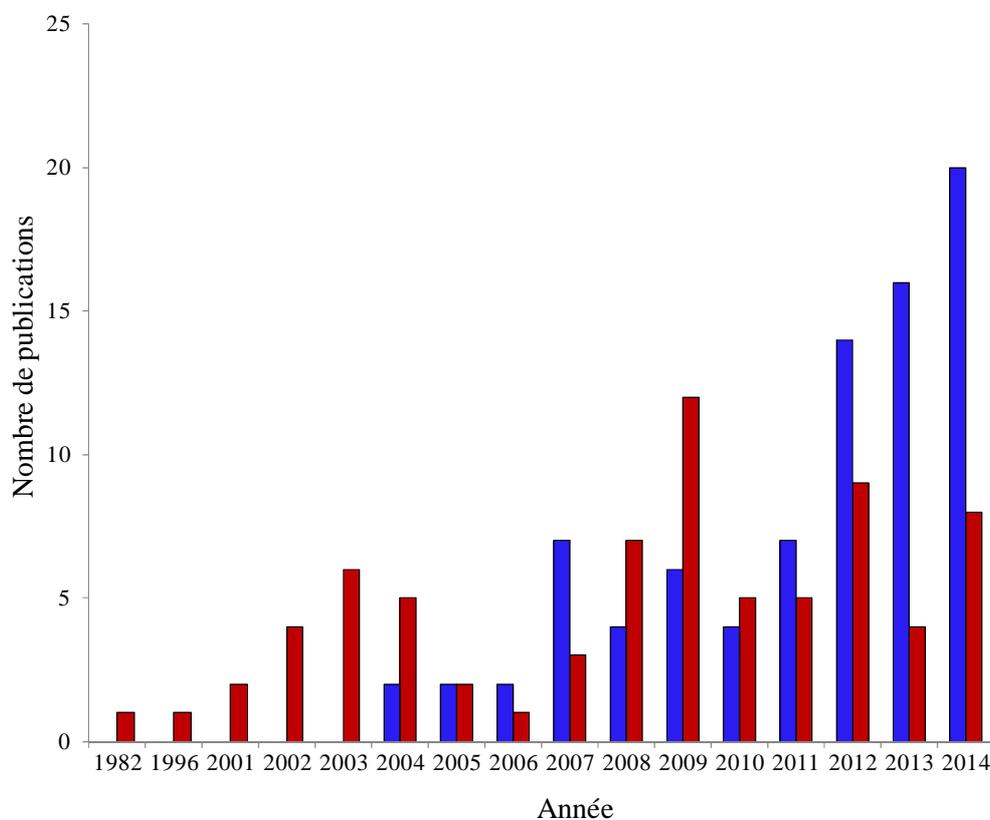
Enfin, dans de nombreux systèmes en TED la vitesse de transfert des électrons peut être ralentie comme on peut le voir par l'absence de plateau de réduction sur la figure I.3.11.A. On a en effet, une large distribution des constantes de vitesse de transfert électronique direct due à l'orientation multiple et aléatoire des enzymes adsorbées [246].

### ✓ Le transfert électronique médié

L'utilisation d'un médiateur rédox permet de diminuer la distance entre le centre rédox de l'enzyme et la surface de l'électrode, ce qui augmente la vitesse de transfert des électrons. De plus cette méthode permet la connexion électrique de plusieurs couches d'enzymes. Elle permet d'obtenir une faible distribution des constantes de vitesse de transfert électronique, ce qui explique la présence d'un plateau en figure I.3.11.B.

Cependant, l'utilisation d'un médiateur rédox ajoute deux étapes supplémentaires au transfert électronique entre le site actif de l'enzyme et la surface de l'électrode. Cela génère des pertes cinétiques et une baisse de la tension nominale susceptibles de diminuer l'efficacité des dispositifs tels que les biopiles.

Ces deux stratégies d'immobilisation des enzymes rédox ont été appliquées au cours des trente dernières années. Bien que les premiers documents publiés présentaient principalement des études en TEM, il existe un intérêt croissant pour le TED (Graphique I.4.1) [90].



**Graphique I.4.1.** Nombre d'articles publiés par an sur les BODs en TED (rouge) et en TEM (bleu).

Les paragraphes suivants présentent différents travaux réalisés en TED et TEM avec les BODs sur divers matériaux d'électrode.

#### **3.4.1.4. L'immobilisation de BODs pour le transfert électronique direct**

La plupart des travaux sur le TED a été consacré aussi bien au décryptage du mécanisme de réduction de l'O<sub>2</sub> qu'à l'élaboration de biocathodes efficaces [199]. Ces travaux ont été réalisés en utilisant différents matériaux d'électrode.

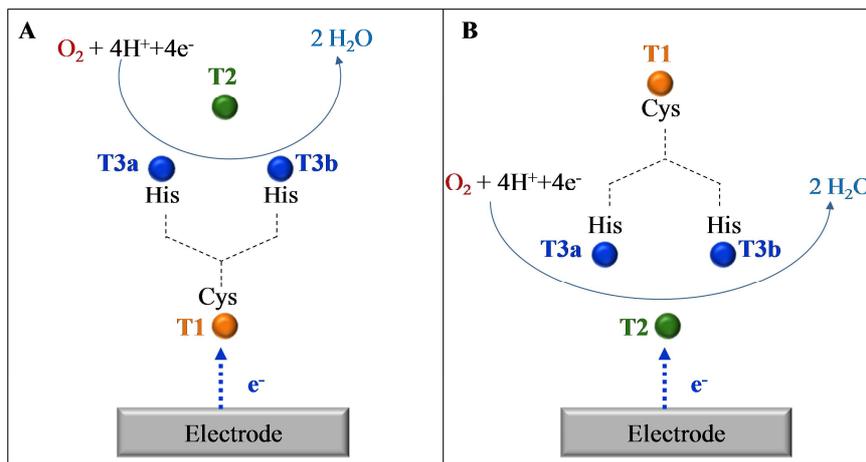
##### **3.4.1.4.1. Etude du mécanisme de réduction de l'oxygène**

Le décryptage du mécanisme de transfert électronique intramoléculaire lors de la réduction d'O<sub>2</sub> a pu être étudié grâce à des techniques électrochimiques. Des méthodes microscopiques telles que la microscopie à effet tunnel *in situ* [247] et la microscopie électrochimique à balayage (SECM) [248-249] ont également été utilisées.

##### **✓ Etude des transferts d'électrons**

Shleev et al. ont conduit de nombreux travaux pour comprendre le mécanisme de réduction de l'O<sub>2</sub> par la BOD [250]. Ils ont ainsi étudié en 2004 la réaction de *M. verrucaria* adsorbée sur SPGE et ont pu démontrer que le cuivre T1 est le premier accepteur d'électrons [212]. Par la suite en 2008 ils ont mis en évidence le fait que l'orientation de *T. tsunodae* dépend du matériau d'électrode utilisé. Sur une électrode de SPGE la BOD est orientée avec le T1 à proximité de la surface de l'électrode, alors que c'est le cluster T2/T3 qui l'est sur une électrode en or [219].

Taniguchi et al. ont étudié la cinétique de *M. verrucaria* immobilisée sur de l'or modifié avec des groupes carboxyles. Ils ont évalué la distance moyenne entre le cuivre T1 et l'extérieur de la protéine à ~ 17 Å [251]. Le même type d'étude réalisée sur des électrodes de graphite de type EPPG ont montré que le transfert direct se fait mieux sur ce type d'électrode que sur du carbone vitreux. De plus les résultats obtenus suggéraient qu'il existe un possible mécanisme de transfert inverse de type ascendant, tel que les électrons vont du cluster T2/T3 au T1 (Figure I.3.12.B) [252].



**Figure I.3.12.** Mécanisme de transfert d'électrons en TED proposé pour les BODs connectées *via* le T1 (A) ou *via* le centre trinuécléaire T2/T3 (B).

Après fixation de la BOD sur des nanotubes multi parois par un agent réticulant, Brocato et al. ont étudié le mécanisme de la réduction de l'oxygène et confirmé qu'il s'agit bien d'un processus à quatre électrons [253]. Ce processus a également été mis en évidence dans une étude du transfert électronique direct de la BOD à une électrode de nanoparticules d'or dans un mélange de liquide ionique et d'eau [254].

Le comportement à la surface de l'électrode et l'activité de la BOD ont été étudiés sur des électrodes d'or. Une perte d'activité a été observée après 3 heures d'expérimentation, ce qui suggérait des changements de conformation de l'enzyme à la surface de l'électrode d'or [255].

### ✓ Etude de l'influence du pH

La dépendance du courant de réduction de l' $O_2$  par rapport au pH a été étudiée pour *M. verrucaria* immobilisée sur une électrode de HOPG, en présence de différents substrats. Pour chaque substrat la différence de potentiel rédox entre la BOD et le substrat était maximale dans la gamme de pH optimale pour la réduction de l' $O_2$ . De ce fait, il a été présumé que cette différence de potentiel rédox devrait être l'un des principaux facteurs déterminant l'activité de la BOD sur les substrats [256].

Plus récemment, Dos Santos et al. ont réalisé des études mécanistiques de *M. verrucaria* sur des électrodes de graphite pyrolytique modifiées de façon covalente avec des groupements naphthyle-2-carboxylate [257]. Ils ont montré qu'à pH 5 l'activité enzymatique était limitée par

le taux de transfert interfacial d'électrons au cuivre T1, tandis qu'à pH 8 ce n'était plus un facteur limitant.

En plus d'influer sur l'activité enzymatique, le pH influe sur les potentiels des centres rédox de la BOD. Une étude a été menée avec *M. verrucaria* sur des électrodes composites à base de nanotubes de carbone et de Ketjen Black. Les résultats ont montré que les potentiels rédox du premier et du troisième site sont dépendants du pH, alors que le potentiel du deuxième site est indépendant du pH [258].

La caractérisation de surface par microscopie à force atomique et l'étude de la catalyse en TED de la BOD de *M. verrucaria*, ont montré que le potentiel rédox du T1 est fortement modulé par le pH. Il dépend également d'autres paramètres, tels que la présence d'inhibiteurs, ou encore les conditions anaérobies et aérobies [259].

#### **3.4.1.4.2. Elaboration de cathodes pour l'amélioration de la réduction de l'O<sub>2</sub>**

##### **3.4.1.4.2.1. Les électrodes à base de carbone**

Le transfert électronique direct a été en parallèle largement utilisé pour l'élaboration de cathodes efficaces avec différents matériaux d'électrode à base de carbone. Tsujimura et al. ont décrit en 2005, une cathode basée sur l'immobilisation électrostatique de *M. verrucaria* dans une matrice cationique de poly-lysine générant jusqu'à  $-1 \text{ mA.cm}^{-2}$  de courant [213]. Par la suite les mêmes auteurs ont réalisé des cathodes à base d'aérogels de carbone [260] et de particules de carbone dont ils ont rapporté l'utilisation dans une biopile fructose/O<sub>2</sub> [218].

Kokoh et al. ont adsorbé *M. verrucaria* sur du Vulcan® XC72 [261], tandis que Flexer et al. ont utilisé des mousses carbonées micro et macro cellulaires [262-263]. Sode et al. ont mis au point un système de détection du glucose auto alimenté, par réticulation de *M. verrucaria* avec du glutaraldéhyde sur une cathode de Ketjen Black [264]. Shim et al. ont lié de façon covalente la même enzyme sur des électrodes de carbone vitreux possédant des groupes carboxyles en surface, introduits grâce à un traitement préalable à l'acide [265].

La BOD de *M. verrucaria* a été encapsulée dans un aérogel constitué d'un alliage de platine et de palladium déposé sur une électrode de carbone vitreux. Cette cathode a été combinée à une anode à base de GOx immobilisée avec de l'acide ferrocène carboxylique servant de médiateur. La biopile glucose/O<sub>2</sub> sans membrane ainsi obtenue générait une densité de puissance maximale de  $20 \text{ mW.cm}^{-2}$  à 0,25 V vs. Ag/AgCl [266].

Cracknell et al. ont montré que l'utilisation de la bilirubine permettait de stabiliser la BOD sur une électrode de graphite pyrolytique. Cette technique permettait de doubler l'activité électrocatalytique par rapport au courant obtenu par simple adsorption de l'enzyme [195]. L'équipe de Kenji Kano a montré par la suite que la performance d'une biocathode à base de Ketjen Black pouvait être améliorée avec l'adsorption préalable de la bilirubine sur l'électrode. L'emploi de bilirubine favorisait une meilleure orientation de l'enzyme sur le support. Par la suite ils ont réalisé une biopile fructose/O<sub>2</sub> sans membrane fournissant une densité de puissance maximale de 2,6 mW.cm<sup>-2</sup> à 0,46 V vs. Ag/AgCl sous air [267].

Tsujimura et al. ont rapporté l'utilisation de *B. pumilus* sur des électrodes mésoporeuses à base de cryogel de carbone [268]. Ces travaux ont mis en avant une dépendance de la densité du courant catalytique et de la vitesse du transfert électronique avec la température et le pH de l'électrolyte.

*M. verrucaria* a été immobilisée de façon covalente via des liaisons imines sur une électrode de graphite modifiée avec des nanotubes et des microfibrilles de carbone. La cathode obtenue génère une densité de courant de -1600 µA.cm<sup>-2</sup> et était résistante aux ions chlorures. La combinaison avec une anode à base de cellobiose déshydrogénase a permis de réaliser une biopile glucose/O<sub>2</sub> fournissant une densité de puissance de 54 µW.cm<sup>-2</sup> à 0,35 V vs. Ag/AgCl [269].

Récemment Narváez Villarrubia et al. ont immobilisé la BOD sur une cathode double couche constituée de papier carbone composite et de Vulcan® XC72 [270]. Cette cathode a été utilisée dans une biopile glucose/O<sub>2</sub> utilisant un système microfluidique. Les biopiles connectées en série dans une boisson gazeuse sucrée (Gatorade®) fonctionnaient à 1,8 V vs. Ag/AgCl et pouvaient alimenter en continu une horloge numérique pendant 36 heures.

Les nano fibres de carbone peuvent être utilisées pour l'immobilisation directe des BODs. Un traitement préalable des fibres au plasma UV/ozone, les rendant plus hydrophiles, permet d'accroître les performances de la cathode. Il a été en effet constaté une augmentation de courant 38 fois supérieur par rapport à des fibres non traitées au plasma [271].

Dernièrement *M. verrucaria* a été immobilisée dans une électrode réalisée par dépôt sur carbone vitreux, de nanoparticules d'or et d'oxyde de cobalt encapsulées dans un polymère de polypropylène-g-polyéthylène glycol. Une biopile glucose/O<sub>2</sub> sans membrane a été réalisée avec cette cathode combinée à une anode à base de GOx, la biopile génère une densité de puissance de 23,5 µW.cm<sup>-2</sup> à + 0,56 V vs. Ag/AgCl [272].

La BOD a été adsorbée sur une électrode modifiée avec une dispersion de Ketjen Black dans une matrice de poly acide lactique (PLA). Cette méthode a permis d'augmenter la vitesse de transfert électronique et de réaliser une biopile avec une anode fructose déshydrogénase générant une puissance de  $57 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  à 400 mV vs. Ag/AgCl [273].

Des nanomatériaux carbonés ont été utilisés pour réaliser le transfert électronique direct avec la BOD. C'est le cas du noir de carbone dispersé dans un bio polymère de poly acide lactique et également de l'oxyde de graphène. Les cathodes obtenues avec ces nanomatériaux généraient des densités de courant supérieures à  $-0,1 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$  à + 0,5 V vs. Ag/AgCl [274].

#### 3.4.1.4.2.2. Les électrodes à base nanotubes de carbone

En raison de leurs propriétés intrinsèques : stabilité thermique et chimique élevées, haute résistance à la traction, conductivité et petites dimensions [275-276], les nanotubes ont été les matériaux de choix pour les expériences en TED (Figure I.3.13). Leur utilisation a été passée en revue par Opallo et Bilewicz [277] et plus récemment par Holzinger et Cosnier [43, 278].

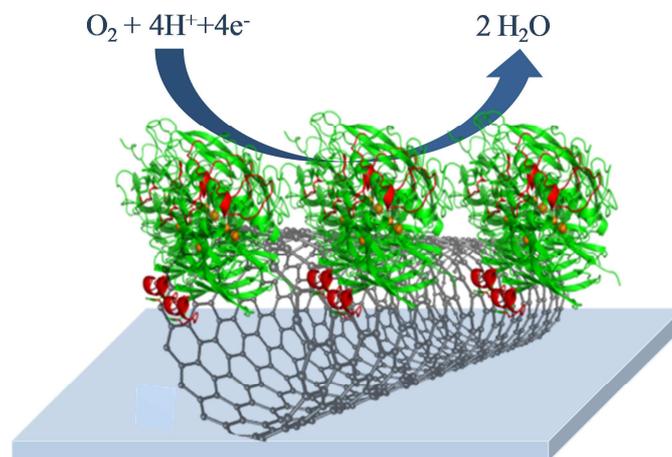


Figure I.3.13. Immobilisation de bilirubine oxydase sur nanotube de carbone.

#### ✓ Utilisation de nanotubes de carbone non fonctionnalisés

Lisdat et al. ont rapporté la réduction d' $\text{O}_2$  sur *M. verrucaria* liée de manière covalente à des nanotubes de carbone multi-parois (MWNT) [214]. Les mêmes auteurs ont également lié cette enzyme de manière covalente à une électrode en or modifiée de MWNT, générant

jusqu'à  $-500 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  à pH 7 et à 25 °C [279-280]. Ils ont par ailleurs modifié des MWNT avec des composés aromatiques [281] et plus tard avec du thiol [282].

Willner et al. ont réalisé une cathode avec *M. verrucaria* adsorbée sur une électrode de carbone vitreux modifiée avec des nanotubes de carbone et l'ont utilisée dans une cellule photo-bioélectrochimique [283]. Il a aussi été montré que *M. verrucaria* encapsulée à l'intérieur d'une électrode composite à base de nanotubes de carbone et de silice sol-gel, catalyse la réduction d' $\text{O}_2$  en eau. La constante de vitesse du transfert électronique à la surface de l'électrode calculée est de  $59 \text{ s}^{-1}$ , indiquant que les parois des nanotubes de carbone sont responsables du transfert d'électrons [284].

Plus récemment Johnson et al. ont décrit une cathode modifiée avec *M. verrucaria* sur nanotubes de carbone, stabilisée par un revêtement de silice sol-gel et utilisée dans un biopile hybride [285]. Tkac et al. ont rapporté une cathode composite conçue de Ketjen Black, de chitosane, et de nanotubes [286]. Pankratov a décrit une biocathode avec *M. verrucaria* adsorbée sur buckypapers (feuilles minces composées d'un assemblage de nanotubes) fonctionnalisés avec des MWNT [287].

Une biopile souple à base de cellulose et de nanotubes de carbone composite déposés sur papier filtre a été conçue. La connexion en série de deux de ces biopiles a permis d'atteindre une puissance maximale de  $7,9 \mu\text{W}$  à  $1,34 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  [288].

#### ✓ Utilisation de nanotubes de carbone fonctionnalisés

Mao et al. ont réalisé la réticulation de *M. verrucaria* sur les nanotubes de carbone à paroi simple (SWNT) sur fibre de carbone avec de l'albumine bovine sérique et du glutaraldéhyde. Ils ont ensuite rapporté l'utilisation de cette cathode dans une biopile miniature glucose/ $\text{O}_2$  avec une grande tolérance à l'acide ascorbique [289].

Gao et al. ont mis en évidence la réduction enzymatique de l' $\text{O}_2$  par *M. verrucaria* réticulée avec de l'albumine bovine sérique sur SWNT et utilisée dans une biopile [70]. Plus tôt, le même groupe a rapporté l'immobilisation en TED de *M. verrucaria* sur nanotubes de carbone fonctionnalisés de façon non covalente avec des dérivés de cellulose [290]. La même stratégie a été appliquée par Wu et al., leur cathode a été utilisée pour l'élaboration d'une biopile fructose/air générant une puissance de  $126 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  à  $+ 663 \text{ mV}$  dans un tampon à pH 5 [291].

Des nanotubes de carbone fonctionnalisés de groupes carboxyles ont été élaborés et la cathode modifiée a été utilisée plus tard dans une biopile  $H_2/O_2$  générant  $300 \text{ mW.cm}^{-2}$  à 0,6 V [292]. Dong et al. ont utilisé des nanotubes fonctionnalisés avec des liquides ioniques modifiés avec *M. verrucaria* comme cathode dans un biopile à base de papier filtre [293]. Plus tard ils ont utilisé le même processus pour l'élaboration de capteurs à acétaldéhyde auto alimentés [294].

La BOD a été immobilisée sur des électrodes à base de nanotubes de carbone alignés verticalement et modifiées avec de la PQQ. La PQQ servait d'interface permettant la fixation covalente de l'enzyme. La cathode obtenue générerait un courant de  $-550 \mu\text{A.cm}^{-2}$  à + 0.1 V vs. Ag/AgCl [59].

Milton et al. ont réalisé avec *M. verrucaria* des biopiles GOx/BOD et FAD-GDH/BOD avec une cathode à base de MWNT fonctionnalisés avec de l'anthracène. Les études menées sur ces biopiles ont permis de mettre en évidence l'effet endommageant sur la BOD du  $H_2O_2$  produit par la GOx. Les piles GOx/BOD sont initialement plus efficaces que les biopiles FAD-GDH/BOD, mais la production de  $H_2O_2$  par la GOx affecte de façon irréversible les performances de la biocathode alors que l'effet sur les laccases est réversible. Cet effet endommageant est visible seulement sur le long terme lors d'un fonctionnement continu pendant 24 heures alors qu'au bout de 30 min la cathode reste stable [295-296]. Cependant dans ces travaux la concentration minimale de  $H_2O_2$  produite par la GOx et endommageant la BOD n'a pas été calculée. La concentration initiale de  $H_2O_2$  (10 mM) introduite en solution pour démontrer l'effet endommageant est très élevée, ce qui ne permet pas de savoir comment réagirait la cathode sur le long terme pour des concentrations plus faibles. Pour une meilleure optimisation de cette cathode il aurait été intéressant de déterminer quelle concentration de  $H_2O_2$  est produite par unité de temps par la GOx et à partir de quelle concentration l'effet endommageant est observé sur la BOD de *M. verrucaria*.

La fonctionnalisation des nanotubes de carbone avec l'acide (1-pyrène butanoïque, ester succinate) (PBSE) et la syringaldazine a permis d'améliorer l'orientation de la BOD sur l'électrode. La cathode obtenue générerait une densité de courant de  $-0,65 \pm 0,10 \text{ mA.cm}^{-2}$  soit 2,5 fois plus que des cathodes non modifiées [297].

Korani et Salimi ont élaboré une biocathode avec la BOD immobilisée sur une électrode modifiée avec de la bilirubine et des nanotubes de carbone. Cette technique permettait non seulement de réaliser un transfert électronique direct, mais également d'obtenir une excellente activité électrocatalytique à + 0,61V vs. Ag/AgCl [298]. Dans le même ordre d'idée la

bilirubine a été utilisée pour favoriser l'orientation de la BOD sur des MWNT et améliorer ainsi le transfert interfacial d'électrons [299].

#### 3.4.1.4.2.3. Les électrodes d'or

Ohno et al. ont fixé la BOD de *M. verrucaria* de façon covalente sur des électrodes tridimensionnelles à base de nanoparticules d'or non fonctionnalisées avec des thiols, et produisant jusqu'à  $-5,2 \text{ mA.cm}^{-2}$  à  $4000 \text{ tr.min}^{-1}$  [300]. Salaj-Kosla a rapporté l'adsorption de *M. verrucaria* sur de l'or nanoporeux générant jusqu'à  $-0,8 \text{ mA.cm}^{-2}$  [301].

En 2012, Wang et al. ont fait état d'une cathode à base de particules d'or de 20 nm, modifiée par *M. verrucaria* [302] et utilisée dans une biopile en tant que source d'énergie pour les lentilles de contact [303]. Puis, De Lacey et al. ont rapporté l'immobilisation de *M. verrucaria* liée de façon covalente sur des nanoparticules d'or [304]. La biocathode générait une densité de courant de  $-140 \text{ }\mu\text{A.cm}^{-2}$  dans des conditions mimant celles du sérum et était stable pendant au moins 6 jours.

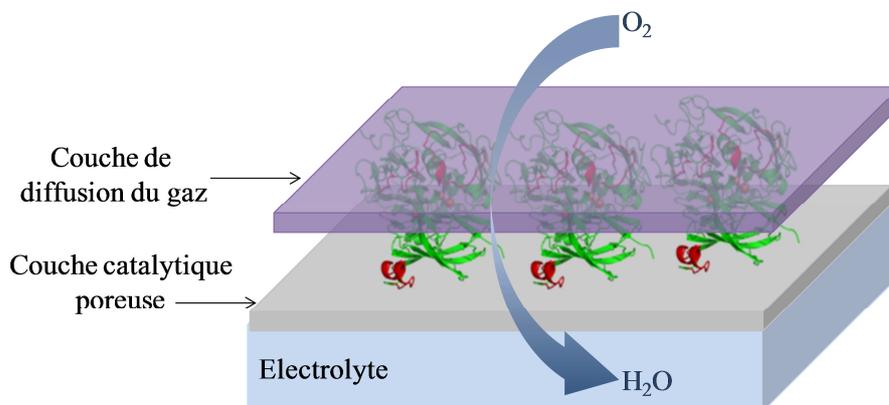
Une cathode hybride à base de nanoparticules d'ITO et de nanoparticules d'or a été réalisée permettant un transfert électronique direct de la BOD à l'électrode. Une augmentation notable de l'intensité du courant a été observée en raison du développement du film de nanoparticules et d'un bon accès aux nanoparticules d'or [305].

Des électrodes modifiées par des nanoparticules d'or ont été utilisées pour l'immobilisation covalente de la BOD. Ces bioélectrodes nanostructurées ont été testées en tant que biocapteurs à oxygène dans les conditions physiologiques. Les mesures en chronoampérométrie montraient une limite de détection de l'oxygène à  $6 \pm 1 \text{ }\mu\text{M}$  avec une plage linéaire de 6 à  $300 \text{ }\mu\text{M}$  [306]. Pankratov et al. ont montré que la taille des nanoparticules d'or dans ces cathodes n'influence ni la vitesse du transfert électronique direct, ni l'activité biocatalytique de l'enzyme [307].

#### 3.4.1.4.2.4. Les cathodes à air

Les faibles solubilité et coefficient de diffusion de l'oxygène dissout en solution aqueuse, contribuent à limiter la réaction biocatalytique. La conception de cathode à air expose l'enzyme à trois phases : la phase solide pour la collecte de courant en TED, la phase liquide

pour un transfert de protons efficace et la phase gazeuse pour le transport efficace de l'oxygène (Figure I.3.14).



**Figure I.3.14.** Schéma d'une cathode à air à base de BOD.

Les cathodes à air ont fait l'objet de nombreux travaux menés notamment par Atanassov et collaborateurs. En 2011 ils ont élaboré une cathode à base de *M. verrucaria* opérant dans les conditions physiologiques et fournissant sous air une densité de courant de  $-0,35 \text{ mA.cm}^{-2}$  à  $+0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ , soit un courant trois fois plus important que sous oxygène [308]. Les mêmes auteurs ont développé plus tard des biopiles utilisant ces cathodes et produisant une densité de courant de  $0,5 \text{ mA.cm}^{-2}$  [309].

Puis, Nishiwaza et al. ont mis au point une cathode à air réalisée à l'aide d'une bande de carbone modifiée avec du Ketjen Black, du polytétrafluoroéthylène et *M. verrucaria*. La cathode ainsi obtenue générait une densité de courant de  $-2 \text{ mA.cm}^{-2}$  [310]. Cette cathode a été par la suite optimisée en ajoutant des nanotubes de carbone [311].

Plus récemment, Zloczewska et al. ont rapporté une cathode réalisée en encapsulant *M. verrucaria* dans un film de gel de silice sur papier de carbone composite, fonctionnalisé avec des SWNT. La cathode a pu être utilisée dans une batterie Zn/O<sub>2</sub> [312].

La cathode à air à base de BOD a été utilisée dans une biopile microbienne sans membrane générant une puissance de  $200 \mu\text{W.cm}^{-2}$  [313]. L'étude de la stabilité de la cathode en présence de polluants/bactéries a montré une perte rapide d'activité [314].

Plus récemment Babanova et al. ont décrit l'étude d'une cathode à air en utilisant des méthodes d'analyses statistiques. Ces méthodes ont permis d'améliorer leur cathode et de générer une densité de courant de  $-755 \pm 39 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  à  $0,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  [315].

L'équipe d'Atanassov a rapporté l'élaboration d'une cathode à base de papier carbone composite, de fibres de carbone, de nanotubes de carbone le tout encapsulé dans un gel de silice. La cathode obtenue générait un courant de  $-655,07 \pm 146,18 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  à pH 5,5 [316].

Une cathode souple a pu être réalisée à base de feuille de silicone revêtue d'un composite de chitosan et de nanotubes de carbone. L'électrode obtenue était stable pendant 5 jours et générait un courant maximal de  $-411 \pm 68 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  à  $+0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  et un potentiel maximal de  $0,624 \pm 0,020 \text{ vs. Ag/AgCl}$  à pH 5 [317]. Tsujimura et al. ont réalisé une cathode flexible utilisée dans une biopile atteignant une densité de puissance de  $0,12 \text{ mW cm}^{-2}$  à  $0,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  [318]. Les mêmes auteurs ont montré que la densité de courant d'une biocathode à diffusion gazeuse pouvait être augmentée en ajustant l'hydrophobicité d'électrodes de carbone poreuses, et en facilitant l'adsorption de l'enzyme par l'ajout une petite quantité de tensio-actif non-ionique à la solution enzymatique [319].

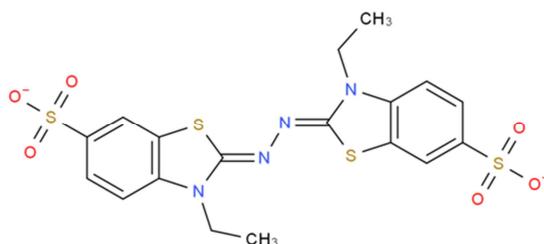
#### **3.4.1.4.3. L'immobilisation de BODs pour le transfert électronique médié**

La réduction bio électrocatalytique médiée de l'oxygène a été réalisée en utilisant différents types de médiateurs tels que l'ABTS [320], les protéines rédox comme le cytochrome c, les cyano complexes métalliques [71], ou encore les polymères rédox couplés avec des complexes d'osmium. Ces médiateurs peuvent être utilisés libres en solution ou immobilisés sur l'électrode.

#### **3.4.1.4.4. Utilisation de médiateurs rédox en solution**

##### **✓ Médiation avec l'ABTS**

L'ABTS (Figure I.3.15) diffusant librement en solution a été utilisé dans les premiers travaux de Tsujimura notamment pour l'élaboration de pile à combustible  $\text{H}_2/\text{O}_2$ . Il a également été utilisé dans une biocathode avec *M. verrucaria* absorbée sur Vulcan® XC72 [179, 321].



**Figure I.3.15.** Structure du 2,2'-Azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) (ABTS).

Il a été constaté que l'utilisation de l'ABTS<sup>2-</sup> conduit à une augmentation du potentiel de 0,38 V vs. Ag/AgCl à 0,41 V vs. Ag/AgCl [261]. En 2007, Kamitaka et al. ont utilisé l'ABTS pour analyser l'effet des mutations des ligands axiaux du cuivre T1 sur le courant d'électroréduction de *M. verrucaria* immobilisée [63, 218]. Ils ont mis en évidence lors de la mutation de la méthionine en glycine, la diminution du potentiel rédox du T1 et l'augmentation de la densité de courant limite par rapport à l'enzyme sauvage.

L'ABTS a également été utilisé par Ikeda et al. afin d'étudier les processus d'inactivation réversible et irréversible de *M. verrucaria* après chauffage et addition de guanidine [322-323]. L'ABTS et le ferricyanure [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> ont été utilisés pour étudier les mécanismes de transfert d'électrons de l'électrode à la BOD [252].

#### ✓ Autres médiateurs

Ikeda et al. ont étudié l'utilisation de poly [oxyéthylène (diméthylimino) propyl-(diméthylimino) éthylène] [324] et de cations de poly-ammonium comme stabilisant pour *M. verrucaria* [325] avec du [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> en solution. L'utilisation du polypropylène-g-polyéthylène glycol avec du ferrocène a permis d'obtenir une cathode avec une activité catalytique 100 fois plus importante que sans ferrocène. La biopile glucose/O<sub>2</sub> obtenue avec cette cathode opérait à + 0,56 V vs. Ag/AgCl et fournissait une puissance de -65 nW.cm<sup>-2</sup> [326].

D'autres médiateurs tels que les complexes cyano-métalliques ont également été utilisés libres en solution pour accroître l'efficacité des cathodes à base de BOD. Les complexes cyano-métalliques les plus utilisés sont le [W(CN)<sub>8</sub>]<sup>3-/4-</sup>, le [Os(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>, le [Mo(CN)<sub>8</sub>]<sup>3-/4-</sup> et le Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> [327-328].

#### 3.4.1.4.5. Utilisation de médiateurs rédox immobilisés

Les médiateurs rédox les plus couramment immobilisés avec les BODs sont l'ABTS, le ferricyanure et les polymères.

##### ✓ Médiation avec l'ABTS

En 2008, Tingry et al. ont immobilisé *M. verrucaria* et l'ABTS dans un film de polypyrrole. La cathode obtenue a été utilisée dans une biopile concentrique générant  $42 \text{ mW.cm}^{-2}$  à  $+0,25 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  [329-330]. Le même concept a été rapporté en utilisant des dérivés de polythiophène possédant des groupements carboxyles [72].

Liu et al. ont co-immobilisé *M. verrucaria* avec des nano-feuillets de graphène dans une matrice de silice sol gel avec l'ABTS comme médiateur rédox [331]. En 2008 Komaba et al. ont réalisée une cathode en combinant la BOD avec de l'ABTS immobilisés à l'aide de nanotubes de carbone. La biopile glucose/ $\text{O}_2$  obtenue générait une puissance de  $150 \mu\text{W.cm}^{-2}$  à  $0,65 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  [332]. Le même type de cathode combinée dans une biopile avec une anode multienzymatique a permis de générer une puissance de  $2,9 \text{ mW.cm}^{-2}$  à  $0,69 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  [333].

Hussein et al. ont réalisé une biocathode faite en mélangeant de la BOD, de l'ABTS et du Nafion® déposés sur buckypapers fabriqués à partir de MWNT fonctionnalisés [334]. Une biopile glucose/ $\text{O}_2$  a été réalisée avec une cathode similaire, elle générait une puissance de  $26 \mu\text{W.cm}^{-2}$  à  $0,55 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  [335].

L'ABTS a également été utilisé comme médiateur rédox dans une biocathode hybride BOD/levure développée par Alfonta [336]. Plus récemment l'ABTS a été immobilisé avec la BOD dans des électrodes de nanoparticules de carbone mésoporeuses. La biopiles obtenue avec la cathode ABTS/BOD associée à une anode ferrocène-méthanol/GOx, également constituée de nanoparticules de carbone mésoporeuses, générait une densité de puissance de  $95 \mu\text{W.cm}^{-2}$  [337].

Une matrice de Nafion® a également été employée pour immobiliser la BOD et l'ABTS en présence de nano fibres de carbone. La biopile glucose/ $\text{O}_2$  obtenue avec cette cathode générait une densité de puissance de  $91 \mu\text{W.cm}^{-2}$  à  $0,168 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  [338].

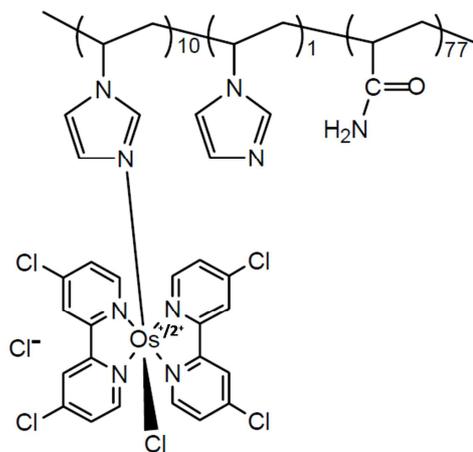
### ✓ Médiation avec le ferricyanure

Le  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  est un médiateur qui a également beaucoup été utilisé, notamment avec *M. verrucaria* dans une matrice poly-L-lysine polycationique [260, 339]. A l'aide de ce concept une biopile produisant une densité de puissance maximale de  $1,45 \text{ mW.cm}^{-2}$  à  $0,3 \text{ V}$  a pu être réalisée [125].

Ce même procédé a permis d'obtenir des densités de courant de  $-20 \text{ mA.cm}^{-2}$  à  $0,25 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  à pH 7 avec une cathode à air [340]. Fujita et al. ont rapporté une cathode BOD- $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  pouvant générer jusqu'à  $-15 \text{ mA.cm}^{-2}$  de courant sous air [341].

### ✓ Médiation avec les polymères rédox

Les polymères rédox poly cationiques greffés de complexes d'osmium ont été largement utilisés. On peut citer notamment le PAA-PVI- $[\text{Os}(4,4'\text{-dichloro-2,2'\text{-bipyridine)}_2\text{Cl}]^{+/2+}$  qui a un potentiel rédox de  $+350 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$  (Figure I.3.16)[112].



**Figure I.3.16.** Structure du PAA-PVI- $[\text{Os}(4,4'\text{-dichloro-2,2'\text{-bipyridine)}_2\text{Cl}]^{+/2+}$ .

En 2002 Mano et Heller ont rapporté deux cathodes à base de BOD et de PAA-PVI- $[\text{Os}(4,4'\text{-dichloro-2,2'\text{-bipyridine)}_2\text{Cl}]^{+/2+}$  sur papier carbone et fonctionnant dans des conditions physiologiques (pH 7,4 ;  $0,15 \text{ M}$  de  $\text{NaCl}$  ;  $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). La première était à base de *M. verrucaria*, elle opérait à  $0,53 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  avec une densité de courant de  $-5 \text{ mA.cm}^{-2}$  [105]. La deuxième à base de *T. tsunodae*, était plus stable et générait une densité de courant de  $-3 \text{ mA.cm}^{-2}$  à  $0,57 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ , soit  $40 \text{ mV}$  de plus que la cathode à base de *M.*

*verrucaria* [109]. Mano et Heller ont également démontré que ce type de cathode était plus efficace que le platine pour la réduction de l'oxygène [143].

Aussi ces cathodes ont été utilisées pour l'élaboration de biopiles glucose/O<sub>2</sub> miniatures performantes et sans membrane [70, 75, 105, 112, 121, 142-144]. Elles ont également été utilisées comme marqueurs pour des immuno essais [342-343] ainsi que pour protéger de l'O<sub>2</sub> un biocapteur à base de GOx [344].

En outre, il a été démontré que la quaternisation du polymère rédox à base d'osmium permettait de stabiliser *T. tsunodae* [345]. Cette technique a été utilisée par Kang et al. pour réaliser une cathode à base de couches de nanotubes de carbone [346].

En 2002, Tsujimura a développé une cathode modifiée avec *M. verrucaria* réticulée avec un polymère rédox à base d'osmium [347]. En 2010, Gao et al. ont développé une cathode en fils de nanotubes hybrides constituée de *M. verrucaria* et de polymère rédox à osmium. Son utilisation dans une biopile permettait de générer une puissance élevée de 740 mW.cm<sup>-2</sup> à + 0,57 V vs. Ag/AgCl [126].

Dans une série de publications, Leech et al. ont utilisé les polymères rédox à osmium pour évaluer la performance et la stabilité de *M. verrucaria* immobilisée [348] et comparer l'effet du pré traitement de surface de l'électrode [349]. Puis en 2011 des électrodes de carbone vitreux et de graphite modifiées ont été réalisées pour améliorer la densité de puissance de leurs biopiles [350].

Les polymères rédox à osmium ont également été utilisés pour immobiliser *M. verrucaria* sur de grandes surfaces d'électrodes d'or nano structurées. Des densités de courant de -500  $\mu\text{A.cm}^{-2}$  ont été obtenues dans des solutions non agitées [351]. Willner et al. ont développé une cathode électro polymérisée constituée de *M. verrucaria*, de platine et de nanoparticules pour l'élaboration d'une biopile éthanol/O<sub>2</sub> [352].

En 2010, Wang et son équipe ont mis au point une biocathode BOD/lysozyme-aptamère [353]. Plus récemment, les polymères rédox à osmium ont été utilisés par Scherson et al. pour élaborer une cathode de *M. verrucaria* qui a été combinée avec une anode oxydante et implantée dans un insecte [354].

Les conditions de préparation de l'hydrogel ont été étudiées, en particulier l'effet de la température et du temps de séchage sur le courant de réduction de *B. pumilus* et *T. tsunodae*. Les analyses ont montré qu'un séchage à 25 ° C sur un temps court (2 heures au lieu de 18 heures) permet d'augmenter la densité du courant de réduction de 78% [355].

Cadet et al. ont optimisé les conditions de synthèse du polymère rédox cathodique PAA-PVI-Os[4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> en ajustant le temps et la température de la réaction de couplage du complexe rédox Os[4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> au copolymère PAA-PVI. Avec une réaction de couplage se produisant sur 2 heures à 180 °C il a été possible d'augmenter la densité de sites catalytiques du polymère rédox, et donc d'augmenter significativement le coefficient de diffusion des électrons entre osmiums voisins. L'utilisation de ce nouveau polymère rédox avec *M. oryzae* a permis d'obtenir une densité de courant de -1,37 mA.cm<sup>-2</sup> à 500 tr.min<sup>-1</sup> [356].

Choi et al. ont récemment synthétisé un nouveau polymère rédox cathodique à base de poly (acide acrylique-vinylpyridine-acrylamide) (PAA-PVP-PAA) et de [Os(4,4'-acide dicarboxylique-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]<sup>+2+</sup> ayant un potentiel de 0,48 V vs. Ag/AgCl. La cathode réalisée avec ce nouveau polymère et *M. verrucaria* délivrait une densité de puissance 60 % plus grande qu'avec du PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> [357].

D'autres polymères rédox ont été synthétisés comme le PVI[Fe(CN)<sub>5</sub>] utilisé comme médiateur pour la BOD *M. verrucaria*. La cathode obtenue génère une densité de courant de -15 mA.cm<sup>-2</sup> à 4000 tr.min<sup>-1</sup> [358].

#### ✓ Médiation avec les polymères rédox couplés aux nanotubes de carbone

L'introduction de nanotubes de carbone dans un hydrogel rédox permet d'accroître les densités de courant. En 2011, Little et al. ont rapporté la conception d'une bio-électrode dans laquelle la BOD et le polymère rédox sont combinés dans une armature nanostructurée [359]. L'électrode était constituée d'un nano réseau carboné (nanotubes de carbone enchevêtrés et intégrés sur une couche de carbone conducteur) déposé sur du carbone vitreux réticulé.

Des nanotubes de carbone introduits dans un hydrogel rédox à base de BOD et de polymère rédox à osmium ont permis d'obtenir des densités de courant  $\geq -0,5$  mA.cm<sup>-2</sup> [360-361] et de réaliser des biopiles sans membrane produisant jusqu'à 70  $\mu$ W.cm<sup>-2</sup> à 37 °C dans du tampon phosphate à pH 7,4 contenant 150 mM NaCl 5 mM glucose et 0,12 mM O<sub>2</sub> [361]. A cette augmentation de courant s'ajoute une inhibition moins importante en présence d'ions halogénures et une stabilité accrue [360].

### 3.5. Conclusion intermédiaire

Les BODs sont d'excellentes enzymes pour la réalisation de cathodes implantables, car elles ont montré d'excellentes performances dans les conditions physiologiques. Les BODs de *Trachyderma tsunodae* et *Myrothecium Verrucaria* ont été longtemps utilisées dans les cathodes enzymatiques pour la réduction de l'oxygène. Elles ont néanmoins certains inconvénients tels qu'une faible activité et/ou une réaction modérée en présence d'urate [362-363] ce qui peut limiter leur utilisation dans des systèmes implantés.

Pour ces raisons, l'identification de nouvelles BODs avec de meilleures propriétés est nécessaire. Nous avons récemment identifié deux nouvelles BODs : une BOD bactérienne issue de *Bacillus pumilus* [190] et une BOD fongique issue de *Magnaporthe oryzae* [187, 196].

Des études biochimiques et électrochimiques ont déjà été rapportées pour ces enzymes et certaines caractéristiques sont résumées dans le Tableau I.3.2. La suite de ce manuscrit présente une étude plus poussée de ces deux enzymes et leur utilisation dans des cathodes enzymatiques pour la réduction de l'O<sub>2</sub>.

## Conclusion

Le monde traverse actuellement une crise énergétique majeure liée à la diminution des réserves en ressources fossiles couramment utilisés pour produire de l'énergie. La bioénergie est une partie intégrante des solutions utilisant des énergies renouvelables et qui permettraient de soulager cette crise.

Contrairement aux biocarburants liquides tels que le bioéthanol et le biodiesel, les biopiles microbiennes ou enzymatiques utilisent des réactions électrochimiques produisant de l'électricité directement par la dégradation de matière organique. Les biopiles enzymatiques sont les moins stables et les moins puissantes. Cependant leur utilisation peut être envisagée pour l'alimentation de biocapteurs nécessitant de faibles puissances et implantables dans le corps humain.

Les enzymes offrent en effet par leur sélectivité la possibilité d'obtenir des biopiles miniatures capables d'alimenter des dispositifs implantables, tels que les capteurs à glucose.

Ces capteurs à glucose nécessaires aux patients diabétiques pour le dosage régulier de leur glycémie pourraient être alimentés par des biopiles glucose/O<sub>2</sub>. Cependant, en dépit de tous les efforts déployés, la cathode reste à ce jour le facteur limitant dans ces biopiles enzymatiques.

Différentes solutions peuvent être envisagées en vue d'améliorer les performances de la cathode : augmenter la surface spécifique des électrodes, développer de nouvelles stratégies pour les transferts d'électrons direct et médié, ou encore réaliser de l'ingénierie enzymatique sur les enzymes cathodiques déjà identifiées.

Les enzymes cathodiques les plus utilisées sont des oxydases multi-cuivre, en particulier les laccases et les bilirubine oxydases. Même si les laccases sont les plus étudiées avec plus de 220 espèces déjà identifiées, les bilirubine oxydases font l'objet d'un intérêt croissant.

Bien qu'elles appartiennent à la même famille les BODs contrairement aux laccases sont capables d'oxyder la bilirubine. Ce sont donc les enzymes idéales pour la bio détection électrochimique de bilirubine dans le sang. Cependant la mauvaise stabilité, le K<sub>M</sub> élevé et la faible activité des BODs commerciales limitent à ce jour le développement de biocapteurs à bilirubine efficaces.

Néanmoins, les BODs présentent une bonne stabilité thermique ainsi qu'une activité et une stabilité élevées à pH neutre en présence de chlore. Au vu de ces propriétés les BODs sont parfaites pour l'élaboration de biocapteurs et biocathodes à oxygène dans les biopiles enzymatiques. Diverses stratégies d'immobilisation de ces BODs sur l'électrode afin d'en améliorer les performances peuvent être utilisées, que ce soit *via* le transfert électronique direct ou médié.

L'ingénierie enzymatique sur les BODs peut également être réalisée pour optimiser les cathodes enzymatiques. Cependant, cela représente un défi particulier car bien qu'un travail considérable ait été réalisé sur les laccases peu d'études de ce type ont été menées sur les BODs.

Sur les quelques BODs identifiées seules deux ont pu être étudiées au rayons X et dévoiler des structures cristallines. Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre la relation entre la structure et l'activité de ces BODs et décrypter les mécanismes de réduction de l'oxygène et d'oxydation de la bilirubine. Cette compréhension permettrait de mettre au point grâce à l'ingénierie enzymatique des biocatalyseurs améliorés, conduisant à des biocathodes à oxygène et biocapteurs à bilirubine plus actifs et les plus stables.

Les possibilités d'amélioration des cathodes enzymatiques passent aussi par l'identification et la production de nouvelles enzymes plus performantes. C'est le cas de *Magnaporthe oryzae* et *Bacillus pumilus* dont l'étude approfondie fait l'objet de la suite de ce manuscrit.

## Références bibliographiques du Chapitre I

1. Cracknell, J.A., K. Vincent, A. , and F.A. Armstrong, *Enzymes as Working or Inspirational Electrocatalysts for Fuel Cells and Electrolysis*. Chemical Reviews, 2008. **108**: p. 2439-2461.
2. Grove, W., *On voltaic series and combination of Gases by platinum* London and Edeinburgh Philosophical Magazine and Journal of Science 1839. **14**(86): p. 127-130.
3. Schoenbein, C.F., *On the voltaic polarization of certain solid and fluid substances*. Philosophical Magazine (Serie 3), 1839 **14** (85): p. 43-45.
4. Tayhas, G., R. Palmore, and G.M. Whitesides, *Microbial and Enzymatic Biofuel Cells*. Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, American Chemical Society Symp. Ser., 1994. **566**(Chapter 14): p. 271-290.
5. Osman, M.H., A.A. Shah, and F.C. Walsh, *Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: enzymatic cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2011. **26**: p. 6.
6. Katz, E., A.N. Shipway, and I. Willner, *Biochemical fuel cells*. Handbook of Fuel Cells Fundamentals, Technology and Applications; Vielstich, W., Gasteiger, H. A., Lamm, A., Eds. John Wiley and Sons, Ltd.: London, 2003. **1**: p. p 355.
7. Shukla, A.K., et al., *Biological fuel cells and their applications*. Current science, 2004. **87**: p. 455-468.
8. Bullen , R.A., et al., *Biofuel cells and their development*. Biosensors and Bioelectronics 2006. **21** (2015-2045).
9. Barton, S.C., J. Gallaway, and P. Atanassov, *Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices*. Chemical Reviews, 2004. **104**(10): p. 20.
10. Leech, D., P. Kavanagh, and W. Schuhmann, *Enzymatic fuel cells: recent progress*. Electrochimica Acta, 2012. **84**: p. 12.
11. Davis, F. and S.P.J. Higson, *Biofuel cells - Recent advances and applications*. Biosensors and Bioelectronics, 2007. **22** p. 1224-1235.
12. Oliveira, V.B., et al., *Overview on the developments of microbial fuel cells*. Biochemical Engineering Journal, 2013. **73**: p. 53–64.
13. Du, Z., H. Li, and T. Gu, *A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy*. Biotechnology Advances, 2007. **25** p. 464-482.
14. Logan, B.E., et al., *Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology*. Environmental Science & Technology, 2006. **40**(17): p. 5181–5192.
15. Scott, K., *10 – Microbial fuel cells: transformation of wastes into clean energy*. Membranes for Clean and Renewable Power Applications, 2014: p. 266–300.
16. Rabaey, K., G. Lissens, and W. Verstraete, *Microbial fuel cells: performances and perspectives*. Biofuels for fuel cells: biomass fermentation towards usage in fuel cells Lens, 2005. **Piet Lens, Peter Westermann, Marianne Haberbauer and Angelo Moreno**: p. 377-399
17. Luz, R.A.S., et al., *Enzyme Biofuel Cells: Thermodynamics, Kinetics and Challenges in Applicability*. ChemElectroChem, 2014: p. 1-28.
18. Karami, M.A. and D.J. Inman, *Powering pacemakers from heartbeat vibrations using linear and nonlinear energy harvesters*. Applied physics letters, 2012. **100**: p. 042901.
19. Addo, P., R. Arechederra, and S.D. Minteer, *Evaluating Enzyme Cascades for Methanol/Air Biofuel Cells Based on NAD-dependent Enzymes*. Electroanalysis, 2010. **22**: p. 807-812.
20. Arechederra, R.L. and S.D. Minteer, *Complete Oxidation of Glycerol in an Enzymatic Biofuel Cell*. Fuel cells, 2009. **1**: p. 63-69.
21. Potter, M.C., *Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds*. Proceedings of the Royal Society B, 1910. **84**: p. 260-276.
22. Cohen, B., *The Bacterial Culture as an Electrical Half-Cell*. Journal of Bacteriology, 1931. **21**: p. 18-19.
23. Arechederra, R., K. Boehm, and S.D. Minteer, *Mitochondrial Bioelectrocatalysis for Biofuel Cell Applications*. Electrochimica Acta, 2009. **54**: p. 7268-7273.

24. Arechederra, R.L., et al., *Electrically wired mitochondrial electrodes for measuring mitochondrial function for drug screening*. The Analyst, 2011. **136**(18): p. 3747-3752.
25. Arechederra, R.L. and S.D. Minter, *Organelle-based biofuel cells: Immobilized mitochondria on carbon paper electrodes*. Electrochimica Acta, 2008. **53**(23): p. 6698-6703.
26. Bhatnagar, D., et al., *Mitochondrial biofuel cells: expanding fuel diversity to amino acids*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **1**(13): p. 86-92.
27. Cho, Y.K., et al., *Development of a solar-powered microbial fuel cell*. J. Appl. Microbiol., 2008. **104**: p. 640-650.
28. He, Z., et al., *Self-Sustained Phototrophic Microbial Fuel Cells Based on the Synergistic Cooperation between Photosynthetic Microorganisms and Heterotrophic Bacteria*. Journal of environmental science and technology, 2009. **43**: p. 1648-1654.
29. Rosenbaum, M., U. Schroöder, and F. Scholz, *In Situ Electrooxidation of Photobiological Hydrogen in a Photobioelectrochemical Fuel Cell Based on Rhodobacter sphaeroides*. Journal of environmental science and technology, 2005. **39**: p. 6328-6333.
30. Cao, X., et al., *Electricity generation by an enriched phototrophic consortium in a microbial fuel cell*. Electrochemistry Communications, 2008. **10**: p. 1392-1395.
31. Furukawa, Y., T. Moriuchi, and K. Morishima, *Design Principle & Prototyping of Direct Photosynthetic/Metabolic Biofuel Cell*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2006. **16**: p. S220-S225.
32. Minter, S.D., B.Y. Liaw, and M.J. Cooney, *Enzyme-based biofuel cells*. Current Opinion in Biotechnology, 2007. **18** p. 228-234.
33. Kim, B.H., et al., *Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell*. Biotechnology Letters, 2003. **25**: p. 541-545.
34. Bennetto, H.P., et al., *Anodic reactions in microbial fuel cells*. Biotechnology and Bioengineering, 1983. **25**(2): p. 559-568.
35. Liu, H., S. Cheng, and B.E. Logan, *Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration*. Environmental Science & Technology, 2005. **39**(14): p. 5488-5493.
36. Clauwaert, P., et al., *Minimizing losses in bio-electrochemical systems: the road to applications*. applied microbiology and biotechnology, 2008. **79**(6): p. 901-913.
37. Liew, K.B., et al., *Non-Pt catalyst as oxygen reduction reaction in microbial fuel cells: A review*. International Journal of Hydrogen Energy, 2014. **39**(10): p. 4870-4883.
38. Jang J.K., et al., *Construction and operation of a novel mediator-and membrane-less microbial fuel cell*. Process Biochemistry, 2004. **39**: p. 1007-1012.
39. Liu, H. and B.E. Logan, *Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane*. . environmental science and technology, 2004. **38**(14): p. 4040-4046.
40. Rabaey, K., et al., *Continuous microbial fuel cells convert carbohydrates to electricity*. Water science technology, 2004. **52**(1-2): p. 515-23.
41. Moehlenbrock, M.J. and S.D. Minter, *Extended lifetime biofuel cells*. Chemical Society Reviews, 2008. **37**: p. 1188-1196.
42. Cooney, M.J., et al., *Enzyme catalysed biofuel cells*. Energy & Environmental Science, 2008. **1**(3): p. 320-337.
43. Holzinger, M., A. Le Goff, and S. Cosnier, *Carbon nanotube/enzyme biofuel cells*. Electrochimica Acta, 2012. **82**: p. 12.
44. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochimie*. De Boeck Supérieur, 2005. **Deuxième édition**: p. 1600 pages.
45. Randoux, A., *Biochimie dynamique*. De Boeck Supérieur,, 1997 **Deuxième édition**: p. 938 pages.
46. Moussard, C., *Biochimie structurale et métabolique: médecine, pharmacie, sciences*. De Boeck Supérieur,, 2002. **Deuxième édition**: p. 324 pages.
47. IUBMB, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>.
48. Hofmeister, F., *Zur lehre von der wirkung der salze*. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 1888. **24**: p. 247-260.

49. Kunz, W., J. Henle, and B.W. Ninham, 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts) : Franz Hofmeister's historical papers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2004. **9**: p. 19-37.
50. Yu, E.H. and K. Scott, *Enzymatic biofuel cells - Fabrication of enzyme electrodes*. *Energies*, 2010. **3**: p. 10.
51. Ferri, S., K. Kojima, and K. Sode, *Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases: A Bird's Eye View of Glucose Sensing Enzymes*. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2011. **5**(5): p. 1068–1076.
52. De Poulpique, A., et al., *Biohydrogen for a New Generation of H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Biofuel Cells: A Sustainable Energy Perspective*. *ChemelectroChem Reviews*, 2014. **1**: p. 1724-1750.
53. Topcagic, S. and S.D. Minteer, *Development of a Membraneless Ethanol/Oxygen Biofuel Cell*. *Electrochimica Acta*, 2006. **51**: p. 2168-2172.
54. Arechederra, R.L., B.L. Treu, and S.D. Minteer, *Development of glycerol/O<sub>2</sub> biofuel cell*. *Journal of Power Sources*, 2007. **173**(1): p. 156-161.
55. Neto, S.A., et al., *Direct electron transfer-based bioanodes for ethanol biofuel cells using PQQ-dependent alcohol and aldehyde dehydrogenases*. *Electrochimica Acta*, 2013. **87**: p. 323–329.
56. Durand, F., et al., *Designing a highly active soluble PQQ-glucose dehydrogenase for efficient glucose biosensors and biofuel cells*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 2010. **402** p. 750-754.
57. Gao, F., et al., *An enzymatic glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell: preparation, characterization and performance in serum*. *Electrochemistry Communications*, 2007. **9**: p. 8.
58. Deng, L., et al., *A biofuel cell with enhanced performance by multilayer biocatalyst immobilized on highly ordered macroporous electrode*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2008. **24** p. 329-333.
59. Scherbahn, V., et al., *Biofuel cells based on direct enzyme-electrode contacts using PQQ-dependent glucose dehydrogenase/bilirubin oxidase and modified carbon nanotube materials*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **61**: p. 631–638.
60. PrévotEAU, A. and N. Mano, *How the reduction of O<sub>2</sub> on enzymes and/or redox mediators affects the calibration curve of "wired" glucose oxidase and glucose dehydrogenase biosensors*. *Electrochimica Acta*, 2013. **112**: p. 318-326.
61. Ramanavicius, A., A. Kausaite, and A. Ramanaviciene, *Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by ethanol*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2008. **24** p. 761-766.
62. Gutiérrez-Domínguez, D.E., et al., *Development of alcohol dehydrogenase–polypyrrole electrodes by adsorption and crosslinking for ethanol oxidation*. *International Journal of Hydrogen Energy*,, 2013. **38**(28): p. 12610-12616.
63. Kamitaka, Y., et al., *Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2007. **9**: p. 9.
64. Tsujimura, S., et al., *Electrochemical reaction of fructose dehydrogenase on carbon cryogel electrodes with controlled pore sizes*. *Electrochemistry Communications*, 2010. **12**(3): p. 446-449.
65. Kawai, S., et al., *The electron transfer pathway in direct electrochemical communication of fructose dehydrogenase with electrodes*. *Electrochemistry Communications*, 2014. **38**: p. 28-31.
66. Lee, J.Y., et al., *A novel enzyme-immobilization method for a biofuel cell*. *Journal of Molecular Catalysis B*, 2009. **59** p. 274-278.
67. Treu, B.L. and S.D. Minteer, *Isolation and purification of PQQ-dependent lactate dehydrogenase from *Gluconobacter* and use for direct electron transfer at carbon and gold electrodes*. *Bioelectrochemistry*, 2008. **74**(1): p. 73-77.
68. Di, J., et al., *Direct electrochemistry of lactate dehydrogenase immobilized on silica sol–gel modified gold electrode and its application*. *Biosensors and Bioelectronics*,, 2007. **23**: p. 682-687.
69. Brunel, L., et al., *Oxygen transport through laccases biocathodes for membrane-less glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell*. *Electrochemistry Communications*, 2007. **9**: p. 331-336.
70. Gao, F., O. Courjean, and N. Mano, *An improved glucose/O<sub>2</sub> membrane-less biofuel cell through glucose oxidase purification*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009. **25**(2).
71. Kim, J., et al., *Development of a biofuel cell using glucose-oxidase- and bilirubin-oxidase-based electrodes*. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2009. **13**: p. 8.

