



HAL
open science

Conception des bioélectrodes enzymatiques à base de nanomatériaux dans des piles à combustible et des capteurs

Mariem Bourourou

► **To cite this version:**

Mariem Bourourou. Conception des bioélectrodes enzymatiques à base de nanomatériaux dans des piles à combustible et des capteurs. Matériaux. Université Grenoble Alpes; Faculté des Sciences de Monastir (Tunisie), 2015. Français. NNT: 2015GREAI043 . tel-01227302

HAL Id: tel-01227302

<https://theses.hal.science/tel-01227302>

Submitted on 10 Nov 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.



UNIVERSITÉ
GRENOBLE
ALPES

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

**préparée dans le cadre d'une cotutelle entre
l'Université Grenoble Alpes et l'Université de
Monastir**

Spécialité : **Matériaux, Mécanique, Génie Civil, Electrochimie**

Arrêté ministériel : le 6 janvier 2005 - 7 août 2006

Présentée par

Mariam BOUROUROU

Thèse dirigée par « **Serge COSNIER** » et « **Abderrazak Maaref** »
codirigée par « **Michael HOLZINGER** »

préparée au sein du Département de Chimie Moléculaire (Equipe Biosystèmes électrochimiques et analytiques) et au Laboratoire des Interfaces et des Matériaux Avancés (Equipe Electrochimie et capteurs)

dans **les Écoles Doctorales I-MEP2 et MDM**

Conception de bioélectrodes enzymatiques à base de nanomatériaux dans des piles à combustible et des capteurs

Thèse soutenue publiquement le « **3 Novembre 2015** »,
devant le jury composé de :

Madame Nicole JAFFREZIC-RENAULT

Directeur de recherche CNRS, UCBL, Lyon, Rapporteur

Monsieur Noureddine RAOUAFI

Maitre de conférences à la faculté des Sciences de Tunis, Rapporteur

Monsieur Khaled BOUJLEL

Professeur à la faculté des Sciences de Tunis, Président

Monsieur Serge COSNIER

Directeur de recherche CNRS, Grenoble, Directeur de thèse

Monsieur Abderrazak MAAREF

Professeur à la faculté des Sciences de Monastir, Directeur de thèse

Monsieur Michael HOLZINGER

Chargé de recherche CNRS, Grenoble, Encadrant



Je Dédie ce Travail

A mes Parents

A mes frères et sœurs

A mon cher "Fichem"

A tous ceux qui me sont chers

« Believe and act as if it were impossible to fail ».

Charles Ketterring

REMERCIEMENTS

*Ce travail de thèse en cotutelle est une collaboration entre le Département de Chimie Moléculaire (DCM, Equipe BEA) de l'Université Joseph Fourier de Grenoble, sous la direction de **M. Serge COSNIER**, Directeur de recherche CNRS et le Laboratoire des Interfaces et des Matériaux Avancés (LIMA, Equipe Electrochimie et Capteurs) de la Faculté des Sciences Monastir, sous la direction de **M. Abderrazak MAAREF**.*

Je tiens à leur adresser mes vifs remerciements pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes. J'ai pu apprécier pendant mon travail leurs grandes qualités scientifiques et humaines, je leur exprime toute ma gratitude pour leurs conseils, leurs encouragements et la confiance qu'ils m'ont donnée durant ces trois années de thèse en m'accordant une grande liberté d'action

*Je tiens tout particulièrement à remercier **M. Michael Holzinger** pour l'aide qu'il m'a apportée avec dévouement et disponibilité, pour son soutien moral, pour ses conseils judicieux et ses remarques pertinentes.*

J'adresse ma reconnaissance à tous les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à évaluer mon travail et toutes les remarques intéressantes qu'ils ont pu faire lors de la soutenance.

*Je tiens à remercier **M. Khaled Boujel**, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis pour l'honneur qu'il me fait de présider le Jury de ma thèse.*

*Je tiens par ailleurs à remercier **Mme. Nicole Jaffrezic Renault**, Directrice de recherche CNRS à l'Université Claude Bernard Lyon I et **M. Noureddine Raouafi**, Maître de conférences à la Faculté des Sciences de Tunis pour avoir examiné et jugé ce travail.*

*J'adresse également mes remerciements aux collaborateurs qui ont contribué à ces travaux; c'est avec un réel plaisir que j'ai travaillé sur la technique d'électrospinning avec **M. Frédéric Bossard**, Professeur à l'Université Joseph Fourier.*

*Je présente mes remerciements aussi à **M. Didier Chaussy**, Professeur à Grenoble INP-Pagora, de m'avoir accueillie au sein de son équipe et offert l'opportunité de faire des mesures de conductivité et des mesures DMA.*

*Je remercie également **Mme. Cécile Rossignol**, Maître de Conférences à l'Université Joseph Fourier de m'avoir accueillie au sein de son équipe et offert l'opportunité de travailler avec le four à pyrolyse.*

Merci également à Mme. Karine Gorgy, Maitre de conférences à l'Université Joseph Fourier, pour son aide permanente pour la correction de mon manuscrit et pour sa gentillesse.

Pour sa rigueur scientifique, pour avoir répondu à mes nombreuses questions avec patience et dévouement, je tiens aussi à remercier Mme. Chantal Gondran, Maitre de conférences à l'Université Joseph Fourier.

Je remercie également M. Alain Le Goff, Chargé de Recherche CNRS de m'avoir répondu à mes nombreuses questions.

Pour avoir assuré le bon déroulement des expériences, je remercie Mme. Arielle Lepellec, Technicienne au Département de Chimie Moléculaire.

Je tiens également à remercier chacun des membres des équipes dans lesquelles j'ai travaillé et plus particulièrement Kamal, Fabien, Luminita, Raoudha, Fatima, Noémie, Caroline, Solène, Quentin, Meenakshi, Bertrand, Charles, Gareth, Saravanan, Deonildo, Imen, Frédéric, Philippe, Yannick et Andro.

Je n'oublierai pas de remercier aussi mes amis de la Faculté des Sciences de Monastir qui ont accompagné mon parcours universitaire : Houcine, Amani, Ilhem, Sana, Ferdaws, Chadia, Moncef...

Je remercie aussi mes amis de Grenoble qui m'ont beaucoup soutenu pendant ces 3 années: Hana, Camille, Elodie, Stéphanie, Imen, Ahlem, Hassan, Guillaume..

Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude à ma famille et spécialement à mes parents pour leur soutien moral, leur présence et la confiance dont ils ont fait preuve. Sans eux, je n'aurais pas été ce que je suis aujourd'hui. Que ce travail leur soit dédié avec toute mon affection.

Je remercie également mes frères: Yosri et Mohamed Ali, mes sœurs: Ilhem et Yosra, Mes beaux frères: Karim et Adel, et mes nièces: Dounia, Yasmine, Chaima et le plus beau prince Khaled.

Je remercie surtout Hichem (pas encore de la famille mais bientôt...!).

Mes remerciements s'adressent également au programme Mira (bourse de mobilité internationale de la région Rhône Alpes), à l'Université de Monastir, au Département de Chimie Moléculaire ainsi qu'au programme CMCU N° 14G1206 (comité mixte franco-tunisienne pour la coopération franco-tunisienne) pour leurs soutiens financiers.

Pour finir, je souhaite bon courage à tous les doctorants du DCM et du LIMA pour la fin de leur thèse, et je remercie de manière générale tous ces membres.

Merci

Sommaire

Introduction générale	1
I. Etude bibliographique	6
I.1 Les matériaux carbonés et nanostructurés	7
I.1.1 Les nanotubes de carbones (NTCs)	7
I.1.1.1 Les différentes structures des nanotubes de carbone	8
I.1.1.2 Propriétés des nanotubes de carbone	8
I.1.1.3 Utilisations des nanotubes de carbone dans l'électrochimie	11
I.1.2 Graphène et dérivés de graphites	12
I.1.2.1 Le Graphite	12
I.1.2.2 Le Graphène	13
I.2 Mise en forme de nouveaux matériaux d'électrodes pour la bioélectrochimie	14
I.2.1 Dispersion des nanotubes de carbone	15
I.2.2 Principales configurations d'électrodes	17
I.2.2.1 Déposition de NTCs par « drop casting »	17
I.2.2.2 Les buckypapers	17
I.2.2.3 Les nanofibres obtenues par filage	20
I.3 Utilisation des nanostructures carbonées dans la bio-électrochimie	25
I.3.1 Etat de l'art des biocapteurs enzymatiques	25
I.3.1.1 Définition d'un biocapteur	25
I.3.1.2 Les biorécepteurs	26
I.3.1.3 Biocapteurs à catéchol : principe de fonctionnement	28
I.3.2 Etat de l'art des biopiles enzymatiques	30
I.3.2.1 Les biopiles à glucose/O ₂	30
I.3.2.2 Quelques exemples des biopiles à glucose/O ₂	31
I.3.2.3 Biocathodes enzymatiques	33
I.3.2.4 Etat de l'art de l'immobilisation de la laccase à l'aide de nanotubes de carbone	40
I.4 Conclusion	42
II. Conception de nouvelles bioélectrodes nanostructurées à base de Laccase par transfert d'électrons direct	54
II.1 Introduction	55
II.2 Cathode MWCNTs / Laccase en transfert direct	56
II.3 Cathode MWCNTs / Pyr-AQ(1)/laccase et MWCNTs/Pyr-AQ(2)/laccase en transfert direct	58
II.3.1 Fonctionnalisation non covalente des nanotubes de carbone à l'aide de pyrène	58
II.3.2 Caractérisation électrochimique	59
II.3.2.1 Caractérisation des monomères Pyr-AQ(1) et Pyr-AQ(2)	59
II.3.2.2 Immobilisation des monomères Pyr-AQ(1) et Pyr-AQ(2) sur matrice de MWCNTs	61
II.3.3 Immobilisation de la laccase sur la surface fonctionnalisée	63

II.4 Stabilité en fonctionnement de biocathodes	66
II.5 Conclusion	66
III. Macroélectrodes nanostructurées de NTCs à base de laccase par transfert d'électrons médiaté	70
III.1 Introduction	71
III.2 Conception des nouvelles nanostructures à base de NTCs: Les buckypapers (BPs)	73
III.2.1 Mise en forme des BPs	73
III.2.2 Caractérisations structurales des BPs	74
III.2.3 Incorporation du médiateur rédox: Bis-pyrène-ABTS	77
III.3 Biocathodes nanostructurées à base de laccase par DET et MET	79
III.4 Conclusion	82
IV. Les nanofibres électrofilées: Applications aux biocapteurs et aux biocathodes enzymatique pour la bioconversion d'énergie.	86
IV.1 Introduction aux nanofibres électrofilées	89
IV.1.1 Description du procédé	89
IV.1.1.1 Cabine de filage	89
IV.1.1.2 Formation du cône de Taylor	90
IV.1.1.3 Trajet du jet de polymère	90
IV.1.2 Paramètres de filage	91
IV.1.2.1 Paramètres associés à la solution polymérique	91
IV.1.2.2 Paramètres liés au procédé d'électrospinning	93
IV.1.2.3 Paramètres ambiants	95
IV.2 Matériaux et appareillage utilisés en électrofilage	96
IV.2.1 Appareillage	96
IV.2.2 Matériaux utilisés	96
IV.2.2.1 Polyacrylonitrile (PAN)	97
IV.2.2.2 N,N-diméthylformamide (DMF)	97
IV.3 Préparation des fibres conductrices de NTCs pour des applications en biocathode enzymatique	98
IV.3.1 Mise en forme des structures électrofilées en nanotubes de carbone	98
IV.3.1.1 Electrofilage du Polyacrylonitrile	98
IV.3.1.2 Préparation des dispersions de NTCs dans des solutions de PAN	100
IV.3.1.3 Filage des solutions PAN/NTCs	100
IV.3.1.4 Traitements thermiques des fibres	101
IV.3.1.5 Caractérisations des fibres de carbone	102
IV.3.2 Nanofibres de carbone pour biopiles enzymatiques	105
IV.3.2.1 Préparation des biocathodes	105
IV.3.2.2 Effet du nombre de cycle lors de la polymérisation sur les performances de la biocathode	107
IV.3.2.3 Etude électrocatalytique des biocathodes	108
IV.3.3 Conclusion	109
IV.4 Développement d'un biocapteur à catéchol à base de fibres électrofilées de PAN/NTCs	110
IV.4.1 Réduction chimique des fibres de PAN/NTCs	110
IV.4.2 Caractérisations des fibres	111

IV.4.3 Application au développement de biocapteur à catéchol	115
IV.4.31.Préparation des bioélectrodes	115
IV.3.1.2 Résultats expérimentaux sur les performances du biocapteur à catéchol	116
IV.4.4 Conclusion	117
IV.5 Incorporation d'oxyde de graphène dans les nanofibres	118
IV.5.1 Introduction	118
IV.5.2 Synthèse de l'oxyde de graphène (GO)	118
IV.5.2.1 Oxydation chimique du graphite	119
IV.5.2.2 Exfoliation d'oxyde de graphite dans le DMF	120
IV.5.3 Caractérisations des feuillets d'oxyde de graphène (GO)	121
IV.5.4 Préparation des fibres de PAN/ GO	123
IV.5.5 Caractérisations des fibres PAN/ GO	123
IV.5.6 Production des fibres de PAN/rGO par la réduction chimique des fibres de PAN/GO	125
IV.5.7 Caractérisations des fibres PAN/rGO	126
IV.5.8 Conclusion et perspectives	128
Conclusion générale	133
V. Experimental Part	138
V.1 Solvents, reagents and apparatus	139
V.1.1 Solvents	139
V.1.2 Reagents	139
V.1.3 Enzymes	139
V1.4 Apparatus	140
V.2 Synthesis	141
V.2.1 Synthesis of 1-(2-Anthraquinonylaminomethyl)pyrene [pyr-(AQ)]	141
V.2.2 Synthesis of 1-[Bis(2-anthraquinonyl)aminomethyl]pyrene [pyr-(AQ) ₂]	141
V.2.3 Synthesis of Bis-pyrene2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	142
Liste des abréviations	144
Liste des publications et des présentations	148

Introduction Générale

L'intérêt pour les matériaux carbonés est de plus en plus fort car ils sont connus pour être des matériaux de choix en électrochimie; les principales propriétés recherchées dans ces matériaux étant la conduction électrique, la stabilité chimique et la biocompatibilité. De nombreux matériaux d'électrodes en carbone sont utilisés depuis les années 1960 pour réaliser des capteurs, de batteries et divers dispositifs électrochimiques. L'évolution dans ce domaine vient à la fois du développement récent d'une famille de nanomatériaux ainsi que des progrès importants réalisés dans la chimie des polymères. L'incorporation des nano-objets dans des structures polymères permet de modifier profondément leurs propriétés électriques, mécaniques et thermiques; élargissant ainsi leurs champs d'applications. Des nano-objets comme les nanotubes de carbone et l'oxyde de graphène ont été largement utilisés comme renforts pour la fabrication de nanomatériaux à haute performance.

Observés et révélés au monde en 1991, les nanotubes de carbone (NTCs) font partie des nano-objets les plus étudiés grâce à leurs caractéristiques très prometteuses; en effet, en plus des caractéristiques d'une surface carbonée, ceux-ci constituent un outil polyvalent pour le développement de bioassemblages conducteurs en trois dimensions dédiés à améliorer la performance des bioélectrodes en termes de surface électroactive, de porosité et de transfert électronique. Compte tenu de l'affinité naturelle des nanotubes de carbone pour les enzymes, ces nanomatériaux sont particulièrement intéressants notamment pour des applications analytiques (biocapteurs enzymatiques) et pour la réalisation de biopiles enzymatiques.

L'oxyde de graphite est couramment utilisé comme un matériau de départ pour la production des feuillets de graphène ou d'oxyde de graphène (GO). Ce dernier est électriquement isolant, en raison de la présence de groupes oxygénés sur les deux faces du feuillet de graphène formés au cours de procédé d'oxydation de graphite. Pour cela, la réduction chimique d'oxyde de graphène en des feuillets de graphène présente la méthode la plus efficace pour la production des feuillets de graphène sans défauts structuraux avec une large surface spécifique et une forte conductivité électrique; permettant son utilisation pour renforcer les matrices polymères.

Cependant, les propriétés énoncées sur les NTCs et le graphène sont données à l'échelle individuelle. Récemment, un certain nombre de travaux ont montré l'intérêt d'organiser les NTCs en matrices nanostructurées ou de former des composites polymères à base de feuillets de graphène, d'oxyde de graphène, de nanotubes de carbone et de nanotubes de carbone modifiés. Tous ces matériaux nanostructurés induisent d'excellentes propriétés de transfert

d'électron et d'immobilisation de protéine. Notamment, l'association de ces nanomatériaux sous forme de buckypapers, de fibres ou de forêts de NTCs est très prometteuse pour des applications électrochimiques.

Le travail présenté dans ce manuscrit est une contribution à la recherche sur la mise au point de bioélectrodes nanostructurées utilisées pour le développement d'un capteur ampérométriques à base de Polyphénol oxydase pour la détection du catéchol et des biocathodes enzymatiques, à base de laccase pour les biopiles. La laccase est employée en raison de ses excellents paramètres catalytiques et de son haut potentiel thermodynamique. Elle est immobilisée à la surface de l'électrode nanostructurée et fonctionnalisée, avec deux objectifs principaux: i) optimiser le transfert des électrons direct et/ou médiaté entre l'électrode et l'enzyme, notamment en orientant favorablement le site actif de l'enzyme face à l'électrode en utilisant des molécules comportant des groupements pyrènes capable de former une interaction forte de type « π -stacking» avec les nanotubes de carbone. ii) comparer de façon systématique les performances obtenues pour chaque type de support, par immobilisation de l'enzyme soit par adsorption physique, soit par greffage covalent.

Le premier chapitre contient les données bibliographiques concernant les nanotubes de carbone, les dérivés de graphène et les matériaux carbonés. Il indique également les travaux ayant été réalisés sur des électrodes en nanotubes de carbone utilisées en tant que biocapteur ou biocathode enzymatique.

Le deuxième chapitre est consacré au développement, par drop casting, d'une biocathode enzymatique sans médiateurs à base de nanotubes de carbone et de laccase afin d'opérer un transfert d'électron direct entre l'enzyme et l'électrode. Les méthodes de caractérisation de la surface et d'étude des performances de l'électrode sont présentées.

Le troisième chapitre présente la conception d'une nouvelle génération de bioélectrodes nanostructurées d'épaisseur de l'ordre de 100 μm (buckypapers) permettant la connexion électrique de la laccase avec les nanotubes de carbone en utilisant un médiateur rédox.

Enfin, le quatrième et dernier chapitre se scinde en trois sous parties. La première explique le procédé de fabrication des fibres à base de nanotubes de carbone et de polyacrylonitrile par technique de filage électrostatique. Ces fibres ont permis de concevoir une biocathode enzymatique. La deuxième partie est consacrée à l'utilisation des fibres électrofilées pour mettre en place un biocapteur du catéchol évalué par mesures

ampérométriques. Une attention particulière a été portée sur la caractérisation physico-chimique des fibres PAN/NTCs. Cette partie s'achève avec la mise en forme et la caractérisation des fibres électrofilées à base d'oxyde de graphène et de polyacrylonitrile.

Chapitre 1

I. Etude bibliographique

II. Etude bibliographique	6
I.1 Les matériaux carbonés et nanostructurés	7
I.1.1 Les nanotubes de carbones (NTCs)	7
I.1.1.1 Les différentes structures des nanotubes de carbone	7
I.1.1.2 Propriétés des nanotubes de carbone	8
I.1.1.3 Utilisations des nanotubes de carbone dans l'électrochimie	11
I.1.2 Graphène et dérivés de graphites	12
I.1.2.1 Le Graphite	12
I.1.2.2 Le Graphène	13
I.2 Mise en forme de nouveaux matériaux d'électrodes pour la bio-électrochimie	14
I.2.1 Dispersion des nanotubes de carbone	15
I.2.2 Principales configurations d'électrodes	17
I.2.2.1 Déposition de NTCs par « drop casting »	17
I.2.2.2 Les buckypapers	17
I.2.2.3 Les nanofibres obtenues par filage	20
I.3 Utilisation des nanostructures carbonées dans la bio-électrochimie	25
I.3.1 Etat de l'art des biocapteurs enzymatiques	25
I.3.1.1 Définition d'un biocapteur	25
I.3.1.2 Les biorécepteurs	26
I.3.1.2.a Les enzymes	26
I.3.1.2.b La cinétique enzymatique	27
I.3.1.2.c La polyphénol oxydase (PPO)	27
I.3.1.3 Biocapteurs à catéchol : principe de fonctionnement	28
I.3.2 Etat de l'art des biopiles enzymatiques	30
I.3.2.1 Les biopiles à glucose/O ₂	30
I.3.2.2 Quelques exemples des biopiles à glucose/O ₂	31
I.3.2.3 Biocathodes enzymatiques	33
I.3.2.3.a La laccase	33
I.3.2.3.b Réduction du dioxygène	35
I.3.2.3.c Connexion électrique des enzymes sur électrode	36
(DET/MET)	
I.3.2.4 Etat de l'art de l'immobilisation de la laccase à l'aide de nanotubes de carbone	40
I.4 Conclusion	42

I.1 Les matériaux carbonés et nanostructurés

I.1.1 Les nanotubes de carbonés (NTCs)

Le carbone est l'un des éléments les plus abondants dans la nature et qui peut exister sous plusieurs formes allotropiques comme le graphite, le diamant, les fullerènes et les nanotubes de carbone. En 1991, Iijima était la première personne à identifier les nanotubes de carbone en observant des structures tubulaires par microscopie électronique dans des fibres de carbone [1]. Depuis, un intérêt considérable a été entrepris pour améliorer notre connaissance des NTCs au niveau de la recherche fondamentale ainsi qu'au niveau d'applications potentielle.

I.1.1.1 Les différentes structures des nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone se présentent comme des tubes creux concentriques séparés de 0,344 nanomètre (nm), ce qui rapproche leur structure de celle du graphite avec un diamètre interne de l'ordre du nanomètre tandis que leur longueur peut varier de la centaine de nanomètres à la dizaine de micromètre. On peut distinguer deux types de NTCs comme montré sur la **figure I.1**, des nanotubes à paroi unique ou monofeuillets (Single Walled Carbon Nanotubes, SWCNTs) et à parois multiples ou multifeuillets (Multi Wall Carbon Nanotubes, MWCNTs).

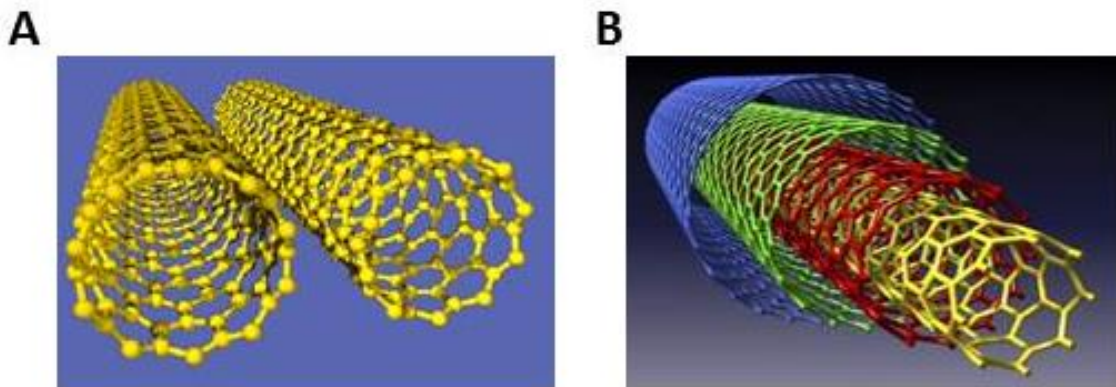


Figure I.1. Représentation schématique de la structure de A) SWCNTs et B) MWCNTs

Les SWCNTs ont généralement une structure qui peut être représentée comme un seul feuillet de graphène enroulé sur lui-même et fermé à ses deux extrémités par une demi-sphère **figure I.1.A**. A l'issue de la synthèse, les SWCNTs sont rarement isolés. Ils se présentent plutôt sous la forme de faisceaux (ou fagots) de nanotubes monoparois comme l'indique la **figure I.2.A** représentant un cliché obtenu par microscopie électronique à balayage d'un dépôt de SWCNTs. Cette technique permet d'obtenir des informations structurales sur

l'échantillon (densité et taille des fagots présents) mais aussi des indications concernant la pureté de celui-ci.

Les MWCNTs, quant à eux, sont constitués de plusieurs feuillets de graphène emboîtés les uns dans les autres à la manière des poupées russes ou bien d'un seul feuillet de graphène enroulé plusieurs fois sur lui-même **figure I.1.B**. Par observation par microscopie électronique à balayage, nous constatons que les MWCNTs forment beaucoup moins d'agrégats que les SWCNTs. Le diamètre du plus petit tube interne est de l'ordre de deux nanomètres, tandis que le diamètre externe peut atteindre une centaine de nanomètre mais est le plus souvent de l'ordre d'une vingtaine de nanomètres [2]. Celui-ci étant bien plus grand que le diamètre des SWCNTs compris entre 0,7 et 2 nm [1] **figure I.2.B**.

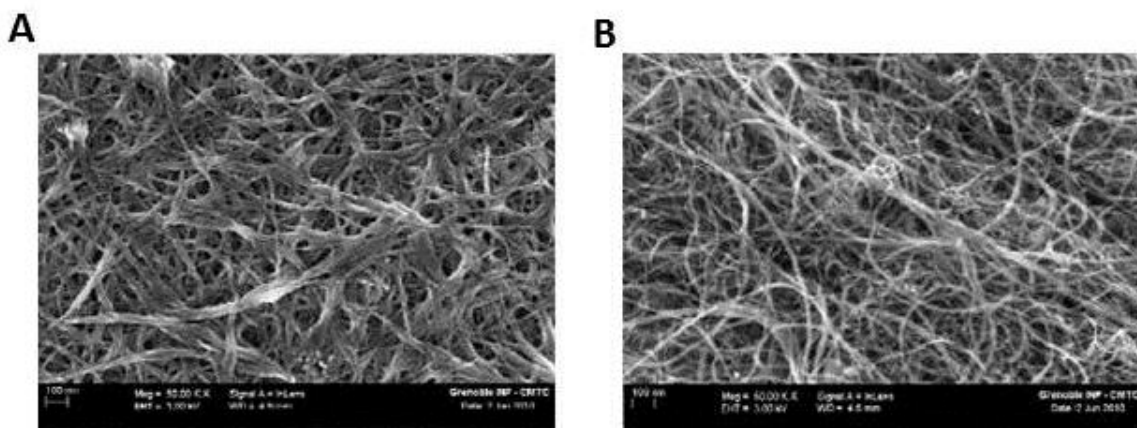


Figure I.2. Clichés obtenus en microscopie électronique à balayage de A) un dépôt de SWCNTs et B) un dépôt de MWCNTs.

I.1.1.2 Propriétés des nanotubes de carbone

Si les nanotubes de carbone ont suscité un énorme intérêt dans le monde de la recherche, c'est avant tout grâce à leurs propriétés exceptionnelles; en effet, ce matériau présente des propriétés mécaniques, électriques, thermiques et chimiques hors du commun qui permettent d'envisager plusieurs applications telles que des dispositifs électroniques [3], des dispositifs à émission à effet de champ [4], le renforcement de matériaux composites [5], les capteurs [6], les biopiles [7]... On notera en particulier les propriétés suivantes :

- **Propriétés de conduction électrique**

Les nanotubes de carbone présentent des propriétés de conduction électrique particulières. Selon leur chiralité et leur diamètre, ils se comportent soit comme des conducteurs métalliques soit comme des semi-conducteurs [8]. Dans le cas des nanotubes multiparois, dont les diamètres sont beaucoup plus grands que les SWCNTs, la largeur de la bande interdite est liée au diamètre. En effet, plus le diamètre des nanotubes est grand, plus la

largeur de la bande interdite est petite ce qui permet aux électrons de se déplacer facilement d'une bande à l'autre et inversement [9].

Théoriquement, les nanotubes de carbone peuvent supporter des densités de courants de l'ordre de 10^{13} A.cm⁻². Sur le plan expérimental, les MWCNTs peuvent conduire à une très forte densité de courant allant de 10^7 à 10^9 A.cm⁻² [10] et ont une résistivité de l'ordre de 10^{-4} Ω.cm, en comparaison de celle des SWCNTs qui ont un comportement métallique avec une résistivité de l'ordre de 10^{-6} Ω.m à 300 K [11]. Grâce à ces propriétés, les nanotubes sont intensivement étudiés et très prometteurs dans le domaine de l'électronique.

- **Effet des nanotubes de carbone sur la conductivité des nanocomposites**

Le potentiel des nanotubes de carbone en tant que matériau conducteur a été mis à profit dans un grand nombre de matrices polymères. Et pour tirer avantage de cette propriété, il faut privilégier les NTCs ayant un fort rapport d'aspect et une faible tortuosité. Il faut également que la dispersion soit de bonne qualité pour éviter la formation d'agrégats au sein de la matrice polymère. Le plus souvent, cela passe par l'utilisation d'un agent dispersant (tensioactif, polymère) qui a alors tendance à créer des barrières isolantes entre les nanotubes. L'orientation des NTCs présente également un paramètre essentiel pour maintenir une bonne conductivité au sein des matériaux composites. Du et *al.* ont montré que pour des composites PMMA/SWCNTs, il est possible que l'orientation des nanotubes de carbone puisse entraîner le décroissement rapide de la conductivité [12]. Ainsi, une distribution isotrope des NTCs est nécessaire afin d'obtenir une conductivité optimum. Une autre propriété qui peut influencer la conductivité du composite c'est la modification chimique des NTCs qui peut interrompre la conjugaison- π le long des nanotubes et réduire la conductivité électrique des tubes individualisés. Malgré cet effet négatif, les chercheurs n'ont pas cessé à rapporter une amélioration de la conductivité pour les nanotubes fonctionnalisés. Il est possible de greffer des entités chimiques à la surface des nanotubes en formant des liaisons covalentes en utilisant des espèces très réactives comme des radicaux [13], des carbènes [14], des alkyls de lithium [15], et des sels de diazonium [16, 17]. Cependant, ce type de fonctionnalisation peut modifier les propriétés électroniques des nanotubes, citons le cas du carbène, par transfert de charge de la molécule vers le nanotube. Valentini et *al.* ont reporté aussi que les SWCNTs fonctionnalisés par des fonctions amines favorisent la migration des charges intrinsèques dans des matrices époxy, ce qui contribue à la conductivité totale [18].

Tamburri et *al.* ont présenté une fonctionnalisation des SWCNTs par des groupements –COOH et –OH ce qui permet d'augmenter la conductivité dans les polymères, d'un facteur 140 et 90 respectivement, tandis que l'introduction de nanotubes de carbone non

fonctionnalisés, n'augmente la conductivité que d'un facteur 20 par rapport au polymère seul [19].

Il s'avère que les effets négatifs de la fonctionnalisation soient contre balancés par les améliorations de dispersions qu'apporte cette fonctionnalisation. Il y a donc là une réelle difficulté à franchir pour atteindre de bonnes propriétés électriques des nanocomposites. Un des objectifs de ce travail consiste à trouver un compromis afin d'entretenir la propriété de conduction électrique des NTCs.

- **Propriétés mécaniques**

Les nanotubes de carbone ont des propriétés mécaniques exceptionnelles [20] étant donné la liaison C=C qui est considérée comme l'une des liaisons les plus fortes dans les matériaux solides [21]. Or, l'enroulement des NTCs leur permet, d'être entièrement sp^2 et donc de profiter au maximum de cette rigidité. Le comportement des NTCs en flexion a aussi été étudié par Iijima et *al.* [1] qui ont conclu que les NTCs pouvaient se déformer, se courber ou bien se tordre selon des angles très importants allant jusqu' à 110° **figure I.3** sans subir de dommage dans leur arrangement graphitique [22, 23].

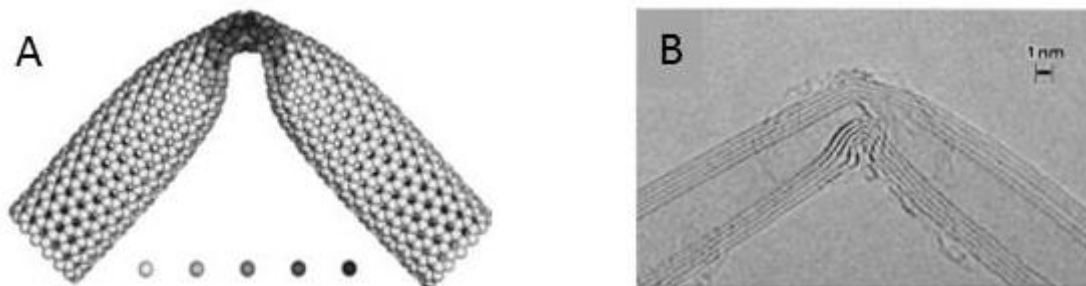


Figure I.3. A) Simulation de la structure atomique d'un coude obtenu par pliure d'un SWCNTs et B) micrographie en champ clair du coude formé sur un MWCNTs sous contraintes mécaniques [24].

La forte rigidité des nanotubes de carbone combiné à leur grande flexibilité et à leur faible densité (six fois plus léger que l'acier tout en étant environ cent fois plus résistants que celui-ci) en font des charges particulièrement attractives pour le renfort mécanique des matériaux.

- **Propriétés thermiques**

La conductivité thermique d'un matériau est une grandeur physique qui caractérise l'aptitude d'un corps à conduire la chaleur. Les nanotubes de carbone possèdent une conductivité thermique supérieure à celle du diamant et les rend donc extrêmement résistants

à la chaleur. Expérimentalement, Kim et *al.* ont mesuré sur des MWCNTs à température ambiante une conductivité de plus de $3000 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ [25]. Cette propriété permettrait d'améliorer les propriétés de conduction thermique de certains matériaux en incorporant des nanotubes dans ces matériaux [26].

I.1.1.3 Utilisations des nanotubes de carbone dans l'électrochimie

Nous venons de le voir, en raison de leurs excellentes propriétés mécaniques, électriques, thermiques, les nanotubes de carbone pourraient être des candidats attractifs pour des applications de renfort mécanique et de conductivité électrique. Outre ces avantages, le succès des NTCs réside aussi dans leur remarquable surface spécifique, qui est estimée théoriquement à $1000 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ [27], ce qui leur confère une bonne capacité d'adsorption. Cette propriété les rend particulièrement prometteurs pour l'élaboration de biocapteurs et des biopiles.

Les électrodes à base de nanotubes de carbone sont apparues très rapidement comme un matériau d'exception pour l'élaboration de biocapteurs. Britto et *al.* ont été les premiers à avoir utilisé les NTCs sous forme d'une pâte pour étudier l'oxydation de la dopamine [28]. Depuis, plusieurs techniques ont été mises en place pour élaborer de biocapteurs telles que le greffage covalent, l'adsorption physique, ou encore l'utilisation de systèmes affins en ancrant un des partenaires affins sur les nanotubes de carbone afin de créer des attaches permettant l'ancrage de protéines. En 2003, Besteman et *al.* ont réussi à immobiliser la glucose oxydase (GOx) sur des nanotubes monoparois et à réaliser un biocapteur à effet de champ et ceci via des interactions non-covalentes de type π - π entre les nanotubes de carbone et la molécule de pyrène-(N-succinimidyl-1-pyrènebutanoate). Le groupement succinimide a ensuite permis le greffage covalent de la GOx à la surface des NTCs par réaction chimique avec les fonctions amine périphériques de la protéine [29]. En 2005, Joseph Wang et Mustapha Musameh ont décrit une procédure de préparation d'un biocapteur ampérométrique basé sur la co-immobilisation de nanotubes de carbone et de GOx dans un film électropolymérisé de polypyrrole [30]. Parmi les travaux antérieurs de notre laboratoire, une stratégie originale de fonctionnalisation des nanotubes de carbone dans un milieu aqueux en présence d'un tensioactif électropolymérisable, le (11-pyrrolyl-1-ylundecyl)triethylammonium tetrafluoroborate a été développée [31]. Ceci permet par addition de biomolécules, comme la GOx et la tyrosinase, et par simple électropolymérisation, une élaboration simple et rapide de biocapteurs. Une autre génération de biocapteurs faisant intervenir les systèmes d'affinité a été aussi développée en 2009 par Holzinger et *al.* en utilisant des monomères pyrroliques fonctionnalisés par un des partenaires des systèmes d'affinité avidine/biotine [32] et adamantane/ β -cyclodextrine [33]. En particulier, dans le cas du système adamantane/ β -

cyclodextrine, ce film permet l'immobilisation d'enzymes par l'intermédiaire de nanoparticules modifiées par la β -cyclodextrine en utilisant les interactions hôte-invité "host-guest". Ces derniers ont permis également d'obtenir des biocapteurs très performants. Comme pour les biocapteurs, les nanotubes de carbone ont été utilisés aussi pour la production d'énergie à partir de glucose ou de dihydrogène. En 2010, Mano et *al.* ont développé de nouvelles microélectrodes à base de fibres de nanotubes de carbone de grande porosité présentant une large surface spécifique (supérieur à $300 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) [7]. En utilisant ces fibres à l'anode et à la cathode, les chercheurs viennent de mettre en place une biopile glucose/ O_2 puissante générant un courant électrique d'une puissance inégalée de $740 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$. Zebda et *al.* ont décrit la fabrication des électrodes, pour les biopiles à glucose, moyennant la compression d'un mélange d'enzyme et de nanotubes de carbone. Ce mélange favorise le transfert direct d'électrons entre l'enzyme et les nanotubes de carbone. Les biopiles déjà développées délivrent une puissance de $1 \text{ mW}.\text{cm}^{-2}$ avec une durée de vie maximale d'un mois [34, 35].

I.1.2 Graphène et dérivés de graphites

I.1.2.1 Le Graphite

En 1924, John Desmond Bernal a identifié avec succès la structure cristalline du graphite [36]. A pression et température ambiante, le graphite est la forme la plus stable du carbone pur. C'est donc la forme la plus courante que l'on retrouve en général sous forme de charbon. Le graphite possède une structure lamellaire dont les plans (appelés graphène) sont espacés de $3,35 \text{ \AA}$ et constitués d'un réseau hexagonal (en nid d'abeille) d'atomes de carbone **figure I.4.B.**

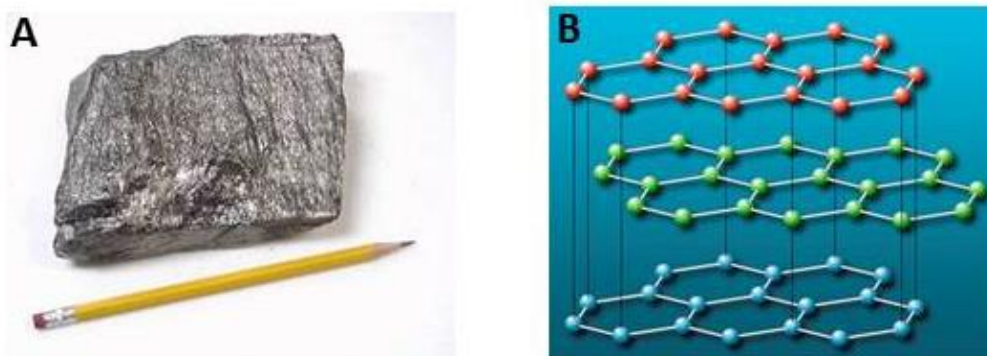


Figure I.4. A) Graphite naturel brut et mine de crayon et B) structure lamellaire du graphite

I.1.2.2 Le Graphène

Isolé pour la première fois en 2004 par Andre Geim et son collaborateur Konstantin Novoselov à Manchester au Royaume Unis [37, 38], le graphène s'est rapidement imposé comme un matériau très innovant promis à de nombreuses applications, notamment en électronique [39]. Les scientifiques qui l'ont isolé ont reçu le prix Nobel de physique en 2010 [37, 40, 41]. Le graphène se présente comme un matériau 2D parfait puisqu'il n'est constitué que d'une seule couche d'atomes, de maille hexagonale, dont l'épaisseur (celle de l'atome de carbone), est de 70 picomètres, soit un millionième d'un cheveu humain [41]. Les scientifiques le décrivent comme étant le matériau le plus fin, très léger (0,77 milligrammes au mètre carré), et l'un des matériaux les plus résistants connu à ce jour. C'est un excellent conducteur électrique et son point de fusion est supérieur à 3000 degrés Celsius. Le graphène sert de matériau de base pour des matériaux graphitiques de toutes dimensionnalités: fullerènes, nanotubes ou graphite comme le montre la **figure I.5**. L'oxyde de graphène (ou graphene oxide, GO, en anglais,) peut être produit par l'exfoliation directe d'oxyde de graphite, ce dernier est obtenu par oxydation du graphite. En effet, l'oxyde de graphène est électriquement isolant en raison de la présence de groupes oxygénés sur les deux faces du feuillet de graphène formés au cours de procédé d'oxydation de graphite. La réduction chimique de GO en feuillets de graphène se présente comme la méthode la plus efficace pour leur production sans défauts structuraux et avec une forte surface spécifique.