72. Kuwahara, T., et al., *Fabrication of enzyme electrodes with a polythiophene derivative and application of them to a glucose fuel cell*. Synthetic Metals, 2009. **159**: p. 6.
73. Lee, J.Y., et al., *Use of bioelectrode containing DNA wrapped single walled carbon nanotubes for enzyme based biofuel cell*. Journal of Power Sources, 2010. **195** p. 750-755.
74. Lim, J., et al., *Nanostructured Sol-Gel Electrodes for Biofuel Cells*. Journal of Electrochemical Society, 2007. **154** p. A140-A145.
75. Mano, N., *A 280  $\mu\text{W cm}^{-2}$  biofuel cell operating at low glucose concentration*. Chemical Communications, 2008. **19**: p. 3.
76. Durand, F., et al., *Designing a highly active soluble PQQ-glucose dehydrogenase for efficient glucose biosensors and biofuel cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010. **402**: p. 750-754.
77. Miyake, T., et al., *Biofuel cell anode: NAD<sup>+</sup>/glucose dehydrogenase-coimmobilized ketjenblack electrode*. Chemical Physics Letters, 2009. **480**(1-3): p. 123-126.
78. Yakovleva, M.E., et al., *Recombinant pyranose dehydrogenase—A versatile enzyme possessing both mediated and direct electron transfer*. Electrochemistry Communications, 2012. **24**: p. 120-122.
79. Zafar, M.N., et al., *Wiring of pyranose dehydrogenase with osmium polymers of different redox potentials*. Bioelectrochemistry, 2010. **80**(1): p. 38-42.
80. Killyéni, A., et al., *Effect of deglycosylation on the mediated electrocatalytic activity of recombinantly expressed Agaricus meleagris pyranose dehydrogenase wired by osmium redox polymer*. Electrochimica Acta, 2014. **126**: p. 61-67.
81. Salaj-Kosla, U., et al., *Mediated electron transfer of cellobiose dehydrogenase and glucose oxidase at osmium polymer-modified nanoporous gold electrodes*. Analytical Bioanalytical Chemistry 2013. **405**: p. 3823-3830.
82. Stoica, L., et al., *Membrane-Less Biofuel Cell Based on Cellobiose Dehydrogenase (Anode) / Laccase (Cathode) Wired via Specific Os-Redox Polymers*. Fuel Cells 2009. **9**: p. 53-62.
83. Kovacs, G., et al., *Graphite electrodes modified with Neurospora crassa cellobiose dehydrogenase: Comparative electrochemical characterization under direct and mediated electron transfer*. Bioelectrochemistry, 2012. **88**: p. 84-91.
84. Ciaccafava, A., et al., *A friendly detergent for H<sub>2</sub> oxidation by Aquifex aeolicus membrane-bound hydrogenase immobilized on graphite and Self-Assembled-Monolayer-modified gold electrodes*. Electrochimica Acta, 2012. **82**: p. 115-125.
85. Baur, J., et al., *Three-dimensional carbon nanotube-polypyrrole-[NiFe] hydrogenase electrodes for the efficient electrocatalytic oxidation of H<sub>2</sub>*. International Journal of Hydrogen Energy, 2011. **36**(19): p. 12096-12101.
86. Solomon, E.I., U.M. Sundaram, and T.E. Machonkin, *Multicopper oxidases and oxygenases*. Chemical Review, 1996. **96**: p. 43.
87. Mano, N., et al., *Oxygen is electroreduced to water on a "wired" enzyme electrode at a lesser overpotential than on platinum*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**: p. 15290-15291.
88. Mano, N., V.S. Soukharev, and A. Heller, *A laccase-wiring redox hydrogel for efficient catalysis of O<sub>2</sub> electroreduction*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**: p. 11180-11187.
89. Chen, T., et al., *A miniature biofuel cell*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123** (35): p. 8630-8631.
90. Mano, N. and L. Edembe, *Bilirubin oxidases in bioelectrochemistry: Features and recent findings*. Biosensors and Bioelectronics 2013. **50**: p. 478-485.
91. Willner, I., G. Arad, and E. Katz, *A biofuel cell based on pyrroloquinoline quinone and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1998. **44** (2): p. 209-214.
92. Pizzariello, A., M. Stred'ansky, and S. Miertus, *A glucose/hydrogen peroxide biofuel cell that uses oxidase and peroxidase as catalysts by composite bulk-modified bioelectrodes based on a solid binding matrix*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 2002 **56**(1-2): p. 99-105.
93. Ramanaviciusa, A., et al., *Biofuel cell based on glucose oxidase from Penicillium funiculosum 46.1 and horseradish peroxidase*. Chemical Engineering Journal, 2015. **264**: p. 165-173.

94. Reuillard, B., et al., *Direct electron transfer between tyrosinase and multi-walled carbon nanotubes for bioelectrocatalytic oxygen reduction*. *Electrochemistry Communications*, 2012. **20**: p. 19-22.
95. Katz, E., I. Willner, and A.B. Kotlyar, *A non-compartmentalized glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell by bioengineered electrode surfaces*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1999. **479**: p. 64-68.
96. Cao, L., *Immobilised enzymes: science or art?* *Current Opinion in Biotechnology*, 2005. **9**: p. 217-226.
97. Sheldon, R.A., *Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2007. **349**: p. 1289-1307.
98. Tingry, S., M. Cretin, and C. Innocent, *Les biopiles enzymatiques pour produire de l'électricité*. *L'actualité chimique*, 2013. **373**: p. 18-25.
99. Willner, I., et al., *Electrical wiring of glucose oxidase by reconstitution of FAD-modified monolayers assembled onto Au-electrodes*. *Journal of the American Chemical Society*, 1996. **118**(42): p. 10321-10322.
100. S. Tingry, M. Cretin, and C. Innocent, *Les biopiles enzymatiques pour produire de l'électricité*. *L'actualité chimique*, 2013. **373**: p. 18-25.
101. Chen, J., et al., *A Simple Means to Immobilize Enzyme into Conducting Polymers via Entrapment*. *Electrochemical and Solid-State Letters*, 2006. **9**(7): p. H68-H70.
102. Foulds, N.C. and C.R. Lowe, *Enzyme entrapment in electrically conducting polymers. Immobilisation of glucose oxidase in polypyrrole and its application in amperometric glucose sensors*. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 1986. **82**(4): p. 1259-1264.
103. Bartlett, P.N. and R.G. Whitaker, *Electrochemical immobilisation of enzymes: Part II. Glucose oxidase immobilised in poly-N-methylpyrrole*. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1987. **224**(1-2): p. 37-48.
104. Pandey, P.C., *A new conducting polymer-coated glucose sensor*. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 1988. **84**(7): p. 2259-2265.
105. Mano, N., et al., *An oxygen cathode operating in a physiological solution*. *Journal of the American Chemical Society*, 2002. **124**(22): p. 7.
106. Soukharev, V., N. Mano, and A. Heller, *A four-electron O<sub>2</sub>-electroreduction biocatalyst superior to platinum and a biofuel cell operating at 0.88 V*. *Journal of the American Chemical Society*, 2004. **126**: p. 2.
107. Heller, A., *Potentially implantable miniature batteries*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006. **385**: p. 5.
108. Heller, A., *Miniature biofuel cells*. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2004. **6**: p. 209-216.
109. Mano, N., H.-H. Kim, and A. Heller, *On the relationship between the characteristics of bilirubin oxidases and O<sub>2</sub> cathodes based on their "wiring"*. *Journal of Physical Chemistry*, 2002. **106**: p. 7.
110. Gregg, B.A. and A. Heller, *Redox Polymer Films Containing Enzymes*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1991. **95**: p. 5970-5975.
111. Kavanagh, P., et al., *Performance of a glucose/O<sub>2</sub> enzymatic biofuel cell containing a mediated *Melanocarpus albomyces* laccase cathode in a physiological buffer*. *Fuel Cells* 2008. **9**(1): p. 79-84.
112. Kim, H.-H., et al., *A miniature membrane-less biofuel cell operating under physiological conditions at 0.5 V*. *Journal of the Electrochemical Society*, 2003. **150**(2): p. 5.
113. Heller, A., *Electron-conducting redox hydrogels: design, characteristics and synthesis*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006. **10**(6): p. 664-672.
114. Mao, F., N. Mano, and A. Heller, *Long tethers binding redox centers to polymer backbones enhance electron transport in enzyme "Wiring" hydrogels*. *Journal of The American Chemical Society*, 2003. **125**(16): p. 4951-7.
115. Mano, N., F. Mao, and A. Heller, *On the parameters affecting the characteristics of the "wired" glucose oxidase anode*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2005. **574**: p. 347-357.
116. Heller, A. and B. Feldman, *Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management*. *Chemical Reviews*, 2008. **108** (7): p. 2482-2505.

117. Barton, S.C., et al., *The "wired" laccase cathode : high current density electroreduction of O<sub>2</sub> to water at +0.7 V (NHE) at pH 5*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**: p. 2.
118. Barrière, F., et al., *Targetting redox polymers as mediators for laccase oxygen reduction in a membrane-less biofuel cell*. Electrochemistry Communications, 2004. **6**(3): p. 237-241.
119. Yahiro, A.T., S.M. Lee, and D.O. Kimble, *Bioelectrochemistry. I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies*. Biochimica et Biophysica Acta, 1964. **88**: p. 375-383.
120. Palmore, G.T.R., et al., *A methanol dioxygen biofuel cell that uses NADq-dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials*. Journal of Electroanalytical Chemistry 1998. **443** (1): p. 155-161.
121. Mano, N., F. Mao, and A. Heller, *Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O<sub>2</sub> biofuel cell and its operation in a living plant*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**: p. 6588.
122. Heller, A., *Integrated Medical Feedback Systems for Drug Delivery*. Bioengineering, Food, and Natural Products, 2005. **51**: p. 1054-1066.
123. Mano, N., et al., *A miniature biofuel cell operating at 0.78 V*. Chem. Commun 2003: p. 518-519.
124. J. Kim, H. Jia, and P. Wang, *Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells*. Biotechnology Advances, 2006. **24**: p. 296–308.
125. Sakai, H., et al., *A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions*. Energy and Environmental Science, 2009. **2**: p. 6.
126. Gao, F., et al., *Engineering hybrid nanotube wires for high-power biofuel cells*. Nature Communications, 2010. **1**(2): p. 7.
127. Gellett, W., et al., *Biofuel cells for portable power*. Electroanalysis 2010. **22**: p. 727-731.
128. Sony, *Sony Develops "Bio Battery" Generating Electricity from Sugar* <<http://www.sony.net/SonyInfo/News/Press/200708/07-074E/index.html>> 2007.
129. Wang, J., *Electrochemical glucose biosensors*. Chemical Reviews, 2008. **108** (2): p. 814-825.
130. Heller, A. and B. Feldman, *Electrochemistry in Diabetes Management* Accounts of chemical research, 2010. **43**(7): p. 963-973.
131. Hammond, P., A. Liebl, and S. Grunder, *International survey of insulin pump users: Impact of continuous subcutaneous insulin infusion therapy on glucose control and quality of life*. Primary care diabetes, 2007. **1**(3): p. 143-146.
132. Clarke, S.F. and J.R. Foster, *A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus*. British journal of biomedical science, 2012. **69**(2): p. 83-93.
133. <http://www.futura-sciences.com/magazines/sciences/infos/actu/d/recherche-mini-puce-maxi-debat-notre-vie-privee-menacee-4687/>.
134. Shao, M., et al., *Optimization of a Membraneless Glucose/Oxygen Enzymatic Fuel Cell Based on a Bioanode with High Coulombic Efficiency and Current Density*. ChemPhysChem, 2013. **14**: p. 2260-2269.
135. Yehezkeli, O., et al., *Nano-engineered Flavin-Dependent Glucose Dehydrogenase/Gold Nanoparticle-Modified Electrodes for Glucose Sensing and Biofuel Cell Applications*. ACS Nano., 2011. **5**(3): p. 2385-9.
136. Zebda, A., et al., *Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes*. Nature Communication, 2011.
137. Reuillard, B., et al., *High power enzymatic biofuel cell based on naphthoquinone-mediated oxidation of glucose by glucose oxidase in a carbon nanotube 3D matrix*. Phys Chem Chem Phys, 2013. **15**: p. 4892-4896.
138. Cosnier, S., A. Le Goff, and M. Holzinger, *Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review*. Electrochemistry Communications 2014. **38** p. 19-23.
139. Cinquin, P., et al., *A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats*. PLoS ONE 2010. **5**(5): p. e10476.
140. Zebda, A., et al., *Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices*. Scientific reports, 2013 **3**(1516).
141. Galanopoulo, L., *Le bel avenir des biopiles*. Le journal du cnrs, 2014.

142. Flexer, V. and N. Mano, *From dynamic measurements of photosynthesis in a living plant to sunlight transformation into electricity*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(4): p. 6.
143. Mano, N. and A. Heller, *A miniature membraneless biofuel cell operating at 0.36 V under physiological conditions*. Journal of the Electrochemical Society, 2003. **150**(8): p. 3.
144. Mano, N., F. Mao, and A. Heller, *A miniature membrane-less biofuel cell operating at +0.60 V under physiological conditions*. Chemical Biology Chemistry, 2004. **5**: p. 3.
145. Flexer, V. and N. Mano, *From Dynamic Measurements of Photosynthesis in a Living Plant to Sunlight Transformation into Electricity*. Anal. Chem., 2010. **82**(4): p. 1444-1449.
146. Gao, F., et al., *Engineering hybrid nanotube wires for high-power biofuel cells*. Nat Commun, 2010. **1**(1): p. 10.1038/ncomms1000
147. Fernandez, J.L., et al., *Optimization of "Wired" enzyme O<sub>2</sub>-Electroreduction Catalyst Composition by Scanning Electrochemical Microscopy*. Angew. Chem. Int. Ed., 2004. **43**: p. 6355-6357.
148. Zloczewska, A., et al., *Vertically aligned carbon nanotube film electrodes for bioelectrocatalytic dioxygen reduction*. Electrochim. Acta., 2011. **56**: p. 3947-3953.
149. Heller, A., *Miniature Biofuel Cells*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2004. **6**: p. 209-216.
150. Rengaraj, S., et al., *A membrane-less enzymatic fuel cell with layer-by-layer assembly of redox polymer and enzyme over graphite electrodes*. Chem. Commun., 2011. **47**: p. 11861-11863.
151. Wang, X., et al., *Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes*. Biosens Bioelectron, 2012. **31**: p. 219-225.
152. Zebda, A., et al., *Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes*. Nat. Commun., 2011: p. DOI: 10.1038/ncomms1365.
153. Rincón, R.C., et al., *Enzymatic fuel cells: Integrating flow-through anode and air-breathing cathode into a membrane-less biofuel cell design*. Biosens Bioelectron, 2011. **27**: p. 132-136.
154. Gao, F., et al., *An enzymatic glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell: Preparation, characterization and performance in serum*. Electrochem. Comm., 2007. **9**: p. 989-996.
155. Mayer, A. and R. Staples, *Laccase: new functions for an old enzyme*. Phytochemistry 2002. **60**(6): p. 551-565.
156. Xu, F., et al., *A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability*. Biochimica BiophysicaActa, 1996. **1292**: p. 303-311.
157. Hirose, J., et al., *Characterization of ascorbate oxidase from Acremonium sp. HI-25*. Journal of Biochemistry, 1994. **115**(5): p. 811-813.
158. Kawahara, K., et al., *Characterization of cucumber ascorbate oxidase and its reaction with hexacyanoferrate (II)*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1985. **241**(1): p. 179-186.
159. Messerschmidt, A., et al., *X-ray crystal structure of the blue oxidase ascorbate oxidase from zucchini. Analysis of the polypeptide fold and a model of the copper sites and ligands*. Journal of Molecular Biology, 1989. **206**(3): p. 513-529.
160. Hirose, J., et al., *Characterization of ascorbate oxidase from Acremonium sp. HI-25*. J Biochem, 1994. **115**(5): p. 811-3.
161. Messerschmidt, A., et al., *X-ray crystal structure of the blue oxidase ascorbate oxidase from zucchini. Analysis of the polypeptide fold and a model of the copper sites and ligands*. J Mol Biol, 1989. **206**(3): p. 513-29.
162. Kawahara, K., et al., *Characterization of cucumber ascorbate oxidase and its reaction with hexacyanoferrate (II)*. Arch Biochem Biophys, 1985. **241**(1): p. 179-86.
163. Zaitsev, V.N., et al., *An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma*. J Biol Inorg Chem, 1999. **4**(5): p. 579-587.
164. Zaitseva, I., et al., *The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: Nature of the copper centres*. J. Biol. Inorg. Chem. , 1996. **1**(1): p. 15-23.
165. Hiromi, K., et al., *Bilirubin oxidase from Trachyderma tsunodae K-2593, a multicopper enzyme*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1992. **56**: p. 1349-1350.

166. Kataoka, K., et al., *High-level expression of Myrothecium verrucaria bilirubin oxidase in Pichia pastoris, and its facile purification and characterization*. Protein Expression and Purification, 2005. **41**(1): p. 77-83.
167. Giardina, P., et al., *Laccases: a never-ending story*. Cellular and molecular life sciences, 2010. **67**(3): p. 369-385.
168. Han, M.J., H.T. Choi, and H.G. Song, *Purification and characterization of laccase from the white rot fungus Trametes versicolor*. 2005. **43**(6): p. 555-560.
169. Giardina, P., et al., *Laccases: a never-ending story*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(3): p. 369-85.
170. Han, M.J., H.T. Choi, and H.G. Song, *Purification and characterization of laccase from the white rot fungus Trametes versicolor*. J Microbiol, 2005. **43**(6): p. 555-60.
171. Madhavi, V. and S.S. Lele, *Laccase : properties and applications*. BioResources, 2009. **1**(1): p. 1694-1717.
172. Rodríguez Couto, S. and J.L. Toca Herrera, *Industrial and biotechnological applications of laccases: A review*. Biotechnology Advances, 2006. **24**(5): p. 500–513.
173. M. Tarasevich , et al., *Electrocatalysis of a cathodic oxygen reduction by laccase*. J. Electroanal Chem, 1979. **104**: p. 393-403.
174. Gallaway, J., et al., *Oxygen-reducing enzyme cathodes produced from SLAC, a small laccase from Streptomyces coelicolor*. Biosensors & Bioelectronics, 2008. **23**: p. 7.
175. Gelo-Pujic, M., et al., *Electrochemical studies of a truncated laccase produced in Pichia pastoris*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(12): p. 7.
176. Mano, N., *Features and applications of bilirubin oxidases*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. **96**(2): p. 7.
177. Murao, S. and N. Tanaka, *A new enzyme "bilirubin oxidase" produced by Myrothecium verrucaria MT-1*. Agricultural and Biological Chemistry, 1981. **45**(10): p. 2.
178. Goldfinch, M.E. and G.A. Maguire, *Investigation of the Use of Bilirubin Oxidase to Measure the Apparent Unbound Bilirubin Concentration in Human Plasma*. AnalyticalClinicalBiochemistry 1988. **25**: p. 73–77.
179. Tsujimura, S., et al., *Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water at neutral pH using bilirubin oxidase as an enzyme and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) as an electron transfer mediator*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2001. **496**: p. 7.
180. Masuda-Nishimura, I., et al., *cDNA cloning of bilirubin oxidase from Pleurotus ostreatus strain Shinshu and its expression in Aspergillus sojae: an efficient screening of transformants, using the laccase activity of bilirubin oxidase*. . The Journal of General and Applied Microbiology, 1999. **45**: p. 93-97.
181. Sakurai, T., et al., *Authentic and recombinant bilirubin oxidases are in different resting forms*. . Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2003. **67**(5): p. 1157-1159.
182. Guo, J., et al., *Purification and properties of bilirubin oxidase from Myrothecium verrucaria*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1991. **31**(2): p. 135-143.
183. Murao, S. and N. Tanaka, *Isolation and identification of a microorganism producing bilirubin oxidase*. Agricultural and Biological Chemistry, 1982. **46**(8): p. 4.
184. Tanaka, N. and S. Murao, *Reaction of bilirubin oxidase produced by Myrothecium verrucaria MT-1*. . Agricultural and biological chemistry, 1985. **49**: p. 843-844.
185. Seki, Y., i.M. Takeguch, and I. Okura, *Purification and properties of bilirubin oxidase from Penicillium janthinellum*. Journal of Biotechnology, 1996. **46**: p. 145-151.
186. Takeguchi, M., et al., *On the molecular weight of bilirubin oxidase from Penicillium janthinellum*. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 1995. **97**: p. L3-L5.
187. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Magnaporthe oryzae: an attractive new enzyme for biotechnological applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. **96**(6): p. 10.
188. Sakasegawa, S., et al., *Bilirubin oxidase activity of Bacillus subtilis CotA*. 2006. **72**(1): p. 972-975.
189. Yoshino, E.M., et al., *Thermostable bilirubin oxidase and production process thereof*. . Toyo Jozo Co., Ltd. (Shizuoka, JP) Japan, 1988.
190. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Bacillus pumilus: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 7.

191. Reiss, R., J. Ihssen, and L. Thöny-Meyer, *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnology*, 2011. **11**(9).
192. Mizutani, K., et al., *X-ray analysis of bilirubin oxidase from Myrothecium verrucaria at 2.3 Å resolution using a twinned crystal*. *Acta Crystallographica*, 2010. **766**: p. 6.
193. Shimizu, A., et al., *Myrothecium verrucaria bilirubin oxidase and its mutants for potential copper ligands*. *Biochemistry*, 1999. **38**: p. 9.
194. Zoppellaro, G., et al., *The reversible change in the redox state of type I Cu in Myrothecium verrucaria bilirubin oxidase depending on pH*. *Biosciences Biotechnology and Biochemistry*, 2004. **68**(9): p. 3.
195. Cracknell, J.A., et al., *Bilirubin oxidase from Myrothecium verrucaria: X-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O<sub>2</sub> reduction*. *Dalton Transactions*, 2011. **40**(25): p. 8.
196. Kjaergaard, C.H., et al., *Spectroscopic and crystallographic characterization of "alternative resting" and "resting oxidized" enzyme forms of bilirubin oxidase: implications for activity and electrochemical behavior of multicopper oxidases*. *Journal of the American Chemical Society*, 2012. **134**: p. 4.
197. Piontek, K., M. Antorini, and T. Choinowski, *Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(40 ): p. 37663 -37669.
198. Page, C., et al., *Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation reduction*. *Nature* 1999. **402**(6757 ): p. 47-52.
199. Shleev, S., et al., *Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005. **20**: p. 37.
200. Solomon, E.I., et al., *Electronic Structures of Metal Sites in Proteins and Models: Contributions to Function in Blue Copper Proteins*. *Chemical Reviews*, 2004. **104**(2): p. 419-458.
201. Sakurai, T. and K. Kataoka, *Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase*. *The Chemical Record*, 2007. **7**: p. 10.
202. Solomon, E.I., A.J. Augustine, and J. Yoon, *O<sub>2</sub> reduction to H<sub>2</sub>O by the multicopper oxidases*. *Dalton transactions*, 2008. **14**(30): p. 3921-32.
203. Koikeda, S., et al., *Molecular cloning of the gene for bilirubin oxidase from Myrothecium verrucaria and its expression in yeast*. *Journal of Biological Chemistry*, 1993. **268**(25): p. 18801-18809.
204. Koschorreck, K., et al., *Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008. **79**(2): p. 217-224.
205. Mohammadian, M., et al., *Enhanced expression of a recombinant bacterial laccase at low temperature and microaerobic conditions: purification and biochemical characterization*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2010. **37**: p. 863-869.
206. Yoshino, E., et al., *Thermostable bilirubin oxidase and production process thereof*. *United States Patents*, 1988. **US 4770997 A**.
207. Durao, P., et al., *Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes*. *J Biol Inorg Chem*, 2008. **13**(2): p. 183-193.
208. Hilden, K., T. Hakala, and T. Lundell, *Thermotolerant and thermostable laccases*. 2009. **31**(8): p. 1117-1128.
209. Kataoka, K., et al., *Point mutations at the type I Cu ligands, Cys457 and Met467, and at the putative proton donor, Asp105, in Myrothecium verrucaria bilirubin oxidase and reactions with dioxygen*. *Biochemistry* 2005. **44**(18): p. 7004-7012.
210. Xu, F., *Dioxygen reactivity of laccase: dependence on laccase source, pH, and anion inhibition*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2001. **95**: p. 125-133.
211. Christenson, A., et al., *Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006. **1757**: p. 8.
212. Shleev, S., et al., *Direct heterogeneous electron transfer reactions of bilirubin oxidase at a spectrographic graphite electrode*. *Electrochemistry Communications*, 2004. **6**: p. 6.

213. Tsujimura, S., K. Kano, and T. Ikeda, *Bilirubin oxidase in multiple layers catalyzes four-electron reduction of dioxygen to water without redox mediators*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2005. **576**: p. 8.
214. Weigel, M.C., E. Tritscher, and F. Lisdat, *Direct electrochemical conversion of bilirubin oxidase at carbon nanotube-modified glassy carbon electrodes*. Electrochemistry Communications, 2007. **9**: p. 5.
215. Hirose, J., et al., *Anions binding to bilirubin oxidase from Trachyderma tsunodae K-2593*. Inorganica Chimica Acta, 1998. **273**: p. 9.
216. Hirose, J., et al., *Characterization of ascorbate oxidase from Acremonium sp. HI-25 and bilirubin oxidase from Trachyderma tsunodae K-2593, multi-copper enzymes*. Journal of Inorganic Biochemistry, 1995. **59**(2-3): p. 1.
217. Ivnitsky, D., K. Artyushkova, and P. Atanassov, *Surface characterization and direct electrochemistry of redox copper centers of bilirubin oxidase from fungi Myrothecium verrucaria*. Bioelectrochemistry, 2008. **74**: p. 10.
218. Kamitaka, Y., et al., *Effects of axial ligand mutation of the type I copper site in bilirubin oxidase on direct electron transfer-type bioelectrocatalytic reduction of dioxygen*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2007. **601**: p. 6.
219. Ramirez, P., et al., *Direct electron transfer from graphite and functionalized gold electrodes to T1 and T2/T3 copper centers of bilirubin oxidase*. Biochimica et Biophysica Acta, 2008. **1777**: p. 6.
220. F. Durand, et al., *Bilirubin oxidase from Bacillus pumilus: A promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 140-146.
221. F. Durand, S.G., C. H. Kjaergaard, E. I. Solomon, N. Mano, *Bilirubin oxidase from Magnaporthe oryzae: an attractive new enzyme for biotechnological applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012.
222. Fevery, J., *Bilirubin in clinical practice: a review*. Liver International, 2008. **28**(5): p. 14.
223. Doumas, B., et al., *Determination of the Sum of Bilirubin Sugar Conjugates in Plasma by Bilirubin Oxidase*. Clinical Chemistry, 1999. **45**(8): p. 1255-1260.
224. Kirihigashi, K., et al., *Basic and clinical evaluation of a newly-developed enzymatic bilirubin assay*. Osaka city medical journal, 2000. **46**(1): p. 55-70.
225. Kosaka, A., et al., *Enzymatic determination of bilirubin fractions in serum*. Clinical Biochemistry 1987. **20**(6): p. 451-458.
226. Kurosakaa, K., et al., *A new enzymatic assay for selectively measuring conjugated bilirubin concentration in serum with use of bilirubin oxidase*. Clinica Chimica Acta, 1998. **269**: p. 125-136.
227. Kirk, J., *Neonatal jaundice: a critical review of the role and practice of bilirubin analysis*. Annals of Clinical Biochemistry, 2008. **45**: p. 452-462.
228. Kirk, J.M., *Neonatal jaundice: a critical review of the role and practice of bilirubin analysis*. Ann Clin Biochem. , 2008. **45**: p. 452-462.
229. Maisels, M.J., *Neonatal jaundice In: Neonatology, Pathophysiology and Management of the Newborn*. Avery, G.B., ed 3rd edition. J.B. Lippincott Company, Philadelphia., 1989.
230. Doumas, B.T., et al., *Measurement of direct bilirubin by use of bilirubin oxidase*. Clinical Chemistry, 1987. **33**(8): p. 5.
231. Otsuji, S., et al., *A new enzymatic approach for estimating total and direct bilirubin*. Clinical Biochemistry, 1988. **1**(33-38).
232. Perry, B., et al., *Measurement of total bilirubin by use of bilirubin oxidase*. Clinical Chemistry, 1986. **32**(2): p. 4.
233. Sundberg, M.W., et al., *Estimation of unconjugated, conjugated, and 'delta' bilirubin fractions in serum by use of two coated thin films*. Clinical Chemistry 1984. **30** (8): p. 1314-1317.
234. Shoham, B., et al., *A bilirubin biosensor based on a multilayer network enzyme electrode*. Biosensors & Bioelectronics, 1995. **10**: p. 12.
235. Klemm, J., M.I. Prodromidis, and M.I. Karayannis, *An enzymic method for the determination of bilirubin using an oxygen electrode*. Electroanalysis, 2000. **12**(4): p. 4.

236. Matui, Y., Y. Yoshihara, and T.J. Yaniguti, Japanese Kokai Tokyo Koho, 1985. **60**: p. 110290.
237. Wang, J. and M. Ozsoz, *A polishable amperometric biosensor for bilirubin*. *Electroanalysis*, 1990. **2**(8): p. 647-650.
238. Li, X., et al., *Determination of Bilirubin by Fiberoptic Biosensor*. *Analytical Letters*, 1996. **29**(2): p. 171-180.
239. Fortuney, A. and G.G. Guilbault, *Enzyme electrode for the determination of bilirubin*. *Electroanalysis*, 1996. **8**(3): p. 4.
240. Andreu, Y., et al., *Determination of direct-bilirubin by a fluorimetric-enzymatic method based on bilirubin oxidase*. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000. **368**(5): p. 516-521.
241. Kannan, P., et al., *Highly sensitive amperometric detection of bilirubin using enzyme and gold nanoparticles on sol-gel film modified electrode*. *Talanta* 2011. **86**: p. 400-407.
242. Feng, Q., et al., *Synthesis of the multi-walled carbon nanotubes-COOH/graphene/gold nanoparticles nanocomposite for simple determination of Bilirubin in human blood serum*. *Sensors and Actuators B*, 2013. **185**: p. 337-344.
243. Batra, B., et al., *Construction of an amperometric bilirubin biosensor based on covalent immobilization of bilirubin oxidase onto zirconia coated silica nanoparticles/chitosan hybrid film*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. **44**: p. 64-69.
244. Liu, Y., Y. Du, and C.M. Li, *Direct electrochemistry based biosensors and biofuel cells enabled with nanostructured materials*. *Electroanalysis*, 2013. **25**(4): p. 7.
245. Marcus, R.A. and N. Sutin, *Electron transfers in chemistry and biology*. *Biochim Biophys Acta*, 1985. **81**(1): p. 265-322.
246. Léger, C. and P. Bertrand, *Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanistic studies*. *Chemical Reviews*, 2008. **108**: p. 60.
247. Climent, V., et al., *Voltammetry and single-molecule in situ scanning tunneling microscopy of laccases and bilirubin oxidase in electrocatalytic dioxygen reduction on Au(111) single-crystal electrodes*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2012. **116**: p. 12.
248. Nogala, W., et al., *Bioelectrocatalytic mediatorless dioxygen reduction at carbon ceramic electrodes modified with bilirubin oxidase*. *Electrochimica Acta*, 2010. **55**: p. 6.
249. Fernandez, J.L., et al., *Optimization of "wired" enzyme O<sub>2</sub>-electroreduction catalyst compositions by scanning electrochemical microscopy*. *Angewandte Chemie*, 2004. **43**: p. 3.
250. Shleev, S., et al., *On the possibility of uphill intramolecular electron transfer in multicopper oxidases: electrochemical and quantum chemical study of bilirubin oxidase*. *Electroanalysis*, 2012. **24**(7): p. 17.
251. Tominaga, M., M. Ohtani, and I. Taniguchi, *Gold single-crystal electrode surface modified with self-assembled monolayers for electron tunneling with bilirubin oxidase*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2008. **10**(46): p. 7.
252. Li, D., et al., *Bioelectrocatalytic Oxygen Reduction Reaction by Bilirubin Oxidase Adsorbed on Glassy Carbon and Edge Plane Pyrolytic Graphite Electrodes: Effect of Redox Mediators* *International Journal of ELECTROCHEMICAL SCIENCE*, 2014. **9**: p. 1390-1398.
253. Brocato, S., C. Lau, and P. Atanassov, *Mechanistic study of direct electron transfer in bilirubin oxidase*. *Electrochimica Acta*, 2012. **61**: p. 6.
254. Kuwahara, J., et al., *Electrocatalytic reduction of oxygen by bilirubin oxidase in hydrophobic ionic liquids containing a small quantity of water*. *Catalysis Today*, 2013. **200**: p. 49-53.
255. Pankratov, D., et al., *Interfacial behavior and activity of laccase and bilirubin oxidase on bare gold surfaces*. *Langmuir*, 2014. **30**(10): p. 2943-2951.
256. Otsuka, K., et al., *Electrochemical consideration on the optimum pH of bilirubin oxidase*. *Analytical Biochemistry*, 2007. **370**: p. 9.
257. Dos Santos, L., et al., *Mechanistic studies of the "blue" Cu enzyme, bilirubin oxidase, as a highly efficient electrocatalyst for the oxygen reduction reaction*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010. **12**: p. 13.
258. Filip, J. and J. Tkac, *The pH dependence of the cathodic peak potential of the active sites in bilirubin oxidase*. *Bioelectrochemistry* 2014. **96**: p. 14-20.
259. Ivnitski, D.M., et al., *Surface characterization and direct bioelectrocatalysis of multicopper oxidases*. *Electrochimica Acta*, 2010. **55** p. 7385-7393.

260. Tsujimura, S., Y. Kamitaka, and K. Kano, *Diffusion-controlled oxygen reduction on multi-copper oxidase-adsorbed carbon aerogel electrodes without mediator*. Fuel Cells, 2007. **7**(6): p. 7.
261. Habrioux, A., et al., *Electrochemical characterization of adsorbed bilirubin oxidase on Vulcan XC 72R for the biocathode preparation in a glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell*. Electrochimica Acta, 2010. **55**: p. 5.
262. Flexer, V., et al., *Porous mediator-free enzyme carbonaceous electrodes obtained through integrative chemistry for biofuel cells*. Energy and Environmental Science, 2011. **4**(6): p. 10.
263. Flexer, V., et al., *A novel three-dimensional macrocellular carbonaceous biofuel cell*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**: p. 9.
264. Hanashi, T., et al., *Bioradio transmitter: a self-powered wireless glucose-sensing system*. Journal of Diabetes Science and Technology, 2011. **5**(5): p. 6.
265. Shim, J., G.-Y. Kim, and S.-H. Moon, *Covalent co-immobilization of glucose oxidase and ferrocenedicarboxylic acid for an enzymatic biofuel cell*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2011. **653**: p. 7.
266. Wen, D., et al., *A Membraneless Glucose/O<sub>2</sub> Biofuel Cell Based on Pd Aerogels*. Chemistry - A European Journal, 2014. **20**(15): p. 4380–4385.
267. So, K., et al., *Improvement of a direct electron transfer-type fructose/dioxygen biofuel cell with a substrate-modified biocathode*. Phys Chem Chem Phys, 2014. **16**(10): p. 4823–4829.
268. Tsujimura, S., et al., *Oxygen reduction reactions of the thermostable bilirubin oxidase from Bacillus pumilus on mesoporous carbon-cryogel electrodes*. Electrochimica Acta, 2014. **117**: p. 263–267.
269. Vivekananthan, J., et al., *Biofuel-Cell Cathodes Based on Bilirubin Oxidase Immobilized through Organic Linkers on 3D Hierarchically Structured Carbon Electrodes*. ChemElectroChem, 2014: p. 1–9.
270. Narváez Villarrubia, C.W., et al., *Practical electricity generation from a paper based biofuel cell powered by glucose in ubiquitous liquids*. Electrochemistry Communications, 2014. **45**: p. 44–47.
271. Xue, Q., et al., *Improved direct electrochemistry for proteins adsorbed on a UV/ozone-treated carbon nanofiber electrode*. Analytical sciences, 2013. **29**: p. 611–618.
272. Kilic, M.S., et al., *Development and operation of gold and cobalt oxide nanoparticles containing polypropylene based enzymatic fuel cell for renewable fuels*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. **61**: p. 500–505.
273. Filip, J., R. Monosik, and J. Tkac, *Poly(lactic acid)-based Nanocomposite for Construction of Efficient Bilirubin Oxidase -Based Biocathodes and Stable Biofuel Cells*. International Journal of ELECTROCHEMICAL SCIENCE, 2014. **9**: p. 2491–2506.
274. Filip, J. and J. Tkac, *Direct electron transfer of bilirubin oxidase on graphene and carbon black*. Journal of Biotechnology, 2014. **185**: p. S21–S22.
275. Banks, C.E. and R.G. Compton, *New electrodes for old: from carbon nanotubes to edge plane pyrolytic graphite*. Analyst, 2006. **131**: p. 7.
276. Gooding, J.J., *Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: a review on electrochemistry and applications for sensing*. Electrochimica Acta, 2005. **50**: p. 11.
277. Opallo, M. and R. Bilewicz, *Recent developments of nanostructured electrodes for bioelectrocatalysis of dioxygen reduction*. Advances in Physical Chemistry, 2011. **2011**: p. 21.
278. Cosnier, S., M. Holzinger, and A. Le Goff, *Recent Advances in Carbon Nanotube-Based Enzymatic Fuel Cells*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2014. **2**(45): p. 1–6.
279. Schubert, K., G. Goebel, and F. Lisdat, *Bilirubin oxidase bound to multi-walled carbon nanotube-modified gold*. Electrochimica Acta, 2009. **54**: p. 6.
280. Göbel, G., T. Dietz, and F. Lisdat, *Biosensor based on an oxygen reducing bilirubin oxidase electrode*. Procedia Chemistry, 2009. **1**: p. 4.
281. Göbel, G. and F. Lisdat, *Organic interlayers for oxygen reducing electrodes based on bilirubin oxidase and MWCNT modified gold*. Electrochemistry Communications, 2008. **10**(11): p. 4.
282. Tanne, C., G. Göbel, and F. Lisdat, *Development of a (PQQ)-GDH-anode based on MWCNT-modified gold and its application in glucose/O<sub>2</sub>-biofuel cell*. Biosensors & Bioelectronics, 2010. **26**(2): p. 6.

283. Yehezkeli, O., et al., *Integrated photosystem II-based photo-bioelectrochemical cells*. Nature Communications, 2012. **3**(742): p. 7.
284. Lim, J., et al., *Direct electron transfer in nanostructured sol-gel electrodes containing bilirubin oxidase*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2007. **9**: p. 6.
285. Strack, G., et al., *Power generation from a hybrid biological fuel cell in seawater*. BioresourceTechnology, 2013. **128**: p. 222-228.
286. Filip, J., et al., *Electrochemistry of bilirubin oxidase and its use in preparation of a low cost enzymatic biofuel cell based on a renewable composite binder chitosan*. Electrochimica Acta, 2013. **87**: p. 9.
287. Pankratov, D.V., et al., *A comparative study of biocathodes based on multiwall carbon nanotube buckypapers modified with three different multicopper oxidases*. Electroanalysis, 2013. **25**(5): p. 7.
288. Wu, X.E., et al., *Fabrication of flexible and disposable enzymatic biofuel cells*. Electrochimica Acta, 2013. **98**: p. 20–24.
289. Li, X., et al., *A miniature glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell with a high tolerance against ascorbic acid*. Fuel Cells, 2009. **09**(1): p. 7.
290. Zheng, W., et al., *Direct electrochemistry of multi-copper oxidases at carbon nanotubes noncovalently functionalized with cellulose derivatives*. Electroanalysis, 2006. **18**(6): p. 8.
291. Wu, X., et al., *A one-compartment fructose/air biological fuel cell based on direct electron transfer*. Biosensors & Bioelectronics, 2009. **25**: p. 6.
292. Ciaccafava, A., et al., *An innovative powerful and mediatorless H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> biofuel cell based on an outstanding bioanode*. Electrochemistry Communications, 2012. **23**: p. 4.
293. Zhang, L., et al., *Small-size biofuel cell on paper*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 5.
294. Zhang, L., M. Zhou, and S. Dong, *A self-powered acetaldehyde sensor based on biofuel cell*. Analytical Chemistry, 2012. **84**: p. 5.
295. Milton, R.D., et al., *Glucose oxidase progressively lowers bilirubin oxidase bioelectrocatalytic cathode performance in single-compartment glucose/oxygen biological fuel cells*. Electrochimica Acta, 2014. **104**: p. 59–64.
296. Milton, R.D., et al., *Bilirubin oxidase bioelectrocatalytic cathodes: the impact of hydrogen peroxide*. Chemical communications (Cambridge England), 2014. **50**(1): p. 94-6.
297. Ulyanova, Y., et al., *Effect of enzymatic orientation through the use of syringaldazine molecules on multiple multi-copper oxidase enzymes*. Phys Chem Chem Phys, 2014. **16**(26): p. 13367-75.
298. Korania, A. and A. Salimia, *Fabrication of High performance bioanode based on fruitful association of dendrimer and carbon nanotube used for design O<sub>2</sub>/glucose membrane-less biofuel cell with improved bilirubine oxidase biocathode*. Biosensors and Bioelectronics, 2013. **50**: p. 186–193.
299. Lopez, R.J., et al., *Improved Interfacial Electron Transfer in Modified Bilirubin Oxidase Biocathodes*. ChemElectroChem, 2014. **1**: p. 241-248.
300. Murata, K., et al., *Direct electrochemistry of bilirubin oxidase on three-dimensional gold nanoparticle electrodes and its application in a biofuel cell*. Energy and Environmental Science, 2009. **2**: p. 6.
301. Salaj-Kosla, U., et al., *Direct electron transfer of bilirubin oxidase (Myrothecium verrucaria) at an unmodified nanoporous gold electrode*. Electrochemistry Communications, 2012. **16**: p. 4.
302. Wang, X., et al., *Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **31**: p. 7.
303. Falk, M., et al., *Biofuel cell as a power source for electronic contact lenses*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **37**(1): p. 8.
304. Gutierrez-Sanchez, C., et al., *Bilirubin Oxidase-Based Nanobiocathode Working in Serum-Mimic Buffer for Implantable Biofuel Cell*. Electroanalysis, 2013. **25**: p. 1359-1362.
305. Kamińska, I., et al., *(Bio)electrocatalysis at tin-doped indium oxide nanoparticulate film decorated with gold*. Electrochimica Acta, 2013. **106**: p. 165–171.
306. Pita, M., et al., *Oxygen biosensor based on bilirubin oxidase immobilized on a nanostructured gold electrode*. Bioelectrochemistry, 2013. **94**: p. 69–74.

307. Pankratov, D.V., et al., *Impact of surface modification with gold nanoparticles on the bioelectrocatalytic parameters of immobilized bilirubin oxidase*. Acta Naturae., 2014. **6**(1): p. 102-106.
308. Gupta, G., et al., *Direct electron transfer catalyzed by bilirubin oxidase for air breathing gas-diffusion electrodes*. Electrochemistry Communications, 2011. **13**: p. 3.
309. Ciniciato, G.P.M.K., et al., *Development of paper based electrodes: from air-breathing to paintable enzymatic cathodes*. Electrochimica Acta, 2012. **82**: p. 6.
310. Haneda, K., et al., *Sheet-shaped biofuel cell constructed from enzyme-modified nanoengineering carbon fabric*. Electrochimica Acta, 2012. **82**: p. 4.
311. Miyake, T., et al., *Flexible, layered biofuel cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2013. **40**(1): p. 5.
312. Zloczewska, A. and M. Jönsson-Niedziolka, *Efficient air-breathing biocathodes for zinc/oxygen batteries*. Journal of Power Sources, 2013. **228**: p. 8.
313. Santoro, C., et al., *High Power Generation by a Membraneless Single Chamber Microbial Fuel Cell (SCMFC) Using Enzymatic Bilirubin Oxidase (BOx) Air-Breathing Cathode* Journal of The Electrochemical Society, 2013. **160**(10): p. H720-H726.
314. Santoro, C., *Bilirubin oxidase-based cathode for microbial fuel cell (MFC) applications: The effects of bacterial/pollutants' presence on enzyme stability* Electrochemical Society Interface, 2013. **22**(4): p. 89-90.
315. Babanova, S., et al., *Design of experiments and principal component analysis as approaches for enhancing performance of gas-diffusional air-breathing bilirubin oxidase cathode*. Journal of Power Sources 2014. **245** p. 389-397.
316. Garcia, S.O., et al., *Gas-Diffusion Cathodes Integrating Carbon Nanotube Modified-Toray Paper and Bilirubin Oxidase*. Journal of Electrochemical Society, 2014. **161**(9): p. H523-H528
317. Chen, M.Y., X.D. Chen, and X.E. Wu, *Design and Fabrication of a Silicone Rubber-based Mediatorless Bioelectrode for Oxygen Reduction*. Chemistry Letters, 2014. **43**(7): p. 1081-1083.
318. Shitanda, I., et al., *Flexible and high-performance paper-based biofuel cells using printed porous carbon electrodes*. Chem. Commun, 2013. **49**: p. 11110-11112.
319. Asano, I., et al., *Improved Performance of Gas-diffusion Biocathode for Oxygen Reduction*. Electrochemistry, 2012. **80**(5): p. 324-326.
320. Okuda-Shimazaki, J., et al., *Biofuel cell system employing thermostable glucose dehydrogenase*. Biotechnology Letters, 2008. **30**(10): p. 6.
321. Tsujimura, S., et al., *Bioelectrocatalysis-based dihydrogen/dioxygen fuel cell operating at physiological pH*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2001. **3**: p. 5.
322. Ikeda, T., et al., *A Bioelectrocatalysis Method for the Kinetic Measurement of Thermal Inactivation of a Redox Enzyme, Bilirubin Oxidase*. Analytical Science 2008. **24**(2): p. 237-241.
323. Ikeda, T., et al., *Measurements of Reversible and Irreversible Inactivation Processes of a Redox Enzyme, Bilirubin Oxidase, by Electrochemical Methods Based on Bioelectrocatalysis*. Analytical Science, 2009. **25**(11): p. 1283-128.
324. Katano, H., et al., *Application of poly[oxyethylene(dimethylimino)propyl(dimethylimino)ethylene] as enzyme stabilizer for bilirubin oxidase immobilized electrode*. Analytical science, 2009. **25**(9): p. 5.
325. Katano, H., et al., *Application of Polyammonium Cations to Enzyme-immobilized Electrode: Application as Enzyme Stabilizer for Bilirubin Oxidase*. Analytical Science, 2008. **24**(11): p. 1421-1424.
326. Kilic, M.S., S. Korkut, and B. Hazer, *Electrical Energy Generation from a Novel Polypropylene Grafted Polyethylene Glycol Based Enzymatic Fuel Cell*. Analytical Letters, 2014. **47**(6): p. 983-995.
327. Topcagic, S. and S. Minteer, Electrochimica. Acta., 2005. **52**: p. 2168-2172.
328. Tsujimura, S., et al., *Mediated bioelectrocatalytic O<sub>2</sub> reduction to water at highly positive electrode potentials near neutral pH*. Electrochemistry Communications, 2003. **5**: p. 138-141.
329. Habrioux, A., et al., *Concentric glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2008. **622**: p. 6.
330. Merle, G., et al., *Long-term activity of covalent grafted biocatalysts during intermittent use of a glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell*. Electrochimica Acta, 2009. **54**: p. 6.

331. Liu, C., et al., *Membraneless enzymatic biofuel cells based on graphene nanosheets*. Biosensors & Bioelectronics, 2010. **25**(7): p. 5.
332. Komaba, S., T. Mitsuhashi, and S. Shiraishi, *Optimization of Enzyme Anode and Cathode with Polyion Complex for the Application to Biofuel Cells*. Electrochemistry, 2008. **76**(8): p. 619-624
333. Handa, Y., et al., *Fabrication of Carbon-Felt-Based Multi-Enzyme Immobilized Anodes to Oxidize Sucrose for Biofuel Cells*. ChemPhysChem, 2014. **15**: p. 2145–2151.
334. Hussein, L., G. Urban, and M. Krüger, *Fabrication and characterization of buckypaper-based nanostructured electrodes as a novel material for biofuel cell applications*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **13**(13): p. 9.
335. Bunte, C., L. Hussein, and G.A. Urban, *Performance of non-compartmentalized enzymatic biofuel cell based on buckypaper cathode and ferrocene-containing redox polymer anode*. Journal of Power Sources, 2014. **247**: p. 579–586.
336. Szczupak, A., D. Kol-Kalman, and L. Alfonta, *A hybrid biocathode: surface display of O<sub>2</sub>-reducing enzymes for microbial fuel cell applications*. Chemical Communications, 2012. **48**: p. 3.
337. Trifonov, A., et al., *Enzyme-capped relay-functionalized mesoporous carbon nanoparticles: effective bioelectrocatalytic matrices for sensing and biofuel cell applications*. ACS Nano., 2013. **7**(12): p. 11358-68.
338. Holade, Y., et al., *Insights on Hybrid Glucose Biofuel Cells Based on Bilirubin Oxidase Cathode and Gold-Based Anode Nanomaterials*. ChemElectroChem, 2014: p. 1-13.
339. Nakagawa, T., et al., *Bilirubin Oxidase and [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> Modified Electrode Allowing Diffusion-controlled Reduction of O<sub>2</sub> to Water at pH 7.0*. Chemistry Letters, 2003. **32**(1): p. 54-55.
340. Nakagawa, T., et al., *Water-repellent-treated enzymatic electrode for passive air-breathing biocathodic reduction of oxygen*. Electrochemistry Communications, 2013. **36**: p. 46–49.
341. Fujita, S., et al., *A repeatedly refuelable mediated biofuel cell based on a hierarchical porous carbon electrode*. Scientific reports, 2014. **4**.
342. Kim, H.-H., Y. Zhang, and A. Heller, *Bilirubin oxidase label for an enzyme-linked affinity assay with O<sub>2</sub> as substrate in a neutral pH NaCl solution*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(8): p. 4.
343. Zhang, Y., et al., *Detection of ~10<sup>3</sup> copies of DNA by an electrochemical enzyme-amplified sandwich assay with ambient O<sub>2</sub> as the substrate*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(14): p. 5.
344. Mano, N. and A. Heller, *Detection of glucose at 2fM concentration*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(2): p. 4.
345. Shin, H., et al., *Stabilization of a bilirubin oxidase-wiring redox polymer by quaternization and characteristics of the resulting O<sub>2</sub> cathode*. Journal of the Electrochemical Society, 2009. **156**(6): p. 6.
346. Song, J., H. Shin, and C. Kang, *A carbon nanotube layered electrode for the construction of the wired bilirubin oxidase oxygen cathode*. Electroanalysis, 2011. **23**(12): p. 8.
347. Tsujimura, S., K. Kano, and E. Ikeda, *Glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell operating at physiological conditions*. Electrochemistry, 2002: p. 940-942.
348. Jenkins, P.A., et al., *Evaluation of performance and stability of biocatalytic redox films constructed with different copper oxygenases and osmium-based redox polymers*. Bioelectrochemistry, 2009. **76**(1-2): p. 7.
349. Boland, S., et al., *Biocatalytic fuel cells: a comparison of surface pre-treatments for anchoring biocatalytic redox films on electrode surfaces*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2009. **626**: p. 5.
350. Rengaraj, S., P. Kavanagh, and D. Leech, *A comparison of redox polymer and enzyme co-immobilization on carbon electrodes to provide membrane-less glucose/O<sub>2</sub> enzymatic fuel cells with improved power output and stability*. Biosensors & Bioelectronics, 2011. **30**(1): p. 6.
351. Scanlon, M.D., et al., *Characterization of nanoporous gold electrodes for bioelectrochemical applications*. Langmuir, 2012. **28**: p. 11.
352. Yan, Y.-M., et al., *An ethanol/O<sub>2</sub> biofuel cell based on an electropolymerized bilirubin oxidase/Pt nanoparticle bioelectrocatalytic O<sub>2</sub>-reduction cathode*. Advanced Materials, 2009. **21**: p. 5.

353. Zhou, M., et al., *Aptamer-controlled biofuel cells in logic systems and used as self-powered and intelligent logic aptasensors*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(7): p. 3.
354. Rasmussen, M., et al., *An implantable biofuel cell for a live insect*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(3): p. 3.
355. Suraniti, E., et al., *Heat and drying time modulate the O<sub>2</sub> reduction current of modified glassy carbon electrodes with bilirubin oxidases*. Bioelectrochemistry, 2012. **88**: p. 5.
356. Cadet, M., et al., *Design of a highly efficient O<sub>2</sub> cathode based on bilirubin oxidase from Magnaporthe oryzae*. Chemical Physical Chemistry, 2013: p. 4.
357. Choi, Y.-B., J.-M. Lee, and H.-H. Kim, *Synthesis of a New Cathode Redox Polymer for High Performance in Biofuel Cells*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2014. **35**(9): p. 2803.
358. Ishibashi, K., S. Tsujimura, and K. Kano, *Pentacyanoferrate and bilirubin oxidase-bound polymer for oxygen reduction bio-cathode*. Electrochemistry 2008. **78**(8): p. 594-596.
359. Little, S.J., et al., *A novel enzymatic bioelectrode system combining a redox hydrogel with a carbon NanoWeb*. Chemical communications (Cambridge England), 2011. **47**(31): p. 8886-8.
360. Shin, H. and C. Kang, *Enhanced performance of the wired-bilirubin oxidase oxygen cathode with incorporation of carboxylated single-walled carbon nanotubes*. Electrochimica Acta, 2014. **115**: p. 599–606.
361. MacAodha, D., et al., *Membraneless glucose/oxygen enzymatic fuel cells using redox hydrogel films containing carbon nanotubes*. Chemphyschem., 2013. **14**(10): p. 2302–2307.
362. Kang, C., H. Shin, and A. Heller, *On the stability of the "wired" bilirubin oxidase oxygen cathode in serum*. Bioelectrochemistry, 2006. **68**: p. 5.
363. Kang, C., et al., *Deactivation of bilirubin oxidase by a product of the reaction of urate and O<sub>2</sub>*. Bioelectrochemistry, 2004. **65**(1): p. 6.





## Chapitre 2 :

Etude des cathodes enzymatiques de  
*Bacillus pumilus* et *Magnaporthe oryzae*

---



## Sommaire

Introduction .....	104
1. Etudes préliminaires sur les nouvelles BODs .....	106
1.1. Identification et production de nouvelles BODs .....	106
1.1.1. Identification de <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	106
1.1.2. Identification de <i>Bacillus pumilus</i> .....	106
1.2. Caractérisation des nouvelles BODs .....	107
1.2.1. Etudes spectroscopiques .....	107
1.2.2. Propriétés biochimiques des nouvelles BODs .....	108
1.2.2.1. Etudes cinétiques .....	108
1.2.2.2. Décoloration du Rémozol R bleu brillant.....	109
1.3. Influence des paramètres physiologiques .....	109
1.3.1. Etudes de thermostabilité .....	109
1.3.2. Stabilité en fonction du pH .....	110
1.3.3. Effet de l'urée.....	110
1.3.4. Effet du chlore.....	111
1.4. Etudes électrochimiques .....	111
1.4.1. Etude électrochimique de <i>B. pumilus</i> .....	112
1.4.2. Etude électrochimique de <i>M. oryzae</i> .....	112
1.5. Conclusion intermédiaire.....	113
2. Etude comparative des BODs de <i>B. pumilus</i> et de <i>M. oryzae</i> .....	113
2.1. Comparaison des structures cristallines .....	113
2.2. Comparaison des caractéristiques des deux nouvelles BODs en électrochimie .....	114
2.2.1. Etude des potentiels de réduction de l'oxygène .....	115
2.2.1.1. Résultats expérimentaux .....	115
2.2.1.2. Hypothèses.....	117
2.2.2. Comparaison des stratégies d'immobilisation.....	118
2.2.2.1. Résultats expérimentaux .....	118
2.2.2.2. Analyses des résultats et hypothèses .....	119
2.2.3. Effet de la température .....	121
2.2.3.1. Résultats expérimentaux .....	121
2.2.3.2. Analyse des résultats et hypothèses .....	122
2.2.4. Effet du chlore et de la conductivité des tampons de mesure .....	123

2.2.4.1.	Résultats expérimentaux.....	123
2.2.4.2.	Analyse de l'effet du chlore sur <i>M. oryzae</i> .....	124
2.2.4.3.	Analyse de l'effet du chlore sur <i>B. pumilus</i> .....	127
2.2.4.4.	Analyse de l'effet du chlore sur les potentiels rédox.....	127
2.2.4.5.	Effet de la conductivité des tampons de mesure.....	130
2.2.5.	Effet de la concentration en phosphate de sodium dans l'hydrogel.....	131
2.2.5.1.	Résultats expérimentaux.....	132
2.2.5.2.	Analyses des résultats et hypothèses .....	135
2.3.	Conclusion intermédiaire .....	136
3.	Etude de l'effet de l'urate sur la BOD de <i>Bacillus pumilus</i> .....	137
3.1.	Introduction.....	137
3.2.	Effet de l'urate sur les BODs .....	138
3.2.1.	Résultats expérimentaux .....	140
3.2.1.1.	Etudes dans les conditions physiologiques.....	140
3.2.1.2.	Etudes dans le sérum .....	143
3.2.2.	Discussion .....	143
3.2.2.1.	Effet de la concentration en phosphate de sodium dans l'hydrogel .....	143
3.2.2.2.	Etude de l'augmentation de courant à l'ajout d'urate avec <i>B. pumilus</i> .....	146
3.2.2.2.1.	Etude de la réduction de l'urate par <i>B. pumilus</i> .....	147
3.2.2.2.2.	Identification du produit d'oxydation de l'urate.....	150
3.2.2.2.3.	Utilisation de l'urate comme médiateur de <i>B. Pumilus</i> .....	152
3.3.	Conclusion intermédiaire .....	155
4.	Elaboration d'électrodes tridimensionnelles poreuses avec <i>M. oryzae</i> .....	156
4.1.	Introduction.....	156
4.2.	Hypothèse de travail .....	156
4.3.	Synthèse de carbones poreux contenant des nanoparticules d'or .....	158
4.3.1.	Synthèse du matériau inorganique poreux Si-HIPE.....	158
4.3.2.	Synthèse de carbones poreux et de nanoparticules d'or à partir des Si-HIPE .....	159
4.4.	Caractérisation des matériaux .....	160
4.4.1.	Etude microscopique .....	160
4.4.2.	Analyse élémentaire .....	161
4.4.3.	Mesures de conductivité.....	162
4.5.	Mesures électrochimiques.....	163

4.5.1.	Mesures sur des électrodes séchées à 4 °C.....	163
4.5.1.1.	Etude de la réduction de l'oxygène .....	163
4.5.1.2.	Etude de la diffusion de l'oxygène dans les matériaux .....	165
4.5.1.3.	Traitement des données .....	166
4.5.2.	Mesures sur des électrodes séchées sous vide à 25 °C.....	170
4.5.2.1.	Etude de la réduction de l'oxygène .....	170
4.5.2.2.	Traitement des données .....	172
4.5.2.3.	Analyse des résultats et hypothèses .....	174
4.5.3.	Synthèse séquentielle des nano particules d'or .....	176
4.5.3.1.	Etude de la réduction de l'O <sub>2</sub> .....	176
4.5.3.2.	Etude de la diffusion de l'oxygène dans les matériaux .....	177
4.5.3.3.	Traitement des données .....	178
4.6.	Conclusion intermédiaire .....	180
	Conclusion.....	181
	Références bibliographiques du Chapitre II.....	183

## Introduction

Les BODs fongiques de *M. verrucaria* et *T. tsunodae* ont été largement employées pour l'élaboration de biocathodes enzymatiques. Ces deux enzymes ont été utilisées aussi bien immobilisées avec un polymère rédox dans un hydrogel, que directement connectées à la surface de l'électrode. Cependant, l'intérêt pour ces deux enzymes était principalement dû à leur disponibilité commerciale. Elles montrent en effet des limitations importantes en termes d'activité et de stabilité dans les conditions physiologiques : à 37 °C et pH 7,2 en présence de 140 mM NaCl.

Ces limitations ont été constatées notamment en TEM sur des cathodes à base de papier carbone modifiées avec un hydrogel rédox de BOD et de PAA-PVI-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>. La cathode réalisée avec *M. verrucaria* montrait une densité de courant de -5 mA.cm<sup>-2</sup> avec la réduction de l'O<sub>2</sub> commençant + 0,53 V vs. Ag/AgCl, mais elle perdait 10 % de courant par jour [1]. Quant à la cathode obtenue avec *T. tsunodae* elle ne perdait que 5 % de courant par jour, mais générait une densité de courant de seulement -3 mA.cm<sup>-2</sup> avec la réduction de l'O<sub>2</sub> commençant + 0,57 V vs. Ag/AgCl [2].

Ces contraintes ont motivé la recherche de BODs possédant des propriétés améliorées. Aussi, deux nouvelles BODs issues de *Magnaporthe oryzae* et de *Bacillus pumilus* ont été identifiées au CRPP. Quelques une de leurs caractéristiques ont été présentées dans le chapitre précédent.

Dans la suite du présent manuscrit nous nous attèlerons à une présentation et une étude plus approfondies de ces nouvelles BODs. Nous présenterons d'abord pour chacune de ces enzymes les résultats des travaux préliminaires d'identification et de production ainsi que leurs caractérisations biochimiques.

Puis, nous présenterons une étude comparative aussi bien du point de vue structural que du point de vue électrochimique. Les conditions primordiales pour l'élaboration d'une cathode enzymatique efficace sont une activité et une stabilité élevée à pH neutre, une faible sensibilité aux ions chlorures, et une bonne résistance aux élévations de température. Notre étude comparative s'est donc principalement focalisée sur ces différents aspects.

Enfin nous verrons comment chacune de ces enzymes a été utilisée pour l'élaboration de biocathodes efficaces pour la réduction d'O<sub>2</sub>. Une première étude avec la BOD de *Bacillus pumilus* a été consacrée à l'effet de l'urate qui est un constituant physiologique endommageant habituellement les cathodes à base de BODs [3]. La deuxième étude a été réalisée avec la BOD

de *Magnaporthe oryzae*. Nous avons utilisé cette enzyme pour analyser les performances de biocathodes à base de nouveaux matériaux carbonés poreux contenant des nanoparticules d'or.

## 1. Etudes préliminaires sur les nouvelles BODs

L'identification et la production des deux nouvelles BODs ainsi que les caractérisations biochimiques et les études électrochimiques préliminaires ont été réalisées au CRPP. Ces travaux ont été menés par les Docteurs Fabien Durand et Emmanuel Suraniti, l'ingénieur Sébastien Gounel et la doctorante Marine Cadet.

### 1.1. Identification et production de nouvelles BODs

#### 1.1.1. Identification de *Magnaporthe oryzae*

Initialement l'équipe du CRPP cherchait à identifier une BOD présentant une forte analogie de séquence avec *M. verrucaria* mais possédant une meilleure stabilité et une activité élevée. Ces travaux ont permis d'identifier la BOD de *Magnaporthe oryzae*.

La *Magnaporthe oryzae* est issue d'un champignon filamenteux responsable de la pyriculariose du riz [4]. Cette enzyme possède 58 % d'analogie de séquence avec *M. verrucaria* et assure plus efficacement la réduction de l'O<sub>2</sub> en eau [5].

#### 1.1.2. Identification de *Bacillus pumilus*

En parallèle Reiss et collaborateurs ont identifié la CotA de *Bacillus pumilus*. Cette enzyme est issue d'une bactérie aérobie très répandue dans la nature (sols, plantes, roches...) [6]. *Bacillus pumilus* est capable de former des endospores bactériennes qui permettent à la bactérie dans un état de dormance de survivre à des conditions environnementales extrêmes. Les spores des *Bacillus* sont connues pour être très résistantes à des conditions défavorables telles que les fortes températures, l'absence de nutriments, la dessiccation extrême, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les UV, les rayons gamma, ou la désinfection chimique [7-8].

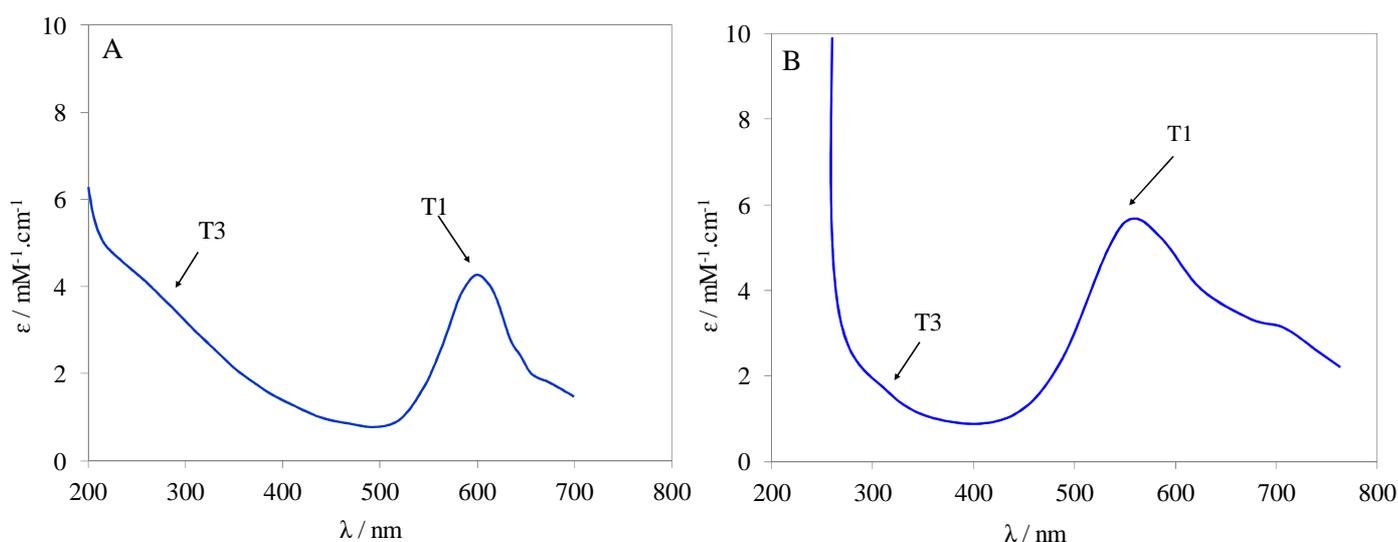
*Bacillus pumilus* possède 67 % d'analogie de séquence avec la CotA de *Bacillus subtilis*. Les travaux de Reiss et collaborateurs ont montré que *Bacillus pumilus* pouvait être utilisée en tant que biocatalyseur. Cette enzyme possède en effet une grande stabilité thermique, un pH optimal dans une gamme allant du neutre au basique et une large variété de substrats [9]. Cependant, les études de spectroscopie et d'oxydation de la bilirubine n'ont pas été réalisées, *B. pumilus* a donc été initialement classée comme une laccase.

## 1.2. Caractérisation des nouvelles BODs

La BOD de *B. pumilus* a été surexprimée dans *Escherichia coli*. Les études en spectrométrie de masse et la migration électrophorétique sur gel de SDS ont montré un poids moléculaire d'environ 60 kDa. La BOD de *M. oryzae* a été exprimée dans *Pichia pastoris*. La production dans cette levure permet d'obtenir facilement de grandes quantités d'enzyme. La migration de *M. oryzae* sur gel de SDS a montré un poids moléculaire d'environ 64 kDa.

### 1.2.1. Etudes spectroscopiques

Les enzymes purifiées selon un protocole précis [10] ont la couleur bleu profond spécifique aux oxydases multi cuivre. Leur appartenance à cette famille a été confirmée par la présence sur les spectres UV-visible (Figure II.1.1) des bandes caractéristiques à 600 nm et 300 nm, ainsi que par les spectres de résonance Raman et EPR [11-12] (Chapitre I Figures I.3.3 à Figure I.3.5).



**Figure II.1.1.** Spectres UV-visible de *B. pumilus* (A) et de *M. oryzae* (B). Mesures avec 50 nM de BOD dans du tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 4 à 37 °C [11-12].

## 1.2.2. Propriétés biochimiques des nouvelles BODs

### 1.2.2.1. Etudes cinétiques

Pour chaque BOD l'activité enzymatique a été étudiée vis-à-vis des substrats usuels permettant de caractériser les laccases (ABTS, SGZ et 2,6 DMP) à leur pH optimal à 37 °C, et également vis-à-vis de la bilirubine. Pour chaque substrat le pH optimal a été déterminé dans du tampon citrate-phosphate McIlvaine à 0,1 M en faisant varier le pH de 2,6 à 7,5 ou dans du tampon Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 50 mM pour les pH supérieurs à 7,5.

L'activité enzymatique a été déterminée en suivant l'oxydation de chaque substrat à sa longueur d'onde caractéristique par spectrophotométrie UV-visible. Les paramètres cinétiques  $k_{cat}$  et  $K_M$  ont été déterminés par ajustement des données obtenues avec le modèle de Michaelis-Menten simple par régression non linéaire en fonction de l'équation II.1.1:

$$V_{Max} = k_{cat} \times [BOD] \quad (\text{Equation II.1.1})$$

Pour chaque substrat les paramètres cinétiques  $k_{cat}$  et  $K_M$  déterminés pour *B. pumilus* et *M. oryzae* sont reportés au tableau II.1.1.

	ABTS				SGZ				2,6-DMP			
	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$	pH	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$	pH	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$	pH
<i>B. pumilus</i>	31,7	391,3	12	3	45	116	2,6	6,2	822	57	0,07	6,8
<i>M. oryzae</i>	429	664	1,5	4	26	14	0,5	7	nd	nd	nd	nd
	Bilirubine conjuguée				Bilirubine non conjuguée							
	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$	pH	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$	pH				
<i>B. pumilus</i>	35	67	1	4,8	22	70	3	7,2				
<i>M. oryzae</i>	18	29	1,6	3,6	nd	nd	nd	nd				

**Tableau II.1.1.** Comparaison des paramètres cinétiques de *B. pumilus* [11] et *M. oryzae* [12].

Au vu de son activité catalytique vis-à-vis des deux formes de bilirubines, *B. pumilus* a pu être reclassée comme une bilirubine oxydase.

#### **1.2.2.2. Décoloration du Rémozol R bleu brillant**

Les BODs présentent un intérêt industriel dans la mesure où elles sont capables de décolorer divers colorants synthétiques. Cela a été démontré notamment pour *B. subtilis* et *M. verrucaria* [13-15]. Aussi, l'activité de *M. oryzae* et de *B. pumilus* sur le Rémozol R bleu brillant (RBBR) a été étudiée en présence et en l'absence d'ABTS.

Ces analyses ont montré pour les deux enzymes une décoloration lente en l'absence de médiateur. Par contre en présence de 10  $\mu\text{M}$  d'ABTS, *M. oryzae* décolore 80  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de RBBR avec plus de 95 % d'efficacité après 20 min dans du tampon citrate-phosphate McIlvaine à 0,1 M à 37 °C et pH 7 [12]. Pour *B. pumilus* la décoloration de la même quantité de RBBR avec la même quantité d'ABTS est un peu plus lente, avec 95 % d'efficacité après 300 min dans du tampon phosphate de potassium à 37 °C pH 6 [16].

### **1.3. Influence des paramètres physiologiques**

#### **1.3.1. Etudes de thermostabilité**

L'utilisation de cathodes enzymatiques peut également être envisagée dans des piles à combustible nécessitant des hautes températures de fonctionnement. De ce fait nous avons étudié l'effet de la température sur *B. pumilus* et *M. oryzae*.

##### **✓ Effet de la température sur *B. pumilus***

Pour évaluer en solution la désactivation thermique de *B. pumilus*, l'activité de l'enzyme par rapport à l'ABTS a été mesurée après pré-incubation à 37 °C et 80 °C. Aucune perte d'activité n'a été observée après une pré-incubation à 37 °C pendant 300 min à pH 7. À 80 °C l'activité de *B. pumilus* a baissé de moins de 50 % au bout de 90 min [11].

✓ **Effet de la température sur *M. oryzae***

L'étude de l'activité de *M. oryzae* par rapport à l'ABTS sur une gamme de 15 °C à 80 °C a montré un maximum d'activité à 60 °C. La désactivation thermique a été étudiée par pré-incubation de l'enzyme à 37 °C et 60 °C suivie par des mesures d'activité en présence de bilirubine conjuguée. Le temps de demi-vie pour la désactivation est d'environ 70 minutes à 60 °C et de plus de 300 min à 37 °C [12]. Même si *M. oryzae* est la plus thermostable des BODs fongiques, elle l'est moins que *B. pumilus*.

**1.3.2. Stabilité en fonction du pH**

La dépendance de la stabilité des enzymes par rapport au pH a été étudiée sur une gamme de 3 à 9. L'activité résiduelle de l'enzyme en présence de 1 mM d'ABTS a été mesurée à 4 °C dans du tampon phosphate-citrate 0,1 M à pH 3 pour *B. pumilus* et à 37 °C dans du tampon phosphate-citrate 0,1 M à pH 4 pour *M. oryzae*.

Après 24 heures *B. pumilus* conserve son activité quel que soit le pH [17]. Après 24 heures *M. oryzae* conserve son activité pour les pH allant de 4 à 9, mais perd 40 % d'activité à pH 3 [12].

**1.3.3. Effet de l'urée**

L'urée est utilisée comme agent de dénaturation chimique dans l'étude du repliement et de la stabilité des protéines. L'étude de l'influence de l'urée sur l'activité enzymatique de *B. pumilus* et de *M. oryzae* a été réalisée avec 1 mM ABTS à 25 °C et 37 °C dans du tampon phosphate-citrate à 0,1 M à pH 3 pour *M. oryzae* et pH 4 pour *B. pumilus*. Les analyses ont été réalisées pour des concentrations croissantes d'urée de 0 M à 6 M.

✓ **Effet de l'urée sur *B. pumilus***

A 25 °C il a été observé une augmentation de l'activité de *B. pumilus* avec des concentrations d'urée croissantes jusqu'à 30 % en présence de 3 M d'urée. Par la suite, l'activité diminue de 25 % en présence de 6 M d'urée. Par contre à 37 °C, l'activité est stable jusqu'à 2,5 M d'urée puis diminue de 50 % en présence de 5 M d'urée [17].

✓ **Effet de l'urée sur *M. oryzae***

Pour *M. oryzae* que ce soit à 37 °C ou à 25 °C, l'augmentation de la concentration d'urée entraîne une baisse de l'activité de façon continue de 80 % en présence de 5 M d'urée [12]. La BOD de *M. oryzae* est donc plus sensible à l'urée que celle de *B. pumilus*.

**1.3.4. Effet du chlore**

Les anions halogénures sont capables d'inhiber l'activité des laccases en se coordonnant aux cuivres. Or le sang contient 0,14 M de chlorure aussi nous avons étudié l'effet de cet anion sur nos BODs [1, 18].

✓ **Effet du chlore sur *B. pumilus***

La tolérance de *B. pumilus* au chlore a été étudiée à 37 °C dans du tampon citrate-phosphate 50 mM à pH 6,2 en présence de 0,05 mM de SGZ. L'étude a été réalisée pour des concentrations de NaCl allant de 0 mM à 1000 mM.

Pour des concentrations de NaCl allant jusqu'à 100 mM, la BOD de *B. pumilus* a montré une tolérance élevée au chlore. A partir de 300 mM de NaCl on observe une perte d'activité de moins de 20 %. Avec les concentrations de NaCl croissantes la baisse se poursuit jusqu'à 1000 mM où l'enzyme perd près de 60 % d'activité [11].

✓ **Effet du chlore sur *M. oryzae***

La dépendance de l'activité enzymatique avec la concentration de NaCl a été mesurée pour *M. oryzae* à 37 °C dans du tampon citrate-phosphate 0,1 M à pH 7 en présence de 0,1 mM de SGZ. A 150 mM de NaCl l'activité enzymatique a diminué de 60 % environ [12]. Ce qui montre une moins bonne tolérance au chlore pour *M. oryzae* par rapport à *B. pumilus*.

**1.4. Etudes électrochimiques**

Les études électrochimiques préliminaires ont été effectuées en TEM. Elles ont permis de déterminer la composition optimale des hydrogels réalisés avec les deux nouvelles BODs. Les hydrogels sont constitués de 62,1 %m de PAA-PVI-[Os(4,4V-dichloro-2,2-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> à 10 mg.ml<sup>-1</sup>, de 30,5 %m de BOD à 5 mg.ml<sup>-1</sup> et de 7,4 %m de PEGDGE à 2 mg.ml<sup>-1</sup> pour un

taux de recouvrement de  $108 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Les mesures électrochimiques ont été réalisées dans du tampon phosphate de sodium 100 mM sans chlore à pH 7,2 à 37 °C.

#### 1.4.1. Etude électrochimique de *B. pumilus*

Les conditions de préparation de l'hydrogel de *B. pumilus* ont été étudiées. Ces travaux ce sont intéressés en particulier à l'effet de la température et du temps de séchage de l'hydrogel sur les courants de réduction de l'O<sub>2</sub>.

La structure de l'hydrogel rédox évolue au cours du temps, devenant de plus en plus dense et conductrice. A 4 °C, le courant catalytique augmente avec le temps de séchage en raison de la cinétique de formation lente de l'hydrogel. Par contre à 25 °C, le courant catalytique est moins dépendant du temps de séchage. Après 18 heures de séchage à 4 °C on retrouve un courant similaire à celui obtenu après seulement 2 heures de séchage à 25 °C. L'hydrogel de *B. pumilus* est donc déjà structurellement formé à plus haute température sur un laps de temps plus court. Ainsi, les conditions de séchage optimales retenues par la suite pour les expérimentations avec *B. pumilus* sont de 4 heures à 25 °C [19].

La densité de courant maximale obtenue pour *B. pumilus* était de  $-0,64 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$  avec la réduction de l'O<sub>2</sub> commençant à  $\sim 0,42 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  [11]. La stabilité de *B. pumilus* a été évaluée par chronoampérométrie avec les électrodes maintenues à 0,1 V vs. Ag/AgCl. Après 50 minutes de fonctionnement en continu la densité de courant a diminuée de  $\sim 2 \%$  [11].

#### 1.4.2. Etude électrochimique de *M. oryzae*

L'étude des conditions de préparation des électrodes de *M. oryzae* a mis en évidence un séchage optimal à 4 °C pendant 18 heures. De plus l'influence de la concentration en osmium du polymère rédox a été étudiée.

Ces analyses ont montré que l'augmentation de la concentration en centres rédox permet d'améliorer le taux de transfert électronique et donc la densité de courant, il en est de même pour *B. pumilus*. Une densité de courant maximale de  $-1,37 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$  a pu être obtenue pour *M. oryzae* avec la réduction de l'O<sub>2</sub> commençant à  $\sim 0,48 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  [5].

### 1.5. Conclusion intermédiaire

Les deux nouvelles BODs de *M. oryzae* et de *B. pumilus* ont été identifiées et les analyses biochimiques réalisées nous ont permis de les caractériser. Les études préliminaires ont montré en solution une grande stabilité thermique pour *B. pumilus* ainsi qu'une tolérance élevée au chlore et à l'urée. Bien que *M. oryzae* soit la plus thermostable des BODs fongiques, elle ne l'est pas autant que *B. pumilus*. Elle est aussi plus sensible au chlore et à l'urée.

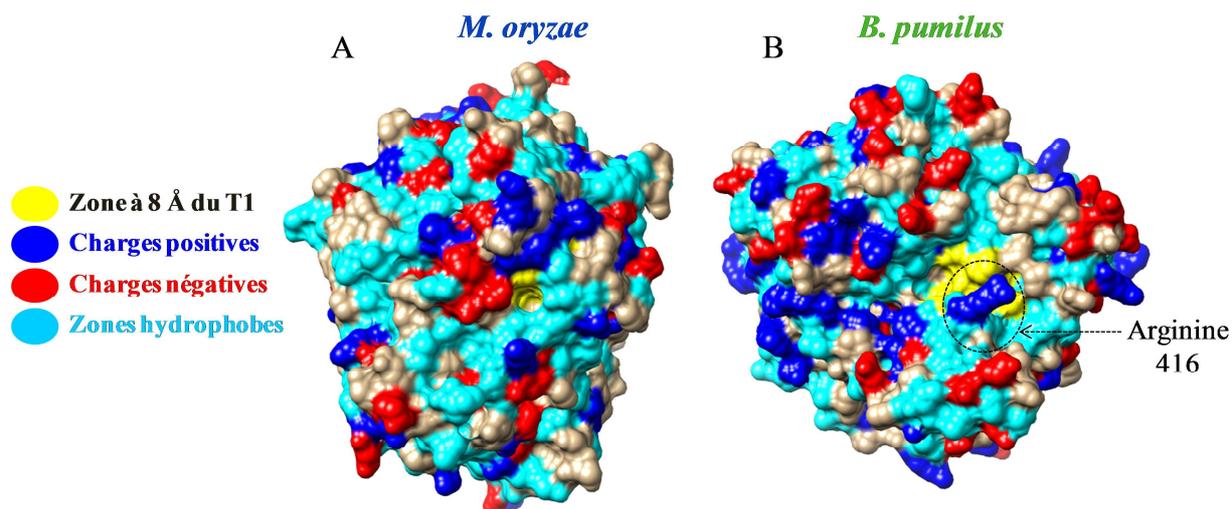
Les études électrochimiques préliminaires ont été réalisées en transfert électronique médié avec un polymère rédox, dans le tampon phosphate 100 mM sans chlore à pH 7,2. Ces études ont montré que *M. oryzae* commence à réduire l'O<sub>2</sub> à un potentiel élevé de ~ 0,48 V vs. Ag/AgCl avec une densité de courant de -1,37 mA.cm<sup>-2</sup>. Quant à *B. pumilus* elle commence à réduire l'O<sub>2</sub> à un potentiel de ~ 0,42 V vs. Ag/AgCl et fournit un courant plus faible (-0,64 mA.cm<sup>-2</sup>).

Au cours de nos travaux de thèse nous avons réalisé des études électrochimiques plus poussées de ces deux enzymes. Dans la deuxième partie de ce chapitre nous proposons une étude comparative des différentes caractéristiques de *B. pumilus* et *M. oryzae* observées en électrochimie.

## 2. Etude comparative des BODs de *B. pumilus* et de *M. oryzae*

### 2.1. Comparaison des structures cristallines

La BOD de *B. pumilus* n'a pour le moment pas pu être cristallisée. Néanmoins, grâce à ses 67 % d'analogie de séquence avec la CotA de *Bacillus subtilis* la structure de *B. pumilus* a pu être modélisée et comparée à celle de *M. oryzae* (Figure II.2.1).



**Figure II.2.1.** Comparaison des structures cristallines de *M. oryzae* code PDB 2L9Y (A) et de *B. pumilus* (B) obtenues sur Chimera, avec les zones chargées positivement (bleu foncé), négativement (rouge), les zones hydrophobes (bleu ciel) et la zone à 8 Å autour du T1 (jaune).

En comparant les structures des deux enzymes nous constatons que *B. pumilus* (Figure II.2.1.B) a une proportion plus importante de zones hydrophobes autour de son site actif, représenté ici par la zone jaune située à 8 Å du cuivre T1. Le site actif de *M. oryzae* est quant à lui entouré de plus de charges négatives et positives que de résidus hydrophobes (Figure II.2.1.A).

Nous pouvons également constater que le site actif de *M. oryzae* est plus enfoui dans la protéine, alors que celui de *B. pumilus* est plus exposé. De plus, nous pouvons noter à l'entrée du site actif de *B. pumilus* la présence en position 416 d'un résidu arginine chargé positivement.

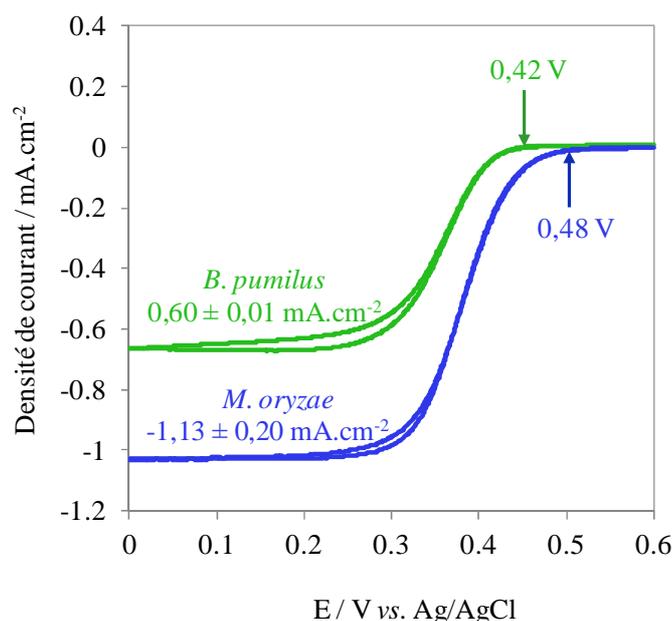
## 2.2. Comparaison des caractéristiques des deux nouvelles BODs en électrochimie

Nous avons modifié des électrodes de carbone vitreux de 5 cm avec les hydrogels rédox de *B. pumilus* et de *M. oryzae* à leurs ratios optimums. Le taux de recouvrement et les densités de courant sont exprimés par rapport à la surface géométrique de l'électrode.

## 2.2.1. Etude des potentiels de réduction de l'oxygène

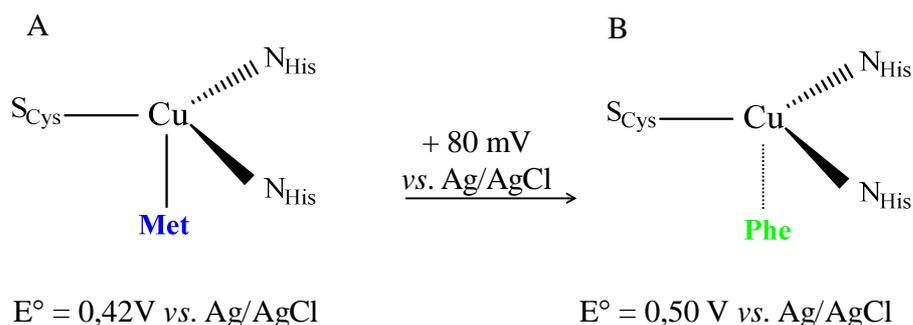
### 2.2.1.1. Résultats expérimentaux

Les études préliminaires réalisées dans le tampon phosphate de sodium 100 mM sans chlore à pH 7,2 ont mis en évidence une meilleure activité catalytique pour *M. oryzae* (Figure II.2.2 courbe bleue). De plus, cette enzyme commence à réduire l'O<sub>2</sub> à un potentiel plus oxydant que *B. pumilus* (Figure II.2.2 courbe verte).



**Figure II.2.2.** Comparaison des CVs à 5 mV.s<sup>-1</sup> des électrodes de carbone vitreux de 5 cm modifiées avec les hydrogels de *B. pumilus* (vert) et de *M. oryzae* (bleu) à 62,1 %m de PAA-PVI-[Os(4,4V-dichloro-2,2-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> 30,5 %m de BOD et 7,4 %m de PEGDGE pour un taux de recouvrement de 108 µg.cm<sup>-2</sup>. Mesures dans le tampon phosphate de sodium 100 mM sans chlore pH 7,2 à 37 °C sous 1 atm O<sub>2</sub>. Rotation des électrodes à 500 tr.min<sup>-1</sup>, densités de courant sont mesurées à +0,1 V vs. Ag/AgCl.

Nous avons souligné dans le chapitre précédent l'importance des ligands de coordination du cuivre T1 sur le potentiel rédox de l'enzyme. Effectivement le type de ligand, la nature de la coordination, ou encore l'environnement autour du T1 peuvent avoir une influence sur le potentiel de l'enzyme et donc sur le potentiel de début de réduction de l'O<sub>2</sub> (Figure II.2.3).



**Figure II.2.3.** Effet du ligand axial du cuivre T1 sur les potentiels de début de réduction de l'O<sub>2</sub> des hydrogels de *B. pumilus* (A) et de *T. tsunodae* (B). Potentiels mesurés sur les CVs à 5 mV.s<sup>-1</sup> dans le tampon phosphate 100 mM à pH 7,2 sans chlore.

Chez *B. pumilus* le ligand axial du T1 est une méthionine faiblement coordonnée (Figure II.2.3.A trait plein). Par contre la présence chez *T. tsunodae* d'une phénylalanine non coordonnée (Figure II.2.3.B trait en pointillé), lui confère un potentiel rédox supérieur à celui de *B. pumilus* d'environ 80 mV vs. Ag/AgCl.

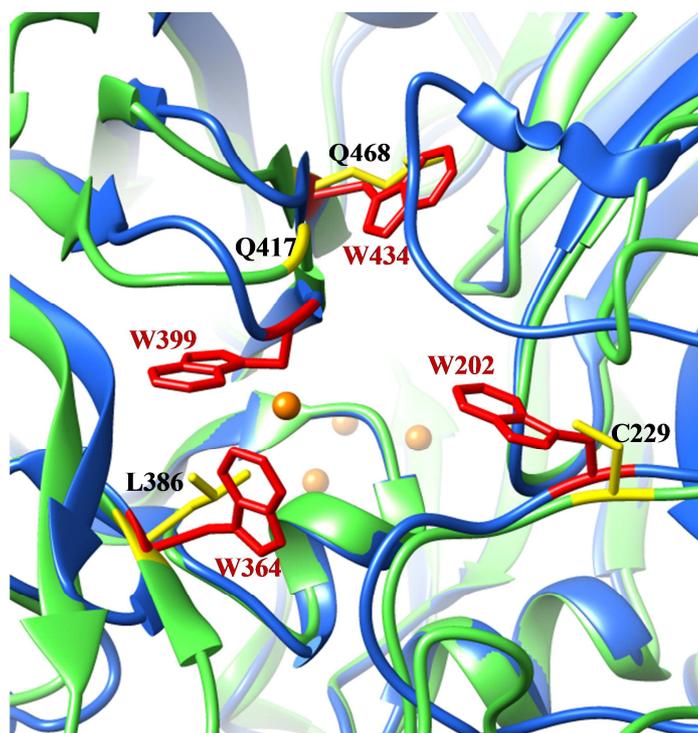
La phénylalanine est acide aminé hydrophobe alors que la méthionine est hydrophile (Chapitre I figure I.2.2). Diverses études sur les protéines rédox métalliques ont permis de constater que les enzymes dont le cuivre T1 possède un ligand axial hydrophobe ont un potentiel élevé. Les récents travaux de Nicholas Marshall sur les cuprédoxines ont d'ailleurs mis en évidence l'existence d'une dépendance linéaire du potentiel rédox avec l'hydrophobicité du ligand axial et donc l'accessibilité du solvant [20-21]. On suppose qu'en présence de solvant donc d'eau, le cuivre T1 interagit avec l'atome d'oxygène des molécules d'eau *via* des liaisons faibles ce qui stabilise la forme Cu<sup>2+</sup>. Or la stabilisation préférentielle de la forme oxydée d'un couple redox entraîne une diminution du pouvoir oxydant et donc une baisse du potentiel rédox du couple [22]. Ainsi, un environnement hydrophobe stabilise préférentiellement l'état d'oxydation Cu<sup>+</sup> ce qui augmente le potentiel du couple Cu<sup>2+</sup>/Cu<sup>+</sup> [23-24].

Cependant *B. pumilus* et *M. oryzae* possèdent toutes deux une méthionine en axial du T1, mais ne réduisent pourtant pas l'oxygène au même potentiel. Ce constat nous a poussé à considérer la totalité de la structure du site actif de l'enzyme et non plus seulement le ligand axial du T1.

### 2.2.1.2. Hypothèses

Nous avons observé sur la Figure II.2.1 que le site actif de *M. oryzae* est plus enfoui dans la protéine. Une étude plus poussée des structures cristallines nous a permis de constater que le cuivre T1 de *M. oryzae*, contrairement à celui de *B. pumilus*, est entouré de quatre tryptophanes.

Nous avons superposé les structures des sites actifs de *B. pumilus* et *M. oryzae* (Figure II.2.4). Nous avons comparé les quatre tryptophanes de *M. oryzae* (rouge) avec les acides aminés retrouvés aux positions équivalentes chez *B. pumilus* (jaune).



**Figure II.2.4.** Superposition des structures cristallines des sites actifs de *B. pumilus* (vert) et *M. oryzae* (bleu). Les quatre tryptophanes (W) sont représentés en rouge, les acides aminés équivalents chez *B. pumilus* en jaune (Q : Glutamine, L : Leucine, C : Cystéine).

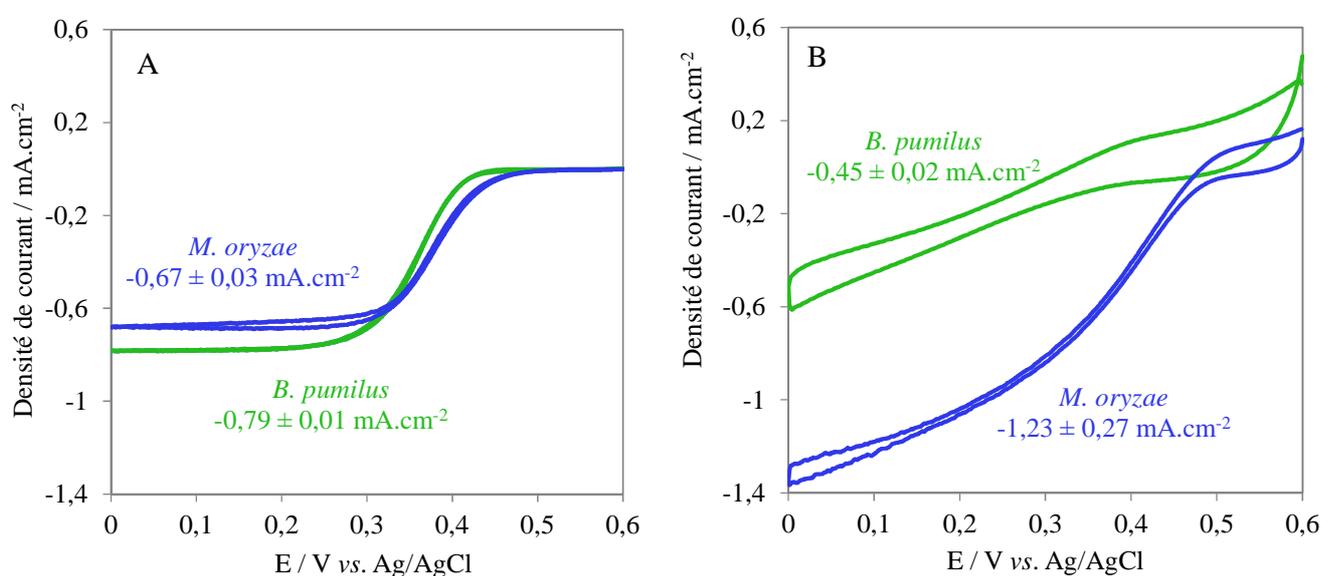
Nous pouvons constater en figure II.2.4 que les quatre tryptophanes de *M. oryzae* sont remplacés chez *B. pumilus* par une leucine hydrophobe, ainsi que par deux glutamines et une cystéine hydrophiles. Aussi, la localisation plus profonde du site actif et la présence de ces quatre tryptophanes inexistantes chez *B. pumilus* confèrent une plus grande hydrophobicité autour du cuivre T1 de *M. oryzae*. L'accessibilité réduite du solvant au site actif de *M. oryzae* pourrait donc être à l'origine de son potentiel rédox plus élevé.

## 2.2.2. Comparaison des stratégies d'immobilisation

Nous avons étudié le comportement des deux enzymes en fonction de la stratégie d'immobilisation sur l'électrode. Nous avons comparé l'immobilisation en TEM sur du carbone vitreux et en TED sur des électrodes poreuses de cryogel de carbone.

### 2.2.2.1. Résultats expérimentaux

Nous avons comparé les stratégies d'immobilisation des deux enzymes dans du tampon phosphate salin (PBS) à 20 mM phosphate, 140 mM NaCl et pH 7,2 (Figure II.2.5).



**Figure II.2.5.** CVs à  $5 \text{ mV.s}^{-1}$  des électrodes modifiées avec *B. pumilus* (vert) et *M. oryzae* (bleu) immobilisées en TEM dans un hydrogel rédox (A) et en TED sur cryogel de carbone (B), mesures dans le PBS. Autres conditions identiques à la figure II.2.2.

Nous avons comparé les densités de courant par rapport à la surface géométrique des électrodes. Nous pouvons constater que *B. pumilus* (courbe verte) a une meilleure densité de courant lorsque l'enzyme est immobilisée dans un hydrogel redox (Figure II.2.5.A). A l'inverse *M. oryzae* (courbe bleue) augmente sa densité de courant lorsque l'enzyme est directement immobilisée sur l'électrode sans médiateur (Figure II.2.5.B).

Nous pouvons également noter que les valeurs des courants de réduction de l'O<sub>2</sub> diffèrent en fonction du tampon de mesure. En comparant en effet les valeurs de courant dans le tampon phosphate de sodium 100 mM sans chlore (Figure II.2.2) nous observons dans le PBS (Figure II.2.5) une augmentation du courant de *B. pumilus* et une baisse du courant de *M. oryzae*. Ce comportement est *a priori* lié à la présence du chlore dans le PBS, aussi l'effet du chlore sur nos BODs sera étudié un peu plus loin dans la suite de ce chapitre.

#### 2.2.2.2. Analyses des résultats et hypothèses

##### ✓ Hypothèses

La comparaison des structures cristallines des deux enzymes sur la Figure II.2.1 montre que le site actif de *B. pumilus* est entouré en majorité de zones hydrophobes. De plus, *B. pumilus* possède à l'entrée du site actif un résidu arginine en position 416. Ces divers paramètres pourraient influencer l'interaction polymère-enzyme dans le cas du transfert médié, et l'interaction enzyme-électrode dans le cas du transfert direct.

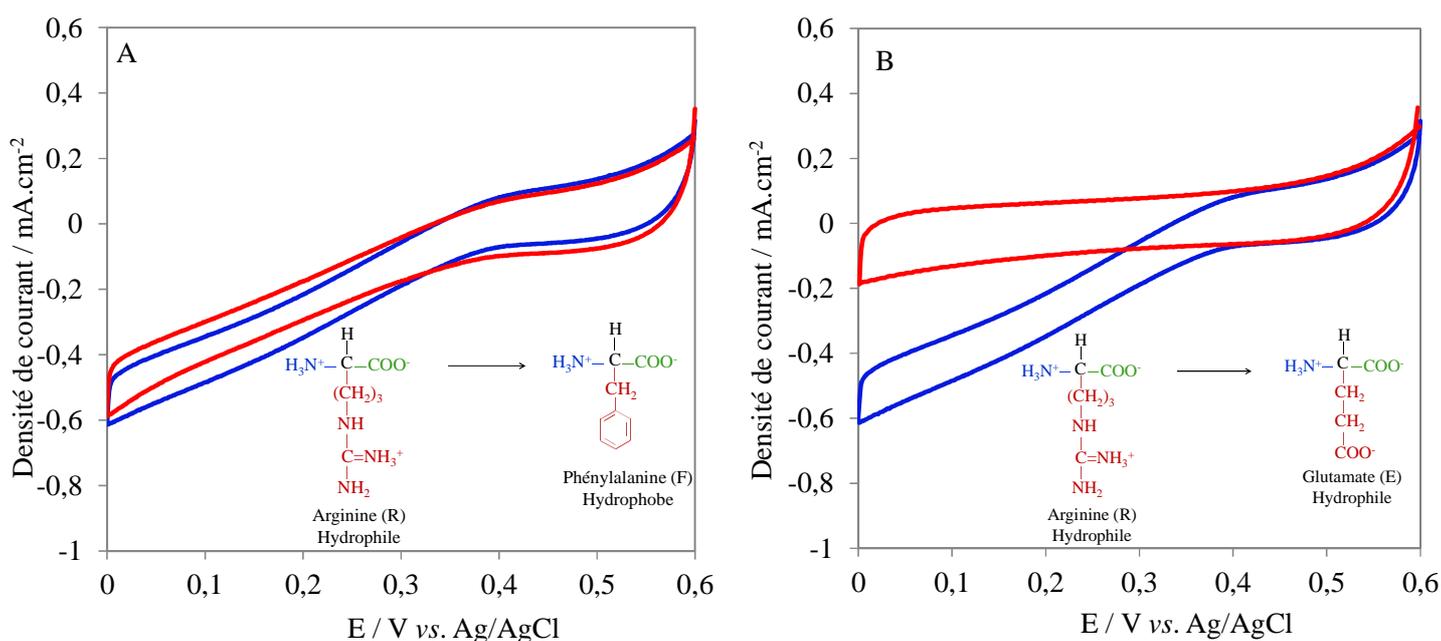
Quelle que soit la stratégie d'immobilisation utilisée les électrodes sont préalablement traitées au plasma O<sub>2</sub>. Ce traitement permet de nettoyer la surface mais également d'accroître son caractère hydrophile. Du fait de son hydrophobicité plus importante nous pouvons supposer que *B. pumilus* est moins efficacement immobilisée à la surface d'une électrode hydrophile. En outre, le résidu arginine pourrait être à l'origine d'une gêne stérique et/ou provoquer des interactions différentes, ce qui ne faciliterait pas le transfert direct d'électrons. Ces caractéristiques pourraient donc expliquer que l'immobilisation de *B. pumilus* directement sur l'électrode soit moins efficace qu'en présence de médiateur.

Au vu du meilleur courant obtenu en TED nous supposons que *M. oryzae* s'oriente mieux sur l'électrode sans médiateur. Cela pourrait s'expliquer par le fait que cette enzyme possède une proportion moins importante de zones hydrophobes autour du site actif. De plus elle ne présente aucun résidu susceptible d'introduire une gêne stérique à l'entrée du site actif, bien que celui-ci soit plus enfoui dans la protéine que celui de *B. pumilus*.

### ✓ Vérification des hypothèses

Pour vérifier nos hypothèses nous avons réalisé des tests sur deux mutants de *B. pumilus*, dans lesquels l'arginine a été remplacé par un glutamate (mutant R416E) et par une phénylalanine (mutant R416F). Nous avons supposé que l'introduction d'une chaîne latérale plus courte permettrait de réduire l'encombrement stérique à l'entrée du site actif et d'améliorer les performances en TED.

L'analyse des séquences d'acides aminés sur les deux mutants a montré que les mutations avaient été réalisées avec succès. Les tests d'activité en solution en présence d'ABTS ont montré pour le mutant R416F une activité spécifique de  $511 \pm 4 \text{ U.mg}^{-1}$  et pour le mutant R416E une activité spécifique de  $352 \pm 4 \text{ U.mg}^{-1}$ . Les mutants ont ensuite été étudiés en électrochimie en TED sur des électrodes de cryogel de carbone préalablement hydrophylisées au plasma  $\text{O}_2$  (Figure II.2.6).



**Figure II.2.6.** Comparaison des CVs de réduction de l' $\text{O}_2$  des électrodes modifiées avec *B. pumilus* sauvage (bleu) et les mutants (rouge) R416F (A) et R416E (B) immobilisées en TED sur cryogel de carbone, mesures dans le PBS. Autres conditions identiques à la figure II.2.2.

Bien que les mutations soient effectives et les enzymes actives en solution, nous n'obtenons pas les résultats escomptés en électrochimie. Le mutant R416F (Figure II.2.6 A courbe rouge)

donne un courant et un potentiel de début de réduction identiques à ceux de l'enzyme sauvage (Figure II.2.6 A courbe bleue). Toutefois nous constatons que l'allure du CV est un peu moins sigmoïdale que celle de l'enzyme sauvage. La phénylalanine étant plus hydrophobe nous pouvons supposer que cette hydrophobicité accrue à l'entrée du site actif ne facilite pas l'orientation optimale des enzymes sur des électrodes hydrophiles, ce qui pourrait expliquer cette légère différence d'allure.

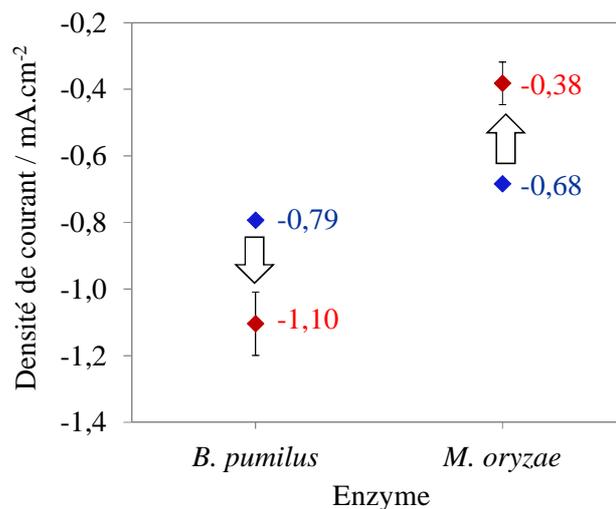
Aucun courant n'a été observé avec le mutant R416E (Figure II.2.6 B courbe rouge). Par rapport à l'arginine et à la phénylalanine, la chaîne latérale du glutamate présente une charge négative. Or, le passage préalable des électrodes au plasma charge négativement leur surface avec des groupements esters, hydroxyles et carboxyliques [25]. Nous pouvons donc supposer qu'il se produit une répulsion entre la chaîne latérale du résidu et l'électrode, ce qui pourrait expliquer que l'on n'observe aucun courant avec le glutamate. Aussi, nous supposons que de meilleurs résultats pourraient être obtenus en utilisant des électrodes non traitées au plasma ou encore des électrodes d'or, malheureusement nous ne disposons plus de quantité suffisante de mutant R416E pour tenter ces expériences.

Même si ces mutations n'ont pas donné les résultats escomptés d'autres mutations en position 416 peuvent être envisagées. Le résidu arginine pourrait être remplacé par un acide aminé hydrophile à chaîne latérale courte ne présentant pas de charges négatives. La glycine, l'asparagine et la thréonine par exemple pourraient donner des résultats plus prometteurs. Ces mutations sont actuellement en cours de réalisation.

### **2.2.3. Effet de la température**

#### **2.2.3.1. Résultats expérimentaux**

La sensibilité thermique de *B. pumilus* en électrochimie a été étudiée sur une gamme de températures allant de 37 °C à 70 °C. Les analyses ont montré une activité catalytique croissante avec la température [16]. Vu la plus grande sensibilité de *M. oryzae* en solution aux températures élevées nous avons comparé le comportement des deux enzymes en électrochimie en fonction de la température. Nous avons comparé en TEM l'évolution de la densité de courant pour chaque enzyme après une augmentation de température de 37 °C à 50 °C (Figure II.2.7).



**Figure II.2.7.** Comparaison des densités de courant à 37 °C (bleu) et 50 °C (rouge) obtenues sur les CVs à 5 mV.s<sup>-1</sup> des électrodes modifiées avec les hydrogels de *B. pumilus* et de *M. oryzae* rotation des électrodes à 500 tr.min<sup>-1</sup> dans le PBS sous 1 atm O<sub>2</sub>. Densités de courant mesurées à + 0,1 V vs. Ag/AgCl.

En élevant la température de 37 °C (Figure II.2.7 points bleus) à 50 °C (Figure II.2.7 points rouges) nous observons une augmentation moyenne de 39 % de la densité de courant pour *B. pumilus*. Par contre pour *M. oryzae* nous constatons une perte moyenne de 44 % de la densité de courant.

### 2.2.3.2. Analyse des résultats et hypothèses

Les résultats obtenus à haute température peuvent s'expliquer par les propriétés intrinsèques des deux enzymes. Etant issue d'une bactérie thermophile l'augmentation de courant observée pour *B. pumilus* est cohérente.

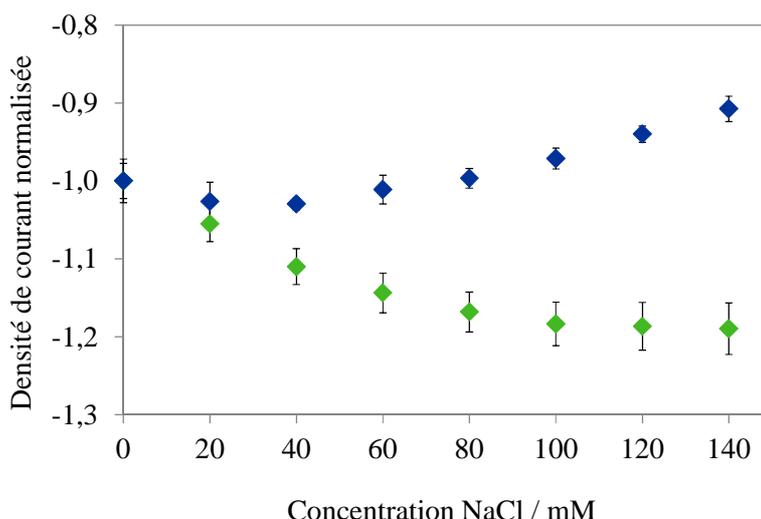
Contrairement à *B. pumilus* la BOD de *M. oryzae* est issue d'un champignon mésophile, elle est donc plus sensible aux températures élevées. Cependant nous remarquons une différence de comportement de *M. oryzae* en solution et de l'enzyme immobilisée sur l'électrode. Les travaux préliminaires sur *M. oryzae* ont en effet montré que l'enzyme libre en solution était active jusqu'à 60 °C [12].

Or nous constatons ici une perte d'activité importante à 50 °C (Figure II.2.5 points rouges). Ce comportement pourrait être attribué des différences d'interactions entre résidus ou de conformation de l'enzyme sur l'électrode, la rendant plus sensible aux fortes températures.

## 2.2.4. Effet du chlore et de la conductivité des tampons de mesure

### 2.2.4.1. Résultats expérimentaux

Nous avons étudié l'effet du chlore sur des électrodes modifiées avec les hydrogels de *B. pumilus* et *M. oryzae*. Nous avons réalisé des chronoampérométries avec les électrodes opérant à + 0,1 V vs. Ag/AgCl dans du tampon phosphate de sodium à 100 mM pH 7,2 sans chlore. Pour chaque enzyme nous avons effectué des incréments de 20 mM de NaCl toutes les 100 secondes (Figure II.2.8).



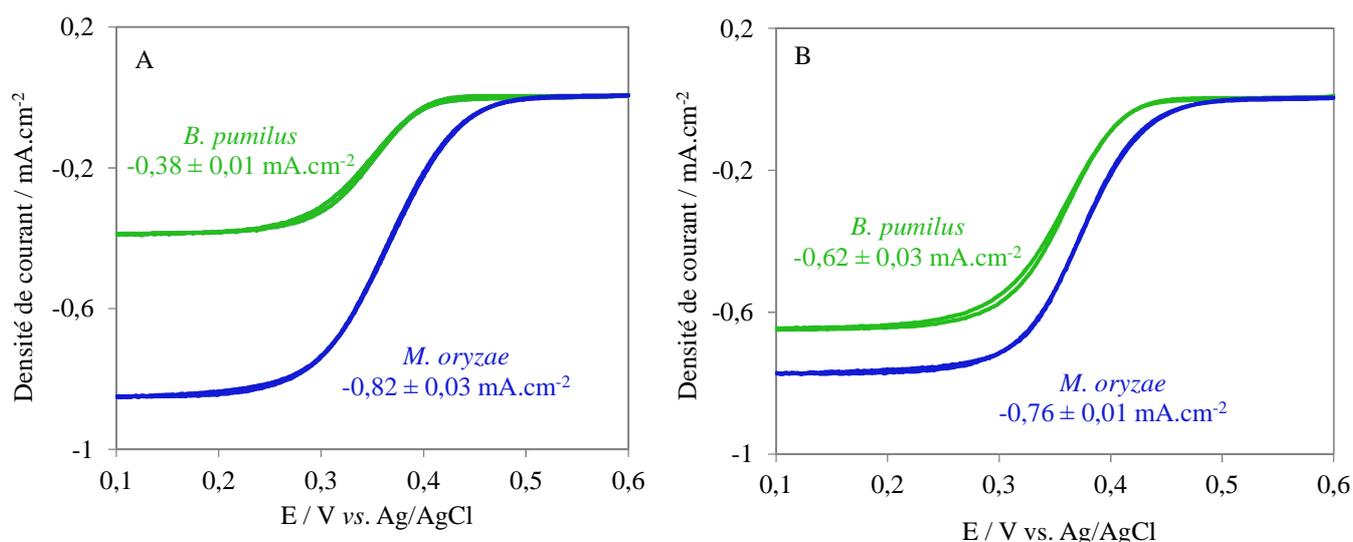
**Figure II.2.8.** Dépendance de la densité de courant normalisée des électrodes modifiées avec les hydrogels de *B. pumilus* (vert) et de *M. oryzae* (bleu), en fonction de la concentration de NaCl dans le tampon phosphate 100 mM pH 7,2 sans chlore à 37 °C sous 1 atm O<sub>2</sub> rotation des électrodes à 200 tr.min<sup>-1</sup>.

Une augmentation du courant catalytique a d'abord été observée pour les deux BODs. Par la suite la densité de courant de l'électrode modifiée avec *M. oryzae* diminue rapidement dès 60 mM de NaCl (Figure II.2.8 points bleus). Par contre celle de l'électrode modifiée avec *B. pumilus*

(Figure II.2.8 points verts) devient presque indépendante de la concentration en chlore dès 100 mM.

A 140 mM de NaCl, l'électrode de *M. oryzae* a perdu 9 % de densité de courant initiale. Par contre celle de *B. pumilus* à la même concentration de chlore a augmenté son courant de 19 %.

Nous avons comparé les CVs des électrodes modifiées en TEM avec les deux enzymes dans du tampon phosphate de sodium 20 mM avant et après ajout de 140 mM de NaCl (Figure II.2.9).



**Figure II.2.9.** Comparaison des CVs à  $5 \text{ mV.s}^{-1}$  des électrodes modifiées avec les hydrogels de *B. pumilus* (vert) et de *M. oryzae* (bleu) dans le tampon phosphate 20 mM pH 7,2 à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  sous 1 atm  $\text{O}_2$  avant ajout de NaCl (A) et après ajout de 140 mM de NaCl (B) rotation des électrodes à  $500 \text{ tr.min}^{-1}$ . Autres conditions identiques à la figure II.2.2

Nous constatons que la BOD de *M. oryzae* a perdu en moyenne près de 7 % de sa densité de courant (Figure II.2.9.B courbe bleue). Alors que la densité de courant de *B. pumilus* a augmenté en moyenne de 63 % (Figure II.2.9.B courbe verte).

#### 2.2.4.2. Analyse de l'effet du chlore sur *M. oryzae*

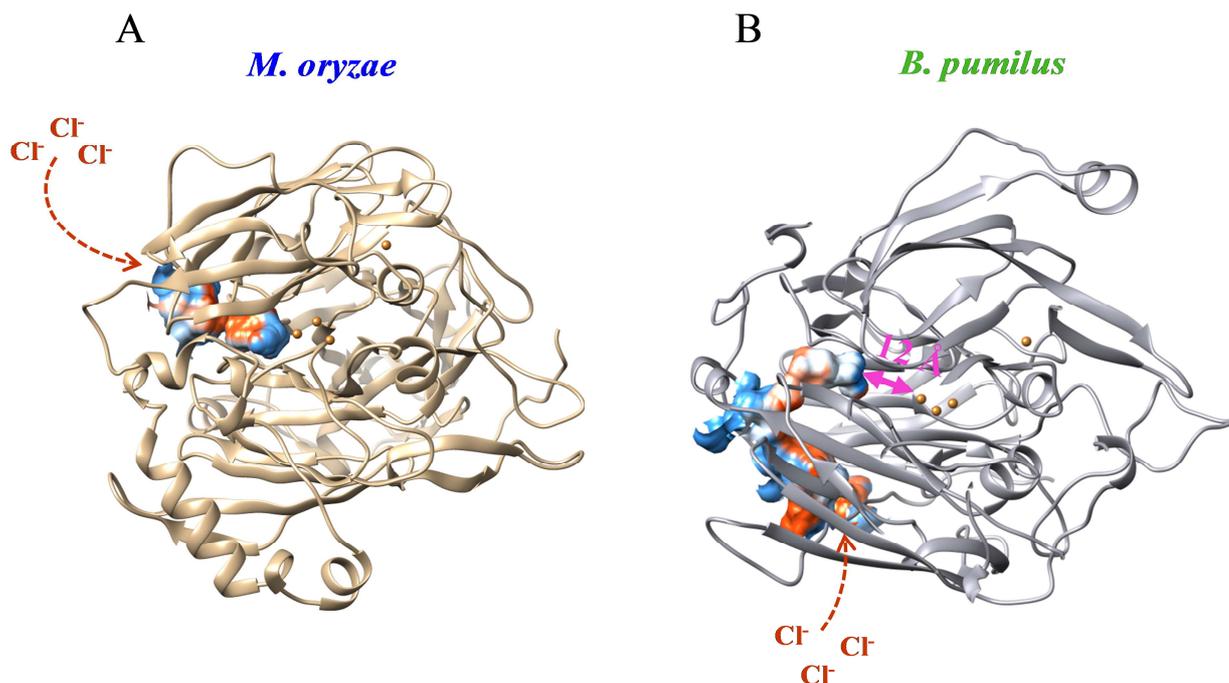
Le mécanisme d'inhibition par le chlore a été très étudié sur les laccases, cependant aucun mécanisme universel n'a pu être mis en évidence. Divers mécanismes ont pu être proposés selon l'enzyme ou encore le substrat utilisé [26]. Par exemple Zilly et al. ont rapporté pour l'oxydation

de l'ABTS par la laccase de *Ganoderma lucidum* une inhibition de type mixte par le NaCl, c'est-à-dire que l'on a à la fois une baisse d'affinité de l'enzyme pour le substrat mais également un effet sur l'étape catalytique [27]. En étudiant la laccase de *Trametes versicolor*, Enaud et al. ont décrit avec le NaCl une inhibition mixte pour l'oxydation de l'ABTS et une inhibition non compétitive pour la décoloration de l'acide 62 bleu (ABu62) [28].

L'étude du mécanisme d'inhibition de *M. oryzae* par le chlore est actuellement en cours de réalisation. Toutefois nous avons supposé, comme pour la plupart des laccases, que les anions Cl<sup>-</sup> se coordonnent au cuivre T2 et inhibent le transfert d'électrons du T1 au T3 [29-30]. En considérant qu'il y a une interaction du chlore avec le T2, les anions Cl<sup>-</sup> doivent avant tout pouvoir y être acheminé depuis l'extérieur de l'enzyme.

Certains résidus d'acides aminés sont impliqués dans l'acheminement des protons au sein de la protéine. Ces résidus délimitent des canaux allant de l'extérieur de l'enzyme jusqu'au T2. Il a été supposé que ces canaux pourraient *a priori* être utilisés pour la sortie des molécules d'eau formées lors de la réduction de l'oxygène [31-33]. Aussi, nous avons présumé que ces canaux pourraient être utilisés par les anions Cl<sup>-</sup> afin d'accéder au centre trinuécléaire du site actif et ainsi inhiber l'activité enzymatique.

Nous avons modélisé ces canaux pour *M. oryzae* et *B. pumilus* avec le logiciel CASTp. Ce logiciel permet de modéliser les cavités et les tunnels pour une enzyme donnée. Pour se faire il utilise une sonde sphérique de 1,4 Å correspondant au rayon des molécules d'eau. De cette façon pour chacune des deux enzymes nous avons pu modéliser les canaux supposés être impliqués dans l'acheminement des molécules d'eau vers l'extérieur de l'enzyme (Figure II.2.10).



**Figure II.2.10.** Comparaison des structures cristallines de *M. oryzae* (A) et de *B. pumilus* (B) sur Chimera. Les tunnels de sortie supposés des molécules d'eau sont représentés par les sphères bleu-orange, modélisées avec le logiciel CASTp. L'entrée des anions Cl<sup>-</sup> est représentée par les flèches orange en pointillés.

Nous pouvons constater que chez *M. oryzae* le canal modélisé est continu et parvient jusqu'à proximité du centre trinuéaire (Figure II.2.10.A). Alors que chez *B. pumilus* il s'arrête à environ 12 Å du centre trinuéaire (Figure II.2.10.B double flèche rose) ce qui signifie que le canal devient plus étroit sur cette distance.

Les anions Cl<sup>-</sup> mesurant 1,67 Å de rayon accèderaient donc plus difficilement au site actif de *B. pumilus*, ce qui pourrait expliquer sa meilleure tolérance au chlore. Alors que le site actif de *M. oryzae* est lui beaucoup plus facilement accessible, d'où une plus grande sensibilité de l'enzyme.

Il est à noter néanmoins que nous considérons pour notre hypothèse une modélisation figée. Or la protéine étant un système dynamique il se pourrait qu'il y ait des modifications de diamètre liées à des changements de conformations au cours du processus, sans compter les interactions avec les différents résidus chargés. Dans tous les cas nous ne sommes pas en mesure de vérifier cette hypothèse pour le moment.

### 2.2.4.3. Analyse de l'effet du chlore sur *B. pumilus*

Nous avons observé une augmentation de courant pour *B. pumilus* en présence de chlore. Les travaux d'Heller sur les hydrogels rédox ont montré qu'à forte concentration de NaCl, les charges des macromolécules (enzymes et polymère) sont écrantées par les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . En présence de NaCl les anions dominants à proximité des sites polycationiques du polymère sont les  $\text{Cl}^-$  et non plus les résidus chargés négativement des acides aminés. De même, les cations dominants à proximité de l'enzyme anionique ne sont plus les sites cationiques du polymère mais les  $\text{Na}^+$  [34].

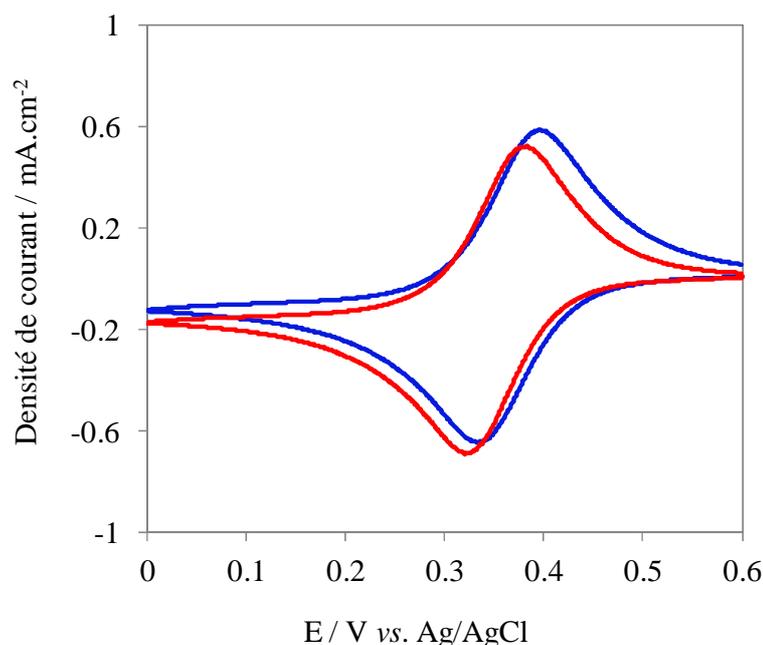
Si les charges négatives de l'enzyme et positives du polymère sont équivalentes on observe à faible concentration de NaCl une précipitation de l'adduit électrostatique polymère-enzyme, on alors une baisse de courant. L'augmentation de la concentration de NaCl permet de redissoudre l'adduit et d'augmenter le courant. Les observations d'Heller sont cohérentes avec la série de Hofmeister (Figure I.2.9 du chapitre I). On constate en effet que les anions  $\text{Cl}^-$  permettent d'améliorer la solubilité des protéines.

Ces résultats nous permettent de supposer que dans le cas de *B. pumilus* l'augmentation de courant observée en présence de chlore pourrait être due à une amélioration de l'interaction enzyme-polymère. Ces interactions étant fortement dépendantes de la force ionique et de la concentration en sels.

### 2.2.4.4. Analyse de l'effet du chlore sur les potentiels rédox

#### ✓ Effet du chlore sur le polymère

Durant nos travaux nous avons observé un effet du chlore sur le potentiel du polymère rédox. Nous avons constaté que le potentiel du PAA-PVI-[Os(4,4V-dichloro-2,2-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> est plus oxydant dans le tampon phosphate 100 mM sans chlore que dans le PBS (Figure II.2.11).



**Figure II.2.11.** Comparaison des CVs à  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  des électrodes modifiées avec les hydrogels de *B. pumilus* dans le tampon phosphate 100 mM pH 7,2 sans chlore (bleu) et dans le PBS (rouge) à  $37^\circ\text{C}$  sous  $\text{N}_2$  rotation des électrodes à  $500 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Le potentiel du polymère rédox passe de  $0,36 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  dans le tampon phosphate 100 mM sans chlore (Figure II.2.11 courbe bleue) à  $0,35 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  dans le PBS (Figure II.2.11 courbe rouge). Les potentiels rédox des polymères sont définis principalement par l'ion du métal de transition et plus particulièrement par ses ligands. Cependant il a été démontré que la concentration de chlorure (et d'autres anions) dans les hydrogels affecte également le potentiel rédox [35-37].

Lorsque le complexe métallique cationique est oxydé, la sphère de coordination externe du complexe gagne des anions provenant de la solution. Typiquement, dans le cas du PAA-PVI- $[\text{Os}(4,4\text{V-dichloro-2,2-bipyridine})_2\text{Cl}]^{+/2+}$  cela se traduit par l'équation II.2.1 [37] :



Cette dépendance du potentiel avec la concentration en anions suit un comportement Nernstien. En général pour ce type de complexe on a une variation de ~ 60 mV par décade [37], mais ici la variation n'est que de 10 mV.

✓ **Effet du chlore sur les enzymes**

Nous également avons remarqué un effet du chlore sur les potentiels de début de réduction de l'O<sub>2</sub> selon le tampon de mesure et la stratégie d'immobilisation des enzymes (Tableau II.2.1.). Pour plus de commodité nous désignons ici le tampon phosphate de sodium 100mM sans chlore par l'acronyme « NaP » et le potentiel de début de réduction de l'O<sub>2</sub> est désigné par le terme anglais « onset ».