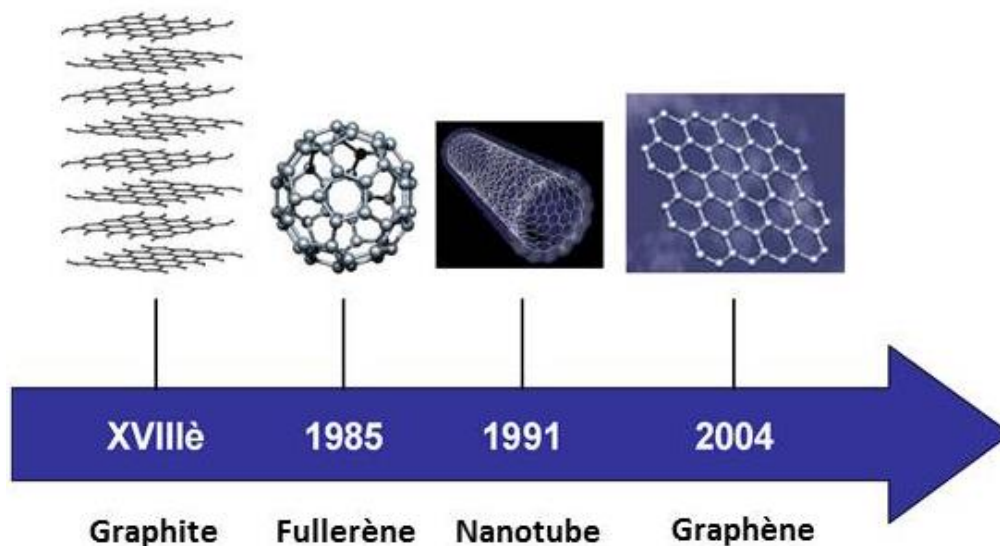


Figure I.5. Le graphène, modèle de base des autres matériaux du carbone enroulé en nanotubes, mis en boule en fullerènes, ou empilé en graphite [40].

La stupéfiante polyvalence du graphène donne lieu à de multiples applications commerciales et au développement d'une nouvelle génération de capteurs utiles pour les technologies propres et les biotechnologies [42, 43]. Il est à la fois très résistant

mécaniquement et souple si bien qu'on peut le modeler facilement, c'est pourquoi il est utilisé dans la fabrication des écrans flexibles enroulables et pliables [44], servant de base à plusieurs dispositifs, ou des batteries à durée de vie plus longue pour les téléphones portables, les ordinateurs et les voitures électriques [45, 46, 47]. Le graphène est conçu également par les entreprises du secteur de l'électronique, notamment pour la fabrication de disques durs capables d'emmagasiner 1000 fois plus d'information et des semi-conducteurs sur lesquels s'appuient les ordinateurs ultrarapides de l'avenir [48]. D'autres dispositifs peuvent être développés comme des ultra-condensateurs pour les automobiles et les trains électriques [49] et des avions qui voleront bien plus vite et émettront moins de gaz nocifs dans l'atmosphère pour des applications aéronautiques [50]:

Nous venons de démontrer que les caractéristiques remarquables des nanotubes de carbone et du graphène les rendent très attractifs pour des applications de renfort mécanique et de conductivité électrique.

I.2 Mise en forme de nouveaux matériaux d'électrodes pour la bio-électrochimie

Nous venons de voir que d'un point de vue théorique, les propriétés exceptionnelles des nanotubes de carbone ont font un candidat idéal pour des applications électrochimiques, notamment le renfort mécanique, la large surface spécifique et la bonne conduction électrique. En effet, les NTCs se présentent généralement sous forme d'une poudre légère désorganisée **figure I.6**, il est donc nécessaire de développer de nouveaux procédés afin de les incorporer de façon optimale dans des matrices à renforcer. Un des facteurs les plus déterminants de cette optimisation c'est l'état de dispersion de nanotubes de carbone.



Figure I.6. Poudre de nanotubes de carbone.

I.2.1 Dispersion des nanotubes de carbone

Afin de pouvoir disperser les NTCs en solution, il faut tout d'abord « casser » les agrégats présents dans la poudre de nanotubes de carbone à l'issue de la synthèse et donc aller à l'encontre des fortes interactions de Van der Waals qui existent entre deux nanotubes. Plusieurs dispositifs tels que l'agitation magnétique, l'utilisation d'un agent dispersant, le reflux, les ultrasons sous forme de bain ou de sonde, mais aussi de façon répandue la fonctionnalisation chimique ont été largement étudiés pour disperser les NTCs. Cette dernière permet non seulement d'améliorer la dispersion des nanotubes en milieux aqueux et/ou dans les solvants organiques mais aussi de les doter de fonctions chimiques qui élargissent leurs domaines d'application [51, 52]. Les types de fonctionnalisation peuvent être classés en deux grands ensembles: la fonctionnalisation covalente et la fonctionnalisation non-covalente [53]. La fonctionnalisation covalente consiste à greffer de manière covalente des entités chimiques sur les parois des nanotubes. Cette méthode permet de réduire largement la quantité et la puissance des ultrasons mais aussi de fixer des groupements chimiques sur les parois des tubes. La solubilité des NTCs dépend du type de fonctions et aussi de la quantité de groupements greffés. Les nanotubes fortement fonctionnalisés sont plus individualisés en solution et possèdent en général une plus grande solubilité [54].

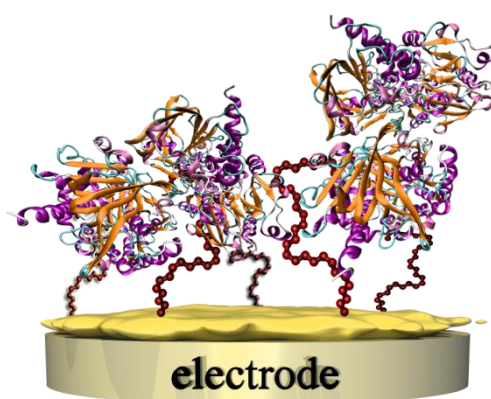


Schéma I.1. Représentation schématique de la fonctionnalisation covalente.

Quant à la fonctionnalisation non covalente, elle implique uniquement une liaison physique entre les nanotubes et le groupement fonctionnel [55]. L'avantage de ce type de fonctionnalisation non covalente est de rendre les nanotubes dispersables dans un solvant aqueux ou organique sans modifier la structure du nanotube. Différents types de molécules ont été étudiés dans la littérature comme par exemple les tensioactifs [56, 57], les polymères [58, 59] ou aussi les molécules amphiphiles [60]. La partie hydrophobe de ces molécules s'adsorbe à la surface des nanotubes tandis que la partie hydrophile s'oriente vers la solution. Parmi les tensioactifs on trouve le Dodécyl Benzène Sulfate de sodium (SDBS), le Dodécyl

Sulfate de sodium (SDS), ou encore le Triton X. Les polymères permettent de disperser les nanotubes principalement dans des solvants organiques en venant s'enrouler le long du nanotube ou s'adsorber à leur surface. Les molécules utilisées pour disperser les nanotubes sont généralement riches en électrons π qui interagissent avec ceux des nanotubes. Les pyrènes ont été déjà utilisés à de nombreuses reprises dans la littérature [61, 62].

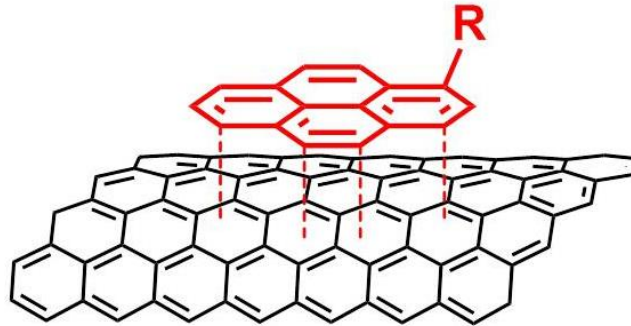


Schéma I.2. Représentation schématique de l'interaction pyrène/nanotubes de carbone par π -stacking.

Une autre méthode qui permet d'augmenter la dispersion des NTCs en solution c'est d'utiliser les ultrasons sous forme de bain ou de sonde. Il faut toutefois noter que les ultrasons utilisés pendant une longue durée ou à forte puissance tend à couper les nanotubes de carbone et à les endommager.



Figure I.7. Dispersion de nanotubes de carbone multi-paroi dans le DMF obtenues après 15 minutes dans le bain à ultrasons : (a) mauvaise dispersion et (b) bonne dispersion.

Les premiers travaux réalisés au laboratoire avant ce travail avaient ouvert une nouvelle voie au domaine. Pour autant beaucoup de phénomènes ont été développés, tels que la synthèse des nanotubes de carbone et le développement de différents voies de fonctionnalisation. Ce travail de thèse veut apporter de nouveautés par rapport à ce qui était fait et ceci en utilisant les nanotubes comme système d'étude. Le mode opératoire développé sera extrapolé à une autre forme de carbone qui est l'oxyde de graphène en vue de fabriquer

de nouvelles configurations d'électrodes macroscopiques qui seront utilisées pour la bioconversion d'énergie et la biodétection.

I.2.2 Principales configurations d'électrodes

La grande variété de propriétés des nanotubes de carbone mise en évidence dans les sections précédentes laissent entrevoir de nombreuses applications dans plusieurs domaines. Un certain nombre de dispositifs à base de NTCs ont été développés : transistors à effet de champs [4, 63], cellules solaires organiques [64], diodes électroluminescentes organiques [65], capteurs [6, 66, 67], piles enzymatiques [7, 35, 68]... Généralement, les NTCs sont utilisés soit seuls, soit collectivement (sous forme de réseaux), ou soit incorporés dans des matrices de natures variées (polymères, métaux, céramiques...) pour former des matériaux composites avec des propriétés fonctionnelles plus avancées.

I.2.2.1 Dépôt de NTCs par «drop casting»

La réalisation la plus simple de réseau consiste à disperser les nanotubes de carbone dans un solvant approprié, à déposer quelques gouttes de cette dispersion sur la surface de l'électrode (carbone vitreux, platine...), puis à sécher cette dernière en évaporant le solvant. A la fin, nous obtenons un film homogène de NTCs, cette technique est appelé «drop casting» [69]. Plusieurs études ont été menées sur ce genre d'électrodes comme pour la détection électrochimique de nombreuses molécules électroactives en solution (Glucose, ADN, NADH, Cytochrome c, Thiocholine, Carbohydrates ainsi que la détection simultanée de dopamine et d'acide ascorbique) [70-76]. Cette modification de surface est nécessaire du fait qu'elle a une influence considérable sur les performances en électrochimie. Il a été montré que de tels matériaux permettaient d'améliorer les courants de pic grâce à une surface spécifique de l'électrode en NTCs plus grande et un meilleur transfert d'électron.

I.2.2.2 Les buckypapers (BPs)

Les nanotubes de carbone peuvent également se présenter sous forme d'un assemblage de nanotubes communément appelés «Buckypaper» **figure I.8**. Il s'agit d'une feuille mince constituée par un agrégat de NTCs enchevêtrés dont l'épaisseur peut être ajustée d'une manière relativement fine en jouant sur les concentrations ou sur les volumes des solutions à filtrer.

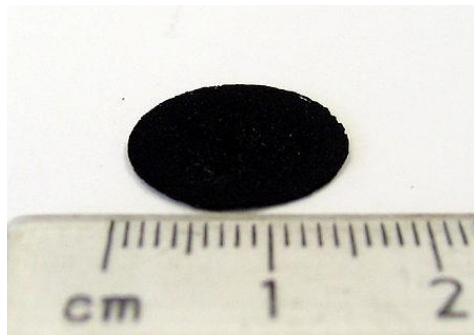
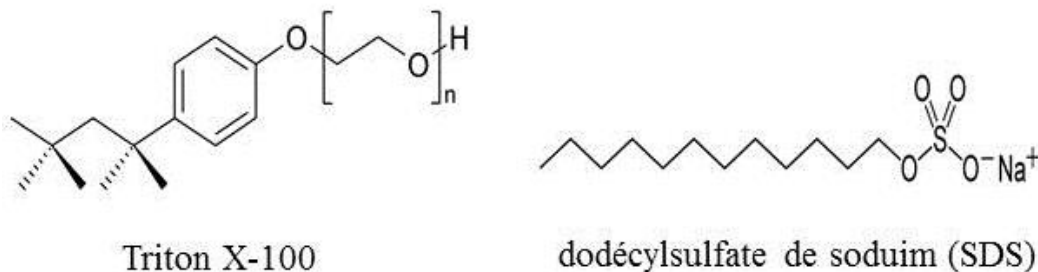


Figure I.8. Image optique de buckypaper de nanotubes de carbone

A l'origine, les buckypapers (BPs) ont été confectionnés pour manipuler les nanotubes, puis ils ont été étudiés par différents groupes de recherche et testés dans le but de créer des applications dans différents domaines, telles que les muscles artificiels [77], les cathodes d'émission de champs [78], stockage de l'hydrogène [79], les biocapteurs [80, 81]...En effet, un BP semble posséder d'intéressantes propriétés héritées des NTCs, ce qui lui confère les mêmes caractéristiques à condition que sa mise en forme macroscopique garde les mêmes propriétés que les nanotubes de carbone et soit en adéquation avec l'application considérée. Actuellement, la méthode la plus fréquente pour créer un buckypaper est la filtration d'une suspension de NTCs [82, 83] en utilisant un surfactant, tel que le Triton X-100 ou le dodécylsulfate de sodium (SDS) (dont les formules sont données dans la **figure I.9**) permettant d'améliorer leur dispersion dans des solutions aqueuses [84].



Figures I.9. Formules chimiques des surfactants Triton X-100 et SDS

D'autres traitements sur les BPs peuvent être réalisés tel qu'un traitement acide permettant de fonctionnaliser les NTCs et facilite leur dispersion dans la suspension [83]. Ces dernières peuvent être donc filtrées à travers une membrane et les BPs seront alors retirés délicatement dans le but d'obtenir un film uniforme constitué des nanotubes de carbone orientés de manière aléatoire et liés entre eux par des liaisons de Van Der Waals [85]. Les papiers de nanotubes ont été caractérisés par diverses méthodes et présentent une très faible résistivité (de l'ordre de $2 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) [86], une grande porosité ainsi qu'une large surface spécifique qui peut atteindre une valeur maximale de $700 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ [87]. Ces propriétés en font

des bons candidats en catalyse. La littérature fait référence à leur utilisation comme électrodes sur lesquels est possible d'adsorber spontanément des enzymes et d'effectuer un transfert d'électrons direct. Giuseppe-Elie et *al.* [88] ont comparé notamment les propriétés électrocatalytiques d'une feuille de NTCs à celle d'un réseau de nanotubes adsorbé par drop casting, et ont conclu qu'étant donné la grande surface spécifique des buckypapers, ces derniers permettent d'obtenir des meilleurs courants. Henry Papa et *al.* [89] ont développé récemment des buckypapers de nanotubes de carbone pour la détection de glucose. Les BPs ont été utilisés dans une autre étude comme support de catalyseur pour une pile à combustible à membrane échangeuse de protons [90, 91]. L'objectif d'une telle étude a été de réduire la corrosion en remplaçant le noir du carbone utilisé comme support pour le catalyseur du platine et entraînant la dissociation d'hydrogène par des BPs présentant un taux de graphitisation élevé.

Il est également possible d'améliorer la qualité de réseau de nanotubes utilisés pour la fabrication des buckypapers. Toutefois, les courbures des NTCs et leurs agglomérations en solution peuvent diminuer de façon remarquable la résistance mécanique et la conductivité thermique et électrique du BP. L'idéal serait donc d'avoir des NTCs longs, alignés et connectés entre eux. Une méthode simple et efficace consiste à synthétiser directement des nanotubes alignés par «effet domino» [92].

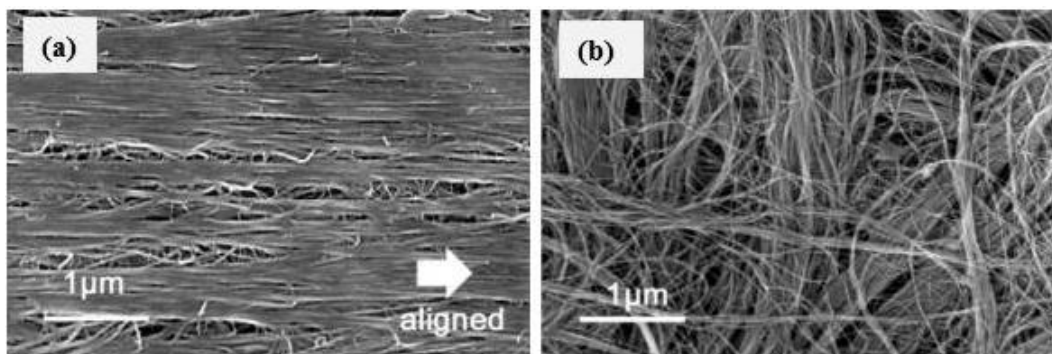


Figure 1.10. Micrographie de (a) surface de buckypaper aligné (effet domino) et (b) surface de buckypaper aléatoire [92].

Dans ce procédé, on fait croître des «forêts» de nanotubes alignés perpendiculairement à un substrat, et on oriente ensuite mécaniquement les NTCs dans un plan horizontal. Ceci résulte en l'obtention d'un réseau de nanotubes alignés selon une même direction et des BPs exempts de toute impureté et ne nécessite pas de traitements supplémentaires. De tels matériaux permettent un meilleur contrôle de diamètres et de l'espacement des nanotubes, ce qui facilite les mesures électrochimique en solution.

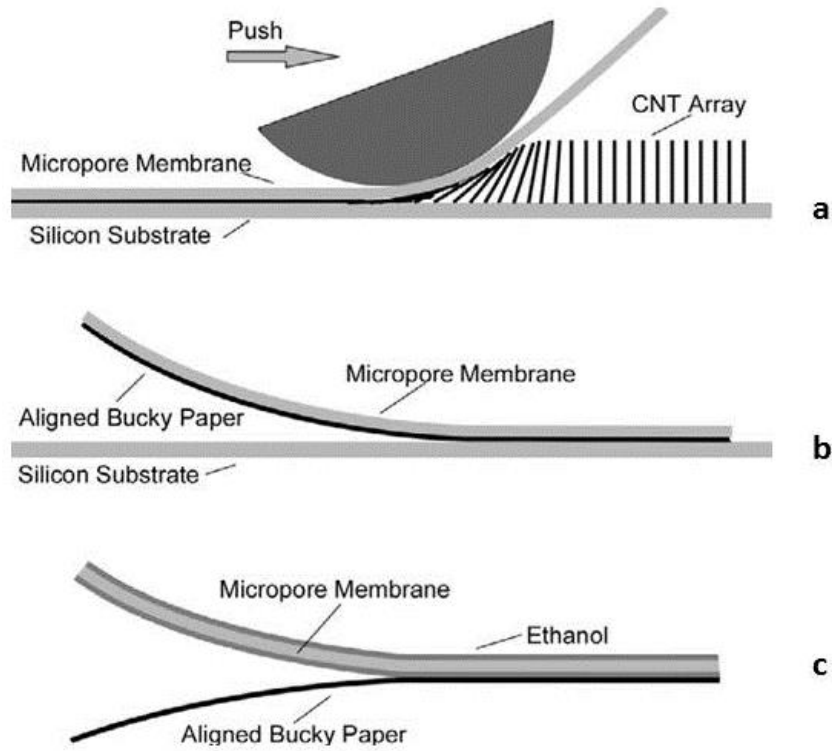


Figure I.11. Synthèse de buckypapers par effet domino [92].

I.2.2.3 Les nanofibres obtenues par filage

Il existe plusieurs techniques de synthèse de fibres composites de NTCs, parmi, on trouve la méthode de Vigolo et *al.* [93], qui consiste à produire de fibres composites à base de nanotubes de carbone et de polymère avec un diamètre de taille nanométrique. Ce procédé de synthèse qui se déroule en deux étapes consiste à disperser les SWCNTs dans un solvant en présence d'un tensioactif puis à injecter, au moyen d'une seringue et d'une aiguille, les nanotubes préalablement dispersés de façon homogène dans l'écoulement d'une solution de polymère coagulant. Le procédé est présenté sur la **figure. I.14.**

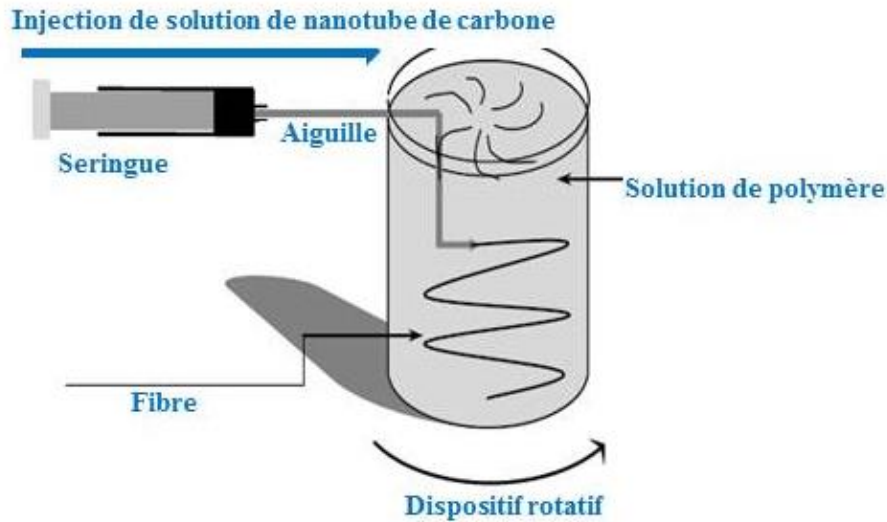


Figure I.14. Représentation schématique du dispositif expérimental de filage des nanotubes en voie humide développé par Vigolo et al. [93].

Après carbonisation, ces fibres montrent de bonnes performances électriques (une conductivité électrique importante pouvant aller jusqu'à 200 S.cm^{-1}), mécaniques (module d'Young de l'ordre de 3 GPa), et une surface spécifique de l'ordre de $300 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. Elles présentent donc un bon potentiel pour la fabrication de capteurs et des actionneurs [94].

Zhu et al. ont mis en place un autre procédé de synthèse de fibres assemblées directement dans un four dans lequel des NTCs individuels sont fabriqués [95]. Celles-ci possèdent une conductivité électrique de 1400 S.cm^{-1} et des propriétés mécaniques intéressantes (résistance à la traction de 1 GPa et un module d'Young de l'ordre de 77 GPa).

Une autre technique de synthèse de fibres par voie fondu, consiste à incorporer les nanotubes de carbone dans une matrice polymère à l'état fondu puis à extruder la fibre [96]. Cette méthode est adaptée aux polymères thermoplastiques. Cependant, cette approche n'est pas si facile à mettre en œuvre car elle ne permet l'incorporation que d'un faible taux des nanotubes de carbone et les étirements très importants durant le filage peuvent présenter des limitations pour la conductivité des fibres. En revanche, une forte dose de NTCs peut entraîner une forte augmentation de la viscosité du polymère et par conséquent des problèmes lors du filage.

L'électrofilage (ou Electrospinning, ES, en anglais) est une technologie simple et peu coûteuse qui exploite les forces coulombiennes pour mettre en forme des nanostructures polymériques sous forme de fibres possédant un diamètre allant de nanomètres au micromètres par l'action d'un champ électrique externe très important sur un polymère [97, 98]. Cela est présenté dans le schéma I.3.ci-dessous.

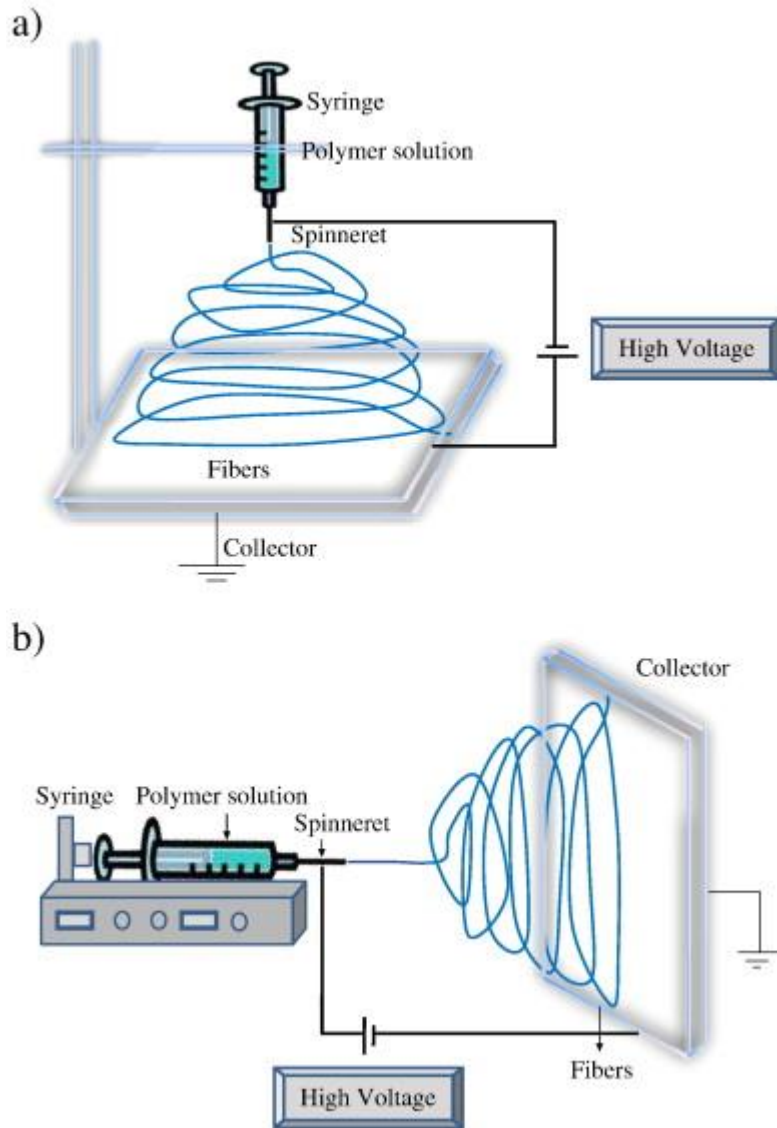


Schéma I.3. Représentation schématique du procédé d'électrofilage. a) installation verticale et b) installation horizontale [99].

C'est au début du 20ème siècle, en 1934 précisément que l'électrospinning est né avec Anton Formhals [100]. Son utilisation est restée toutefois limitée par le manque de contrôle sur la structure et sur les propriétés des fibres ainsi produites et en raison du manque de techniques de caractérisation. La redécouverte ou l'intérêt proprement dit est arrivé, un peu plus tard, dans le courant des années 2000 [101] et depuis, ce moyen de mise en forme fait l'objet d'un nombre de travaux croissants comme le montre la **figure I.12** qui présente le nombre de publications référencées sur le site « web of Science » au début de la dernière décennie portant sur l'électrofilage de polymère.

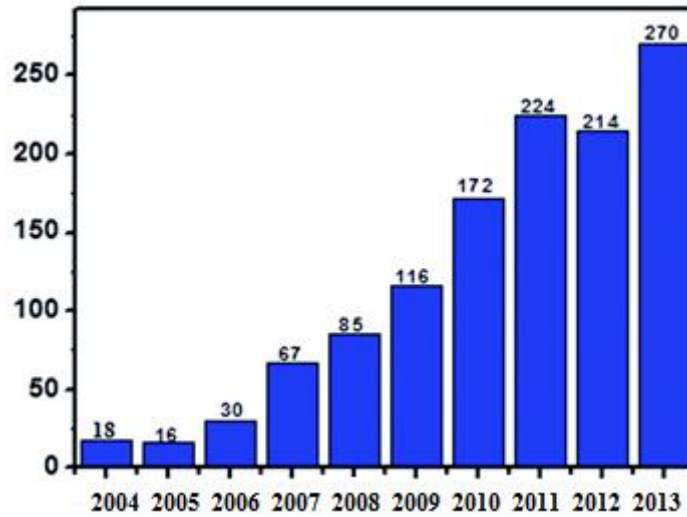


Figure I.12. Publications sur l'électrofilage, « Web of Science » [102]

Reneker et son équipe [103] se sont rendus compte que, par cette technique, il était facile d'obtenir des matériaux avec des propriétés structurales intéressantes et ceci de façon reproductible. Ceci a permis de créer un panel d'applications dans de nombreux laboratoires de recherche qui touchent différents domaines. Parmi les applications où se sont inscrites les nanofibres, sont recensés: l'ingénierie tissulaire [104], les textiles de protection [105], la cosmétique [106], l'immobilisation des enzymes [107, 108], les biocapteurs [109], ou la biomédical [110].

Ces dernières années, cette technique a dépassé le niveau du laboratoire pour être utilisée à l'échelle industrielle notamment pour la fabrication de supports nanostructurés destinés pour le secteur de tissu. Des matrices intéressantes ont été obtenues à partir de différents polymères tels que le polyuréthane [111], la soie [112], le collagène [113]... Mais il subsiste une limite réelle actuelle à la diffusion à grande échelle de l'électrospinning: la productivité. En effet, le débit de production est très faible, à savoir de quelques millilitres par heure sur un système mono-jet. Pour résoudre ce problème, de nouveaux systèmes d'injection ont été mis en place dont notamment le multijet. Il s'agit simplement d'aligner plusieurs seringues parallèlement **figure I.13.**

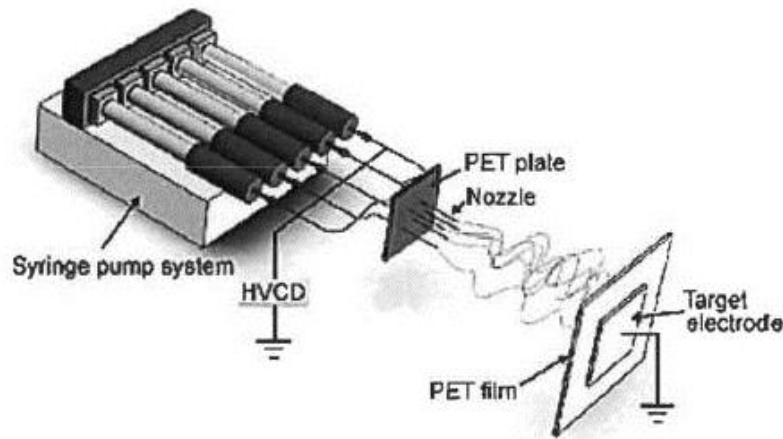


Figure I.13. Système d'injection par multi-jet

D'autres systèmes d'alimentation plus complexes ont aussi fait preuve d'efficacité et équipent actuellement certains dispositifs semi-industriels [47].

L'électrofilage d'une solution contenant un mélange de polymère et des nanotubes de carbone présente une autre voie de synthèse de fibres composite. Lors de l'électrospinning, les NTCs viennent s'aligner dans le même axe de la fibre à la sortie de l'aiguille sous l'effet du champ électrique appliqué couplé au cisaillement de la solution [102]. L'ajout de NTCs à la solution de filage permet de renforcer les fibres et améliorer leurs propriétés mécaniques. Almecija et *al.* ont obtenu des fibres en PVA/SWCNTs (1wt%) avec un module d'Young compris entre 10 et 50 GPa [114]. Néanmoins, de telles fibres présentent l'inconvénient d'être peu chargées, avec généralement moins de 5wt% de nanotubes ce qui peut influencer leurs propriétés conductrices, un traitement thermique est donc nécessaire [115]. Une fois le traitement est effectué, les fibres électrofilées ainsi obtenues possèdent des grandes surfaces spécifiques de l'ordre de $1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ [115, 116]. Comme le taux de réactions électrochimiques est proportionnel à la surface de l'électrode [117, 118], ces nanofibres sont donc appropriées pour servir d'électrodes autosupportées poreuses dans le développement de biocapteurs de haute performance [109, 119] et de piles à combustible pour la conversion d'énergie [120, 121].

Dans ce qui précède, nous avons mis en relief le potentiel unique des nanotubes de carbone afin de développer des électrodes performantes. La recherche dans ce domaine reste cruciale et motive cette thèse dont le défi consiste à mettre en forme des bioélectrodes à base de nanomatériaux et de polymères pour faire de l'électrochimie. Ces dernières doivent donc avoir des bonnes propriétés de conduction électriques ainsi que mécaniques, que ce soit pour une question de maniabilité du matériau ou pour profiter au mieux des propriétés électromécaniques des nanotubes de carbone.

I.3 Utilisation des nanostructures carbonées dans la bioélectrochimie

La bioélectrochimie est une discipline qui a en charge l'application des concepts et des méthodes de l'électrochimie, à l'étude des molécules et des systèmes biologiques organisés. Entre autres, deux grandes applications peuvent en être dégagées: la première consiste à exploiter les diverses réactions biologiques afin de détecter et quantifier les molécules en solution. La seconde application, plus récente, se focalise sur la production énergétique par le biais d'espèces rédox (microbes, enzymes, mitochondries) pour l'oxydation et la réduction de combustible et de comburant respectivement, mettant en exergue l'activité biocatalytique des espèces en présence.

I.3.1 Etat de l'art des biocapteurs enzymatiques

Les instruments classiques d'analyse pour la détection d'une espèce bio-chimique sont généralement complexes, coûteux, volumineux et souvent difficiles à mettre en œuvre. De plus, les phases de préparation des échantillons, d'incubation, et d'exploitation des résultats augmentent souvent très fortement la durée totale d'analyse. Depuis une quarantaine d'années, ils font face à l'avènement des capteurs biochimiques appelés plus couramment biocapteurs. De nombreuses équipes travaillent aujourd'hui sur le développement des biocapteurs applicables à des domaines divers et variés (médecine, agro-alimentaire, ou contrôle environnemental). En effet, de par leur petite taille et leur facilité d'utilisation, ce sont des éléments d'analyse particulièrement avantageux et intéressants [122].

I.3.1.1 Définition d'un biocapteur

Un biocapteur est un système analytique combinant des technologies différentes issues de la biologie moléculaire, la microélectronique, l'optique et l'informatique. Ceux-ci sont des dispositifs souvent simples et compacts composés d'un élément biologique, que l'on appelle «biorécepteur», lui-même lié à un transducteur. Pour mettre en jeu un tel dispositif, le choix du biorécepteur est capital. Les biocapteurs utilisent trois grands types de biomolécules comme éléments de reconnaissance: les enzymes, les immunoespèces, et les acides nucléiques. De même plusieurs types de transducteurs ont été testés pour ce genre de détection tel que les capteurs à fibre optique, électrochimique, piézoélectrique, calorimétrique ou acoustique) permettant de transformer le signal (bio) chimique en un signal électrochimique ou optique facilement exploitable [123, 124] schéma. I.4.

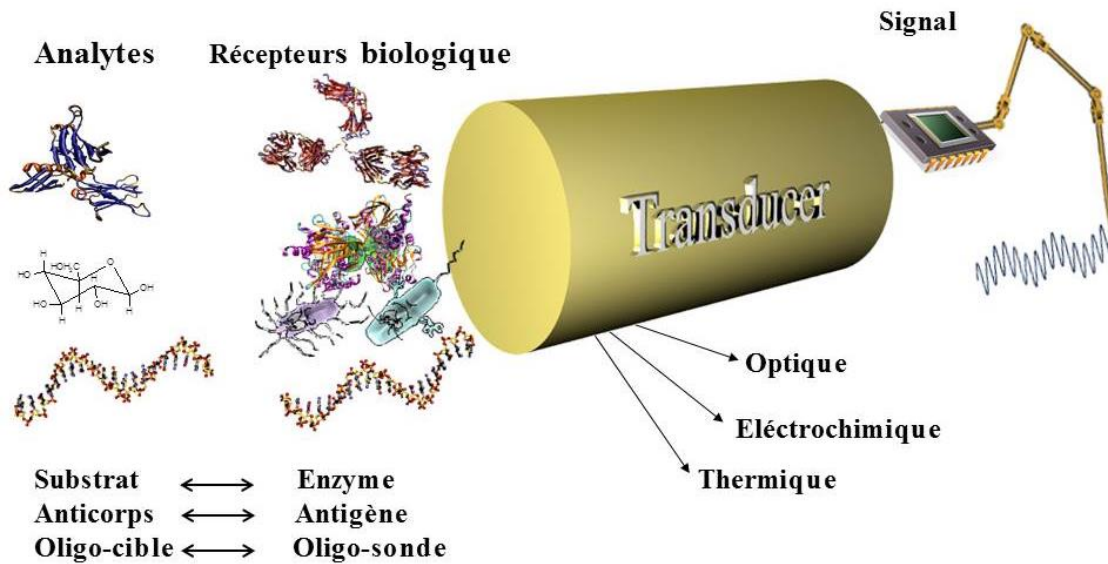


Schéma I.4. Représentation schématique d'un biocapteur

I.3.1.2 Les biorécepteurs

Le biorécepteur constitue le premier maillon du biocapteur. Grâce à son site particulièrement sélectif, il permet l'identification de la cible à détecter. Le biorécepteur assure ainsi la reconnaissance moléculaire, associée ou non à la transformation de l'espèce à mesurer. Dans un biocapteur, le biorécepteur est spécifique et offre une sensibilité élevée pour un groupe particulier d'analyte, ainsi qu'une réponse rapide. Il existe différents types de biorécepteurs qui ont été utilisés comme moyen de reconnaissances moléculaires pour le développement de biocapteurs. Dans ce qui suit, nous nous intéresserons principalement aux biocapteurs enzymatiques et plus particulièrement à ceux à base de polyphénol oxydase (PPO).

1.3.1.2.a Les enzymes

Les enzymes sont des protéines catalytiques qui ont une spécificité exquise pour certaines structures moléculaires (substrat). (Elles sont les plus utilisées et les plus commercialisées). En effet, l'enzyme est une molécule protéinique de structure très complexe formée d'acides aminés constituant des chaînes reliées par des liaisons peptidiques.

Il existe six principaux groupes d'enzymes qui sont classées en fonction du type de réaction qu'elles catalysent : Les oxydoréductases, les hydrolases, les transférases, les lyases, les isomérase, les ligases.

1.3.1.2.b La cinétique enzymatique

Cette partie s'attachera à faire un rapide rappel de cinétique enzymatique. La première étude théorique qui constitue la base de la cinétique enzymatique est due à Michaelis et Menten en 1913 [125]. Leur modèle est basé sur l'existence d'un complexe ES, instable, entre l'enzyme, noté E, et le substrat, noté S. Cette liaison chimique possède une durée de vie bien déterminée et donne rapidement naissance à un produit (P). Comme on peut le voir sur le schéma I.5, il est possible de déterminer la constante de Michaelis-Menten K_M qui correspond à la concentration en substrat nécessaire pour atteindre une intensité de courant égale à la moitié du courant maximum I_{max} . La vitesse maximale V_m quant à elle, est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme en solution. La représentation de la linéarisation en double inverse ($1/v$ en fonction de $1/[S]$), appelée linéarisation de Lineweaver - Burk, est souvent utilisée pour vérifier la nature du mécanisme réactionnel et les valeurs des paramètres V_m et K_m [126].

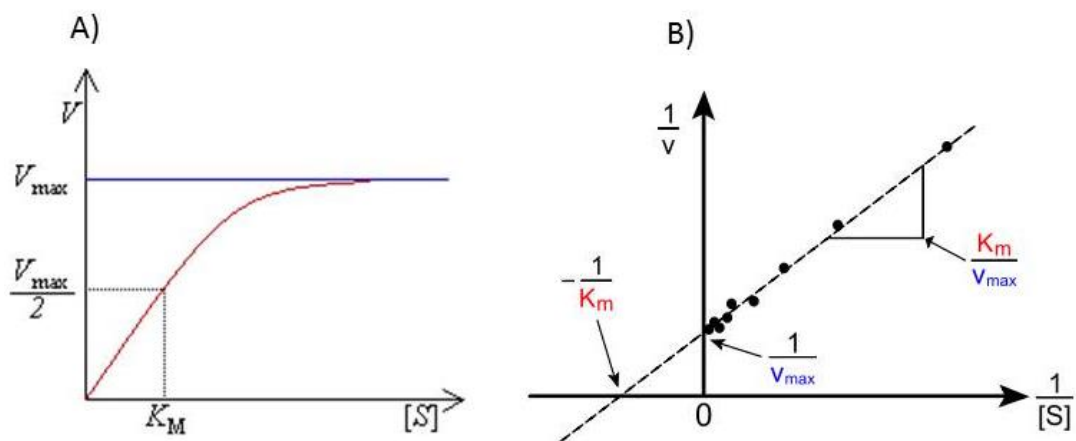


Schéma I.5. A) Représentation de Michaelis-Menten B) Représentation graphique de la linéarisation de Lineweaver-Burk.

1.3.1.2.c La polyphénol oxydase (PPO)

La polyphénol oxydase (monophénol mono-oxygénase EC 1. 14.18.1) également appelée tyrosinase est une métallo-protéine de masse moléculaire élevée (~ 128 kDa) [127] issue de différentes souches (végétale, animale). Cette enzyme catalyse en milieu aérobie deux types de réactions:

Activité de crésolase : Ortho-hydroxylation du monophénol en ortho-diphénol.

Activité de catécholase : Oxydation de l'ortho-diphénol en ortho-quinone.

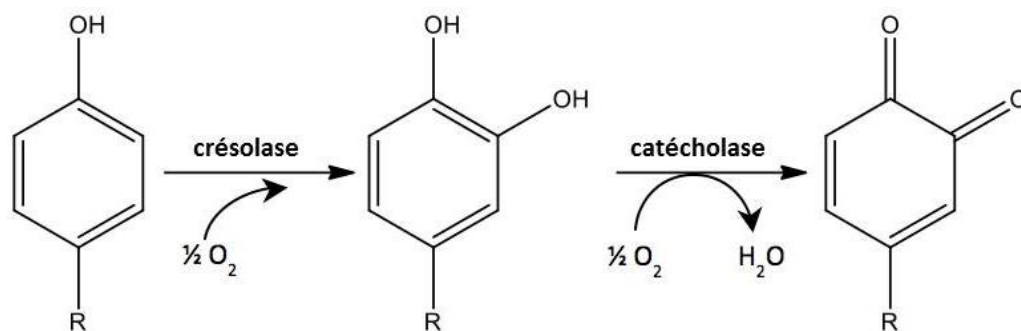


Schéma I.6. Activités enzymatiques de la polyphénol oxydase (PPO).

Le site actif de la PPO contient deux atomes de cuivre et peut être dans trois états d'oxydation: E_{met} pour la forme "metoxy", lorsque les atomes d'oxygène sont liés aux atomes de cuivre mais plus entre eux $[\text{Cu(II) OH Cu (II)}]$, E_{oxy} pour la forme "oxy", lorsque les atomes d'oxygènes sont liés entre eux et aux atomes de cuivre $[\text{Cu(II) O}_2^{2-} \text{ Cu(II)}]$ et E_{deoxy} pour la forme "deoxy" lorsque le site actif n'est pas lié à l'oxygène $[\text{Cu(I) Cu(I)}]$. Ces formes limites interviennent donc dans tous les mécanismes d'action de la PPO [128]. Il est généralement admis que cette enzyme possède deux sites distincts de fixation: l'un présente une affinité pour les composés aromatiques comme le catéchol et ses dérivés et l'autre est le site où vient se fixer les molécules d'oxygène. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à la détection du catéchol et plus précisément à l'activité de catécholase. En effet, dans le mécanisme correspondant à l'activité de catécholase de la PPO, deux molécules de catéchol s'oxydent en ortho-quinones avec la réduction de deux molécules d'oxygène en H_2O . Une molécule ortho-diphénol est liée à la forme «met» de l'enzyme. Ce mécanisme génère une molécule de quinone. La deuxième molécule de catéchol est liée à la forme «oxy» ce qui donne lieu à la formation d'une deuxième molécule d'ortho-quinone et la régénération de la forme «met» qui recommence le cycle catalytique [129].

A pH 6,5, supérieur au point isoélectrique de la PPO ($\text{pI}=4,7$), l'enzyme devient chargée négativement et favorise la transformation de catéchol en ortho-quinone [127].

I.3.1.3 Biocapteur électrochimique à catéchol: principe de fonctionnement

Le principe de fonctionnement consiste en la mesure du courant de réduction électrochimique de l'ortho-quinone électroactifs générés enzymatiquement sur l'électrode de travail à un potentiel $E= 0.2\text{V vs. ECS}$ [130] en ortho-diphénol en fonction de la concentration de catéchol en solution. Le substrat régénéré à la surface de l'électrode peut soit diffusé en solution soit entrer dans un nouveau cycle catalytique avec l'enzyme.

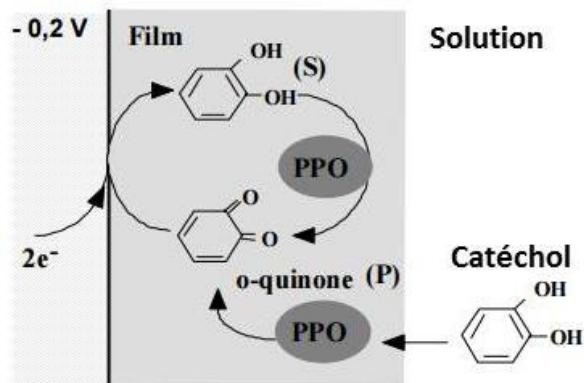


Schéma I.7. Représentation du fonctionnement d'un biocapteur ampérométrique à catéchol, à base de PPO [130]

Les propriétés analytiques d'un biocapteur sont évaluées en termes de sensibilité, de linéarité et de stabilité opérationnelle.

- La sensibilité qui présente la pente de la partie linéaire de la courbe de variation du courant en fonction de la concentration en substrat.
- Le domaine de linéarité, qui correspond à la gamme de concentration de catéchol induisant une variation linéaire de la réponse du biocapteur.
- Le temps de réponse, qui correspond au temps nécessaire pour que la réponse du biocapteur se stabilise à une nouvelle valeur après une injection de substrat.

Ce type de biocapteurs s'avère posséder un champ d'application important notamment dans l'analyse environnementale et les produits agroalimentaires [131]. En 1993, des travaux publiés par Cosnier et *al.* [130] décrivaient la conception d'un biocapteur basé sur l'électropolymérisation d'un mélange de monomère pyrrole amphiphile et de PPO préalablement adsorbé sur une électrode. Ce biocapteur a été appliqué à la détection de plusieurs phénols et des o-diphénols. La réponse de l'électrode est basée sur la détection ampérométrique de l'ortho-quinones générés. Ce biocapteur a un temps de réponse rapide (environ 3 s), des limites de détection très basses (2 nmol.L^{-1} pour le catéchol) et un domaine de linéarité variant de 1 à $300 \text{ mA. mol}^{-1}.\text{L}$. La valeur de K_M reportée, à $\text{pH} = 6,5$ et à $T = 25^\circ\text{C}$ est de $5,10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. En 2008, Cosnier et *al.* [132] ont développé un biocapteur SWCNTs/ polypyrrole/ tyrosinase appliquée aussi à la détection de catéchol. Les caractéristiques analytiques de ce capteur, tant en sensibilité ($S = 1,516 \text{ A mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-2}$), domaine de linéarité ($0,5\text{--}10 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$), valeur maximale de la densité de courant ($557 \text{ }\mu\text{A.cm}^{-2}$), comptent parmi les meilleures biocapteurs à catéchol reportés. Ozoner et *al.* [133] ont aussi mis en place un biocapteur à catéchol à base de PPO piégé dans un film de nanotubes de carbone fonctionnalisé avec du polypyrrole, le tout déposé à la surface d'une électrode de carbone vitreux. L'analyse par injection en flux continu a été utilisée en premier temps pour tester le biocapteur en termes de sensibilité, stabilité, répétabilité et linéarité. En deuxième

temps pour le dosage de produits phénolique dans des échantillons réels. Le biocapteur proposé présentait des caractéristiques analytiques performantes telles qu'une gamme de linéarité entre 3 et 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, un temps de réponse court (10 s), une limite de détection de 0,671 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, une sensibilité de 8 $\text{nA}.\mu\text{mol}^{-1}.\text{L}^{-1}$ et une excellente stabilité de fonctionnement après 10 semaines.

I.3.2 Etat de l'art des biopiles enzymatiques

I.3.2.1 Les biopiles à glucose/O₂

Les biopiles au sens de « piles à combustible biologiques », traduction de l'expression anglaise « biofuel cells » sont des dispositifs biologiques capables de transformer directement l'énergie chimique en énergie électrique par des réactions d'oxydoréduction impliquant des voies biochimiques [134, 135]. Le principe d'une biopile est directement issu du fonctionnement des piles à combustible; deux électrodes assurent le fonctionnement du générateur. A l'anode, la réaction d'oxydation est catalysée généralement par une oxydoréductase (la glucose oxydase ou la glucose déshydrogénase par exemple), c'est le centre de production des électrons. Ceux-ci sont transportés jusqu'à la cathode, centre de la réduction toujours sous l'effet catalytique d'une oxydoréductase (la laccase, la bilirubine oxydase, ou la cytochrome oxydase par exemple). Les électrodes assurent la collecte des électrons et permettent ainsi de produire une énergie. Ces réactions d'électrodes nécessitent des catalyseurs. Dans le cas des piles à combustible « classique », la catalyse est assurée par des métaux nobles (platine notamment) qui permettent d'améliorer l'efficacité des réactions électrochimiques [35]. Dans le cas des biopiles, la catalyse est assurée par des bioéléments: des enzymes redox pour les biopiles enzymatiques, ou des micro-organismes (bactéries, algues, levures...) pour les biopiles microbiennes.

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux biopiles enzymatiques qui utilisent exclusivement le glucose comme combustible à l'anode et l'oxygène comme comburant à la cathode, **schéma I.8**. Leur attractivité provient du fait que les deux substrats utilisés sont présents dans de nombreux milieux physiologiques animaux et végétaux en concentrations normalement régulées et sans cesse renouvelées [136].

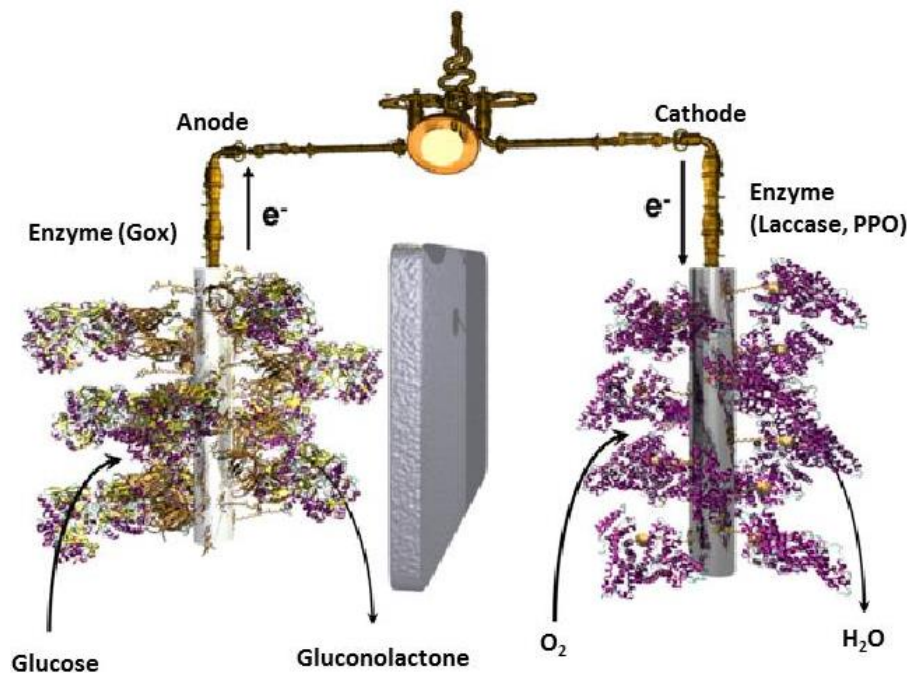


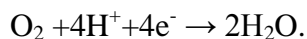
Schéma I.8. Principe d'une biopile enzymatique à Glucose/Oxygène

A l'anode, la Glucose Oxydase (GOx) est l'enzyme sans conteste la plus communément utilisée dans la conception de biopile à Glucose/Oxygène, notamment avec l'engouement observé pour le développement des biocapteurs métaboliques à glucose [35]. Elle permet de catalyser la demi-réaction suivante: $\text{Glucose} \rightarrow \text{Gluconolactone} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$.

De plus, celle-ci présente une activité et une stabilité remarquables dans les conditions de température et de pH physiologique (37°C, pH~ 7,4) et ceci grâce à la présence du cofacteur rédox responsable de son activité enzymatique: la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD).

Ces caractéristiques font de ces protéines des candidates privilégiées pour le développement de biopiles à glucose implantable.

A la cathode, deux enzymes, en particulier, sont utilisés pour bioélectrocatalyse : la Laccase (Lac) et la Bilirubin Oxydases (BOD). Tous les deux appartiennent à la famille des oxydases multicuivre qui utilise quatre ions de cuivre pour catalyser la réduction du dioxygène en eau à quatre électrons sans libérer H_2O_2 [137].



I.3.2.2 Quelques exemples de biopiles à glucose/O₂

Ces dernières années, le développement important des recherches sur les biopiles a permis de les envisager comme une source alternative d'énergie dans des applications potentielles à des milieux physiologiques. Sa miniaturisation possible en vue d'élaborer un système implantable dans le corps humain et d'autres évolutions dans le domaine des sources d'énergies portables ont été aussi développées. Il convient toutefois de rappeler que le concept mis en jeu dans ce système est ancien. La première communication scientifique concernant la

mise au point d'une biopile enzymatique à combustible date de 1964 [138] et ce n'est qu'au cours des dernières années que le volume de publications scientifiques a augmenté notamment du fait de l'amélioration du transfert des électrons vers l'électrode **figure I.14**.

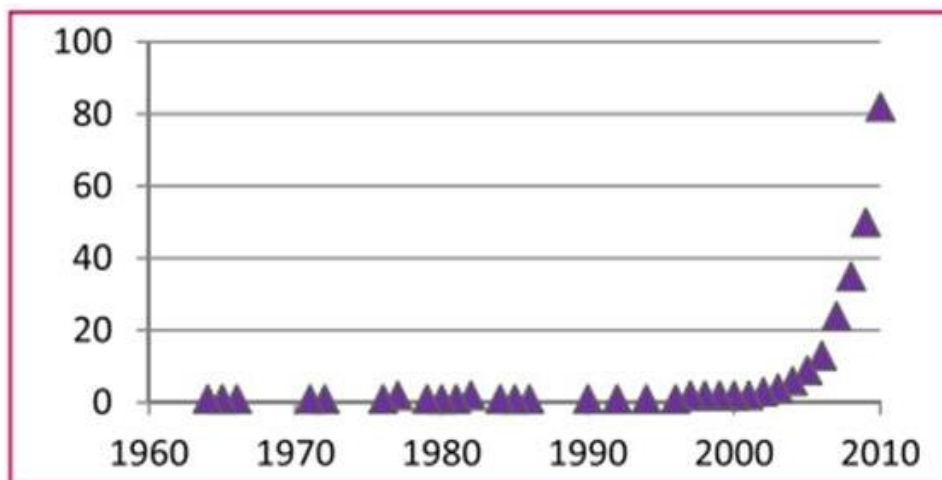


Figure I.14. Nombre de publications par an sur le thème « biopile enzymatique » (source ISI Web of knowledge).

La recherche sur les biopiles à glucose a considérablement progressé depuis la biopile développée par SONY en 2007 capable d'alimenter un appareil de type MP3 [139]. Il s'agit d'un montage complexe car à l'anode, une chaîne de réactions est mise en œuvre. Deux enzymes sont utilisées : Le glucose déshydrogénase (GDH) et la diaphorase (Di), **figure I.15**. Pour la cathode, l'enzyme catalysant la réduction de l'oxygène est la BOD associée à la vitamine K3 (ménadione) comme médiateur.

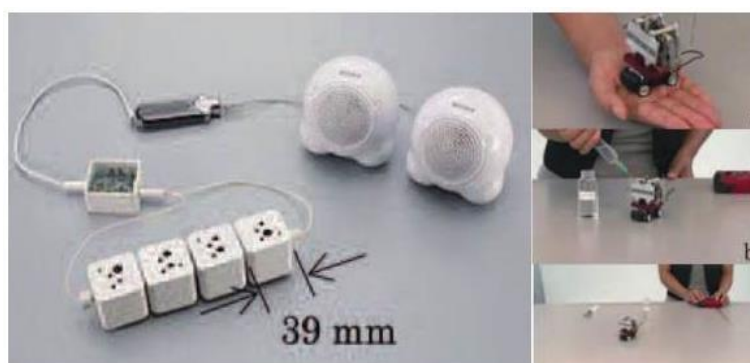


Figure I.15. Biopiles à glucose/oxygène développées par SONY en 2007 [139].

Une biopile à Glucose/O₂ miniaturisée a été implantée dans un grain de raisin. Cette biopile contient deux électrodes en fibre de carbone de 7 µm de diamètre et de 2 centimètres de long. Les enzymes (GOx à l'anode et BOD à la cathode respectivement) ont été immobilisés sur les électrodes avec des médiateurs à base d'osmium à l'aide d'hydrogel.

Cette pile présente une différence de potentiel de 0,8V et délivre une densité de puissance maximale de $240 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ [140].

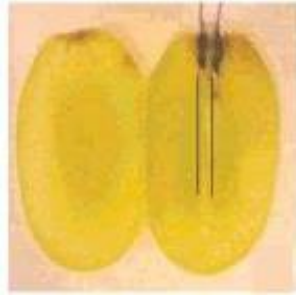


Figure I.16. Biopile à glucose/ O_2 dans un grain de raisin [140].

En 2010, une biopile a été conçue et implantée dans le rat [141]. Celle-ci fonctionne grâce à la catalyse enzymatique du glucose au niveau des électrodes, de la même façon que les batteries développées par Sony. Dans ce cas, le dispositif miniaturisé est emballé dans une membrane semi-perméable qui l'isole du milieu extérieur permettant le passage du glucose, de l' O_2 et de leurs produits. Cette biopile implantée présente une différence de potentiel de 0,275V et délivre puissance maximale de $6,5\mu\text{W}$ pendant plusieurs mois.

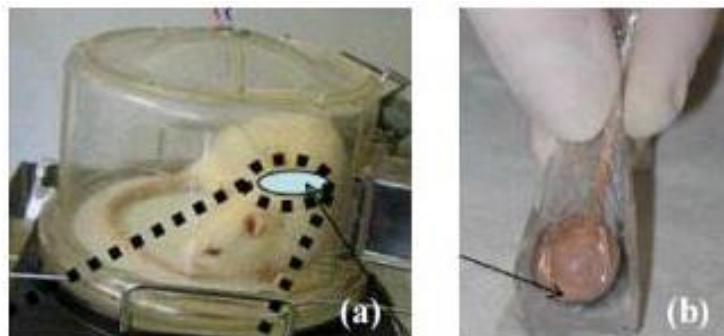


Figure I.17. Biopile (b) implantée dans un rat (a) [141].

Il s'avère que le paramètre majeur qui permet de caractériser la pile est la puissance enregistrée à la sortie de la pile, Pcell. Les données publiées indiquaient quelques milliwatts par cm^2 à la fin des années 2000 [35]. Les efforts ont donc porté principalement sur les méthodes d'immobilisation et de connexion des enzymes sur l'électrode afin d'améliorer au mieux l'activité et la stabilité de ces systèmes.

I.3.2.3 Biocathodes enzymatiques

I.3.2.3.a La Laccase

La laccase de *T. versicolor* fait partie des oxydases à cuivres multiples (OCM). Celles-ci sont des protéines dont le site actif est constitué de quatre atomes de cuivre qui catalyse l'oxydation de différents composés phénoliques et d'amines aromatiques à la fois avec la

réduction concomitante à 4 électrons de l'oxygène en eau [142]. Les oxydases multicuivres sont largement présentes chez les plantes et les champignons et ont été identifiées chez les insectes et les bactéries [143], [144].



Figure I.18. *T. versicolor*, champignon de la pourriture blanche produisant la laccase.

Les ions de cuivre de ces enzymes sont classés en trois types. Le centre de cuivre de type 1 (T1) responsable du transfert électronique entre la surface d'électrode et le centre trinuéaire T2-2T3, il accepte les électrons des substrats qui sont donneur d'électron et les transmet au site de réduction de O₂. Le site de réduction est un cluster trinuéaire qui contient un ion cuivre de type 2 (T2) et une paire d'ions cuivre de type 3 (T3) couplés de manière antiferromagnétique et ponté par une espèce oxygénée [145].

La laccase a de nombreuses applications. Elles peuvent être commercialisées en tant que molécule du blanchiment dans l'industrie du textile et du colorant. D'autres applications potentielles existent dans l'industrie du papier, la conversion enzymatique de produits chimiques intermédiaires, la transformation oxydative des polluants environnementaux, la détoxification d'effluents industriels d'herbicides, de pesticides et de certains explosifs [143, 145]. La laccase a un potentiel redox élevé et d'excellents paramètres catalytiques, ce qui est bénéfique pour les technologies de biocapteurs et de biopiles [146]. Cette protéine a la propriété d'être très active à proximité de pH (4~5) et capable de réduire le dioxygène avec une très faible surtension (quelques dizaines de mV). Le potentiel redox du site T1, auquel les électrons sont transférés se trouve autour de 0,6 V Vs Ag/AgCl. Elles sont considérées comme des électrocatalyseurs efficaces pour l'électroréduction du dioxygène [147, 148]. Cependant, le fait que cette enzyme soit acidophile (peu active à pH neutre) la rend beaucoup moins attractive dans le cadre d'élaboration de biopiles glucose-O₂ pour l'implantation (pH 7,4 et [Cl⁻] = 150 mM) [149, 150].

La laccase de *T. versicolor* a une dimension approximative de 70×50×50Å [143]. Le site T1 qui est mononucléaire contient un ion cuivre Cu^I, sa coordination à une cystéine très proche, est responsable d'une bande d'adsorption intense autour de 600nm, ce qui donne la couleur bleue à l'enzyme. Le cuivre T1 est situé à environ 6,5 Å de la surface de l'enzyme. Les sites T2 et T3 forment un centre de cuivre trinuéaire T2/T3 qui est situé à environ 12 Å

au fond d'une crevasse au sein de l'enzyme. Le cuivre T1 est relié au site trinuéculaire T2/T3 par un histidine-cystéine-histidine tri-peptide [143, 151] **figure I.19**.

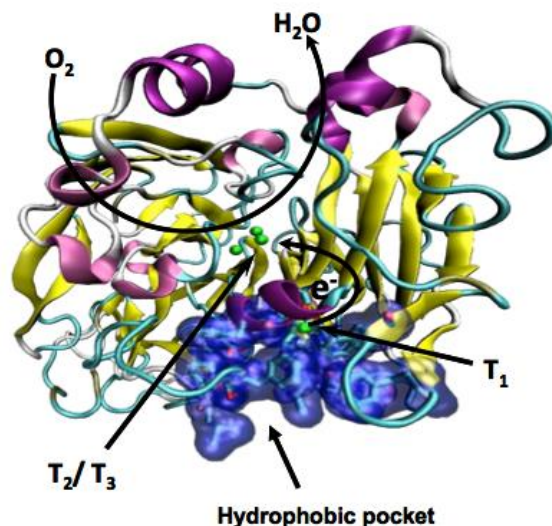


Figure I.19. Structure de la laccase de *T. versicolor*.

I.3.2.3.b Réduction du dioxygène

La catalyse enzymatique par la laccase implique que le substrat réducteur soit oxydé au site T1, ce qui s'accompagne de la réduction de l'ion Cu^{2+} de ce site T1 en Cu^+ , puis le transfert d'électron de T1 au cluster T2/T3, où se déroule la réduction subséquente d'une molécule d' O_2 en H_2O [145].

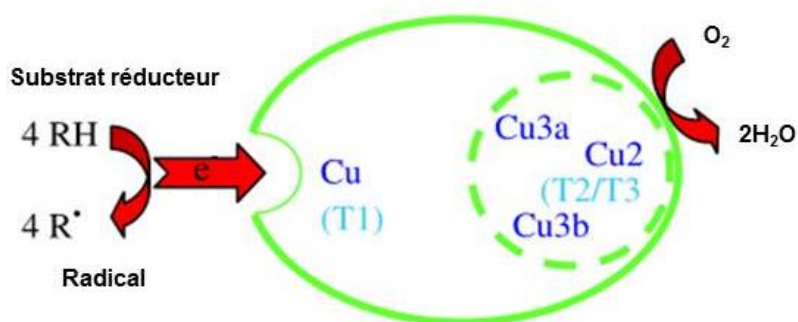


Schéma I.9. Réaction catalysée par la laccase.

Les ions de cuivre de la protéine offrent les réactions du transfert d'électron par (switch) leurs états d'oxydation entre Cu^{2+} et Cu^+ . La fonction du site actif T1 est d'oxyder le substrat réducteur et de fournir le transfert d'électron intramolécule à grande distance du substrat au centre de cuivre redox T2/T3. En conclusion, quatre électrons sont fournis successivement par le site T1 et les trois ions Cu^{2+} du centre trinuéculaire sont ainsi réduits en Cu^+ et réduisent O_2 en eau.

I.3.2.3.c Connexion électrique des enzymes sur électrode: Transfert d'électrons direct et médiaté

Le transfert d'électrons de l'électrode au site actif de l'enzyme est une étape cruciale pour développer des biopiles ayant des meilleures performances. De nombreuses méthodes ont été proposées pour établir ou améliorer le transfert d'électrons entre les biomolécules et les électrodes. En général, il existe deux mécanismes différents: le transfert d'électrons direct (DET), et le transfert d'électrons via un médiateur (MET) **schéma I.10**.

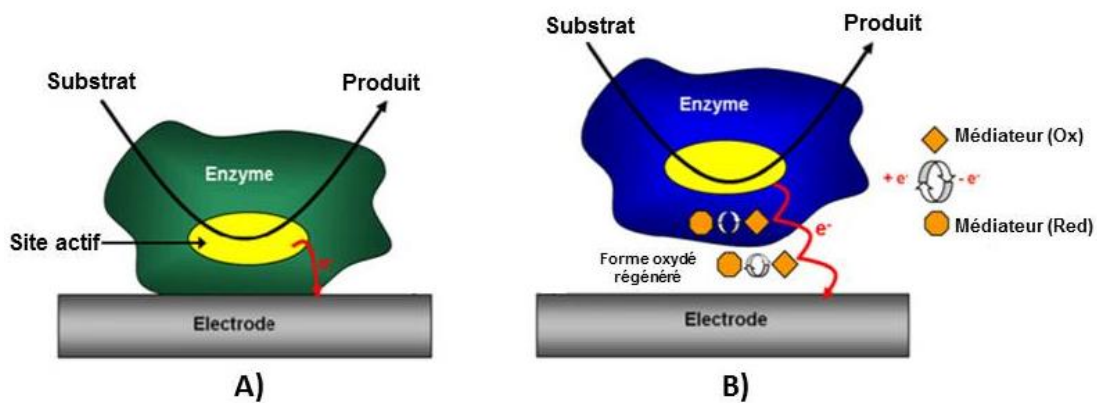


Schéma I.10. Schématisation des mécanismes de transfert d'électrons : **A)** transfert direct et **B)** transfert via un médiateur [149].

- **Influence de la localisation du centre actif sur le transfert d'électron**

Les enzymes redox peuvent être classées en trois groupes selon la localisation du site actif au sein de l'enzyme et par conséquent, le mode de transfert d'électron entre les enzymes et les électrodes [152,153].

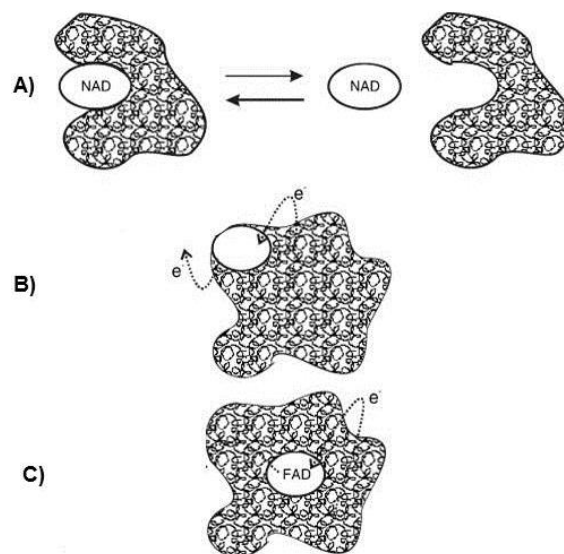


Schéma I.11. Trois groupes d'enzymes basées sur la localisation du site actif : **A)** Site actif diffusif **B)** Site actif situé à la périphérie de l'enzyme **C)** Site active profondément enfoui dans l'enzyme [154].

Pour une biopile Glucose/O₂, à la cathode, la laccase et la bilirubine oxydase sont parmi les enzymes appartenant au groupe B. Le centre redox est situé à proximité de la surface de l'enzyme, ce qui permet le transfert direct d'électrons à l'électrode. A l'anode, la glucose oxydase dont le centre FAD se trouve à 15 Å de la surface de la protéine est l'enzyme la plus étudiée. Celle-ci appartient au groupe C et elle contient un centre redox fortement lié à l'enzyme et profondément enterré à l'intérieure de la protéine. La communication électrique de ce type d'enzyme avec les électrodes est difficile car la GOx ne libère pas le site actif pour qu'il agisse comme une navette d'électrons.

Transfert direct d'électrons (DET)

Dans le cas d'un transfert direct, les électrons transitent directement entre l'électrode et le site actif de l'enzyme [155]. Ce mode de transfert électronique permet d'éviter et d'abaisser la tension d'une biopile et les rendent biocompatibles pour des applications in vivo. Le fonctionnement d'une enzyme en mode DET est étroitement relié à l'emplacement du centre actif dans l'enzyme comme expliqué dans le paragraphe précédent, de la conformation de la protéine, mais aussi au matériau d'électrode utilisé dans la conception des biopiles enzymatiques.

Le challenge reste d'orienter l'enzyme sur l'électrode en gardant son activité optimale pour permettre un meilleur transfert d'électron, rapide tout en minimisant les limitations diffusionnelles du co-substrat [156, 157]. La laccase bénéficie de cette attention puisque elle appartient au groupe B, elles sont donc en mesure d'effectuer un transfert d'électron direct [158].

La première publication sur l'immobilisation de la laccase de *Polyporus versicolor* sur des électrodes carbonées pour effectuer un transfert direct d'électron permettant l'électroréduction du dioxygène a été publiée par Berezin et ses collaborateurs en 1978 [159]. En 1984, une deuxième publication rapporte des phénomènes de transfert direct d'électron par la laccase de *P. versicolor* qui sert de catalyseur pour la réduction d'O₂ en utilisant des électrodes HOPG [160].

En 2005, l'équipe de Shleev a rapporté des phénomènes de DET pour différents types de laccases, ils ont détaillé aussi le mécanisme de DET à la surface d'électrode [144]. Ce dernier consiste en deux étapes:

- Transfert d'électrons de l'électrode au site T1 de l'enzyme. La distance de séparation la plus courte entre la surface de la laccase et le site T1 est d'environ 6,5 Å [161].
- Ensuite, transfert de ces électrons par un mécanisme de transfert d'électron interne du site T1 au cluster T2/T3 (la distance est 12Å) [162] et réduction de la molécule d'oxygène en H₂O.

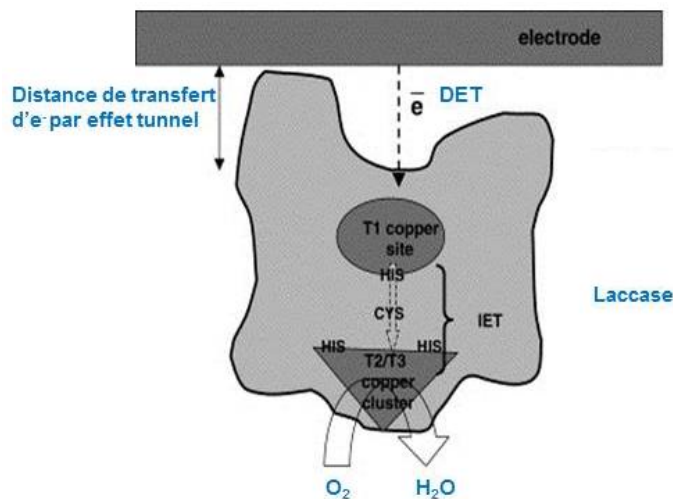


Schéma I.12. Mécanisme de DET pour la laccase adsorbée sur une électrode de Carbone [144].

Armstrong et *al.* ont proposé une nouvelle approche pour immobiliser la laccase tout en l'orientant afin d'améliorer la performance de la biocathode. Ces immobilisations et orientations sont réalisées par fonctionnalisation des électrodes par des dérivés d'anthracène [162]. L'immobilisation de la laccase orientée est réalisée par l'interaction affine de l'anthracène à la surface de l'électrode avec la poche hydrophobe de l'enzyme pointant vers le site T1. Cependant, il n'y a pas de liaison covalente impliquée entre l'électrode modifiée et l'enzyme.

Différentes molécules polycycliques ont été utilisées et ont prouvé leurs efficacités pour la fonctionnalisation non-covalente de matériaux d'électrodes [163]. Probablement, ces molécules polycycliques capables de rentrer dans la poche hydrophobique interagissent favorablement avec le site actif T1 de la laccase, ce qui conduit à une orientation préférentielle de l'enzyme avec le site T1 en face de l'électrode permettant un DET entre ce site de cuivre de la laccase et l'électrode.

L'équipe de Vazquez-Duhalt [164] a créé un nouveau design d'une électrode de graphite et ceci en la modifiant avec l'acide 4-(2-aminoéthyl) benzoïque (AEBA). La laccase a été ensuite immobilisée à la surface de l'électrode via couplage peptidique activée par EDC. La fonction d'acide benzoïque de l'AEBA peut interagir ainsi avec le site T1 de la laccase comme un ligand avec une affinité importante (constante d'association $K_a = 6,6 \times 10^{-6} \text{ M}$) et cela permet l'orientation de l'enzyme. Une biopile semi-enzymatique Zn-AEBA à base de cette biocathode a été ensuite développée en présence d'une anode de zinc. Elle présente des bonnes performances. Des mesures chronoampérométriques montrent une stabilité de fonctionnement pendant 6 heures.

- **Transfert médiaté d'électrons**

Le transfert d'électron médiaté est effectué à l'aide d'une espèce redox de faible poids moléculaire, appelée médiateur. Celui-ci agit comme un relais électronique et donc raccourcit la distance du transfert d'électron entre le site actif de l'enzyme et l'électrode [165]. L'enzyme catalyse l'oxydation ou la réduction du médiateur. La régénération de celui-ci se fait à la surface de l'électrode. La sélection du médiateur est importante. D'une part, le médiateur est spécifique à l'enzyme, et d'autre part il est un des acteurs indispensables au bon fonctionnement d'une pile [34]. D'ailleurs, le potentiel redox du médiateur utilisé doit être inférieur à celui de l'enzyme redox à la cathode et inversement à l'anode. Les médiateurs doivent être aussi stables chimiquement sous l'effet des cycles de transfert d'électrons et en fonction du temps. Pour la laccase, le médiateur le plus utilisé est le 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-acide sulphonique) (ABTS) [166].

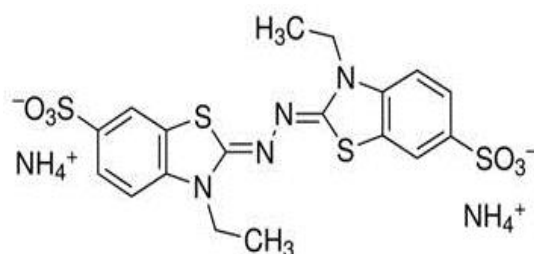


Figure I.20. Structure du médiateur redox ABTS

Le schéma I.13 illustre le transfert d'électrons entre la cathode et le dioxygène en présence de l'ABTS ainsi que les potentiels thermodynamiques de chaque constituant correspondant dans la réaction globale. A proximité de la cathode, en oxydant séquentiellement plusieurs médiateurs redox ABTS en ABTS⁺, la laccase stocke les électrons nécessaires pour la réduction de l'oxygène.

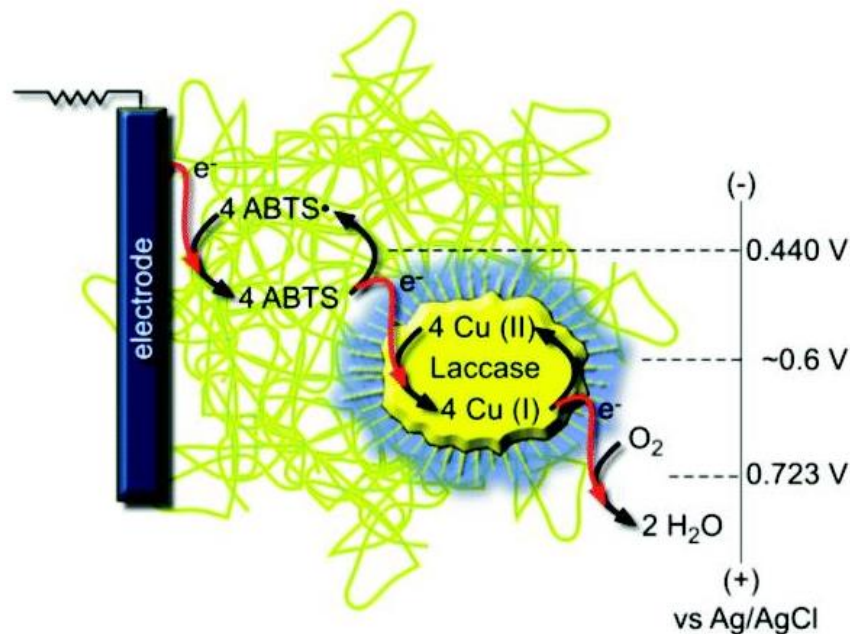


Schéma I.13. Réduction bioelectrocatalytique du dioxygène en H₂O à l'aide du médiateur ABTS [167]

Plusieurs autres molécules sont capables d'agir comme médiateurs d'enzymes [168, 169]. Parmi lesquelles figurent, les médiateurs issus de complexes organométalliques comme le Ferricyanure de potassium, Phtalocyanine, les complexes à base d'osmium et de ruthénium. Cela peut être attribué à trois facteurs : ils présentent des potentiels redox bas, généralement insensibles au pH, et sont disponibles dans le commerce. Les ferrocènes et les quinones sont très intéressants car une grande variété de dérivés existe avec diverses fonctionnalités.

D'un point de vue technique, les médiateurs peuvent être physiquement encapsulés à l'intérieur d'une membrane, immobilisés avec l'enzyme dans une matrice, greffés de façon covalente à la surface d'un polymère ou bien libres en solution [170]. Cependant, cette dernière technique nécessite une membrane séparatrice entre l'anode et la cathode.

L'efficacité du transfert d'électron médiaté peut être largement augmenté grâce à l'immobilisation conjointe de l'enzyme et du médiateur redox à la surface du conducteur électronique et ceci afin d'éviter plusieurs inconvénients du MET tel que les problèmes de relargage et la fuite des médiateurs dans les systèmes. D'ailleurs la toxicité et la non biocompatibilité de nombreux médiateurs limite les applications d'implantation des biopiles.

I.3.2.4 Etat de l'art de l'immobilisation de la laccase à l'aide de nanotubes de carbone

L'électroréduction enzymatique de la molécule d'oxygène catalysée par la laccase avec ou sans médiateur a été largement étudiée [145,171, 172]. L'utilisation des nanotubes de carbone dans les biopiles enzymatiques semble permettre une nette amélioration des performances de ces systèmes [173]. La laccase est généralement immobilisée sur les électrodes en NTCs, par piégeage dans des polymères, en la liant de manière covalente aux

nanotubes de carbone ou par adsorption physique. Cette dernière technique lie l'enzyme de manière non covalente et spontanée grâce à l'affinité naturelle des NTCs pour les enzymes et à la présence des interactions de type électrostatiques, hydrophobiques et aussi des liaisons hydrogènes entre la protéine et les nanotubes. Il est également montré que vu leur grande surface spécifique, les NTCs permettent de connecter une plus grande quantité d'enzyme que sur d'autres supports comme le carbone vitreux ou le graphite. Cela permet l'amélioration de la stabilité des biocathodes et empêche la dénaturation des enzymes, particulièrement dans des conditions extrêmes de températures ou dans les solvants [174].

Parmi les principaux travaux immobilisant la laccase sur des configurations d'électrodes à base de NTCs, on peut citer: Hussein et *al.* qui ont immobilisé la laccase par adsorption sur des buckypapers en NTCs déposés sur carbone vitreux [175]. Cela a permis de concevoir une biocathode fonctionnant avec un transfert d'électrons direct. La biopile génère un courant de $422 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. D'autres travaux ont utilisé des composites nanotubes de carbone/polymère pour immobiliser la laccase sur des électrodes. Ainsi, Liu et *al.* ont encapsulé la laccase dans une électrode composite nanotube de carbone/ liquide ionique [176], de même que Deng et *al.* qui ont immobilisé un mélange de NTCs, de poly-L-lysine et de laccase sur une électrode de ITO par une technique de couche par couche. Le système fonctionne avec un transfert direct d'électrons et ceci leur a permis de développer une biopile glucose /O₂ générant une puissance de $329 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ [177]. Sosna et *al.* [178] ont adsorbé la laccase sur des électrodes nanostructurées NTCs/CMF/graphite fonctionnalisées de manière non covalente avec Anthraquinone. D'une part, les NTCs permettent d'augmenter la surface spécifique de l'électrode ainsi que le transfert direct d'électron entre l'électrode et la laccase. D'autre part, les groupements polycycliques sont capables de rentrer dans la poche hydrophobe de l'enzyme, responsable du transfert d'électron avec le substrat. Cette biocathode a permis d'obtenir un courant catalytique de réduction d'O₂ de $3,5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$. De même, Lalaoui et *al.* [172] ont développé une bioélectrode basé sur la fonctionnalisation non covalente de nanotubes de carbones multi-parois fonctionnalisées par électropolymérisation oxydative du Poly-(pyrène-pyrrole). Ces biocathodes s'avèrent être très performantes vis-à-vis à la réduction de l'oxygène, avec des faibles surtensions, des densités de courant égales à $1,85 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ et une stabilité électro-enzymatique élevée (50% après un mois).

Une méthode intéressante visant à immobiliser la laccase en MET a été également rapportée par Nazaruk et *al.* [179] qui ont développé une bioélectrode composite SWCNTs/liquide cristallin à phase cubique/ABTS/laccase pour réduire l'oxygène. L'ABTS a été incorporé dans la configuration de la bioélectrode par adsorption ou en la liant par une liaison covalente. Il a été montré que la fixation covalente de l'ABTS sur les nanotubes permet de maintenir le médiateur à la surface de l'électrode et par conséquent éviter son

relarguage. Le courant catalytique obtenu est $0,4 \text{ mA.cm}^{-2}$. Cette technique a été également utilisée par Sadowska et *al.* [173] qui ont adsorbé des SWCNTs modifié avec ABTS à la surface de l'électrode, le tout couvert avec un film de Nafion contenant la laccase.

I.4 Conclusion

L'objectif de ce travail de thèse consiste donc à réaliser de manière simple des bioélectrodes nanostructurées pour développer des biocapteurs et des biocathodes enzymatiques pour biopiles. On examine dans un premier temps plusieurs approches pour la fabrication de biocathodes à base de nanotubes de carbone et de laccase afin d'opérer un transfert d'électron direct et/ou médiaté entre l'enzyme et l'électrode.

L'immobilisation et la connexion électrique d'enzymes nécessite l'ajout d'additifs jouant le rôle de liants (dérivés d'anthracène, Bis-pyrène-ABTS et d'une matrice diazonium...) dans la configuration de l'électrode suivant le mode de transfert électronique que l'on souhaite faire.

De telles électrodes peuvent servir comme matériaux de base idéals pour réaliser des biocapteurs et des biocathodes enzymatiques. Cependant, le défi reste à pouvoir mettre en forme des bioélectrodes conductrices, poreuses et qui possèdent une large surface spécifique afin qu'une telle biocathode génère un courant catalytique de réduction d'oxygène à la fois stable et important et aussi qu'un tel biocapteur présente des limites de détection basses, une bonne sensibilité et une bonne stabilité de fonctionnement.