Stratégie d'immobilisation	Tampon de mesure	Onset de <i>M. oryzae</i> (V vs. Ag/AgCl)	Onset de <i>M. oryzae</i> (V vs. Ag/AgCl)
TED	PBS	0,50	0,44
	NaP 100 mM	0,50	0,44
TEM	PBS	0,50	0,44
	NaP 100 mM	0,48	0,42

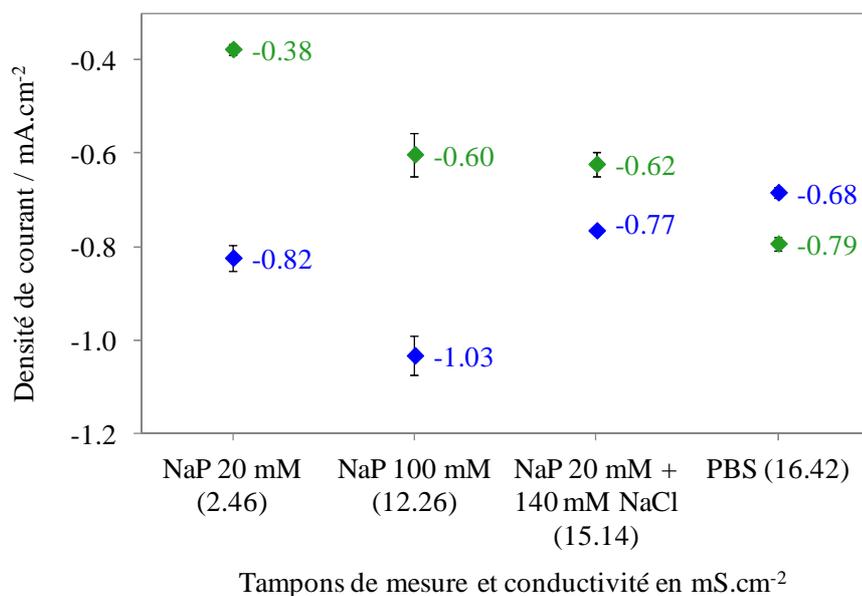
**Tableau II.2.1.** Potentiels de début de réduction de l'O<sub>2</sub> par les BODs en fonction de la stratégie d'immobilisation et du tampon de mesure. Mesures des onsets avec le logiciel CHI sur les CVs à 5 mV.s<sup>-1</sup>, rotation des électrodes à 500 tr.min<sup>-1</sup>.

En TED les onsets de chacune des deux enzymes ne sont pas influencés par le tampon de mesure. Par contre en TEM dans le tampon phosphate 100 mM sans chlore l'onset de chaque enzyme devient plus réducteur de 20 mV vs. Ag/AgCl par rapport au PBS. Ce résultat est clairement lié au fait que dans le NaP le potentiel rédox du polymère devient plus oxydant même si cette augmentation n'est seulement que de 10 mV vs. Ag/AgCl. Or le potentiel rédox du médiateur dicte le potentiel auquel l'hydrogel rédox assure la réduction de l'O<sub>2</sub> [38-39].

Cette variation du potentiel rédox du polymère modifie la force électromotrice permettant le transfert d'électrons entre le polymère et l'enzyme. La force électromotrice et la différence de potentiel rédox entre les molécules sont interdépendantes. Ainsi, nous supposons que pour que le transfert d'électron reste optimal il se produit un réajustement de l'onset de chaque enzyme.

### 2.2.4.5. Effet de la conductivité des tampons de mesure

L'augmentation du courant de *B. pumilus* en présence chlore pourrait également s'expliquer par l'augmentation de la conductivité du tampon. Sur les CVs précédents (Figure II.2.2, Figure II.2.4.A, Figure II.2.7.A) nous avons pu observer des variations de courant en fonction du tampon utilisé. Les valeurs des densités de courant mesurées sur les CVs à + 0.1 V en fonction des tampons avec une conductivité croissante sont reportées sur la figure II.2.12.



**Figure II.2.12.** Densités de courant de réduction en fonction des tampons à pH 7,2 à 37 °C sous 1 atm O<sub>2</sub> pour les électrodes modifiées avec les hydrogels de *B. pumilus* (vert) et *M. oryzae* (bleu). Mesures à + 0,1 V sur les CVs à 5 mV.s<sup>-1</sup> rotation des électrodes à 500 tr.min<sup>-1</sup>.

Dans le chapitre I nous avons abordé l'effet de la force ionique du tampon sur les enzymes. Selon sa force ionique et la concentration des divers ions le tampon peut fortement influencer l'activité enzymatique. Le tableau II.2.2 présente les compositions et les conductivités des différents tampons utilisés.

Tampon de mesure	C <sub>NaP</sub> (mM)	C <sub>NaCl</sub> (mM)	Conductivité (mS.cm <sup>-1</sup> )
NaP 20 mM	20	0	2,85
NaP 100 mM	100	0	12,26
NaP 20 mM + 140 mM NaCl	19	140	15,14
PBS	20	140	16,42

**Tableau II.2.2.** Composition et conductivité des tampons de mesure.

Pour *B. pumilus* nous avons une augmentation de la densité de courant avec la conductivité du tampon. Cet effet de la conductivité sur le courant a été également constaté pour *M. oryzae*. Cependant en présence de chlore, bien que la conductivité soit plus élevée, nous obtenons une diminution de la densité de courant de *M. oryzae* en raison de sa forte sensibilité au chlore.

Lors de l'addition d'une solution de NaCl dans le tampon à 20 mM phosphate il y a un effet de dilution. La concentration de phosphate de sodium diminue de 20 mM à 19 mM, ce qui donne une conductivité plus faible que celle du PBS. Cela pourrait expliquer que pour *B. pumilus* on ait dans ce tampon un courant plus faible que dans le PBS où la concentration réelle en phosphate de sodium est de 20 mM.

### 2.2.5. Effet de la concentration en phosphate de sodium dans l'hydrogel

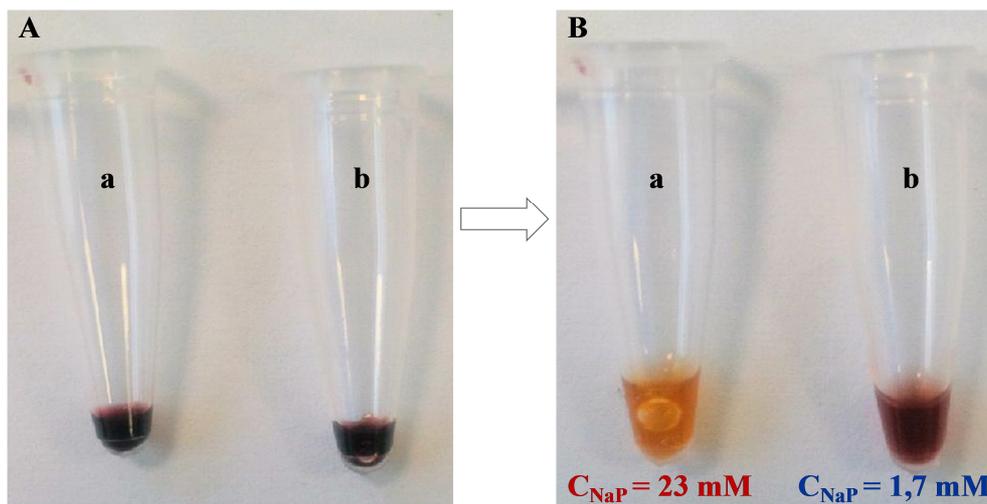
A cours de l'optimisation des électrodes à base de *B. pumilus* nous avons remarqué que la dilution préalable de l'enzyme dans l'eau donne des densités de courant plus importantes qu'une dilution dans son tampon de conservation (phosphate de sodium à 50 mM sans chlore pH 7,6). Selon que l'enzyme soit diluée dans l'eau ou dans son tampon, la force ionique et la composition finales de l'hydrogel diffèrent.

Nous avons donc supposé que ces différences de densité de courant pourraient être dépendantes de la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel. Nous avons comparé pour les deux enzymes des hydrogels rédox contenant 1,7 mM de phosphate de sodium (dilution de l'enzyme dans l'eau) et 23 mM de phosphate de sodium (dilution de l'enzyme dans le tampon).

### 2.2.5.1. Résultats expérimentaux

#### ✓ Préparation des hydrogels :

De premières observations ont été faites visuellement au moment de la préparation des hydrogels rédox, après ajout de l'enzyme diluée (Figure II.2.13).



**Figure II.2.13.** Couleur du polymère rédox avant ajout de la solution enzymatique (A). Couleur des hydrogels de *B. pumilus* après ajout de la solution enzymatique (B), hydrogels contenant 23 mM de phosphate de sodium (a) et 1,7 mM de phosphate de sodium (b).

Pour *B. pumilus* l'hydrogel contenant 23 mM de phosphate devient orange (Figure II.2.11.B.a). Alors qu'à 1,7 mM de phosphate l'hydrogel conserve une couleur foncée proche du rouge bordeaux du polymère (Figure II.2.11.B.b). La couleur des hydrogels de *M. oryzae* vire à l'orange quelle que soit la concentration de phosphate de sodium.

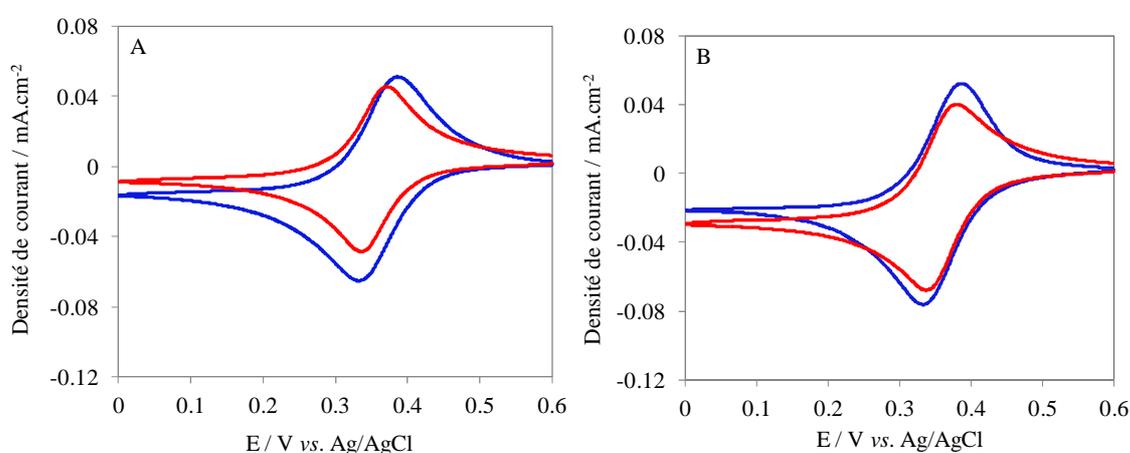
#### ✓ Comparaison des signaux sous N<sub>2</sub>

Nous avons comparé les CVs sous N<sub>2</sub> obtenus pour *B. pumilus* (Figure II.2.13.A) et *M. oryzae* (Figure II.2.13.B). Pour analyser les résultats nous avons mesuré l'aire sous les pics de réduction ou d'oxydation du signal enregistré sous N<sub>2</sub>. A l'aide de cette mesure nous pouvons

remonter à la quantité d'osmiums connectés sur l'électrode. L'aire sous les pics de réduction ou d'oxydation correspond en effet à la charge électrique qui est reliée au nombre de moles d'osmiums par l'équation II.2.2:

$$Q = nNF \quad (\text{Equation II.2.2})$$

où  $Q$  est la charge électrique,  $n$  le nombre d'électrons échangés ( $n = 1$ ),  $N$  le nombre de moles d'espèces rédox et  $F$  la constante de Faraday ( $96485 \text{ C.mol}^{-1}$ ). Ce calcul se fait à faible vitesse de balayage ( $5 \text{ mV.s}^{-1}$ ), ce qui permet d'observer les échanges d'électrons entre toutes les espèces rédox.



**Figure II.2.13.** Cyclovoltammogrammes à  $5 \text{ mV.s}^{-1}$  des électrodes de carbone vitreux modifiées avec les hydrogels de *B. pumilus* (A) et de *M. oryzae* (B) sous  $\text{N}_2$  avec  $C_{\text{NaP}}=1,7 \text{ mM}$  (bleu) et  $C_{\text{NaP}}=23 \text{ mM}$  (rouge).

Nous avons donc comparé les quantités moyennes d'osmiums connectés sur des électrodes modifiées avec les hydrogels de *B. pumilus* et de *M. oryzae* à 23 mM et 1,7 mM de phosphate de sodium pour des CVs à  $5 \text{ mV.s}^{-1}$  (Tableau II.2.3).

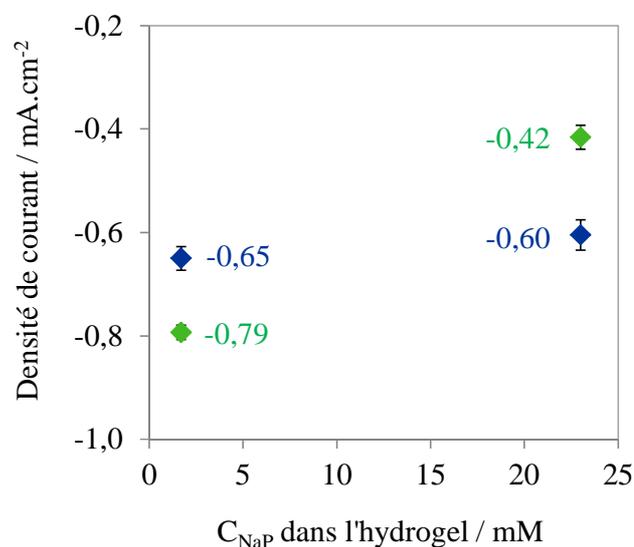
	Q à 1,7 mM NaP (moles.cm <sup>-2</sup> )	Q à 23 mM NaP (moles.cm <sup>-2</sup> )	Variation de charge de 1,7 mM à 23 mM NaP
<i>B. pumilus</i>	(2,4 ± 0,1) x 10 <sup>-8</sup>	(1,8 ± 0,1) x 10 <sup>-8</sup>	-25 %
<i>M. oryzae</i>	(3,1 ± 0,2) x 10 <sup>-8</sup>	(2,8 ± 0,3) x 10 <sup>-8</sup>	-9 %

**Tableau II.2.3.** Concentrations en osmiums connectés sur les électrodes modifiées avec les hydrogels de *B. pumilus* et de *M. oryzae* contenant 23 mM et 1,7 mM de phosphate de sodium.

Pour l'hydrogel de *B. Pumilus* (Figure II.2.13.A) à 23 mM de phosphate de sodium (Figure II.2.13.A courbe rouge) la quantité d'osmiums connectés est plus faible de 25 % par rapport à 1,7 mM (Figure II.2.13.A courbe bleue). Par contre pour l'hydrogel de *M. oryzae* (Figure II.2.13.B) la baisse n'est que de 9 %.

#### ✓ Comparaison des signaux sous O<sub>2</sub>

Les densités de courant catalytique mesurées sous O<sub>2</sub> en fonction de la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel sont reportées sur la figure II.2.14.



**Figure II.2.14.** Densités de courant de réduction de l'O<sub>2</sub> des électrodes modifiées avec les hydrogels de *M. oryzae* (bleu) et de *B. pumilus* (vert) en fonction de la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel, mesures à +0,1 V vs. Ag/AgCl sur les CVs enregistrés à 5 mV.s<sup>-1</sup> dans le PBS à 37 °C sous 1 atm O<sub>2</sub>. Rotation des électrodes à 500 tr.min<sup>-1</sup>.

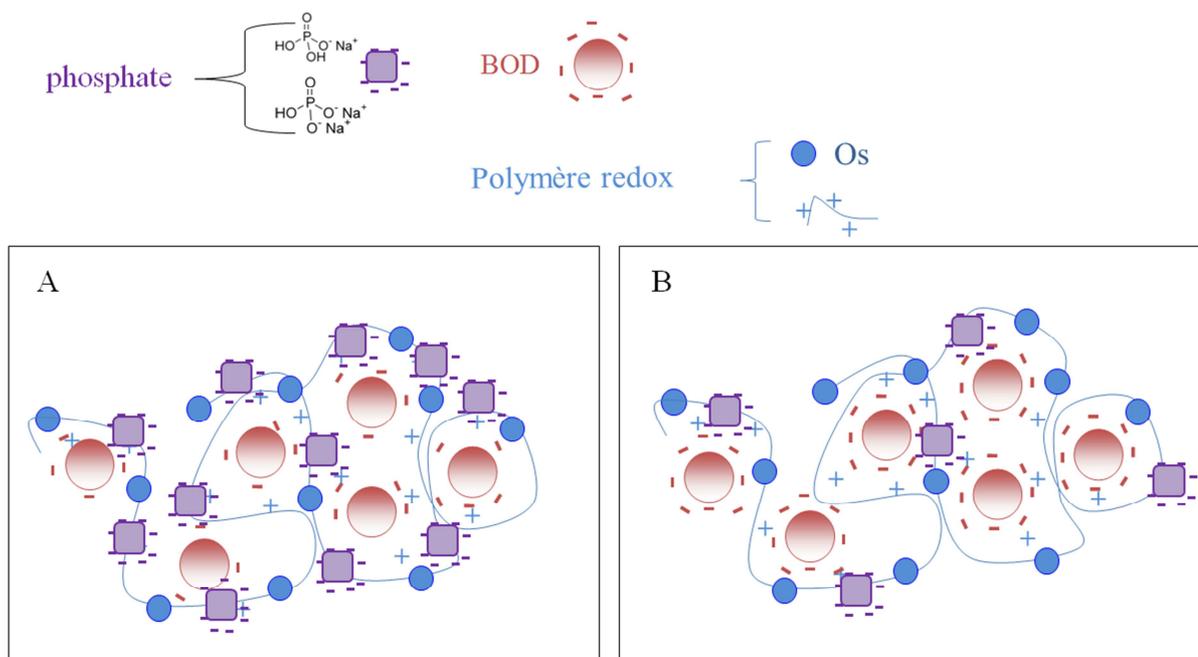
Avec un hydrogel contenant 23 mM de phosphate de sodium le courant de *B. pumilus* (Figure II.2.14 points verts) est plus faible de 47 % par rapport à un hydrogel contenant 1,7 mM de phosphate de sodium. Par contre pour *M. oryzae* (Figure II.2.14 points bleus) le courant baisse seulement de 7 % lorsqu'on passe d'un hydrogel contenant 1,7 mM à 23 mM de phosphate de sodium ce qui est négligeable.

### 2.2.5.2. Analyses des résultats et hypothèses

La concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel a une influence nette sur les signaux enregistrés sous N<sub>2</sub>, mais également sur les densités de courant sous O<sub>2</sub>. L'effet est plus important sur *B. pumilus* alors que dans l'hydrogel de *M. oryzae*, l'effet du phosphate est négligeable tant sur le signal sous N<sub>2</sub> que sur les courants de réduction. Pour les deux enzymes à 23 mM de phosphate dans l'hydrogel la quantité d'osmiums connectés sur l'électrode est plus faible qu'à 1,7 mM.

A partir de ces résultats nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle à 1,7 mM de phosphate dans l'hydrogel, l'interaction électrostatique polymère-enzyme serait plus faible pour *B. pumilus* par rapport à *M. oryzae*. Cette plus faible interaction pourrait être due à une quantité de charges négatives moins importantes à la surface de l'enzyme ou encore une plus grande hydrophobicité de la protéine (Figure II.2.1). Par contre dans l'hydrogel de *M. oryzae* nous pouvons supposer qu'il y a une meilleure interaction polymère-enzyme (protéines moins hydrophobes, plus de charges négatives en surface).

A 23 mM de phosphate de sodium on introduit une quantité de charges négatives plus importante dans l'hydrogel. Dans le cas de *B. pumilus* en supposant une interaction polymère-enzyme plus faible, on présume qu'il y a plus de sites cationiques sur le polymère qui sont accessibles pour les anions phosphates. Ainsi en se fixant aux sites cationiques accessibles ces anions peuvent provoquer un encombrement stérique et/ou une précipitation de l'hydrogel, sachant que la diffusion des électrons au sein de l'hydrogel dépend de la mobilité des segments d'osmium [35]. Aussi, la présence des anions phosphates entraîne une diminution des transferts d'électrons par collisions entre osmiums voisins, d'où les courants plus faibles (Figure II.2.15.A).



**Figure II.2.15.** Représentation de l'effet des anions phosphate sur l'hydrogel de *B. pumilus* à 23 mM de phosphate (A) et à 1,7 mM de phosphate (B).

Par contre à 1,7 mM la proportion d'anions phosphate dans l'hydrogel étant plus faible, il y a sur le polymère moins de sites cationiques occupés. Cela diminue les possibilités de précipitation et/ou d'encombrement stérique et permet de conserver des courants élevés (Figure II.2.15.B). Ces hypothèses pourraient donc expliquer les différences de courants obtenues en fonction de la concentration de phosphate dans l'hydrogel de *B. pumilus*.

### 2.3. Conclusion intermédiaire

L'étude comparative des BODs de *B. pumilus* et de *M. oryzae* a mis en évidence un certain nombre de différences déterminées en solution et en électrochimie. La BOD de *M. oryzae* commence à réduire l' $\text{O}_2$  un potentiel élevé et offre le meilleur courant obtenu jusqu'à présent avec des BODs. Cependant la sensibilité de cette enzyme au chlore et aux températures élevées limite ses performances. La BOD de *B. pumilus* par contre grâce à ses propriétés intrinsèques, montre une activité croissante avec la température, ainsi qu'une meilleure tolérance au chlore. Avec sa thermostabilité élevée *B. pumilus* présente un intérêt particulier pour les applications nécessitant de fortes températures. Elle peut être utilisée notamment dans les biopiles  $\text{H}_2/\text{O}_2$  utilisant une hydrogénase hyper thermophile à l'anode [40].

En plus de la teneur en chlore et de la conductivité du tampon de mesure, le courant catalytique obtenu dépend aussi de la stratégie d'immobilisation sur l'électrode. L'électrode de *M. oryzae* est plus performante en TED qu'en TEM, contrairement à celle de *B. pumilus*.

Les différences entre les deux enzymes peuvent s'expliquer notamment par leurs caractéristiques structurales. La BOD de *B. pumilus* présente en effet un site actif moins enfoui, mais possédant une arginine à son entrée, ainsi qu'une proportion de zones hydrophobes plus importante que *M. oryzae*. La présence de quatre tryptophanes rend le site actif de *M. oryzae* plus hydrophobe et pourrait augmenter le potentiel rédox de l'enzyme. De plus, les canaux de sortie des molécules d'eau qui pourraient être utilisés par le chlore pour atteindre le site actif, sont plus étroits chez *B. pumilus*.

La concentration en phosphate dans l'hydrogel influence également les réponses électrochimiques des enzymes. La BOD de *B. pumilus* en particulier présente une plus grande sensibilité à ce paramètre. A 23 mM de phosphate dans l'hydrogel le courant de *B. pumilus* est plus faible de 47 % alors que celui de *M. oryzae* baisse seulement de 7 % par rapport aux hydrogels à 1,7 mM de phosphate.

### 3. Etude de l'effet de l'urate sur la BOD de *Bacillus pumilus*

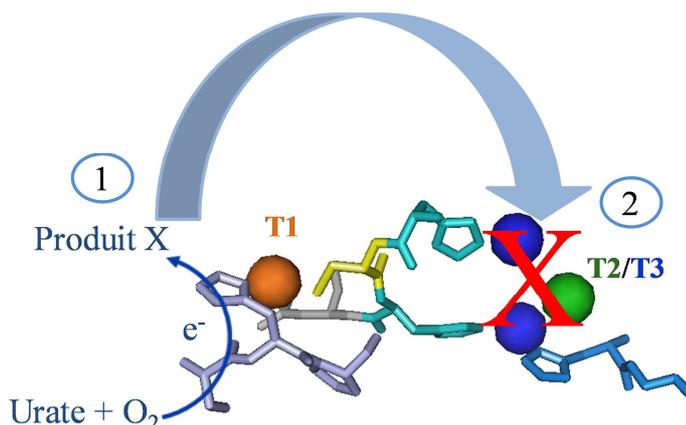
#### 3.1. Introduction

L'acide urique est un composé biologique naturellement produit par le catabolisme des purines qui est peu soluble dans l'eau et à pH physiologique. Le taux normal sanguin d'acide urique est compris entre 0,1 et 0,4 mM et son accumulation dans le sang peut entraîner l'apparition de calculs rénaux ou encore d'inflammations articulaires telles que la goutte. On retrouve l'acide urique dans l'organisme sous forme d'anion urate qui est oxydé en allantoiné plus soluble et excrété plus facilement par les reins dans l'urine où il peut être détecté [41-42].

Dans une série de publications, Kang et collaborateurs ont montré que les électrodes modifiées avec *T. Tsunodae* étaient instables dans le sérum et perdaient plus de la moitié de leur courant en quelques heures. Ils ont attribué l'instabilité des électrodes de *T. tsunodae* à la présence d'urate [43-44]. Etant donné que la BOD de *B. pumilus* présente une meilleure thermostabilité en solution et une meilleure tolérance au chlore par rapport à *T. tsunodae* et *M. oryzae* nous avons étudié sa tolérance par rapport à l'urate.

### 3.2. Effet de l'urate sur les BODs

Au cours de leur étude dans le sérum, Kang et al. ont montré que l'urate réagit avec l'oxygène dans une réaction catalysée à la fois par la BOD et les centre osmiums de l'adduit électrostatique. Le produit d'oxydation ainsi obtenu désactive l'enzyme de façon irréversible, en interagissant avec un ou plusieurs des quatre centres cuivriques  $\text{Cu}^{2+}$  de son site actif (Figure II.3.1) [44].



**Figure II.3.1.** Processus de désactivation de la BOD par l'urate, étape 1 : oxydation de l'urate, étape 2 : coordination du produit d'oxydation aux cuivres.

Cependant ce produit d'oxydation n'a pas pu être identifié. Nous savons seulement qu'il ne correspond ni à l'allantoïne ni à l'acide allantoïque qui sont les produits courants résultant de l'oxydation de l'urate.

Dans une précédente étude, la même équipe a pu constater sur une anode modifiée avec un hydrogel rédox à base de GOx que le produit d'oxydation de l'urate se coordonne aux sites cationiques du polymère rédox. Cela conduit à une précipitation de l'adduit électrostatique diminuant ainsi la mobilité des segments qui assurent le transfert d'électrons par collision entre osmiums voisins. On a dans ce cas une perte de diffusivité des électrons liée à l'augmentation de la résistivité de l'adduit et non à un endommagement de l'enzyme [45]. Les expériences réalisées sur la cathode *T. tsunodae* ont montré que cet effet est considérablement atténué par l'ajout dans le tampon d'ions  $\text{Cl}^-$  qui entrent en compétition avec l'urate sur les sites cationiques, ainsi que par l'utilisation de Nafion® permettant d'exclure l'urate du film électrocatalytique [44].

Dans leurs travaux suivant Kang et al. ont étudié l'influence du gaz (O<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>) et du potentiel sur une cathode de *T. tsunodae* réalisée avec l'enzyme dans un hydrogel rédox contenant du PAA-PVI-[Os(4,4V-dichloro-2,2-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> [43]. La cathode a été immergée pendant 2 heures dans différentes conditions : tampon avec ou sans urate, bullage sous oxygène ou sous argon, application ou non d'un potentiel à l'électrode. Les résultats obtenus sont reportés au tableau II.3.1.

Atmosphère	Urate (mM)	Potentiel appliqué	% Pertes (±5 %)
1 atm O <sub>2</sub>	0,5	Aucun	73
1 atm O <sub>2</sub>	0,5	0,1 vs. Ag/AgCl	26
1 atm O <sub>2</sub>	0	Aucun	78
1 atm O <sub>2</sub>	0	0,1 vs. Ag/AgCl	0
Argon	0,5	Aucun	0
Argon	0,5	0,1 vs. Ag/AgCl	0
Argon	0	Aucun	72
Argon	0	0,1 vs. Ag/AgCl	0

**Tableau II.3.1.** Pertes de courant mesurées sur les voltammogrammes à 1 mV.s<sup>-1</sup> des électrodes modifiées avec *T. tsunodae* (rotation 500 tr.min<sup>-1</sup>) après 2 heures de rotation à 100 tr.min<sup>-1</sup> dans du PBS (0,15 M de NaCl 0,02 M phosphate) à 37,5 °C [43].

Ces études ont montré qu'en présence à la fois d'O<sub>2</sub> et d'urate ou d'oxygène seul la déstabilisation de la cathode est plus importante lorsqu'aucun potentiel n'est appliqué. Par contre la cathode ne perd rien de son activité catalytique lorsque l'on applique un potentiel de + 0,1 V vs. Ag/AgCl et qu'elle est stockée dans un tampon sans urate que ce soit sous argon ou sous O<sub>2</sub>. La perte est minimisée dans un tampon avec urate sous O<sub>2</sub> lorsque le potentiel de + 0,1 V vs. Ag/AgCl est appliqué.

Les hauteurs des pics voltammétriques associés à l'électro oxydoréduction du polymère rédox n'avaient sensiblement pas changé au bout des 2 heures d'immersion. Ces résultats supposent que l'urate tout comme le potentiel maintient les osmiums du polymère et les centre rédox de

l'enzyme dans leur état réduit (Chapitre 1 Figure I.3.2). Dans ce cas la cathode est stabilisée alors que le maintien des centres Cu à l'état oxydé provoque l'instabilité dominante.

En résumé dans le sérum, il existe deux processus endommageant la BOD. Dans le premier, un produit issu de l'oxydation de l'urate catalysée par la BOD en présence d'O<sub>2</sub> désactive l'enzyme [44]. Dans le second processus, il y a une désactivation irréversible des centres cuivriques maintenus à l'état oxydé en présence d'O<sub>2</sub> et d'urate lorsqu'aucun potentiel n'est appliqué à l'électrode. Cet effet n'est pas observé en absence d'oxygène et en présence d'urate seul qui maintient les cuivres dans leur état réduit [43]. Il a également été constaté que les cathodes déconnectées sont endommagées plus rapidement et de façon plus drastique par ce procédé, alors que les cathodes opérant à + 0.1 V vs. Ag/AgCl ne le sont pas vu qu'elles sont maintenues à un potentiel où les cuivres et les osmiums sont à l'état réduit. De plus pour la même raison, en l'absence d'O<sub>2</sub> les électrodes déconnectées peuvent être conservées dans le sérum sans perdre leur activité. Pour notre étude avec *B. pumilus*, nous nous sommes placés dans les mêmes conditions expérimentales afin de comparer la perte de stabilité liée à l'endommagement de l'enzyme.

### 3.2.1. Résultats expérimentaux

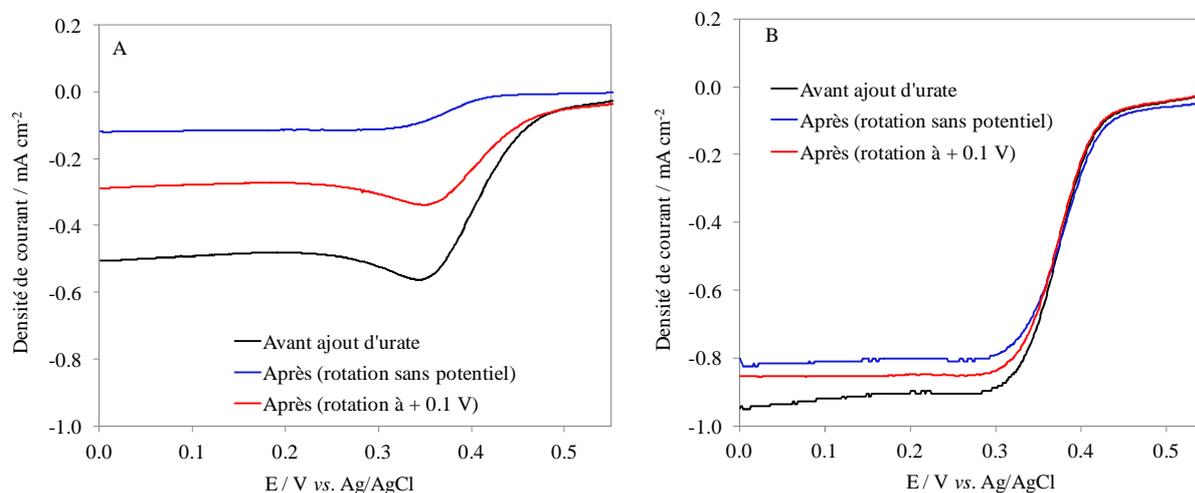
#### 3.2.1.1. Etudes dans les conditions physiologiques

Pour démontrer les performances de la nouvelle BOD de *B. pumilus* par rapport à *T. tsunodae*, nous avons effectué les mêmes expériences que celles réalisées par l'équipe de Kang. Les électrodes ont été préparées aux ratios optimums pour chaque BODs avec un taux de recouvrement de 156 µg.cm<sup>-2</sup> [43-44].

Nous avons opté pour un faible taux de recouvrement sur les électrodes afin de réaliser notre étude dans les conditions les plus critiques possibles. Les hydrogels ont en effet une épaisseur très fine ce qui permet la diffusion d'un maximum de molécules d'urate. Aussi pour pouvoir nous assurer de la stabilité mécanique de l'hydrogel au cours du temps et constater les pertes effectives de courant liées à l'altération des enzymes, nous avons réalisé les dépôts d'hydrogel sur des disques de papier carbone poreux.

Les courbes de polarisation des électrodes modifiées avec *T. tsunodae* et *B. pumilus* ont été enregistrées, puis les électrodes ont été mises en rotation pendant 160 minutes à 200 tr.min<sup>-1</sup> dans

le PBS oxygéné contenant 0,5 mM d'urate. L'expérience a été réalisée avec les électrodes opérant à + 0,1 V vs. Ag/AgCl et sans appliquer de potentiel. Les électrodes ont ensuite été rincées avec du PBS et de nouvelles courbes de polarisation ont été enregistrées à 500 tr.min<sup>-1</sup> dans du PBS oxygéné en l'absence d'urate (Figure II.3.2.).



**Figure II.3.2.** Courbe de polarisation de la réduction de l'O<sub>2</sub> à 5 mV.s<sup>-1</sup> des électrodes de papier carbone modifiées avec les hydrogels de *T. tsunodae* (A) et de *B. pumilus* (B) avant (noir) et après 160 min de rotation sans potentiel (bleu) et rotation à + 0,1 V vs. Ag/AgCl (rouge) à 200 tr.min<sup>-1</sup> dans du PBS contenant 0,5 mM d'urate sous 1 atm O<sub>2</sub> à 37 °C. Courbes de polarisation enregistrées à 500 tr.min<sup>-1</sup>.

Les densités de courant mesurées à + 0,1 V sur les courbes de polarisation avant ajout d'urate (Figure II.3.2 ligne noire) sont de -0,5 mA.cm<sup>-2</sup> pour l'électrode de *T. tsunodae* et de -0,9 mA.cm<sup>-2</sup> pour *B. pumilus*. Après rotation à + 0,1 V l'électrode modifiée avec *T. tsunodae* a perdu 38 % de sa densité de courant initiale (Figure II.3.2.A, rouge) alors que l'électrode modifiée avec *B. pumilus* (Figure II.3.2.B, rouge) en a seulement perdu 13 %.

Lorsqu'aucun potentiel n'est appliqué la perte de densité de courant initiale pour l'électrode modifiée avec *T. tsunodae* est de 78 % (Figure II.3.2.A, bleue). Quant à l'électrode modifiée avec *B. pumilus*, elle perd seulement 15 % de courant (Figure II.3.2.B, bleue) ce qui est similaire à la perte obtenue lorsqu'un potentiel est appliqué. Les CVs sous N<sub>2</sub> à 50 mV.s<sup>-1</sup> enregistrés avant et après l'expérience ont montré pour les deux enzymes des signaux similaires. La perte

observée sous O<sub>2</sub> correspondait donc bien à une déstabilisation de l'enzyme seule et non à une déstabilisation de l'adduit.

Les résultats obtenus pour *T. tsunodae* concordent avec ceux de Kang et collaborateurs. En l'absence de potentiel appliqué la perte de densité de courant pour *T. tsunodae* s'explique donc par la désactivation irréversible du cuivre maintenu à l'état oxydé par l'urate et l'oxygène. Cet effet est atténué lorsqu'un potentiel est appliqué car les cuivres sont alors maintenus dans leur état réduit. Par contre en présence ou en l'absence de potentiel, la BOD de *B. pumilus* n'est pas affectée par l'urate et présente la même stabilité dans les deux cas. Nous avons refait la même expérience sans urate, les différents résultats obtenus sont reportés dans le tableau II.3.2 :

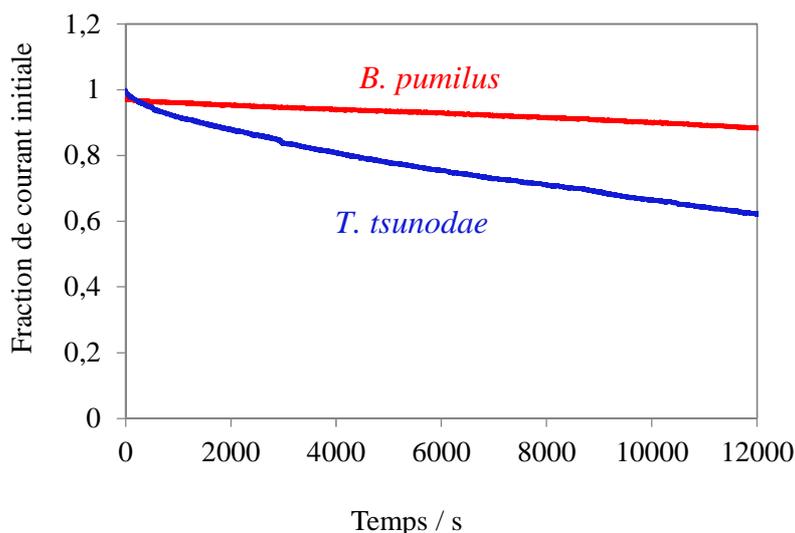
<b>Urate (mM)</b>	<b>Potentiel appliqué</b>	<b>% Pertes <i>B. Pumilus</i> (%)</b>	<b>% Pertes <i>T. tsunodae</i> (%)</b>
<b>0,5</b>	Aucun	15	78
<b>0,5</b>	0,1 V vs. Ag/AgCl	13	38
<b>0</b>	Aucun	0	78
<b>0</b>	0,1 V vs. Ag/AgCl	0	0

**Tableau II.3.2.** Pertes de courant mesurées à + 0.1 V sur les CVs des électrodes de papier carbone, modifiées avec les hydrogels de *T. tsunodae* et de *B. pumilus*, après 160 min de rotation dans du PBS sous 1 atm O<sub>2</sub> à 37 °C.

Les mêmes expériences sous N<sub>2</sub> ont également été réalisées. Qu'il y ait ou non de l'urate en solution aucune perte de densité de courant n'a été constatée pour l'électrode modifiée avec *B. pumilus*. Tandis qu'en l'absence d'urate, la densité de courant diminue de 78 % pour l'électrode modifiée avec *T. tsunodae* ce qui est similaire au résultat rapporté par Kang et al. [43].

### 3.2.1.2. Etudes dans le sérum

Au vu des résultats obtenus dans le tampon dans les conditions physiologiques, nous avons comparé *B. pumilus* et *T. tsunodae* dans du sérum de veau sans membrane protectrice. Les électrodes ont été mise en rotation continue à 500 tr.min<sup>-1</sup> pendant 3h30 à +0,1 V vs. Ag/AgCl, à 37 °C sous O<sub>2</sub> (Figure II.3.3).



**Figure II.3.3.** Dépendance de l'électroréduction de l'O<sub>2</sub> en fonction du temps pour les électrodes de feuilles de carbone poreuses modifiées avec les hydrogels de *T. tsunodae* (bleu) et de *B. pumilus* (rouge) dans du sérum de veau à 37 °C bullé sous 1 atm O<sub>2</sub> [3].

Nous pouvons constater sur la figure II.3.3 que dans le sérum de veau l'électrode modifiée avec *B. pumilus* (Figure II.3.3 ligne rouge) a seulement perdu 9 % de sa densité de courant initiale. Tandis que l'électrode modifiée avec *T. tsunodae* a perdu 38 % de sa densité de courant initiale (Figure II.3.3 ligne bleue).

## 3.2.2. Discussion

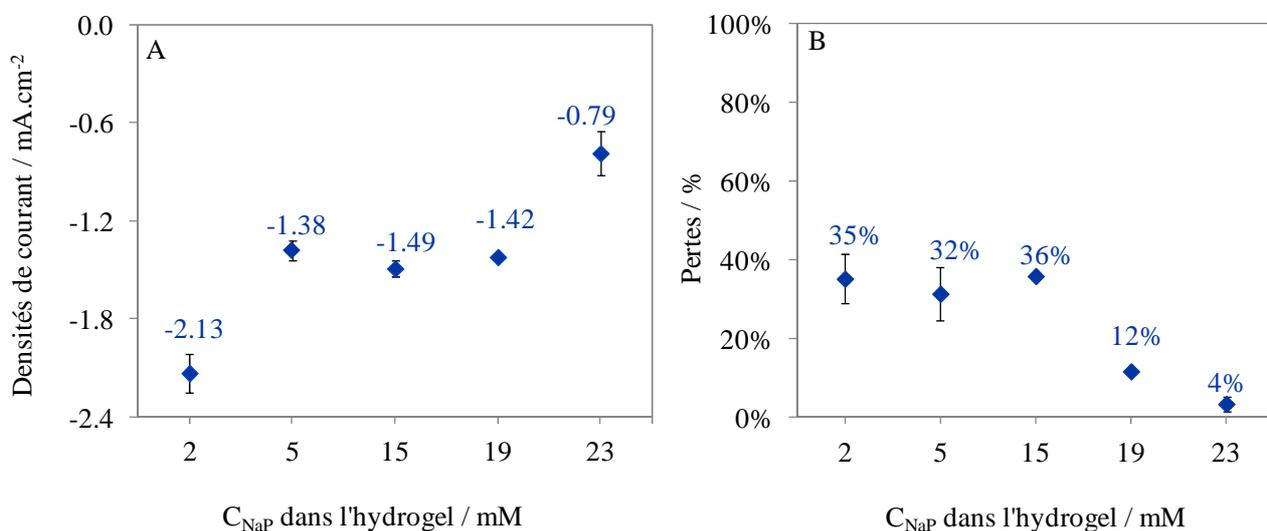
### 3.2.2.1. Effet de la concentration en phosphate de sodium dans l'hydrogel

Diverses hypothèses pourraient expliquer la meilleure tolérance de la nouvelle BOD par rapport à l'urate : une structure plus compacte de la protéine, des cuivres plus profondément

enfouis à l'intérieur de l'enzyme, une différence de coordination autour du cuivre T1, une différence de l'état rédox des cuivres etc.

Cependant, nous avons montré précédemment que la densité de courant de *B. pumilus* est dépendante de la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel. Or, dans les expériences réalisées en présence d'urate, nous avons utilisée sans dilution préalable dans l'eau une *B. pumilus* conservée à  $3,6 \text{ mg.ml}^{-1}$  dans du tampon phosphate à  $50 \text{ mM}$  pH 7,6 sans chlore. L'hydrogel obtenu contenait donc une proportion de phosphate importante ( $23 \text{ mM}$ ), ce qui pourrait expliquer la meilleure stabilité de *B. pumilus* en présence d'urate.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons réalisé une expérience comparative à différentes concentrations de phosphate dans l'hydrogel, en utilisant un lot de *B. pumilus* conservée à  $36,28 \text{ mg.ml}^{-1}$  dans du tampon phosphate à  $50 \text{ mM}$  pH 7,6 sans chlore. Nous avons effectué des chronoampérométries sur 8000 secondes avec les électrodes opérant à  $+0,1 \text{ V}$  et tournant à  $200 \text{ tr.min}^{-1}$  dans du PBS à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  sous  $1 \text{ atm O}_2$ . Au bout de 1000 secondes de chronoampérométrie nous avons ajouté l'urate pour obtenir une concentration finale de  $0,5 \text{ mM}$  dans le tampon de mesure. Nous avons comparé les densités de courant initiales et les pertes de courant en fin d'expérience (Figure II.3.4).

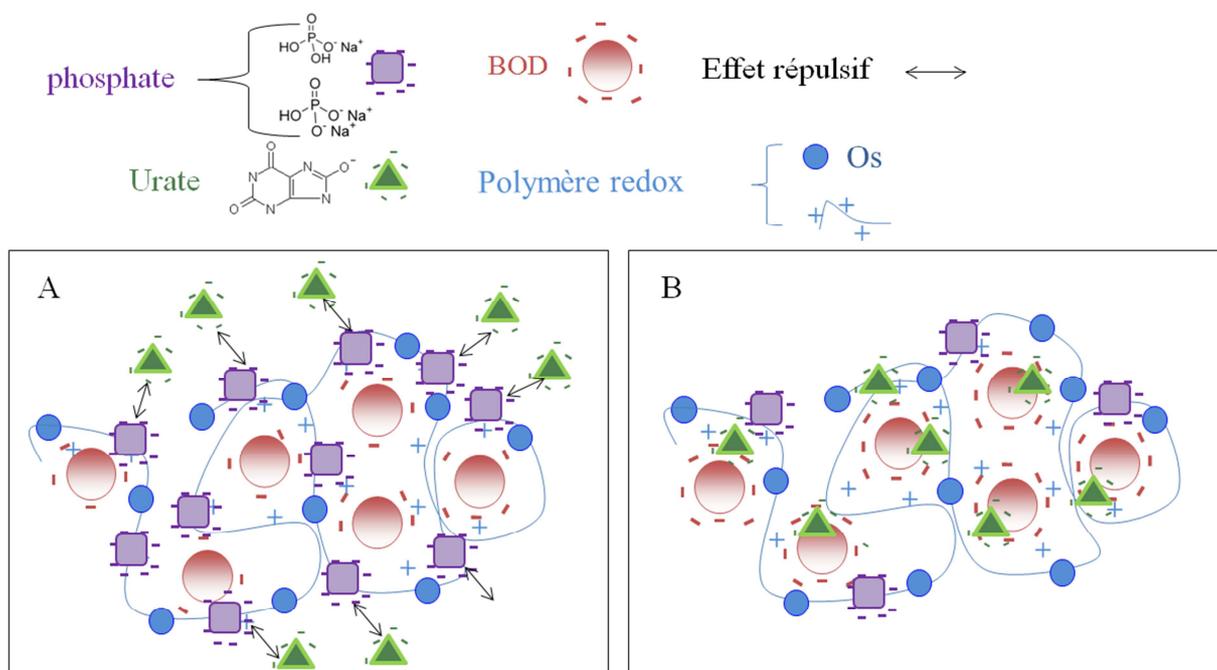


**Figure II.3.4.** Densités de courant (A) mesurées sur les cyclovoltammogrammes à  $5 \text{ mV.s}^{-1}$  des électrodes de papier carbone poreuses, modifiées avec l'hydrogel de *B. pumilus* à  $+0,1 \text{ V}$  rotation des électrodes à  $500 \text{ tr.min}^{-1}$  et pertes de courant après 8000 secondes de chronoampérométrie à  $200 \text{ tr.min}^{-1}$  (B), en fonction de la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel, mesures dans le PBS à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  sous  $1 \text{ atm O}_2$ .

Les résultats obtenus figure II.3.4 montrent une dépendance du courant et des pertes en présence d'urate avec la concentration de phosphate dans l'hydrogel. Le courant baisse lorsque la concentration de phosphate augmente, cependant un plateau est rapidement atteint à partir de 5 mM jusqu'à 19 mM, puis à 23 mM le courant baisse un peu plus (Figure II.3.4.A). En outre, à concentration de phosphate élevée les pertes de courant en présence d'urate sont moins importantes et un plateau est atteint aux concentrations de phosphate plus faibles (Figure II.3.4.B).

On peut supposer qu'à partir de 5 mM tous les sites cationiques libres du polymère sont occupés par les phosphates. Ainsi, entre 5 mM et 19 mM de phosphate les pertes de courant observées sont liées à des transferts d'électrons moins efficaces, en raison de l'encombrement stérique engendré par les anions phosphate. Puis à 23 mM, le courant baisse encore plus en raison de la précipitation de l'hydrogel liée à une réduction de la solubilité de l'enzyme.

Nous pouvons en effet constater sur la série de Hofmeister (Chapitre I Figure I.2.9), que les phosphates sont des anions capables de diminuer la solubilité des protéines, beaucoup plus que les chlorures par exemple. Ainsi, nous pouvons supposer que les anions phosphate ont un effet répulsif vis-à-vis de l'urate et/ou de son produit d'oxydation (Figure II.3.5).

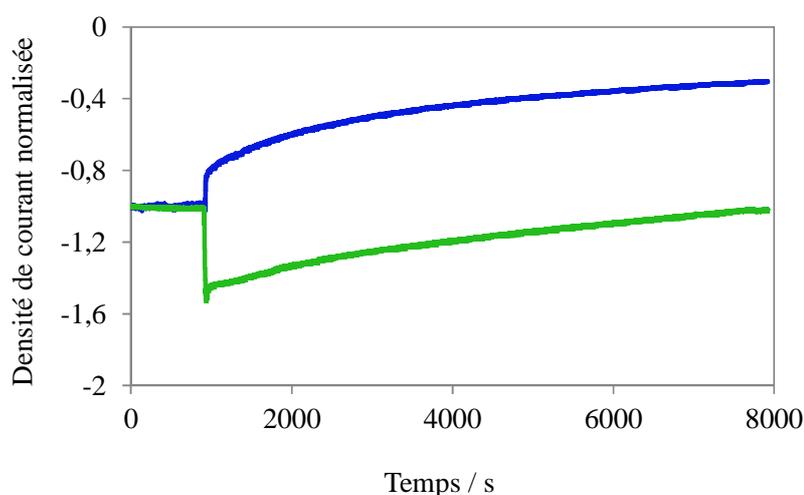


**Figure II.3.5.** Représentation de l'effet des anions phosphate sur l'hydrogel de *B. pumilus* à 23 mM de phosphate avec effet répulsif sur l'urate (A) et à 1,7 mM sans effet répulsif sur l'urate (B).

Par contre, pour que cet effet répulsif soit suffisamment important il semble nécessaire d'atteindre une concentration assez élevée  $\geq 19$  mM.

### 3.2.2.2. Etude de l'augmentation de courant à l'ajout d'urate avec *B. pumilus*

En comparant l'effet de l'urate sur les BODs, nous avons constaté une différence de comportement particulière entre les enzymes au moment de l'ajout d'urate en solution (Figure II.3.6).



**Figure II.3.6.** Chronoampérométries à + 0,1 V vs. Ag/AgCl des électrodes de feuilles de carbone poreuses modifiées avec les hydrogel de *M. oryzae* (bleu) et de *B. pumilus* (vert) à 23 mM de phosphate, ajout d'urate à 1000 secondes dans le PBS à 37 °C sous 1 atm O<sub>2</sub>.

Lors de l'ajout d'urate en solution pendant la chronoampérométrie, il se produit une augmentation d'environ 30 % du courant de réduction dans le cas de *B. pumilus*, puis le courant repart à la baisse rapidement (Figure II.3.6 courbe verte). Par contre le courant de *T. tsunodae* baisse directement à l'ajout d'urate, il en est de même pour *M. oryzae* (Figure II.3.6 courbe bleue) que nous avons utilisé pour effectuer des expériences comparatives sur cet effet.

Cet effet a été constaté quelle que soit la concentration de phosphate dans l'hydrogel. Nous avons supposé que cette augmentation pouvait être liée soit :

- ✓ à la réduction de l'urate par la *B. pumilus* ;

- ✓ à la réduction du produit d'oxydation de l'urate ;
- ✓ à l'apport d'électrons supplémentaire par l'urate qui agirait comme un médiateur pour *B. pumilus* ;
- ✓ à l'amélioration de l'orientation de *B. pumilus* sur l'électrode par l'urate.

### 3.2.2.2.1. Etude de la réduction de l'urate par *B. pumilus*

#### ✓ Analyses en solution

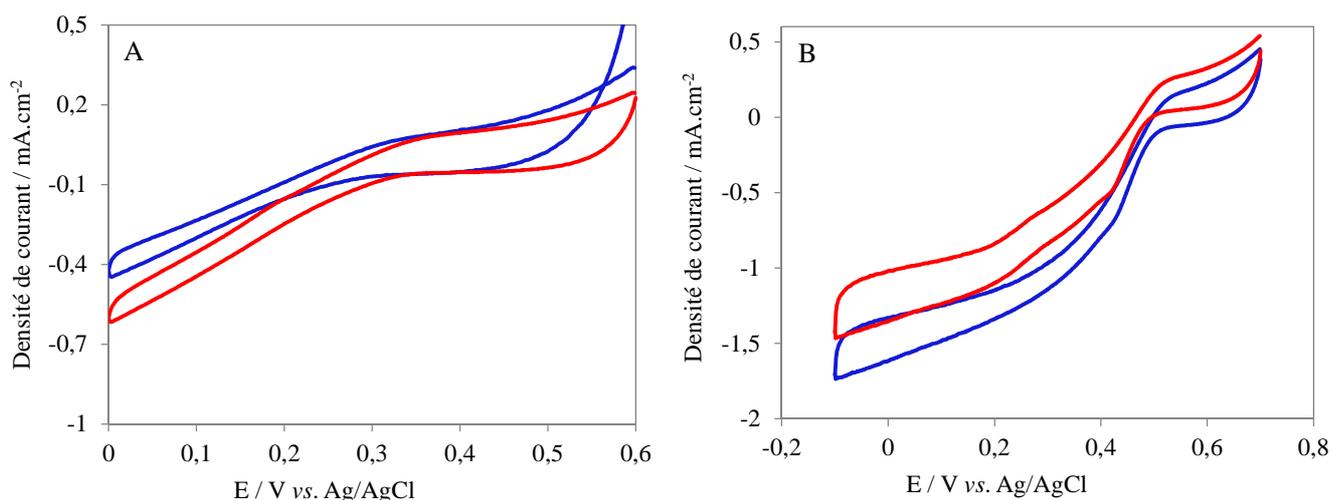
Dans un premier temps nous avons effectué des tests colorimétriques en solution en présence d'ABTS. Ce médiateur de la BOD a un potentiel rédox de  $\sim 0,5$  V vs. Ag/AgCl à pH 7 [46], il peut donc transférer les électrons de la BOD vers un substrat de potentiel plus élevé comme l' $O_2$  ce qui conduit à une coloration verte foncée de la solution. Dans 1,5 mL de solution d'ABTS à 100 mM nous avons introduit 10  $\mu$ L de *B. Pumilus* à 0,072 mg ml<sup>-1</sup>. Puis nous avons ajouté 159  $\mu$ L d'urate à 5 mM pour obtenir une concentration finale en solution de 0,5 mM.

Lorsque la solution est bullée en continue sous  $N_2$  avant et après ajout d'urate aucune coloration n'est observée. Par contre sous  $O_2$  la solution se colore en vert. Cette coloration est clairement liée à la réduction de l' $O_2$  et/ou du produit d'oxydation de l'urate et non pas à la réduction de l'urate seul.

#### ✓ Analyses électrochimiques

Les expériences en solutions ont été complétées par des expériences électrochimiques. Pour mener notre étude nous avons opté pour l'immobilisation de l'enzyme en TED sur des électrodes de cryogel de carbone. Pour ce faire nous avons déposé 10  $\mu$ L de BOD diluée à 10 mg.ml<sup>-1</sup> dans l'eau distillée.

Nous avons comparé l'évolution du courant de réduction pour les électrodes modifiées avec *B. pumilus* dans du PBS avant et après ajout de 0,5 mM d'urate sous argon et sous oxygène. La même expérience a été réalisée avec *M. oryzae* (Figure II.3.7)

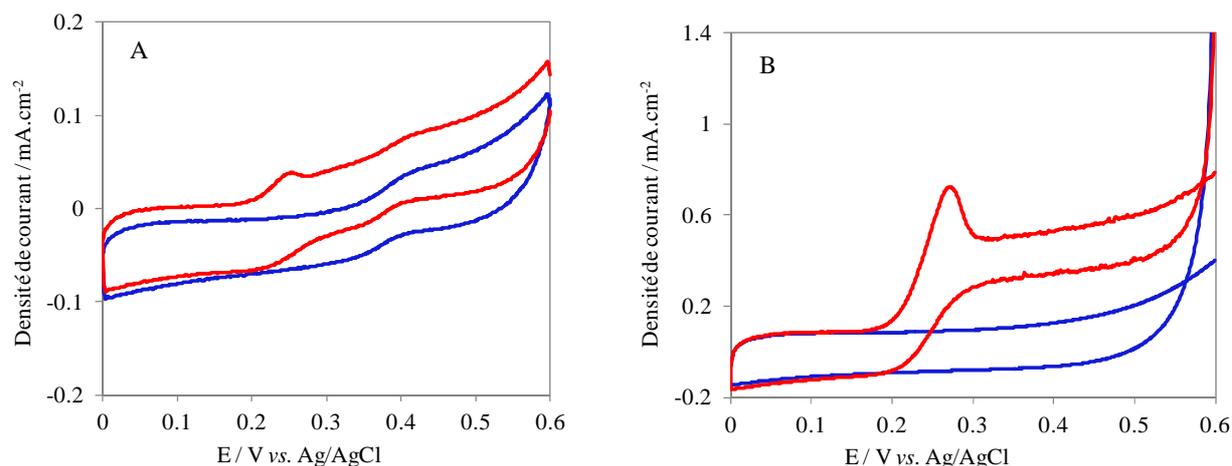


**Figure II.3.7.** Comparaison CVs à  $5 \text{ mV.s}^{-1}$  des électrodes de CCG modifiées avec *B. pumilus* (A) et *M. oryzae* (B) dans le PBS à  $37 \text{ °C}$  sous  $\text{O}_2$ , sans urate (bleu) et avec  $0,5 \text{ mM}$  d'urate (rouge). Rotation des électrodes à  $500 \text{ tr.min}^{-1}$ .

Après ajout de  $0,5 \text{ mM}$  d'urate dans le tampon sous  $\text{O}_2$  le courant de *M. oryzae* qui est une enzyme sensible à l'urate baisse de  $16 \%$  à  $0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  (Figure II.3.7.B courbe rouge). Par contre avec *B. pumilus* il y a une augmentation d'environ  $30 \%$  du courant de réduction à  $+0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  comme en chronoampérométrie (Figure II.3.7.A courbe rouge).

En effectuant des ajouts supplémentaires d'urate en solution nous observons une légère augmentation de courant pour *B. pumilus*, alors que le courant de *M. oryzae* continue de baisser. Toutefois à partir de  $0,6 \text{ mM}$  d'urate les ajouts successifs provoquent une baisse de courant pour *B. pumilus*. Par la suite nous avons testé la stabilité de l'enzyme à  $1 \text{ mM}$  d'urate, en réalisant 10 scans successifs. Nous n'avons pas observé de perte de courant dans les deux cas. Il est possible qu'à partir de  $0,6 \text{ mM}$  on ait une précipitation sur l'électrode, ce qui conduit à une baisse du courant de *B. pumilus* par rapport aux concentrations d'urate plus faibles.

Nous avons voulu vérifier si *B. pumilus* seule catalyse la réduction de l'urate sous  $\text{N}_2$ . Nous avons comparé les courants obtenus pour des électrodes de cryogel de carbone sans enzyme et modifiées avec *B. pumilus* avant et après ajout d'urate (Figure II.3.8).



**Figure II.3.8.** Comparaison des CVs sous N<sub>2</sub> à 5 mV.s<sup>-1</sup> de l'électrode de CCG modifiée avec *B. pumilus* (A) sans urate (bleu) et avec 0,5 mM d'urate (rouge) et de l'électrode de CCG sans enzyme (B) sans urate (bleu) et avec 0,5 mM d'urate (rouge). Mesures dans le PBS à 37 °C avec les électrodes tournant à 500 tr.min<sup>-1</sup>.

Pour une électrode de CCG modifiée avec *B. pumilus* (Figure II.3.8.A) il n'y a aucune augmentation de courant de réduction en présence d'urate sous N<sub>2</sub>. Nous constatons seulement l'apparition d'une vague de d'oxydation (courbe rouge) autour de 0,25 V. Sur CCG sans enzyme (Figure II.3.8.B) nous retrouvons cette vague d'oxydation en présence d'urate, que ce soit sous N<sub>2</sub> ou O<sub>2</sub>.

Le signal de l'urate obtenu en figure II.3.8.B, montre que le système est irréversible. La réduction de l'urate se ferait donc à un potentiel plus faible que la gamme sur laquelle nous travaillons. Le potentiel rédox de la BOD étant plus élevé, l'enzyme ne peut *a priori* pas réduire l'urate.

Au vu de ces résultats nous pouvons conclure que *B. Pumilus* ne réduit pas l'urate. De ce fait l'augmentation du courant de réduction observée sous O<sub>2</sub> pourrait être attribuée à la réduction du produit d'oxydation de l'urate, ou à l'action de l'urate comme médiateur d'électrons.

### 3.2.2.2. Identification du produit d'oxydation de l'urate

Afin de corroborer l'hypothèse de la réduction du produit d'oxydation de l'urate, nous avons essayé de l'identifier. Les travaux de Kang ont en effet montré qu'il ne s'agissait pas des produits d'oxydation classiques de l'urate.

#### ✓ Etudes en spectroscopie UV-visible

L'acide urique existe sous plusieurs formes tautomères. Dans sa forme stable il présente quatre fonctions (-NH) capables de libérer des protons en solution. On a alors quatre mono-anions et six di-anions possibles en fonction de la position de la charge négative en N1, N3, N7 et N9 [41].

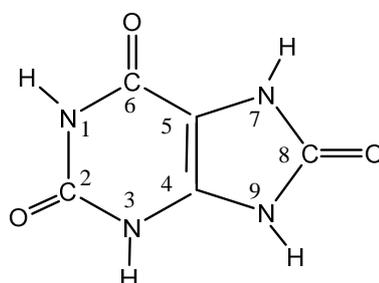


Figure II.3.9. Structure de la forme la plus stable de l'acide urique

Le spectre UV-visible de l'acide urique présente deux pics caractéristiques à  $\sim 235$  nm et à  $\sim 280$  nm (Figure II.3.10).

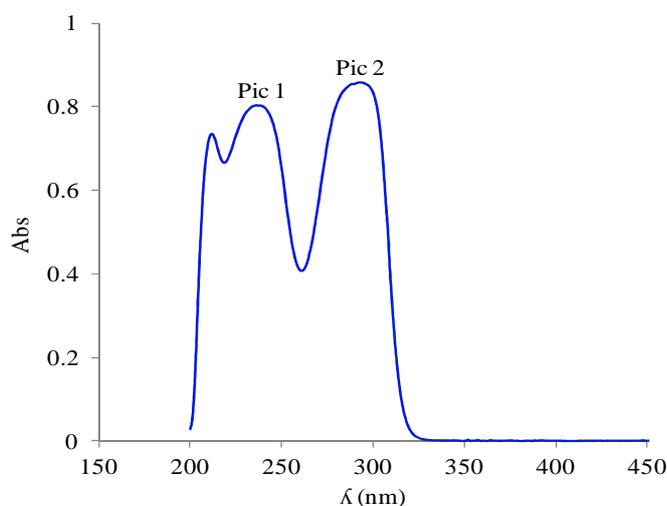


Figure II.3.10. Spectre UV-visible de l'urate.