- [1] S. Iijima. *Nature*, 1991, 354, 56-58.
- [2] S. Amelinckx; A. Lucas; P. Lambin. *Rep. Prog. Phys*, 1999, 62, 1471–1524.
- [3] A. K. Feldman; M. L. Steigerwald; X. Guo; C. Nuckolls. *Acc. Chem. Res.*, 2008, 41(12), 1731–1741.
- [4] Z. Chen; J. Appenzeller; J. Knoch; Y-M. Lin; P. Avouris, *Nano Lett.*, 2005, 5 (7), 1497–1502.
- [5] E.T. Thostenson; T-W. Chou. *J. Phys. D: Appl. Phys*, 2002, 35, 77–L80.
- [6] J. Wang. *Electroanalysis*, 2005, 17, 1, 7–14.
- [7] F. Gao; L. Viry; M. Maugey; P. Poulin; N. Mano. *Nature Communications*, doi:10.1038/ncomms1000.
- [8] N. Hamada. *Materials Science and Engineering: B*, 1993, 19, no. 1-2, 181-184.
- [9] C. T. White; D. H. Robertson; J. W. Mintmire. *Physical Review B*, 1993, 47, 5485–5488.
- [10] Z. Yao; C. L. Kane; C. Dekker. *Physical Review Letters*, 2000, 84.
- [11] B.Q. Wei; R. Vajtai; P.M. Ajayan. *Applied Physics Letters*, 2001, 79, no. 8, 1172-1174.
- [12] F. Du; J.E. Fischer; K.I. Winey. *Physical Review B*, 2005, 72, no. 12, 121404.
- [13] S. Qin; D. Qin; W.T. Ford; J. E. Herrera; D. E. Resasco; S. M. Bachilo; R. B. Weisman. *Macromolecules*, 2004, 37, 3965-3967.
- [14] L-B. Alejandro; F. Triozon; S. Latil; X. Blasé; S. Roche. *Nano Letters* 2009, 9, No. 3, 940-944.
- [15] R. Blake; Y. K. Gun'ko; J. Coleman; M. Cadek; A. Fonseca; J. B. Nagy; W.J. Blau. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 10226-10227.
- [16] D. Tasis; N. Tagmatarchis; A. Bianco; M. Prato. *Chem. Rev.* 2006, 106, 1105–1136.
- [17] J. L. Bahr; J. Yang; D.V. Kosynkin; M. J. Bronikowski; R. E. Smalley; J. M. Tour. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 6536-6542.
- [18] L. Valentini; I. Armentano; D. Puglia; J.M. Kenny. *Carbon*, 2004, 42, no. 2, 323-329.
- [19] E. Tamburri; S. Orlanducci; M.L. Terranova; F. Valentini; G. Palleschi; A. Curulli; F. Brunetti; D. Passeri; A. Alippi; M. Rossi. *Carbon*, 2005, 43, no. 6, 1213-1221.

- [20] J. Tersoff; R. S. Ruoff. *Phys. Rev. Lett*, 1994, 73, 676.
- [21] V. N. Popov; V. E. Van Doren; M. Balkanski. *Physical Review B*, 2000, 61, 3078.
- [22] G. Dereli; , C. Özdoğan. *Physical Review B*, 2003, 67, 035416.
- [23] B. I. Yakobson; M. P. Campbell; C. J. Brabec; J. Bernholc; *Computational Materials Science*, 1997, 8, 341–348.
- [24] S. Iijima; C. Brabec; A. Maiti; J. Bernholc. *The Journal of Chemical Physics*, 1996, 104, 2089–2092.
- [25] P. Kim; L. Shi; A. Majumdar; P. L. McEuen. *Physical Review Letter*, 2001, 87, 215502.
- [26] G. D. Zhan; J. D. Kuntz; H. Wang; A. K. Mukherjee. *Thermal Conductivity*, 2005, 27, 103.
- [27] R. Saito; G. Dresselhaus ; M. S. Dresselhaus. Imperial College Press, London; 1998.
- [28] P. Britto; J. Santhanam; K. S. V ; Ajayan. P. M. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1996, 41, 121-125.
- [29] K. Besteman; J. O. Lee; F. G. M. Wiertz; H. A. Heering; C. Dekker. *Nano Letters*, 2003, 3, 727.
- [30] J. Wang; M. Musameh. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 539, 209.
- [31] S. Cosnier; R. E. Ionescu; M. Holzinger. *J. Mater. Chem.*, 2008, 18, 5129.
- [32] M. Holzinger; R. Haddad; A. Maaref; S. Cosnier. *J. Nanosci. Nanotechnol*, 2009, 9, 6042-6046.
- [33] M. Holzinger; L. Bouffier; R. Villalonga; S. Cosnier. *Biosens. Bioelectron*, 2009, 24, 1128-1134.
- [34] B. Reuillard; A. Le Goff; C. Agnès; M. Holzinger; A. Zebda; C. Gondran; K. Elouarzaki; S. Cosnier. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013, DOI : 10.1039/c3cp50767j.
- [35] A. Zebda; C. Gondran; A. Le Goff; M. Holzinger; P. Cinquin; S. Cosnier. *Nature Communications*, 2011, 2, 370.
- [36] J. D. Bernal. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A*, 1924, 106, 749–773.
- [37] K. S. Novoselov; A. K. Geim; S. V. Morozov; D. Jiang; Y. Zhang; S. V. Dubonos; I. V. Grigorieva; A. A. Firsov; *Science*, 2004, 306, 666–669.
- [38] K. S. Novoselov; D. Jiang; F. Schedin; T. J. Booth; V. V. Khotkevich; S. V. Morozov; A. K. Geim; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102, 10451–10453.
- [39] P. Avouris; F. Xia. *MRS Bulletin*, 2012, 37, 12, 1225-1234.

- [40] A. K. Geim; K. S. Novoselov. *Nature Materials*, 2007, 6, 183–191.
- [41] J. C. Meyer; A. K. Geim; M. I. Katsnelson; K. S. Novoselov; T. J. Booth; S. Roth. *Nature*, 2007, 446, 60–63.
- [42] J. S. Bunch; A. M. Van der Zande; S. S. Verbridge; I. W. Frank; D. M. Tanenbaum; J. M. Parpia; H. G. Craighead; P. L. McEuen. *Science*, 2007, 315, 5811, 490–493.
- [43] N. Staley; H. Wang; C. Puls; J. Forster; T. N. Jackson; K. McCarthy; B. Clouser; Y. Liu. *Appl. Phys. Lett.*, 2007, 90, 143518.
- [44] J. Kang; H. Kim; Keun Soo Kim; S-Ki Lee; S. Bae; J-H. Ahn; Y.-J. Kim; J-B. Choi; B. H. Hong. *Nano Lett.*, 2011, 11, 5154–5158.
- [45] H. Wang; Y. Yang; Y. Liang; J. T. Robinson; Y. Li; A. Jackson; Y. Cui; H. Dai. *Nano Lett.* 2011, 11, 2644–2647.
- [46] P. G. Bruce; B. Scrosati; J. Tarascon. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, 47, 2930–2946.
- [47] J. B. Goodenough; Y. Kim. *Chem. Mater.*, 2010, 22, 587–603.
- [48] M. Armand; J. Tarascon. *Nature*, 2008, 451, 652–657.
- [49] P. Simon; Y. Gogotsi. *Nature Materials*, 2008, 7, 845–854.
- [50] M. A. Rafiee; J. Rafiee; Z.-Z. Yu; N. Koratkar. *Applied Physics Letters*, 2009, 95, 223103.
- [51] M. L. Shofner; V. N. Khabashesku; E. V. Barrera. *Chem Mater*, 2006.
- [52] J. Gao; M. E. Itkis; A. Yu; E. Bekyarova; B. Zhao; R. C. Haddon. *J Am Chem Soc*, 2005, 127, 3847–3854.
- [53] C. A. Mitchell; J. L. Bahr; S. Arepalli; J. M. Tour; R. Krishnamoorti. *Macromolecules* 2002, 35, 8825–8830.
- [54] C. Park; Z. Ounaies; K. A. Watson; R. E. Crooks; J. S. Jr; S. E. Lowther; J. W. Connell; E. J. Siochi; J. S. Harrison; T. L. St. Clair, *Chemical Physics Letters*, 2002, 364, 3–4, 303–308
- [55] K. E. Wise; C. Park; E. J. Siochi; J. S. Harrison. *Chemical Physics Letters*, 2004, 391, 4–6, 21, 207–211.
- [56] H. Wang. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2009, 14, 5, 364–371.
- [57] V. C. Moore; M. S. Strano; E. H. Haroz; R. H. Hauge; R. E. Smalley. *Nano Letters*, 2003, 3 (10), 1379–1382.
- [58] J. Chen; H. Liu; W. A. Weimer; M. D. Halls; D. H. Waldeck; G. C. Walker. *J. AM. CHEM. SOC.*, 2002, 124, 9034–9035.

- [59] K.Saint-Aubin ; P. Poulin; H. Saadaoui; M. Maugey; C. Zakri. *Langmuir*, 2009, 25 (22), 13206–13211.
- [60] R. Haddad; S. Cosnier; A. Maaref; M. Holzinger. *Analyst*, 2009, 134, 2412-2418.
- [61] M. Jönsson-Niedziolk; K. Szot; Jerzy Rogalski; M. Opallo. *Electrochemistry Communications*, 2009, 11, 5, 1042–1044.
- [62] C. Ehli; G. M. A. Rahman; N. Jux; D. Balbinot; D. M. Guldi; F. Paolucci; M. Marcaccio; D. Paolucci; M. Melle-Franco; F. Zerbetto; S. Campidelli; M. Prato. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128 (34), 11222–11231.
- [63] A. Javey; J. Guo; Q. Wang ; M. Lundstrom ; H. Dai. *Nature*, 2003, 424, 654-657.
- [64] M. W. Rowell; M. A. Topinka; M. D. McGehee; H-J.Prall; G. Dennler; N. SerdarSariciftci; L. Hu; G. Gruner. *Applied Physics Letters*, 2006, 88, 233506.
- [65] D. Zhang; K. Ryu; X. Liu; E.Polikarpov; J. Ly; M. E. Tompson; C. Zhou. *Nano Letters*, 2006, 6, No. 9, 1880-1886.
- [66] M. Holzinger; L. Bouffier; R. Villalonga; S. Cosnier. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24, 5, 1128–1134.
- [67] A. Le Goff; M. Holzinger; S. Cosnier. *Analyst*, 2011, 136, 1279–1287 | 1279.
- [78] Y. Yan; W. Zheng; L. Su; L. Mao. *Adv Mater*, 2006, 18, 2639- 2643.
- [69] I. Dumitrescu; P. R. Unwin; J. V. Macpherson. *Chem. Commun.* 2009, 6886-6901.
- [70] Y-L.Yao; K-K. Shiu. *ElectrochimicaActa*, 2007, 53, 2, 278–284.
- [71] Y. Xu; Y. Jiang; H. Cai; P-G. He; Y-Z. Fang. *AnalyticaChimicaActa*, 2004, 516, 1–2, 19–27.
- [72] C. E. Banks; R. G. Compton. *Analyst*, 2005, 130, 1232–1239.
- [73] J. Wang ;M. Li; Z. Shi; N. Li; Z. Gu, *Anal. Chem.*, 2002, 74 (9),1993–1997.
- [74] G. Liu; S. L. Riechers; M. C. Mellen; Y. Lin. *Electrochemistry Communications*, 2005, 7, 11, 1163–1169.
- [75] R. P. Deo; J. Wang. *Electrochemistry Communications*, 2004, 6, 3, 284–287.
- [76] Y. Zhang; Y. Cai ; S. Su. *Analytical Biochemistry*, 2006, 350, 2, 285–291.
- [77] U. Vohrer; I. Kolaric; M.H. Haque; S. Roth; U. Detlaff-Weglikowska. *Carbon*, 2004, 42, 5-6, 1159-1164.
- [78] W. Knapp; D. Schleussner. *Vacuum*, 2002, 69,1-3, 333-338.
- [79] M. Bechera; M. Haluskaa ; M. Hirschera; A. Quintelb ; V. Skakalovab; U. Dettlaff-Weglikovskab; X.Chenb; M. Hulmanb;Y. Choib; S. Rothb; V. Meragallib ; M. Parrinellob; R.

Ströbelc; L.Jörissenc; M.M. Kappesd; J. Finke; A. Züttelf; I. Stepanekg; P. BernierComptesRendus Physique, 2003, 4 9, 1055-1062.

[80] A. Ahmadalinezhad; W.Guosheng; A.Chen.Biosens.Bioelectron. 2011, 30, 287–293.

[81] Y.Lin; L.Fang; T.Yi; Z.Ren. Nano Lett. 2004, 4, 191–195.

[82] Y. A. Kim; H. Muramatsu; T. Hayashi; M. Endo; M. Terrones; M. S. Dresselhaus. Chem. VaporDepos, 2006, 12 327.

[83] S. M. Cooper ; H.F. Chuang; M. Cinke; B. A. Cruden; M. Meyyappan. Nano Letters, 2003. 3, 2, 189-192.

[84] P.G Whitten; G.M. Spinks; G.G. Wallace. Carbon, 2005, 43, 9,1893-1896.

[85] W. Ding; S. Pengcheng; L. Changhong; W. Wei; F. Shoushan.Nanotechnology, 2008, 19, 075609.

[86] A. G Rinzler; J. Liu; H. Dai; P. Nikolaev; C.B. Huffman; F. J. Rodriguez-Macias; P. J Boul; A. H Lu; D. Heymann; D. T Colbert. Applied Physics A: Materials Science and Processing 1998, 67, 29-37.

[87] F. Zheng; D. L. Baldwin; L. S. Fifield; N. C. Anheier; Jr; C. L. Aardahl; J. W. Grate. Analytical Chemistry, 2006. 78,7, 2442-2446.

[88] A. Guiseppi-Elie; C. Lei; R. H. Baughman.Nanotechnology, 2002, 13, 559-564.

[89] H. Papa; M. Gaillard; L. Gonzalez; J. Chatterjee. Biosensors, 2014, 4, 449-460.

[90] C. Song. Catalysis Today, 2002. 77,1-2, 17-49.

[91] B. Hammer; J. K. Norskov.Surface Science, 1995. 343, 3, 211-220.

[92] D. Wang; P. Song; C. Liu; W. Wu; S. Fan. Nanotechnology, 2008, 19, 075609.

[93] B.Vigolo; A. Penicaud; C. Coulon; C. Sauder ; R. Pailler; C. Journet; P. Bernier; P Poulin. Sciences, 2000, 290, 1331-1134.

[94] Thèse de Anne-Sophie Michardiere, Microélectrode de nanotubes de carbone pour conversion d'énergie, 2013, Université de bordeaux.

[95] H.W. Zhu; C.L. Xu; D.H. Wu; B.Q. Wei; R. Vajtai; P. M. Ajayan. Science, 2002,296, 884-886.

[96] P. Pötschke; A. R. Bhattacharyya; A. Janke; H. Goering.Composite Interfaces, 2003. 10, 4-5, 389-404.

- [97] Z.M. Huang; Y.Z. Zhang; M. Kotaki; S. Ramakrishna. *Compos SciTechnol* 2003;63:2223-53.
- [98] A. Greiner; J.H. Wendorff. *Adv. PolumSci*, 2008, 219, 107-71.
- [99] N. Bhardwaj; S. C. Kundu. *Biotechnology Advances*, 2010, 28, 3, 325–347.
- [100] A. Formhals. *US Pat*, 1934, no. 1975504.
- [101] Z-M. Huang; Y-Z. Zhang; M. Kotaki; S. Ramakrishna. *Composites Science and Technology*, 2003, 63, 2223–2253.
- [102] Z. Su; J. Ding; G. Wei. *RSC Adv.*, 2014, 4, 52598-52610.
- [103] D. H. Reneker; A.L. Yarin; H. Fong; S. Koombhongse. *Journal of Applied Physics*, 2000, 87, 9, 4531- 4547.
- [104] J.A. Hubbell. *Biotechnology*, 1995, 13, 565–576.
- [105] H.L. Schreuder-Gibson; P. Gibson; K. Senecal; M. Sennett; J. Walker, W. Yeomans; et al. *J Adv Mater*, 2002, 34, 44–55.
- [106] S. Ramakrishna; K. Fujihara; W.E. Teo; T. Yong; Z. Ma; R. Ramaseshan. *Mater Today*, 2006, 9, 40–50.
- [107] H.F. Jia; G.Y. Zhu; B. Vugrinovich; W. Kataphinan; D.H. Reneker; P. Wang. *BiotechnolProg*, 2002, 18, 1027–1032.
- [108] S.F. Li; J.P. Chen; W.T. Wu. *J MolCatal, B Enzym*, 2007, 47, 117–124.
- [109] X. Wang; C. Drew; S.H. Lee; K.J. Senecal; J. Kumar; L.A. Samuelson. *Nano Lett*, 2002, 2, 1273–1275.
- [110] J. Zeng; X. Xu; X. Chen; Q. Liang; X. Bian; X. Yang; et al. *J Control Release*, 2003, 92, 227–231.
- [111] J.J. Stankus; J. Guan; K. Fujimoto; W.R. Wagner. *Biomaterials*, 2006, 27, 5, 735-744.
- [112] S. Zarkoob; R.K. Eby; D.H. Reneker; S.D. Hudson; D. Ertley; W.W. Adams. *Polymer*, 2004, 45, 11, 3973-3977.
- [113] A. Alessandrino; B. Marelli; C. Arosio; S. Fare; M.C. Tanzi; G. Freddi. *Engineering in Life Sciences*, 2008, 8, 3, 219–225.
- [114] D. Almecija; D. Blond; J. E. Saderd; J. N. Coleman; J.J. Bolanda. *Carbon*, 2009, 47, 9, 2253-2258.
- [115] S. Jagannathan; H.G. Chae; R. Jain; S. Kumar. *Journal of Power Sources*, 2008, 185, 676-684.
- [116] Y-W. Ju; G-R. Choi; H-R Jung; W-J Lee. *ElectrochimicaActa*, 2008, 53, 5796-5803.

- [117] K.J. Senecal; D.P. Ziegler; J.He; R. Mosurkal; H. Schreuder-Gibson; L.A. Samuelson. *Mater Res SocSympProc*, 2002,708, 285–289.
- [118] I.D. Norris; M.M. Shaker; F.K. Ko; A.G. Macdiarmid. *Synthetic Metals*, 2000,114, 109–114.
- [119] J. Huang; Y. Liu; T. You. *Analytical Methods*, 2010, 2, 202-211.
- [120] A. B. Engel; A. Cherifi; S.Tingry; D. Cornu; A. Peigney; L. Ch. *Nanotechnology*, 2013,24, 245402.
- [121] Z. Dong; S. J. Kennedy; Y. Wu. *Journal of Power Sources*, 2011,196, 4886-4904.
- [122] P. Vadgama; P.W. Crump. *Analyst*, 1992, 117.
- [123] A. Le Goff; M. Holzinger; S. Cosnier. *Analyst*, 2011, 136, 1279.
- [124] D. Grieshaber; R. MacKenzie; J. Vörös; E. Reimhult. *Sensors*, 2008,8, 1400–1458.
- [125] W. P. Atkins. *Physical Chemistry*.3rd Ed Oxford University, Press New York, 1982.
- [126] H. Lineweaver; D. Burk. *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, 56, 3, 658–666.
- [127] S. Cosnier. *Electronanalysis* 1991, 9, No. 12.
- [128] V. Dragancea. *Optimisation du biocapteur de type sérigraphié à base de tyrosinase*.
- [129] C.Eicken; B. Krebs; J. C.Sacchetti. *Current Opinion in Structural Biology* 1999, 9, 677–683.
- [130] S. Cosnier; C. Innocent. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1993, 31, 2, 147-160.
- [131] P.Onnerfjord; J.Emnus; G.Marko-Varga; L. Gorton, Ortega F; E.Dominguez. *Biosensors & Bioelectronics*, 1995,10, 607-619.
- [132] S. Cosnier; R. E. Ionescu; M. Holzinger. *J. Mater. Chem*, 2008, 18, 5129-5133.
- [133] S. KorkutOzoner; M. Yalvac; E.Erhan. *Current Applied Physics*, 2010,10, 323–328.
- [134] M. Holzinger; A. Le Goff; S. Cosnier. *ElectrochimicaActa*, 2012, 82, 179–190.
- [135] S. D Minter; B. Yann Liaw; M. J Cooney. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18, 3, 228–234.
- [136] M. Falk; C. W. Narváez Villarrubia; S. Babanova; P. Atanassov; and S. Shleev; *ChemPhysChem*, 2013, 14, 2045–2058.
- [137] E. I. Solomon; U. M. Sundaram; T. E. Machonkin. *Chem.Rev*, 1996, 96, 2563–2605.
- [138] A.T. Yahiro; S.M. Lee; D.O. Kimble. *BiochimicaetBiophysicaActa (BBA) - Specialized Section on Biophysical Subjects*, 1964, 88, 2, 375–383.

- [139] Ken Yeang. *Architectural Design*, 2008, 78, 2, 134–135.
- [140] N. Mano; F. Mao; A. Heller. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 6588–6594.
- [141] P. Cinquin; C. Gondran; F. Giroud; S. Mazabrard; A. Pellissier; F. Boucher, J.-P. Alcaraz; K. Gorgy; F. Lenouvel; S. Mathé; P. Porcu; S. Cosnier. *PLoS ONE*, 5, 5, e10476.
- [142] E. I. Solomon; P. Chen, M. Metz; S.-K. Lee; A. E. Palmer. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 4570–4590.
- [143] T. Bertrand; C. Jolival; P. Briozzo; E. Caminade; N. Joly; C. Madzak; C. Mougín, *Biochemistry*, 2002, 41, 23, 7325–7333.
- [144] S. Shleev; A. Jarosz-Wilkolazka; A. Khalunina; O. Morozova; A. Yaropolov; T. Ruzgas; L. Gorton. *Bioelectrochemistry*, 2005, 67, 115–124.
- [145] A. Le Goff; M. Holzinger; S. Cosnier. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2015, 72, 941–952.
- [146] Y. Tan; W. Deng; B. Ge; Q. Xie; J. Huang; S. Yao. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24, 7, 2225–223.
- [147] L. Brunel; J. Denele; K. Servat; K. B. Kokoh; C. Jolival; C. Innocent; M. Cretin; M. Rolland; S. Tingry. *Electrochem. Commun.*, 2007, 9, 331.
- [148] T. Chen; S. C. Barton; G. Binyamin; Z. Gao; Y. Zhang; H. H. Kim; A. Heller. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 8630.
- [149] S. C. Barton; J. Gallaway; P. Atanassov. *Chem. Rev.* 2004, 104, 4867–4886.
- [150] A. Heller. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2004, 6, 209–216.
- [151] K. Piontek; M. Antorini; T. Choinowski. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 37663–37669.
- [152] Hao Yu, E., and Scott, K. (2010) Enzymatic Biofuel Cells—Fabrication of Enzyme Electrodes, *Energies* 3, 23–42.
- [153] A. Heller. *J. Phys. Chem.*, 1992, 96, 3579–3587.
- [154] R. A. Bullen; T. C. Arnot; J. B. Lakeman; F. C. Walsh, *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21, 2015–2045.
- [155] L. Gorton; A. Lindgren; T. Larsson; F. D. Munteanu; T. Ruzgas; I. Gazaryan. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 400, 1–3, 91–108.
- [156] A. Ciaccafava; P. Infossi; M. Ilbert; M. Guiral; S. Lecomte; M. T. Giudici-Orticoni; E. Lojou. *Angew. Chem.*, 2012, 124, 977–980.
- [157] S. Shleev, M. Pita, A. I. Yaropolov, T. Ruzgas, L. Gorton, *Electroanalysis*, 2006, 18, 1901–1908.

- [158] M. Bourourou; K. Elouarzaki; N. Lalaoui; C. Agnès; A. Le Goff; M. Holzinger; A. Maaref; S. Cosnier. *Chem. Eur. J.*, 2013, 19, 9371–9375.
- [159] I.V. Berezin; V.A. Bogdanovskaya; S.D. Varfolomeev; M.R. Tarasevich; A.I. Yaropolov. *Bioelectrocatalysis, Dokl. AN SSSR*, 240 (1978), pp. 615–617.
- [160] C.W. Lee; H.B. Gray; F.C. Anson; B.G. Malmström. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1984, 172, 1–2, 289–300.
- [161] K. Piontek; M. Antorini; T. Choinowski. *The Journal Of Biological Chemistry*, 2002, 277, 37663–37669.
- [162] C. F. Blanford; R. S. Heath; F. A. Armstrong. *Chem. Commun.* 2007, 0, 1710–1712.
- [163] C. F. Blanford; C. E. Foster; R. S. Heath; F. A. Armstrong. *Faraday Discuss*, 2009, 140, 319–335.
- [164] J. Martinez-Ortiz; R. Flores; R. Vazquez-Duhalt. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26, 5, 2626–2631.
- [165] K. Karnicka; K. Miecznikowski; B. Kowalewska; M. Skunik; M. Opallo; J. Rogalski; W. Schuhmann; P.J. Kulesza, *Anal. Chem*, 2008, 80, 7643–7648.
- [166] H. P. Call; I. Mücke. *J. Biotechnol.* 1997, 53, 163.
- [167] J. Fei; H.-K. Song; G. Tayhas; R. Palmore. *Chem. Mater*, 2007, 19, 1565–1570.
- [168] R. Bourbonnais; D. Leech; M.G. Paice. *Biochem. Acta* 1379, 1998, 381.
- [169] W. Nogala; E. Rozniecka; I. Zawisza; J. Rogalski; M. Opallo. *Electrochemistry Communications*, 2006, 8, 1850–1854.
- [170] M.L. Fultz; R.A. Durst, *Anal. Chim. Acta*, 1982, 140, 1–18.
- [171] M. Bourourou; K. Elouarzaki; M. Holzinger; C. Agnès; A. Le Goff; N. Reverdy-Bruas; D. Chaussy; M. Party; A. Maaref; S. Cosnier. *Chem. Sci.*, 2014, 5, 2885–2888.
- [172] N. Lalaoui; K. Elouarzaki; A. Le Goff; M. Holzinger; S. Cosnier. *Chem. Commun.*, 2013, 49, 9281.
- [173] K. Sadowska; K. Stolarczyk; J.F. Biernat; K.P. Roberts; J. Rogalski; R. Bilewicz. *Bioelectrochemistry*, 2010, 80, 1, 73–80.
- [174] E. Nazaruk; M. Karaskiewicz; K. Zelechowska; J. F. Biernat; J. Rogalski; R. Bilewicz. *Electrochemistry Communications*, 2012, 14, 1, 67–70.
- [175] L. Hussein; S. Rubenwolf; F. von Stetten; G. Urban; R. Zengerle; M. Krueger; S. Kerzenmacher. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26, 4133–4138.
- [176] Y. Liu; L. Huang; S. Dong. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 23, 1, 35–41.

[177] L. Deng; L. Shang; Y. Wang; T. Wang; H. Chen; S. Dong. *Electrochemistry Communications*, 2008, 10, 7, 1012-1015.

[178] M. Sosna; L. Stoica; E. Wright; J. D. Kilburn; W. Schuhmann; P. N. Bartlett. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, 14, 11882-11885.

[179] E. Nazaruk; K. Sadowski; K. Madrak; J. F. Biernat; J. Rogalski; R. Bilewicz. *Electroanalysis*, 2009, 21, 3-5, 507-511

II. Conception de nouvelles bioélectrodes nanostructurées à base de laccase par transfert d'électrons direct

II Conception de nouvelles bioélectrodes nanostructurées à base de laccase par transfert d'électrons direct	54
II.1 Introduction	55
II.2 Cathode MWCNTs / laccase en transfert direct	56
II.3 Cathode MWCNTs/ Pyr-AQ(1)/laccase et MWCNTs/Pyr-AQ(2)/laccase en transfert direct	58
II.3.1 Fonctionnalisation non covalente des nanotubes de carbone à l'aide de pyrène	58
II.3.2 Caractérisation électrochimique	59
II.3.2.1 Caractérisation des monomères Pyr-AQ(1) et Pyr-AQ(2)	59
II.3.2.2 Immobilisation des monomères Pyr-AQ(1) et Pyr-AQ(2) sur matrice de MWCNTs	61
II.3.3 Immobilisation de la laccase à la surface fonctionnalisée	63
II.4 Stabilité de fonctionnement des biocathodes	65
II.5 Conclusion	66

II.1 Introduction

De nombreuses électrodes utilisant des nanotubes de carbone ont permis de développer des biopiles enzymatiques glucose/oxygène à haute performance. Néanmoins, l'étude de ces biopiles indique que leurs performances sont souvent limitées par la réduction de l'oxygène à la biocathode [1]. Les limitations d'une bioélectrode, sont une faible concentration de surface d'enzymes, une connexion électrique difficile entre l'électrode et le site actif de la protéine et une stabilité relativement faible [2]. C'est pourquoi, de nombreux travaux sont mis en œuvre afin d'améliorer la densité de courant. Dans ce contexte, nous proposons de développer des biocathodes sans médiateurs à base de NTCs et de laccase afin d'opérer un transfert d'électron direct entre l'enzyme et l'électrode permettrait d'obtenir de manière simple des matériaux potentiellement plus efficaces.

L'optimisation de la connexion entre le site actif rédox de l'enzyme et l'électrode sera opérée par de nouvelles architectures de biopiles à base de connexion tridimensionnelle de la laccase à des nanotubes au sein d'un matériau composite. Le greffage d'enzymes à des nanomatériaux conducteurs dans un polymère ou un liant biocompatible agissant comme médiateur, permettra d'augmenter la vitesse et l'efficacité du transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode et d'améliorer la stabilité du matériau, tout en conservant une architecture tridimensionnelle nanostructurée extrêmement poreuse [3]. L'alliance de la porosité et de la stabilité est un élément majeur pour la diffusion des substrats vers les centres actifs des enzymes immobilisées. Plusieurs voies sont envisagées pour la réalisation de ces bioélectrodes hybrides:

- ✧ un polymère combiné à des nanotubes de carbone, pour assurer la connexion électrique des enzymes et une forte conductivité [4, 5].
- ✧ un assemblage supramoléculaire en synthétisant des molécules comportant des groupements pyrènes capable de former une interaction forte de type « π -stacking» avec les nanotubes de carbone, dans le but d'immobiliser la laccase [1, 6, 7].

L'étude de ces différentes voies a pour but d'augmenter d'une part la densité de courant générée par ces biocathodes et d'autre part, leur stabilité en passant de l'échelle de quelques jours à plusieurs semaines de fonctionnement.

II.2 Cathode MWCNTs/laccase en transfert direct

Les performances de la biocathode sont liées de façon étroite au mode d'immobilisation de l'enzyme [8] et à la nature de l'électrode utilisée pour la réalisation de bioélectrodes enzymatiques de bonne qualité. Les électrodes utilisées sont des tiges de carbone vitreux (glassy carbon en Anglais, GC) commercialisées ($S = 0,071 \text{ cm}^2$). L'électrode est polie avec de la pâte diamantée (Presi (France)) pendant deux minutes. Elle est ensuite rincée avec de l'eau distillée et de l'éthanol puis séchée à l'air. Les électrodes de MWCNTs ont été élaborées par une méthode de dépôt d'une solution de MWCNTs dispersés dans du N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) à 5 mg.mL^{-1} . Le dépôt de $20 \mu\text{L}$ de la dispersion puis le séchage sous vide permet d'obtenir des films de NTCs stables et reproductibles à la surface de l'électrode. L'électrode modifiée a ensuite été lavée deux fois dans 10 mL de tampon phosphate (0.1 mol.L^{-1} , $\text{pH}=5$) pour éliminer tous les composants non liés à l'électrode. Ensuite, $20 \mu\text{L}$ d'une solution de laccase (5 mg.mL^{-1} , dans une solution de tampon phosphate 0.1 mol.L^{-1} , $\text{pH}=5$) ont été déposés sur l'électrode. L'électrode ainsi obtenue est maintenue pendant une nuit pour favoriser l'adsorption des enzymes orientées à la surface de l'électrode. L'électrode (GC/MWCNTs/laccase) a été ensuite lavée dans 10 mL de tampon phosphate (0.1 mol.L^{-1} , $\text{pH}=5$) pour éliminer la laccase non adsorbée.

Les performances de la biocathode ont dans un premier temps été étudiées par voltampérométrie cyclique (Cyclic Voltammetry en anglais, CV) pour suivre l'activité catalytique de la laccase vis-à-vis de la réduction de O_2 à $\text{pH } 5$. **figure II.1**. Le montage électrochimique est constitué d'un système classique à trois électrodes, une électrode de travail de GC couverte par un dépôt de MWCNTs/laccase, une contre électrode en platine et d'une électrode de référence au calomel saturé. L'ensemble est piloté par un potentiostat (Autolab PGSTAT100).

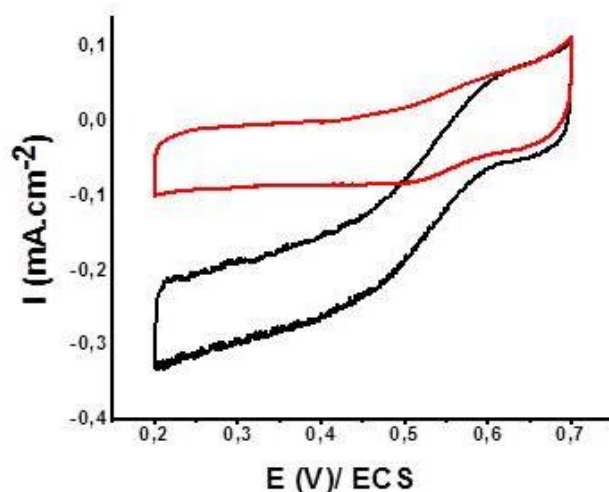


Figure II.1. CV de la biocathode MWCNTs/laccase sous atmosphère d'argon (courbe rouge) et sous bullage d'oxygène (cours noire) dans une solution de tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH } 5$), $v = 0,01 \text{ V.s}^{-1}$.

Les CVs sont réalisées à une vitesse de balayage de 0.01 V.s^{-1} pour atténuer la contribution de la composante capacitive du composite MWCNTs/laccase. Le potentiel est balayé entre 0,1 et 0,7 V vs. ECS. Sur le CV effectué sous argon (courbe rouge), aucune activité électrocatalytique n'a été observée. En revanche, en présence de dioxygène (courbe noire), une vague de réduction catalytique apparaît à 0,61 V, potentiel très proche des valeurs thermodynamiques pour le site Cu mononucléaire T1 de la laccase *Trametes versicolor* observées dans la littérature [9], confirmant un transfert électronique direct entre la laccase et l'électrode nanostructurée.

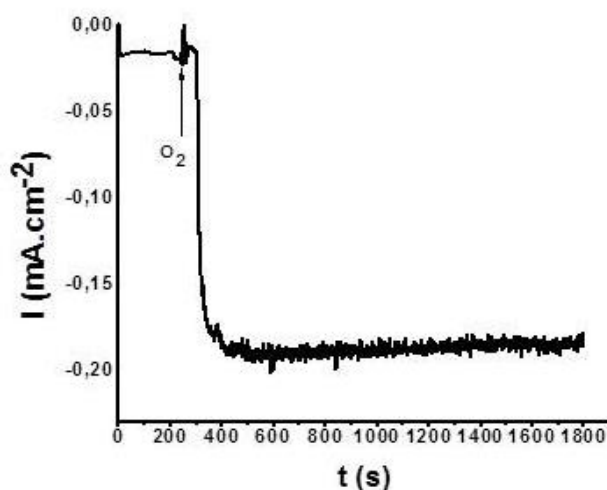


Figure II.2. Mesure de chronoampérométrie à 0,3 V vs. ECS de la biocathode GC/MWCNTs/laccase dans une solution de tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH } 5$), avant et après ajout d'un bullage d' O_2

En parallèle, des mesures de chronoampérométrie ont également été effectuées dans le même milieu (tampon phosphate 0.1 mol.L⁻¹) à un potentiel imposé de 0,3 V. La solution est d'abord désaérée pendant 300 s par bullage d'azote, puis de l'oxygène est introduit par bullage. Un courant catalytique de réduction d'O₂ par la laccase de 0,19 mA.cm⁻² a été observé **figure II.2**.

II.3 Cathodes MWCNTs/Pyr-AQ(1)/ laccase et MWCNTs/Pyr-AQ(2)/ laccase en transfert direct

II.3.1 Fonctionnalisation non covalente des nanotubes de carbone à l'aide de pyrène

Plusieurs méthodes ont été proposées pour fonctionnaliser les nanotubes de carbone. Parmi celles-ci, l'équipe d'Armstrong [10] a modifié la surface de l'électrode à l'aide des groupements anthracène, un composé aromatique hydrophobe. Ils se sont aperçu que ce dérivé permettait d'orienter le site T1 de la laccase sur la surface de l'électrode et de connecter très efficacement la métalloenzyme. Les courants obtenus par cette méthode d'orientation étaient de l'ordre de 0,65 mA.cm⁻². Minter et *al.* [11] ont fonctionnalisé de manière covalente les MWCNTs également avec des groupements anthracène permettant d'atteindre un courant catalytique de 140 µA.cm⁻² pour un transfert d'électrons direct. De même, Bilewicz et *al.* [12] ont obtenu un courant cathodique de 246 µA.cm⁻² en modifiant des NTCs monoparois (SWCNTs) avec des groupements anthraquinone portant des fonctions d'aryles diazonium. Schuhmann et Bartlett ont réussi à montrer que, grâce la modification de la surface avec un dérivé anthraquinone, il était possible de connecter la totalité des enzymes immobilisées sur la surface et de n'être alors limité que par la diffusion de O₂ permettant d'atteindre des performances plus élevées (jusqu'à 3,5 mA.cm⁻²) [13]. Depuis, un bon nombre de travaux ont décrit la modification de surface avec plusieurs dérivés polycycliques hydrophobes (pyrène, naphthalène, porphyrine) capables de rentrer dans la poche hydrophobe du centre T1 de la laccase permettant l'immobilisation de la laccase dans des conditions favorables au DET et à la réduction de l'oxygène.

En s'inspirant de tous ces travaux et en se basant sur l'efficacité de la fonctionnalisation non covalente effectuée grâce à des interactions entre les NTCs et les groupements pyrènes comme on a pu le voir dans le chapitre I sur le **schéma I.2**, nous avons synthétisé une molécule de pyrène-anthraquinone (Pyr-AQ(1)) et une molécule de pyrène-bis-anthraquinone (Pyr-AQ(2)), un produit secondaire issu de la synthèse du pyrène anthraquinone (pyr-AQ(1)). Ce type de fonctionnalisation permet de préserver la structure des carbones des nanotubes et

d'impliquer de forts recouvrements d'orbitales entre pyrènes et NTCs. La synthèse du Pyrène/AQ(1) et du Pyrène/AQ(2) **figure II.3** s'est faite à partir du 1-Pyrèneméthylamine et de 2-Bromométhylantraquinone. La synthèse est détaillée dans la partie expérimentale. Le pyrène-mono-anthraquinone est obtenue sous forme d'une poudre marron clair avec un rendement de 73%, alors que le pyrène-bis-anthraquinone est obtenu sous forme d'une poudre jaune avec un rendement de 75%. Les deux molécules ont été caractérisées par RMN 1H, par spectroscopie de masse et par voie électrochimique.

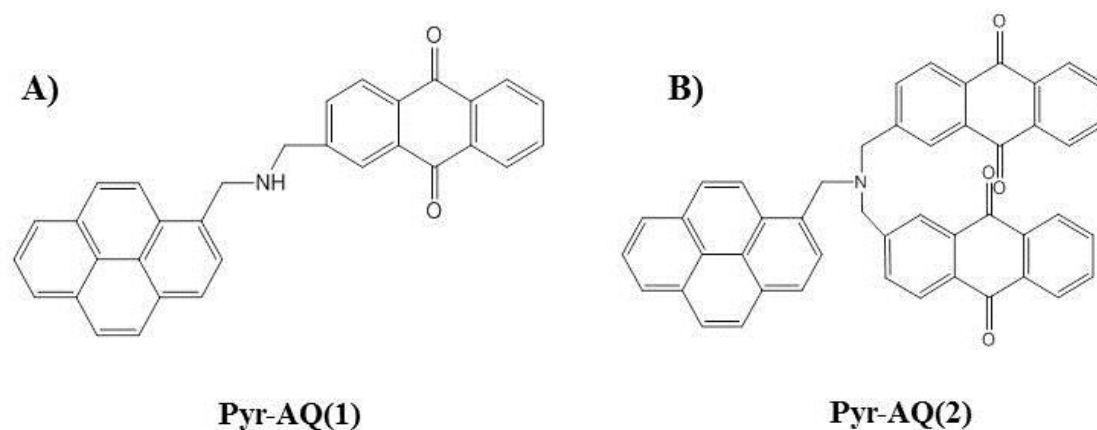


Figure II.3. Schéma de **A)** Pyrène-mono-anthraquinone et **B)** Pyrène-bis-anthraquinone.

II.3.2 Caractérisation électrochimique

II.3.2.1 Caractérisation des monomères Pyr-AQ(1) et Pyr-AQ(2)

Parmi les espèces organiques, les quinones représentent une classe de molécules rédox particulièrement utilisée dans les processus de transfert électronique enzyme-électrode. Leur processus d'oxydo-réduction met en jeu 2H^+ et 2e^- :



En particulier, les Pyr-AQ (1) et Pyr-AQ (2), présentent des structures tout à fait intéressantes, ayant la capacité de s'adsorber sur la surface des matériaux carbonés π -conjugué via des interactions non-covalentes de type « π -stacking ». Toutefois, ces deux monomères ne sont pas solubles dans le même solvant. Le monomère Pyr-AQ (1) a été caractérisé en solution dans le DMF 0,1 M tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF₆) sur électrode de GC. Le CV présente un pic de réduction irréversible à $E_p^{\text{red}} = -0.95\text{ V vs. Ag/Ag}^+$ qui correspond à la réduction de l'antraquinone en hydroquinone à 2e^- . Les

derniers systèmes irréversibles observés à $E_p^{ox} = 0,66 \text{ V}$ et $E_p^{ox} = 1,05 \text{ V}$ correspondent à l'oxydation irréversible du pyrène.

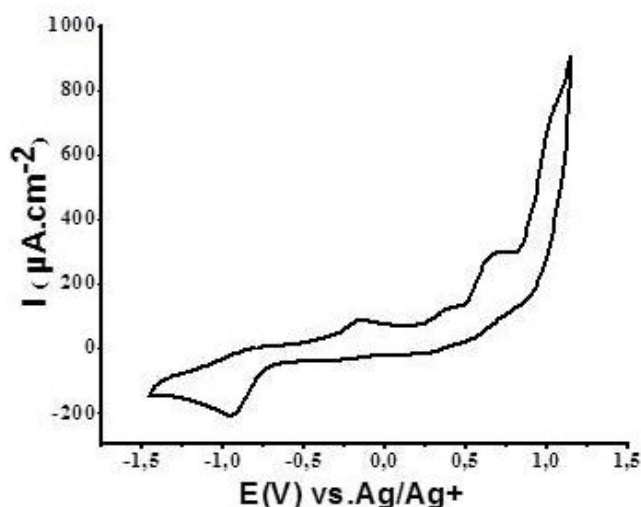


Figure II.4. CV du Pyr-AQ(1) ($10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) sur électrode de GC ($S=0,071 \text{ cm}^2$) dans DMF+TBAPF₆ ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

Les propriétés rédox du Pyr-AQ(2) a été ont été observées aussi par CV dans MeCN en présence de tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF₆) ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) sur électrode de GC. Le monomère présente un système de pics réversibles à $E_{1/2} = -1,22 \text{ V}$ vs Ag/Ag+ qui est attribué à une première réduction de l'antraquinone à 1 e- et un pic irréversible concomitant à $E_p^{red} = -1,86 \text{ V}$ qui est attribué à la formation du dianion. Les deux pics irréversibles observés à $E_p^{ox} = 1,05 \text{ V}$ et $E_p^{ox} = 1,24 \text{ V}$ correspondent à l'oxydation irréversible du pyrène.

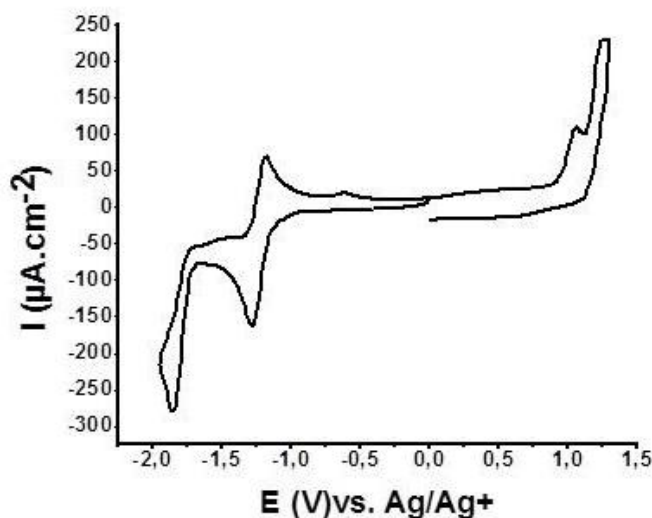


Figure II.5. CV du Pyr-AQ(2) ($10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) sur électrode de GC ($S=0,071 \text{ cm}^2$) dans MeCN +TBAPF₆ ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

II.3.2.2 Immobilisation des monomères Pyr-AQ(1) et Pyr-AQ(2) sur matrice de MWCNTs

Les interactions de « π -stacking » entre les groupements pyrènes et les parois des MWCNTs permettent la physisorption des molécules Pyr-AQ(1) et Pyr-AQ(2) à la surface de l'électrode comme le montre le schéma II.1.

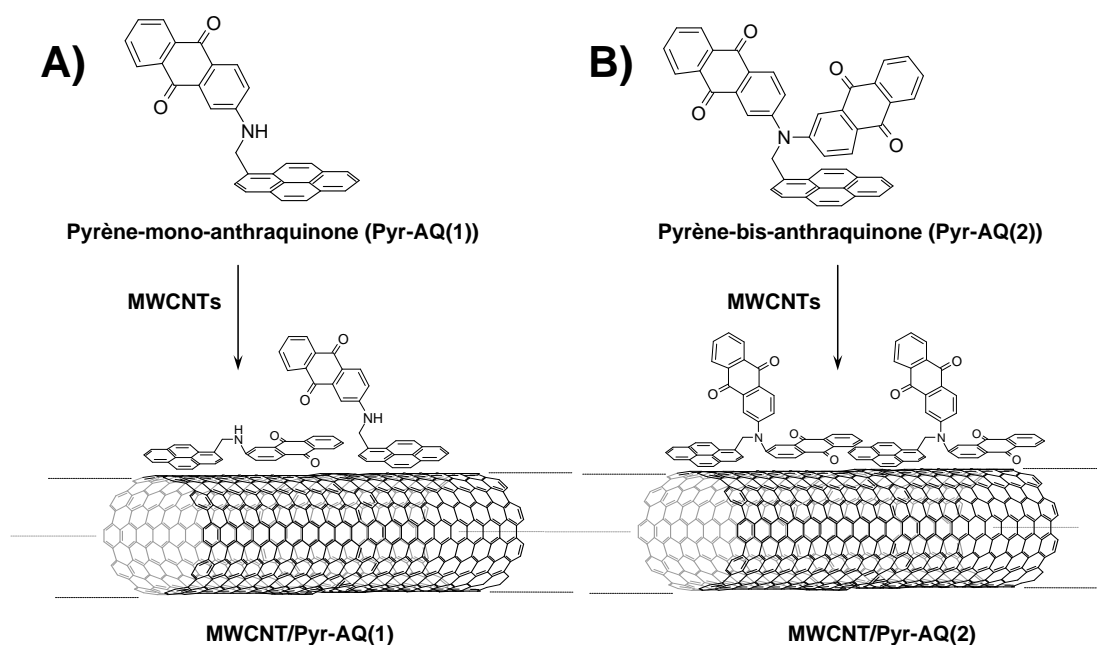


Schéma II.1. Schéma du pyrène-mono-anthraquinone **A)** et pyrène-bis-anthraquinone **B)** et de leur greffage sur les nanotubes de carbone multifeuillets par interactions- π .

A la suite de la formation du film de MWCNTs sur l'électrode, l'étape suivante consiste à fonctionnaliser le dépôt par simple incubation pendant 1h dans une solution de pyr-AQ(1) (1 mg.ml^{-1}) dans le DMF et pyr-AQ(2) (1 mg.ml^{-1}) dans CH_2Cl_2 , respectivement. Après séchage et rinçage, les électrodes fonctionnalisées ont été caractérisées par CV dans une solution de tampon phosphate (0.1 mol.L^{-1}).

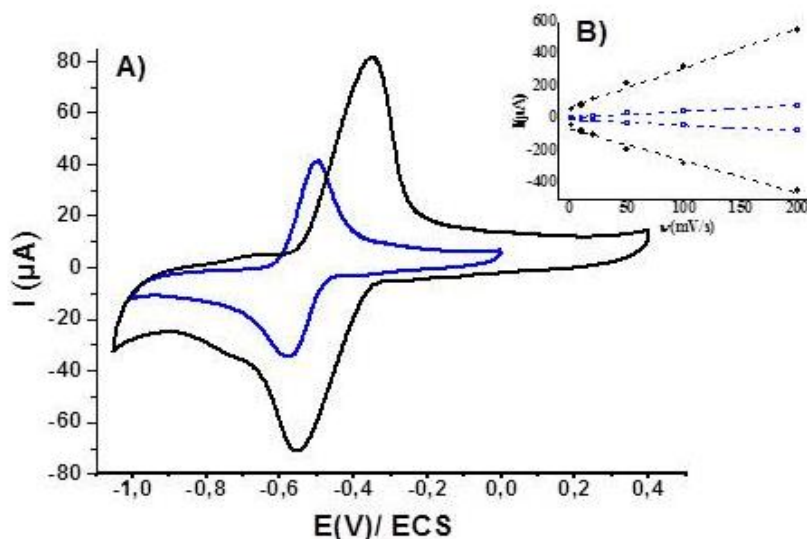


Figure II.7. **A)** CVs d'une électrode de GC ($S=0,071 \text{ cm}^2$) modifiée avec MWCNTs/pyr-AQ(1) (courbe bleu) et MWCNTs/pyr-AQ(2) (courbe noire) dans un tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5), $v = 0,02 \text{ V.s}^{-1}$. **B)** Variation de l'intensité du courant de pics en fonction de la vitesse de balayage de MWCNTs/pyr-AQ(1) (pointillés bleu) et MWCNTs/pyr-AQ(2) (pointillés noir)

Dans le cas de l'électrode modifiée avec MWCNTs/pyr-AQ(1), on observe un système de pics réversibles à $2e^-$ et $2H^+$ à $E_{1/2} = -0,54 \text{ V vs. ECS}$ qui correspond aux signaux caractéristiques de l'espèce anthraquinone immobilisée sur surface [13]. Les pics d'oxydation et de réduction restent stables après dix scans, témoignant donc de la force des interactions de « π -stacking ». Dans la même **figure II.7**, le CV d'une électrode modifiée avec MWCNTs/Pyr-AQ(2) montre un système de pics réversible à $E_{1/2} = -0,45 \text{ V vs. ECS}$. Ce signal rédox correspond à la réduction à $2e^-$ et $2H^+$ des deux groupements anthraquinone. Comme attendu, le signal rédox correspondant aux Pyr-AQ(2) est plus important de celui de pyr-AQ(1), de plus, la valeur de ΔE_p est relativement plus grande que dans le cas de pyr-AQ(1). Cela peut s'expliquer par le fait que la molécule de Pyrène-bis-anthraquinone est constituée de trois groupements polycycliques ce qui peut créer une sorte d'encombrement stérique et ralentir la diffusion à travers l'électrode d'où ΔE_p plus large. D'autre part, le système contient plus d'entités AQ capables d'interagir avec le système $-\pi$ des nanotubes ce qui explique l'augmentation du signal électrique. La **figure II.7.B** présente les courants de pics des deux complexes qui varient linéairement en fonction de la vitesse de balayage ce qui confirme bien l'immobilisation des deux espèces pyr-AQ(1) et pyr-AQ(2) sur les nanotubes.

Afin de déterminer la quantité de monomères pyr-AQ immobilisé pour chaque type d'électrode, nous avons calculé la concentration de surface Γ qui est estimée par intégration de

la charge du pic anodique ou cathodique enregistrée sous le signal rédox entre -1 et 0,4 V pour MWCNTs/Pyr-AQ(2) et entre -1 et 0 V pour MWCNTs/Pyr-AQ(1) considérant que 2 électrons sont consommés par molécule d'anthraquinone [13]. Etant donné que la concentration surfacique Γ d'une monocouche d'AQ est estimée à $0,5 \text{ nmol.cm}^2$ [13], on peut déduire que la concentration de surface égale à $(45 \pm 10) \text{ nmol.cm}^2$ pour Pyr-AQ(1) et $(123 \pm 15) \text{ nmol.cm}^2$ pour Pyr-AQ(2) correspond à 90 et 246, respectivement de monocouches d'AQ. Cela met en avant l'effet bénéfique de la couche de NTCs en termes de structure 3D et de grande surface spécifique et confirme aussi l'efficacité de la fonctionnalisation non-covalente utilisant des dérivés de pyrène.

II.3.3 Immobilisation de la laccase sur la surface fonctionnalisée

Après avoir été modifiées par $20 \mu\text{l}$ de MWCNTs (5 mg.mL^{-1}), suivie d'une fonctionnalisation non covalente par les dérivés pyrènes porteurs de fonctions d'encrages mono-anthraquinone et bis-anthraquinone décrits précédemment, les électrodes ont été incubées pendant la nuit dans une solution de tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5) contenant 5 mg.mL^{-1} de laccase. Les CVs ont été réalisés après rinçage abondant des bioélectrodes avec du tampon phosphate (0.1 M , pH 5) **figure II.8**.

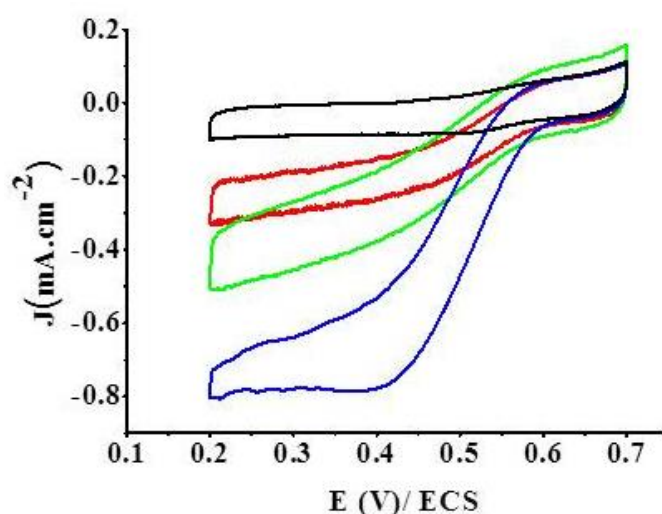


Figure II.8. CVs des bioélectrodes de MWCNTs/laccase sous argon (courbe noire), MWCNTs/laccase (courbe rouge), MWCNTs/Pyr-AQ(1)/laccase (courbe verte) et MWCNTs/Pyr-AQ(2)/laccase (courbe bleue) sous bullage d'oxygène, $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ dans une solution de Tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5).

Une électrode témoin MWCNTs/laccase n'ayant pas été fonctionnalisée par un des dérivés pyrènes, a été comparée aux électrodes porteuses des fonctions pyrènes MWCNTs/Pyr-AQ(1)/lac et MWCNTs/Pyr-AQ(2)/lac. Les CVs présentés sur la **figure II.8**

montrent, en présence de dioxygène, l'apparition d'une vague de réduction électrocatalytique de O_2 débutant à 0,61 V en présence d' O_2 , potentiel redox proche de celui du site actif de la laccase confirmant un transfert d'électron direct entre l'enzyme et l'électrode. L'électrode fonctionnalisée par le monomère pyrène-AQ(1) mène à l'obtention des courants catalytiques deux fois plus élevé que le courant délivré par l'électrode témoin. Ces électrodes montrent des performances similaires à celles décrites dans la littérature [11, 13]. Par comparaison, l'électrode fonctionnalisée avec le composé pyrène-AQ(2), permet d'obtenir $1,0 \pm 0,2$ $mA \cdot cm^{-2}$, soit un courant 4 fois plus important que celui obtenu avec les électrodes MWCNTs/laccase, montrant ainsi les propriétés plus intéressantes d'électrocatalyse de ces électrodes. Les performances des biocathodes ont été également étudiées par chronoampérométrie pour suivre l'activité catalytique de la laccase vis-à-vis de la réduction d' O_2 **figure II.9**. Le courant de réduction d' O_2 a été enregistré en fonction du temps à potentiel fixe (+ 0,3 V vs. ECS) en milieu tampon phosphate pH 5.

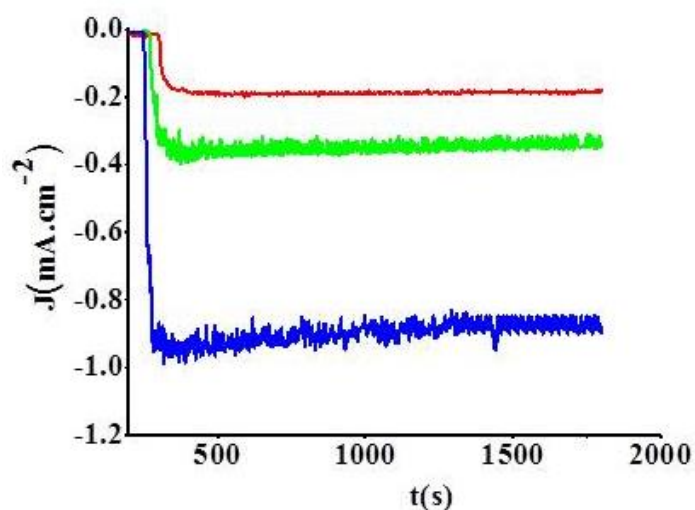


Figure II.9. Mesure de chronoampérométrie à 0,3 V vs. ECS de biocathodes MWCNTs/laccase (courbe rouge), MWCNTs/Pyr-AQ(1)/laccase (courbe verte) et MWCNTs/Pyr-AQ(2)/laccase (courbe bleue) dans une solution de tampon phosphate (0,1 $mol \cdot L^{-1}$, pH 5) avant et après ajout d'un bullage d' O_2 .

Les densités de courant catalytiques obtenues sont de l'ordre du $0,4$ $mA \cdot cm^{-2}$ avec la configuration utilisant Pyr-AQ(1). La raison la plus probable pour laquelle cette méthode de fonctionnalisation n'a pas mené à une forte augmentation de performances est l'interaction des systèmes- π entre l'antraquinone et les parois de nanotubes de carbone, ce qui empêche l'immobilisation et l'orientation optimales de la laccase **schéma II.10.A**. La configuration utilisant le Pyr-AQ(2), permet d'obtenir un courant plus élevé de 1 $mA \cdot cm^{-2}$, conséquence d'une meilleure orientation de l'enzyme sur de l'électrode. En effet, le Pyr-AQ(2) interagit

favorablement avec la poche hydrophobe sur l'enzyme pointant vers le site T1, ce qui permet un DET entre le site de cuivre de la laccase et l'électrode. En outre, le Pyr-AQ(2) est une molécule constituée de trois entités capables d'interagir avec le système π des nanotubes, mais l'encombrement stérique de l'antraquinone ne permet pas le « π -stacking» de toutes les fonctions. Cela rend, par conséquent, au moins un groupement d'antraquinone disponible pour l'ancrage et la connexion de l'enzyme **schéma II.2.B.**

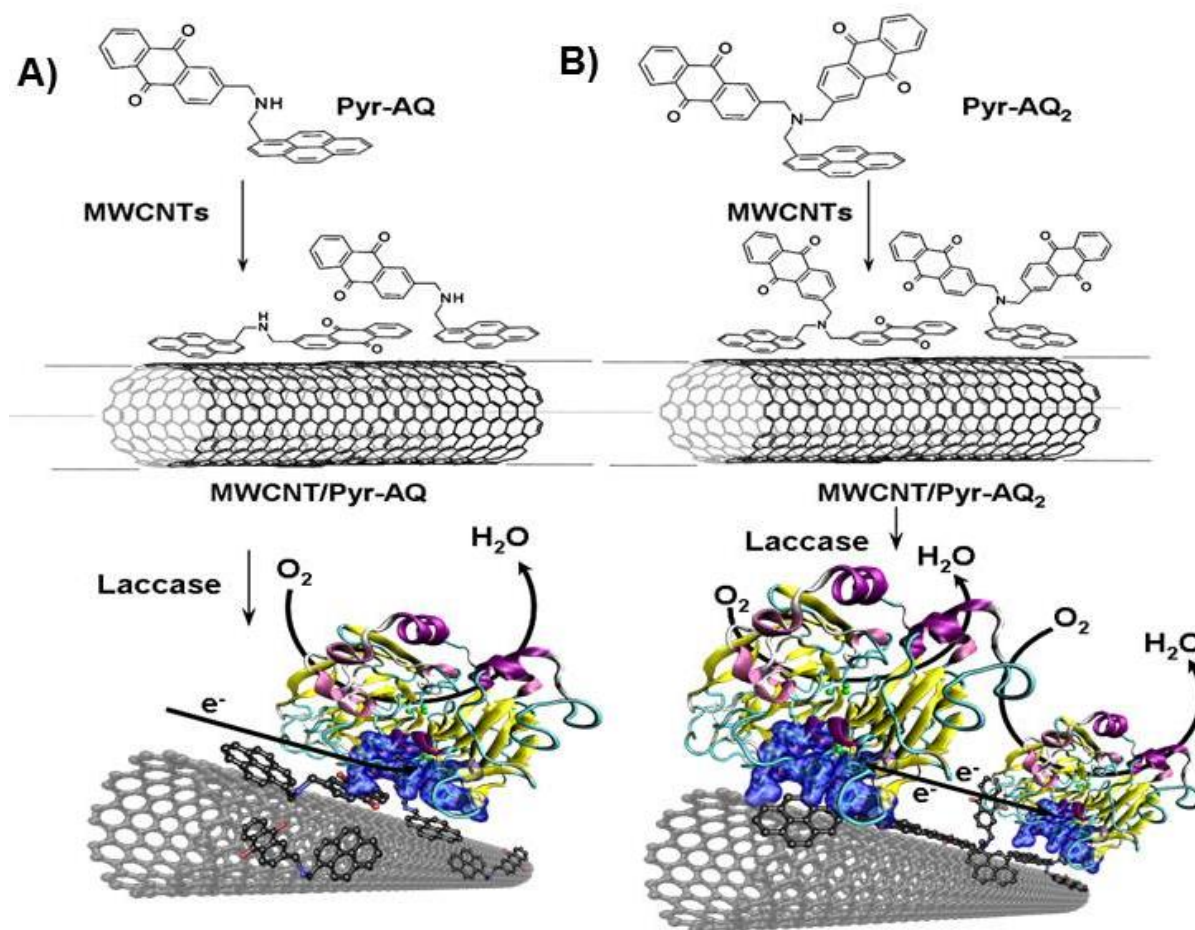


Schéma II.2. Représentation schématique du processus de transfert d'électrons entre la laccase et la matrice de MWCNTs fonctionnalisées par A) Pyr/AQ(1) et B) Pyr/AQ(2).

II.4 Stabilité de fonctionnement des biocathodes

Afin de comparer et de connaître les limites du système d'électrodes MWCNTs/laccase et MWCNTs/Pyr-AQ(2)/laccase, une étude de stabilité a été réalisée quotidiennement dans des conditions de stockage et d'utilisation à pH 5 sous O₂ en effectuant des mesures de décharge à un potentiel de 0,3 V et sur une durée de 1 heure pendant 20 jours **figure II.10.**

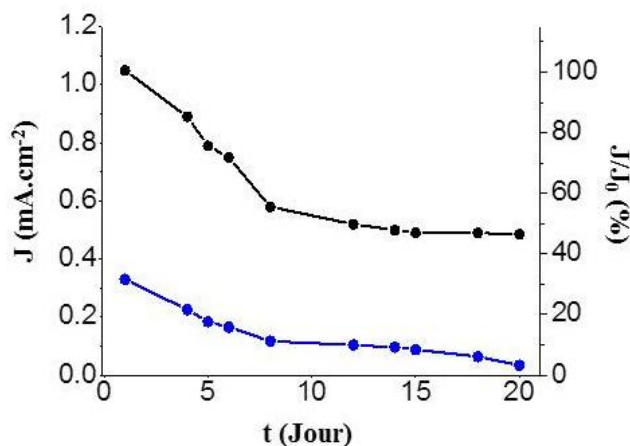


Figure II. 10. Evolution du courant catalytique des biocathodes MWCNTs/laccase (courbe bleue) et MWCNTs/Pyr-AQ(2)/laccase (courbe noire) mesuré chaque jours pendant 1 heure en fonction du temps de stockage dans TP 0,1 mol.L⁻¹, pH 5 en présence d'O₂.

D'après les résultats de la figure ci-dessus, on note dans un premier temps une perte de 45% de l'activité catalytique pour la biocathode MWCNTs/Pyr-AQ(2)/laccase pendant la première semaine. Cette baisse pourrait s'expliquer par une désorption de l'enzyme connectée et des pyrènes adsorbés, entraînant une perte d'efficacité catalytique de la biocathode. Ce courant se stabilise ensuite à 0,5 mA.cm⁻², ce qui est équivalent à 48% du courant catalytique initial sur une période de deux semaines. En comparaison, la biocathode MWCNTs/laccase présente une chute de réponse catalytique pendant la première semaine suivie d'une lente diminution jusqu'à la perte totale de l'activité électrocatalytique après 20 jours.

Ce résultat souligne l'intérêt de la fonctionnalisation supramoléculaire utilisant des dérivés de pyrènes en comparaison avec des configurations utilisant des nanotubes de carbone seuls pour l'obtention d'une stabilité catalytique sur le long terme dans des conditions adéquates de fonctionnement et de stockage.

II.5 Conclusion

Ces résultats montrent bien que la fonctionnalisation non covalente d'électrodes nanostructurées par des dérivés de pyrène portant deux motifs anthraquinone est effective et que la laccase est immobilisée efficacement à la surface de l'électrode au vue des augmentations de densités de courant catalytiques.

Ces bioélectrodes présentent une bonne stabilité dans le temps et permettent un accès au site actif de l'enzyme par un transfert d'électrons direct.

La simplicité de conception de cette biocathode par approche supramoléculaire et ses performances pour la réduction d'oxygène en présence d'O₂ en font un outil précieux pour la conception de bioélectrode à base de laccase.

- [1] C. Gutiérrez-Sanchez; W. Jia; Y. Beyl; M. Pita; W. Schuhmann; A. L. De Lacey; L. Stoica. *Electrochimica Acta*, 2012, 82, 218-223.
- [2] M. J. Moehlenbrock; S.D. Minter. *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1188.
- [3] E. Nazaruk; M. Karaskiewicz; K. Zelechowska; J. F. Biernat; J. Rogalski; R. Bilewicz. *Electrochemistry Communications*, 2012, 14, 67-70.
- [4] A. Le Goff; K. Gorgy; M. Holzinger; R. Haddad; M. Zimmermann; S. Cosnier. *Chem. Eur. J.* 2011, 17, 10216.
- [5] A. Le Goff; M. Holzinger; S. Cosnier. *Electrochim. Acta*, 2011, 56, 3633.
- [6] M. Bourourou; K. Elouarzaki; N. Lalaoui; C. Agnés; A. Le Goff; M ; Holzinger; A. Maaref; S. Cosnier. *Chemistry - A European Journal*, 2013, 19, 28, 9371–9375.
- [7] N. Lalaoui; K. Elouarzaki; A. Le Goff ; M. Holzinger; S. Cosnier. *Chem. Commun.*, 2013, 49, 9281--9283
- [8] C. Tortolini; S. Rea; E. Carota; S. Cannistraro; F. Mazzei. *Microchemical Journal*, 2012, 8-13.
- [9] D. Ivnitski; P. Atanassov. *Electroanalysis*, 2007, 19, 2307–2313.
- [10] C. F. Blanford; R. S. Heath; F. A. Armstrong. *Chem. Commun.* 2007, 1710–1712.
- [11] M. T. Meredith; M. Minson; D. Hickey; K. Artyushkova; D. T. Glatzhofer; S. D. Minter. *ACS Catal.* 2011, 1, 1683.
- [12] K. Stolarczyk; M. Sepelowska; D. Lyp; K. Zelechowska; J. F. Biernat; J. Rogalski; K. D. Farmer; K. N. Roberts; R. Bilewicz. *Bioelectrochemistry* 2012, 87, 154–163.
- [13] M. Sosna; L. Stoica; E. Wright; J. D. Kilburn; W. Schuhmann; P. N. Bartlett. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, 14, 11882–11885.

III. Macroélectrodes nanostructurées de NTCs à base de laccase par transfert d'électrons médiaté

III. Macroélectrodes nanostructurées de NTCs à base de laccase par transfert d'électrons médiaté	70
III.1 Introduction	71
III.2 Conception des nouvelles nanostructures à base de NTCs: Les buckypapers (BPs)	73
III.2.1 Mise en forme des BPs	73
III.2.2 Caractérisations structurales des BPs	74
III.2.3 Incorporation du médiateur rédox: Bis-pyrène-ABTS	77
III.3 Biocathodes nanostructurées à base de laccase par DET et MET	79
III.4 Conclusion	82

III.1 Introduction

Comme décrit dans le chapitre I, les NTCs ont révélé de nombreuses propriétés spécifiques avantageuses dédiés à améliorer les performances des bioélectrodes en termes de surface spécifique, de porosité et de transfert électronique qui les rendent particulièrement intéressantes pour la connexion des enzymes. Un grand nombre d'études récentes s'est focalisé sur la structuration et la formulation des NTCs en matrices nanostructurées ou incorporés dans des matériaux composites, ceux-ci induisant d'excellentes propriétés de transfert d'électron et d'immobilisation de protéine.

Entre autre, l'équipe de Nishizawa a publié une étude qui porte sur l'utilisation de « forêt » de NTCs (CNTF) présentant la particularité d'être facilement manipulable due à leur stabilité mécanique pour l'élaboration d'une biopile glucose-O₂ à base de glucose oxydase (GOx) et d'un polymère d'osmium comme médiateur rédox. Ces CNTF ont l'avantage de présenter également d'importantes surfaces spécifiques (1300 m².g⁻¹) et donc de permettre l'immobilisation d'un grand nombre de protéines [1].

Au laboratoire, un nouveau concept a été développé. Celui-ci consiste à confiner un grand nombre d'enzymes rédox au sein de matrice de NTCs par simple compression mécanique donnant lieu à une électrode nanostructurée de forme cylindrique, mécaniquement très stable, et aisément manipulable en vue de développer des biopiles. La surface spécifique de ces bioélectrodes est de l'ordre de 280 m².g⁻¹. Par utilisation de la GOx à l'anode pour l'oxydation du glucose et de la laccase à la cathode pour la réduction de O₂, la biopile nanostructurée a permis l'obtention d'excellentes performances avec un transfert électronique directe aux deux bioélectrodes [2].

Outre la structuration des NTCs, la conception de composites, incorporant des NTCs et un polymère électrogénéré, a également été abondamment utilisée pour l'élaboration de bioélectrodes. Par exemple en 2013, Michardiere et *al.* [3] ont décrit la formation d'une nouvelle classe de microélectrodes de fibres à base de nanotubes de carbone et d'un polymère de polyvinyl alcool (PVA). Celles-ci sont réalisées par un filage en voie humide et se présentent sous forme de ruban dont la largeur peut varier de dix à cent microns. Grâce à la formation de ces fibres de NTCs hautement conductrices et de bonne tenue mécanique, de nouveaux matériaux exploitant ces propriétés ont été développés en vue de faire des actionneurs électromécaniques et des biopiles enzymatiques glucose/oxygène.

Nous nous sommes donc inspirés de tous ces travaux, ainsi des résultats obtenus dans le chapitre précédent, pour poursuivre cet axe de recherche. Celui-ci consiste en la réalisation des prototypes de biocathodes enzymatiques pour la réduction de dioxygène. Nous envisageons donc de synthétiser de nouvelles bioarchitectures nanostructurées sous la forme d'un papier de NTCs (les Buckypapers, BPs), plus ou moins flexible et suffisamment stables, permettant la connexion électrique de la laccase par introduction de médiateur rédox bis-pyrène-2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, (bis-Pyr-ABTS) avec les nanotubes de carbone.

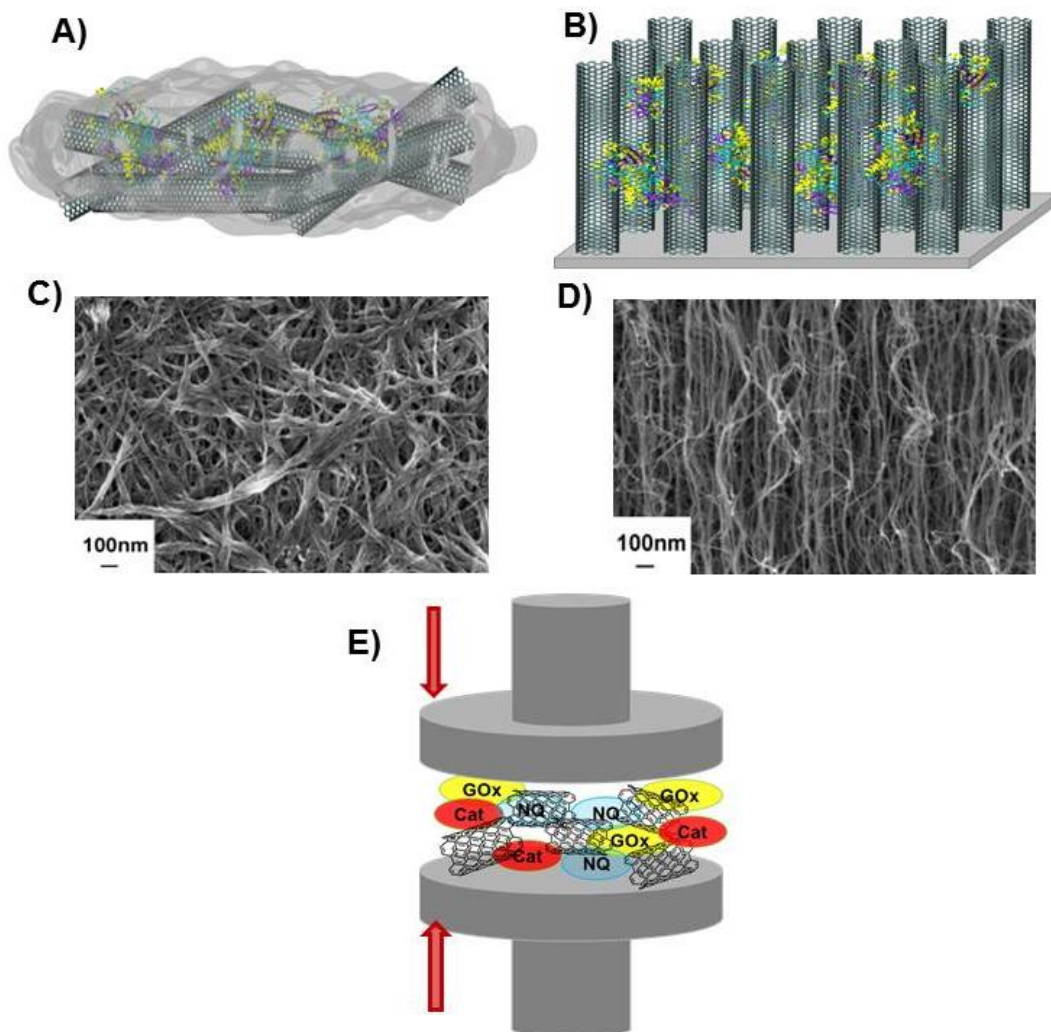


Figure III.1. Schémas représentatifs de trois types d'architectures à base de NTCs et d'enzyme **A)** composite enzyme/polymère/NTCs **B)** bioélectrode enzymatique de forêt de nanotube **E)** nanostructures de NTCs par compression mécanique et clichés MEB de **C)** NTCs recouvert par un polymère électrogénéré **D)** d'une forêt de CNTs.

III.2 Conception des nouvelles nanostructures à base de NTCs: Les buckypapers (BPs)

III.2.1 Mise en forme des BPs

Les feuilles de NTCs (buckypapers) sont obtenues en dispersant 30 mg de nanotubes de carbone multi-parois dans 250 ml de diméthylformamide (DMF) en présence de 20 mg de Bis-pyrène-ABTS, puis en filtrant la dispersion sous vide à travers une membrane en PTFE de diamètre de pore de 0,45 μm .

Les étapes de préparations sont les suivantes :

- Incorporation des NTCs dans le DMF.
- Passage dans un bain à ultrasons de la solution NTCs/DMF pendant 15 min.
- Addition du Bis-pyr-ABTS dans la solution colloïdale de NTCs/DMF.
- Agitation mécanique pendant une nuit.
- Filtration de la dispersion MWCNTs/Bis-pyr-ABTS/DMF sur un dispositif de filtre Büchner de diamètre de 35 mm sous pression.
- Rinçage de la feuille de NTCs/ Bis-pyr-ABTS obtenue avec l'eau distillé afin d'éliminer l'excès de Bis-pyr-ABTS non adsorbés.
- Le BP peut alors être retiré soigneusement de la membrane et séché sous vide à une température de 50°C.

La **figure III.2** ci-dessous présente schématiquement les différentes étapes de fabrication du BP à partir des précurseurs ABTS et du Pyrèneméthylamine et une photo du buckypaper formé sur une membrane en PTFE.

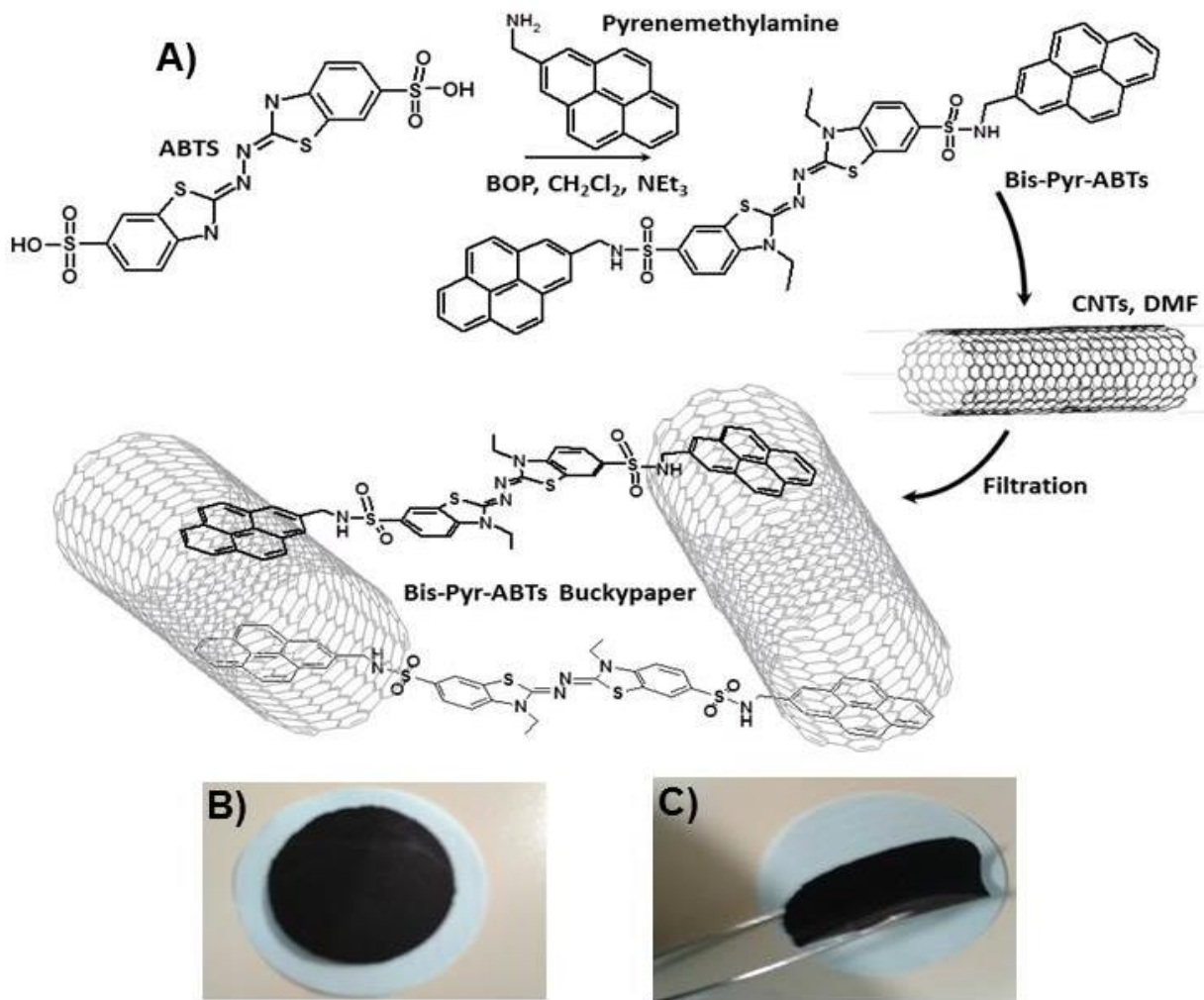


Figure III.2. A) Représentation schématique de la synthèse de Bis-pyr-ABTS et de de la mise en forme des buckypapers, B) Photo d'un BP formé sur une membrane de PTFE C) Photo d'un BP plié avec une pince.

III.2.2 Caractérisations structurales des BPs

Le buckypaper ainsi obtenu se présentant une forme de tapis de NTCs montre une grande flexibilité et une bonne stabilité mécanique, car il retrouve parfaitement sa forme initiale après pliage **figure III.2.C**. Les observations à la microscopie électronique à balayage (MEB) mettent en évidence une forme macroscopique composée de NTCs multi-parois, orientés de manière aléatoire tout au long du film et liés par des enchevêtrements mécaniques grâce à la présence du bis-Pyr-ABTS. Ce dernier joue à la fois le rôle de liant permettant la réticulation des nanotubes et le renforcement des BPs et d'un médiateur redox intervenant dans le processus de transfert d'électron **figure III.3.A**.

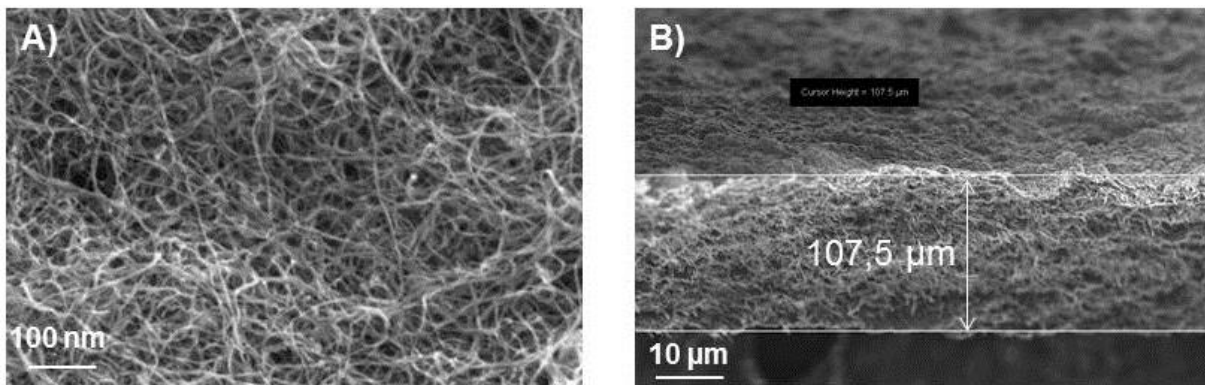


Figure III.3. Observations au MEB de A) la surface de Buckypaper de MWCNTs/Bispyr-ABTS B) section transversale montrant l'épaisseur du buckypaper.