Des études de spectroscopie UV-visible de l'acide urique effectuées par Shukla et al. [47] ont montré que la longueur d'onde maximale d'absorption, ainsi que l'intensité des deux pics caractéristiques changent en fonction du pH. Selon le pH de la solution différentes espèces ioniques sont présentes. A pH neutre on a un mélange de deux mono-anions : une majorité de mono-anion 3 et une minorité de mono-anion 9. A pH élevé (pH=10) la solution d'acide urique se compose de trois di-anions : le di-anion 3-9 en majorité avec une minorité de di-anion 3-7 et de di-anion 1-9.

Nous avons supposé qu'en présence de BOD et d'O<sub>2</sub> il y aurait une possible coexistence de l'urate et de son produit d'oxydation en solution. Cela pourrait alors se traduire sur le spectre d'absorption UV-visible par une modification telle qu'un décalage de longueur d'onde, l'apparition ou la disparition de pics, la variation de l'intensité et/ou de la forme des pics etc.

Nous avons réalisé l'étude UV-visible sur l'urate avec les BODs de *B. pumilus* et de *M. oryzae*. Nous avons chauffé à 37 °C 20 mL de PBS contenant 0,5 mM d'urate avec bullage continu sous O<sub>2</sub>. Afin d'obtenir un signal de référence, nous avons prélevé 400 µl de cette solution que nous avons analysé au spectrophotomètre UV-visible entre 200 nm et 800 nm. Ensuite nous avons ajouté 2 µl de BOD diluée à 5 mg.ml<sup>-1</sup> dans du tampon phosphate. Les résultats obtenus sont reportés dans tableau II.3.3.

	Pic 1		Pic 2			Pic 1		Pic 2	
	λ (nm)	Abs	λ (nm)	Abs		λ (nm)	Abs	λ (nm)	Abs
<b>Sans</b> <i>B. pumilus</i>	229	0,902	280	0,905	<b>Sans</b> <i>M. oryzae</i>	232	0,952	281	0,932
<b>Avec</b> <i>B. pumilus</i>	228	0,850	277	0,828	<b>Avec</b> <i>M. oryzae</i>	232	0,825	281	0,805

**Tableau II.3.3.** Variation de l'intensité et de la longueur d'onde des pics de l'urate après ajout de *B. pumilus* et de *M. oryzae*.

Les variations d'intensité d'absorbance constatées avant et après ajout de BODs sont peu significatives d'une enzyme à l'autre. De plus la baisse d'intensité observée pourrait tout aussi

bien être attribuée à un effet de dilution de la solution d'urate. Nous avons en effet constaté de faibles variations de signal en ajoutant 2 µl d'eau distillée à la place de la solution enzymatique. Quelle que soit l'enzyme les pics caractéristiques sont toujours aux mêmes longueurs d'onde que ceux de l'urate seul. Ce qui laisse supposer que l'urate et son produit d'oxydation ont une structure semblable.

Nous observons tout de même avec *B. pumilus* un léger décalage du pic à 280 nm vers 277 nm. Cela pourrait traduire un effet différent de *B. pumilus* sur l'urate. Il se pourrait que l'on ait plusieurs espèces ioniques en solution : l'urate et son produit d'oxydation. Ces différentes espèces possèderaient alors globalement la même structure, mais avec des charges différentes.

Cependant, nous constatons que d'une expérience à l'autre l'intensité et la longueur d'onde des pics de la solution d'urate sans enzyme ont des valeurs variables. Les différentes expérimentations que nous avons réalisées ont toujours donné des résultats peu reproductibles et peu fiables. La spectroscopie UV-visible ne semble pas être une technique adaptée pour nous permettre d'aller au bout de nos hypothèses.

#### ✓ **Autres analyses complémentaires**

Nous avons poursuivi nos investigations par des études en RMN du carbone, en spectroscopie de masse et en dichroïsme circulaire. Ces techniques ont été utilisées pour détecter la possible apparition d'un nouveau produit, une modification de la structure et/ou de la masse de l'urate, ainsi qu'une modification de la structure de l'enzyme.

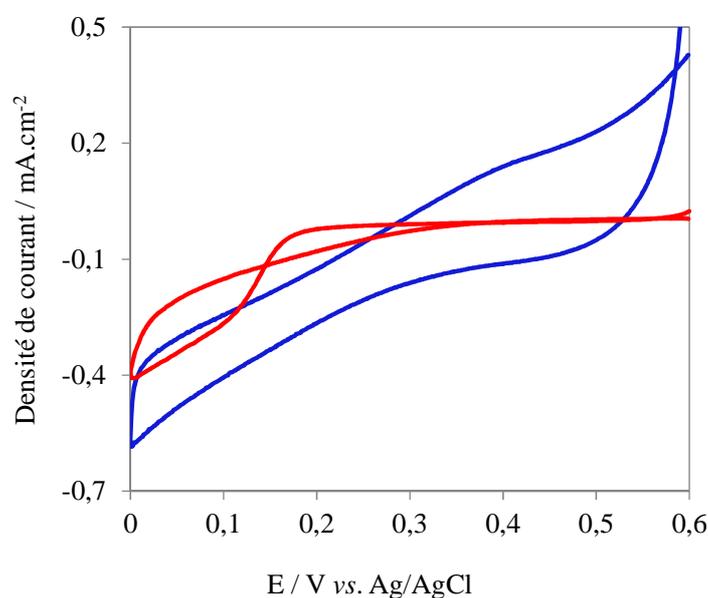
Cependant nos expériences ont été peu concluantes, cela étant notamment dû au fait que ces techniques requièrent d'importantes quantités d'enzyme. Or, ces expériences ont été réalisées avant l'optimisation récente des conditions de production des enzymes permettant d'obtenir de plus grands volumes.

#### **3.2.2.2.3. Utilisation de l'urate comme médiateur de *B. Pumilus***

Pour vérifier l'hypothèse de la médiation par l'urate nous avons d'abord réalisé des tests d'activité en spectroscopie UV-visible avec l'ABTS et la SGZ en présence d'urate. Aucune coloration n'a été observée dans les deux cas et aucun signal n'a pu être obtenu. Les résultats des

tests d'activité ne permettent donc pas d'étayer l'hypothèse d'une médiation par l'urate, mais montrent plutôt une inhibition de *B. pumilus* par l'urate en solution.

Par la suite nous avons réalisé des expériences en TED sur CCG. Nous avons déposé 3  $\mu\text{l}$  d'urate à 0,87 mM sur les électrodes suivi du dépôt après 15 min de 2,5  $\mu\text{l}$  BOD *B. pumilus* diluée à 11  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  dans l'eau distillée. Nous avons comparé le CV de réduction de l' $\text{O}_2$  de l'électrode de *B. pumilus* seule (Figure II.3.11 courbe bleue) avec celui de l'électrode de *B. pumilus* avec urate (Figure II.3.11 courbe rouge).



**Figure II.3.11.** Comparaison des CVs sous 1 atm  $\text{O}_2$  à  $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  des électrodes de CCG modifiées avec *B. pumilus* sans urate (bleu) et *B. pumilus* avec urate (rouge). Rotation à  $500 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$  dans le PBS.

L'électrode de CCG modifiée avec *B. pumilus* et l'urate (Figure II.3.11 courbe rouge) montre un courant plus faible que l'électrode avec *B. pumilus* seule (Figure II.3.11 courbe bleue). Cependant avec *B. pumilus* et l'urate nous constatons un décalage du potentiel de début de réduction de l' $\text{O}_2$  à  $\sim 0,2 \text{ V}$  au lieu de  $0,44 \text{ V}$ . Or en modifiant les électrodes de CCG avec l'urate seul nous n'avons obtenu aucun signal.

Un décalage du potentiel de réduction de l'O<sub>2</sub> vers une valeur plus réductrice a déjà été observé par Kjaergaard et al. avec *M. oryzae* [48]. Ils ont montré que cette BOD peut exister sous deux états rédox différents lorsqu'elle est au repos (pas de catalyse de la réduction de l'O<sub>2</sub>).

On distingue une forme totalement oxydée présentant les caractéristiques spectroscopiques classiques des MCOs décrites au chapitre I et une forme dite alternative qui est partiellement oxydée. L'étude spectroscopique et cristallographique de cette forme alternative a montré une disparition en UV-visible à 300 nm du signal caractéristique de la paire d'ions cuivriques T3, un décalage et une baisse de l'intensité du signal du T2 en EPR et une augmentation de la distance entre les deux cuivres T3.

En fonction des conditions expérimentales *M. oryzae* peut passer rapidement d'une forme à l'autre. Immobilisée en TED sur une électrode de SPGE la forme alternative commence la réduction de l'O<sub>2</sub> à un potentiel plus réducteur d'environ 0,2 V vs. Ag/AgCl par rapport à la forme oxydée. Par la suite, la forme alternative ayant été activée par réduction est convertie en forme oxydée.

Il se pourrait donc qu'en présence d'urate il y ait une variation de l'état rédox de *B. pumilus* se traduisant par une modification du potentiel de début de réduction de l'O<sub>2</sub> qui est alors de ~ 0,2 V vs. Ag/AgCl sur CCG. Or les études de Kang et al. ont montré qu'en présence de BOD et d'O<sub>2</sub> l'urate s'oxyde et nous avons constaté en figure II.3.8.B courbe rouge que l'oxydation de l'urate se fait autour de 0,25 V vs. Ag/AgCl sur CCG. Nous pouvons donc supposer que dans son état rédox alternatif *B. pumilus* pourrait réduire en totalité ou en partie le produit issu de l'oxydation de l'urate. Cela pourrait expliquer l'augmentation du courant de réduction observé lors de l'ajout d'urate. Par la suite, au cours de la réduction continue de l'O<sub>2</sub> l'état rédox alternatif n'étant pas permanent *B. pumilus* revient à son état rédox initial et se comporte comme les autres BODs en présence d'urate.

Au final, même si l'immobilisation conjointe de l'urate avec *B. pumilus* ne nous a pas permis d'obtenir de meilleur courant elle a mis en évidence l'existence d'une possible interaction entre l'urate et le site actif de *B. pumilus*. Nous pouvons également supposer que sans être un médiateur, l'urate pourrait interagir avec *B. pumilus* en favorisant son orientation sur l'électrode comme nous l'avons vu au chapitre précédent avec la bilirubine par exemple. On a alors dans un premier temps l'augmentation de courant au moment de l'ajout liée à une modification de

conformation de l'enzyme. Il serait donc intéressant d'essayer d'étudier plus en détail de la même façon que pour *M. oryzae*, l'existence d'une forme alternative de *B. pumilus*, mais également d'essayer d'optimiser les paramètres de l'expérience d'immobilisation conjointe de *B. pumilus* avec l'urate.

### 3.3. Conclusion intermédiaire

L'urate est un constituant majeur du sérum connu pour inhiber l'activité de la BOD de *T. tsunodae*, nous avons pu également observer cet effet sur *M. oryzae*. Nous avons montré que *B. pumilus* est capable de conserver son activité dans le sérum grâce à sa tolérance à l'urate. Après plus de 3 heures de rotation continue dans le sérum, *B. pumilus* ne perd que 9 % d'activité contre 38 % pour *T. tsunodae*.

La composition de l'hydrogel rédox de *B. pumilus* et la concentration en phosphates en particulier influencent à la fois la stabilité de l'enzyme et la densité de courant générée. Nous avons démontré qu'un hydrogel ayant une forte concentration de phosphates sera plus stable en présence d'urate mais produira un courant moins important qu'un hydrogel de plus faible concentration en phosphate. Ainsi, la réalisation d'électrodes performantes avec *B. pumilus* passerait par un compromis entre tolérance à l'urate et densité de courant.

L'augmentation du courant de réduction observée avec *B. pumilus* en présence d'urate reste difficile à expliquer. Nous avons formulé diverses hypothèses pour essayer de comprendre cet effet de l'urate. Nous avons supposé que cette augmentation pouvait être liée à la réduction de l'urate par la *B. pumilus* ou à la réduction du produit d'oxydation de l'urate ou encore à l'action de l'urate comme un médiateur pour *B. pumilus*. Des différentes hypothèses formulées, celle d'une possible réduction du produit d'oxydation de l'urate est la seule qui pour le moment ne peut être totalement écartée. Cependant, l'identification de ce produit reste complexe ce qui limite la compréhension des mécanismes réactionnels et des interactions possibles entre les enzymes et l'urate. Des études cristallographiques combinées de *B. pumilus* en présence d'urate permettraient de visualiser les possibles interactions entre ces deux molécules et de comprendre l'effet observé en électrochimie.

En dépit des zones d'ombre qui restent à éclaircir, la nouvelle BOD de *B. pumilus* avec sa haute activité, sa tolérance élevée à l'urate et aux chlorures, et sa forte stabilité thermique est très prometteuse pour le développement de cathodes pour biopiles fonctionnant dans des conditions

physiologiques. Sa restriction majeure étant sa faible efficacité en TED, nous avons opté pour la BOD de *M. oryzae* afin d'étudier les performances de nouvelles matrices carbonées contenant des nanoparticules d'or.

## 4. Elaboration d'électrodes tridimensionnelles poreuses avec *M. oryzae*

### 4.1. Introduction

L'utilisation d'électrodes poreuses tridimensionnelles permet d'augmenter la quantité d'enzymes connectées. De précédentes études menées sur des bioélectrodes carbonées à porosité hiérarchisée ont permis de mettre en évidence en TED et TEM (avec un polymère rédox à osmium), l'efficacité de ce type de matériaux aussi bien à l'anode avec la GOx [49] qu'à la cathode avec la BOD [10, 50].

La macroporosité associée à une surface spécifique élevée a permis d'optimiser dans le cas du TEM, à la fois l'accessibilité aux centres rédox et les mécanismes de transport électronique au sein de la couche d'hydrogel. Dans le cas du TED il a été observé une optimisation du transfert électronique à l'interface avec l'enzyme, initiée par le matériau carboné macrocellulaire.

Dans notre premier chapitre nous avons pu constater que les BODs peuvent être efficacement immobilisées en TED sur des électrodes d'or. Nous avons donc supposé que la réalisation d'électrodes de carbone poreuses contenant des nanoparticules d'or pourrait considérablement améliorer les courants catalytiques, en augmentant la conductivité des électrodes ou en améliorant la connexion des enzymes. Ces nouveaux matériaux ont été synthétisés et caractérisés par Martin Depardieu, doctorant au CRPP dans l'équipe du Professeur Rénal Backov.

### 4.2. Hypothèse de travail

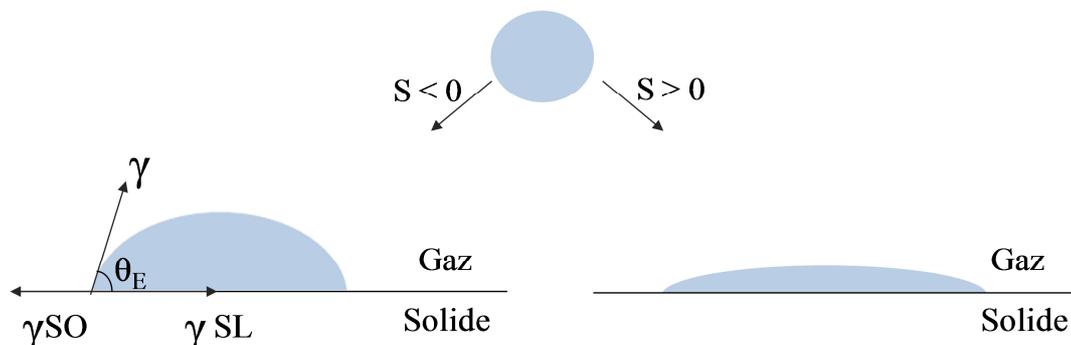
Les parois de carbone et les nanoparticules d'or ont des énergies de surface différentes et de ce fait leur mouillabilité vis-à-vis de la solution enzymatique n'est pas la même. Les métaux sont des matériaux ayant une énergie de surface élevée avec des liaisons de haute énergie ~ quelques eV. Par contre, les matériaux carbonés présentent souvent des hétéroatomes de surface principalement l'oxygène, conduisant à la formation de groupements COOH, OH, et COOR [51-

52]. Ces groupements minimisent l'énergie de surface des matériaux carbonés qui est déjà intrinsèquement inférieure à celle des métaux (liaisons de basse énergie  $\sim kT$ ).

La mouillabilité des solutions de faible viscosité est régit par le paramètre d'étalement « S » ou «critère de mouillage » (Equation II.4.1) adressé par la règle de Zisman (Figure II.4.1) [53-54].

$$S = \gamma_{SO} - (\gamma_{SL} + \gamma) \quad (\text{Equation II.4.1})$$

S mesure la différence entre la tension de surface du solide sec  $\gamma_{SO}$  et celle du solide mouillé  $(\gamma_{SL} + \gamma)$  où  $\gamma_{SL}$  est la tension interfaciale liquide-solide et  $\gamma$  la tension interfaciale liquide-air.



**Figure II.4.1.** Mouillabilité d'une surface plane.

L'étalement d'un liquide sur une surface solide est total ( $S > 0$ ) si celle-ci est moins polarisable que le solide [55]. Les liquides comme l'eau vont donc facilement s'étaler sur les matériaux de haute énergie comme les métaux, alors que l'étalement sera moindre sur les matériaux carbonés en raison d'une différence de polarisabilité plus faible entre la surface du carbone et le liquide. Un carbone poreux contenant des nanoparticules d'or devrait donc voir sa conductivité augmentée du fait du mouillage préférentiel de la solution enzymatique sur les nanoparticules métalliques.

### 4.3. Synthèse de carbones poreux contenant des nanoparticules d'or

Les carbones matriciels poreux ont été élaborés par une stratégie de « nanomoulage » consistant à imprégner un matériau inorganique poreux par un précurseur de carbone. Cette imprégnation est suivie de l'élimination de l'empreinte dure par lavage puis d'une pyrolyse en conditions non-oxydantes.

#### 4.3.1. Synthèse du matériau inorganique poreux Si-HIPE

L'empreinte dure utilisée pour l'élaboration de carbones monolithiques poreux est une empreinte de silice à porosité hiérarchisée. La synthèse des mousses de silice a été développée durant les travaux de thèse de Florent Carn [56]. Elle fait appel à une combinaison de matière molle et de chimie sol-gel typique des voies de synthèse de la chimie intégrative [57].

Pour réaliser l'empreinte de silice, on utilise une émulsion concentrée d'huile en solution aqueuse dite High Internal Phase Emulsion (HIPE), dans laquelle la phase aqueuse continue contient un précurseur de silice : le TEOS. La silice se condense au niveau des interfaces des gouttes, puis après lavage et calcination une mousse de silice poreuse désignée Si-HIPE est obtenue (Figure II.4.2).

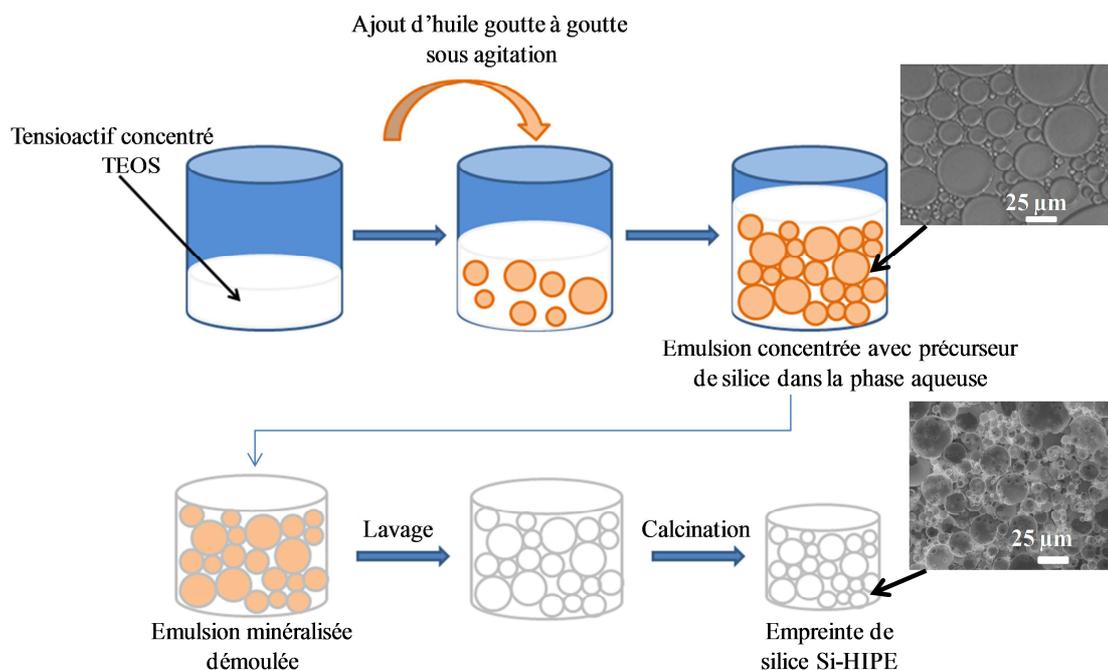
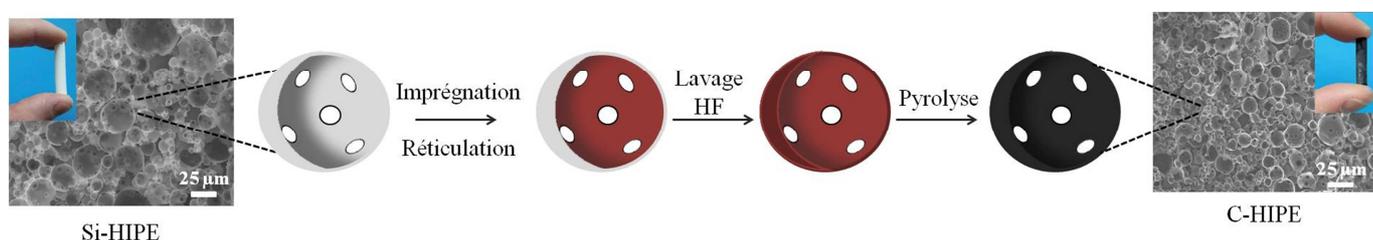


Figure II.4.2. Synthèse de l'empreinte dure de silice Si-HIPE.

### 4.3.2. Synthèse de carbones poreux et de nanoparticules d'or à partir des Si-HIPE

La synthèse de carbones poreux utilisant comme empreintes dures des Si-HIPE a été développée par Nicolas Brun lors de ses travaux de thèse [58]. La silice est imprégnée avec une solution contenant une résine phénolique qui se polymérise sur la mousse poreuse.

La silice est ensuite éliminée par lavage à l'acide fluorhydrique et le matériau est pyrolysé (Figure II.4.3). Le monolithe de carbone poreux obtenu est nommé C-HIPE. La résine d'imprégnation utilisée pour nos matériaux était concentrée à 60 % massique dans le THF, les matériaux ainsi obtenus ont donc été désignés C-HIPE<sub>(60Carb)</sub>.



**Figure II.4.3.** Mode opératoire de la synthèse d'un carbone poreux par imprégnation d'un monolithe de silice par une résine phénolique.

Les nanoparticules d'or sont ensuite synthétisées *in situ* par imprégnation de la mousse de carbone avec une solution de sel d'or. Après séchage et réduction du sel, les nanoparticules métalliques obtenues sont uniformément réparties à l'intérieur du monolithe de carbone poreux. Des matériaux contenant 5 %m et 15 %m de nanoparticules ont été réalisés, ils sont nommés 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> et 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (Figure II.4.4).

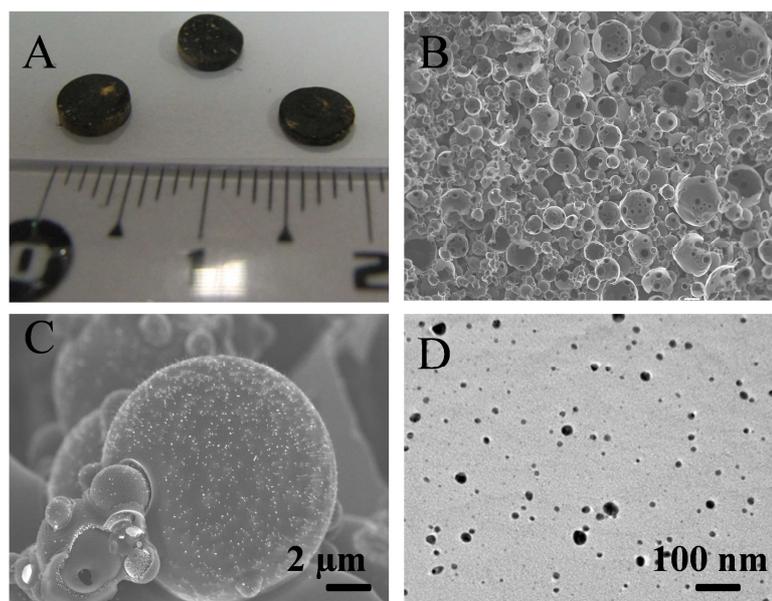


**Figure II.4.4.** Morphologie des disques de carbones poreux C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (A), 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (B), 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (C).

## 4.4. Caractérisation des matériaux

### 4.4.1. Etude microscopique

Les matériaux ont été analysés en microscopie électronique à balayage et en microscopie électronique à transmission haute résolution (Figure II.4.5).



**Figure II.4.5.** Morphologies globale des mousses carbonées chargées d'or : Photographie montrant le caractère monolithique des mousses 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (A). Cliché en microscopie électronique à balayage d'une mousse carbonée macrocellulaire C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (B). Cliché en microscopie électronique à balayage utilisant un détecteur d'électrons rétrodiffusés d'un matériau 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub>, les points brillants correspondent aux nanoparticules d'or ancrées à la surface macroporeuse (C). Cliché en microscopie électronique à transmission haute résolution d'un matériau 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (D).

Qu'ils contiennent ou non de l'or les échantillons se présentent tous sous une forme monolithique (Figure II.4.5.A). La structure interne du matériau à l'échelle macroscopique observée par microscopie électronique à balayage montre des sphères creuses interconnectées (Figure II.4.5.B). Ces sphères sont entourées de vide ce qui donne au matériau un volume libre important. Cette structure est similaire d'un échantillon à l'autre.

L'utilisation d'un détecteur d'électrons rétrodiffusés permet de mettre en évidence la présence de particules métalliques. Les points brillants à la surface des sphères creuses (Figure II.4.5.C) correspondent aux zones diffusant fortement les électrons, c'est-à-dire celles portant de hautes densités électroniques correspondant aux nanoparticules d'or. Les nanoparticules d'or sont réparties dans tout le matériau de façon homogène, mais la présence d'agrégats est parfois observée.

La microscopie électronique à transmission haute résolution permet d'observer la cristallinité des nanoparticules (Figure II.4.5.D). Ces dernières sont polycristallines et l'on observe également une polydispersité de taille. Cette grande polydispersité suppose que la nucléation hétérogène des nanoparticules d'or est distribuée au niveau des micropores, mais aussi à la surface des macropores où il se forme des particules de plus grand diamètre.

Ces différentes analyses montrent que les hôtes carbonés chargés d'or sont donc des monolithes poreux portant nanoparticules métalliques ancrées à la surface des macropores. Les analyses de porosimétrie à intrusion de mercure permettant d'obtenir les tailles des interconnexions entre les pores et les mesures de porosité par physisorption d'azote sont actuellement en cours.

#### 4.4.2. Analyse élémentaire

L'analyse des matériaux à l'échelle microscopique consiste notamment à déterminer la quantité d'or présent dans les matériaux. Les analyses élémentaires ont permis de déterminer les pourcentages massiques exacts d'or contenu dans les matériaux (Tableau II.4.1).

Matériaux	Pourcentage d'or (%m)
5-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	7,88
15-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	14,4

**Tableau II.4.1.** Pourcentage massique d'or contenu dans les différents matériaux.

Le matériau 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> a un pourcentage massique d'or plus important que celui théoriquement attendu. Quant au matériau 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> son pourcentage massique d'or est un peu plus faible. Ces différences entre les valeurs théoriques et les valeurs réelles peuvent être dues à une répartition non homogène des nanoparticules dans l'ensemble du matériau. Ainsi, la fraction du matériau utilisée pour l'analyse élémentaire peut être plus ou moins chargée en or. Dans tous les cas nous avons bien une proportion d'or croissante avec la quantité de précurseur introduite initialement.

#### 4.4.3. Mesures de conductivité

Avant de réaliser notre étude électrochimique nous avons mesuré la résistivité des matériaux avec un multimètre (Tableau II.4.2).

Matériaux	Résistivité (Ohm)
C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	10,5
5-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	5,4
15-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	4,9

**Tableau II.4.2.** Résistivité des différents matériaux mesurée au multimètre.

La résistivité est inversement proportionnelle à la conductivité. Nous pouvons constater que la conductivité des matériaux contenant des nanoparticules d'or est supérieure à celle des matériaux sans or. Elle augmente de 53 % lorsque l'on ajoute 15 %m de nanoparticules d'or dans le carbone matriciel. Bien que l'on observe des différences non négligeables entre les Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> et le C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> il n'y a que 9 % d'augmentation de conductivité entre les matériaux à 5 %m et 15 %m d'or.

La conductivité du matériau dépend autant de la composition que de la structure, de la porosité ou encore des défauts de l'échantillon. Les chemins de conduction dans nos matériaux sont sûrement assez tortueux, il est donc difficile d'obtenir avec un multimètre des valeurs très justes ce qui peut expliquer la faible différence entre les matériaux contenant de l'or. Néanmoins,

les résultats obtenus supposent qu'en électrochimie les matériaux Au@C-HIPE devraient être plus performants que le C-HIPE sans or.

#### 4.5. Mesures électrochimiques

Nous avons réalisé notre étude avec la BOD *M. oryzae* produite et purifiée selon un protocole précédemment décrit [12] puis conservée à 46,32 mg.ml<sup>-1</sup> dans du tampon phosphate de sodium à 50 mM pH 7,6 sans chlore. Pour nos analyses nous avons dilué l'enzyme dans l'eau jusqu'à 1,7 mg.ml<sup>-1</sup> avant dépôt sur l'électrode.

Dans un premier temps, nous avons vérifié pour chacun des carbones poreux qu'ils ne catalysaient pas la réduction de l'O<sub>2</sub> en absence d'enzyme immobilisée. Etant donné la sensibilité au chlore de *M. oryzae* toutes les mesures ont été réalisées dans du tampon phosphate de sodium 20 mM sans chlore à pH 7,2 à 37 °C. Le même tampon avait également été utilisé avec *T. tsunodae* dans les travaux précédents de Flexer et Brun [10, 50].

Les CVs ont été enregistrés à une vitesse de balayage en potentiel de 5 mV.s<sup>-1</sup> avec les électrodes en rotation à 1000 tr.min<sup>-1</sup>. Les densités de courant mesurées ont été normalisées par rapport à la surface géométrique des électrodes.

##### 4.5.1. Mesures sur des électrodes séchées à 4 °C

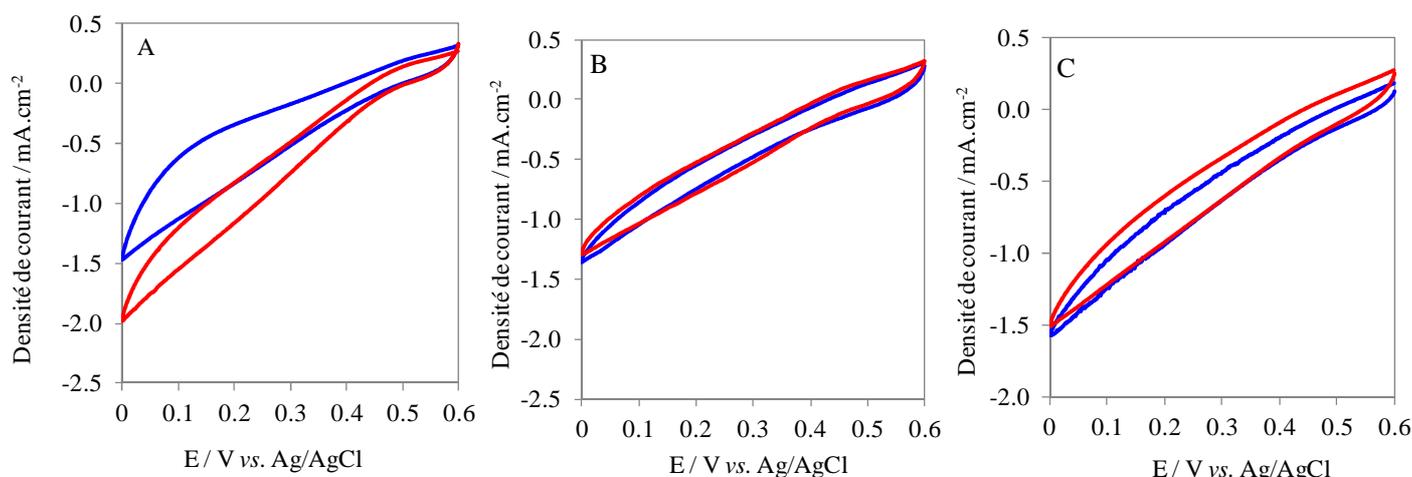
Les électrodes imprégnées de solution de *M. oryzae* à 1,7 mg.ml<sup>-1</sup> ont été séchées à 4 °C pendant 1h30. Puis elles ont été rincées avec 3 ml de tampon phosphate à 20 mM sans chlore et laissées à température ambiante pendant 30 min avant les mesures électrochimiques.

##### 4.5.1.1. Etude de la réduction de l'oxygène

Les densités de courant moyennes mesurées à + 0,1 V sur les CVs sous O<sub>2</sub> pour chaque matériau sont reportées dans le tableau II.4.3 :

Matériaux	Densités de courant moyennes (mA.cm <sup>-2</sup> )
C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	- 1,39 ± 0,16
5-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	- 0,92 ± 0,13
15-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	- 1,29 ± 0,07

**Tableau II.4.3.** Densités de courant moyennes mesurées à 0,1 V sur les CVs sous O<sub>2</sub> des électrodes séchées à 4 °C.



**Figure II.4.6.** CVs des électrodes de C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (A), 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (B), 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (C), séchées 1h30 à 4 °C. Mesures sous N<sub>2</sub> (bleu) et O<sub>2</sub> (rouge).

La densité de courant de l'électrode C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (Tableau II.4.3) ainsi que la forme du CV (Figure II.4.6.A courbe rouge) sont similaires aux résultats obtenus par Flexer et Brun sur des matériaux de même type [10, 50]. L'allure du CV sous O<sub>2</sub> est plus résistive que sur du carbone vitreux et on note l'absence de plateau. Cela est caractéristique d'une large distribution des constantes de vitesse de transfert électronique direct due à l'orientation multiple et aléatoire des enzymes. On peut également constater que le courant capacitif est ici plus important que ce qui est observé sur du carbone vitreux. Or le courant capacitif provient d'un réarrangement des charges à l'interface et est fonction de la porosité du matériau. Ainsi plus la surface active du matériau est importante plus le courant capacitif est élevé.

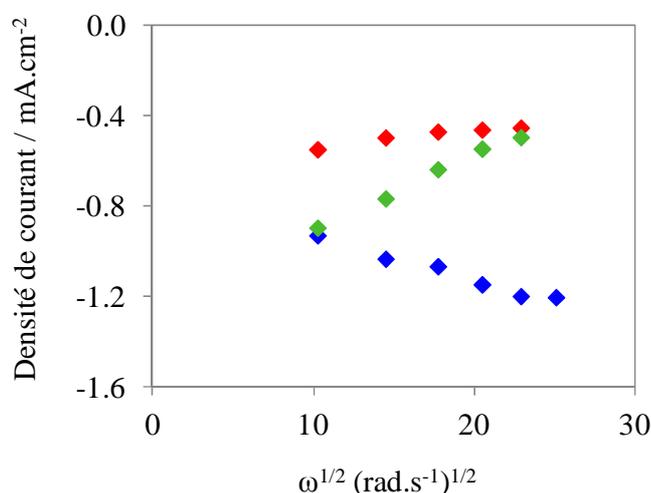
Par contre nous ne constatons pas d'amélioration de courant avec les nanoparticules d'or dans les matériaux 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> par rapport au C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (Tableau II.4.3). Au contraire les densités de courant moyennes diminuent lorsque le pourcentage massique d'or

augmente. De plus, il n'y a quasiment aucune différence entre les CVs sous N<sub>2</sub> et sous O<sub>2</sub> pour les électrodes à 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (Figure II.4.6.B). Ce qui suppose que dans ces matériaux les enzymes sont peu ou mal immobilisées, la réduction de l'O<sub>2</sub> ne se faisant donc pas efficacement.

Par contre pour le 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> même si les CVs sous N<sub>2</sub> et sous O<sub>2</sub> sont semblables (Figure II.4.6.C) on a une densité de courant plus importante que pour le 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (Tableau II.4.3). Cette différence peut être attribuée à un effet de la conductivité du matériau, vu que même sans enzyme un courant plus élevé est obtenu pour le 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> par rapport au 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub>.

#### 4.5.1.2. Etude de la diffusion de l'oxygène dans les matériaux

Dans les électrodes macroporeuses de Nicolas Brun la densité de courant était étroitement liée à la vitesse angulaire  $\omega$ , ce qui est typique d'une limitation relative au transport de masse [10]. Aussi, pour chacune de nos électrodes nous avons fait varier la vitesse de rotation par pas de 1000 tr.min<sup>-1</sup> toutes les 200 secondes, afin d'augmenter la diffusion de l'O<sub>2</sub> au sein du matériau (Figure II.4.7).



**Figure II.4.7.** Densités de courant en fonction de la racine carrée de la vitesse angulaire de l'électrode, mesurées sur les chronoampérogrammes à +0,1 V vs. Ag/AgCl pour les électrodes de C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (bleu), 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (rouge) et 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (vert) sous O<sub>2</sub> à 37 °C, 1 tr.min<sup>-1</sup> = 2π/60 rad.s<sup>-1</sup>.

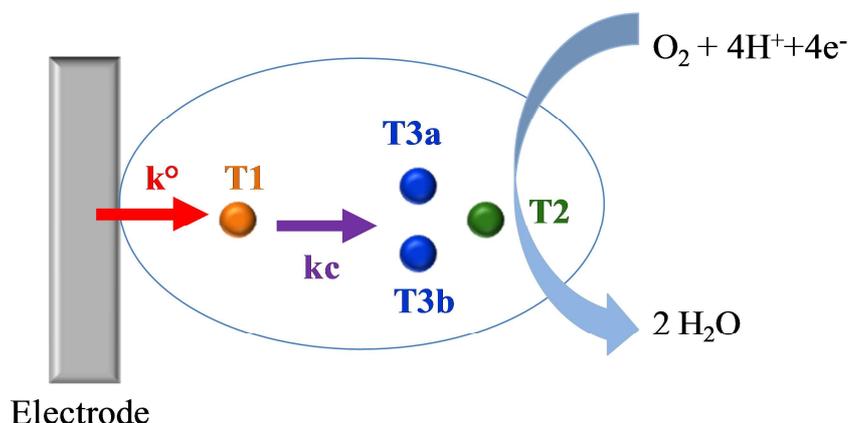
Contrairement à l'électrode C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> qui augmente son courant catalytique avec la vitesse de rotation (Figure II.4.7 points bleus), on constate que les électrodes 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (Figure II.4.7 points rouges), et 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (Figure II.4.7 points verts), perdent leur courant rapidement. Ce qui confirme un problème d'immobilisation de l'enzyme dans ces matériaux.

En rajoutant de l'ABTS après l'enregistrement des CVs, nous avons constaté une coloration verte du tampon, signalant la présence d'enzyme en solution et non plus dans le matériau. Plus les matériaux contiennent de l'or, plus l'intensité de la coloration verte de la solution est importante. Les CVs enregistrés en présence d'ABTS dans chaque cas montraient une faible augmentation d'environ 5 % du courant initial à + 0,1 V.

Ces résultats montrent que même si il y a bien une connexion entre l'enzyme et les électrodes contenant des nanoparticules d'or, il y a un relargage des enzymes en solution. Ainsi, des enzymes peu ou mal immobilisées seront d'autant plus rapidement relarguées en solution que la rotation de l'électrode sera forte.

#### 4.5.1.3. Traitement des données

Kano et Ikeda ont développé un formalisme permettant d'obtenir des informations sur les mécanismes cinétiques se produisant dans les matériaux sur lesquels une BOD est adsorbé en TED (Figure II.4.8).



**Figure II.4.8.** Représentation schématique de la réduction de l'O<sub>2</sub> en TED, mise en évidence des constantes k° (rouge) et kc (violet).

La constante  $k^\circ$  correspond à la vitesse de transfert des électrons de l'électrode à l'enzyme. Cette constante permet donc de comparer le comportement de l'enzyme sur une électrode selon la composition du matériau. La constante catalytique  $k_c$  est une fonction de la constante de vitesse du transfert électronique intramoléculaire du T1 au centre trinuécléaire, et de la constante de vitesse du transfert électronique intermoléculaire pour la réduction de l' $O_2$  au niveau du centre trinuécléaire. La constante catalytique  $k_c$  est supposée identique au  $k_{cat}$  de *M. verrucaria* en solution ( $250 \text{ s}^{-1}$ ) déterminé par des équations de type Michaelis Menten [59]. Dans une première approximation nous considérons que le  $k_{cat}$  de *M. oryzae* est au moins égale à celui de *M. verrucaria*.

En se basant sur ce modèle nous avons ajusté nos courbes expérimentales en utilisant le formalisme développé par Kano et Ikeda, permettant d'exprimer le courant en fonction des constantes  $k^\circ$  et  $k_c$  (Equation II.4.1) [60].

$$I = \frac{nFk_c\Gamma_t}{1+k_c/k_f+k_b/k_f} \quad (\text{Equation II.4.1})$$

où  $I$  est le courant ( $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ ),  $n$  le nombre d'électrons transférés ( $n = 1$ ),  $F$  la constante de Faraday ( $\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $k_c$  la constante catalytique maximale de la BOD en solution,  $\Gamma_t$  la concentration totale de BOD sur l'électrode ( $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ),  $\alpha$  le coefficient de transfert,  $k_f$  et  $k_b$  les constantes de vitesse des électrons.

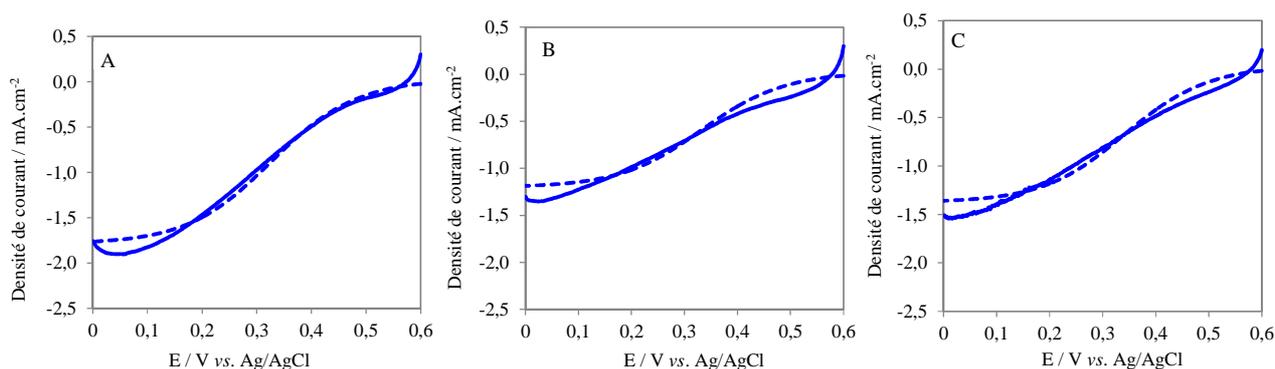
Les constantes de vitesse de transfert électronique  $k_f$  et  $k_b$  sont exprimées par les équations de type Butler-Volmer (Equation II.4.2.a et b) :

$$k_f = k^0 \exp[-\alpha(nF/RT)(E - E^0)] \quad (\text{Equation II.4.1.a})$$

$$k_b = k^0 \exp[(1 - \alpha)(nF/RT)(E - E^0)] \quad (\text{Equation II.4.1.b})$$

avec  $k^\circ$  la constante standard de taux de transfert d'électrons ( $s^{-1}$ ),  $\alpha$  le coefficient de transfert,  $E$  le potentiel appliqué (V vs. Ag/AgCl)  $E^\circ$  le potentiel thermodynamique du cuivre T1 de la BOD de *M. oryzae* (0,5 V vs. Ag/AgCl).

Nous avons ajusté les courbes de polarisation cathodiques pour chaque matériau en utilisant ce modèle théorique (Figure II.4.9). Les courants des courbes de polarisation et des courbes ajustées sont obtenus après soustraction du courant capacitif.



**Figure II.4.9.** Courbes de polarisation cathodiques (lignes pleines) des électrodes de C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (A), 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (B), 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (C), séchées 1h30 à 4 °C. Les courbes en pointillés correspondent aux courbes de polarisation ajustées avec le modèle de Kano et Ikeda.

Les courbes de polarisation cathodiques obtenues avec le modèle de Kano et Ikeda sont assez proches des courbes expérimentales avec un coefficient de détermination  $R^2$  de 0,97. Toutefois, nous constatons que l'ajustement se fait moins bien aux faibles potentiels, ce qui pourrait être dû à une limitation par le transport de masse. Nous constatons la même chose aux potentiels les plus élevés, dans ce cas il se pourrait que sur ces matériaux la réduction de l' $O_2$  ne commence pas exactement à + 0,5 V vs. Ag/AgCl.

L'ajustement des courbes de polarisation cathodiques (Figure II.4.9) nous a permis d'obtenir pour chaque matériau la concentration  $\Gamma t$  de BOD sur l'électrode et les valeurs des paramètres cinétiques  $k^\circ$  et  $\alpha$ . Pour tous les matériaux le coefficient de transfert  $\alpha$  est de 0,35 les valeurs du paramètre cinétique  $k^\circ$  et de la concentration  $\Gamma t$  de BOD sur l'électrode sont reportées au tableau II.4.4 :

	C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	5-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	15-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>
<b>k° (s<sup>-1</sup>)</b>	25	27	30
<b>Γt (mol.cm<sup>-2</sup>)</b>	7,42 x 10 <sup>-8</sup>	4,98 x 10 <sup>-8</sup>	5,70 x 10 <sup>-8</sup>

**Tableau II.4.4.** Paramètre cinétique k° et concentration Γt de BOD immobilisée sur l'électrode pour chaque matériau séché à 4 °C. Valeurs de k° et Γt déterminées par ajustement des courbes de polarisation avec le modèle de Kano et Ikeda.

Nous observons une diminution de la concentration de BOD lorsque le pourcentage d'or augmente (Tableau II.4.4). Ce qui corrobore notre hypothèse selon laquelle une plus faible quantité d'enzyme est immobilisée dans les matériaux à teneur élevée en or.

Pour les matériaux 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> et 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> la quantité d'enzyme immobilisée est la même, par contre la constante de vitesse de transfert des électrons à la surface des électrodes (k°) augmente avec le pourcentage d'or dans les matériaux. Ce qui est en adéquation avec l'augmentation de la conductivité des matériaux (Tableau II.4.2) permettant un meilleur transfert des électrons du matériau à l'enzyme.

Par contre entre 0 %m et 5 %m d'or le paramètre cinétique k° est le même (Tableau II.4.4). Nous supposons donc que dans ce cas, bien que la conductivité du matériau augmente (Tableau II.4.2), la teneur en or est encore trop faible pour accélérer le transfert d'électrons de l'électrode à l'enzyme. Au final plus on augmente la teneur en or du matériau, plus on augmente sa conductivité et la vitesse de transfert des électrons, par contre on diminue la quantité d'enzyme immobilisée.

Au vu de ces résultats nous avons essayé d'optimiser les conditions de séchage des électrodes, afin de maximiser l'infiltration de la solution enzymatique et donc d'augmenter la concentration de BOD dans les matériaux. Nous avons procédé à un séchage à plus haute température (25 °C) et ajouté un vide léger (-10 kPa).

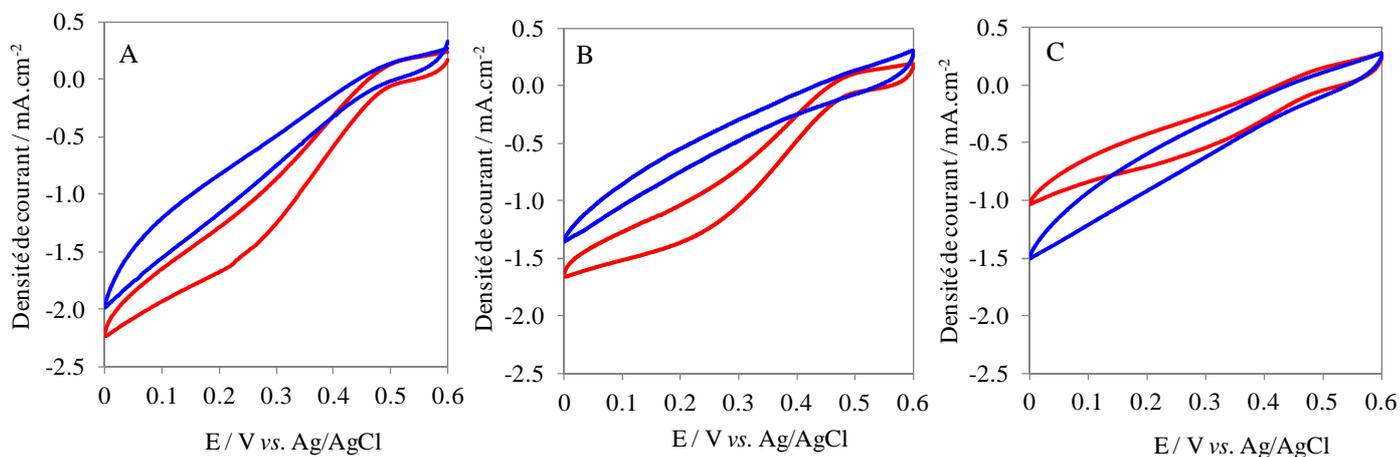
#### 4.5.2. Mesures sur des électrodes séchées sous vide à 25 °C

Etant donné que les enzymes étaient seulement adsorbées sur les matériaux, ces derniers ont pu être réutilisés facilement. Nous avons rincé abondamment les électrodes précédemment utilisées à l'eau distillée. Nous les avons laissées sécher 48 heures à température ambiante.

Pour nous assurer qu'il ne restait plus d'enzyme dans les matériaux, nous les avons testé en électrochimie sous O<sub>2</sub> dans le tampon phosphate à 20 mM sans chlore à pH 7,2. Les électrodes ont été à nouveau rincées à l'eau distillée et séchées 18 heures au four à 60 °C, puis 4 heures à température ambiante avant de réaliser un nouveau dépôt d'enzyme.

##### 4.5.2.1. Etude de la réduction de l'oxygène

Cette fois, le séchage des électrodes modifiées a été effectué pendant 1h30 à 25 °C dans un dessiccateur en appliquant un vide léger de -10 kPa. Les électrodes ont ensuite été rincées avec 3 ml de tampon phosphate à 20 mM sans chlore à pH 7,2, avant les mesures électrochimiques. La figure II.4.10 compare les résultats obtenus pour chaque type de matériau, en fonction des conditions de séchage.



**Figure II.4.10.** CVs sous O<sub>2</sub> des électrodes de C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (A), 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (B), 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (C), séchées à 4 °C (bleu) et au dessiccateur sous vide à 25 °C et -10 kPa (rouge).

Les CVs obtenus après séchage au dessiccateur sous vide à -10 kPa et 25 °C (Figure II.4.10 courbes rouges) présentent une allure plus sigmoïdale. On peut en effet mieux distinguer

l'inflexion correspondant au début de la catalyse et un plateau de réduction commence à se dessiner. Ces résultats laissent supposer qu'il y a une meilleure orientation des enzymes sur les électrodes.

Nous avons comparé les densités de courant obtenues après séchage à 4 °C et à 25 °C sous vide (Tableau II.4.5). Pour cette comparaison nous n'avons pas considéré le matériau 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> étant donné que le courant observé pour le séchage à 4 °C ne résulte pas d'une catalyse.

Matériaux	Séchage à 4 °C $j$ (mA.cm <sup>-2</sup> )	Séchage à 25 °C et -10 kPa $j$ (mA.cm <sup>-2</sup> )	Variation de courant (%)
C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	-1,39 ± 0,16	-1,93 ± 0,16	+ 39
5-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	- 0,92 ± 0,13	- 1,58 ± 0,03	+ 58

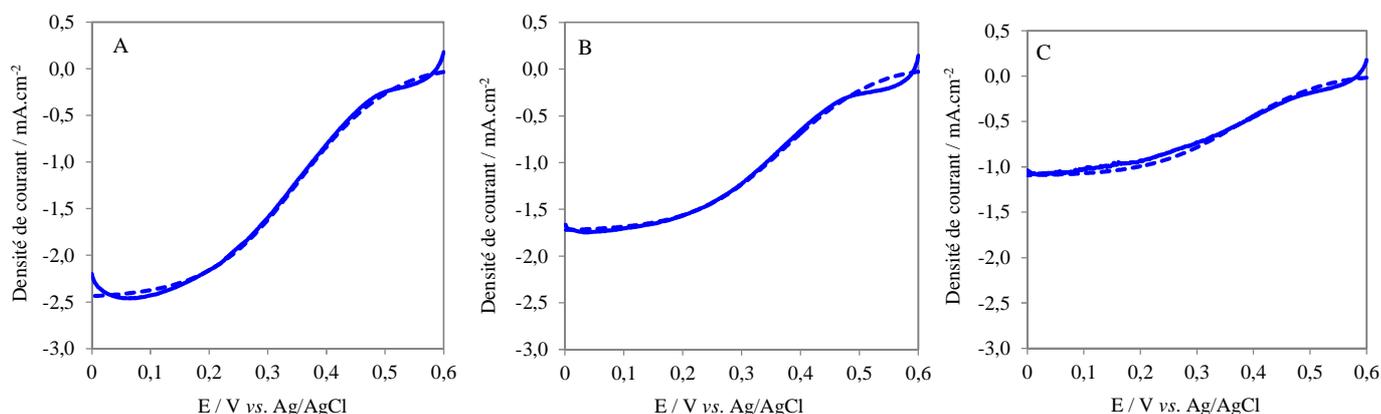
**Tableau II.4.5.** Comparaison des densités de courant mesurées à 0,1 V sur les CVs sous O<sub>2</sub> des électrodes séchées à 4 °C et à 25 °C sous vide.

En réalisant le séchage des électrodes à 25 °C sous vide, nous augmentons de 39 % la densité de courant des matériaux C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> et de 58 % celle des matériaux 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (Tableau II.4.5). Toutefois le CV sous O<sub>2</sub> du matériau 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> séché à 25 °C sous vide (Figure II.4.10.C courbe rouge) montre bien une inflexion à ~ 0,5 V et une allure indiquant qu'il se produit effectivement une réduction de l'O<sub>2</sub> catalysée par l'enzyme.

Nous avons également comparé la diffusion d'O<sub>2</sub> dans les matériaux, en faisant varier la vitesse de rotation des électrodes. Nous avons obtenus des résultats similaires à ceux de la figure II.4.7. Malgré une amélioration du courant catalytique au départ, la limite cinétique est plus rapidement atteinte avec 5 % d'or.

#### 4.5.2.2. Traitement des données

Comme dans le cas du séchage à 4 °C nous avons ajusté les courbes de polarisation cathodiques pour chaque matériau en utilisant le modèle théorique décrit par Kano et Ikeda (Figure II.4.11).



**Figure II.4.11.** Courbes de polarisation (lignes pleines) des électrodes de C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (A), 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (B), 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (C), séchées 1h30 à 25 °C et - 10 kPa. Les courbes en pointillés correspondent aux courbes de polarisation ajustées avec le modèle de Kano et Ikeda.

Pour tous les matériaux le coefficient de transfert  $\alpha$  est de 0,35 les valeurs du paramètre cinétique  $k^\circ$  et de la concentration  $\Gamma t$  de BOD sur l'électrode sont reportées au tableau II.4.6 :

	C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	5-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	15-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>
$k^\circ$ (s <sup>-1</sup> )	35	45	45
$\Gamma t$ (mol.cm <sup>-2</sup> )	1,02 x 10 <sup>-7</sup>	7,19 x 10 <sup>-8</sup>	4,57 x 10 <sup>-8</sup>

**Tableau II.4.6.** Paramètre cinétique  $k^\circ$  et concentration  $\Gamma t$  de BOD immobilisée sur l'électrode pour chaque matériau séché à 25 °C et - 10 kPa. Valeurs de  $k^\circ$  et  $\Gamma t$  déterminés par ajustement des courbes de polarisation avec le modèle de Kano et Ikeda.

Comme dans le cas du séchage à 4 °C, nous constatons une augmentation du paramètre  $k^\circ$  avec le pourcentage d'or dans les matériaux. Mais en parallèle nous observons une baisse de la concentration de BOD immobilisée sur l'électrode avec le pourcentage d'or dans les matériaux.

Nous avons comparé l'évolution du paramètre cinétique  $k^\circ$  en fonction des conditions de séchage (Tableau II.4.7) :

Matériaux	Séchage à 4 °C $k^\circ$ ( $s^{-1}$ )	Séchage à 25 °C et -10 kPa $k^\circ$ ( $s^{-1}$ )	Variation de $k^\circ$ (%)
<b>C-HIPE</b> <sub>(60Carb)</sub>	25	35	+ 40
<b>5-Au@C-HIPE</b> <sub>(60Carb)</sub>	27	45	+ 66
<b>15-Au@C-HIPE</b> <sub>(60Carb)</sub>	30	45	+ 50

**Tableau II.4.7.** Comparaison du paramètre cinétique  $k^\circ$  des électrodes séchées à 4 °C et à 25 °C sous vide.

En réalisant un séchage à 25 °C sous vide nous augmentons le paramètre cinétique  $k^\circ$  (Tableau II.4.7). Aussi nous pouvons supposer que dans ces conditions de séchage nous améliorons l'orientation et la connexion des enzymes sur les matériaux et donc les transferts électroniques.

Nous avons comparé la quantité de BOD immobilisée sur l'électrode en fonction des conditions de séchage (Tableau II.4.8) :

Matériaux	Séchage à 4 °C $\Gamma t$ ( $mol.cm^{-2}$ )	Séchage à 25 °C et -10 kPa $\Gamma t$ ( $mol.cm^{-2}$ )	Variation de $\Gamma t$ (%)
<b>C-HIPE</b> <sub>(60Carb)</sub>	$7,42 \times 10^{-8}$	$1,02 \times 10^{-7}$	+ 37
<b>5-Au@C-HIPE</b> <sub>(60Carb)</sub>	$4,98 \times 10^{-8}$	$7,19 \times 10^{-8}$	+ 44
<b>15-Au@C-HIPE</b> <sub>(60Carb)</sub>	$5,70 \times 10^{-8}$	$4,57 \times 10^{-8}$	- 19

**Tableau II.4.8.** Comparaison des concentrations de BOD sur les électrodes séchées à 4 °C et à 25 °C sous vide.

Le séchage des électrodes poreuses à 25 °C sous vide (- 10 kPa) nous permet d'augmenter la concentration d'enzymes immobilisées de 37 % pour les matériaux C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> et de 44 % pour les matériaux contenant 5 %m d'or. Par contre pour le matériau 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> on constate une perte de 19 %. Cependant ce résultat est à nuancer dans la mesure où pour ce matériau le CV sous O<sub>2</sub> à 4 °C (Figure II.4.6 courbe rouge) montrait un courant élevé qui était plus lié à un effet de conductivité intrinsèque qu'à un transport de charge électrocatalytique.

#### 4.5.2.3. Analyse des résultats et hypothèses

Le séchage sous vide permet d'augmenter la quantité d'enzymes infiltrées à l'intérieur de la matrice poreuse et/ou adsorbée à l'interface (Tableau II.4.8). En effet, lors du séchage à 4 °C la solution enzymatique infiltre les pores uniquement par pressions capillaires auxquelles s'oppose la pression de Laplace liée à l'air présent dans le matériau. Ces deux forces antagonistes finissent par s'équilibrer (équilibre mécanique) sans que l'infiltration de la solution enzymatique n'ait été optimisée. Par contre, l'application d'un vide léger déplace cet équilibre en minimisant la pression de Laplace et en favorisant la convection du fluide enzymatique au sein du matériau poreux.

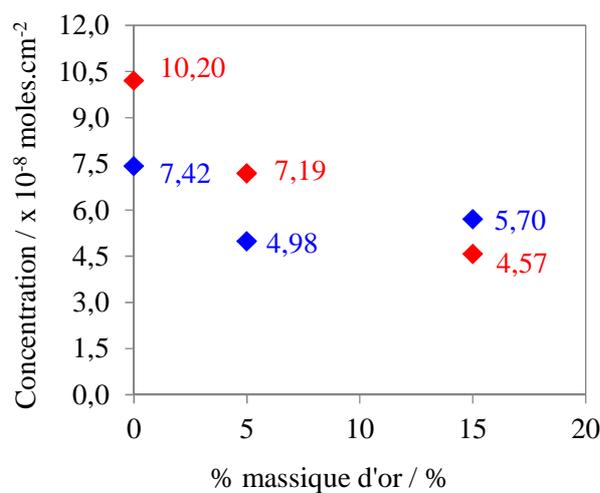
En outre, l'augmentation de la température de séchage de 4 °C à 25 °C pourrait également améliorer l'homogénéité de la répartition enzymatique au sein des architectures poreuses, notamment celles contenant de l'or. En particulier, la capacité calorifique (Cp) des éléments métalliques et du carbone matriciel est une grandeur thermodynamique importante à considérer dans nos configurations de séchage. Dans les conditions normales de température et de pression (25°C, 1 bar), elle est comprise entre 8,52 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup> et 8,30 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup> pour le carbone semi-graphitique et de 25,42 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup> pour l'or.

De ce fait, lors d'un séchage à 4 °C les nanoparticules d'or deviennent des points froids sur lesquels pourraient croître préférentiellement des cristaux de glace. Ces cristaux empêchent ainsi une bonne répartition/ancrage enzymatique à l'interface des nanoparticules d'or, ce qui n'est plus le cas à 25 °C.

En définitive, le séchage sous vide à 25 °C permet d'optimiser le transfert électronique grâce à l'augmentation de la proportion de BODs directement au contact de l'électrode et une meilleure connectivité induisant une orientation optimale de l'enzyme sur le matériau. La

distribution de constante de vitesse de transfert électronique est ainsi réduite et le mécanisme de transfert électronique est plus homogène d'une enzyme à l'autre, ce qui accélère la vitesse globale de transfert d'électrons.