La figure III.3.B présente une coupe transversale du BP ayant une épaisseur de l'ordre de $100 \pm 7 \mu\text{m}$, une masse de $23,7 \text{ g. m}^{-2}$ et un volume spécifique de $4,2 \pm 0,1 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$. Il est à noter que ces paramètres caractérisant le papier de NTCs peuvent être ajustés d'une manière relativement fine en jouant sur la concentration ou le volume de la solution à filtrer.

La surface spécifique du BPs ainsi que la distribution poreuse, ont été mesurées par adsorption de gaz BET «Micromeritics ASAP 2020 Accelerated Surface Area and Porosimetry System» au Laboratoire LEPMI sous la direction du Dr. Vincent Martin. La méthode permet de mesurer la surface spécifique ($S_{\text{spéc}}$) et d'analyser la taille des pores d'un solide après dégazage, par adsorption d'une monocouche d'azote, par liaison de Van der Waals, autour de chaque particule et dans chaque pore de l'échantillon. Une quantité précise de papiers de nanotubes a été introduite dans un porte-échantillon de verre. Ce dernier a ensuite été chauffé à 80°C puis dégazé pendant 24 heures. Par la suite, le porte échantillon est immergé dans de l'azote liquide et les mesures d'adsorption de l'azote sont entamées par des admissions successives du gaz. La formation d'une couche mono-moléculaire sur la surface est utilisée pour déterminer la surface spécifique, tandis que la condensation capillaire peut être utilisée pour évaluer le volume des pores et la distribution de la taille des pores. Les résultats obtenus sont traités selon la théorie de Brunauer, Emmet et Teller (BET). La valeur de la surface spécifique obtenue pour les BPs est égale à $290 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ équivaut à la surface recouverte par le gaz par gramme d'échantillon ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). La taille des pores varie entre 2 nm et 100 nm.

Dans une étude précédente, portant sur la fabrication des BPs obtenus par filtration de 100 mg de MWCNTs (97,5 wt%, Baytubes) dans 200 ml d'une solution aqueuse contenant 1% de tensioactif (Triton X-100) utilisés pour la réduction d' O_2 utilisant la bilirubine oxydase (BOD), Hussein et al. [4,5] ont obtenu des BPs avec une épaisseur de $80 \mu\text{m}$, une densité de

0,152 g.cm⁻³, un diamètre de pore allant de 20 à 70 nm et une Sspés égal à 201 m².g⁻¹. Les valeurs que nous avons trouvé, reste donc cohérentes.

Des mesures de résistance électrique des BPs ont été effectuées au Laboratoire PAGORA sous la direction du Dr. Didier Chaussy. Nous avons utilisé une méthode traditionnelle dite de «Quatre points» (Jandel Universal Probe System with RM3-AR Test Unit) à 25°C. Valdes a été l'un des premiers à la décrire en 1954 [5]. Le principe de mesure est simple et est schématisé sur la **figure III.4**.

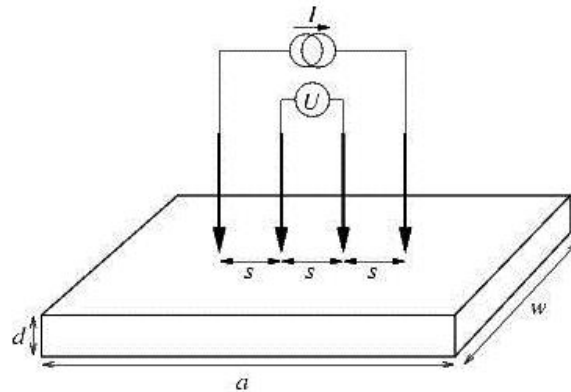


Figure III.4. Montage de mesure de résistivité avec une sonde quatre points.

Quatre points alignées et équidistantes sont appliquées par simple pression sur l'échantillon à analyser. Un courant I est appliqué par les deux points externes à l'aide d'une source de courant, créant ainsi une variation de potentiel. La tension U générée peut donc être mesurée entre les deux points internes reliées à un voltmètre. La mesure de la tension conduit à la valeur de résistance. L'avantage principal de cette méthode en comparaison avec une méthode plus classique à 2 points est l'élimination de l'effet de la résistance de contact. Connaissant l'épaisseur «e» de l'échantillon on peut calculer ainsi la résistivité ρ qui est l'inverse de la conductivité électrique γ grâce à la relation suivante :

$$\rho = \frac{R \times e}{K}$$

Avec :

R: Résistance électrique (Ohm).

e: épaisseur de la couche (μm).

K: constante de la cellule ($1/K= 4.532$).

Les buckypapers semblent posséder d'intéressantes propriétés héritées des NTCs avec une conductivité électrique de $51 \pm 5 \text{ S.cm}^{-1}$.

III.2.3 Incorporation du médiateur redox: Bis-pyrène-ABTS

Depuis de nombreuses années l'utilisation des molécules relais, a permis de contourner la difficulté que représente la connexion directe des enzymes. Les médiateurs rédox peuvent être libres en solution ou immobilisés à la surface de l'électrode [6].

Parmi les espèces organiques, le 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) (ABTS) est une molécule rédox particulièrement utilisée dans les processus de transfert électronique enzyme multicuivres-électrode. Ses propriétés de médiation de la laccase pour la réduction d'O₂ ont été amplement décrites dans de nombreuses reprises dans la littérature [7]. Son processus d'oxydo-réduction met en jeu 1 H⁺ et 1 e⁻:

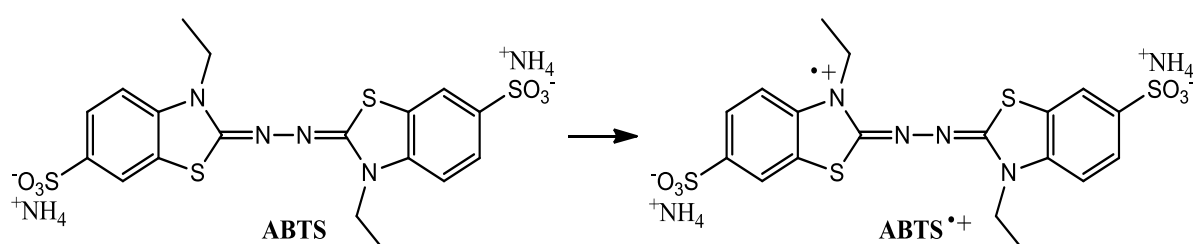


Figure III.5. Système rédox de l'ABTS, médiateur de la laccase.

Sous sa forme réduite, l'ABTS est capable de transférer un e⁻ à la laccase pour former le radical cation ABTS^{•+}. Le couple redox ABTS^{•+}/ABTS a un potentiel élevé ($E^{\circ'} \sim + 0,430V$ vs. ECS) mais inférieur à celui de laccase de *T. versicolor* ce qui lui confère sa réactivité avec l'atome de cuivre du site T1 de la laccase et permet de garder un potentiel le plus élevé possible pour la biocathode.

En particulier, la Bis-pyrène-ABTS présente une structure tout à fait intéressante. Elle est synthétisée à partir du 1-Pyrèneméthylamine et du médiateur redox 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) avec un rendement de 65% (voir partie expérimentale). La molécule est composée d'une molécule ABTS, responsable de son activité rédox modifiée avec deux groupements pyrènes. Ces derniers lui confèrent une aromaticité importante rendant possible les interactions de « π -stacking » sur les parois des NTCs. Ses propriétés rédox ainsi que sa structure en font donc un excellent candidat pour la médiation et pour son incorporation au sein de biocathodes nanostructurées à base de laccase et de MWCNTs.

Nous avons développé une approche originale permettant d'obtenir des feuilles de NTCs avec des proportions en Bis-pyr-ABTS différente. Notre démarche consiste à fabriquer les buckypapers par simple filtration puis à incuber les électrodes de surface égale à 1 cm^2 dans une solution de DMF contenant le médiateur redox (5 mg.mL^{-1}) pendant 1 heure, ce qui donne accès au BPsat. Ces derniers ont été connectés à un fil de cuivre et utilisés en tant qu'électrode de travail.

Le comportement électrochimique des buckypapers a été étudié par voltampérométrie cyclique **figure III.6**. Les CVs sur ce type d'électrodes sont réalisées à faible vitesse de balayage, 1 mV.s^{-1} , afin de minimiser les courants capacitifs dû aux grandes quantités de NTCs utilisées dans la conception de l'électrode.

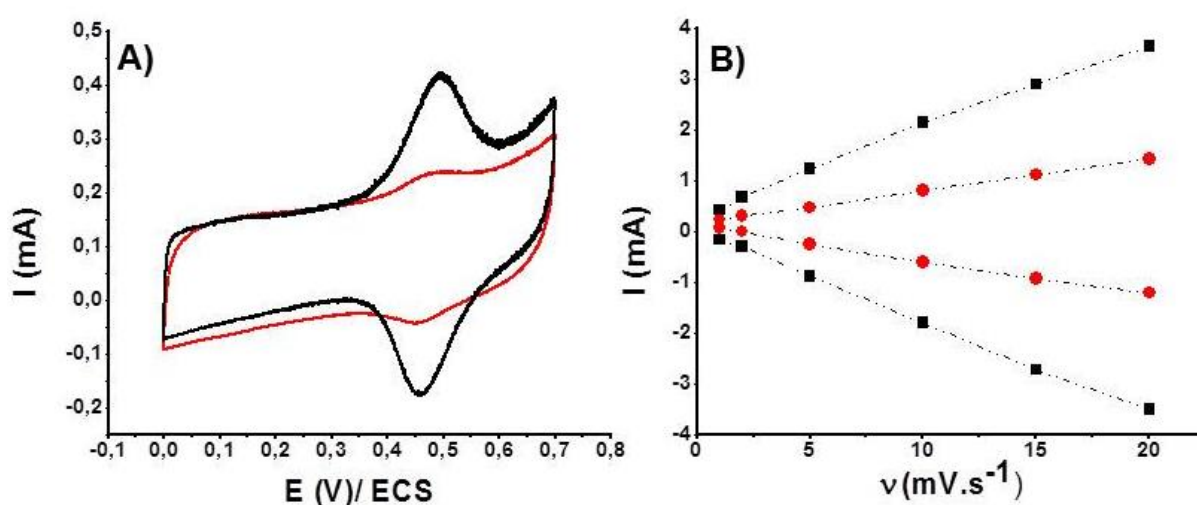


Figure III.6. A) CVs du buckypaper (MWCNTs/Bis-pyr-ABTS) ($S=1 \text{ cm}^2$) avant (courbe rouge) et après incubation dans une solution de Bis-pyr-ABTS (5 mg.mL^{-1}) (courbe noire), dans une solution de tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH5), sous argon, $v=1 \text{ mV.s}^{-1}$. B) Variation de l'intensité du courant de pics en fonction de la vitesse de balayage de BP (cercles rouge) et BP concentré (carrés noirs).

Les voltammogrammes font état d'un système rédox réversible caractéristiques de l'ABTS avec un $E_{1/2}$ d'une valeur de 0,46 et 0,47 V vs. ECS pour le BP et le BPsat, respectivement. Ces valeurs sont conformes à celles précédemment rapportées pour ABTS piégé dans un film de polypyrrole (0,46 V) [8] et pour ABTS immobilisé sur des MWCNT (0,47 V) [9]. La présence de deux systèmes de pics caractéristiques du médiateur peut indiquer également que les groupements pyrènes liants l'ABTS aux MWCNTs n'affectent pas le potentiel rédox d'ABTS.

Après incubation des BPs dans une solution de Bis-pyr-ABTS, nous avons observé une augmentation significative de l'intensité de courant de pics. Par exemple, le courant de pic anodique atteint une valeur de 0,42 mA (0,21 mA.cm⁻²) pour un BPsat contre 0,24 mA (0,12 mA.cm⁻²) pour un BP non saturé. Cela peut s'expliquer par la présence d'une quantité d'ABTS plus importante dans la nanostructure. Ce résultat a été confirmé par intégration de l'aire des vagues obtenues en CV, ce qui a permis d'avoir accès aux quantités de Bis-pyr-ABTS, présentant une réponse électrochimique. La vague correspondant au BPsat indique que 1,03 μmol cm⁻² ce qui équivaut à 40 wt% d'ABTS répondent électrochimiquement. En revanche, seulement 0,23 μmol cm⁻² équivaut à 9 wt% d'ABTS présente dans le composite est visible en CV. La quantité d'ABTS immobilisée est donc multipliée par un facteur de 4,5 après une incubation supplémentaire des feuilles de nanotubes dans une solution contenant du Bis-Pyr-ABTS. La **figure III.6.B** présente la variation linéaire des courants de pics des deux électrodes en fonction de la vitesse de balayage ce qui confirme l'immobilisation potentielle du Bis-pyr-ABTS sur la surface des NTCs et l'absence de relargage ou de diffusion en solution du médiateur d'où l'intérêt de la modification chimique des médiateurs par incorporation éventuelle d'un groupement d'ancrage, sans influencer sur le potentiel rédox de la molécule.

III.3 Biocathodes nanostructurée à base de laccase par DET et MET

L'objectif est de concevoir une cathode pour une biopile enzymatique en une seule étape utilisant l'enzyme laccase de *Trametes versicolor* et une feuille en MWCNTs/Bis-pyr-ABTS (buckypaper). Dans le prototype que nous avons développé, deux configurations de BPs: saturés en médiateur (BPsat) et non saturé (BP) de surface ($S=1\text{cm}^2$) ont été plongées dans 1 mL d'une solution de tampon phosphate (0,1mol.L⁻¹, pH5) contenant 5 mg.mL⁻¹ de laccase pendant une nuit. Les électrodes modifiées ont été ensuite rincées deux fois dans une solution de tampon phosphate (0, 1mol.L⁻¹, pH=5) pour enlever la laccase non adsorbée et testés sous atmosphère argon puis en présence d'oxygène afin d'évaluer les propriétés catalytiques des bioélectrodes vis-à-vis à la réduction du dioxygène.

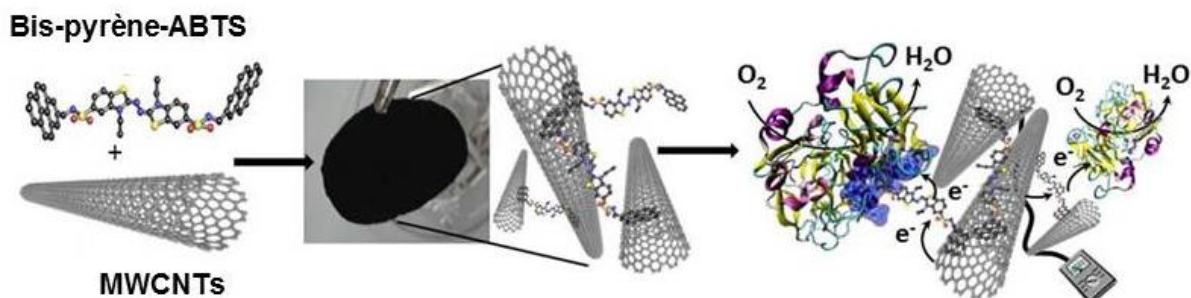


Figure III.7. Représentation schématique du processus de transfert électronique entre la laccase et le buckypaper.

Le procédé établi doit permettre de faire fonctionner l'enzyme avec un transfert d'électron direct et médiaté de manière simple et efficace. Les propriétés d'ABTS en terme de médiation de la laccase pour la réduction de O_2 permet de faire fonctionner la cathode avec un MET. Alors que le DET s'effectue en s'appuyant d'une part sur l'adsorption spontanée des enzymes sur les NTCs et d'autre part sur la structure conjuguée du bis-pyr-ABTS. En effet, cette molécule contient deux groupements pyrènes capables d'interagir par π -stacking avec les cycles aromatiques des NTCs ayant pour effet d'orienter favorablement la biomolécule grâce aux interactions supramoléculaires entre la poche hydrophobe de la laccase et les unités pyrènes non adsorbées sur les NTCs.

Les performances des BPsat en médiateur ont été dans un premier temps étudiées par CVs sous argon puis sous bullage d'oxygène afin de suivre l'activité catalytique de la laccase vis-à-vis de la réduction d' O_2 à pH 5 **figure III.8**.

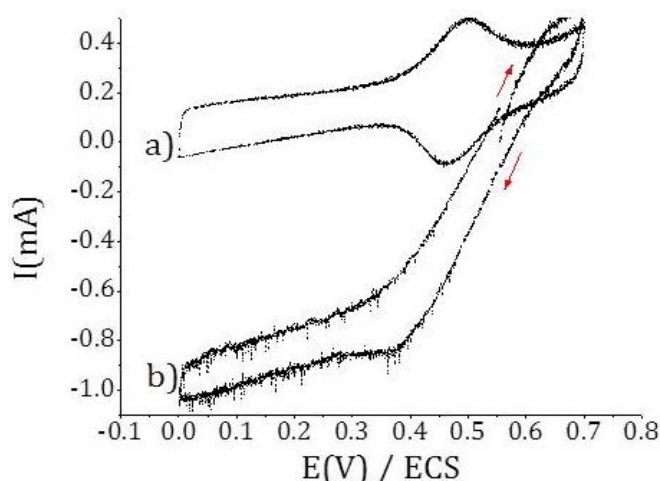


Figure III.8. CVs des bioélectrodes BPsat/laccase immobilisée **a)** sous argon **b)** sous bullage d'oxygène dans une solution de tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5), $v = 1 \text{ mV.s}^{-1}$.

La comparaison des CVs réalisés sous argon puis sous oxygène des biocathodes BP_{sat}/laccase immobilisée mettent en évidence d'une part la disparition du pic anodique d'oxydation d'ABTS ce qui montre que notre système fonctionne avec un transfert électronique médiaté (MET), [10, 11] et d'autre part l'apparition d'une vague de réduction électrocatalytique débutant à 0,62 V vs. ECS avec un courant cathodique de 0,5 mA.cm⁻² sachant que le transfert d'électrons est assuré par les deux faces du BP. Ce potentiel est très proche des valeurs théoriques du potentiel du site mononucléaire T1 de la laccase ce qui montre que le transfert électronique entre la laccase et le BP peut se faire directement (DET). Ce potentiel correspond également à ce qui a été observé par Karnicka et *al.* sur électrode de carbone vitreux modifiée avec une suspension d' ABTS+ laccase [9].

Afin d'évaluer le transfert d'électrons direct et indirect, les performances potentielles des bioélectrodes (BP et BP_{sat}) à enzymes immobilisée et en solution ont été séparément mises en évidence par des mesures de chronoampérométrie. La **figure III.9** illustre à la fois les courants catalytiques obtenus dans le cas des BP et des BP_{sat} (S= 1 cm²) en présence de laccase immobilisée (5mg.mL⁻¹) et en solution (0,1 mg.mL⁻¹).

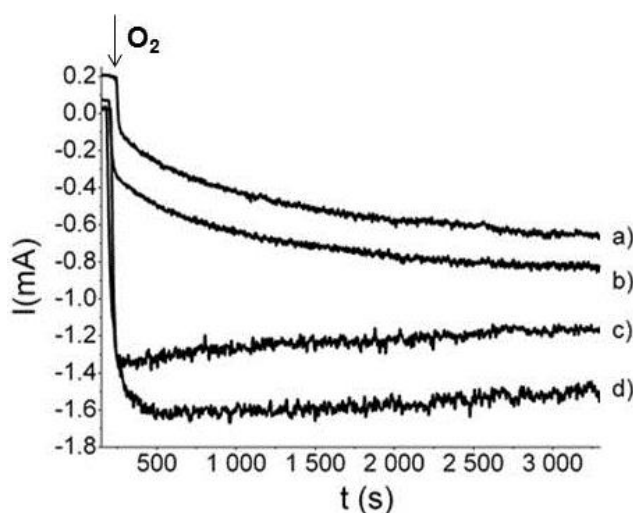


Figure III.9. Mesure de chronoampérométrie à 0,3 V vs. ECS de biocathodes: **a)** BP/laccase immobilisée, **b)** BP_{sat}/ laccase immobilisée, **c)** BP/laccase en solution et **d)** BP_{sat}/laccase en solution, dans tampon phosphate (0,1 mol.L⁻¹, pH 5), avant et après ajout d'un bullage d'O₂.

Les courants de réduction de l'oxygène ont été enregistrés en fonction du temps après 1 heure de décharge à potentiel fixe (+ 0.3 V vs. ECS) en milieu tampon phosphate pH 5. La **figure III.10** récapitule les courants I_{MAX} obtenus pour les quatres configurations d'électrodes étudiées.

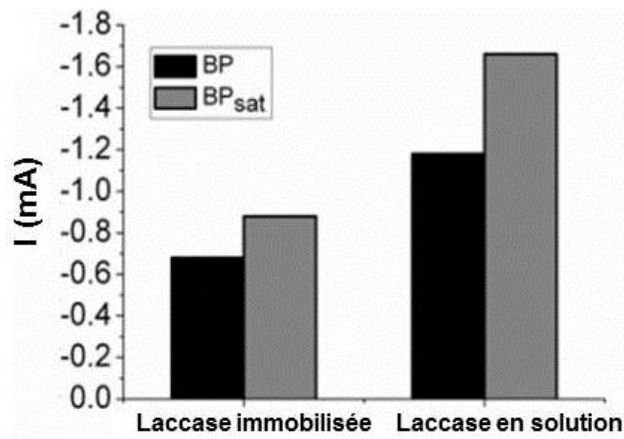


Figure III.10. Diagramme des intensités de courants maximales obtenues avec des BPs et des BP_{sat} en présence de laccase immobilisée et en solution.

Les différentes bioélectrodes donnent des résultats significativement différents en termes de réponse catalytique. Dans le cas où la laccase est en solution, les courants observés sont beaucoup plus importants que celles utilisant la laccase immobilisée. Notamment, lorsque le BP est saturé en Bis-pyr-ABTS, le courant catalytique délivré par la bioélectrode est de l'ordre $1,55 \pm 0,07$ mA contre $1,20 \pm 0,07$ mA pour les BPs non saturés en médiateur. Alors que les configurations utilisant la laccase immobilisée à la surface du BP et du BP_{sat}, les courants obtenus sont respectivement $0,83 \pm 0,03$ mA et $0,67 \pm 0,02$ mA équivaut à 55% des valeurs de courant catalytiques obtenus avec la laccase en solution. Cette différence de comportement peut être expliquée d'une part par une diffusion des réactifs en solution (oxygène et laccase) plus facile car dans ce cas, l'enzyme est principalement libre en solution et d'autre part par une accessibilité réduite des enzymes piégées à la surface des BPs causée par l'encombrement stérique au sein du buckypaper. La meilleure configuration de biocathode, à savoir le BP_{sat}/laccase en solution a été étudiée en terme de stabilité. Le courant catalytique a diminué seulement de 6% après une durée de 1h ce qui prouve l'efficacité et la stabilité de fonctionnement de ces bioélectrodes.

III.4 Conclusion

Dans ce chapitre, la conception d'une biocathode nanostructurée Buckypaper /enzyme basée sur la connexion indirecte de la laccase a été décrite. La mise en forme des NTCs et du Bis-pyr-ABTS, sous forme d'un buckypaper stable a permis à la fois de limiter le relargage du médiateur rédox non-immobilisé, de conserver une bonne tenue mécanique de la bioélectrode et de faciliter la diffusion du substrat vers la protéine connectée.

L'enzyme a été soit intégrée à la surface du BP et connectée avec succès, soit libre en solution. Grâce au médiateur Bis-pyrène-ABTS, possédant un potentiel rédox idéalement placé, la biocathode utilisant la protéine en solution a permis d'obtenir des courants de catalyse de réduction d'oxygène de l'ordre de 1,6 mA.

Comme les enzymes, leur durée de vie en solution est limitée, notre concept paraît efficace pour l'élaboration des futures biopiles implantable utilisant des biomolécules fraîches en solution.

- [1] S. Yoshino; T. Miyake; T. Yamada; K. Hata; M. Nishizawa. *Adv. Energy Mater.*, 2013, 3, 60–64.
- [2] A. Zebda; C. Gondran; A. Le Goff; M. Holzinger; P. Cinquin; S. Cosnier. *Nat. Commun.*, 2011, 2, 370.
- [3] Thèse de Anne-Sophie Michardiere, Microélectrodes de nanotubes de carbone pour conversion d'énergie.
- [4] L. Hussein; G. Urban; M. Kruger. *Phys.Chem. Chem. Phys.*, 2011, 13, 5831-5839.
- [5] L. B. Valdes. *Proceedings of the I.R.E.*, 1954, 42, 420.
- [6] E.H.Yu; K. Scott. *Energies*, 2010, 3, 23–42.
- [7] H. P. Call; I. Mücke; *J. Biotechnol.* 1997, 53, 163.
- [8] L. Brunel; J. Denele; K. Servat; K. B. Kokoh; C. Jolival; C. Innocent; M. Cretin; M. Rolland; S. Tingry. *Electrochem. Commun*, 2007, 9, 331.
- [9] K. Karnicka; K. Miecznikowski; B. Kowalewska; M. Skunik; M. Opallo; J. Rogalski; W. Schuhmann, P. J. Kulesza, *Anal. Chem.* 2008, 80, 7643- 7648.
- [10] W. Nogala; E. Rozniecka; I. Zawisza; J. Rogalski; M. Opallo. *Electrochem. Commun.* 2006, 8, 1850.
- [11] C. Fernández-Sánchez; T. Tzanov; G. M. Gübitz; A. Cavaco-Paulo. *Bioelectrochemistry* 2002, 58, 149.

Chapitre 4

IV. Les nanofibres électrofilées: Applications aux biocapteurs et aux biocathodes enzymatiques pour la bioconversion d'énergie

IV. Les nanofibres électrofilées: Applications aux biocapteurs et aux biocathodes enzymatique pour la bioconversion d'énergie.	86
IV.1 Introduction aux nanofibres électrofilées	89
IV.1.1 Description du procédé	89
IV.1.1.1 Cabine de filage	89
IV.1.1.2 Formation du cône de Taylor	90
IV.1.1.3 Trajet du jet de polymère	90
IV.1.2 Paramètres de filage	91
IV.1.2.1 Paramètres associés à la solution polymérique	91
IV.1.2.2 Paramètres liés au procédé d'électrospinning	93
IV.1.2.3 Paramètres ambiants	95
IV.2 Matériaux et appareillage utilisés en électrofilage	96
IV.2.1 Appareillage	96
IV.2.2 Matériaux utilisés	96
IV.2.2.1 Polyacrylonitrile (PAN)	97
IV.2.2.2 N,N-diméthylformamide (DMF)	97

IV.3 Préparation des fibres conductrices de NTCs pour application biocathode enzymatique	98
IV.3.1 Mise en forme des structures électrofilées en nanotubes de carbone	98
IV.3.1.1 Electrofilage du Polyacrylonitrile	98
IV.3.1.2 Préparation des dispersions de NTCs dans des solutions de PAN	100
IV.3.1.3 Filage des solutions PAN / NTCs	100
IV.3.1.4 Traitements thermiques des fibres	101
IV.3.1.5 Caractérisations des fibres de carbone	102
IV.3.1.5.a Microscopie Electronique à Balayage	102
IV.3.1.5.b Mesure de la conductivité des nanofbres PAN/NTCs	103
IV.3.1.5.c Mesure de la surface spécifique	104
IV.3.1.5.d Caractérisation électrochimique	104
IV.3.2 Nanofibres de carbone pour biopiles enzymatiques	105
IV.3.2.1 Préparation des biocathodes	105
IV.3.2.2 Effet du nombre de cycle lors de la polymérisation sur les performances de la biocathode	107
IV.3.2.3 Etude électrocatalytique des biocathodes	108
IV.3.3 Conclusion	109
IV.4 Développement d'un biocapteur à catéchol à base de fibres électrofilées de PAN/NTCs	110
IV.4.1 Réduction chimique des fibres de PAN/NTCs	110
IV.4.2 Caractérisations des fibres	111
IV.4.2.a Microscopie Electronique à Balayage	111
IV.4.2.b Spectroscopie Infrarouge (FTIR)	112

IV.4.2.c	Caractérisation électrochimique	114
IV.4.3	Application au développement de biocapteur à catéchol	115
IV.4.3.1	Préparation des bioélectrodes	115
IV.4.3.2	Résultats expérimentaux sur les performances du biocapteur à catéchol	116
IV.4.4	Conclusion	117
IV.5	Incorporation d'oxyde de graphène dans les nanofibres	118
IV.5.1	Introduction	118
IV.5.2	Synthèse de l'oxyde de graphène (GO)	118
IV.5.2.1	Oxydation chimique du graphite	119
IV.5.2.2	Exfoliation d'oxyde de graphite dans le DMF	120
IV.5.3	Caractérisations des feuillets d'oxyde de graphène (GO)	121
IV.5.3.a	Microscopie Electronique à transmission	121
IV.5.3.b	Spectroscopie Raman	122
IV.5.4	Préparation des fibres de PAN/ GO	123
IV.5.5	Caractérisation des fibres PAN/ GO	123
IV.5.5.a	Microscopie Electronique à Balayage	123
IV.5.5.b	Caractérisation mécanique	124
IV.5.6	Production des fibres de PAN/rGO par réduction chimique des fibres de PAN/GO	125
IV.5.7	Caractérisations des fibres PAN/rGO	126
IV.5.7.a	Microscopie Electronique à Balayage	126
IV.5.7.b	Caractérisation électrochimique	127
IV.5.8	Conclusion et perspective	128

IV.1 Introduction aux nanofibres électrofilées

Comme décrit précédemment, l'électrospinning est une approche originale utilisée pour la production de fibres de diamètres très fins allant de quelques microns à une centaine de nanomètres par voie électrostatiques. Le principe de cette technique consiste à appliquer un champ électrique intense sur l'aiguille d'une seringue contenant une solution concentrée de polymère afin d'en faire jaillir un jet continu de polymère. Le jet ainsi formé est alors étiré par le biais de charges électriques et projeté du bout de l'aiguille vers un collecteur qui peut être fixe ou rotatif et qui porte une charge opposé à celle de l'aiguille. Le solvant s'évapore lors de l'envolée du jet et on récupère les fibres formées sur le collecteur. Aujourd'hui, l'électrofilage s'inscrit comme une technique incontournable dans plusieurs domaines et notamment dans le secteur des matériaux innovants. Actuellement, cette technique est largement utilisée par le monde universitaire et un bon nombre de laboratoires possèdent leur propre dispositif. La **figure IV.1** représente le dispositif ainsi que le principe de filage électrostatique [1].

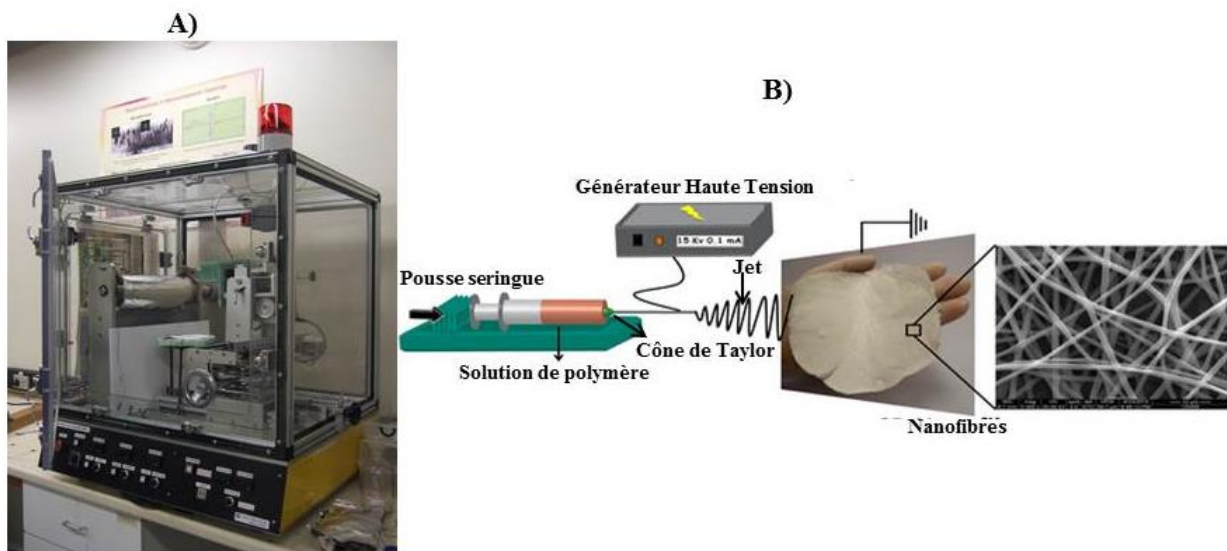


Figure IV. 1. A) Dispositif d'électrospinning B) Présentation schématique du principe d'ES [1].

IV.1.1 Description du procédé

D'un point de vue technique, l'électrospinning est considéré comme un procédé de filage assez simple. Certaines entreprises se sont spécialisées dans la fabrication et la vente de cabines de filage adaptées aux laboratoires de recherches et aux projets de recherches et développement.

IV.1.1.1 Cabine de filage

Une cabine de filage est généralement constitué d'un système d'alimentation haute tension de polarité négative ou positive, d'une seringue munie d'une aiguille métallique, d'un pousse-

seringue, d'une pompe d'alimentation en solution et d'une contre électrode ou collecteur qui peut être de différentes formes: plat, circulaire, tubulaire. Il peut être également statique ou rotatif.

IV.1.1.2 Formation du cône de Taylor

Comme expliqué précédemment, lors du procédé d'électrofilage, la solution de polymère à filer est conduite sous une tension élevée de l'ordre de milliers de volts pour atteindre le système cible (collecteur). Le mouvement du fluide entraîne la formation d'une goutte de polymère qui perle à la pointe de l'aiguille et qui sous l'effet du champ électrostatique subit des déformations et forme le cône de Taylor ce qui initie le processus d'électrofilage. Ce phénomène physique a été étudié en 1969 par Taylor qui a été honoré par la communauté scientifique en donnant son nom «cône de Taylor» à cet aspect physique [2].

IV.1.1.3 Trajet du jet de polymère

Une fois le cône du Taylor formé, ce dernier s'étire pour former un filament d'une finesse nanométrique qui s'éjecte ensuite du cône et continue à se rétrécir jusqu'à atteindre la contre électrode avec une vitesse atteignant jusqu'à 100 mètres par seconde. Ce mouvement rapide est expliqué par le fait que les charges à l'intérieur du jet accélèrent la solution de polymère dans la direction du champ électrique vers le collecteur. Cependant, il a été montré que le jet peut aussi subir un mouvement chaotique caractérisé par des flexions aléatoires. Yarin et *al.* ont attribué ces flexions à l'existence des forces répulsives entre les différentes espèces ioniques à l'intérieur du jet [3]. Selon Shina et *al.*, ces instabilités sont liées au mouvement rapide du jet ce qui affaiblit le diamètre du jet [4]. Il existe d'autres types de perturbations qui sont engendrées par la tension de surface du jet; qui conduisent à la formation de deux types de fibres: les fibres branchées et les fibres contenant des «perles» (beads). Fong et *al.* [5] ont montré que d'une manière générale, les «perles» se forment lorsque la densité de charges est ponctuellement faible, la rétraction peut briser la fibre en plusieurs gouttelettes alors que les fibres branchées se forment lorsque la densité de charges sur la surface du jet est assez élevée **figure IV.2.**

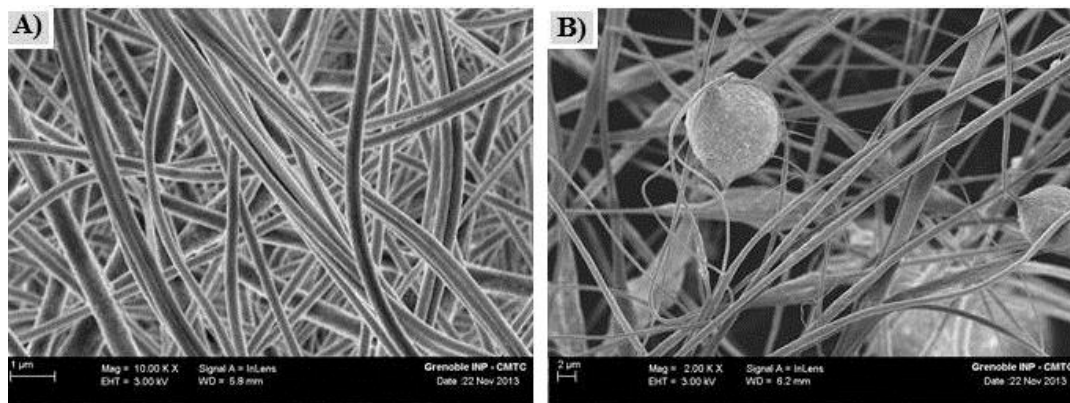


Figure IV.2. Clichés MEB présentant A) fibres de PAN branchées et B) Fibres de PAN contenant des «perles».

IV.1.2 Paramètres de filage

Au niveau expérimental, il est possible d'éviter tout type de perturbation et ceci par l'ajustement des paramètres d'électrofilage. Chaque dispositif permet de faire varier un paramètre de filage et d'observer instantanément les changements sur le jet et/ou sur la morphologie des fibres obtenues. Ces paramètres sont classés en trois catégories: les paramètres liés à la solution de polymère, les paramètres liés au procédé et les paramètres ambiants.

IV.1.2.1 Paramètres associés à la solution polymérique

- **Concentration et viscosité**

La concentration est un paramètre intrinsèque de la solution du polymère et elle présente un critère déterminant dans le procédé d'électrofilage. Il a été montré qu'une solution de polymère contenant plus de 2,5 enchevêtrements par chaîne suffit pour que le filage puisse aboutir à des fibres uniformes [6]. La concentration a un effet significatif sur le diamètre et la morphologie final des fibres [7, 8].

De nombreux travaux rapportent qu'à faible concentration en polymère, le non-tissé est composé de «perles» alors qu'on augmentant la concentration au-delà de la concentration critique, peut entraîner une limitation de l'étirage du jet et conduit par conséquent à la formation de gros filaments avec des diamètres plus grands [9]. Donc il existe pour chaque solution polymère/solvant une proportion idéale pour le filage. He et al. [10] ont montré que le diamètre de la fibre (d) est en relation avec la concentration(C):

$$d \propto C^k$$

Avec k , constante qui varie selon le type de polymère utilisé; par exemple pour le Polyacrylonitrile (PAN) dans le N,N-diméthylformamide (DMF), $k= 3,45$ [10], Pour le Polyuréthane (PU) dans le DMF aussi, $k= 3$ [7]. La constante k , varie d'un polymère à un autre car le diamètre d'une fibre ne dépend pas seulement de la concentration du polymère mais aussi de la qualité du solvant et des conditions de filages.

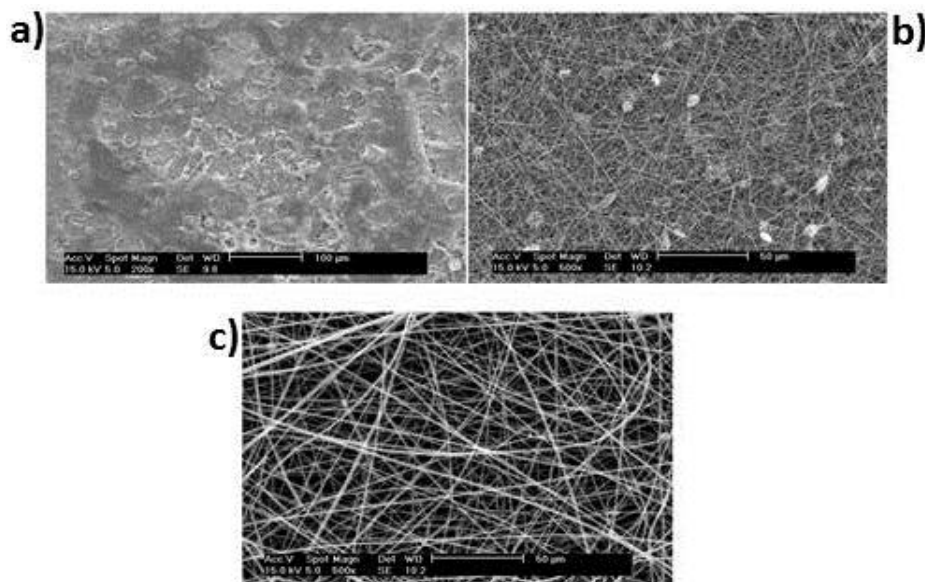


Figure IV.3. Des images MEB de la morphologie de nanofilaments de Poly (L-lactacid) (PLLA) en fonction de la concentration de la solution de polymère **a)** 2 wt% ; **b)** 5 wt% ; et **c)** 8 wt%.

La viscosité et la concentration sont corrélées entre eux. En effet, la viscosité joue un rôle important dans la détermination de la plage des concentrations à partir de laquelle il est possible de filer des nanofibres. De nombreuses études ont montré qu'il est impossible de filer pour des solutions de faible viscosité, et à l'inverse pour une viscosité élevée, il est difficile d'obtenir des nanofibres régulières en raison de l'instabilité du jet de polymère. Alors, comme pour la concentration, il existe une gamme de viscosité dans laquelle il faut se placer pour obtenir des nanofibres électrofilées.

- **Tension de la surface**

La tension de surface d'une solution de polymère est la principale force qui s'oppose à la formation du jet chargé. Il suffit que celle-ci soit inférieure à la force subite par la goutte à l'extrémité de l'aiguille pour que cette dernière puisse se déformer et permet le filage.

Généralement, la tension de surface d'une solution de polymère dépend majoritairement du solvant utilisé. Si la tension de surface est assez élevée, ceci inhibe le processus d'électrofilage et provoque des instabilités au niveau du jet de solution et d'où l'apparition de filaments perlés. A

l'inverse, une faible tension de surface de la solution de polymère permet de réduire le champ électrique appliqué lors du filage tout en limitant la formation de «perles» de polymère dans les nanofilaments [11].

- **Conductivité de la solution de polymère**

La conductivité est un paramètre important car elle permet une meilleure capacité de transport de charge permettant ainsi un meilleur étirement et une optimisation de fibres. Zhang et *al.* [12] ont étudié l'effet de l'ajout de NaCl dans une solution de PVA dans l'eau dans le but d'améliorer la conductivité et ont conclu que cette dernière a progressé de 1,53 à 10,5 mS.cm⁻¹ en augmentant la concentration massique de NaCl de 0,05 à 0,2g. Dans la suite de cette étude, les auteurs ont conclu aussi qu'en augmentant la conductivité de la solution le diamètre moyen des fibres diminue de 214± 19 nm à 159± 21 nm. Cette diminution a été attribuée à l'augmentation de densité de charges permise par NaCl augmentant la force électrique d'étirage exercée sur le jet.

IV.1.2.2 Paramètres liés au procédé d'électrospinning

Pour le montage d'électrofilage, trois paramètres doivent être pris en compte car elles peuvent influencer considérablement la formation et la structure des fibres. Ces paramètres sont la tension appliquée, le débit de solution de polymère et la distance de l'extrémité de l'aiguille au collecteur.

- **Voltage/Champ électrique**

La tension appliquée à l'échelle de kV est un paramètre crucial durant l'électrofilage. Selon Zhang et *al.* [12], plus la tension appliquée est importante, plus on éjecte une quantité importante de polymère ce qui a pour effet de produire des filaments de diamètre important. En plus, les hautes tensions aident à évaporer plus rapidement le solvant et à obtenir des nanofilaments bien secs [13]. D'autres chercheurs ont rapporté que plus le champ électrique appliqué est important, plus il y aura d'étirements intenses du jet, et donc des filaments de plus petits diamètres. Ceci peut cependant provoquer l'apparition de filaments perlés [7, 8, 14].

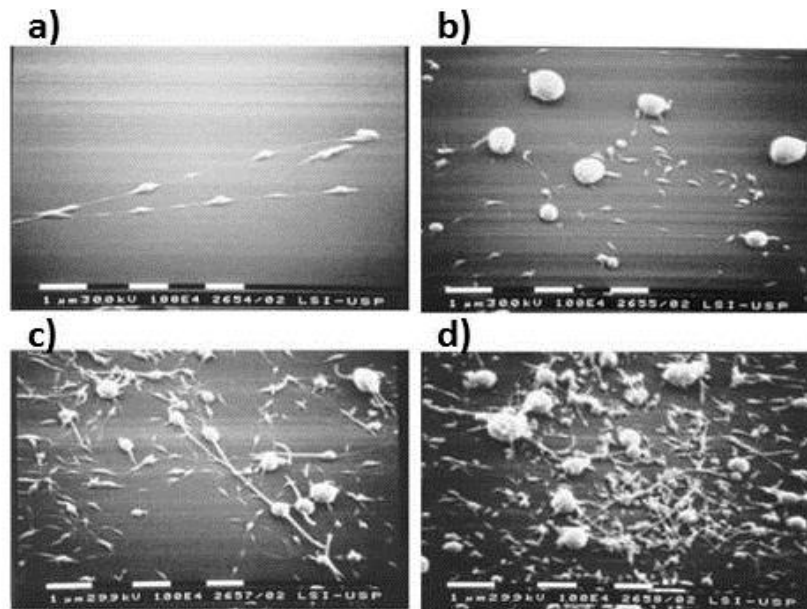


Figure IV.3. Influence du champ appliqué sur le diamètre des fibres obtenues par électrospinning **a)** 4kV, **b)** 8kV, **c)** 16kV, **d)** 20kV.

- **Débit d'alimentation en solution**

Ce paramètre permet de déterminer tout d'abord le volume de la solution de polymère consommé lors de l'électrofilage. Il a également un impact sur la taille des fibres, et plus particulièrement sur la porosité. A une tension donnée, la forme de cône à l'extrémité du capillaire ne peut être maintenue que si le débit de la solution à travers l'aiguille est suffisant pour remplacer la solution éjectée. Il faut donc qu'il y ait une corrélation entre la tension appliquée et le débit d'alimentation en solution pour obtenir le cône de Taylor et puis avoir un jet stable. En effet, si on augmente le voltage, sans varier le débit d'injection, il peut y avoir des instabilités de filage et même des ruptures dans le jet ce qui laisse apparaître des perles dans la structure finale des fibres. Megelski et *al.* [15] ont étudié les effets de changement de débit d'écoulement sur la structure des fibres électrofilées à partir de solution de polystyrène (PS) dans le tétrahydrofurane (THF). Ils ont démontré qu'une augmentation de débit peut engendrer à la fois une augmentation du diamètre des fibres et de la taille des pores.

- **Distance aiguille/ collecteur**

La distance entre l'extrémité de l'aiguille et le collecteur définit la force du champ électrique et le temps minimum à laisser aux filaments avant d'atteindre le collecteur pour que le solvant puisse s'en évaporer. Un collecteur trop éloigné signifie que la solution de polymère nécessite un temps de vol plus long pour que la solution soit étirée avant d'être déposée sur le collecteur [16,17], ceci peut conduire à une diminution du diamètre moyen des fibres [18] et l'apparition des perles dans le non-tissé formé [19, 20]. Cependant, il y a des cas où à plus longue distance, le

diamètre des fibres augmente. Ceci est dû à une diminution de l'intensité du champ électrostatique qui rend l'étirement du jet chargé assez difficile [21]. A l'inverse, si cette distance est trop courte, les fibres vont fusionner sur la surface du collecteur et ainsi provoquer une instabilité du jet qui donne naissance aux billes.

IV.1.2.3 Paramètres ambiants

La température et l'humidité de l'atmosphère dans laquelle est placé le dispositif d'électrospinning sont connues pour avoir une influence sur le processus de filage car elles influent sur la structure des nanofilaments obtenus, donc sur leurs propriétés.

- **Température**

La température de la solution a pour effet d'augmenter la vitesse d'évaporation du solvant et de réduire la viscosité de la solution de polymère. Par exemple, l'électrofilage du Polyuréthane (PU) à haute température conduit à la production de fibres avec un diamètre uniforme [7]. Hardick et *al.* [22] ont évalué l'électrofilage de l'acétate de cellulose en variant la température à l'intérieur du dispositif du filage. L'étude a montré une diminution du diamètre des fibres, pouvant être attribué à la réduction du degré d'enchevêtrement entre les chaînes polymériques et à la diminution de la viscosité des solutions à hautes températures. Il y a donc une relation inverse entre viscosité et température.

- **Humidité**

Le facteur ambiant le plus important qui peut influencer la morphologie des fibres électrofilées est l'humidité [23, 24]. Des chercheurs ont examiné l'impact de ce paramètre sur le filage par voie électrostatique. Baumgarten et *al.* [23] ont étudié les effets de changement d'humidité en allant de 30 à 40% sur la structure des fibres électrofilées à partir de solution de résine acrylique(12,5wt%) dans le DMF. Ils ont montré que lorsque l'humidité relative a été réduite à moins de 5%, le filage ne peut avoir lieu que seulement pendant 1 à 2 minutes car le solvant peut sécher rapidement et son évaporation extrêmement rapide peut se produire à la pointe de l'aiguille. A l'inverse, ils ont montré qu'en augmentant le taux d'humidité au-delà de 60%, la solution devient emmêlée avant d'atteindre le collecteur car elle n'a pas séché suffisamment créant ainsi des problèmes de filage. Par conséquent, il faut qu'il y ait une valeur optimale de l'humidité favorisant la production des fibres.

IV.2 Matériaux et appareillage utilisés en électrofilage

IV.2.1 Appareillage

Le système de production de nanofibres que nous avons utilisé est un dispositif de filage électrostatique entièrement conçu au Laboratoire de Rhéologie et Procédés dans l'équipe de Frédéric Bossard. Ce système est composé d'une seringue de 5 millilitres qui délivre la solution de polymère à la pointe de l'aiguille d'un diamètre de 400 à 700 micromètres située à la verticale du collecteur et d'une pousse seringue (KD Scientific series 200, USA) à débit réglable extérieur au dispositif de filage proprement dit. Le système de filage est vertical (prise en compte des forces de gravité). Un champ électrique à haute tension (± 25 kV) est assurée par un système de haute tension externe à la cabine. Le système est isolé par une enceinte en plexiglas pour éviter les phénomènes électriques parasites, ainsi que toute perturbation de courant d'air. Un ajustement très précis de la distance entre l'aiguille et le collecteur est rendu possible par un système de commande piloté par ordinateur. La plage de variation est comprise entre 2 et 50 cm. La densité de distribution des nanofilaments sur la plaque réceptrice sera définie, non seulement par le temps de production, mais aussi par la manière dont les filaments viennent se déposer sur le support. L'échelle de débit d'écoulement de la solution peut varier du $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'au $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Un système d'aspiration a été également ajouté afin d'extraire les vapeurs de solvant inhérentes au filage. Enfin, la température a été fixée à 22°C et l'humidité de l'atmosphère dans laquelle est placé le dispositif est égal à 25%.

IV.2.2 Matériaux utilisés

Les produits utilisés sont le Polyacrylonitrile (PAN), sous forme de poudre blanche pulvérulente de masse molaire moléculaire de $1,5 \text{ Tonne}\cdot\text{mol}^{-1}$ obtenu chez Sigma-Aldrich (France), des nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs) de diamètre de 9,5 nm et de pureté $> 95 \%$, obtenus chez «Nanocyl», et l'oxyde de graphène (GO) synthétisé au laboratoire. Le N, N-Diméthylformamide (DMF) extra-sec (eau < 50 ppm) a été utilisé comme solvant pour dissoudre le PAN, les MWCNTs et le GO.

IV.2.2.1 Polyacrylonitrile (PAN)

Le Polyacrylonitrile est un polymère très cohésif qui fait partie de la famille des acrylates.

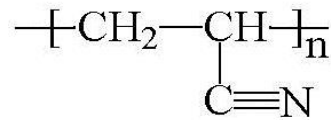


Figure IV.4. Formule chimique du Polyacrylonitrile (PAN)

Le Polyacrylonitrile se dégrade thermiquement vers 280°C sans fondre. Il est obtenu par polymérisation soit en solution aqueuse soit en émulsion. Le Polyacrylonitrile est l'un des polymères les plus utilisés dans l'électrospinning en raison de sa résistance élevée à la traction, de sa stabilité thermique et mécanique et d'une résistance à l'abrasion et aux solvants [25]. Les fibres Polyacryliques, obtenues à partir du PAN ont un grand potentiel pour diverses types d'applications dans le domaine du textile telles que les fibres de renforcement dans les matériaux composites de filtrage, et des matériaux absorbants mais aussi comme électrode de haute surface spécifique pour des applications de biocapteurs et de pile à combustible [26].

IV.2.2.2 N,N-Diméthylformamide (DMF)

Le N,N-Diméthylformamide est un solvant courant en chimie organique de formule HCO-N(CH₃)₂. Communément abrégé DMF, ce liquide incolore est miscible dans l'eau et dans la majorité des liquides organiques. Le DMF est un bon solvant pour l'électrofilage car il est polaire, il a une haute constante diélectrique de 38,3 et sa tension de surface est de 37,1mN.m⁻¹. C'est un solvant apolaire à bas point de fusion (-61 °C) et haute température d'ébullition (153 °C), utilisé couramment pour les réactions chimiques. En général, le DMF est le solvant le plus approprié pour la solubilisation et le traitement du PAN, des NTCs et de GO.

L'objectif principal de ce chapitre est d'incorporer des nano-objets comme les nanotubes de carbone et l'oxyde de graphène dans les fibres de polyacrylonitrile pour le développement de substrats utilisés dans des applications bioélectrochimiques. A partir du dispositif de filage, différentes solutions de PAN, PAN/NTCs et PAN/GO ont été filées et une structure fibreuse, composée de nanofilaments enchevêtrés, ou nanoweb, a été obtenue et analysée.

Ce chapitre se divise en trois sous parties: La première partie concerne la production de fibres à base de PAN et de nanotubes qui seront utilisées comme matériaux d'électrode pour la conception d'une cathode enzymatique capable de réduire le dioxygène. La deuxième partie concerne l'utilisation de ces fibres de PAN/NTCs pour le développement d'un biocapteur ampérométrique à base de Polyphénol oxydase pour la détection de catéchol. Dans la dernière partie de ce chapitre, nous avons introduit un autre type de nano-objets dans la formulation des fibres qui est l'oxyde de graphène. Le GO a été synthétisé, dans notre laboratoire et les fibres de PAN/GO et PAN/rGO ont été caractérisées par des méthodes microscopiques, spectroscopiques et électrochimiques.

IV.3 Préparation des fibres conductrices de NTCs pour application biocathode enzymatique

IV.3.1 Mise en forme des structures électrofilées en nanotubes de carbone

IV.3.1.1 Électrofilage du Polyacrylonitrile

Les solutions de PAN/DMF ont été préparées en dispersant différentes concentrations du polymère (PAN) dans le DMF. Celles-ci sont alors passées pendant 1 heure sous agitation mécanique puis chauffé à 80 ° C pendant 10 minutes pour bien homogénéiser le mélange et diminuer la viscosité du PAN.

Les paramètres de filage les plus influents sont la concentration des solutions de polymères, le voltage, la distance entre l'aiguille et le collecteur et le débit d'injection.

Chacun de ces paramètres influence de façon significative la morphologie des fibres obtenues par électrofilage, et une manipulation adéquate de ces paramètres permet d'obtenir des nanofibres de la morphologie et du diamètre désirés.

Le **tableau IV.1** présente le plan d'expériences avec les plages de variation des différents paramètres sélectionnés. Ce plan d'étude nous a permis de constater que les meilleures fibres obtenues sont celles correspondant à la combinaison 6 et présentant une concentration massique de polymère de 10 wt % dans le DMF, le tout rempli dans une seringue de diamètre égal à 0,5 mm et celle-ci est placée à environ 20 cm du collecteur couvert avec une feuille d'aluminium.

L'injection de la solution de polymère se fait à un débit de $0,5\text{mL.h}^{-1}$ et le voltage appliqué est de 20 KV.

Tableau IV.1. Plan d'essais des paramètres pour la détermination des principaux facteurs affectant la qualité des nanofibres

Essais	Concentration massique (wt%)	Débit (mL.h^{-1})	Voltage (kV)	Distance (cm)	Observations
1	5	1	20	20	gouttes
2	5	0.7	20	20	gouttes
3	5	0.3	25	10	gouttes
4	10	1	20	20	Fibres discontinues
5	10	0,7	20	20	Fibres discontinues
6	10	0,5	20	20	Fibres continues
7	10	0,3	25	20	Gouttes/fibres discontinues
8	10	0,3	20	20	Gouttes/fibres discontinues
9	15	0,3	25	20	Pas de filage
10	15	0,5	25	20	Pas de filage

Pour une faible concentration en polymère (5wt%), il a été impossible d'obtenir des fibres. On observe uniquement des gouttes de polymère. C'est à partir de concentrations de 10wt% que le filage est possible et que l'on obtient des structures fibreuses sous forme d'un tissu blanc **figure IV.5**. Les nanofilaments obtenus ont un diamètre moyen d'environ 280 nm. On constate que l'augmentation de la concentration à 15wt% induit une disparition de cône de Taylor et une discontinuité de l'électrofilage.



Figure IV.5. Photo d'un tissu de fibre de Polyacrylonitrile obtenu par électrofilage.

IV.3.1.2 Préparation des dispersions de NTCs dans des solutions de PAN

Suite à nos résultats avec le PAN, nous avons décidé de fabriquer un autre type de nanofibres, toujours par électrofilage, mais cette fois en incorporant des nanotubes de carbone dans les nanofibres. Pour que le filage soit correct, nous avons choisi d'intégrer directement les NTCs dans les solutions de filage. Pour cela, il est indispensable de réaliser une dispersion homogène et une répartition stable des nanotubes dans les solutions de polymère. Afin de répondre à ces exigences, nous avons mis en place un protocole de préparation comportant plusieurs étapes. Les solutions de filage sont préparées par dispersion d'une quantité contrôlée de nanotubes de carbone allant de 0,3 à 2% en poids dans des solutions PAN-DMF. Les étapes de préparations sont les suivantes :

- Incorporation des NTCs dans le DMF.
- Passage dans un bain à ultrasons de la solution NTCs/DMF pendant 15 min.
- Addition du PAN dans la solution colloïdale de NTCs/DMF.
- Agitation mécanique pendant 1 heure et chauffage de la solution NTCs/PAN/DMF (10 min/80°C).

La première étape d'incorporation des NTCs dans le DMF a pour objectif d'amorcer le mélange, tout en gardant une grande mobilité des nanotubes de carbone et ceci grâce à la faible viscosité du DMF (1mPa.s). Ensuite, vient l'étape de passage aux ultrasons qui est une étape obligatoire permettant de séparer les agrégats. Le temps aux ultrasons choisi est de 15 minutes répartis en trois fois 5 minutes chacune. L'addition du polyacrylonitrile entraîne l'augmentation de la viscosité, critère indispensable pour le procédé de filage électrostatique.

La dernière étape comme expliqué dans le paragraphe précédent, est l'agitation mécanique durant 1h suivie d'un chauffage à 80°C pendant 10 min permettant l'obtention des solutions avec des caractéristiques adaptées à la technique d'ES.

IV.3.1.3 Filage des solutions PAN/NTCs

Pour le filage des solutions de PAN chargées en NTCs, les conditions optimales ont légèrement changé par rapport à l'étude précédente. La distance entre l'extrémité de l'aiguille et le collecteur est fixée à 20 cm. Le débit d'alimentation de la solution PAN/NTCs/DMF est égal à 0,5mL.h⁻¹, mais la tension appliquée ici est de 25 kV. Les fibres formées ont été récoltées sur une feuille d'aluminium. Dans cette étude, notre objectif est d'introduire au maximum des nanotubes dans la solution de filage. Pour cela nous avons varié la concentration des NTCs au sein de la solution polymérique comme cela a été déjà fait avec les fibres de PAN et voir à quel point cela

peut affecter la stabilité du jet au cours du filage et par conséquent la structure de nanofilaments qu'on puisse obtenir.

Au niveau des résultats, les meilleures fibres sont obtenues à partir d'une concentration de 0,3 wt% en NTCs **figure IV.6**. Au-delà de cette concentration, la qualité des fibres produites ne correspond pas à nos attentes car elles présentent une discontinuité énorme, avec la formation de gouttelettes de polymères qui s'éjectent sur le collecteur.



Figure IV.6. Photo d'un tissu d'une fibre de PAN/NTCs fabriquée par électrofilage.

IV.3.1.4 Traitements thermiques des fibres

Malgré l'incorporation des nanotubes de carbone dans la formulation des nanofibres, il reste toujours possible d'améliorer d'avantage la conductivité électrique en jouant sur les propriétés chimiques du précurseur organique utilisé. Les fibres étudiées dans ce travail ont subi sous tension contrôlée deux types de traitement dont les étapes sont les suivantes :

- **Oxydation thermique:** Cette étape consiste à faire oxyder les fibres en les insérant dans l'étuve à une température comprise entre 200 et 300 °C, permettant d'améliorer leur résistance thermomécanique.
- **Carbonisation:** Le traitement de carbonisation qui s'effectue sous atmosphère inerte vient juste après l'étape d'oxydation. Il a pour but d'éliminer la majorité des hétéroatomes du polymère ou des nanotubes (azote, Oxygène, soufre...) et d'atteindre un taux de carbone très important de l'ordre de 95 à 97% en masse en faisant varier la température la température de carbonisation utilisée. Après ce traitement, les fibres deviennent plus légères étant donné qu'elles ont perdu à peu près 60% en masse [27]. Dans notre cas les nanofibres de PAN et PAN/ NTCs ont été carbonisées en coopération avec Cecile Rossignol au Laboratoire LEPMI. Nous avons varié la température de chauffage de 700°C jusqu'à 850°C pendant 1 heure avec un débit de 1°C.min⁻¹ sous argon et 3% H₂. Au cours de ces différentes étapes de traitement, un changement de la couleur des fibres a été observé avec un passage du blanc (fibres de PAN) au gris (fibre de

PAN/NTCs) et noire après la carbonisation. Ci-dessous une photo présentant un tissu de fibre de PAN/NTCs carbonisée à 850 °C **figure IV.7**.



Figure IV.7. Photo d'un tissu d'une fibre de PAN/NTCs après carbonisation

IV.3.1.5 Caractérisations des fibres de carbone

IV.3.1.5.a Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Les structures non-tissés ainsi que la morphologie de surface des nanofibres ont été examinées par microscopie MEB afin de vérifier leur homogénéité et déterminer leur diamètre moyen. Pour observer l'influence des NTCs sur la morphologie, les nanofilaments composites sont systématiquement comparés à un échantillon témoin de PAN qui présente une structure composée de nanofibres homogènes et de diamètre régulier **figure IV.8.a**.

L'ajout des NTCs semble modifier la morphologie de surface des nanofibres composites **figure IV.8.b**. On observe de gros agrégats de nanotubes mal dispersés qui créent des inhomogénéités à la surface. A partir de ces observations MEB, nous avons déterminé le diamètre moyen des fibres produites, qui est de l'ordre de 280 nm, une valeur qui se rapproche de celles de la littérature [26].

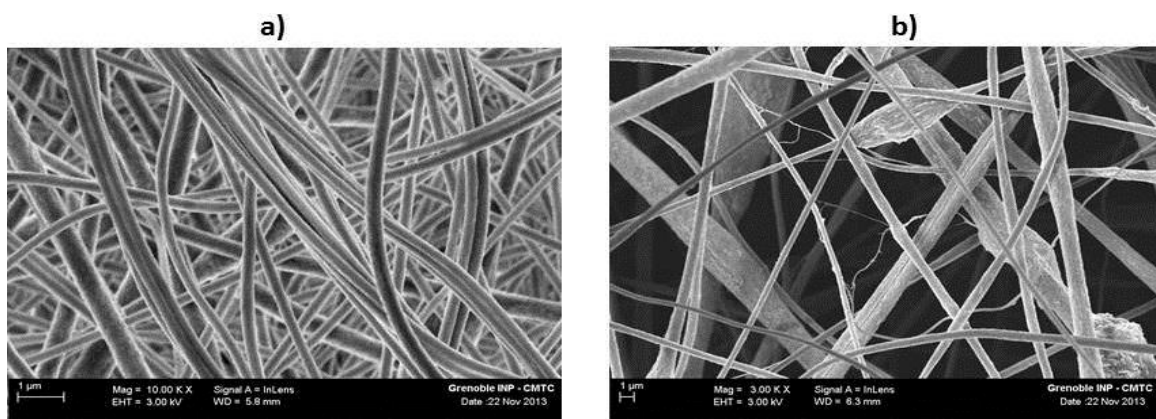


Figure IV.8. Images MEB de fibres obtenues par électrofilage. a) fibres PAN. b) fibres PAN/NTCs. Echelle: 1µm.

La morphologie des nanofibres électrofilées traités à 850°C a été également observée par MEB. La **figure IV.9** montre les images des nanofibres de PAN et de PAN/NTCs après recuit. Au cours de la conversion chimique des nanofibres électrofilées en nanofibres carbonisées, le diamètre moyen des fibres diminue de 280 nm à 180 nm. Cela est bien évidemment dû à la perte en masse pendant le recuit. Bien que la texture des fibres de PAN ne semble pas être affectée par cette étape de traitement thermique, les fibres composites PAN/NTCs montrent une structure coulée et la surface apparaît légèrement épaissie.

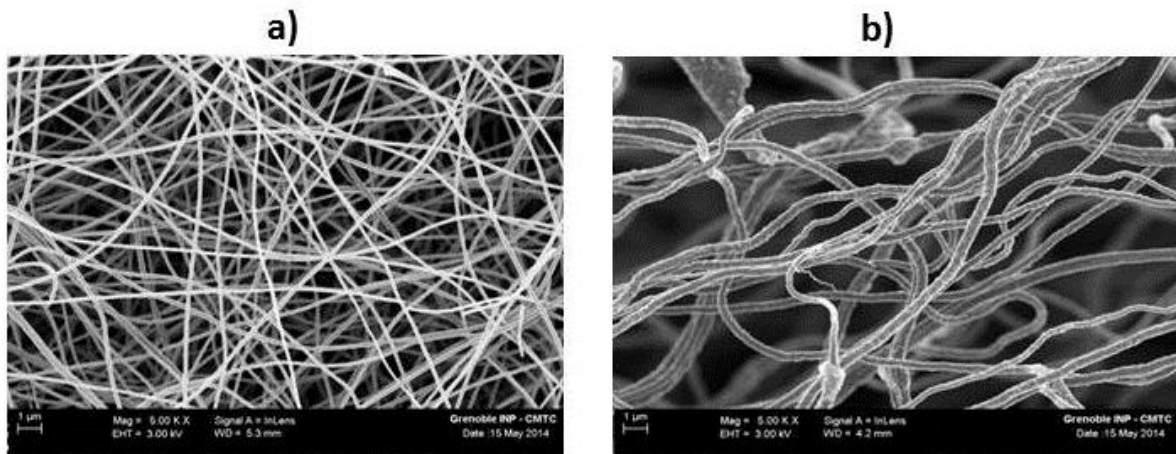


Figure IV.9. Images MEB de fibres électrofilées obtenues après carbonisation. a) fibres PAN. b) fibres PAN/NTCs. Echelle: 1µm.

IV.3.1.5.b Mesure de la conductivité des nanofibres de PAN/NTCs

Les mesures de la résistance électrique en fonction de la température de chauffage ont été effectuées pour tous les échantillons en utilisant la méthode de quatre points.

Les résultats sont présentés dans le **tableau IV.2** et montrent l'évolution de la conductivité en fonction de la température de traitement thermique. Et les valeurs moyennes de cinq échantillons provenant d'une même fibre.

Tableau IV.2. Evolution de la conductivité électrique en fonction de la température de carbonisation

Electrode	Epaisseur (μm)	Résistance électrique (Ω)	Conductivité électrique (S.cm ⁻¹)
Fibre de PAN (850°C)	23	986	2
Fibre de PAN/NTCs (700°C)	117	42	9,14
Fibre de PAN/NTCs (800°C)	132	18,7	18,4
Fibre de PAN/NTCs (850°C)	227	7,4	25,63

Les résultats montrent que l'augmentation de la température de chauffage entre 700 et 850°C avec une même période de traitement entraîne l'augmentation de la conductivité électrique des fibres. Ceci s'explique par l'amélioration de la structure graphitique des nanofibres de carbone caractérisée par une densité de points de contact plus élevée et plus ordonnée. Pour conclure sur ce point, les fibres traitées à 850°C et qui possèdent une conductivité électrique de 26 S.cm⁻¹ ont été choisies comme électrodes de travail pour la suite des mesures.

IV.3.1.5.c Mesure de la surface spécifique

Des mesures d'adsorption-désorption d'azote ont permis de calculer la surface spécifique ($S_{spéc}$) des fibres de PAN/NTCs carbonisées à 850°C grâce à la méthode BET. Cette $S_{spéc}$ est égale à 156 m².g⁻¹ et la taille des pores varie entre 10 nm et 55 nm.

IV.3.1.5.d Caractérisation électrochimique des fibres

Dans cette étude, deux fibres en PAN et en PAN/NTCs carbonisées à 850°C et possédant une surface géométrique de 1cm² ont servi d'électrode de travail dans une cellule électrochimique à trois électrodes utilisant une électrode de référence au calomel saturée (ECS) et une grille de platine comme contre-électrode. L'électrolyte utilisé est une solution de KCl (0,1 mol.L⁻¹) contenant une sonde redox [Ru^{II}(NH₃)₆]Cl₂ à la concentration 10⁻³ mol.L⁻¹. La sonde redox a été caractérisée par voltampérométrie cyclique (CV) entre -0,5 et 0,1 V à 2 mV.s⁻¹. Les CVs de la **figure IV.10** montrent que l'intensité de courant d'oxydation du Ru^{II} en Ru^{III} sauvegardées sur des fibres de PAN/NTCs carbonisées est cinq fois plus grande que celle des fibres de PAN carbonisée. Ce résultat est lié principalement à l'augmentation de la conductivité

des nanofibres suite à l'incorporation des nanotubes de carbone dans la formulation des fibres électrofilées.

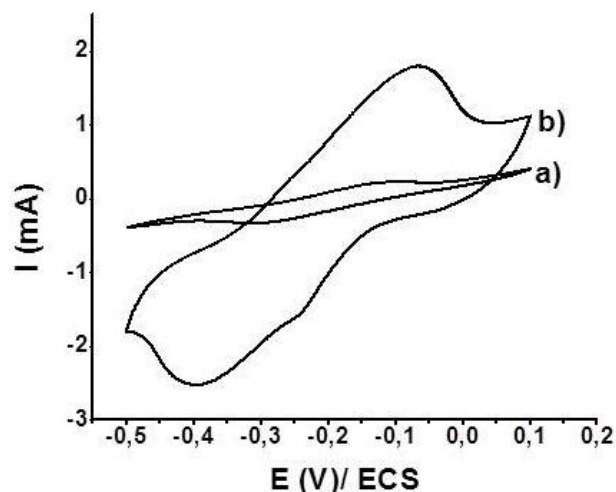


Figure IV.10. CV d'une solution $[Ru^{II}(NH_3)_6]Cl_2(1\text{mmol.L}^{-1})$ dans une solution $H_2O+KCl(0,1\text{mol.L}^{-1})$ sur des fibres ($S= 1\text{cm}^2$) préparées par électrofilage et carbonisées à 850°C **a)** PAN et **b)** PAN/NTCs, vitesse de balayage = 2mV.s^{-1} .

IV.3.2 Nanofibres de carbone pour biopiles enzymatiques

IV.3.2.1 Préparation des biocathodes

Quatre configurations d'électrodes enzymatiques ont été réalisées par immobilisation de la laccase de *Trametes Versicolor* via une fonctionnalisation covalente et non covalente des nanofibres de carbone. Le procédé ainsi établi doit permettre un transfert d'électrons direct en présence de la fonction diazonium et un transfert d'électron médié utilisant le Bis-pyrene-ABTS. L'originalité de notre démarche réside dans le design des électrodes mis en œuvre pour l'élaboration de la biocathode. Des nanofibres carbonisées (NFC) (850°C , 1h), ayant 1cm^2 de surface géométrique ont été testés séparément dans une solution de tampon phosphate ($0,1\text{mol.L}^{-1}$, pH 5) pour déterminer la catalyse de la réduction d' O_2 :

- La première biocathode correspond à des électrodes modifiées après incubation dans une solution de laccase (5mg.mL^{-1}) pendant 1 heure ce qui donne lieu à des biocathodes de type NFC/Laccase. Dans ce cas, l'enzyme est connectée à la surface extérieure des NFC par simple adsorption physique.
- La deuxième biocathode correspond à des NFC modifiées par électrodéposition de 4-carboxyphényldiazonium (4-CPD) à la surface des fibres. Cette étape est suivie par l'incubation dans une solution aqueuse contenant 1 mL de laccase (5mg.mL^{-1}) et 1mL de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthyl-carbodiimideHydrochloride (EDC) (10mmol.L^{-1}). L'électrode est nommée NFC/CPD/Laccase. Les électrodes ont été ensuite maintenues pendant 2 h à température ambiante pour former une liaison covalente entre la fibre et l'enzyme.

- La troisième biocathode consiste à incuber les NFC/CPD/Laccase dans une solution de 2 mL de DMF contenant du Bis-pyrene-ABTS ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) pendant 1heure donnant des biocathodes NFC/CPD/Laccase-Bis-pyr-ABTS.
 - La quatrième série consiste à tester les électrodes de la deuxième série dans une solution de tampon phosphate ($0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH5) contenant $50\ \mu\text{L}$ d'ABTS en solution.
- Le schéma IV.1 présente les différentes formulations des biocathodes enzymatiques préparées.

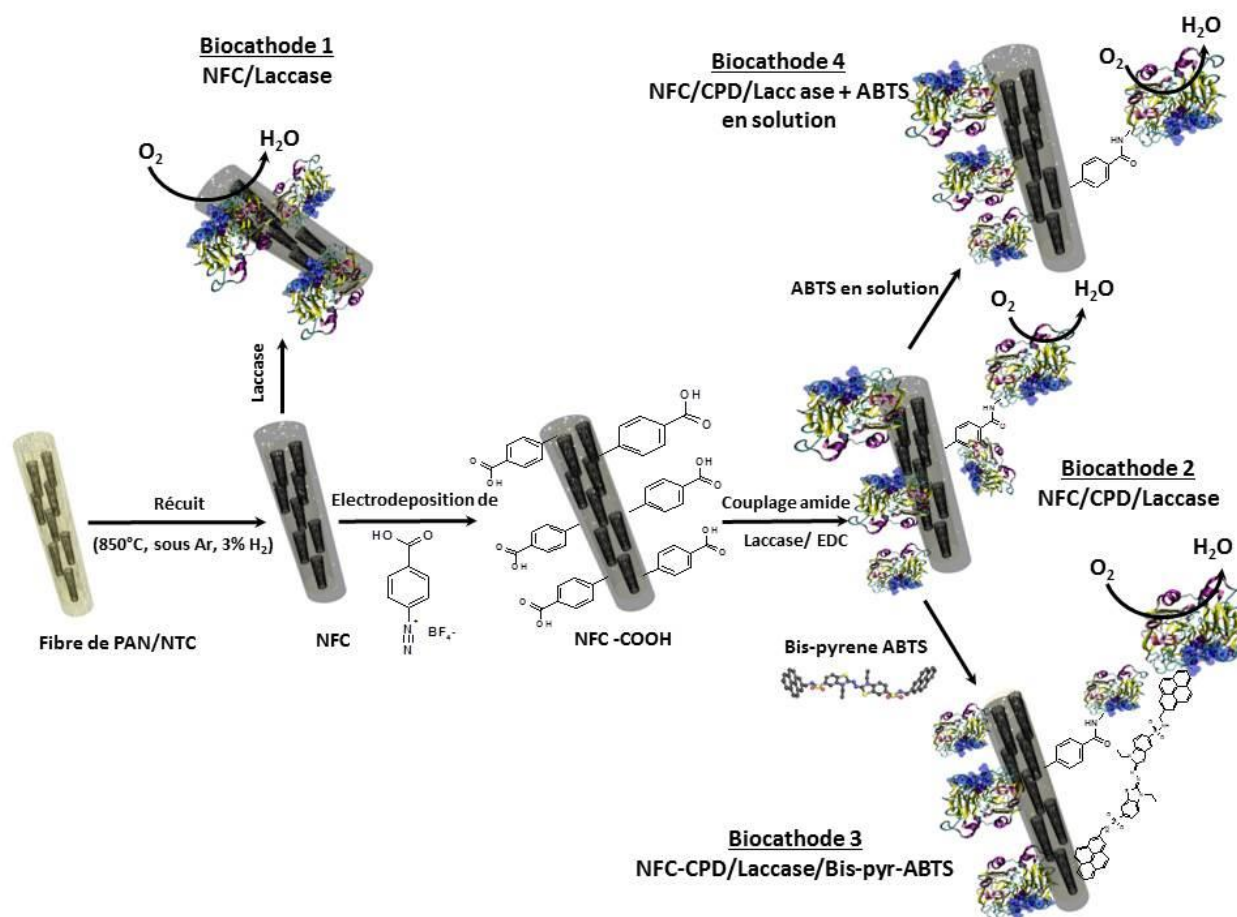


Schéma IV.1. Résumé de mode de préparation des biocathodes enzymatiques à partir des nanofibres de carbone électrofilées

Les quatre types de NFC sont utilisées comme électrode de travail immergée dans une solution d'acétonitrile (MeCN) contenant le 4-CPD ($1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) avec Bu_4NPF_4 ($0,1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) comme électrolyte support. La surface a été modifiée par cyclage successif des potentiels entre 0.4 et -0.4V. L'électrode Ag/Ag⁺ (un fil d'argent plongeant dans une solution de MeCN contenant le sel d'argent AgNO_3 ($0,1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)) est prise comme système de référence des potentiels. La vitesse de balayage est de $5\ \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Durant le balayage en potentiels, le sel de diazonium en solution est réduit sur l'électrode par le transfert d'un électron suivi par de la libération d'une molécule d'azote, et le radical aryle formé à la surface de l'électrode va former

une liaison covalente. Après modification, les électrodes sont retirées du mélange (diazonium/solvant/sel) et rincée à l'eau distillée pour éliminer les molécules phényles non adsorbées à la surface de l'électrode.

Les électrodes sont ensuite conservées à 4°C dans un tampon phosphate 0,1mol.L⁻¹, pH=5 à 4 °C pour une utilisation ultérieure.

IV.3.2.2 Effet du nombre de cycle lors de la polymérisation sur les performances de la biocathode

L'influence du nombre de cycle lors de la modification de la surface des NFC par le 4-CPD, pour l'élaboration des électrodes fonctionnalisées avec des fonctions carboxyliques, a été menée en déterminant la réponse de la bioélectrode vis-à-vis à la réduction d'oxygène. Ceci a été réalisé pour les biocathodes NFC/CPD/laccase. L'étude se fait notamment par chronoampérométrie par la mesure du courant de réduction de l'oxygène en fonction du temps à potentiel fixe (+0.2 V vs ECS) dans une solution de tampon phosphate à pH 5 **figure IV.11**.

Quatre électrodes NFC/CPD/laccase ont été modifiées par électrodéposition du 4-carboxyphényldiazonium par balayage du potentiel pour 1, 5, 10 et 20 cycles puis incubées dans un mélange de (laccase + EDC) pendant une heure. Cette incubation permet un couplage amide entre les fonctions acides de l'électrode et l'enzyme. Pour 5 cycles de balayage, nous avons obtenu une densité de courant de 135 µA équivalente à 65 µA.cm⁻² à 0,2 V. Les autres conceptions utilisant 1, 10 et 20 cycles conduisent à des plus faibles densités de courant. On peut donc conclure qu'au-delà de 5 cycles de balayage, on obtient une couche fonctionnelle trop épaisse ce qui rend le transfert électronique entre l'électrode et l'enzyme difficile. Par conséquent, 5 cycles de balayage en voltamétrie cyclique entre 0.4 et -0.4V vs. ECS ont été choisis dans la suite de ce travail.

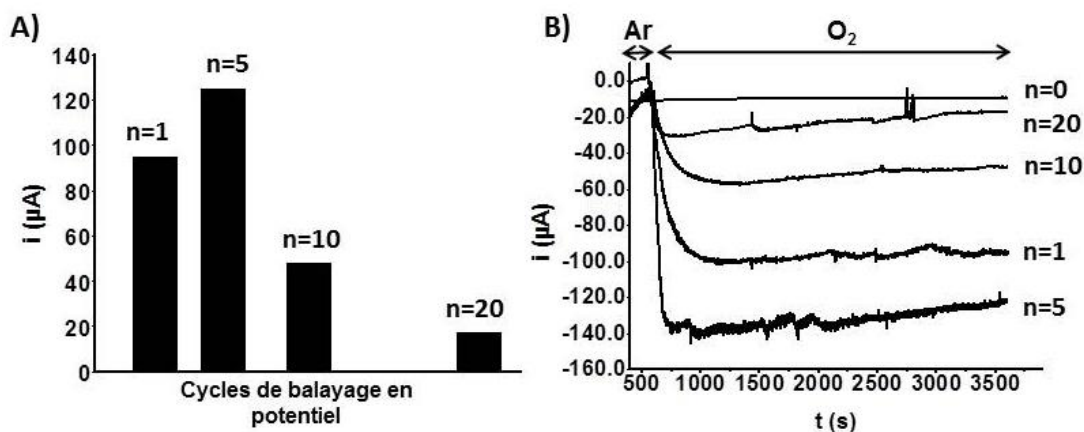


Figure IV.11. a) Diagramme présentant les courants catalytiques obtenus avec les différentes biocathodes en fonction de nombre de cycles de balayage en potentiel **b)** Chronoampérométrie (sous Ar puis sous O_2) de ces électrodes. Les mesures sont effectuées dans une solution aqueuse de tampon phosphate (0.1mol.L^{-1} , pH 5) à 0,2 V vs. ECS.

IV.3.2.3 Etude électrocatalytique des biocathodes

Les biocathodes étudiées ont été préparées selon la procédure citée précédemment. L'objectif étant de démontrer et de comparer les performances de chaque électrode pour la réduction de l'oxygène. Dans le cas où la laccase est directement adsorbée à la surface des nanofibres, en présence d' O_2 , les densités de courant de réduction mesurées sont de l'ordre de quelques $\mu\text{A.cm}^{-2}$ **figure IV.12.a**. La raison pour laquelle cette bioélectrode n'a pas donné de bonnes performances est que les NFC ne possédant pas assez de groupements π conjugués ou des parties hydrophobes rendant ainsi l'immobilisation de la laccase à la surface des nanofibres difficile.

Dans le but d'améliorer l'ancrage et la connexion de l'enzyme sur les NFC, ces électrodes ont été modifiées chimiquement par électrodéposition du 4-carboxyphényldiazonium comme liant entre les nanofibres de carbone et la laccase via un couplage amide. Cette fonctionnalisation covalente entraîne une forte augmentation de la densité de courant de réduction ($65 \mu\text{A.cm}^{-2}$) **figure IV.12.b** par rapport à la configuration précédente confirmant l'hypothèse de la disponibilité des groupements phényles à la surface des fibres capables de connecter et d'orienter la laccase immobilisée soit par liaison covalente soit par adsorption via une interaction hydrophobe entre le centre rédox de cette enzyme et les groupements phényles adsorbés ce qui favorise un transfert d'électron direct entre l'enzyme et l'électrode.