Cependant, en comparant les résultats obtenus pour les différents matériaux qu'ils soient séchés à 4 °C (Figure II.4.12 points bleus) ou sous vide à 25 °C (Figure II.4.12 points rouges), nous constatons une diminution de la quantité de BOD immobilisée avec la teneur en or dans les matériaux.



**Figure II.4.12.** Concentration de BOD immobilisée sur des électrodes de Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> séchées 1h30 à 4 °C (bleu) et au dessiccateur sous vide à -10 kPa et 25 °C (rouge) en fonction du pourcentage massique en or.

Malgré l'amélioration du processus d'immobilisation des enzymes dans la matrice poreuse, il existe une limitation de l'infiltration due à la présence des nano particules d'or. Cela laisse supposer une possible obstruction des pores par les nanoparticules, ne permettant pas une immobilisation optimale des enzymes.

Des analyses de porosimétrie à intrusion de mercure et des mesures de porosité par physisorption d'azote ont été réalisées par Martin Depardieu sur des matériaux similaires. Ces analyses ont montré qu'il se produit effectivement une perte de porosité en présence de nanoparticules d'or et cette baisse est croissante avec le pourcentage de particules métalliques[61].

Afin d'éviter l'obstruction des pores par les nanoparticules d'or, nous avons envisagé une autre méthode de synthèse. Nous avons choisit de synthétiser les nanoparticules d'or par une méthode séquentielle.

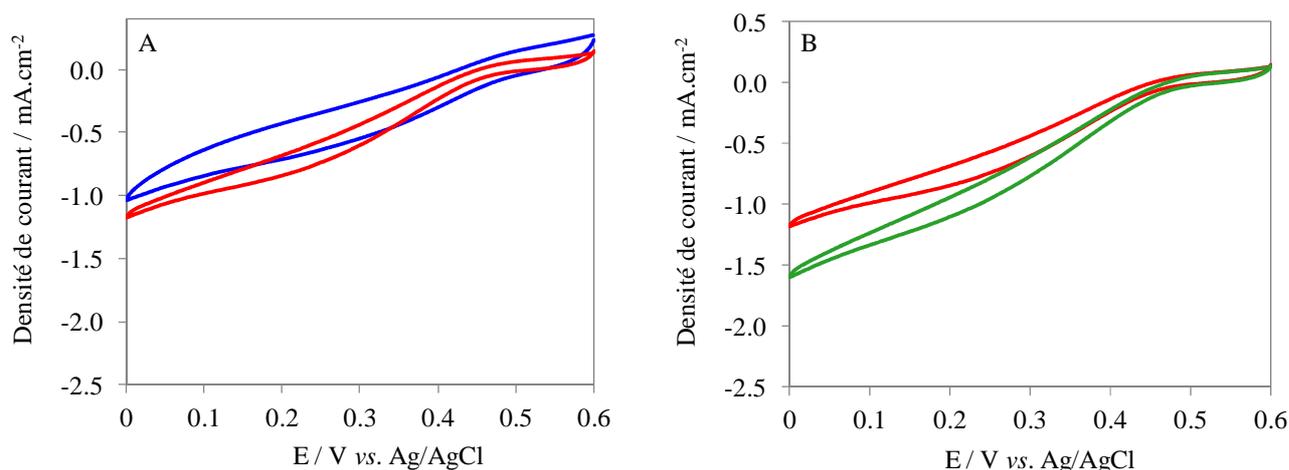
#### **4.5.3. Synthèse séquentielle des nano particules d'or**

Pour réaliser la synthèse séquentielle un échantillon 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> est réutilisé comme base pour un nouveau cycle d'imprégnation/réduction. A chaque nouveau cycle on augmente la concentration en nanoparticules d'or de façon séquentielle. Les premières particules d'or agissent comme points de nucléation pour les précurseurs introduits lors du deuxième cycle de croissance. L'objectif ici est de réduire le nombre d'évènements de nucléation à la surface du carbone menant à la croissance des particules et donc d'en limiter la quantité dans les pores.

Suivant le nombre de cycles d'imprégnation/réduction effectués (2 ou 3), les échantillons ont été nommés S-10Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> et S-15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub>. Cette nomenclature indique d'une part la nature séquentielle de la croissance des particules et d'autre part la concentration massique finale en or.

##### **4.5.3.1. Etude de a réduction de l'O<sub>2</sub>**

Sur les électrodes obtenues avec la méthode séquentielle nous avons réalisé le dépôt et le séchage de *M. oryzae* sous vide (-10 kPa) à 25 °C. Nous avons comparé entre eux les matériaux à 15 %m obtenus selon les deux méthodes de synthèse (Figure II.4.13.A) et les matériaux à 10 %m et 15 %m d'or obtenus selon la méthode séquentielle (Figure II.4.13.B).

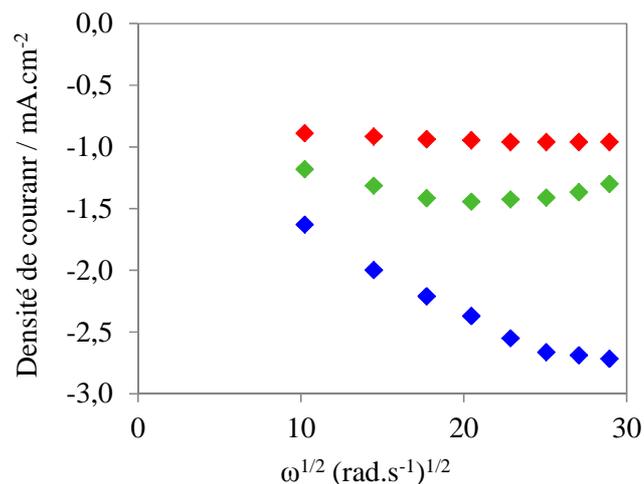


**Figure II.4.13.** Comparaison des CVs sous  $O_2$  des électrodes 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (bleu) et S-15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (rouge) (A). Comparaison des CVs sous  $O_2$  des électrodes S-15Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (rouge) et S-10-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (vert) (B). Electrodes séchées et au dessiccateur sous vide à 25 °C et -10 kPa.

En comparant les deux méthodes de synthèse pour les matériaux à 15 %m d'or, nous constatons une très faible augmentation du courant catalytique de  $\sim 16\%$  à + 0,1 V avec le matériau S-15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (Figure II.4.13.A rouge). De plus, l'allure mieux définie des cyclovoltammogrammes suppose une meilleure orientation des BODs sur l'électrode. On note également un courant capacitif moins important. Par contre le matériau S-10-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> donne un meilleur courant que le S-15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub>.

#### 4.5.3.2. Etude de la diffusion de l'oxygène dans les matériaux

Nous avons comparé la diffusion d' $O_2$  dans les matériaux S-Au@C-HIPE obtenus par synthèse séquentielle de nanoparticules d'or (Figure II.4.14).

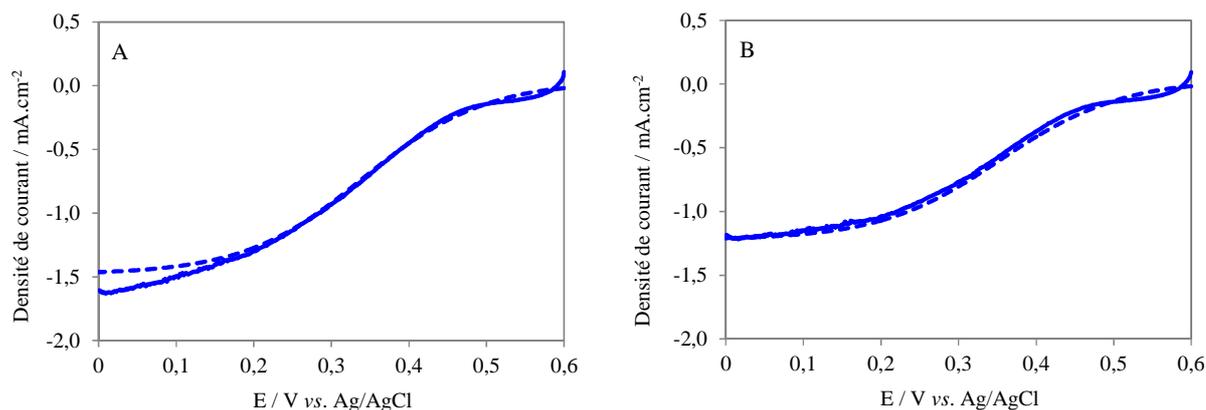


**Figure II.4.14.** Variation des courants catalytiques sous O<sub>2</sub> en fonction de la racine carrée de la vitesse angulaire de l'électrode, mesurés sur les chronoampérogrammes à + 0,1 V vs. Ag/AgCl pour les électrodes de C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (bleu), S-10-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (vert), S-15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (rouge), obtenus par synthèse séquentielle séchées à 25 °C -10 kPa, 1 tr.min<sup>-1</sup> = 2π/60 rad.s<sup>-1</sup>.

Nous constatons une légère augmentation du courant catalytique dans les matériaux S-10-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> aux faibles vitesses de rotation (points verts). Par la suite, la limite cinétique est plus rapidement atteinte que dans le cas des matériaux sans or (points bleus). Par contre pour le S-15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> le courant reste constant quelle que soit la vitesse de rotation (points rouge).

#### 4.5.3.3. Traitement des données

Nous avons ajusté les courbes de polarisation cathodiques pour chaque matériau en utilisant le modèle théorique décrit par Kano et Ikeda (Figure II.4.15).



**Figure II.4.15.** Courbes de polarisation cathodiques (lignes pleines) des électrodes de S-10-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (A) et S-15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (B), séchées 1h30 à 25 °C et - 10 kPa. Les courbes en pointillés correspondent aux courbes de polarisation ajustées avec le modèle de Kano et Ikeda.

Nous avons ensuite comparé les valeurs du paramètre cinétique  $k^\circ$  et de la concentration  $\Gamma t$  de BOD pour les électrodes obtenues selon les deux méthodes de synthèse (Tableau II.4.7) :

	Synthèse directe	Synthèse séquentielle	
	15-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	S10-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>	S15-Au@C-HIPE <sub>(60Carb)</sub>
$k^\circ$ (s <sup>-1</sup> )	45	30	35
$\Gamma t$ (mol.cm <sup>-2</sup> )	4,57 x 10 <sup>-8</sup>	6,14 x 10 <sup>-8</sup>	5,06 x 10 <sup>-8</sup>

**Tableau II.4.7.** Comparaison des paramètres cinétiques  $k^\circ$  et des concentrations de BOD pour les électrodes obtenues par synthèse séquentielle et synthèse directe.

La méthode de synthèse séquentielle des nanoparticules d'or permet d'augmenter de 34 % la concentration d'enzyme dans le carbone matriciel contenant 15 %m d'or. Nous constatons également une baisse de la valeur du paramètre cinétique  $k^\circ$  dans le cas des matériaux obtenus par synthèse séquentielle par rapport à la synthèse directe. Aussi nous pouvons supposer que plus on infiltre d'enzyme dans le matériau moins le transfert électronique de l'électrode à l'enzyme se fera rapidement car les molécules d'enzyme ne pourront pas toutes s'orienter de façon optimale

sur l'électrode. Ce qui explique que malgré l'immobilisation d'une quantité d'enzyme plus importante le gain de courant (Figure II.4.13.A) reste faible (16 %).

Lorsque l'on compare les deux matériaux obtenus par méthode séquentielle, nous obtenons un meilleur courant (Figure II.4.13.B) et une quantité de BOD plus importante pour le 10-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> par rapport au 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub> (Tableau II.4.7). Ainsi, bien que la méthode de synthèse séquentielle permette d'accroître la quantité d'enzyme immobilisée dans les matériaux, nous avons toujours une perte de porosité avec le pourcentage massique d'or.

#### 4.6. Conclusion intermédiaire

Afin d'améliorer les performances de la cathode enzymatique de *M. oryzae*, nous avons utilisé des matrices carbonées poreuses contenant des nanoparticules d'or. La solution enzymatique devrait préférentiellement mouiller les nanoparticules d'or et donc augmenter la connectivité des enzymes sur l'ensemble du matériau.

Nous avons obtenu une augmentation de la concentration d'enzyme connectée et donc du courant catalytique après séchage sous vide à 25 °C. L'allure plus sigmoïdale des CVs et l'augmentation du paramètre cinétique  $k^{\circ}$  obtenus pour ces conditions de séchage suggèrent qu'il y a une meilleure orientation des enzymes spécifiquement adsorbées sur l'électrode. Cependant, en présence de nanoparticules d'or la connexion entre l'enzyme et l'électrode se fait moins bien et il y a moins de BOD immobilisée. Les courants catalytiques obtenus sont faibles et ce même en augmentant la cinétique de pénétration du substrat dans l'épaisseur de l'électrode poreuse avec la vitesse de rotation de l'électrode. On constate au contraire une baisse de courant avec l'augmentation de la rotation due au relargage de l'enzyme en solution.

Nous avons présumé que les faibles courants et concentrations de BOD obtenus en présence d'or étaient dus à une perte de porosité, liée à l'obstruction des pores par les nanoparticules d'or. Nous avons supposé que l'obstruction des pores pourrait être réduite en modifiant le protocole de synthèse des matériaux.

Bien que pour une même quantité d'or les résultats obtenus avec une synthèse séquentielle soit plus encourageants, ils restent tout de même moins prometteurs que ceux obtenus sur des matériaux sans or. Ainsi, malgré le fait que la connectivité de l'enzyme sur les matériaux soit améliorée par les nouvelles conditions de séchage et la synthèse séquentielle des nanoparticules

d'or, la perte de porosité liée à la présence des nanoparticules métalliques reste un facteur limitant.

## Conclusion

A la suite des caractérisations biochimiques sur les deux nouvelles BODs de *M. oryzae* et de *B. pumilus*, nous avons réalisé l'étude électrochimique comparative de ces deux enzymes. Les propriétés structurales des deux BODs permettent d'expliquer les différences de comportement observé en électrochimie. Le potentiel plus élevé de *M. oryzae* serait lié à la structure plus hydrophobe de son site actif. La sensibilité au chlore de la cathode enzymatique à base de *M. oryzae* pourrait être liée à une plus grande accessibilité des anions Cl<sup>-</sup> au centre trinuécléaire. Malgré un potentiel plus faible *B. pumilus* montre une activité croissante avec la température, ainsi qu'une meilleure tolérance au chlore.

Les performances des deux nouvelles BODs sont dépendantes de la stratégie d'immobilisation utilisée. L'électrode de *M. oryzae* est plus performante en TED qu'en TEM, contrairement à celle de *B. pumilus*. En plus de la teneur en chlore et de la conductivité du tampon de mesure, le courant catalytique obtenu dépend aussi de la concentration en phosphate dans l'hydrogel, à laquelle *B. pumilus* est particulièrement sensible. A 23 mM de phosphate dans l'hydrogel, le courant de *B. pumilus* est plus faible de 47 % alors que celui de *M. oryzae* baisse seulement de 7 % par rapport à 1,7 mM de phosphate.

Nous avons montré que *B. pumilus* possède une tolérance élevée à l'urate à forte concentration de phosphate dans l'hydrogel. Ce qui rend cette enzyme capable de conserver son activité dans le sérum, où elle ne perd que 9 % d'activité après plus de 3 heures de rotation continue, contre 38 % pour *T. tsunodae*. Cependant la stabilité élevée obtenue à forte concentration de phosphate dans l'hydrogel, est contre balancée par un courant plus faible. D'où la nécessité de trouver un compromis entre tolérance à l'urate et densité de courant.

La déstabilisation observée sur les BODs, serait liée à l'interaction entre le produit d'oxydation de l'urate et les cuivres. L'identification de ce produit couplée à des études cristallographiques permettraient de comprendre les mécanismes réactionnels et les interactions possibles entre les enzymes et l'urate.

La BOD de *M. oryzae* nous a permis d'étudier les performances de nouveaux monolithes de carbones poreux contenant des nanoparticules d'or. Nous avons démontré que le séchage sous vide à 25 °C permet d'améliorer la connectivité des enzymes. Cependant contre toute attente, en présence d'or les courants catalytiques obtenus sont très faibles, et ce même en augmentant la cinétique de pénétration du substrat dans l'électrode avec la vitesse de rotation. Ces résultats pourraient être liés à une réduction de la porosité due à l'obstruction des pores par les nanoparticules d'or. L'utilisation d'une méthode de synthèse séquentielle des nanoparticules d'or, bien que permettant une amélioration de la connectivité, ne permet pas de palier à l'obstruction des pores.

Pour résoudre ce problème on pourrait essayer de faire varier la concentration de précurseur d'or mais également la température de réduction. La concentration de précurseur influence la taille des particules, quant à la température elle joue sur la vitesse de diffusion des particules au sein du carbone matriciel et sur la fusion des particules entre elle. Aussi en faisant varier ces deux paramètres on pourrait obtenir une composition optimale en or permettant d'améliorer les courants catalytiques tout en limitant la perte de porosité.

## Références bibliographiques du Chapitre II

1. Mano, N., et al., *An oxygen cathode operating in a physiological solution*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(22): p. 7.
2. Mano, N., H.-H. Kim, and A. Heller, *On the relationship between the characteristics of bilirubin oxidases and O<sub>2</sub> cathodes based on their "wiring"*. Journal of Physical Chemistry, 2002. **106**: p. 7.
3. Edembe, L., et al., *A highly efficient O<sub>2</sub> cathode based on bilirubin oxidase from Bacillus pumilus operating in serum*. Electrochemistry Communications, 2012. **23**: p. 3.
4. Talbot, N.J., *On the trail of a cereal killer : Exploring the biology of Magnaporthe grisea*. Annual Review of Microbiology, 2003. **57**(117-202).
5. Cadet, M., et al., *Design of a highly efficient O<sub>2</sub> cathode based on bilirubin oxidase from Magnaporthe oryzae*. Chemical Physical Chemistry, 2013: p. 4.
6. Benardini, J.N., et al., *Spore UV and acceleration resistance of endolithic Bacillus pumilus and Bacillus subtilis isolates obtained from Sonoran desert basalt: implications for lithopanspermia*. Astrobiology., 2003. **3**(4): p. 709-717.
7. Nicholson, W.L., et al., *Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments*. Microbiology and molecular biology reviews, 2000. **64**(3): p. 548-572.
8. Kempf, M.J., et al., *Recurrent isolation of hydrogen peroxide-resistant spores of Bacillus pumilus from a spacecraft assembly facility*. Astrobiology., 2005. **5**(3): p. 391-405.
9. Reiss, R., J. Ihssen, and L. Thöny-Meyer, *Bacillus pumilus laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum*. BMC Biotechnology, 2011. **11**(9).
10. Flexer, V., et al., *Porous mediator-free enzyme carbonaceous electrodes obtained through integrative chemistry for biofuel cells*. Energy and Environmental Science, 2011. **4**(6): p. 10.
11. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Bacillus pumilus: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 7.
12. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Magnaporthe oryzae: an attractive new enzyme for biotechnological applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. **96**(6): p. 10.
13. Brissos, V., et al., *Expression system of CotA-laccase for directed evolution and high-throughput screenings for the oxidation of high-redox potential dyes*. Biotechnology Journal, 2009. **4**(4): p. 558-563.
14. Pereira, L., et al., *Enzymatic biotransformation of the azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase*. Journal of Biotechnology, 2009. **139**(1): p. 68-77.
15. Liu, Y., J. Huang, and X. Zhang, *Decolorization and biodegradation of remazol brilliant blue R by bilirubin oxidase*. Journal of bioscience and bioengineering, 2009. **108**(6): p. 496-500.
16. Suraniti, E., et al., *Thermophilic biocathode with bilirubin oxidase from Bacillus pumilus*. Electrochemistry Communications, 2013. **26**: p. 4.
17. Mano, N. and F. Durand, *Bacillus pumilus bilirubin oxidase and applications thereof*. 2011.
18. Hirose, J., et al., *Anions binding to bilirubin oxidase from Trachyderma tsunoda K-2593*. Inorganica Chimica Acta, 1998. **273**: p. 9.
19. Suraniti, E., et al., *Heat and drying time modulate the O<sub>2</sub> reduction current of modified glassy carbon electrodes with bilirubin oxidases*. Bioelectrochemistry, 2012. **88**: p. 5.
20. Marshall, N.M., et al., *Rationally tuning the reduction potential of a single cupredoxin beyond the natural range* Nature, 2009. **462**: p. 113-116.
21. Marshall, N., *Fine-tuning the reduction potential of cupredoxin proteins by altering secondary coordination sphere interactions*. University of Illinois at Urbana-Champaign, 2011: p. 185 pages.
22. Miomandre, F., et al., *Électrochimie - 3e édition: Des concepts aux applications - Cours et exercices corrigés*. Hachette Livre, 2014: p. 352 pages.
23. Li, H., et al., *Determinants of the Relative Reduction Potentials of Type-I Copper Sites in Proteins*. Journal of American chemical society, 2004. **126**: p. 8010-8019.
24. Kamitaka, Y., et al., *Effects of axial ligand mutation of the type I copper site in bilirubin oxidase on direct electron transfer-type bioelectrocatalytic reduction of dioxygen*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2007. **601**: p. 6.

25. Hojati-Talemia, P., et al., *Using oxygen plasma treatment to improve the performance of electrodes for capacitive water deionization*. *Electrochimica Acta*, 2013. **106**: p. 494-499.
26. Champagne, P.-P., M.E. Nesheim, and J.A. Ramsay, *A mechanism for NaCl inhibition of Reactive Blue 19 decolorization and ABTS oxidation by laccase*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013. **97**: p. 6263–6269.
27. A. Zilly, et al., *Influence of NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on the kinetics and dye decolorization ability of crude laccase from Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011. **65**: p. 340-344.
28. Enaud, E., et al., *Laccase chloride inhibition reduction by anthraquinone substrate*. *Enzym Microb Technol*, 2011. **49**: p. 517-525.
29. Xu, F., *Dioxygen reactivity of laccase: dependence on laccase source, pH, and anion inhibition*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2001. **95**: p. 125-133.
30. Kepp, K.P., *Halide Binding and Inhibition of Laccase Copper Clusters: The Role of Reorganization Energy*. *Inorganic chemistry*, 2015. **54**: p. 476-483.
31. Bento, I., et al., *Mechanisms underlying dioxygen reduction in laccases. Structural and modelling studies focusing on proton transfer*. *BMC Structural Biology*, 2010. **10**(28).
32. Enguita, F.J., et al., *Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* 2004. **279** (22): p. 23472-23476.
33. Enguita, F.J., et al., *Crystal structure of a bacterial endospore coat component a laccase with enhanced thermostability properties*. *Journal of Biological Chemistry* 2, 2003. **78** (21): p. 19416-19425.
34. Heller, A., *Redox hydrogel-based electrochemical biosensors*. *Biosensors*, Jon Cooper & Tony Cass Oxford University Press, 2004. **2nd Edition**: p. 268 pages.
35. Heller, A., *Electron-conducting redox hydrogels: design, characteristics and synthesis*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006. **10**(6): p. 664–672.
36. Ju, H., Y. Gong, and H. Zhu, *Electrolyte Effects on Electrochemical Properties of Osmium Complex Polymer Modified Electrodes*. *Analytical sciences*, 2001. **17**: p. 59-63.
37. Mano, N., F. Mao, and A. Heller, *On the parameters affecting the characteristics of the "wired" glucose oxidase anode*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2005. **574**: p. 347-357.
38. Cracknell, J.A., K. Vincent, A. , and F.A. Armstrong, *Enzymes as Working or Inspirational Electrocatalysts for Fuel Cells and Electrolysis*. *Chemical Reviews*, 2008. **108**: p. 2439-2461.
39. Katz, E., A.N. Shipway, and I. Willner, *Biochemical fuel cells*. *Handbook of Fuel Cells Fundamentals, Technology and Applications*; Vielstich, W., Gasteiger, H. A., Lamm, A., Eds. John Wiley and Sons, Ltd.: London, 2003. **1**: p. p 355.
40. De Poulpique, A., et al., *Design of a H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> biofuel cell based on thermostable enzymes*. *Electrochemistry Communications*, 2014. **42**: p. 72-74.
41. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochimie*. De Boeck Supérieur, 2005. **Deuxième édition**: p. 1600 pages.
42. Kiran, R., et al., *Quasi-real time quantification of uric acid in urine using boron doped diamond microelectrode with in-situ cleaning*. *Analytical Chemistry*, 2012. **84**: p. 10207-10213.
43. Kang, C., H. Shin, and A. Heller, *On the stability of the "wired" bilirubin oxidase oxygen cathode in serum*. *Bioelectrochemistry*, 2006. **68**: p. 5.
44. Kang, C., et al., *Deactivation of bilirubin oxidase by a product of the reaction of urate and O<sub>2</sub>*. *Bioelectrochemistry*, 2004. **65**(1): p. 6.
45. Binyamin, G., T. Chen, and A. Heller, *Sources of instability of 'wired' enzyme anodes in serum: urate and transition metal ions*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2001. **500** p. 604 - 611.
46. Shin, W., H.-Y. Cho, and N.-S. Cho, *Screening of New Mediators for Lignin Degradation Based on Their Electrochemical Properties and Interactions with Fungal Laccase*. *Journal of Korea TAPPI*, 2006. **38**(5).
47. Shukla, M.K. and P.C. Mishra, *Electronic structures and spectra of two antioxidants: uric acid and ascorbic acid*. *Journal of Molecular Structure*, 1996. **377**: p. 247-259.
48. Kjaergaard, C.H., et al., *Spectroscopic and crystallographic characterization of "alternative resting" and "resting oxidized" enzyme forms of bilirubin oxidase: implications for activity and electrochemical behavior of multicopper oxidases*. *Journal of the American Chemical Society*, 2012. **134**: p. 4.

49. Brun, N., et al., *Emulsion-Templated Macroporous Carbons Synthesized By Hydrothermal Carbonization and their Application for the Enzymatic Oxidation of Glucose*. ChemSusChem, 2013. **6**: p. 701 – 710.
50. Flexer, V., et al., *A novel three-dimensional macrocellular carbonaceous biofuel cell*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**: p. 9.
51. Brun, N., et al., *Hard Macrocellular Silica Si(HIPE) Foams Templating Micro/Macroporous Carbonaceous Monoliths : Applications as Lithium Ion Battery Negative Electrodes and Electrochemical Capacitors*. . Advanced functional material, 2009. **19**(3136-3145).
52. Brun, N., et al., *Design of Hierarchical Porous Carbonaceous Foams from a Dual Template Approach and their use as Electrochemical Capacitor and Li-ion Battery Negative Electrodes*. . Journal of physical chemistry C, 2012. **116**: p. 1408-1421.
53. Zisman, W., *Contact angle wettability and adhesion*. Chemical series, Washington, 1964: p. p. 43.
54. Fox, H.W. and W.A. Zisman, *The spreading of liquids on low energy surfaces. I. polytetrafluoroethylene*. Journal of Colloid Science, 1950. **5**: p. 514-531.
55. De Gennes, P.G., F. Brochar-Wyart, and D. Quéré, *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Collection échelles, 2005. **Belin Edition**.
56. Carn, F., et al., *Inorganic monoliths hierarchically textured via concentrated direct emulsion and micellar templates*. Journal of Materials chemistry, 2004. **14**: p. 1370-1376.
57. Backov, R., *Combining soft matter and soft chemistry: Integrative chemistry towards designing novel and complex multiscale architectures*. Soft Matter 2006. **2**: p. 452-464.
58. Brun, N., et al., *Hard macrocellular silica Si(HIPE) foams templating micro/macroporous carbonaceous monoliths: applications as lithium ion battery negative electrodes and electrochemical capacitors*. . Advanced Materials, 2009. **19**: p. 3136-3145.
59. Tsujimura, S., K. Kano, and T. Ikeda, *Mediated bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water via bilirubin oxidase near neutral pH*. Abstract 204th meeting of the Electrochemical Society, 2003: p. 1230.
60. Tsujimura, S., et al., *Kinetic Study of Direct Bioelectrocatalysis of Dioxygen Reduction with Bilirubin Oxidase at Carbon Electrodes*. Electrochemistry, 2004. **72** (6): p. 437-439.
61. Depardieu, M., et al., *Novel Au/Pd@carbon macrocellular foams as electrodes for lithium-sulfur batteries*. Journal of Materials Chemistry A, 2014. **2**: p. 18047-18057.







## Chapitre 3 :

# Réalisation de cathodes bi-enzymatiques à base d'oxydases multi-cuivre

---



Sommaire

Introduction .....	188
1. Etude de la cathode bi-enzymatique <i>M</i> -BOD/ <i>P</i> -BOD.....	190
1.1. Réalisation de la cathode bi-enzymatique <i>M</i> -BOD/ <i>P</i> -BOD.....	190
1.1.1. Concept de la cathode bi-enzymatique.....	190
1.1.2. Préparation du mélange bi-enzymatique.....	191
1.2. Etude de la cathode bi-enzymatique à 30 %m de BOD totale dans l'hydrogel.....	191
1.2.1. Comparaison des densités de courant en fonction du ratio <i>M</i> -BOD/ <i>P</i> -BOD .....	191
1.2.2. Comparaison des potentiels de début de réduction de l'O <sub>2</sub> en fonction du ratio <i>M</i> -BOD/ <i>P</i> -BOD.....	192
1.2.2.1. Résultats expérimentaux.....	192
1.2.2.2. Analyse des résultats et hypothèses.....	194
1.2.3. Variation de la fraction massique de BOD totale dans l'hydrogel .....	195
1.2.4. Etude du dépôt de l'hydrogel bi-enzymatique 50 %v <i>M</i> -BOD / 50 %v <i>P</i> -BOD à 30 %m de BOD totale en deux étapes.....	196
1.2.4.1. Réalisation de la cathode bi-enzymatique en deux étapes.....	196
1.2.4.2. Influence du dépôt en deux étapes sur les densités de courant.....	196
1.2.4.3. Influence du dépôt en deux étapes sur les potentiels de début de réduction de l'O <sub>2</sub> .....	198
1.2.5. Tests d'activité en solution du mélange bi-enzymatique 50 %v <i>M</i> -BOD/50 %v <i>P</i> -BOD... ..	199
1.2.6. Comparaison avec les cathodes mono-enzymatiques à 15 %m de BOD totale dans l'hydrogel.....	200
1.3. Conclusion intermédiaire.....	202
2. Comparaison de l'effet des paramètres physiologiques sur la cathode bi-enzymatique par rapport aux cathodes mono-enzymatiques .....	202
2.1. Etude de l'effet de la température.....	202
2.2. Etude de l'effet du chlore .....	204
2.3. Effet de la conductivité et de la composition du tampon de mesure .....	205
2.4. Etude de l'effet de la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel et de l'urate.....	207
2.5. Comparaison des comportements en TED et TEM .....	208
2.6. Répartition des enzymes sur l'électrode.....	211
2.7. Cathode bi-enzymatique avec une <i>B. pumilus</i> inactive .....	212
2.7.1. Obtention de la <i>B. pumilus</i> inactive.....	212
2.7.2. Etude de la cathode bi-enzymatique 50 %v <i>M</i> -BOD / 50 %v GF-BOD .....	213
2.8. La biopile à cathode bi-enzymatique <i>B. pumilus</i> / <i>M. oryzae</i> .....	215
2.8.1. Optimisation des taux de recouvrement aux électrodes.....	215
2.8.2. Comparaison avec les biopiles aux cathodes mono-enzymatique 100 %v <i>P</i> -BOD et 100 %v <i>M</i> -BOD.....	217

2.9. Conclusion intermédiaire.....	218
3. La cathode bi-enzymatique <i>Bacillus pumilus</i> / <i>Podospora anserina</i> .....	219
3.1. Caractéristiques de la laccase de <i>Podospora anserina</i> .....	220
3.1.1. Caractéristiques biochimiques .....	220
3.1.2. Etude des potentiels de réduction de l'O <sub>2</sub> et des caractéristiques structurales .....	220
3.2. Effet du chlore et de la température.....	223
3.2.1. Effet du chlore .....	223
3.2.2. Effet de la température .....	224
3.2.3. Biopile avec la cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD .....	225
3.3. Conclusion intermédiaire.....	227
Conclusion.....	228
Références bibliographiques du chapitre III.....	230

## Introduction

Les méthodes les plus fréquemment utilisées pour améliorer les performances des cathodes enzymatiques sont : l'augmentation de la surface spécifique de l'électrode [1-7], le développement de nouveaux processus de transferts électroniques directs ou médiés, ou encore la recherche de nouvelles enzymes cathodiques [8-10]. Le génie enzymatique est également une stratégie particulièrement intéressante. Ce procédé permet d'améliorer les propriétés des enzymes existantes telles que l'activité catalytique, la tolérance à divers paramètres (température, chlore,...) ou encore le potentiel rédox.

L'ingénierie enzymatique a été appliquée avec succès aux enzymes anodiques [11-13] et aux laccases [14-15]. Cependant, cette approche nécessite une forte expertise en biologie moléculaire et peut être coûteuse et longue à mettre en œuvre. En outre, il est encore difficile de prévoir l'effet des mutations sur l'électrode. Dans de nombreux cas les résultats en électrochimie divergent des attentes théoriques [16-18]. Nous avons d'ailleurs pu le constater au chapitre précédent avec les mutations sur l'arginine 416 de *B. pumilus*.

Aussi, nous proposons ici une alternative basée sur un nouveau concept qui est la réalisation d'une cathode bi-enzymatique à base de MCOs. L'étude comparative de *Bacillus pumilus* et de *Magnaporthe oryzae* a mis en évidence pour ces deux enzymes des caractéristiques différentes mais complémentaires résumées dans le tableau III.1 :

	<i>B. pumilus</i>	<i>M. oryzae</i>
<b>Potentiel de début de réduction de l'O<sub>2</sub> en TEM dans le PBS (vs. Ag/AgCl)</b>	0,44 V	0,50 V
<b>Variation de courant après ajout de 140 mM NaCl dans du tampon phosphate 20 mM</b>	+ 63 %	- 7 %
<b>Variation de courant de 37 °C à 50 °C</b>	+ 39 %	- 44 %
<b>Pertes de courant de 1,7 mM à 23 mM de phosphate dans l'hydrogel</b>	- 47 %	- 7 %
<b>Pertes de courant après 8000 s de rotation dans 0,5 mM d'urate avec l'électrode opérant à + 0,1 V vs. Ag/AgCl</b>	- 4 %	- 48 %

**Tableau III.1.** Comparaison des propriétés de *M. oryzae* et de *B. pumilus*

La BOD de *M. oryzae* commence la réduction de l'O<sub>2</sub> un potentiel de + 0,50 V vs. Ag/AgCl, mais elle est très sensible au chlore, aux fortes températures et à l'urate. *A contrario*, la BOD de *B. pumilus* ne commence la réduction de l'O<sub>2</sub> qu'à un potentiel de + 0,44 V vs. Ag/AgCl mais présente une excellente activité en présence de chlore et à haute température, ainsi qu'une stabilité élevée en présence d'urate. Chacune de ces deux BODs a ses avantages et ses inconvénients, mais aucune d'elle ne présente à la fois toutes les caractéristiques idéales pour réaliser la cathode enzymatique la plus performante possible.

Aussi, au vu de leurs propriétés complémentaires nous avons choisi pour assurer la réduction de l'O<sub>2</sub> de combiner ces deux enzymes dans une cathode bi-enzymatique. Pour d'autres systèmes il a été montré que des enzymes d'espèces différentes peuvent être combinées et fonctionner en synergie [19-20]. Dans le cas de notre cathode bi-enzymatique il s'agit plutôt de tirer avantage à la fois des propriétés de *M. oryzae* et de *B. pumilus* et donc d'utiliser les effets coopératifs de deux enzymes de la même famille sur le même substrat.

Dans ce troisième chapitre nous présenterons d'abord les conditions de réalisation d'une cathode bi-enzymatique optimale à base de *B. pumilus* et de *M. oryzae*, puis l'étude de sa tolérance vis-à-vis des différents paramètres physiologiques : chlore, température, urate. Ensuite nous nous intéresserons aux performances des biopiles réalisées avec les différents types de cathodes mono- et bi-enzymatiques. Enfin nous présenterons de façon succincte les résultats obtenus dans les mêmes conditions pour une cathode bi-enzymatique à base de *B. pumilus* et d'une nouvelle laccase identifiée dans *Podospora anserina* [21].

Dans la suite de ce manuscrit, pour plus de commodité nous désignerons la BOD de *Bacillus pumilus* par l'abréviation P-BOD, celle de *Magnaporthe oryzae* par M-BOD et la laccase de *Podospora anserina* par A-Lac.

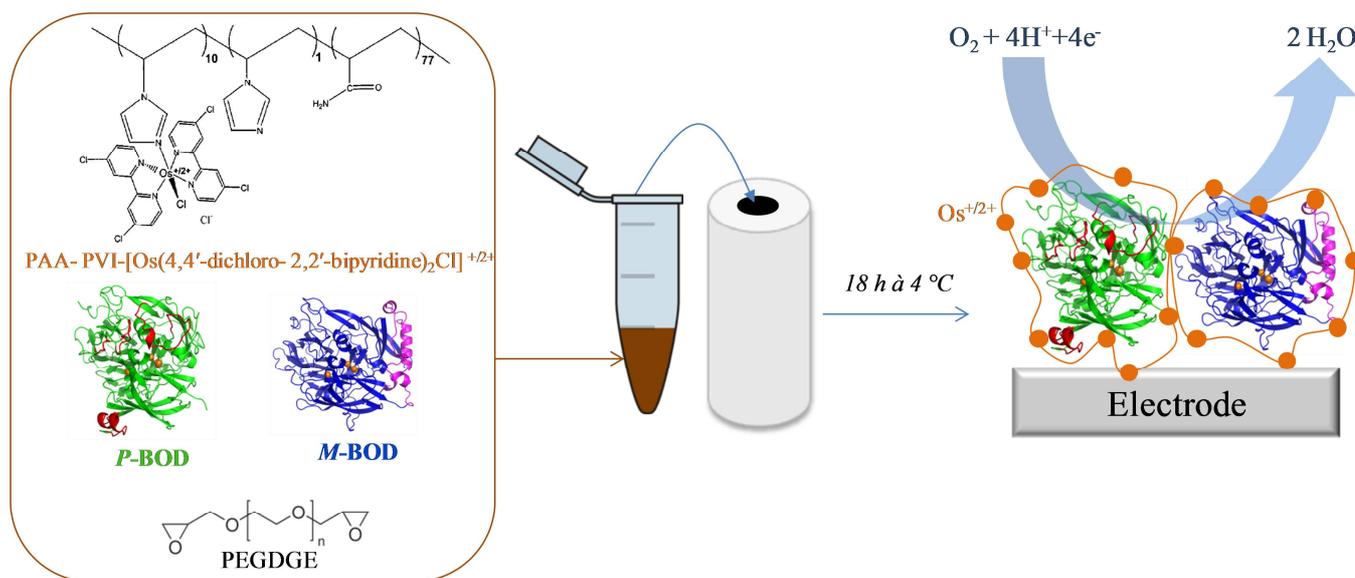
## 1. Etude de la cathode bi-enzymatique *M-BOD/P-BOD*

### 1.1. Réalisation de la cathode bi-enzymatique *M-BOD/P-BOD*

#### 1.1.1. Concept de la cathode bi-enzymatique

Nous avons conçu notre cathode bi-enzymatique en TEM en réalisant un hydrogel rédox à la composition massique optimale déterminée pour chacune des deux enzymes. Nous avons donc conservé un ratio de 30 % massique de BOD totale (mélange de *M-BOD* et *P-BOD*) dans l'hydrogel final.

Ainsi sur des électrodes de carbone vitreux nous avons déposé un hydrogel constitué de 62,6 %m de polymère rédox (PAA-PVI-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>), 30 %m de BOD totale et 7,4 %m de PEGDGE, avec un taux de recouvrement maintenu constant à 108 μg.cm<sup>-2</sup> (Figure III.1.1).



**Figure III.1.1.** Principe de réalisation de la cathode bi-enzymatique *M-BOD / P-BOD*.

Les électrodes ainsi modifiées sont séchées pendant 18 heures à 4 °C avant utilisation. Chaque expérience a été réalisée au moins trois fois à 37 °C avec une reproductibilité de ± 5 %.

### 1.1.2. Préparation du mélange bi-enzymatique

Pour cette étude nous avons utilisé une *M*-BOD à 98,5 mg.ml<sup>-1</sup> et une *P*-BOD à 82,46 mg.ml<sup>-1</sup>. Les deux enzymes étaient conservées dans du tampon phosphate de sodium à 50 mM sans chlore à pH 7,6.

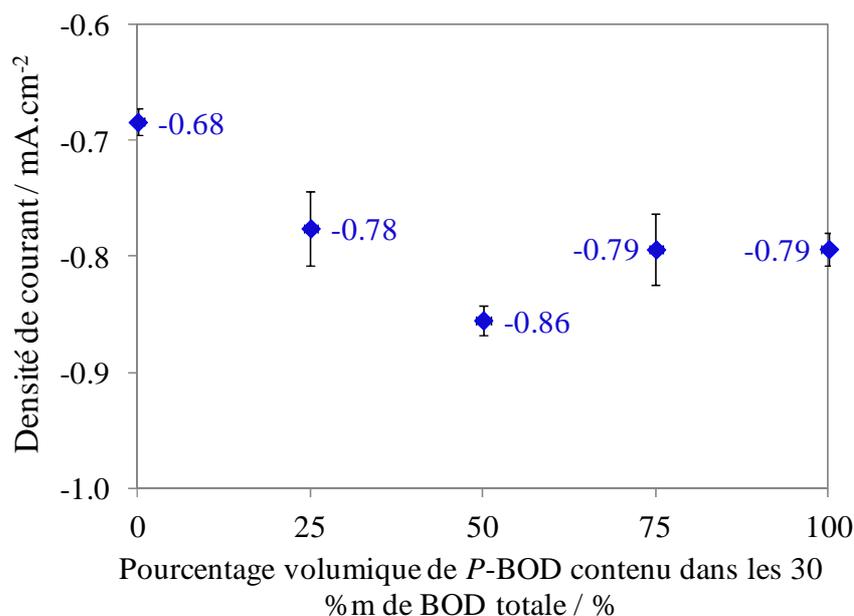
Nous avons constaté dans le chapitre précédent que *B. pumilus* immobilisée dans un hydrogel rédox contenant 23 mM de phosphate fournit 47 % de courant en moins que dans un hydrogel contenant 1,7 mM de phosphate. Pour *M. oryzae* par contre la variation de courant en fonction de la concentration de phosphate dans l'hydrogel est négligeable.

Au vu de ces résultats nous avons préféré préalablement diluer les enzymes à 5 mg.ml<sup>-1</sup> avec de l'eau distillée plutôt que du tampon phosphate. La concentration de phosphate de sodium est ainsi réduite afin d'éviter la précipitation de l'hydrogel tout en conservant une force ionique suffisante pour maintenir les enzymes actives. Par la suite nous avons réalisé différents mélanges de *M*-BOD et de *P*-BOD en faisant varier les proportions volumiques de chaque enzyme.

## 1.2. Etude de la cathode bi-enzymatique à 30 %m de BOD totale dans l'hydrogel

### 1.2.1. Comparaison des densités de courant en fonction du ratio *M*-BOD/*P*-BOD

Afin de déterminer la composition enzymatique optimale de la nouvelle cathode nous avons fait varier le rapport volumique *M*-BOD/*P*-BOD en maintenant constant le pourcentage massique d'enzyme total dans l'hydrogel. Par la suite nous avons étudié la dépendance de la densité de courant de réduction de l'O<sub>2</sub> par rapport au pourcentage volumique de *P*-BOD dans le mélange bi-enzymatique (Figure III.1.2). Ces premières expériences ont été réalisées dans du PBS (20 mM phosphate de sodium, 140 mM NaCl à pH 7,2).



**Figure III.1.2.** Densités de courant de réduction de l'O<sub>2</sub> en fonction du pourcentage volumique de P-BOD dans le mélange enzymatique pour un hydrogel à 30 %m de BOD totale sur des électrodes de carbone vitreux. Courants mesurés à + 0,1 V vs. Ag/AgCl sur des CVs à 5 mV.s<sup>-1</sup> rotation des électrodes à 500 tr.min<sup>-1</sup> dans le PBS sous 1 atm O<sub>2</sub> à 37 °C.

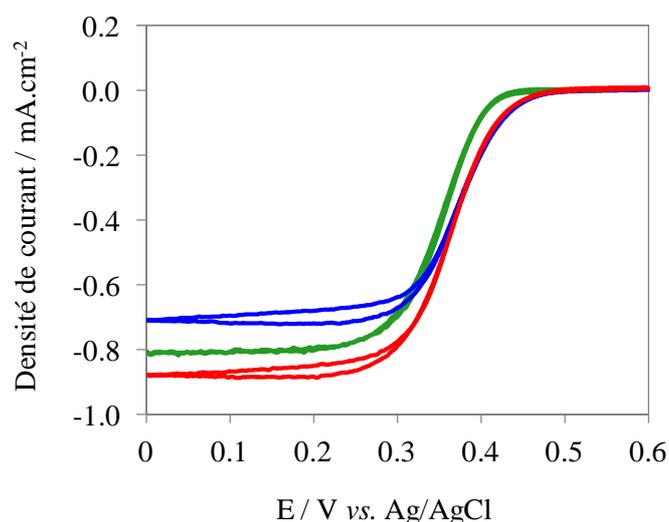
La cathode mono-enzymatique réalisée avec 100 %v M-BOD a une densité de courant moyenne de  $-0,68 \pm 0,01$  mA.cm<sup>-2</sup> (Figure III.1.2). La densité de courant moyenne de la cathode mono-enzymatique réalisée avec 100 %v P-BOD est de  $-0,79 \pm 0,03$  mA.cm<sup>-2</sup>.

En faisant varier les ratios volumiques de BODs dans le mélange bi-enzymatique, une densité de courant maximale de  $-0,86 \pm 0,01$  mA.cm<sup>-2</sup> est obtenue pour un pourcentage volumique de 50 %v de chaque BOD. La densité de courant de réduction de la cathode bi-enzymatique semble modulée par la proportion volumique de P-BOD dans le mélange.

## 1.2.2. Comparaison des potentiels de début de réduction de l'O<sub>2</sub> en fonction du ratio M-BOD/P-BOD

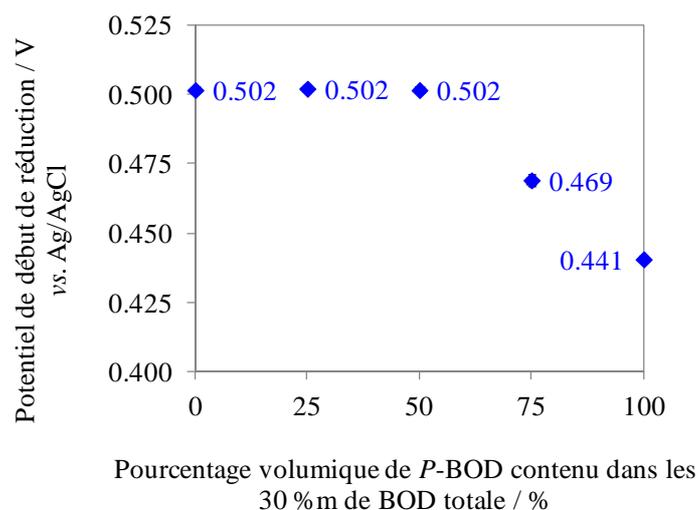
### 1.2.2.1. Résultats expérimentaux

Nous avons comparé les CVs des cathodes mono-enzymatiques 100 %v P-BOD et 100 %v M-BOD avec celui de la cathode bi-enzymatique 50 %v M-BOD / 50 %v P-BOD (Figure III.1.3) :



**Figure III.1.3.** CVs à 5 mV.s<sup>-1</sup> des électrodes modifiées avec les hydrogels à 100 %v *M*-BOD (bleu), 100 %v *P*-BOD (vert) et 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD (rouge) contenant 30 %m de BOD totale. Autres conditions identiques à la figure III.1.2.

Nous constatons que la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD (Figure III.1.3 courbe rouge) commence à réduire l'O<sub>2</sub> au même potentiel que la cathode mono-enzymatique 100 %v *M*-BOD (Figure III.1.3 courbe bleue). Au vu de ce résultat nous avons comparé l'évolution du potentiel de début de réduction de l'O<sub>2</sub> de la cathode bi-enzymatique en fonction du pourcentage volumique de *P*-BOD dans le mélange (Figure III.1.4). Nous avons déterminés les potentiels de début de réduction de l'O<sub>2</sub> sur les CVs avec le logiciel CHI.



**Figure III.1.4.** Potentiels de début de réduction de l'O<sub>2</sub> de la cathode bi-enzymatique en fonction du pourcentage volumique de *P*-BOD dans le mélange. Autres conditions identiques à la figure III.1.2.

Nous observons une dépendance du potentiel de début de réduction de l'O<sub>2</sub> en fonction de la constitution du mélange enzymatique. De 0 %v à 50 %v de *P*-BOD dans le mélange bi-enzymatique la réduction de l'O<sub>2</sub> commence à  $0,502 \pm 0,001$  V vs. Ag/AgCl. A 75 %v de *P*-BOD nous observons un potentiel intermédiaire de  $0,469 \pm 0,002$  V.

### 1.2.2.2. Analyse des résultats et hypothèses

Dans la cathode bi-enzymatique le potentiel de début de réduction de l'O<sub>2</sub> est donc modulé par la proportion volumique de *M*-BOD dans le mélange. Sur les CVs, nous n'observons qu'une seule vague de réduction qui commence au potentiel de réduction de l'O<sub>2</sub> par *M*-BOD. En réalisant avec le logiciel CHI les dérivées des CVs à  $5 \text{ mV.s}^{-1}$  des cathodes bi-enzymatiques, nous n'avons obtenu qu'un seul pic confirmant qu'il n'existait qu'un seul processus de réduction.

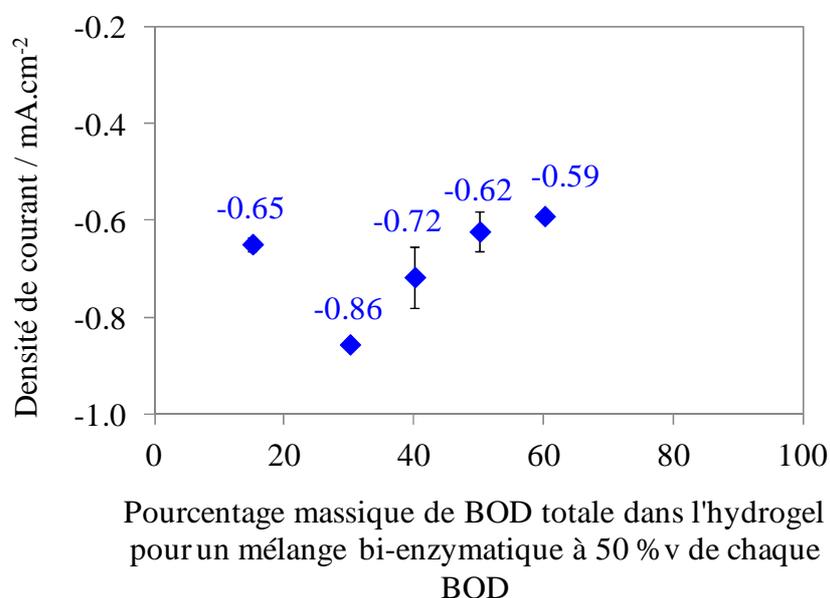
Nous avons observé au chapitre précédent qu'en TEM, le potentiel de début de réduction de l'O<sub>2</sub> peut varier en fonction de la concentration en chlore dans le milieu. De plus l'environnement autour du cuivre T1 influe sur le potentiel rédox de l'enzyme et donc sur le potentiel de réduction de l'O<sub>2</sub>. Or diverses études ont montrés que des mutations en dehors de la première sphère de coordination du T1 et voire même au niveau de l'extrémité C-terminale de l'enzyme pouvaient modifier le potentiel rédox [22-23]. Nous pouvons donc supposer que diverses interactions (électrostatiques, hydrophiles, hydrophobes...) entre les résidus des deux enzymes immobilisées sont susceptibles de produire, même à longue distance, un décalage de potentiel de réduction de chaque enzyme. Le potentiel de *P*-BOD deviendrait alors plus oxydant et celui de la *M*-BOD plus réducteur. Ceci pourrait expliquer l'existence du potentiel intermédiaire observé à 75 % de *P*-BOD dans le mélange bi-enzymatique. Aussi du point de vue de la réduction de l'O<sub>2</sub> les deux enzymes se comportent au final comme une seule enzyme mixte.

Avant de pousser plus loin nos investigations, nous avons voulu vérifier si la composition massique de l'hydrogel rédox pouvait influencer les performances de la cathode bi-enzymatique. Nous avons donc réalisé une étude comparative en faisant varier le pourcentage massique de BOD totale dans l'hydrogel.

### 1.2.3. Variation de la fraction massique de BOD totale dans l'hydrogel

Pour *P*-BOD et *M*-BOD utilisées individuellement le pourcentage massique optimal dans l'hydrogel est de 30 %m. Cependant nous obtenons un meilleur courant avec un mélange bi-enzymatique à 50 %v de chaque enzyme. Nous avons donc supposé que dans le mélange bi-enzymatique le pourcentage massique optimal de BOD totale dans l'hydrogel pourrait être différent de 30 %m.

Nous avons préparé des cathodes bi-enzymatiques avec une fraction massique de BOD totale dans l'hydrogel allant de 15 %m à 60 %m (Figure III.1.5). Pour ces expériences nous avons conservé le pourcentage volumique optimal de 50 %v de chaque BOD dans le mélange bi-enzymatique.



**Figure III.1.5.** Densités de courant de réduction de l'O<sub>2</sub> en fonction du pourcentage massique de BOD totale dans l'hydrogel pour un mélange bi-enzymatique à 50 %v de chaque BOD. Autres conditions identiques à la figure III.1.2.

La fraction massique optimale dans l'hydrogel bi-enzymatique est de 30 %m (Figure III.1.5). Ce qui correspond au pourcentage massique optimal déterminé pour chaque BOD.

Au vu de ces résultats, nous avons essayé d'optimiser les conditions de dépôt de l'hydrogel rédox pour tenter d'améliorer les performances de cathode bi-enzymatique. Vu que le potentiel est modulé

par la proportion de *M*-BOD et le courant par la proportion de *P*-BOD, le dépôt successif des deux hydrogels mono-enzymatiques pourrait modifier les propriétés de la cathode bi-enzymatique.

#### **1.2.4. Etude du dépôt de l'hydrogel bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD à 30 %m de BOD totale en deux étapes**

Au lieu de déposer directement un hydrogel contenant le mélange bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD/50 %v *P*-BOD, nous avons déposé l'un après l'autre deux hydrogels mono-enzymatiques de 100 %v *P*-BOD et 100 %v *M*-BOD. Nous avons fait varier l'ordre et le temps de séchage entre chaque dépôt d'hydrogel mono-enzymatique.

##### **1.2.4.1. Réalisation de la cathode bi-enzymatique en deux étapes**

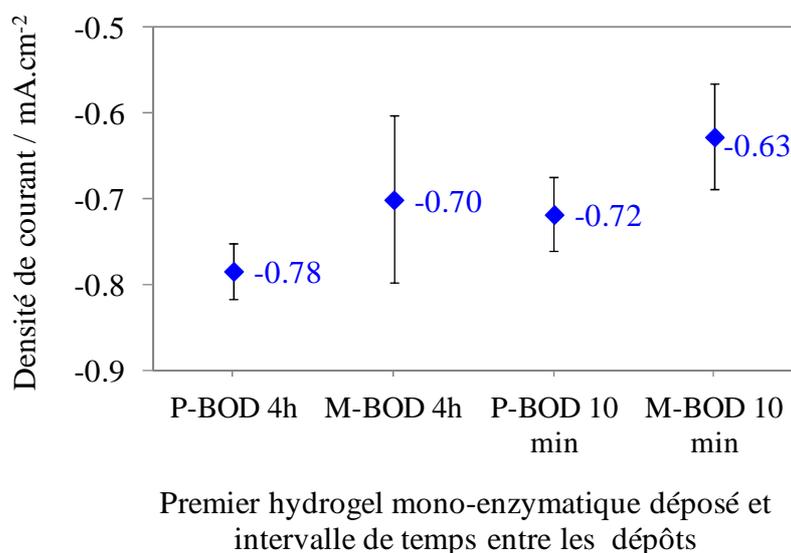
Pour obtenir en deux étapes un hydrogel bi-enzymatique à 30 %m de BOD totale contenant 50 %v de chaque enzyme, nous avons d'abord préparé des hydrogels mono-enzymatiques composés de 30 %m de BOD, 62,6 %m de polymère rédox et 7,4 %m de réticulant. Pour chaque hydrogel mono-enzymatique nous avons réalisé un mélange permettant d'obtenir un taux de recouvrement sur l'électrode de  $54 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

Ainsi en déposant chaque hydrogel mono-enzymatique l'un après l'autre, nous obtenons une cathode bi-enzymatique finale à 30 %m de BOD totale contenant 50 %v de chaque enzyme. Le taux de recouvrement total sur l'électrode bi-enzymatique étant alors de  $108 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

L'hydrogel contenant 100 %v de *P*-BOD (ou 100 %v de *M*-BOD) est déposé en premier suivi au bout de 10 min ou de 4 heures du dépôt de l'hydrogel contenant 100 %v de *M*-BOD (ou 100 %v de *P*-BOD). Nous avons laissé les cathodes sécher à 4 °C entre deux dépôts et conservé un temps de séchage total de 18 heures.

##### **1.2.4.2. Influence du dépôt en deux étapes sur les densités de courant**

Nous avons comparé l'influence de l'ordre et de l'intervalle de temps entre les dépôts sur les courants de réduction de l' $\text{O}_2$  en fonction de l'hydrogel mono-enzymatique déposé en premier (Figure III.1.6).



**Figure III.1.6.** Densités de courant de réduction de l'O<sub>2</sub> des cathodes bi-enzymatiques réalisées en deux étapes avec un hydrogel à 50 %v *M-BOD* / 50 %v *P-BOD* à 30 %m de BOD totale, en fonction de l'ordre de dépôt et de l'intervalle de temps entre les dépôts à 4 °C. Autres conditions identiques à la figure III.1.2.

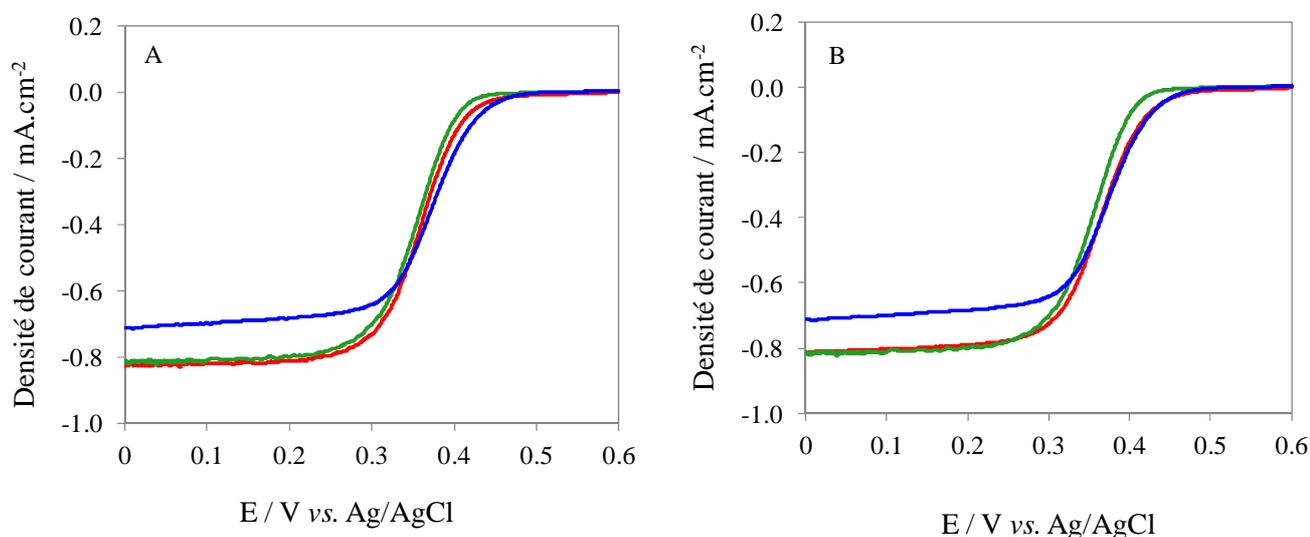
Le dépôt en une étape de l'hydrogel bi-enzymatique 50 %v *M-BOD* / 50 %v *P-BOD* permet d'obtenir une densité de courant de  $-0,86 \pm 0,01 \text{ mA.cm}^{-2}$ . Ici nous n'avons pas obtenu de meilleur courant en réalisant un dépôt en deux étapes successives. Globalement nous avons obtenu des densités de courants similaires quelles que soient les conditions expérimentales.

Cependant que ce soit après 4 heures ou après 10 minutes, des densités de courant maximales sont obtenues lorsque l'hydrogel contenant 100 %v de *P-BOD* est déposé en premier. De plus, les meilleurs courants en moyenne sont obtenus pour un intervalle de 4 heures entre les dépôts. Comme dans le cas du dépôt en une étape le courant de la cathode bi-enzymatique est ici aussi influencé par la *P-BOD*.

Dans le chapitre II nous avons vu que la cinétique de formation de l'hydrogel contenant 100 %v de *P-BOD* est plus rapide (4 heures) que celle de l'hydrogel contenant 100 %v de *M-BOD* (18 heures). Cette caractéristique pourrait expliquer le fait que les meilleures densités de courant sont obtenues lorsque l'hydrogel contenant 100 %v de *P-BOD* est déposé en premier avec un maximum à 4 heures d'intervalle entre les dépôts. Effectivement l'hydrogel contenant 100 %v de *P-BOD* étant structurellement mieux formé à des temps plus courts que celui contenant 100 %v de *M-BOD*, les transferts électroniques se feront d'autant mieux lorsqu'il est déposé en premier.

### 1.2.4.3. Influence du dépôt en deux étapes sur les potentiels de début de réduction de l'O<sub>2</sub>

En observant les CVs sous O<sub>2</sub> nous avons constaté que quel que soit l'intervalle de temps entre les dépôts d'hydrogels mono-enzymatiques, l'ordre des dépôts influence le potentiel de début de réduction de l'O<sub>2</sub> de la cathode bi-enzymatique. Nous avons comparé les CVs de réduction de l'O<sub>2</sub> des cathodes mono-enzymatiques avec ceux des cathodes bi-enzymatiques réalisées en deux étapes, avec 10 min d'intervalle entre les dépôts d'hydrogels mono-enzymatiques (Figure III.1.7).



**Figure III.1.7.** CVs à  $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  des électrodes modifiées avec les hydrogels à de 100 %v *M*-BOD (bleu), 100 %v *P*-BOD (vert) et 50 %v *M*-BOD / 50%v *P*-BOD (rouge) à 30 %m de BOD totale. Dépôt en premier de l'hydrogel contenant 100 %v de *P*-BOD (A), dépôt en premier de l'hydrogel contenant 100 %v de *M*-BOD (B). Intervalle de 10 min entre les dépôts séchage à 4 °C. Autres conditions identiques à la figure III.1.2.

Lorsque l'hydrogel mono-enzymatique contenant 100 %v de *P*-BOD est déposé en premier, la cathode bi-enzymatique (Figure III.1.7.A courbe rouge) commence à réduire l'O<sub>2</sub> à un potentiel intermédiaire de + 0,480 V vs. Ag/AgCl. Par contre lorsque l'hydrogel mono-enzymatique de *M*-BOD est déposé en premier, la cathode bi-enzymatique (Figure III.1.7.B courbe rouge) commence à réduire l'O<sub>2</sub> au même potentiel que la cathode 100 %v *M*-BOD soit + 0,502 vs. Ag/AgCl (Figure III.1.7.B courbe bleue).

Vu la cinétique de formation rapide de l'hydrogel contenant 100 %v de *P*-BOD, les cathodes bi-enzymatiques pour lesquelles cet hydrogel est déposé en premier devraient commencer la réduction de l'O<sub>2</sub> au potentiel de la cathode mono-enzymatique 100 %v de *P*-BOD. Or l'ajout de l'hydrogel contenant 100 %v de *M*-BOD produit à un décalage du potentiel.

On peut donc supposer comme pour un hydrogel déposé en une étape qu'en présence de *M*-BOD il existe différentes interactions entre les résidus des deux enzymes immobilisées. Ces interactions même à longue distance modifieraient le potentiel de *P*-BOD ce qui conduit à un potentiel de début de réduction de l'O<sub>2</sub> intermédiaire. Vu qu'aucun potentiel intermédiaire n'est observé lorsque c'est l'hydrogel de 100 %v *M*-BOD qui est déposé en premier cela suppose que c'est le cuivre T1 de *P*-BOD qui subit l'effet des interactions avec *M*-BOD est qui modifie son potentiel.

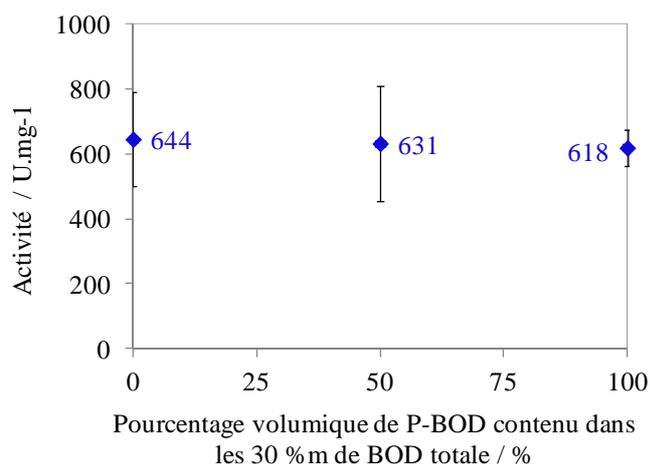
En définitive, en réalisant un dépôt successif d'hydrogels mono-enzymatiques et en faisant varier l'ordre des dépôts, nous pouvons moduler le potentiel de la cathode bi-enzymatique finale. Par contre nous n'améliorons pas significativement le courant de réduction par rapport au dépôt d'un hydrogel bi-enzymatique en une étape.

Dans la cathode bi-enzymatique le potentiel de début de réduction de l'O<sub>2</sub> est modulé par la proportion volumique de *M*-BOD dans le mélange (Figure III.1.4). Par contre la densité de courant de réduction est modulée par la proportion volumique de *P*-BOD (Figure III.1.2). Cette densité de courant atteint une valeur maximale de  $-0,86 \pm 0,01 \text{ mA.cm}^{-2}$  pour un mélange bi-enzymatique contenant 50 %v de chaque BOD.

Ce résultat suppose une meilleure activité du mélange bi-enzymatique à ce ratio volumique, par rapport aux solutions mono-enzymatiques. Pour vérifier cette hypothèse nous avons réalisé des tests d'activité en solution.

#### **1.2.5. Tests d'activité en solution du mélange bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD/50 %v *P*-BOD**

Nous avons procédé aux tests d'activité dans du tampon phosphate citrate à pH 4 avec des solutions à 100 mM d'ABTS dissout dans de l'eau distillée. Ces tests ont été réalisés en triple exemplaires pour le mélange bi-enzymatique à 50 %v de chaque BOD et les solutions mono-enzymatiques de 100 %v *P*-BOD et 100 %v *M*-BOD (Figure III.1.8).



**Figure III.1.8.** Comparaison de l'activité spécifique des solutions mono- et bi-enzymatique en présence d'ABTS en fonction du pourcentage volumique de *P*-BOD dans le mélange enzymatique.

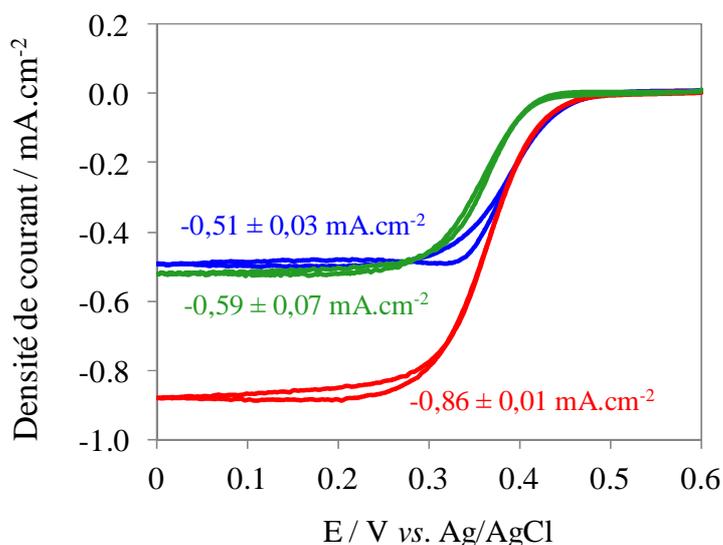
Les tests d'activité en présence d'ABTS n'ont montré aucune différence entre les solutions mono-enzymatiques et le mélange bi-enzymatique à 50 %v de chaque BOD. La meilleure densité de courant obtenue pour la cathode bi-enzymatique à 50% *P*-BOD / 50% *M*-BOD ne peut donc s'expliquer par une meilleure activité du mélange.

Au vu des résultats des tests d'activité, nous supposons que le meilleur courant obtenu à 50 %v de chaque BOD dans un hydrogel à 30 %m de BOD totale résulte de l'addition des courants de chaque enzyme utilisée individuellement. Aussi ce courant serait la somme des courants obtenus pour les cathodes mono-enzymatiques de *P*-BOD et *M*-BOD à 15 %m de BOD dans l'hydrogel. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons préparé des électrodes mono-enzymatiques à 15 %m de BOD dans l'hydrogel.

### 1.2.6. Comparaison avec les cathodes mono-enzymatiques à 15 %m de BOD totale dans l'hydrogel

Nous avons préparé pour chaque enzyme un hydrogel constitué de 15 %m de BOD totale, 77,6 %m de polymère rédox et 7,4 %m d'agent réticulant. Nous avons comparé les CVs des cathodes bi-enzymatiques à 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD à 30 %m de BOD totale avec les cathodes mono-

enzymatiques 100 %v *P*-BOD et 100 %v *M*-BOD à 15 %m de BOD totale dans l'hydrogel (Figure III.1.9).



**Figure III.1.9.** CVs à  $5 \text{ mV.s}^{-1}$  des électrodes modifiées avec les hydrogels contenant 100 %v *M*-BOD à 15 %m dans l'hydrogel (bleu), 100 %v *P*-BOD à 15 %m dans l'hydrogel (vert) et 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD à 30 %m de BOD totale dans l'hydrogel (rouge). Autres conditions identiques à la figure III.1.2.

À  $+0,1 \text{ V}$  nous obtenons une densité de courant moyenne de  $-0,59 \pm 0,07 \text{ mA.cm}^{-2}$  pour les cathodes contenant 100 %v de *P*-BOD à 15 %m dans l'hydrogel (Figure III.1.9 courbe verte). Pour les cathodes contenant 100 %v de *M*-BOD à 15 %m dans l'hydrogel nous obtenons une densité de courant moyenne de  $-0,51 \pm 0,03 \text{ mA.cm}^{-2}$  (Figure III.1.9 courbe bleue).

La densité de courant mesurée pour la cathode bi-enzymatique contenant 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD à 30 %m de BOD totale dans l'hydrogel est de  $-0,86 \pm 0,01 \text{ mA.cm}^{-2}$  (Figure III.1.9 courbe rouge). Elle est en moyenne 22 % plus faible que la somme des courants des deux cathodes mono-enzymatiques à 15 %m alors que nous aurions pu nous attendre à un courant d'environ  $-1,1 \pm 0,1 \text{ mA.cm}^{-2}$ , correspondant à la somme des courants des cathodes mono-enzymatiques à 15 %m.

Ces différences entre les valeurs théoriques attendues à 30 %m de BODs et les valeurs expérimentales peuvent être expliquées par les différences de ratio de polymère dans l'hydrogel. Nous devons en effet tenir compte du fait que les transferts électroniques dans l'hydrogel sont assurés par le polymère rédox. Or, à 30 %m de BOD totale il y a moins de polymère rédox qu'à 15 %m donc moins d'osmium pour assurer le transfert d'un maximum d'électrons. Cela pourrait expliquer que

l'on ne récupère pas la totalité du courant attendu avec la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD à 30 % m de BOD totale dans l'hydrogel.

### 1.3. Conclusion intermédiaire

Nous avons réalisé une nouvelle cathode bi-enzymatique dont le potentiel de début de réduction de l'O<sub>2</sub> est modulé par *M. oryzae* et le courant par *B. pumilus*. La composition optimale d'enzymes dans cette cathode est de 50 %v *P*-BOD et 50 %v *M*-BOD pour un hydrogel à 30 %m de BOD totale. A ce ratio la cathode bi-enzymatique opère au potentiel de la cathode mono-enzymatique 100 %v *M*-BOD soit  $0,502 \pm 0,001$  V vs. Ag/AgCl. De plus, elle délivre une densité de courant de  $-0,86 \pm 0,01$  mA.cm<sup>-2</sup> qui est 26 % plus élevée en moyenne que celle de la cathode mono-enzymatique 100 %v *M*-BOD et 9 % plus élevé en moyenne que celle la cathode mono-enzymatique 100 %v *P*-BOD.

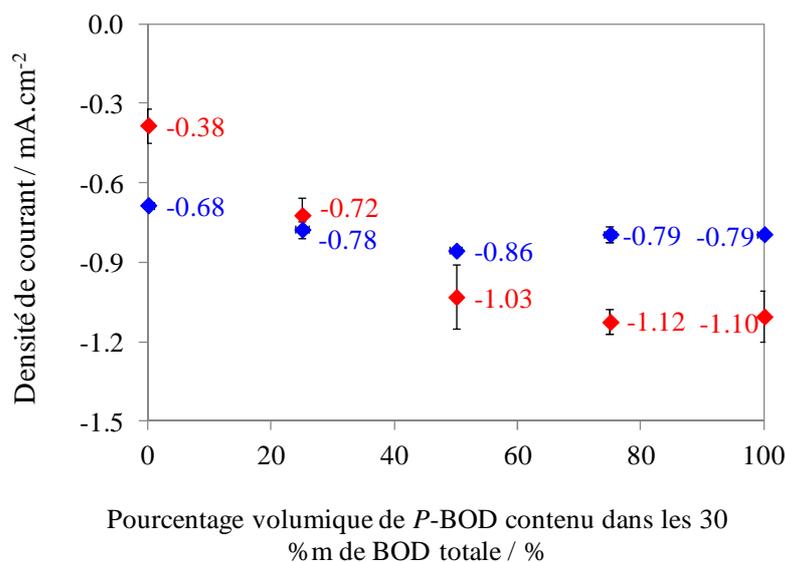
Cette densité de courant plus élevée n'est pas due à l'augmentation de l'activité de la solution bi-enzymatique. Cependant cette valeur pourrait correspondre à la somme des densités de courant des cathodes mono-enzymatiques à 15 %m de BOD totale dans l'hydrogel. Par contre on ne récupère pas la totalité du courant attendu, en raison de la modification du pourcentage massique du polymère rédox assurant le transfert des électrons.

Dans la suite de notre étude de la cathode bi-enzymatique nous nous sommes focalisés sur le ratio optimal 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD à 30 %m de BOD totale dans l'hydrogel. Nous nous sommes intéressés à l'influence des paramètres physiologiques sur les performances de cette nouvelle cathode et en particulier à l'effet de la température, du chlore et de l'urate.

## 2. Comparaison de l'effet des paramètres physiologiques sur la cathode bi-enzymatique par rapport aux cathodes mono-enzymatiques

### 2.1. Etude de l'effet de la température

La BOD de *B. pumilus* présente une activité élevée à haute température à la fois en solution homogène et immobilisée sur les électrodes [24-25]. La BOD de *M. oryzae* est active jusqu'à 60 °C en solution homogène [26], par contre une fois immobilisée elle perd son activité dès 50 °C (Chapitre II Figure II.2.7). Par conséquent, nous avons étudié l'effet de la température sur les densités de courant des électrodes aux différents ratios de *P*-BOD et *M*-BOD (Figure III.2.1).



**Figure III.2.1.** Densités de courant de réduction de l'O<sub>2</sub> en fonction du pourcentage volumique de P-BOD dans le mélange enzymatique pour un hydrogel à 30 %m de BOD totale à 37 °C (bleu) et 50 °C (rouge). Autres conditions identiques à la figure III.1.2.

A 50 °C (Figure III.2.1 points rouges) La densité de courant moyenne de la cathode bi-enzymatique 50 %v M-BOD / 50 %v P-BOD ( $-1,03 \pm 0,12 \text{ mA.cm}^{-2}$ ) est semblable à celle de l'électrode à base de 100 %v P-BOD ( $-1,10 \pm 0,10 \text{ mA.cm}^{-2}$ ) et presque trois fois supérieure à celle d'une cathode contenant 100 %v M-BOD ( $-0,38 \pm 0,06 \text{ mA.cm}^{-2}$ ). La densité de courant augmente avec le pourcentage de P-BOD jusqu'à 50 %v où un plateau est atteint. La tolérance de la cathode bi-enzymatique à une forte température est donc modulée par la proportion volumique de P-BOD dans le mélange enzymatique.

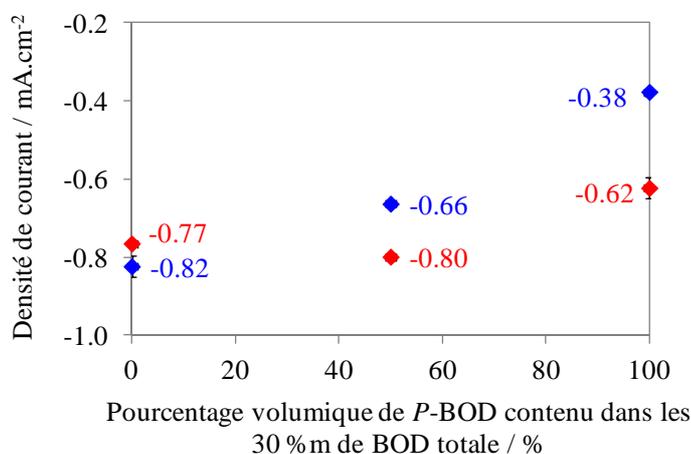
Nous avons supposé dans la première partie de ce chapitre que la forte densité de courant obtenue pour la cathode bi-enzymatique 50 %v M-BOD / 50 %v P-BOD à 30 %m de BOD totale résultait de l'addition des courants des cathodes mono-enzymatiques 100 %v P-BOD et 100 %v M-BOD à 15 %m de BOD totale. De la même façon, vu l'activité croissante de la cathode bi-enzymatique à 50 °C avec le pourcentage volumique de P-BOD dans le mélange, nous pouvons supposer qu'il y a une addition de l'effet de la température sur chaque enzyme.

La perte d'activité que subit M-BOD à 50 °C (- 44%) est donc compensée dans la cathode bi-enzymatique par le gain de courant de P-BOD (+ 39 %). Ce qui explique que l'on ait un courant intermédiaire à 25 %v de P-BOD dans le mélange enzymatique ( $-0,72 \pm 0,07 \text{ mA.cm}^{-2}$ ). A partir de

50 %v de *P*-BOD il y a suffisamment de *P*-BOD dans le mélange pour que la perte de courant lié à la proportion de *M*-BOD soit négligeable par rapport au gain de courant lié à la proportion de *P*-BOD.

## 2.2. Etude de l'effet du chlore

Les analyses que nous avons réalisées au chapitre II ont montré que la cathode 100 %v *M*-BOD est plus sensible aux ions chlorure que la cathode 100 %v *P*-BOD qui est plus performante en présence de chlore. Pour étudier l'effet du chlore sur la cathode bi-enzymatique, nous avons mesuré les densités de courant dans du tampon phosphate de sodium à 20 mM sans chlore avant et après ajout de 140 mM de NaCl (Figure III.2.2).



**Figure III.2.2 :** Densités de courant de réduction de l'O<sub>2</sub> en fonction du pourcentage volumique de *P*-BOD dans le mélange enzymatique pour un hydrogel à 30 %m de BOD totale, dans le tampon phosphate de sodium à 20 mM sans NaCl (bleu) et avec 140 mM de NaCl (rouge). Autres conditions identiques à la figure III.1.2.

Dans le tampon phosphate 20 mM sans chlore (Figure III.2.2 points bleus) la densité de courant la plus élevée est obtenue pour la cathode contenant 100 %v *M*-BOD ( $-0,82 \pm 0,03 \text{ mA.cm}^{-2}$ ). On obtient un courant minimum pour la cathode contenant 100 %v *P*-BOD ( $-0,38 \pm 0,01 \text{ mA.cm}^{-2}$ ) et un courant intermédiaire pour la cathode 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD ( $-0,66 \pm 0,01 \text{ mA.cm}^{-2}$ ). Nous avons pu constater dans ce tampon, ainsi que dans du tampon phosphate 100 mM sans chlore, que plus on augmente le pourcentage de *P*-BOD plus la densité de courant de la cathode bi-enzymatique diminue.

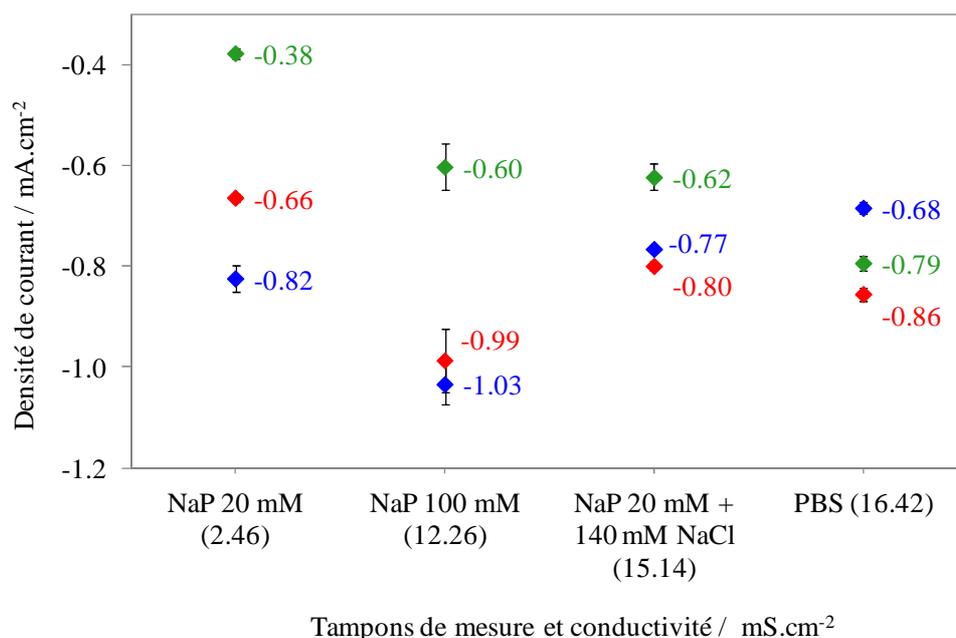
Lorsqu'on ajoute 140 mM de chlore (Figure III.2.2 points rouges) la densité de courant des électrodes contenant 100 %v *M*-BOD diminue de 6 % en moyenne. Par contre le courant des cathodes à 100 %v *P*-BOD augmente en moyenne de 39 % et de 20 % pour la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD.

Dans le tampon phosphate 20 mM sans chlore, le fait de réduire la proportion de *M*-BOD qui est très active dans ce tampon et d'augmenter la proportion de *P*-BOD qui y est moins active donne un courant intermédiaire par rapport aux deux cathodes mono-enzymatiques. Après l'ajout de 140 mM de NaCl le courant de la cathode bi-enzymatique augmente moins que celui de la cathode 100 %v *P*-BOD. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le gain de courant de la proportion 50 %v *P*-BOD est compensé par la perte de courant subie par la proportion 50 %v *M*-BOD. Ainsi, comme dans le cas des hautes températures, le courant généré par cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD résulterait de la compensation mutuelle de deux effets antagonistes.

### 2.3. Effet de la conductivité et de la composition du tampon de mesure

Nous avons discuté au chapitre précédent l'effet de la conductivité et de la composition du tampon de mesure sur *P*-BOD et *M*-BOD. Pour les cathodes mono-enzymatiques 100 %v *P*-BOD et 100 %v *M*-BOD, nous avons observé une augmentation de la densité de courant avec la conductivité du tampon (Chapitre II Figure II.2.12). Cependant malgré l'augmentation de conductivité, la densité de courant de la cathode 100 %v *M*-BOD diminue en présence de chlore car cette enzyme y est plus sensible.

Nous avons comparé les densités de courant obtenues en fonction du tampon de mesure pour la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD avec les densités de courant des cathodes mono enzymatiques 100 %v *P*-BOD et 100 %v *M*-BOD (Figure III.2.3).



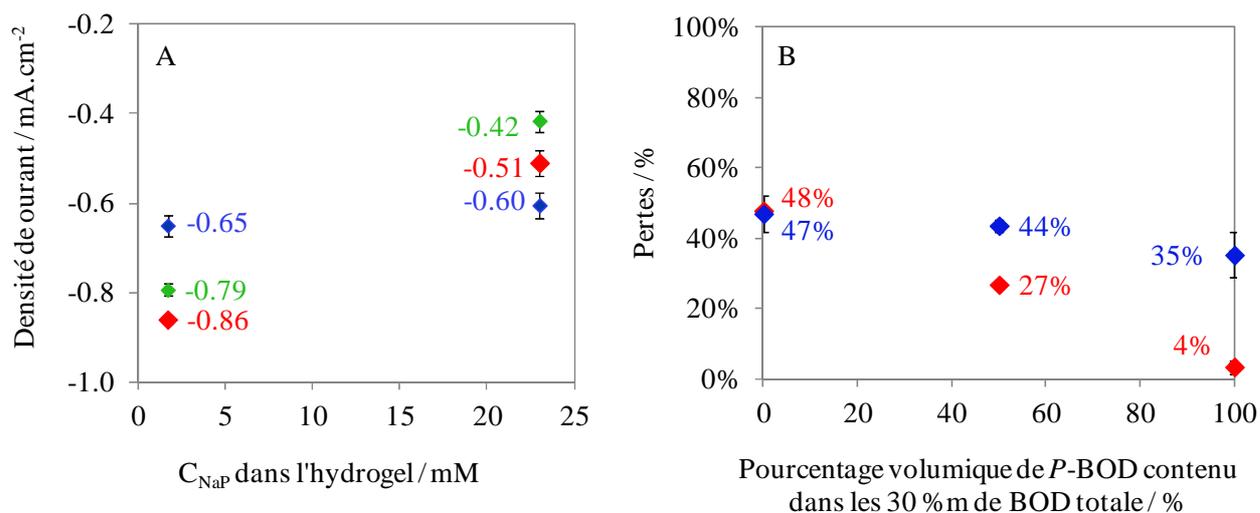
**Figure III.2.3.** Densités de courant de réduction de l'O<sub>2</sub> en fonction de la conductivité des tampons à pH 7,2 pour les cathodes contenant 100 %v *P*-BOD (vert), 100 %v *M*-BOD (bleu) et 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD (rouge). Autres conditions identiques à la figure III.1.2.

A faible conductivité dans le NaP 20 mM sans chlore le courant de la cathode bi-enzymatique (Figure III.2.3 points rouges) a une valeur comprise entre le courant de la cathode 100 %v *M*-BOD (Figure III.2.3 points bleus) et celui de la cathode 100 %v *P*-BOD (Figure III.2.3 points verts). En passant dans le NaP 100 mM qui est plus conducteur, le courant de la cathode bi-enzymatique augmente d'environ de 50 %, celui de la cathode 100 %v *P*-BOD de 57 % et celui de la cathode 100 %v *M*-BOD augmente de 25 %. Par contre, en présence de chlore le courant de la cathode bi-enzymatique diminue mais reste au final supérieur à celui des deux enzymes individuelles.

Comme pour les cathodes mono-enzymatiques, la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD augmente son courant en fonction de la conductivité du tampon. Par contre elle est sensible au chlore comme la cathode 100 %v *M*-BOD, mais cette sensibilité au chlore est moins importante. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la sensibilité au chlore est compensée par la tolérance et la forte activité de la proportion de *P*-BOD en présence de NaCl.

#### 2.4. Etude de l'effet de la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel et de l'urate

Nous avons étudié l'effet de l'urate sur la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD en réalisant les expériences présentées au chapitre II. Nous avons comparé les densités de courant et la tolérance à l'urate sur des électrodes modifiées avec 23 mM et 1,7 mM de phosphate de sodium dans l'hydrogel (Figure III.2.4).



**Figure III.2.4.** Densités de courant de réduction de l' $O_2$  en fonction de la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel pour les cathodes contenant 100 %v *P*-BOD (vert), 100 %v *M*-BOD (bleu) et 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD (rouge) (A). Pertes de courant après 8000 secondes de chronoampérométrie dans le PBS à 0,5 mM d'urate 37 °C sous 1 atm  $O_2$  à 200 tr.min<sup>-1</sup> en fonction du pourcentage volumique de *P*-BOD dans le mélange enzymatique pour un hydrogel à 30 %m de BOD totale contenant 1,7 mM (bleu) et 23 mM (rouge) de phosphate de sodium (B).

Tout comme la cathode mono-enzymatique 100 %v *P*-BOD (Figure III.2.4.A points verts) la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD (Figure III.2.4.A points rouges) est sensible à la concentration en phosphate de sodium dans l'hydrogel. Elle perd en moyenne 40 % de densité de courant lorsque l'on passe de 1,7 mM à 23 mM de phosphate de sodium dans l'hydrogel.

La cathode bi-enzymatique ne résiste pas aussi bien à l'urate que la cathode 100 %v *P*-BOD (Figure III.2.4.B). Cependant, tout comme pour la cathode 100 %v *P*-BOD, les pertes sont plus faibles à 23 mM de phosphate dans l'hydrogel (Figure III.2.4.B points rouges). De plus, en présence

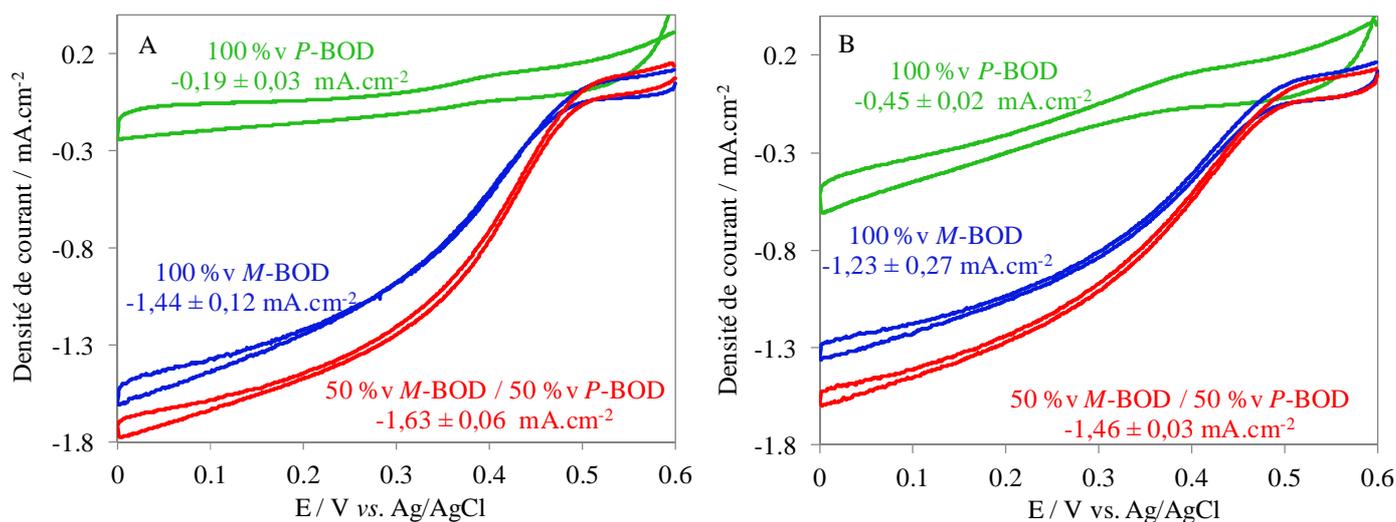
d'urate la cathode bi-enzymatique présente tout de même une meilleure stabilité que les cathodes à base 100 %v *M*-BOD et de *T. tsunodae* (Chapitre II Tableau II.3.2).

Une fois de plus nous observons pour la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD un comportement intermédiaire que ce soit par rapport à la sensibilité à la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel ou la tolérance à l'urate. Nous supposons donc que les pertes de courant subies par la proportion de *P*-BOD en présence de 23 mM de phosphate dans l'hydrogel sont compensées par la stabilité de la proportion de *M*-BOD. De même les pertes de courant subies par la proportion de *M*-BOD en présence de 0,5 mM d'urate en solution sont compensées par la stabilité de la proportion de *P*-BOD.

### 2.5. Comparaison des comportements en TED et TEM

Dans le chapitre précédent nous avons constaté la faible efficacité de *B. pumilus* immobilisée en TED. Nous avons supposé que cela pouvait être lié à la forte proportion de zones hydrophobes et à la présence du résidu arginine à l'entrée du site actif. De ce fait, l'orientation des enzymes sur l'électrode n'est pas optimale et l'utilisation d'un médiateur est nécessaire. Par contre, la *M*-BOD donne un meilleur courant en TED ce qui serait lié à une meilleure accessibilité au site actif.

Nous avons comparé les cathodes mono-enzymatiques avec la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD en TED sur des électrodes de cryogel de carbone. Pour chaque type de cathode nous avons déposé 10 µl d'une solution d'enzyme à 10 mg.ml<sup>-1</sup> sur les électrodes. Les expériences comparatives ont été réalisées dans du tampon phosphate 100 mM sans chlore et dans du PBS (Figure III.2.5).



**Figure III.2.5.** CVs des électrodes de cryogel de carbone modifiées avec 100 %v *M*-BOD (bleu), 100 %v *P*-BOD (vert) et 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD (rouge) à 5 mV.s<sup>-1</sup> dans le tampon phosphate 100 mM (A) et dans le PBS (B). Autres conditions identiques à la figure III.1.2.

Comme en TEM, la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD commence à réduire l'oxygène au même potentiel que la cathode contenant 100 %v *M*-BOD avec une densité de courant supérieure à celle des deux cathodes mono-enzymatiques. Dans le PBS (Figure III.2.5.B) malgré un effet du chlore qui diminue son courant, la cathode bi-enzymatique (Figure III.2.5.B courbe rouge) conserve un courant environ ~ 19 % supérieur à celui de la cathode 100 %v *M*-BOD (Figure III.2.5.B courbe bleue). Les variations des densités de courant constatées en fonction de la présence ou non de Cl<sup>-</sup> dans le tampon confirment ici un effet du chlore sur les enzymes et non sur l'hydrogel rédox uniquement, comme nous l'avions supposé au chapitre II pour *B. pumilus*.

En TEM dans le tampon phosphate de sodium 100 mM sans chlore, la densité de courant de la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD est quasiment égale à celle de la cathode 100 %v *M*-BOD (~ 4 % de différence en moyenne) (Figure III.2.3). Par contre en TED, nous constatons que la densité de courant de la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD est en moyenne 13 % plus grande que celle de la cathode 100 %v *M*-BOD dans le phosphate de sodium 100 mM sans chlore (Figure III.2.5.A). De plus nous constatons que l'allure du CV obtenu pour la cathode bi-enzymatique est semblable à celle de la cathode 100 %v *M*-BOD.

Ces résultats laissent supposer qu'en l'absence de polymère il existe des interactions entre les deux BODs qui vont permettre d'obtenir une orientation et une connexion optimales d'un maximum d'enzymes sur l'électrode.

Nous avons appliqué à ces trois électrodes le traitement de données selon le formalisme développé par Kano et Ikeda. Les résultats obtenus dans le tampon phosphate de sodium 100 mM sans chlore sont reportés au tableau III.1.1.

	100 %v <i>P</i> -BOD	100 %v <i>M</i> -BOD	50 %v <i>M</i> -BOD / 50 %v <i>P</i> -BOD
$k^\circ$ ( $s^{-1}$ )	25	30	35
$\Gamma t$ ( $mol.cm^{-2}$ )	$3,08 \times 10^{-8}$	$5,98 \times 10^{-8}$	$6,87 \times 10^{-8}$

**Tableau III.1.1.** Paramètre cinétique  $k^\circ$  et concentration  $\Gamma t$  de BOD immobilisée sur les électrodes de cryogel de carbone dans le tampon phosphate 100 mM sans chlore à pH 7,2.

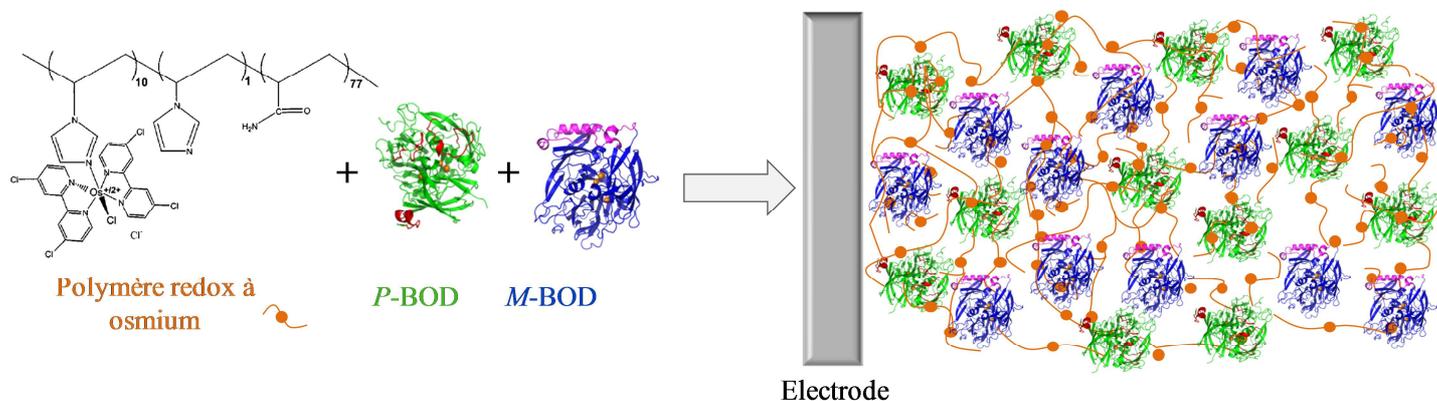
Dans le cas de *B. pumilus* la concentration d'enzymes immobilisées est plus faible que pour *M. oryzae* et la cathode bi-enzymatique, il en est de même pour le paramètre cinétique  $k^\circ$ . Par contre, la quantité d'enzymes immobilisées ainsi que le paramètre  $k^\circ$  sont les plus élevés dans le cas de la cathode bi-enzymatique.

Ainsi, dans la cathode bi-enzymatique la présence de *M*-BOD améliorerait la connexion sur l'électrode de la *P*-BOD qui habituellement s'oriente mal. Cela pourrait expliquer que nous obtenions un meilleur courant dans le tampon phosphate de sodium 100 mM sans chlore et l'allure des CVs. Il en est de même dans le PBS bien que la sensibilité de *M. oryzae* au chlore entraîne une légère baisse de courant.

En résumé, en TEM en fonction des conditions de mesure (conductivité du tampon, température, présence de chlore ou d'urate, concentration en phosphate dans l'hydrogel) la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD présente un comportement intermédiaire à celui des cathodes mono-enzymatiques 100 %v *M*-BOD et 100 %v *P*-BOD. En TED les différentes interactions entre les enzymes dans le mélange bi-enzymatique permettraient une orientation



Cependant lors de la préparation des hydrogels nous n'avons observé ni séparation de phase ni précipitation. Nous avons donc plutôt supposé que la répartition des enzymes sur l'électrode se fait de façon homogène mais aléatoire (Figure III.2.7).



**Figure III.2.7.** Représentation schématique de la répartition homogène des enzymes dans l'hydrogel bi-enzymatique 50 %v *M-BOD* / 50 %v *P-BOD*.

Cette répartition homogène semble plus cohérente avec l'effet observé en TED où l'allure du CV de la cathode bi-enzymatique 50 %v *M-BOD* / 50 %v *P-BOD* par rapport à la cathode 100% *P-BOD* est plus sigmoïdale. Afin de vérifier notre hypothèse nous avons remplacé la *P-BOD* dans la cathode enzymatique par une enzyme inactive.

Si les densités de courant restent élevées et que l'on conserve la tolérance aux paramètres physiologiques tels que le chlore ou la température cela confirmerait une disposition multicouche des enzymes avec un effet « bouclier » de *P-BOD*. Dans le cas contraire nous pourrions confirmer que nous avons plutôt une répartition homogène.

## 2.7. Cathode bi-enzymatique avec une *B. pumilus* inactive

### 2.7.1. Obtention de la *B. pumilus* inactive

La *B. pumilus* inactive a été obtenue au cours des expériences de mutation de l'enzyme sauvage visant à augmenter le potentiel redox. Tout d'abord la méthionine (M) en axial du T1 a été remplacée par une phénylalanine. Le mutant obtenu désigné M516F avait une activité spécifique de 212 U.mg<sup>-1</sup>

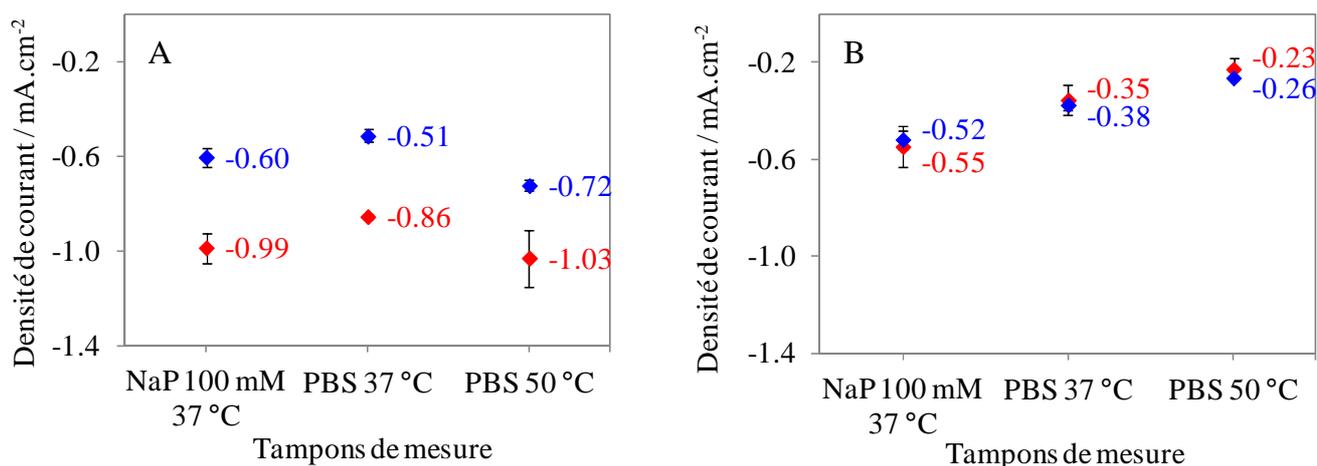
en présence d'ABTS. Pour évaluer l'efficacité d'une production d'enzyme nous calculons le rapport de l'absorbance en UV-visible du cuivre T3 (à ~280 nm) par rapport l'absorbance du cuivre T1 (à ~600 nm). Pour *B. pumilus* ce rapport a une valeur généralement comprise entre 18 et 21. Or pour le mutant M516F ce rapport était de 38 ce qui indiquait une diminution de la proportion de cuivre T1 dans le mutant.

Nous avons supposé que ce résultat pouvait être dû à une gêne stérique ou une perturbation du site T1 par la phénylalanine qui est un acide aminé volumineux. En se basant sur l'alignement de séquence et sur les modèles des laccases comme *T. tsunodae* ou *P. ostreatus* possédant une phénylalanine (F) ou une leucine (L) en axial (Chapitre I Tableau I.3.1) nous avons remarqué qu'elles avaient toutes une glycine (G) précédant l'acide aminé en position axiale.

La glycine est un acide aminé ne possédant qu'un atome d'hydrogène en position latérale, cette chaîne courte ajoute de la flexibilité. Nous avons supposé que cette flexibilité permettrait une meilleure orientation de la phénylalanine et peut être une diminution de la perturbation au niveau du T1. Nous avons donc réalisé un double mutant M516F-F515G désigné GF-BOD, mais en réalisant cette double mutation nous avons perdu totalement l'activité de l'enzyme, elle n'était plus que de 2 U.mg<sup>-1</sup> en présence d'ABTS. Des études sont actuellement en cours pour essayer de comprendre comment ces deux mutations ont conduit à la perte d'activité de l'enzyme. Néanmoins nous avons mis à profit ce mutant pour continuer notre étude sur la cathode bi-enzymatique.

### **2.7.2. Etude de la cathode bi-enzymatique 50 %v M-BOD / 50 %v GF-BOD**

Nous avons modifié notre cathode bi-enzymatique en remplaçant la *B. pumilus* par le double mutant inactif. Nous avons comparé en TEM l'effet sur les densités de courant de la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel, du chlore et de la température pour les cathodes bi-enzymatique réalisées avec une *B. pumilus* active et avec le double mutant GF-BOD (Figure III.2.8).



**Figure III.2.8.** Densités de courant de réduction de l'O<sub>2</sub> en fonction des tampons de mesure pour les cathodes bi-enzymatiques 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD (A) et 50 %v *M*-BOD / 50 %v GF-BOD (B). Concentration de phosphate dans l'hydrogel : 23 mM (bleu) et 1,7 mM (rouge). Autres conditions identiques à la figure III.1.2.

Nous avons comparé en TEM les densités de courant des cathodes bi-enzymatiques 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD (Figure III.2.8.A) et 50 %v *M*-BOD / 50 %v GF-BOD (Figure III.2.8.B). Pour chaque cathode nous avons comparé les densités de courant pour les hydrogels contenant 1,7 mM (Figure III.2.8 points rouges) et 23 mM (Figure III.2.8 points bleus) de phosphate de sodium dans l'hydrogel.

Dans le tampon phosphate 100 mM sans chlore aussi bien que dans le PBS nous ne constatons pas de différence de courant en fonction de la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel pour la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v GF-BOD (Figure III.2.8.B) contrairement à ce qui est observé pour la cathode bi-enzymatique avec une *B. pumilus* active (Figure III.2.8.A). En passant dans le PBS la cathode bi-enzymatique avec le mutant inactif GF-BOD montre une plus grande sensibilité au Cl<sup>-</sup>. Elle perd en moyenne 36 % de densité de courant alors que la cathode 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD ne perd en moyenne que 14 % de densité de courant. Dans le PBS en augmentant la température de 37 °C à 50 °C la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v GF-BOD perd encore 34 % de densité de courant alors que celle de la cathode 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD augmente.

En fait, cette cathode bi-enzymatique réagit de la même façon qu'une cathode 100 %v *M*-BOD mais ici elle contient 15 %m de *M*-BOD, 62,6 %m de polymère rédox et 15 %m d'isolant et 7,4 %m

de réticulant. Les courants obtenus sont très faibles, en effet dans le PBS pour un hydrogel contenant 1,7 mM de phosphate de sodium la cathode 50 %v *M*-BOD / 50 %v GF-BOD délivre un courant de  $-0,35 \pm 0,06 \text{ mA.cm}^{-2}$ . En comparaison la cathode 100% *M*-BOD à 15 %m de BOD totale est à  $-0,51 \pm 0,03 \text{ mA.cm}^{-2}$  soit près de 30 % d'écart.

Nous avons souligné au chapitre II le fait que l'interaction polymère-enzyme dans le cas de *M. oryzae* était très forte ce qui expliquait la tolérance au phosphate de sodium dans l'hydrogel. Dans le cas de la cathode 50 %v *M*-BOD / 50 %v GF-BOD même si le pourcentage massique de polymère dans l'hydrogel (62,6 %m) est plus faible que dans le cas d'une cathode 100 %v *M*-BOD à 15 %m de *M*-BOD (77,6 %m de polymère), la forte interaction polymère-enzyme devrait permettre de conserver un courant assez élevé si les enzymes avaient une répartition multicouche telle que décrite en figure III.2.6.

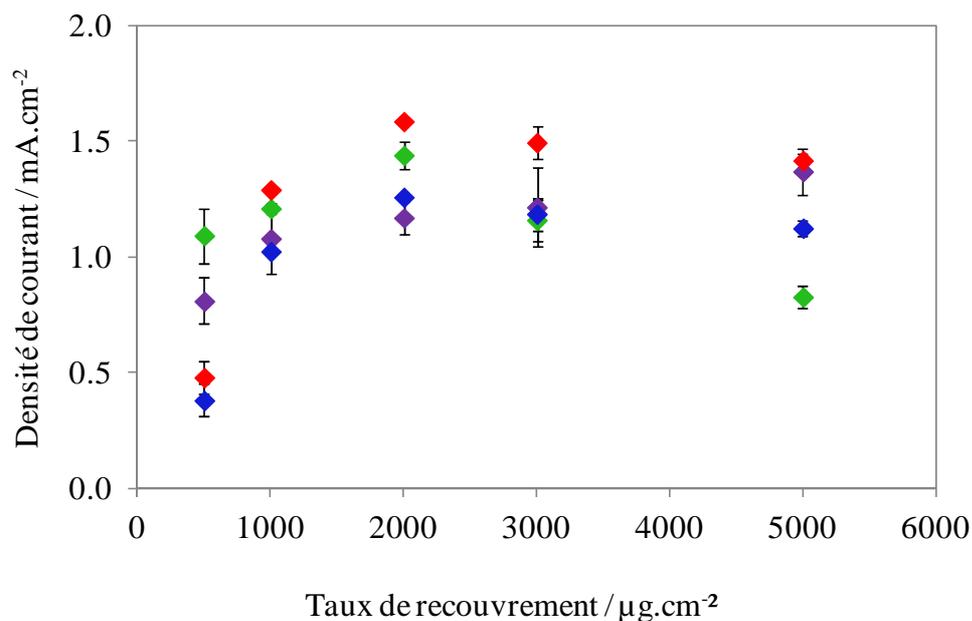
Or, dans notre cas le courant plus faible résulte beaucoup plus probablement d'une gêne stérique par le mutant inactif sur l'électrode. On a alors une diminution des transferts électroniques entre les molécules de *M*-BOD via le polymère rédox. Ce résultat correspond beaucoup plus à une répartition aléatoire des enzymes sur l'électrode.

## 2.8. La biopile à cathode bi-enzymatique *B. pumilus* / *M. oryzae*

Nous avons testé notre cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD dans une biopile miniature glucose/O<sub>2</sub> sans membrane avec les enzymes immobilisées dans des hydrogels rédox sur des fibres de carbone. Pour réaliser les biopiles nous avons combiné nos différentes cathodes (mono- et bi-enzymatique) avec une anode composée de 35 %m de glucose oxydase purifiée à  $8,36 \text{ mg.ml}^{-1}$ , 55 %m de PVP-[Os(N,N-dialkyl-2,2-bi-imidazole)<sub>3</sub>]<sup>2+/3+</sup> à  $7,14 \text{ mg.ml}^{-1}$  et 10 %m de PEGDGE à  $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ .

### 2.8.1. Optimisation des taux de recouvrement aux électrodes

Dans un premier temps nous avons déterminé pour chaque hydrogel anodique et cathodique le taux de recouvrement optimal sur les fibres de carbone. Pour ce faire nous avons fait varier le taux de recouvrement sur les électrodes en maintenant la composition massique optimale constante pour chaque hydrogel (Figure III.2.9).



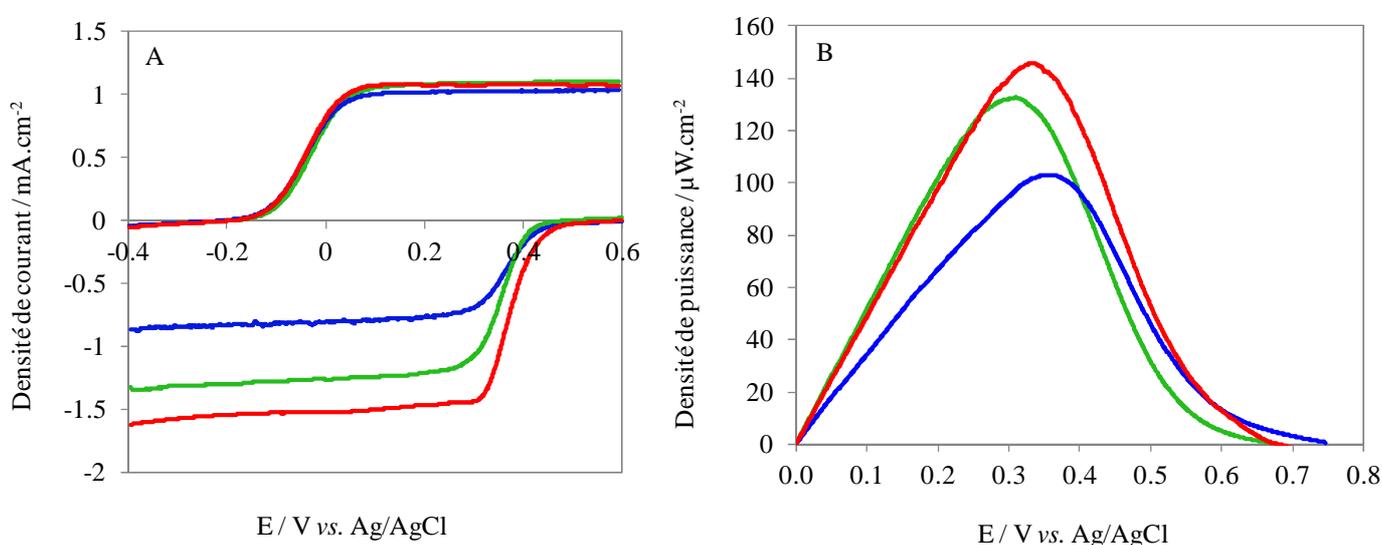
**Figure III.2.9.** Valeurs absolues des densités de courant maximales en fonction du taux de recouvrement sur fibre de carbone pour des hydrogels anodique à base de 35 %m de GOx, 55 %m de PVP-[Os(N,N-dialkyl-2,2-bi-imidazole)<sub>3</sub>]<sup>2+/3+</sup> et 10 %m de PEGDGE (violet), et cathodiques de 100 %v *P*-BOD (verte), de 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD (rouge) et de 100% *M*-BOD à 30 %m de BOD totale 62,6 %m de polymère rédox (PAA-PVI-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>) et 7,4 %m de PEGDGE. Mesures dans le PBS à 37 °C sous 1 atm O<sub>2</sub>.

Nous observons pour chaque hydrogel une augmentation de la densité de courant avec le taux de recouvrement, puis à partir de 2000  $\mu\text{g.cm}^{-2}$  on arrive à saturation. En augmentant le taux de recouvrement sur la fibre de carbone, nous augmentons la quantité d'enzyme et de polymère. Par conséquent le courant catalytique pour chaque hydrogel augmente également. Cependant, à partir de 2000  $\mu\text{g.cm}^{-2}$  l'épaisseur de l'hydrogel devient trop importante et la diffusion des substrats devient de plus en plus difficile.

Ceci explique que la densité de courant stagne à partir de 2000  $\mu\text{g.cm}^{-2}$  et que l'on observe même une baisse de courant à 5000  $\mu\text{g.cm}^{-2}$ . Nous avons donc réalisé nos biopiles avec des taux de recouvrement de 2000  $\mu\text{g.cm}^{-2}$  sur chaque électrode.

### 2.8.2. Comparaison avec les biopiles aux cathodes mono-enzymatique 100 %v P-BOD et 100 %v M-BOD

Nous avons comparé les biopiles réalisées avec la cathode bi-enzymatique 50 %v M-BOD / 50 %v P-BOD et les cathodes mono-enzymatiques 100 %v P-BOD et 100 %v M-BOD. Les biopiles sont désignées respectivement GOx-M-BOD/P-BOD, GOx-P-BOD et GOx-M-BOD. Elles ont été testées dans du PBS contenant 15 mM de glucose avec un bullage continu sous oxygène. Nous avons mesuré pour chaque biopile les courbes de polarisation anodiques et cathodiques à  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  et l'évolution de la densité de puissance en fonction du potentiel avec une vitesse de balayage de  $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (Figure III.2.10).



**Figure III.2.10.** Comparaison des courbes de polarisation anodiques et cathodiques enregistrées à  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (A) et des densités de puissances enregistrées à  $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (B) des biopiles enzymatiques GOx-P-BOD (vert), GOx-M-BOD (bleu) et GOx-M-BOD/P-BOD (rouge) dans le PBS à 15 mM de glucose  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  sous 1 atm  $\text{O}_2$ .

Comme nous l'avons montré au chapitre I, en mesurant simultanément le potentiel et le courant produit par la biopile glucose/ $\text{O}_2$  la densité de puissance maximale peut être calculée par l'équation III.2.1:

$$P = V \times I \quad (\text{Equation III.2.1})$$

avec la tension V de la pile qui dépend de la différence de potentiel entre l'anode et la cathode.

Les courbes de polarisation (Figure III.2.10.A) montrent que la biopile GOx-*M*-BOD (courbes bleues) est limitée par la cathode. De plus malgré un potentiel de réduction de l'O<sub>2</sub> élevé la cathode 100 %v *M*-BOD délivre la densité de courant la moins importante du fait de la sensibilité au chlore de *M. oryzae*. Ainsi, la biopile GOx-*M*-BOD délivre la densité de puissance la plus faible dans le PBS (Figure III.2.10.B courbe bleue).

Les courbes de polarisation des biopiles GOx-*P*-BOD (Figure III.2.10.A courbes vertes) et GOx-*M*-BOD/*P*-BOD (Figure III.2.10.A courbes rouges) montrent que l'anode est l'électrode limitante. Par contre les potentiels de début de réduction de l'O<sub>2</sub> à la cathode ne sont pas les mêmes. Ainsi, avec un potentiel plus élevé la biopile GOx-*M*-BOD/*P*-BOD délivre la densité de puissance la plus importante (Figure III.2.10.B courbe rouge) alors que la biopile GOx-*P*-BOD délivre une densité de puissance intermédiaire (Figure III.2.10.B courbe verte). Le tableau III.2.1 compare les caractéristiques des biopiles GOx-*M*-BOD/*P*-BOD, GOx-*P*-BOD et GOx-*M*-BOD.

	<b>GOx-<i>P</i>-BOD</b>	<b>GOx-<i>M</i>-BOD</b>	<b>GOx-<i>M</i>-BOD/<i>P</i>-BOD</b>
<b>Densité de puissance moyenne (<math>\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}</math>)</b>	129 ± 4	104 ± 1	140 ± 6
<b>OCV moyen (V vs. Ag/AgCl)</b>	0,667 ± 0,026	0,745 ± 0,001	0,715 ± 0,005

**Tableau III.2.1.** Comparaison des densités de puissance et des OCV moyens des biopiles enzymatiques GOx-*P*-BOD, GOx-*M*-BOD et GOx-*M*-BOD/*P*-BOD.

La biopile GOx-*M*-BOD/*P*-BOD délivre en moyenne 35 % de puissance en plus que la biopile GOx-*M*-BOD et 9 % de puissance en plus que la biopile GOx-*P*-BOD (Tableau III.3.1). En plus d'une forte densité de puissance, la biopile GOx-*M*-BOD/*P*-BOD génère également des tensions élevées. Nous avons pu obtenir une tension maximale de + 0,72 V vs. Ag/AgCl avec une densité de puissance de 146  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

## 2.9. Conclusion intermédiaire

Par rapport à la cathode mono-enzymatique 100 %v *M*-BOD la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD montre une activité élevée à haute température, en présence de chlore ainsi

qu'une meilleure stabilité en présence d'urate. Tout comme la cathode mono-enzymatique 100 %v *P*-BOD la nouvelle cathode bi-enzymatique est aussi sensible à la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel mais présente de meilleures performances en TED.

De façon générale la cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD a un comportement compris entre celui des cathodes mono-enzymatiques 100 %v *M*-BOD et 100 %v *P*-BOD. Les meilleures propriétés observées avec la cathode bi-enzymatique résultent en fait de l'addition des effets antagonistes sur la proportion 50 %v *M*-BOD et sur la proportion 50 %v *P*-BOD en fonctions des conditions expérimentales. Cette cathode fonctionne donc sur la base d'un effet coopératif entre les deux enzymes.

Nous avons supposé que ces propriétés de la nouvelle cathode bi-enzymatique pouvaient s'expliquer par une répartition homogène des deux enzymes sur l'électrode. Les expériences réalisées en remplaçant la *B. pumilus* par un double mutant inactif ont permis de confirmer cette hypothèse car la cathode bi-enzymatique obtenue était encore moins efficace qu'une cathode 100 %v *M*-BOD. Une observation directe de l'hydrogel bi-enzymatique permettrait de confirmer ou non l'hypothèse d'une répartition homogène des enzymes sur l'électrode. Cela pourrait se faire par exemple en microscopie à fluorescence haute résolution, en marquant chaque enzyme avec deux fluorophores différents.

Nous avons vérifié l'efficacité de la nouvelle cathode bi-enzymatique 50 %v *M*-BOD / 50 %v *P*-BOD dans une biopile glucose/O<sub>2</sub> sans membrane réalisée avec des fibres de carbone. Que ce soit en termes de densité de puissance ou de tension de fonctionnement maximale nous avons obtenu de meilleurs résultats qu'avec les cathodes mono-enzymatiques. Nous avons pu obtenir une biopile glucose/O<sub>2</sub> générant une tension maximale de + 0,72 V vs. Ag/AgCl avec une densité de courant maximale de 146 μW.cm<sup>-2</sup>.

### 3. La cathode bi-enzymatique *Bacillus pumilus* / *Podospira anserina*

Les laccases présentent un fort intérêt pour la réalisation des biopiles glucose/O<sub>2</sub> car elles ont la capacité de réduire l'oxygène à des potentiels élevés. Cependant, contrairement aux BODs, la majorité des laccases est limitée par une activité et une stabilité plus faibles à pH neutre et une plus grande sensibilité au chlore [28]. Les laccases et les BODs appartiennent à la même famille d'enzymes mais se différencient par la capacité des BODs à oxyder la bilirubine, l'origine de cette particularité n'a pour le moment pas été déterminée.

Nous nous sommes donc demandé s'il serait possible de réaliser une cathode bi-enzymatique avec la *P-BOD* et une laccase, malgré cette différence d'affinité pour la bilirubine qui pourrait être liée à une particularité structurale de l'une ou l'autre des deux enzymes. Cette cathode permettrait de tirer avantage de la meilleure activité et de la meilleure stabilité des BODs dans les conditions physiologiques tout en assurant la réduction de l' $O_2$  à un plus haut potentiel.

Nous avons récemment identifiée une nouvelle laccase issue du champignon *Podospora anserina* [21]. Nous avons utilisé cette laccase dans une cathode bi-enzymatique à base de 50 % de *P-BOD* et 50 % de *P. anserina* dans un hydrogel rédox à 30 %m d'enzyme totale.

### 3.1. Caractéristiques de la laccase de *Podospora anserina*

#### 3.1.1. Caractéristiques biochimiques

La *Podospora anserina* est une laccase de 73 kDa qui a été surexprimée dans *Pichia pastoris*. Les paramètres cinétiques  $k_{cat}$  et  $K_M$  ont été déterminés à 37 °C et pour l'ABTS et la SGZ à leur pH optimal (Tableau III.3.1) [21].

	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}/K_M$
<b>ABTS</b>	1372	307	4,46
<b>SGZ</b>	1,29	10,9	0,12

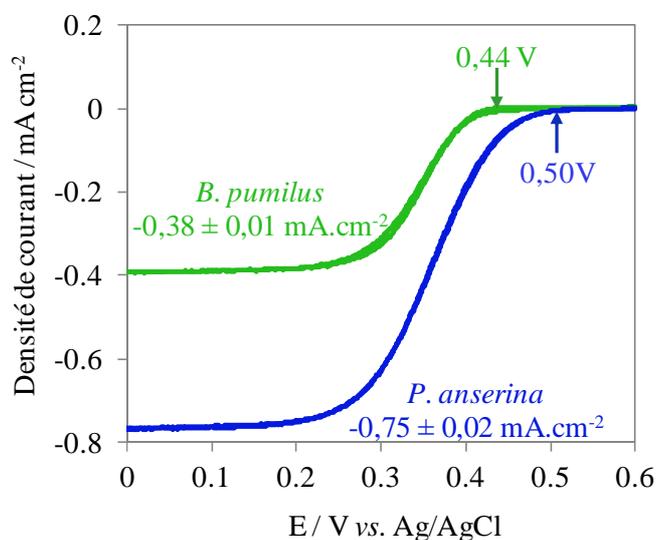
**Tableau III.3.1.** Paramètres cinétiques de la laccase *Podospora anserina*.

A la différence des autres laccases, la *Podospora anserina* présente une meilleure stabilité thermique avec une demi-vie > 400 min à 37 °C. De plus, elle est moins sensible aux chlorures et plus stable à pH 7. Bien que cette enzyme de 566 acides aminés présente 58 % d'analogie de séquence avec la BOD de *Myrothecium verrucaria* elle n'est pas capable d'oxyder la bilirubine qu'elle soit conjuguée ou non conjuguée [21].

#### 3.1.2. Etude des potentiels de réduction de l' $O_2$ et des caractéristiques structurales

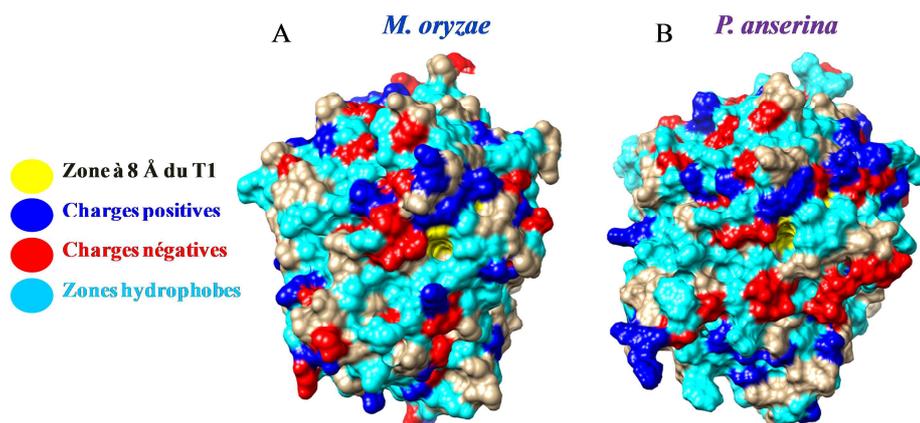
Nous avons comparé en TEM dans le tampon phosphate de sodium à 20 mM sans NaCl les CVs des cathodes réalisées avec les hydrogels rédox de *B. pumilus* et *P. anserina* (Figure III.3.1). Chaque

hydrogel était composé de 62,6 %m de polymère rédox (PAA-PVI-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>), 30 %m d'enzyme et 7,4 %m de PEGDGE.



**Figure III.3.1.** CVs à 5 mV.s<sup>-1</sup> des électrodes modifiées avec les hydrogels de *P. anserina* (bleu) et de *B. pumilus* (vert) à 30 %m de BODs totale sur des électrodes de carbone vitreux. Courants mesurés à + 0,1 V vs. Ag/AgCl sur des CVs à 5 mV.s<sup>-1</sup>, rotation des électrodes à 500 tr.min<sup>-1</sup> dans le tampon phosphate de sodium à 20 mM sans NaCl sous 1 atm O<sub>2</sub> à 37 °C.

La laccase de *P. anserina* commence à réduire l'O<sub>2</sub> à un potentiel de + 0,5 V vs. Ag/AgCl (Figure III.3.1 courbe bleue). Or, comme dans les BODs de *B. pumilus* et *M. oryzae* l'acide aminé en axial du T1 est une méthionine. Nous avons comparé la structure cristalline modélisée de *P. anserina* avec celle de *M. oryzae* (Figure III.3.2).



**Figure III.3.2.** Comparaison des structures de *M. oryzae* (A) et *P. anserina* (B) avec les zones chargées positivement (bleu foncé), négativement (rouge), les zones hydrophobes (bleu ciel) et la zone à 8 Å du T1 (jaune).

La structure de *P. anserina* montre de nombreuses similarités avec la structure de *M. oryzae* (Figure III.3.2). Nous pouvons constater que le site actif est enfoui dans la protéine et entouré de moins de zones hydrophobes que *B. pumilus* (Chapitre II Figure II.2.1). Des quatre tryptophanes entourant le cuivre T1 de *M. oryzae* (Chapitre II Figure II.2.4) trois sont conservés chez *P. anserina* et seul celui en position 202 est remplacé par une phénylalanine. Le site actif de *P. anserina* est donc très hydrophobe ce qui expliquerait que la réduction de l' $O_2$  commence à + 0,5 V vs. Ag/AgCl.

La laccase de *P. anserina* commence la réduction de l'oxygène au même potentiel que *M. oryzae*. L'intérêt ici de réaliser une cathode bi-enzymatique avec *B. pumilus* et *P. anserina* n'est pas de voir si on peut augmenter le potentiel de cette cathode mais plutôt d'étudier si les comportements observés avec deux BODs peuvent être obtenus avec une BOD et une laccase. Dans notre cathode bi-enzymatique nous désignerons la laccase de *P. anserina* par l'abréviation A-Lac.

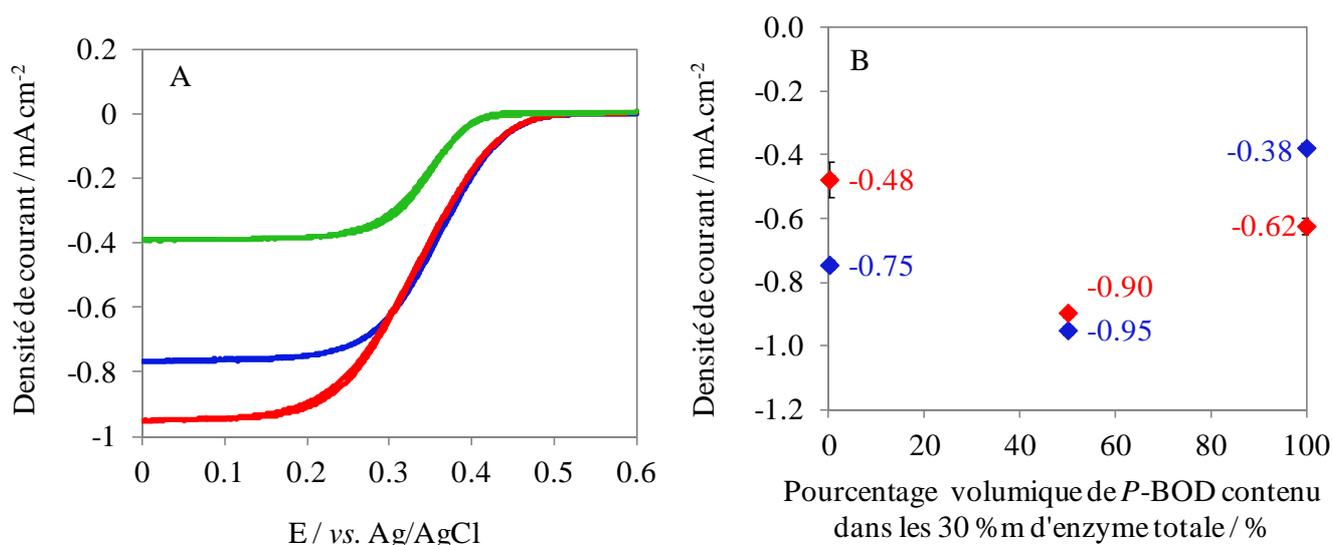
Il est à noter que nous n'avons pas réalisé d'études d'optimisation du ratio de la cathode bi-enzymatique A-Lac/*P*-BOD, nous avons étudié directement la cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v *P*-BOD. Nous nous sommes intéressés à son activité catalytique et en particulier à l'influence du chlore et de la température.

### 3.2. Effet du chlore et de la température

La cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD a été réalisée suivant le même protocole que celui utilisé pour la cathode 50 %v P-BOD / 50 %v M-BOD. Nous avons préparé un hydrogel constitué de 62,6 %m de polymère rédox (PAA-PVI-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl<sup>-</sup>]<sup>+2+</sup>), 30 %m d'enzyme totale (A-Lac et P-BOD) et 7,4 %m de PEGDGE avec un taux de recouvrement de 108 μg.cm<sup>-2</sup>. Les enzymes ont été préalablement diluées à 5 mg.ml<sup>-1</sup> dans de l'eau distillée.

#### 3.2.1. Effet du chlore

Nous avons d'abord testé la cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD dans du tampon phosphate 20 mM sans chlore, par la suite nous y avons ajouté 140 mM de NaCl. Nous avons comparé les CVs réalisées dans le tampon phosphate 20 mM sans chlore et les densités de courant obtenues avant et après ajout de NaCl dans le tampon (Figure III.3.3).



**Figure III.3.3.** CVs à 5 mV.s<sup>-1</sup> des électrodes modifiées avec les hydrogels à 100 %v A-Lac (bleu), 100 %v P-BOD (vert) et 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD (à rouge) à 30 %m d'enzyme totale, dans le tampon phosphate de sodium à 20 mM sans NaCl (A). Densités de courant de réduction de l'O<sub>2</sub> en fonction du pourcentage volumique de P-BOD dans le mélange enzymatique pour un hydrogel à 30 %m d'enzyme totale, mesures à +0,1 V sur les CVs dans le tampon phosphate de sodium à 20 mM sans NaCl (bleu) et avec 140 mM de NaCl (rouge) à 37 °C sous 1 atm O<sub>2</sub> (B). Autres conditions identiques à la figure III.1.2.

En absence de chlore la laccase de *P. anserina* délivre une densité de courant de  $-0,75 \pm 0,02$  mA.cm<sup>-2</sup> alors que celle de *B. pumilus* n'est que de  $-0,38 \pm 0,01$  mA.cm<sup>-2</sup> (Figure III.3.3.B points bleus). La cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD a une densité de courant de  $-0,95 \pm 0,01$  mA.cm<sup>-2</sup> qui est supérieure à celle des deux cathodes mono-enzymatiques 100 %v P-BOD et 100 %v A-Lac. Ici nous avons un comportement différent de celui observé pour la cathode bi-enzymatique 50 %v M-BOD / 50 %v P-BOD (Figure III.2.2 points bleus) dans laquelle le courant obtenu en absence de chlore était un courant intermédiaire.

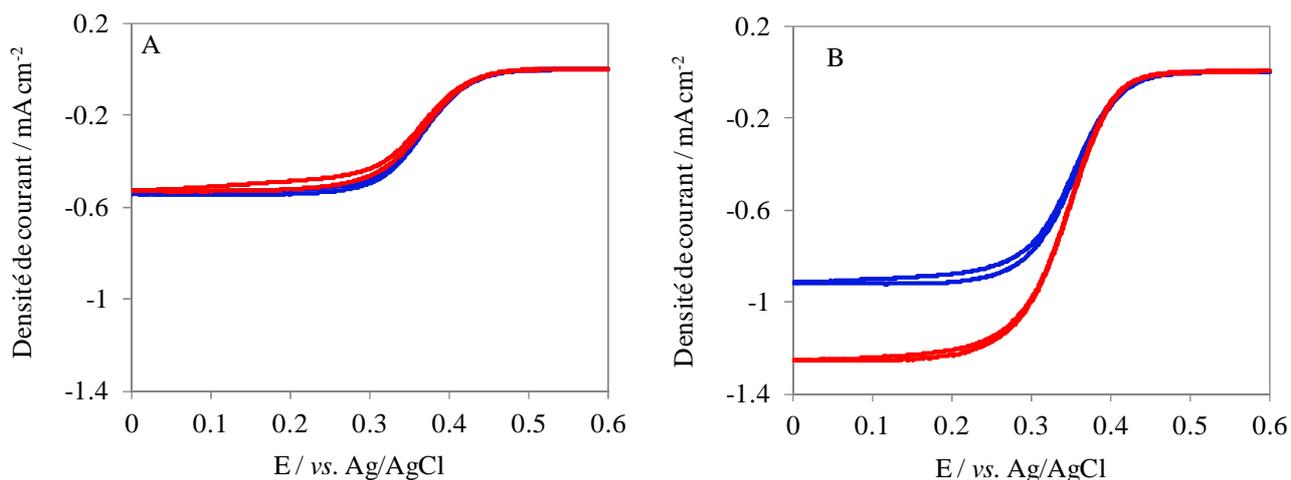
Nous pouvons supposer que dans l'hydrogel bi-enzymatique contenant 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD les interactions polymère-enzyme sont renforcées par les différentes interactions possibles entre les enzymes. Cela peut être dû à des différences structurales entre les enzymes ou même à la différence de poids moléculaire entre *B. pumilus* et *P. anserina* qui est tout de même de 13 kDa.

Après ajout de 140 mM de NaCl (Figure III.3.3.B points rouges) *P. anserina* perd en moyenne 36 % de densité de courant. Elle est plus sensible au chlore que *M. oryzae* qui dans les mêmes conditions ne perdait que 6 % de densité de courant (Figure III.2.2). Par contre la cathode 100 %v P-BOD gagne 39 % de densité de courant alors que la cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD est assez stable et ne perd que 5 % de densité de courant.

Les résultats après ajout de chlore sont là encore différents de ceux que nous avons obtenus pour la cathode bi-enzymatique 50 %v M-BOD / 50 %v P-BOD (Figure III.2.2 points rouges). Dans le cas de la cathode bi-enzymatique 50 %v M-BOD / 50 %v P-BOD nous avons une augmentation de la densité de courant de 20 % en moyenne. Or dans la cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD le gain de courant pour la proportion de P-BOD et la perte de courant de la proportion A-Lac sont quasi similaires. Ainsi, la faible sensibilité au chlore de la cathode bi-enzymatique prouve bien qu'il y a une addition de deux effets antagonistes se produisant sur les deux proportions d'enzymes en présence de NaCl.

### 3.2.2. Effet de la température

Nous avons étudié l'effet de la température dans le tampon phosphate à 20 mM auquel nous avons ajouté 140 mM de NaCl. Nous avons augmenté la température de 37 °C à 50 °C (Figure III.3.4).



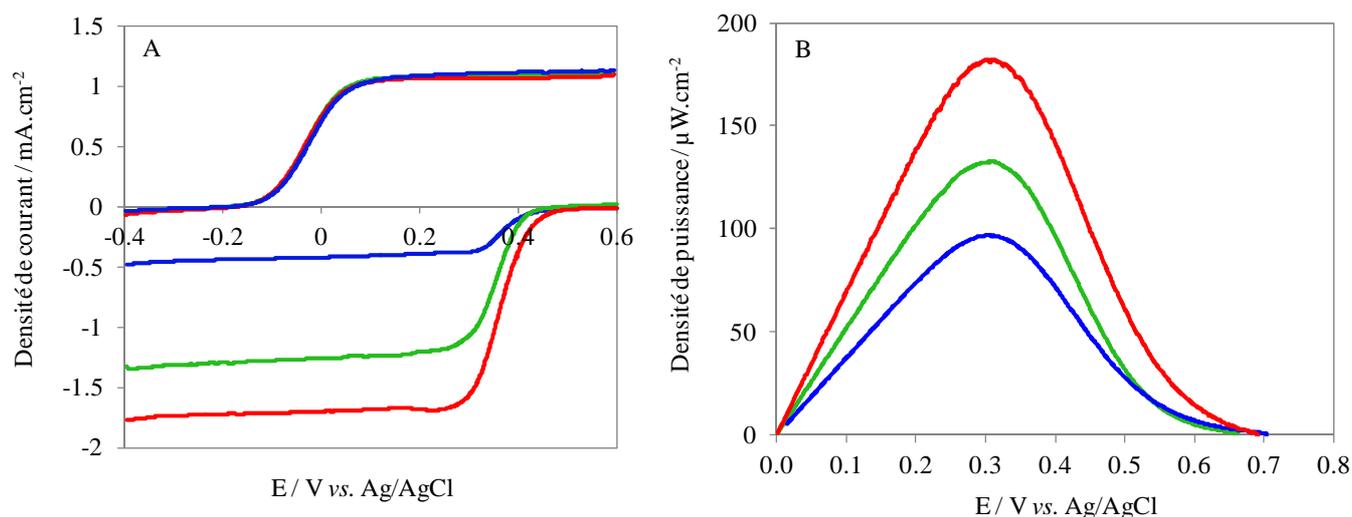
**Figure III.3.4.** CVs à  $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  des électrodes modifiées avec les hydrogels à 100 %v A-Lac (A), et 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD à (B) à 30 %m d'enzyme totale, dans le tampon phosphate de sodium à 20 mM avec 140 mM de NaCl à 37 °C (bleu) et à 50 °C (rouge) sous 1 atm  $\text{O}_2$ . Autres conditions identiques à la figure III.3.1.

En solution la laccase de *P. anserina* montre une activité élevée à haute température[21] il n'est donc pas étonnant de voir qu'à 50 °C l'électrode 100 %v A-Lac ne perd pas de courant (Figure III.3.4.A courbe rouge). Par contre, la cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD augmente son courant de 43 % en moyenne à 50 °C (Figure III.3.4.A courbe rouge).

Or, après augmentation de la température de 37 °C à 50 °C une électrode de 100 %v P-BOD gagne en moyenne 39 % de courant (Figure III.2.1). Le gain de courant à 50 °C observé pour la cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD est donc clairement liée à la proportion de P-BOD.

### 3.2.3. Biopile avec la cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD

Nous avons comparé les biopiles réalisées avec la cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD et les cathodes mono-enzymatiques 100 %v P-BOD et 100 %v A-Lac. Les biopiles sont désignées respectivement GOx-A-Lac/P-BOD, GOx-P-BOD et GOx-A-Lac. Elles ont été testées dans du PBS contenant 15 mM de glucose avec un bullage continu sous oxygène. Nous avons mesuré pour chaque biopile les courbes de polarisation anodiques et cathodiques à  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  et l'évolution de la densité de puissance en fonction du potentiel avec une vitesse de balayage de  $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (Figure III.3.5).



**Figure III.3.5.** Comparaison des courbes de polarisation anodiques et cathodiques enregistrées à  $10 \text{ mV.s}^{-1}$  (A) et des densités de puissances enregistrées à  $1 \text{ mV.s}^{-1}$  (B) des biopiles enzymatiques GOx-*P*-BOD (vert), GOx-*A*-Lac (bleu) et GOx-*A*-Lac/*P*-BOD (rouge) dans le PBS à 15 mM de glucose  $37^\circ\text{C}$  sous 1 atm  $\text{O}_2$ .

La biopile GOx-*A*-Lac (Figure III.3.5.A courbes bleues) est limitée par son courant cathodique. Du fait de sa grande sensibilité au chlore la densité de courant la plus faible est obtenue pour la cathode 100 %v *A*-Lac. Ainsi, la biopile GOx-*A*-Lac (Figure III.3.5.B courbe bleue) délivre une densité de puissance inférieure aux autres.

Les biopiles GOx-*A*-Lac/*P*-BOD (Figure III.3.5.A courbes rouges) et GOx-*P*-BOD (Figure III.3.5.A courbes vertes) sont limitées par leur courant anodique. Cependant la différence de potentiel de début de réduction de l' $\text{O}_2$  entre les cathodes 100 %v *P*-BOD et 50 %v *A*-Lac / 50 %v *P*-BOD induit une différence de densité de puissance. Ainsi, vu que la cathode bi-enzymatique commence la réduction de l' $\text{O}_2$  à un potentiel plus élevé (Figure III.3.5.A courbe rouge) que la cathode 100 %v *P*-BOD (Figure III.3.5.A courbe verte) la biopile GOx-*A*-Lac/*P*-BOD (Figure III.3.5.B courbe rouge) délivre une densité de puissance supérieure à la biopile GOx-*P*-BOD (Figure III.3.5.B courbe verte). Le tableau III.3.2 compare les caractéristiques des différentes biopiles obtenues.

	<b>GOx-P-BOD</b>	<b>GOx-A-Lac</b>	<b>GOx-A-Lac/P-BOD</b>
<b>Densité de puissance moyenne (<math>\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}</math>)</b>	129 $\pm$ 4	84 $\pm$ 13	173 $\pm$ 10
<b>OCV moyen (V vs. Ag/AgCl)</b>	0,667 $\pm$ 0,026	0,707 $\pm$ 0,016	0,693 $\pm$ 0,002

**Tableau III.3.2.** Comparaison des densités de puissance et des OCV moyens des biopiles enzymatiques GOx-P-BOD, GOx-A-Lac et GOx-A-Lac/P-BOD.

La biopile GOx-A-Lac/P-BOD délivre en moyenne 34 % de puissance en plus que la biopile GOx/P-BOD et plus du double de la densité de puissance de la biopile GOx-A-Lac (Tableau III.3.2). En plus d'une forte densité de puissance, la biopile à cathode bi-enzymatique génère également des tensions élevées. Nous avons pu obtenir une tension maximale de + 0,695 V vs. Ag/AgCl avec une densité de puissance de 183  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

### 3.3. Conclusion intermédiaire

Nous avons réalisé une cathode bi-enzymatique avec la BOD de *B. pumilus* et la laccase de *P. anserina*. La cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD obtenue délivre une densité de puissance supérieure aux cathodes mono-enzymatiques 100 %v A-Lac et 100 %v P-BOD en absence et en présence de chlore et augmente son activité à haute température.

Tout comme pour la cathode bi-enzymatique 50 %v M-BOD / 50 %v P-BOD, il semble que les propriétés améliorées de la cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v P-BOD résultent de la compensation des effets antagonistes sur les deux enzymes en fonction des conditions expérimentales. Avec cette cathode nous avons pu réaliser des biopiles glucose/O<sub>2</sub> sans membrane plus efficaces pouvant fournir jusqu'à de 183  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  de densité de puissance avec une tension maximale de + 0,695 V vs. Ag/AgCl.

## Conclusion

En combinant les BODs de *B. pumilus* et *M. oryzae* nous avons réalisé une nouvelle cathode bi-enzymatique dont la composition optimale est de 50 %v *P*-BOD et 50 %v *M*-BOD pour un hydrogel à 30 %m de BOD totale. La cathode bi-enzymatique commence à réduire l'oxygène à  $+0,502 \pm 0,001$  V vs. Ag/AgCl et délivre une densité de courant de  $-0,86 \pm 0,01$  mA.cm<sup>-2</sup> dans le PBS. Cette densité de courant est 26 % plus élevée en moyenne que celle de la cathode mono-enzymatique 100 %v *M*-BOD et 9 % plus élevé en moyenne que celle la cathode mono-enzymatique 100 %v *P*-BOD. Elle correspond à la somme des densités de courant des cathodes mono-enzymatiques à 15 %m de BOD totale dans l'hydrogel, mais elle est plus faible que la valeur théorique attendue car le pourcentage massique du polymère rédox assurant le transfert des électrons est moindre à 30 %m de BOD.

Nous avons étudié l'influence des paramètres physiologiques sur les performances de la nouvelle cathode bi-enzymatique et en particulier l'effet de la température, du chlore et de l'urate. Selon la proportion de chaque enzyme dans le mélange bi-enzymatique des comportements différents peuvent être observés. Dans la cathode bi-enzymatique le potentiel de réduction de l'O<sub>2</sub> est corrélé à la proportion de *M*-BOD tandis que la densité de courant, l'activité en présence de chlore, d'urate et à haute température sont corrélées à la proportion de *P*-BOD.

Ces résultats peuvent être expliqués par une répartition homogène des enzymes sur l'électrode. Ainsi, dans les cathodes bi-enzymatiques les interactions entre enzymes modulent le potentiel et il existerait un compromis des effets antagonistes qu'ont les paramètres physiologiques sur chaque enzyme.

Nous avons également réalisé une cathode bi-enzymatique avec *B. pumilus* et la nouvelle laccase de *P. anserina*. La cathode bi-enzymatique 50 %v A-Lac / 50 %v *P*-BOD présentait également des propriétés améliorées par rapport aux cathodes mono-enzymatiques 100 %v A-Lac et 100 %v *P*-BOD.

Les biopiles obtenues dans les conditions physiologiques avec les cathodes bi-enzymatiques délivrent des densités de puissance supérieures à celle des biopiles utilisant des cathodes mono-enzymatiques. Les biopiles utilisant les cathodes mono-enzymatiques 100% *M*-BOD et 100% A-Lac, délivrent les puissances les plus faibles en raison de leur sensibilité au chlore.

Les résultats obtenus avec les cathodes bi-enzymatiques à base d'oxydase multi-cuivre sont prometteurs. Néanmoins, la différence de potentiel entre la *P*-BOD et les deux autres enzymes n'est que de l'ordre de 60 mV. Il serait donc intéressant de réaliser un système bi-enzymatique avec une

laccase de potentiel plus élevée come par exemple la *Corsiolus hirsutus*, qui réduit l'O<sub>2</sub> à un potentiel supérieur à + 0,6 V vs. Ag/AgCl [29].

Par ailleurs, les résultats obtenus laissent supposer que dans un mélange mono-enzymatique la quantité d'enzyme maximale nécessaire pour la réduction efficace de l'O<sub>2</sub> ne correspond pas *a priori* au pourcentage massique optimal déterminé pour l'hydrogel rédox. Effectivement en réalisant un mélange bi-enzymatique, la modification des interactions entre enzymes permet d'immobiliser de façon optimale une plus grande quantité enzymes sur l'électrode (en TED) et/ou d'accroître les interactions avec le polymère rédox. De ce fait la quantité d'enzymes permettant la réduction de l'O<sub>2</sub> augmente et on obtient des courants plus élevés dans les conditions physiologiques. Il serait alors intéressant d'essayer de déterminer pour chaque enzyme les quantités optimales réellement nécessaires. Cela pourrait se faire par exemple en réalisant des cathodes bi-enzymatiques avec une enzyme active et l'autre inactive à différents ratios.

En définitive, le système bi-enzymatique peut être utile pour les biopiles enzymatiques glucose/O<sub>2</sub> mais également les biopiles H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> où une haute tension de fonctionnement et haute activité sont nécessaires à température élevée. De plus ce procédé permet d'offrir une alternative à tous ceux qui ne bénéficient pas d'une plate-forme d'ingénierie enzymatique. En outre, il a l'avantage d'être simple, rapide, facile à mettre en œuvre et peut être étendu à de nombreux autres systèmes enzymatiques.

### Références bibliographiques du Chapitre III

1. Reculosa, S., et al., *Design of catalytically active cylindrical and macroporous gold microelectrodes*. Advanced functional material, 2010. **21**: p. 691-698.
2. Minteer, S.D., B.Y. Liaw, and M.J. Cooney, *Enzyme-based biofuel cells*. Current Opinion in Biotechnology, 2007. **18** p. 228-234.
3. Lau, C., et al., *Design of carbon nanotube-based gas-diffusion cathode for O<sub>2</sub> reduction by multicopper oxidases*. Advanced Energy Materials, 2012. **2**(1): p. 162–168.
4. Wen, H., et al., *Carbon fiber microelectrodes modified with carbon nanotubes as a new support of immobilization of glucose oxidase*. Microchimica Acta, 2011. **175** p. 283-289.
5. Boland, S. and D. Leech, *A glucose/oxygen enzymatic fuel cell based on redox polymer and enzyme immobilisation at highly-ordered macroporous gold electrodes*. The Analyst 2012. **137** p. 113-117.
6. Flexer, V., et al., *Porous mediator-free enzyme carbonaceous electrodes obtained through integrative chemistry for biofuel cells*. Energy and Environmental Science, 2011. **4**(6): p. 10.
7. Cosnier, S., M. Holzinger, and A. Le Goff, *Recent Advances in Carbon Nanotube-Based Enzymatic Fuel Cells*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2014. **2**(45): p. 1-6.
8. Flexer, V., et al., *Efficient direct electron transfer of soluble PQQ-glucose dehydrogenase on carbon cryogel electrodes at neutral pH*. Analytical Chemistry 2011. **83** p. 5721-5727.
9. Zebda, A., et al., *Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes*. Nature Communication, 2011.
10. Gupta, G., et al., *Direct electron transfer catalyzed by bilirubin oxidase for air breathing gas-diffusion electrodes*. Electrochemistry Communications, 2011. **13**: p. 3.
11. Zhu, Z., et al., *Directed evolution of glucose oxidase from *Aspergillus niger* for ferrocenemethanol mediated electron transfer*. Biotechnology Journal, 2007. **2**: p. 241-248.
12. Durand, F., et al., *Designing a highly active soluble PQQ-glucose dehydrogenase for efficient glucose biosensors and biofuel cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun. , 2010. **402** p. 750-754.
13. Courjean, O. and N. Mano, *Recombinant glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense* for efficient bioelectrochemical applications in physiological conditions*. Journal of Biotechnology, 2011. **151**: p. 122-129.
14. Zumarraga, M., et al., *Altering the laccase functionality by in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra*. Proteins 2008. **71**: p. 250-260.
15. Mate, D.M., et al., *Blood tolerant laccase by directed evolution*. Chemistry & biologie, 2013. **20**: p. 223-231.
16. Suraniti, E., et al., *Uncovering and Redesigning a Key Amino Acid of Glucose Oxidase for Improved Biotechnological Applications*. Electroanalysis, 2013. **25**( 3): p. 606 - 611.
17. Wong, T.S. and U. Schwaneberg, *Protein engineering in bioelectrocatalysis*. Curr Opin Biotechnol., 2003 **14**(6): p. 590-6.
18. Guven, G., R. Prodanovic, and U. Schwaneberg, *Protein Engineering – An Option for Enzymatic Biofuel Cell Design*. Electroanalysis 2010. **22**: p. 765-775.
19. Ammam, M. and J. Fransær, *Combination of laccase and catalase in construction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–O<sub>2</sub> based biocathode for applications in glucose biofuel cells*. Biosensors and Bioelectronics, 2013. **39**(1): p. 274-281.
20. Sokic-Lazic, D., et al., *Oxidation of Biofuels: Fuel Diversity and Effectiveness of Fuel Oxidation through Multiple Enzyme Cascades*. Electroanalysis 2010. **22**: p. 757-764.
21. Durand, F., S. Gounel, and N. Mano, *Purification and characterization of a new laccase from the filamentous fungus *Podospora anserina**. Protein Expression and Purification 2013. **88** p. 61-66.
22. Macellaro, G., et al., *Effective mutations in a high redox potential laccase from *Pleurotus ostreatus**. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014. **98**: p. 4949-4961.
23. Gelo-Pujic, M., et al., *Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris**. Applied and Environmental Microbiology 1999. **65**: p. 5515-5521.
24. Suraniti, E., et al., *Thermophilic biocathode with bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus**. Electrochemistry Communications, 2013. **26**: p. 4.
25. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 7.

26. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Magnaporthe oryzae: an attractive new enzyme for biotechnological applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. **96**(6): p. 10.
27. Ciaurriz, P., E. Bravo, and K. Hamad-Schifferli, *Effect of architecture on the activity of glucose oxidase/horseradish peroxidase/carbon nanoparticle conjugates*. Journal of Colloid and Interface Science, 2014. **414**: p. 73-81.
28. Barton, S.C., J. Gallaway, and P. Atanassov, *Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices*. Chemical Reviews, 2004. **104**(10): p. 20.
29. Mano, N., et al., *A miniature biofuel cell operating at 0.78 V*. Chem. Commun 2003: p. 518-519.







## Conclusion générale et perspectives

Par leur sélectivité accrue les enzymes offrent la possibilité de miniaturiser les biopiles, de ce fait l'implantation de dispositifs médicaux alimentés par des biopiles enzymatiques peut être envisagée. L'utilisation de biocapteurs à glucose implantés permettrait aux patients diabétiques de contrôler régulièrement leur glycémie et d'éviter ainsi les complications inhérentes à cette maladie. Cependant, les performances des biopiles enzymatiques glucose/O<sub>2</sub> restent à l'heure actuelle limitées par la cathode.

Pour pallier cette limitation l'identification de nouvelles enzymes plus efficaces pour assurer la réduction de l'O<sub>2</sub> en eau est nécessaire. Dans cette optique les bilirubine oxydases sont les enzymes cathodiques les plus prometteuses. Elles présentent en effet une activité et une stabilité élevées à pH neutre et en présence de chlore ainsi qu'une bonne stabilité thermique. Les BODs fongiques de *Myrothecium verrucaria* et de *Trachyderma tsunodae* ont été les plus utilisées au cours des trente dernières années, mais elles ont montré des limitations importantes en termes d'activité et de stabilité. Récemment deux nouvelles BODs ont été identifiées au CRPP : la BOD issue du champignon de *Magnaporthe oryzae* et de la bactérie *Bacillus pumilus*. Ces enzymes se sont montrées plus efficaces que les BODs de *Myrothecium verrucaria* et de *Trachyderma tsunodae*.

Nous avons observé des différences de comportement en électrochimie pour ces deux nouvelles BODs. Nous avons montré que les caractéristiques structurales propres à ces deux enzymes seraient susceptibles d'expliquer ces différences. Par exemple *M. oryzae* commence à réduire l'O<sub>2</sub> à un potentiel de + 0,50 V vs. Ag/AgCl alors que chez *B. pumilus* la réduction commence + 0,44 V vs. Ag/AgCl. Cette différence serait liée à une plus grande hydrophobicité autour du site actif de *M. oryzae*. La plus grande sensibilité au chlore de *M. oryzae* par rapport à *B. pumilus* pourrait être due à une structure permettant une meilleure accessibilité des anions Cl<sup>-</sup> au centre trinuécléaire de *M. oryzae*. La BOD de *B. pumilus* possède une activité croissante avec la température en raison de ses propriétés intrinsèques, étant donné qu'elle est issue d'une bactérie thermophile. En raison d'une proportion de zones hydrophobes plus importantes et d'une possible gêne stérique par un résidu arginine situé à l'entrée du site actif de *B. pumilus* cette enzyme est plus performante en TEM qu'en TED, contrairement à *M. oryzae*.

Nous avons également constaté en TEM que *B. pumilus* est plus sensible à la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel. Cette sensibilité pourrait être due à

des différences d'interactions avec le polymère rédox en raison d'une quantité de charges négatives plus faible à la surface de *B. pumilus* par rapport à *M. oryzae*. Ainsi à 23 mM de phosphate de sodium dans l'hydrogel, le courant de *B. pumilus* devient plus faible de 47 % alors que celui de *M. oryzae* ne baisse que de 7 % par rapport à un hydrogel contenant 1,7 mM de phosphate de sodium.

Par contre le plus faible courant obtenu pour *B. pumilus* à 23 mM de phosphate de sodium dans l'hydrogel est contre balancé par une tolérance élevée à l'urate, contrairement à *M. oryzae* qui y est sensible quelle que soit la concentration de phosphate de sodium dans l'hydrogel. Dans ces conditions, après plus de 3 heures de rotation continue dans le sérum *B. pumilus* reste stable en ne perdant que 9 % d'activité contre 38 % pour *T. tsunodae*. La déstabilisation observée sur les BODs en présence d'urate serait liée à l'interaction entre le produit d'oxydation de l'urate et les cuivres des enzymes. Les mécanismes réactionnels mis en jeu et les interactions possibles entre les enzymes et l'urate sont pour l'heure difficiles à comprendre. Pour ce faire il serait intéressant d'arriver à identifier ce produit d'oxydation et également de pouvoir réaliser des études cristallographiques des enzymes en présences d'urate.

Avec la BOD de *M. oryzae* nous avons étudié les performances de nouveaux monolithes de carbones poreux contenant des nanoparticules d'or. Nous avons supposé que l'ajout de nanoparticules d'or permettrait d'améliorer la connectivité des enzymes et donc d'obtenir de meilleurs courants par rapport à des matériaux sans or. Dans un premier temps nous avons démontré qu'en réalisant un séchage à 25 °C sous vide nous pouvons augmenter la quantité d'enzymes immobilisées ainsi que leur connectivité par rapport à un séchage à 4 °C. Par contre, les matériaux contenant des nanoparticules d'or donnent des courants catalytiques très faibles en raison de la perte de porosité induite par les inclusions d'or.

En utilisant une méthode de synthèse séquentielle des nanoparticules d'or, nous avons réussi à améliorer la connectivité des enzymes, mais il y existe toujours une perte de porosité qui augmente avec le pourcentage d'or dans les matériaux. Nous supposons qu'en modifiant certains paramètres lors de la synthèse des nanoparticules, tels que la concentration de précurseur d'or ou encore la température de réduction, nous pouvons espérer obtenir une quantité d'or optimale permettant d'améliorer les courants catalytiques tout en limitant la perte de porosité.

Au vu de leur propriétés complémentaires nous avons combiné les BODs de *B. pumilus* (*P*-BOD) et de *M. oryzae* (*M*-BOD) dans une nouvelle cathode bi-enzymatique. Nous avons montré que la composition optimale de la cathode bi-enzymatique est de 50 %v *P*-BOD et 50 %v *M*-BOD pour un hydrogel à 30 %m de BOD totale. La particularité de cette cathode bi-enzymatique est qu'elle commence à réduire l'oxygène à  $+ 0,502 \pm 0,001$  V vs. Ag/AgCl et délivre une densité de courant de  $-0,86 \pm 0,01$  mA.cm<sup>-2</sup> dans les conditions physiologiques. Nous obtenons donc en moyenne 26 % de courant en plus que pour la cathode mono-enzymatique 100 %v *M*-BOD avec la réduction de l'oxygène commençant au même potentiel. Dans la nouvelle cathode bi-enzymatique le potentiel de début de réduction de l'O<sub>2</sub> est corrélé à la proportion de *M*-BOD, par contre la densité de courant, l'activité en présence de chlore, d'urate et à haute température sont corrélées à la proportion de *P*-BOD.

Sur la base de ces résultats nous avons supposé que la répartition des enzymes sur l'électrode est homogène. De ce fait, les interactions entre enzymes immobilisées modulent le potentiel de réduction de chaque enzyme et il existerait un compromis des effets antagonistes liés à la présence de chlore, d'urate et à la température. La cathode bi-enzymatique fonctionne donc grâce à un effet coopératif des deux enzymes. Afin de confirmer ou non l'hypothèse d'une répartition homogène des enzymes sur l'électrode il serait intéressant de pouvoir observer directement l'hydrogel bi-enzymatique. Typiquement l'utilisation d'une technique telle que la microscopie à fluorescence haute résolution permettrait de réaliser ces observations.

De la même façon nous avons conçu une cathode bi-enzymatique avec *B. pumilus* et la laccase de *Podospora anserina* (*A*-Lac). Nous avons montré que la cathode bi-enzymatique 50 %v *A*-Lac / 50 %v *P*-BOD était plus performante que les cathodes mono-enzymatiques 100 %v *A*-Lac et 100 %v *P*-BOD. Les résultats obtenus avec les cathodes bi-enzymatiques à base d'oxydases multi-cuivre sont prometteurs. Ainsi, un système bi-enzymatique utilisant *B. pumilus* combinée à une laccase réduisant l'O<sub>2</sub> à un potentiel encore plus élevé, comme par exemple la *Corsiolus hirsutus* qui réduit l'O<sub>2</sub> à plus de + 0,6 V vs. Ag/AgCl, permettrait d'obtenir des résultats encore meilleurs.

Le système bi-enzymatique offre une alternative efficace pour améliorer les performances des cathodes des biopiles enzymatiques glucose/O<sub>2</sub>. Ce procédé est très intéressant du fait de sa simplicité, sa rapidité et sa facilité de mise en œuvre. Cependant l'étude du système doit

être approfondie notamment pour comprendre comment les interactions entre les enzymes peuvent influencer leur comportement sur l'électrode.

En définitive, nous avons pu étudier de façon plus poussée les deux nouvelles BODs de *Bacillus pumilus* et de *Magnaporthe oryzae*. Nous avons montré pour chacune de ces deux enzymes quelles en sont les performances et les limitations, pour finir par les combiner dans une cathode bi-enzymatique efficace. Nous espérons que nos travaux préliminaires sur les cathodes bi-enzymatiques utilisant des oxydases multi-cuivre cuivre pourront servir de base à la réalisation d'autres systèmes encore plus performants.





# Matériels et méthodes

---



## Sommaire

1. Produits chimiques et matériaux .....	237
1.1. Les enzymes .....	237
1.2. Les polymères rédox.....	237
2. Méthodes expérimentales .....	238
2.1. Tests d'activité en solution .....	238
2.2. Mesures électrochimiques .....	238
2.3. Préparation des électrodes avec un hydrogel rédox.....	239
2.4. Préparation des électrodes de cryogel de carbone .....	239
2.5. Préparation de la solution d'urate .....	240
2.6. Préparation des électrodes de papier de carbone .....	240
2.7. Préparation des biopiles .....	240
2.8. Synthèse de la silice poreuse (Si-HIPE) .....	241
2.9. Synthèse de la matrice de carbone poreux (C-HIPE) .....	242
2.10. Synthèse des nanoparticules d'or .....	242
2.11. Observations microscopiques des C-HIPE et Au@C-HIPE.....	243
2.12. Préparation des électrodes poreuses C-HIPE et Au@C-HIPE .....	243
Références bibliographiques .....	244

## 1. Produits chimiques et matériaux

Tous les produits chimiques de qualité analytique ou supérieure ont été achetés chez Sigma (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO). Le poly éthylène glycol diglycidyl éther (400) (PEGDGE) a été acheté chez Polysciences Inc. (Warrington, PA). Les papiers de carbone poreux (Toray TGPH-030) provenaient de chez E-TEK (Somerset, NJ). Le CTAB ( $C_{14}H_{29}N(CH_3)_3Br$ , TTAB, 98%) provenait de chez Alfa Aesar. La peinture de carbone conductrice à 20 % de matière solide dans l'isopropanol provenait de chez SPI supplies, (West Chester, PA).

### 1.1. Les enzymes

La production et la purification des deux nouvelles BODs ont été réalisées selon des protocoles décrits pour *B. pumilus* [1] et *M. oryzae* [2]. Les deux enzymes ont été conservées dans du tampon phosphate de sodium à 50 mM pH 7,6 sans chlore à 82,46 mg.ml<sup>-1</sup> pour *B. pumilus* et 98,5 mg.ml<sup>-1</sup> pour *M. oryzae*. Avant utilisation, chaque enzyme a été diluée avec de l'eau distillée jusqu' à 5 mg.ml<sup>-1</sup>. La BOD de *B. pumilus* utilisée pour les premières séries d'expérimentations avec l'urate, a été conservée à 3,6 mg.ml<sup>-1</sup> dans du tampon phosphate de sodium à 50 mM pH 7,6 sans chlore, elle a été utilisée telle quelle sans dilution préalable. Les mutants R416F, R416E et M516F de *B. pumilus* ont été réalisés au laboratoire en utilisant le kit de mutagenèse QuikChange®.

La BOD de *T. tsunodae* et la GOx d'*Aspergillus niger* nous ont été fournies par AMANO (Lombard, IL). *T. tsunodae* a été purifiée et concentrée à 51 mg.ml<sup>-1</sup> dans notre laboratoire suivant un protocole précis [3], puis diluée à 5 mg.ml<sup>-1</sup> avant utilisation. La GOx d'*Aspergillus niger* purifiée [4] a été conservée à 60,7 mg.ml<sup>-1</sup> puis diluée à 8,36 mg.ml<sup>-1</sup> avant utilisation. La laccase de *Podospora anserina* purifiée [5] a été conservée dans du tampon phosphate de potassium à 50 mM pH 6 sans chlore à 69,38 mg.ml<sup>-1</sup> puis diluée à 5 mg.ml<sup>-1</sup>.

### 1.2. Les polymères rédox

Le polymère rédox anodique utilisé est le PAA-PVI-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl<sup>-</sup>]<sup>+2+</sup>, conservé à 10 mg ml<sup>-1</sup>. La synthèse et les caractéristiques de ce polymère ont été rapportés par Cadet et al. [6]. Le polymère rédox anodique utilisé est le PVP-[Os(N,N-

dialkyl-2,2-bi-imidazole)<sub>3</sub>]<sup>2+/3+</sup> à 7,14 mg.ml<sup>-1</sup> dont la synthèse a été rapporté par Mano et al. [7].

## 2. Méthodes expérimentales

### 2.1. Tests d'activité en solution

Les analyse de spectroscopie UV-visible, on été réalisées sur un spectrophotomètre (Cary 100 system) de chez Varian, Inc. (Palo Alto, CA), équipé d'un portoir multi cellules thermo réglable. Les tests d'activité sont réalisés à pH 4 avec des solutions de 100 mM d'ABTS dissout dans l'eau ou à pH 7 avec des solutions de 2 mM syringaldazine dissout dans le méthanol. La solution de mesure est obtenue en mélangeant 30 µl de solution de substrat à 3 ml de tampon phosphate citrate à pH 4 (pour l'ABTS) ou pH 7 (pour la syringaldazine). 3 mL de cette solution sont introduits dans une cuve de spectrophotomètre, puis on y ajoute le volume approprié d'enzyme diluée à 50 nM dans du tampon phosphate 50 mM pH 6. Pour déterminer l'activité la moyenne sur 3 mesures à différentes concentration d'enzyme est effectuée.

### 2.2. Mesures électrochimiques

Les mesures ont été effectuées en utilisant un bipotentiostat (CH Instruments, modèle CHI 842B, Austin, TX, USA) connecté à un ordinateur dédié. Un fil de platine spiralé est utilisé comme contre-électrode et tous les potentiels sont mesurés par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl conservée dans 3 M de NaCl (BAS, West Lafayette, IN). Toutes les mesures électrochimiques sont effectuées dans une cellule thermostatée connectée à un circulateur isotherme (Companion Lab, FR).

Les électrodes tournantes sont fixées à un rotor de chez Pine Instruments. La rotation de l'électrode permet de produire une contrainte de cisaillement et des conditions de transport de masse semblables à ce que subiraient des biopiles implantées, le sang circulant à une vitesse élevée (> 10 cm.s<sup>-1</sup>) [8].

Les tampons de mesures sont systématiquement bullés sous un flux d'argon ou d'oxygène pendant 30 minutes, avant les tests électrochimiques, par la suite un flux léger est maintenu dans le tampon durant chaque expérience.

### 2.3. Préparation des électrodes avec un hydrogel rédox

Des électrodes de carbone vitreux de 3 mm de diamètre ont été polies avec une poudre de particules d'alumine ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) de 0,05  $\mu\text{m}$  (Buehler, lac Bluff, IL), puis rincées aux ultrasons pendant 5 min dans de l'eau distillée. L'étape de polissage est répétée, jusqu'à ce qu'aucune caractéristique voltammétrique ne soit observée lors d'un balayage à 50  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  dans du tampon phosphate entre 0 et 0,6 V vs. Ag/AgCl. Les électrodes sont ensuite séchées sous flux d'air et hydrophylisées par passage au plasma  $\text{O}_2$  à 1 Torr pendant 5 minutes.

Par la suite, elles ont été modifiées avec un hydrogel rédox, aux ratios optimums pour chaque enzyme. Ainsi l'électrode de *T. tsunodae*, est modifiée avec un hydrogel constitué de 77,3 %m de polymère rédox, 15,2 %m de BOD à 5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  et 7,4 %m de PEGDGE à 2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  avec un taux de recouvrement de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Les électrodes modifiées avec *T. tsunodae* sont séchées pendant 18 h à 25 °C. Les électrodes modifiées avec *B. pumilus* et *M. oryzae* ont une composition massique optimale de 62,1 %m du même polymère rédox 30,5 %m de BOD à 5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  et 7,4 %m de PEGDGE à 2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Sauf mention contraire, dans les deux cas, le taux de recouvrement est de 108  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Les électrodes ainsi modifiées sont séchées pendant 18 heures à 4 °C pour *M. oryzae* et 4 heures à 25 °C pour *B. pumilus*. Chaque expérience est réalisée au moins trois fois, avec une reproductibilité de  $\pm 10\%$ .

### 2.4. Préparation des électrodes de cryogel de carbone

Les électrodes ont été réalisées en mélangeant 25 mg de poudre de cryogel de carbone (CCG) à 100 mg d'une solution de Poly fluorure de vinylidène (PVDF), et à 150  $\mu\text{L}$  de N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP). Le tout a été soigneusement homogénéisé par sonication (sonicateur Branson sonifier 450®) pendant 3 minutes avec un cycle continu. Puis 5  $\mu\text{L}$  de la suspension obtenue sont déposés à la surface des électrodes de carbone vitreux de 5 mm de diamètre. Les électrodes sont ensuite séchées à 60 °C pendant 18 heures.

Après leur retour à température ambiante, pour améliorer la performance du TED, elles sont traitées au plasma pendant 5 minutes afin de rendre la surface de CCG plus hydrophile. Puis elles sont refroidies en déposant 5  $\mu\text{L}$  d'eau, dont l'excès est délicatement tamponné avec du papier absorbant. Les électrodes sont ensuite séchées sous un flux d'air léger et 10  $\mu\text{L}$  d'enzyme à 10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  y sont déposés. Les électrodes ainsi modifiées sont stockées à 4 °C pendant 1 heure avant utilisation.

### **2.5. Préparation de la solution d'urate**

Une solution mère de 100 mM d'urate a été préparée par dissolution d'acide urique dans de l'hydroxyde de potassium (KOH) 1 M. Par la suite, une solution de travail à 5,21 mM d'urate a été obtenue extemporanément en deux temps ; la solution stock a d'abord été diluée jusqu'à 10 mM dans du KOH 1 M, puis son pH a été ajusté à 7,4 par ajout de 9,2 mL de phosphate de potassium monobasique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) à 1 M. Pour chaque expérience un volume de 5,31 mL de la solution de travail a été ajouté à 50 ml de PBS (pH 7,2 ; 0,14 M de NaCl ; 20 mM de phosphate) à 37,5 °C de façon à obtenir une concentration finale de 0,5 mM urate.

### **2.6. Préparation des électrodes de papier de carbone**

Des électrodes à base de papier de carbone poreuses ont également été préparées. Pour ce faire, des électrodes de carbone vitreux de 3 mm de diamètre ont été polies et l'état de leur surface a été vérifié en électrochimie comme décrit précédemment. Dans un papier de carbone composé de fibres de 10  $\mu\text{m}$  diamètre avec une fraction interstitielle nominale de 78 %, un disque de 4 mm de diamètre et 1 mm d'épaisseur a été découpé puis collé sur l'électrode à l'aide de pâte de carbone conductrice (SPI, West Chester, PA). Après séchage de la pâte de carbone pendant 5 heures, les électrodes ont été hydrophylisées par passage au plasma  $\text{O}_2$  à 1 Torr pendant 5 minutes. Par la suite, elles ont été modifiées avec l'hydrogel rédox aux ratios optimums pour chaque enzyme. Les électrodes modifiées sont séchées pendant 18 heures à température ambiante avant utilisation.

### **2.7. Préparation des biopiles**

La biopile est faite de deux fibres de carbone de 7  $\mu\text{m}$  de diamètre et 2 cm de long (Goodfellow, Cambridge, U.K.). Les fibres séparées de 0,5 cm ont été placées sur une lame de microscope de 2 cm long. L'extrémité de chaque fibre est connectée à un fil de cuivre à l'aide d'une peinture de carbone conductrice. La peinture sèche est ensuite isolée avec de la résine époxy (Araldite). La surface active de chaque fibre est de 0,44  $\text{mm}^2$ .

Les biopiles rendues hydrophiles pendant 5 minute au plasma, ont été modifiées à l'anode avec un hydrogel de 35 %m de glucose oxydase purifiée à  $8,36 \text{ mg.ml}^{-1}$ , 55 %m de PVP-[Os(N,N-dialkyl-2,2-bi-imidazole)<sub>3</sub>]<sup>2+/3+</sup> à  $7,14 \text{ mg.ml}^{-1}$  et 10 %m de PEGDGE à  $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ . La cathode à base de BOD a été modifiée avec un hydrogel de 62,1 %m de PAA-PVI-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> 30,5 %m de BOD à  $5 \text{ mg.ml}^{-1}$  et 7,4 %m de PEGDGE à  $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ . La cathode à base de *Podospora anserina* a été modifiée avec un hydrogel de 62,1 %m du même polymère rédox 30,5 %m de laccase à  $5 \text{ mg.ml}^{-1}$  et 7,4 %m de PEGDGE à  $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Le taux de recouvrement à l'anode et à la cathode à été maintenu à  $2000 \mu\text{g.cm}^{-2}$ . Les biopiles ainsi modifiées sont séchées 18 heures à 4°C.

## 2.8. Synthèse de la silice poreuse (Si-HIPE)

5 grammes de TEOS sont ajoutés à 16 grammes d'une solution aqueuse concentrée (35 % massiques) d'un tensioactif cationique, ici le CTAB. Cette solution est acidifiée avec 6 grammes d'acide chlorhydrique afin de se placer dans des conditions de catalyse acide. Cette solution d'acide silicique et de tensioactif concentré est placée dans un bécher en verre, puis on y ajoute 35 grammes de dodécane goutte à goutte tout en remuant en continu à l'aide d'un pilon en céramique. L'émulsion obtenue est coulée dans des moules, la plupart du temps des tubes à essais en polystyrène. Ces tubes sont fermés pour éviter toute évaporation pendant le processus de condensation de la silice à partir de l'acide silicique. Les tubes sont laissés au repos pendant une semaine, puis leur contenu est démoulé. A cette étape de la manipulation, les matériaux ont déjà pris forme, mais ils sont particulièrement fragiles. Ils sont alors lavés dans un bain contenant à parts égales du THF et de l'acétone, afin d'éliminer tout résidu des réactions sol-gel, mais surtout le dodécane qui constituait la phase dispersée de l'émulsion. Les matériaux sont laissés 24 heures dans ce bain et l'opération est renouvelée trois fois.

Puis intervient le séchage, qui est une étape délicate. Un séchage trop rapide entraîne en effet, l'effondrement de la structure sous l'effet des forces capillaires. Le séchage est donc réalisé dans un dessiccateur très légèrement ouvert, de façon à ce qu'il soit le plus lent possible (de dix à quinze jours). Les matériaux sont ensuite calcinés à 650 °C pendant 6 heures, avec une montée en température de 2 °C/min et un premier plateau à 200 °C pendant 2 heures afin d'éliminer les résidus de tensioactifs piégés dans la structure des matériaux. A l'issue de ce traitement, les silices poreuses obtenues présentent une bonne résistance

mécanique. Elles sont nommées Si-HIPE, [9-12] en référence à l'émulsion concentrée utilisée lors de leur synthèse.

## 2.9. Synthèse de la matrice de carbone poreux (C-HIPE)

Un Si-HIPE est immergé dans un bécher contenant une solution composée d'une résine phénolique dans du THF. Le bécher est placé sous un vide dynamique jusqu'à disparition de l'effervescence provoquée par le départ de l'air de la silice poreuse. L'ensemble est laissé sous vide statique pendant trois jours afin d'assurer une bonne imprégnation du matériau par la solution visqueuse. L'échantillon est alors rapidement rincé avec du THF pour s'assurer que la porosité sera ouverte et qu'il n'apparaîtra pas une couche de résine étanche sur toute sa surface. Il est alors traité à 80 °C pendant 24 heures pour initier la polymérisation de la résine et éliminer le solvant. Cette polymérisation est complétée par un traitement dans un four sous air avec un premier plateau à 80 °C pendant 12 heures, puis 110 °C pendant 3 heures et enfin 155 °C pendant 5 heures avec à chaque fois des rampes de montée en température de 2 °C/min. La silice est éliminée grâce à un bain de 24 heures dans une solution d'acide fluorhydrique à 10 % massiques, puis l'échantillon est rincé trois fois pendant 24 heures à l'eau distillée. Enfin, afin d'obtenir du carbone, la résine est pyrolysée, dans un four sous argon à 900 °C avec une vitesse de montée en température de 4 °C/min. Une concentration de la résine d'imprégnation de 60 % massiques diluée dans le THF a été utilisée, les matériaux obtenus ont été désignés C-HIPE<sub>(60Carb)</sub>.

## 2.10. Synthèse des nanoparticules d'or

Les échantillons de carbone poreux obtenus sont placés dans un bécher contenant une solution de tétrachloroaurate de potassium dans un mélange à parts égales d'eau et d'acétone. Le bécher est placé sous vide dynamique jusqu'à disparition de l'effervescence due au départ de l'air contenu dans le carbone poreux, puis sous vide statique pendant trois jours. L'échantillon est alors laissé séché à l'air, puis le sel d'or est réduit par traitement thermique à 80 °C sous 8 bars d'hydrogène. La concentration en tétrachloroaurate de potassium a été variée pour étudier l'influence de la teneur en or sur les performances électrochimiques. Des concentrations de  $2,25 \times 10^{-2}$  M et  $6,75 \times 10^{-2}$  M ont été utilisées afin d'obtenir respectivement environ 5% et 15% massiques en or [13-14]. Les échantillons ainsi obtenus ont été nommés 5-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub>, 15-Au@C-HIPE<sub>(60Carb)</sub>.

### **2.11. Observations microscopiques des C-HIPE et Au@C-HIPE**

Les observations en microscopie électronique à balayage ont été réalisées avec un microscope Hitachi TM-1000 à une tension d'accélération de 15 kV. Les échantillons ont été métallisés sous vide avec un alliage or-palladium avant observation. Les observations en microscopie électronique à transmission haute résolution ont été réalisées avec un microscope Jeol 2200 FS. Les échantillons ont été broyés délicatement puis déposés sur une grille de cuivre couverte d'une membrane Formvar/carbone.

### **2.12. Préparation des électrodes poreuses C-HIPE et Au@C-HIPE**

Des électrodes de carbone vitreux de 5 mm de diamètre ont été utilisées comme support pour les disques de 1 mm d'épaisseur et 5 mm de diamètre, coupés avec une scie à main dans un monolithe de carbone poreux de forme cylindrique. Les disques ont été collés sur les électrodes de carbone vitreux à l'aide d'une petite goutte de peinture de carbone conductrice, puis les électrodes tridimensionnelles obtenus ont été séchées à l'air libre sous une coupelle pendant au moins 2 semaines. Avant l'adsorption de l'enzyme, les électrodes ont été rendues superficiellement hydrophiles par exposition au plasma O<sub>2</sub> sous 1 Torr pendant 15 min, puis environ 100 µl de solution de *M. oryzae* à 1,7 mg.ml<sup>-1</sup> ont été déposés sur l'électrode poreuse. Cette concentration étant l'optimum reporté dans les précédents travaux de Flexer et Brun [3].

## Références bibliographiques

1. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Bacillus pumilus: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 7.
2. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Magnaporthe oryzae: an attractive new enzyme for biotechnological applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. **96**(6): p. 10.
3. Flexer, V., et al., *Porous mediator-free enzyme carbonaceous electrodes obtained through integrative chemistry for biofuel cells*. Energy and Environmental Science, 2011. **4**(6): p. 10.
4. Gao, F., O. Courjean, and N. Mano, *An improved glucose/O<sub>2</sub> membrane-less biofuel cell through glucose oxidase purification*. Biosensors & Bioelectronics, 2009. **25**(2): p. 6.
5. Durand, F., S. Gounel, and N. Mano, *Purification and characterization of a new laccase from the filamentous fungus Podospora anserina*. Protein Expression and Purification 2013. **88** p. 61-66.
6. Cadet, M., et al., *Design of a highly efficient O<sub>2</sub> cathode based on bilirubin oxidase from Magnaporthe oryzae*. Chemical Physical Chemistry, 2013: p. 4.
7. Mano, N., H.-H. Kim, and A. Heller, *On the relationship between the characteristics of bilirubin oxidases and O<sub>2</sub> cathodes based on their "wiring"*. Journal of Physical Chemistry, 2002. **106**: p. 7.
8. Wan, M., X. Gong, and M. Qian, *In Vivo Hemodynamic Evaluation Based on Transverse Doppler Measurements of Blood Velocities and Vessel Diameter*. IEEE transactions on biomedical engineering, 1999. **46** p. 1074-1080.
9. Barby, D. and Z. Haq, . European Patent 1982. **0060138**.
10. Cameron, N.R. and D.C. Sherrington, *High internal phase emulsions (HIPEs) - Structure, properties and use in polymer preparation*. Biopolymers Liquid Crystalline Polymers Phase Emulsion Advances in Polymer Science, 1996. **126**: p. 163-214
11. Cameron, N.R., *High internal phase emulsion templating as a route to well-defined porous polymers*. Polymer, 2005. **46**(5): p. 1439-1449.
12. Zhang, H. and A.I. Cooper, *Synthesis and applications of emulsion-templated porous materials*. Soft Matter 2005. **1**: p. 107-113.
13. Depardieu, M., et al., *Nano-spots induced break of the chemical inertness of boron: A new route toward reversible hydrogen storage applications*. Journal of Materials Chemistry A, 2014. **2**: p. 7694-7701.
14. Depardieu, M., et al., *Novel Au/Pd@carbon macrocellular foams as electrodes for lithium-sulfur batteries*. Journal of Materials Chemistry A, 2014. **2**: p. 18047-18057.



## LISTE DES PUBLICATIONS

- ✓ Mano, N. and Edembe, L. "Bilirubin oxidases in bioelectrochemistry: Features and recent findings", *Biosens. Bioelectron.*, 50, 478-485, (2013) - 10.1016/j.bios.2013.07.014
  
- ✓ Brun, N., Edembe, L., Gounel, S., Mano, N. and Titirici, M.M. "Emulsion-Templated Macroporous Carbons Synthesized By Hydrothermal Carbonization and their Application for the Enzymatic Oxidation of Glucose ", *ChemSusChem*, 6, 4, 701-710, (2013) - 10.1002/cssc.201200692
  
- ✓ Edembe, L., Gounel, S., Cadet, M., Durand, F. and Mano, N. "A highly efficient O<sub>2</sub> cathode based on bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus* operating in serum", *Electrochem. Commun.*, 23, 80-82, (2012) - 10.1016/j.elecom.2012.07.013



## LISTE DES CONFÉRENCES

✓ 2014

**Communication orale:** "A novel bi-enzymatic cathode made with BODs from *Bacillus pumilus* and *Magnaporthe oryzae*"

Lise Edembe, Sébastien Gounel, Nicolas Mano

65<sup>th</sup> annual meeting of the International Society of Electrochemistry

Lausanne, Suisse du 31 août au 5 septembre 2014

**Communication orale:** "Bilirubine oxidases in enzymatic cathodes "

Lise Edembe, Sébastien Gounel, Nicolas Mano,

International Conference on Bio Energy

Torremolinos (Málaga), Espagne du 1<sup>er</sup> au 3 juin 2014

✓ 2013 :

**Poster :** "A highly efficient O<sub>2</sub> cathode based on bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus* operating in serum"

Lise Edembe, Sébastien Gounel, Marine Cadet, Fabien Durand, Nicolas Mano,

Elecnano "The Nanoscale and Electroanalysis: surface nanostructuration, nanobiological systems, coupled techniques, microsystems"

Bordeaux, France du 15 au 17 mai 2013

✓ 2012 :

**Communication orale et poster** "A highly efficient O<sub>2</sub> cathode based on bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus* operating in serum"

Lise Edembe, Sébastien Gounel, Marine Cadet, Fabien Durand, Nicolas Mano

13<sup>ème</sup> Colloque du GFB et 8<sup>ème</sup> Workshop Franco-Chinois "Surface Electrochemistry of Molecules of Biological Interest & Biosensor Applications"

Lacanau-Océan, France du 24 au 28 septembre 2012.