Nous avons par ailleurs testé ces bioélectrodes dans une solution de tampon phosphate en présence d'un médiateur redox ABTS afin d'estimer le rapport entre l'enzyme immobilisée et l'enzyme connectée aux NFC. Les biocathodes obtenues montrent une augmentation de la densité de courant **figure IV.12.d**, qui est deux fois supérieur à la configuration précédente

(NFC/CPD/Laccase) ($150 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$). Ce résultat montre que seulement 43% d'enzyme sont correctement orientées sur l'électrode et capables d'effectuer un transfert d'électrons direct au cours de la réduction de l'oxygène moléculaire. Mais, l'utilisation de l'ABTS en solution n'est pas adéquate pour le développement des bioélectrodes censées d'être intégrées dans des circuits électroniques. Dans ce contexte, nous avons les fibres modifiées avec le Bis-pyrène ABTS. Avec cette configuration de bioélectrodes, les densités de courant catalytiques obtenues sont égales à $100 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ **figure IV.12.c**. En comparant les densités de courant obtenues pour les différentes configurations de bioélectrodes on constate que seulement 1/3 d'enzymes immobilisées restent non connectées et cela est dû probablement à une orientation défavorable de la laccase sur l'électrode.

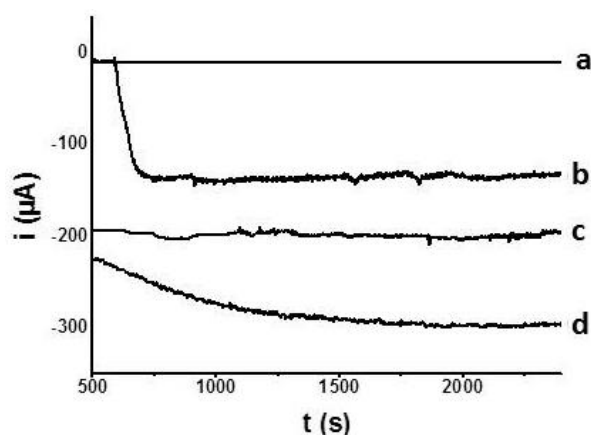


Figure IV.12. Mesures de chronoampérométrie à 0,2 V vs. ECS des biocathodes **a)** NFC/laccase **b)** NFC/CPD/laccase **c)** NFC/CPD/laccase/Bis-pyr-ABTS et **d)** NFC/CPD/laccase en présence d'ABTS en solution. Les mesures sont effectuées dans une solution de tampon phosphate ($0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH5), sous O_2 .

IV.3.3 Conclusion

Nous avons réalisé des nanostructures PAN/NTCs par électrofilage. Puis, nous avons carbonisé ces nanofibres qui ont subi un traitement thermique permettant d'améliorer la conductivité électrique et la stabilité structurale de ces électrodes. Nous avons ensuite fonctionnalisé ces NFC avec des groupements phényle permettant d'immobiliser la laccase à la surface de l'électrode. Afin d'améliorer les performances de la biocathode, nous avons introduit un médiateur redox (Bis-pyrène ABTS) dans la composition de l'électrode ce qui a permis d'effectuer un transfert d'électrons médiaté et d'augmenté le nombre d'enzymes connectées.

IV.4 Développement d'un biocapteur à catéchol à base de fibres électrofilées de PAN/NTCs

A partir des résultats obtenus précédemment avec les nanostructures électrofilées, nous avons décidé de réutiliser ces nanofibres de PAN/NTCs pour développer un biocapteur à catéchol en privilégiant principalement la fonctionnalisation covalente de ces matériaux fibreuses. Dans ce but, nous nous sommes particulièrement intéressés tout d'abord à la conversion des groupements cyanures du Polyacrylonitrile en groupements amines capables d'interagir ensuite avec l'enzyme de Polyphénol oxydase via la formation d'une fonction imine.

Dans cette partie, nous présenterons les fibres de PAN/NTCs modifiées chimiquement après différents temps de réduction. Suivant cette stratégie, nous exploiterons l'interaction entre la PPO et les fibres modifiées pour développer des biocapteurs à catéchol.

IV.4.1 Réduction chimique des fibres de PAN/NTCs

La réduction chimique des fibres de PAN/NTCs en fibres PAN-NH₂/NTCs est réalisée suivant le schéma réactionnel **schéma IV.2**, en dispersant 500 mg de tétrahydroaluminate de lithium (LiAlH₄) dans 100 mL d'éther diéthylique (DET). Une quantité équivalente de fibres de PAN/NTCs (500 mg) est ensuite ajoutée à la solution sous atmosphère d'azote à température ambiante. L'évolution de la réaction est contrôlée à deux temps différents (1 heure et 4 heures). Deux feuilles en nanofibres sont obtenues en filtrant sous vide la dispersion obtenue à travers une membrane en PTFE. Les fibres réduites pendant 1 heure, sont nommées (PAN-NH₂(1h)/NTCs) et celles réduites pendant 4 heures sont nommées (PAN-NH₂ (4h)/NTCs). Ces électrodes sont ensuite rincées plusieurs fois avec l'eau afin d'éliminer les traces de réducteur et d'éventuelles impuretés, retirées délicatement de la membrane, puis séchées sous vide à une température égale 60°C pendant 5 heures en évitant la déformation du film de fibres formé.

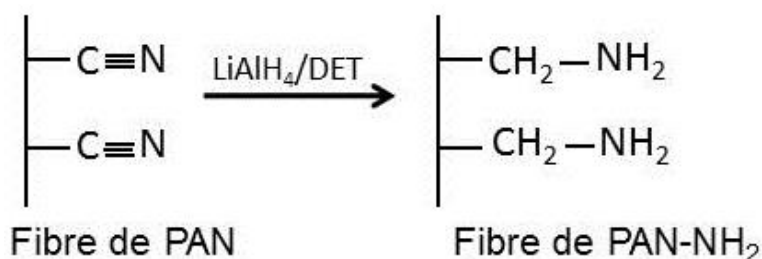


Schéma IV.2. Réduction chimique des fibres de PAN en fibres PAN-NH₂

Après la réduction des groupements cyanures en groupements amines primaires, nous avons observé un changement de la morphologie des fibres. On constate un gonflement après traitement

chimique par voie humide et séchage ultérieur. La photo ci-dessous **figure IV.13** présente un tissu d'une fibre de PAN-NH₂(4h)/NTCs.



Figure IV.13. Photo d'un tissu d'une fibre de PAN-NH₂/NTCs

IV.4.2 Caractérisations des fibres

IV.4.2.a Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Comme indiqué précédemment, les fibres de PAN/NTCs possèdent un diamètre moyen de l'ordre de 280 nm allant de 200 à 400 nm tout au long de l'échantillon. Pour des nanostructures PAN-NH₂(4h)/NTCs, le diamètre moyen des fibres est égal à 470 nm allant de 400 à 600 nm. Cette évolution peut être attribuée à la présence d'eau dans les fibres qui devrait augmenter leur caractère hydrophile et entraîne donc leur gonflement. Cet aspect a pour conséquence de rendre les nanotubes présents dans le matériau plus accessible à l'électrolyte et donc augmenter la surface électroactive de la fibre. La **figure IV.14** ci-dessous présente des images MEB caractérisant des fibres de PAN/NTCs avant et après réduction chimique ainsi que le diagramme présentant le diamètre moyen de chaque type de fibres.

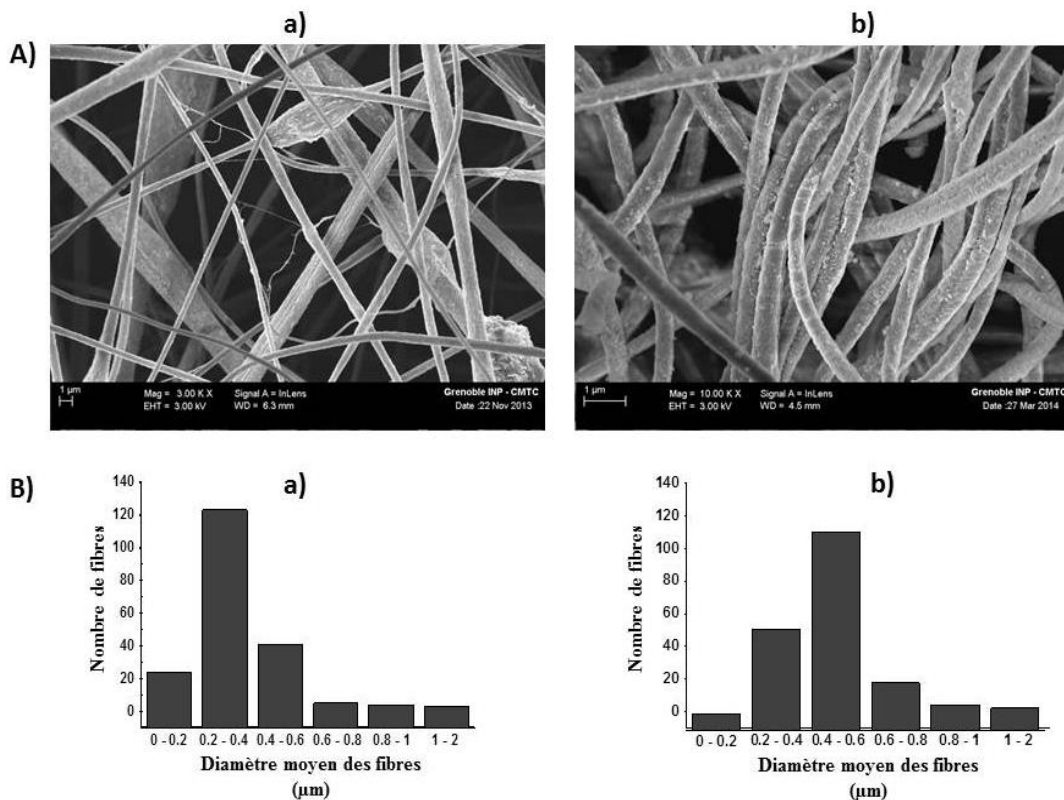


Figure IV.14. A) Images MEB caractéristiques des fibres PAN/NTCs **a)** avant et **b)** après réduction chimique. Echelle: 1 μm. B) Diagramme présentant le diamètre moyen des fibres de PAN/NTCs **a)** avant et **b)** après réduction chimique.

IV.4.2.b Caractérisation par Spectroscopie Infrarouge (FTIR)

L’Infrarouge FTIR (en anglais, Fourier Transform Infrared Spectroscopy), permet de révéler la structure chimique d’un échantillon inconnu. Il est aussi possible, par cette technique, de remonter à des traces de solvant liées à une évaporation incomplète de ce dernier lors du filage.

Cette analyse est basée sur l’excitation des liaisons moléculaires d’un échantillon par des radiations infrarouges (2,5 à 50 μm) de fréquences comprises entre 4000 et 200 cm⁻¹. Des absorptions spécifiques situées dans cette gamme de fréquence permettent d’obtenir des informations riches sur la structure chimique des composés. Lorsque la fréquence du rayonnement est égale à celles des vibrations des fonctions chimiques, toute ou une partie de l’énergie de la radiation émise sera transmise à la liaison. Les bandes de transmission sont alors caractéristiques des vibrations d’élongation (symétrique ou asymétrique) et des vibrations de déformation angulaire: rotation plane, cisaillement, balancement et torsion. Dans cette étude, les analyses FTIR ont été réalisées sur un appareil de type Nicolet ‘Magna 550’ spectrometer ATR. Toutes les analyses ont été effectuées à la température ambiante et les échantillons ont été utilisés sous forme de poudres.

Cette technique a été utilisée pour analyser les fibres: PAN/NTCs, PAN-NH₂(1h)/NTCs et PAN-NH₂(4h)/NTCs et suivre l'évolution des bandes caractéristiques des fonctions nitriles et amines en fonction de temps de réduction sur une plage de mesure allant de 4000 à 400 cm⁻¹. Les résultats sont donnés ci-dessous.

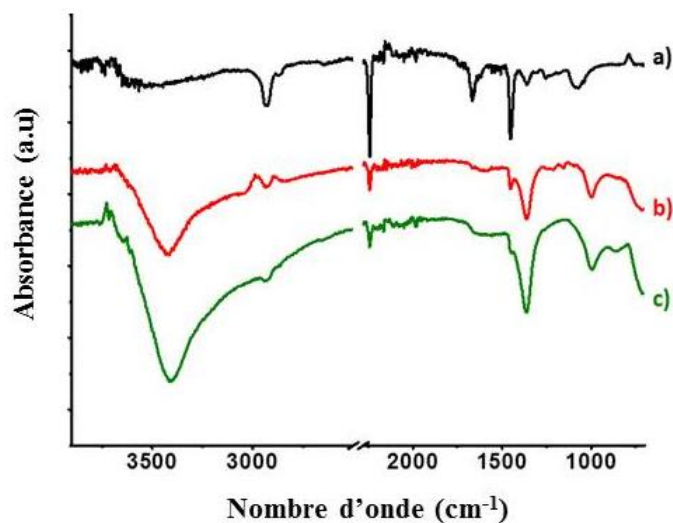


Figure IV.15. Spectres Infrarouge des fibres: **a)** PAN/NTCs, **b)** PAN-NH₂(1h)/NTCs et **c)** PAN-NH₂(4h)/NTCs.

Une bande de vibration d'élongation à 2244 cm⁻¹ permettent de caractériser les nitriles de PAN. Cette bande est plus intense dans le premier spectre correspondant aux fibres PAN/NTCs **figure IV.15. a**. Les vibrations d'élongation et de déformation de la liaison (H-C-H) sont caractérisées par les bandes de fréquences vers 2932 cm⁻¹ et 1456 cm⁻¹ respectivement. La double liaison (C=C) est caractérisée par un pic à 1667cm⁻¹correspond à l'élongation de cette liaison et indique la présence d'acrylonitrile non polymérisé en supposant l'absence de carbonyles dans la composition des fibres.

L'analyse par infrarouge (FTIR) des fibres de PAN/NTCs après réduction chimique à l'aide de LiAlH₄ pendant 1 h **figure IV.15. b**, montre la présence d'une bande d'élongation à 3415 cm⁻¹ caractéristique de la liaison (N-H), une bande autour de 1367cm⁻¹ signale les vibrations d'élongation de la liaison simple (C-N) et une diminution de l'intensité du pic caractéristique de nitrile à 2244 cm⁻¹.

Pour des fibres PAN/NTCs réduites pendant 4 heures **figure IV.15.c**, on observe une bande d'absorption à 3415 cm⁻¹ intense, attribuable aux fonctions amines et une diminution plus prononcée de l'intensité du pic caractéristique de nitrile à 2244 cm⁻¹ traduisant bien la réduction des groupements nitriles en amine primaire.

IV.4.2.c Caractérisation électrochimique

La caractérisation du comportement électrochimique de $K_4Fe(CN)_6$ sur des nanofibres PAN/NTCs avant et après réduction a été réalisée par la voltampérométrie cyclique. La fibre est utilisée en tant qu'électrode de travail de surface géométrique égale à 1 cm^2 connectée à l'aide d'une pince crocodile. Cette partie étant ensuite immergée dans un électrolyte KCl (1 mol.L^{-1}) contenant $10^{-2}\text{ mol.L}^{-1}$ de $K_4Fe(CN)_6$. Un balayage de potentiel a été effectué entre $-0,6$ et $0,4\text{ V}$ vs. ECS avec une vitesse de balayage de 2 mV.s^{-1} . Le CV présenté sur la **figure IV.16.a** montre l'intensité de courant d'oxydation du $Fe(CN)_6^{4-}$ en $Fe(CN)_6^{3-}$ sur une fibre PAN/NTCs. Le système rédox est composé d'un pic d'oxydation et d'un pic de réduction respectivement à $+0,18$ et $-0,35\text{ V}$ vs ECS. La caractérisation électrochimique de la sonde rédox a été réalisée également sur les fibres, PAN-NH₂(1h)/NTCs et PAN-NH₂(4h)/NTCs. Cette étude permet d'évaluer l'efficacité de la modification chimique subite par les fibres. Dans le cas d'une fibre réduite pendant 1 heure **figure IV.16.b**, on observe une augmentation de l'intensité du courant des pics associé à une légère diminution de la séparation entre les pics (ΔE) de $0,58\text{ V}$ à $0,48\text{ V}$. Cela peut être attribué à une amélioration de transfert d'électrons à travers l'électrode. Sur les fibres PAN-NH₂(4h)/NTCs, **figure IV.16.c**, les courants d'oxydation des espèces en solution sont plus élevés que dans la configuration précédente. En effet, il semble que les électrodes modifiées ont été protonées à pH 5, entraînant le gonflement des fibres et un accès plus facile aux NTCs. L'apparition de deux pics rédox à $+0,32$ et $-0,52\text{ V}$ vs ECS peut être attribuée aux interactions électrostatiques entre la sonde redox chargée négativement et les fibres protonées à pH 5.

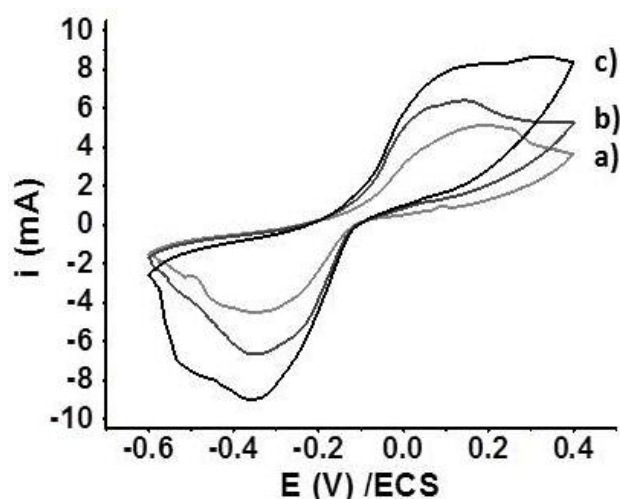


Figure IV.16. CV d'une solution de $K_4Fe(CN)_6$ ($10^{-2}\text{ mmol.L}^{-1}$) dans une solution de H_2O+KCl (1 mol.L^{-1}) sur des fibres ($S=1\text{ cm}^2$) de **a**) PAN/NTCs, **b**) PAN-NH₂(1h)/NTCs et **c**) PAN-NH₂(4h)/NTCs, $V=2\text{ mV.s}^{-1}$.

IV.4.3 Application au développement de biocapteur à catéchol

IV.4.3.1 Préparation des bioélectrodes

Après avoir réussi l'électrofilage du PAN/NTCs et obtenu un tapis de nanofibres réduites, notre approche consiste à réaliser un biocapteur à base de PAN-NH₂/NTCs en immobilisant la Polyphénol oxydase à la surface des nanofibres. Deux électrodes en nanofibres réduites à 1 heure et à 4 heures ont été activées par exposition à une solution de glutaraldéhyde (25% dans l'eau) sous forme vapeur pendant une demi-heure, qui permet la réticulation des biomolécules à la surface d'un support solide ou à d'autres biomolécules. Cette méthode de couplage est basée sur la réaction des groupements fonctionnels de l'agent réticulant avec les groupements amines des fibres afin de les activer **schéma IV.3. A**. Ces dernières vont servir pour le greffage chimique des enzymes via la formation d'une liaison imine **schéma IV.3. B**. Ce couplage aboutit à des bioélectrodes stables, mais les biomolécules immobilisées perdent une partie de leur activité du fait de la rigidification de la structure tridimensionnelle.

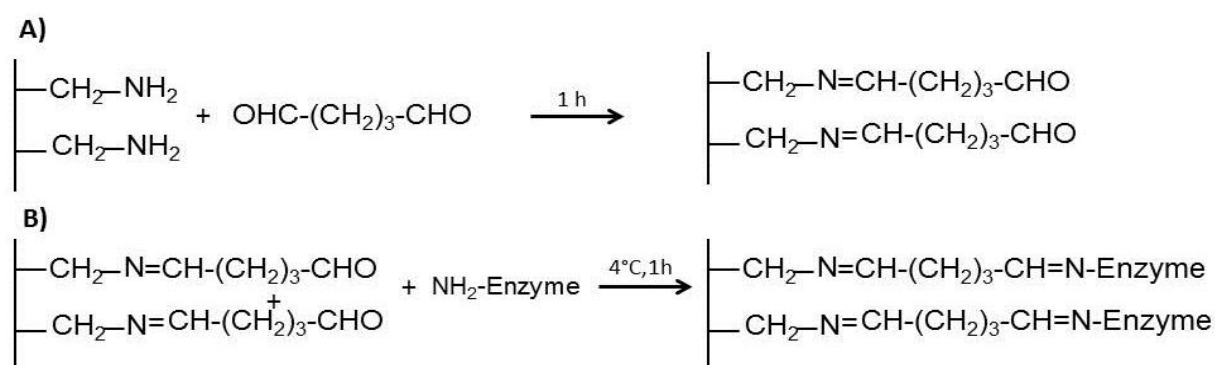


Schéma IV.3. A) Activation des fibres réduites en utilisant le glutaraldéhyde, **B)** Couplage entre les fibres activées et l'enzyme.

Suite à deux lavages successifs dans le tampon phosphate (0.1mol.L⁻¹, pH 6,5), les électrodes ont ensuite incubées dans 500 µL d'une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L⁻¹, pH 6,5) contenant 0,3 mg.mL⁻¹ polyphénol oxydase (PPO) et maintenues à 4°C pendant une nuit. Avant utilisation, les bioélectrodes ont été rincées deux fois avec du tampon phosphate (0,1mol.L⁻¹, pH 6,5) afin d'éliminer les protéines adsorbées non-spécifiquement.

La caractérisation analytique de ces bioélectrodes pour la détection de catéchol a été réalisée par des mesures ampérométriques dans un tampon phosphate (pH 6,5) par application d'un potentiel constant de -0,2 V vs ECS dans une solution de tampon phosphate (0,1mol.L⁻¹; pH 6,5; T= 25 °C) permettant la réduction de o-quinone enzymatiquement généré.

IV.4.3.2 Résultats expérimentaux sur les performances du biocapteur à catéchol

Lors des injections de catéchol (ortho-phénol) et en présence d'O₂, la polyphénol oxydase produit de l'ortho-benzoquinone qui va alors être réduite à l'électrode à E = - 0,2 V vs ECS. L'ajout de 100 µL d'une solution de catéchol à 10⁻³ mol.L⁻¹ est représenté sur la **figure IV.17.A**; nous observons que le temps de réponse de l'électrode, de l'ordre de 10 s, est relativement rapide. La courbe d'étalonnage résultant de ces injections successives **figure IV.17.B** présente une évolution caractéristique aux biocapteurs enzymatiques. La sensibilité du biocapteur ainsi que la densité du courant maximale obtenues ont été normalisées en considérant que les deux faces du matériau ont été modifiées ce qui donne une valeur de surface géométrique de 2 cm² d'où une sensibilité et une densité de courant maximale de 24 mA.cm⁻².mol⁻¹.L et 3,11 µA.cm⁻² respectivement, dans le cas des fibres PAN-NH₂(1h)/NTCs, et de 59 mA.cm⁻². mol⁻¹.L et 5,33 µA.cm⁻² dans le cas des fibres PAN-NH₂(4h)/NTCs.

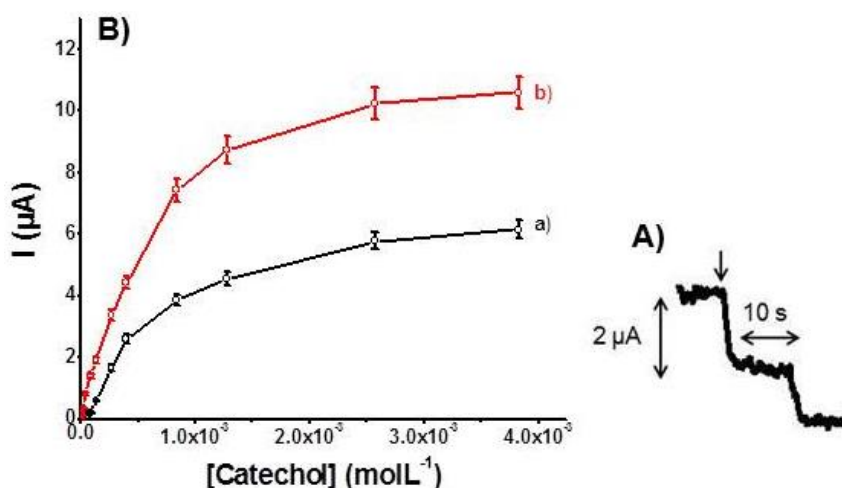


Figure IV.17. A) Réponse ampérométrique suite à des ajouts successifs de 100 µL de catéchol (10⁻³ mol.L⁻¹) dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L⁻¹, pH = 6.5, T = 25°C) à E = - 0,2 V vs ECS d'une fibre PAN-NH₂(4h)/NTCs/PPO (S = 1cm²). **B)** Courbe d'étalonnage de biocapteurs **a)** PAN-NH₂(1h)/NTCs/PPO et **b)** PAN-NH₂(4h)/NTCs/PPO dans un tampon phosphate (0,1 mol.L⁻¹, pH = 6,5, T = 25 °C).

Les valeurs de J_{max} et de sensibilité des deux systèmes ont été comparées. La valeur de J_{max} obtenue avec les fibres (PAN-NH₂(4h)/NTCs) égale à 5,33 µA.cm⁻² est 1,7 fois plus grande que celle obtenue (3,11 µA.cm⁻²) avec les bioélectrodes(PAN-NH₂(1h)/NTCs). De même la sensibilité a augmenté d'un facteur de 2,5.

L'évolution de la réponse du biocapteur peut être attribuée, soit à une amélioration des propriétés diffusionnels l'ortho-benzoquinone produite vers l'électrode, soit à une augmentation

de la quantité de PPO greffée chimiquement à la surface des fibres. C'est pourquoi, Des tests d'activité enzymatique par spectroscopie UV-visible ont été réalisés à une longueur d'onde $\lambda = 420$ nm qui correspondant à la longueur d'onde d'absorption du ferrocyanure de potassium oxydé. L'activité des enzymes immobilisés pour chaque fibre modifiée a été mesurée dans des cuvettes spectroscopiques contenant chacune une configuration de fibre en présence de 1 mL d'une solution de tampon phosphate ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5), 1 mL d'une solution de catéchol ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$), et 500 μL d'une solution de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($0,24 \text{ mol.L}^{-1}$), nous avons ensuite suivi l'évolution de l'absorbance à $\lambda = 420$ nm et cela nous a permis de conclure que la quantité d'enzyme immobilisée sur les fibres PAN-NH₂ (4h)/NTCs est deux fois plus grande que celles immobilisées sur des fibres (PAN-NH₂ (1h)/NTCs). Nous pouvons conclure donc que cette augmentation de sensibilité et de J_{max} est principalement due à la présence d'une plus grande quantité d'enzymes PPO greffée. La meilleure configuration de biocapteur utilisant des fibres réduites en 4 heures, le domaine de linéarité s'étend de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ à $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ et la limite de détection est de $0,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Néanmoins, il faut souligner que ces bioélectrodes en nanofibres réduites ne montrent pas une excellente stabilité au cours du temps puisque les densités de courant maximales évaluées pour toutes les électrodes diminuent d'environ 20% après un jour et 30% après une semaine.

IV.4.4 Conclusion

Un nouveau procédé de modification de fibres PAN/NTCs a été développé dans ce chapitre, il consiste à réduire les groupements nitrile du polymère PAN en groupements amines. Ces fibres ont été ensuite activées par l'intermédiaire d'un agent réticulent (glutaraldéhyde) permettant une post-fonctionnalisation avec la polyphénol oxydase via un couplage covalent. A l'état sec, ces nanofibres semblent résistives alors qu'en solution, elles gonflent et permettent une diffusion plus facile des espèces redox et des substrats enzymatiquement formés vers les nanotubes de carbone. Cette approche représente une alternative prometteuse aux électrodes électrofilées recuites en raison de la facilité de formation des groupements fonctionnels pour l'immobilisation ultérieure des biorécepteurs à la surface de l'électrode. Ces nanofibres ont été ensuite utilisées pour réaliser des biocapteurs de catéchol évalué par mesures ampérométriques.

IV.5 Incorporation d'oxyde de graphène dans les nanofibres

IV.5.1 Introduction

La récente multiplication des formes de carbone, offre aujourd'hui une large gamme de nanomatériaux pour autant que l'on soit capable de les manipuler. Comme indiqué précédemment dans le chapitre 1, le graphène, dernière forme allotropique du carbone isolée n'est pas un matériau réellement nouveau puisqu'il compose le graphite. Le graphène ou graphite 2D est un plan monoatomique de carbone, qui lorsqu'il s'empile verticalement sous l'action des forces de Van der Waals forme le graphite **figure IV.18**. Le graphène possède des propriétés mécaniques intéressantes rappelant celles des nanotubes de carbone. Il pourrait ainsi remplacer les nanotubes pour la synthèse de nouveaux composites [29]. Conscients de cet état de fait, et désireux d'un axe original, nous avons concentré nos recherches sur l'utilisation d'oxyde de graphène (GO) comme élément d'échafaudage pour construire de nouvelles macroélectrodes de polyacrylonitrile par co-filage électrostatique. Le GO étant électriquement isolant, pourrait être introduit en forte concentration dans la solution de polymère et cela permet d'éviter les courts-circuits produits dans le cas de filages des particules chargées comme les NTCs. Dans cette dernière partie de chapitre, nous allons produire tout d'abord des structure fibreuse de PAN/GO ensuite nous allons présenter l'impact de modifications chimiques sur les propriétés électrochimiques de ces fibres.

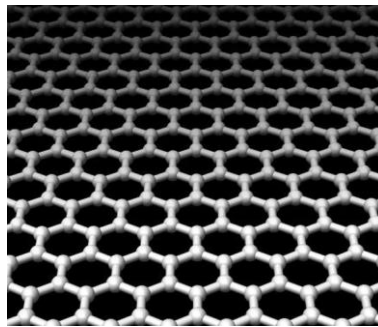


Figure IV.18. Structure du graphène

IV.5.2 Synthèse d'oxyde de graphène (GO)

L'oxydation du graphite, suivie de son exfoliation dans l'eau distillée ou dans le DMF présentent les étapes clés pour obtenir l'oxyde de graphène en large quantité et de haute qualité structurale [30]. Le GO ainsi obtenu peut être incorporé, dans des matrices polymères afin d'obtenir des matériaux composites en utilisant des méthodes conventionnelles de préparation des nanocomposites, tels que le filage électrostatique [31]. Les procédures expérimentales

utilisées pour la synthèse d'oxyde de graphène ainsi que les résultats de caractérisation sont décrites dans cette partie.

IV.5.2.1 Oxydation chimique du graphite

En se basant sur la méthode d'Hummers [32], une oxydation complète du graphite a été obtenue par l'utilisation du graphite naturel de taille de particules de l'ordre ≤ 0.1 millimètre. Les étapes principales de préparation d'oxyde de graphite sont résumées dans le schéma IV.4. Dans une procédure typique, 3 g de poudre de graphite et 1,5 g de nitrate de sodium ont été mélangés dans un ballon de réaction. Puis, 90 mL d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés au mélange sous agitation uniforme dans un bain de glace ($T < 5^\circ\text{C}$). Sous une agitation vigoureuse, 9 g de permanganate de potassium ont été lentement ajoutés à un taux constant pour maintenir la température en dessous de 20°C .

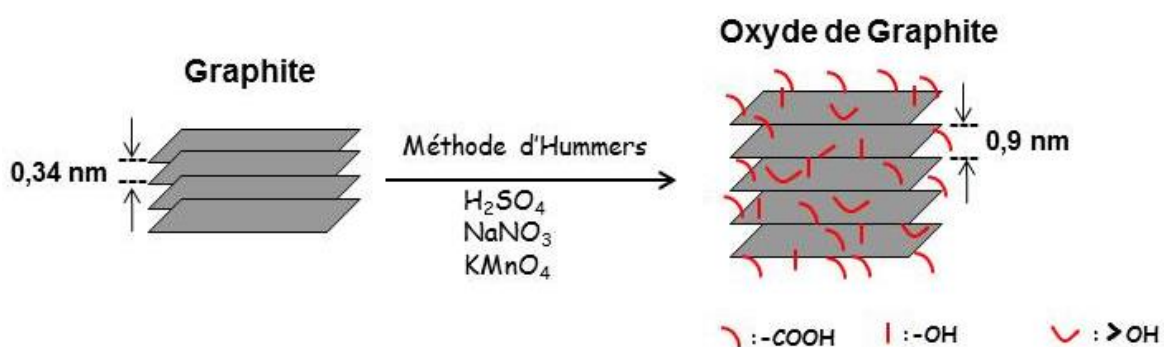


Schéma IV.4. Schématisation de la procédure de préparation d'oxyde de graphite

La suspension a été ensuite agitée pendant 2 h après l'enlèvement du bain de glace. Après une agitation de la solution pendant 30 min à une température de 35°C , 100 mL d'eau distillée ont été lentement ajoutés, donnant une réaction exothermique permettant à la solution d'atteindre une température de 95°C . Pour compléter la réaction, la solution a été agitée pendant 30 min à une température de 95°C , ensuite, diluée avec 200 mL d'eau distillée, et traitée par une solution de peroxyde d'hydrogène (30mL de H_2O_2 , 30 %). Enfin, le mélange est filtré, après son refroidissement dans l'air, donnant un produit pâteux de couleur jaune-brun. Ce dernier est lavé par une solution de HCl (37 %) puis avec de l'eau distillée (plusieurs fois). L'oxyde de graphite a été obtenu par la méthode de centrifugation suivie d'un séchage pendant 24 h, à 60°C .

IV.5.2.2 Exfoliation d'oxyde de graphite dans le DMF

L'oxyde de graphite peut être exfolié en feuillets individuels d'oxyde de graphène via l'approche de sonification dans des solvants organiques tels que le N, N-diméthylformamide (DMF), la N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP), le tétrahydrofurane (THF) ou l'éthylène glycol (EG), sans avoir besoin d'une fonctionnalisation chimique additionnelle [33]. Une propriété importante d'oxyde de graphite, provoquée par la nature hydrophile des couches de graphène oxygénées, est son exfoliation facile dans des milieux aqueux. Cependant, les suspensions obtenues dans le DMF présentent aussi une stabilité comparable à celle observée dans l'eau [34]. Dans ce contexte, le DMF a été utilisé afin de préparer des dispersions stables de GO à l'aide d'un traitement d'ultrasonication. La **figure IV.19.** présente deux suspensions colloïdales de GO obtenues après exfoliation dans l'eau et dans le DMF à l'aide d'ultrason pendant une heure et avec une concentration de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$. Nous allons donc utiliser l'oxyde de graphite exfolié donnant accès au GO pour produire des fibres nanocomposites en utilisant la méthode de filage électrostatique.

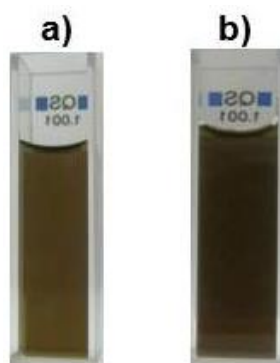


Figure IV.19. *a) Solution colloïdale d'oxyde de graphène dans l'eau distillée ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$), b) solution colloïdale d'oxyde graphène dans le DMF ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$).*

Dans un procédé simple, une quantité d'oxyde de graphite a été dispersée dans le DMF ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$), puis soniquée pendant 1 h permettant ainsi d'obtenir une suspension colloïdale d'oxyde de graphène complètement exfoliés dans le DMF. Ensuite, une forte centrifugation (20000 rpm, 45 min) a été appliquée à la suspension obtenue afin de séparer une phase solide d'oxyde de graphène (sous forme d'agglomérats). Le **schéma IV.5** présente les étapes principales suivies. La formation des feuillets d'oxyde de graphène exfoliés a été confirmée par microscopie électronique à transmission (MET) et par spectroscopie Raman.

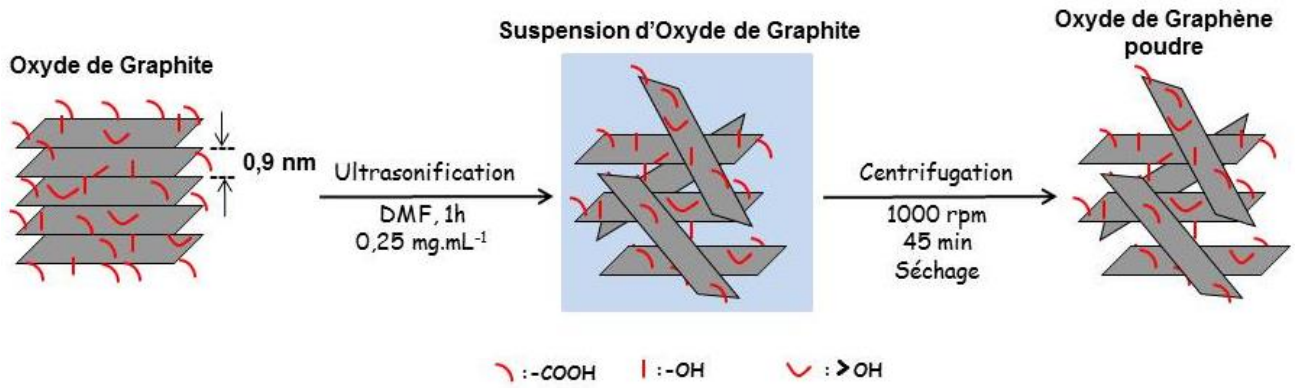


Schéma IV.5. Schéma de la procédure d'exfoliation d'oxyde de graphite dans le solvant DMF par les méthodes d'ultrasonication et de centrifugation.

IV.5.3 Caractérisations des feuillets d'oxyde de graphène (GO)

IV.5.3.a Microscopie électronique à transmission

Une étude très fine d'une suspension de GO a été examinée à l'aide de microscopie électronique à transmission (MET). La figure IV.20 montre une image d'un film ultra-mince contenant 0,25 mg.mL⁻¹ de GO dans l'eau. Ces films ont été obtenus par dépôt d'une goutte de solution sur des grilles d'analyse de carbone. A partir de cette figure, une bonne dispersion/distribution de GO peut être clairement observée. Nous observons également l'existence des structures planaires des feuillets individuels très grandes de plusieurs microns. D'autant plus, on peut clairement conclure que le GO a été bien exfolié et uniformément dispersé.

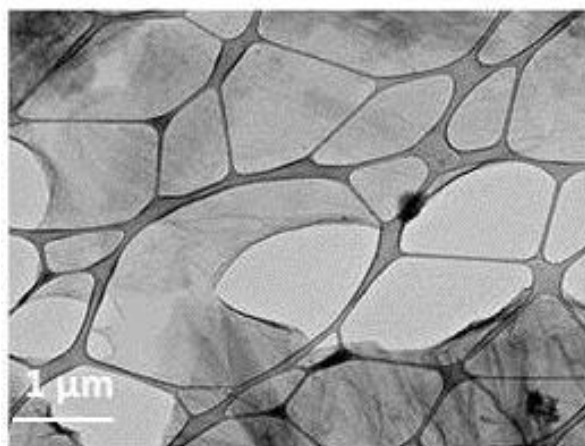


Figure IV.20. Images MET des feuillets de GO synthétisés.

IV.5.3.b Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique d'analyse basée sur la détection des photons diffusés suite à l'interaction de l'échantillon avec un faisceau de lumière monochromatique. La différence de fréquence entre photon exciteur et photon diffusé est directement reliée à l'énergie de vibration de la molécule à l'origine de la diffusion. Les photons incidents sont en partie absorbés par la matière. L'analyse en fréquence de la lumière diffusée montre qu'il existe deux types de diffusion une partie majeure de la lumière est diffusée à la même fréquence ν_0 que la radiation incidente, c'est la diffusion Rayleigh (diffusion élastique), et une composante de longueur d'onde différente du faisceau incident, c'est la diffusion Raman (diffusion inélastique). Le spectre Raman est donc caractéristique de la structure cristalline de l'échantillon étudié. Il représente l'intensité du rayonnement diffusé (nombre de photons comptés à une énergie donnée) en fonction de l'énergie de vibration. Il se présente comme une succession de bandes correspondant chacune à un mode de vibration spécifique ou à une combinaison de modes.

Sur le spectre représenté dans la **figure IV.21** correspondant aux feuillets d'oxyde de graphène (GO) synthétisées, on observe deux bandes larges vers 1350 et 1670 cm^{-1} , associées respectivement à la bande D des défauts et à la bande G des liaisons carbonées sp^2 , ainsi que trois autres bandes, à savoir les bandes G', D+D' et 2D' centrées à 2750 cm^{-1} , 2953 cm^{-1} et 3226 cm^{-1} respectivement. Ainsi, la répartition de la bande 2D en trois pics de faible intensité nous indique la présence de multicouches de feuillets d'oxyde de graphène contenant plusieurs défauts, caractéristique attendue de l'exfoliation d'oxyde de graphite. La présence et l'intensité du pic D sont donc directement associées à la présence de désordre ou de défauts dans l'échantillon. Ce pic n'est normalement pas présent lorsque le spectre Raman est acquis au centre d'un échantillon de graphène de haute qualité cristalline.

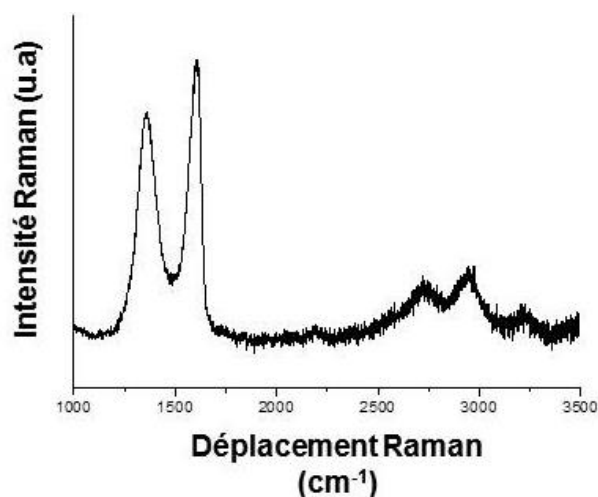


Figure IV.21. Spectre Raman de GO synthétisés.

IV.5.4 Préparation des fibres de PAN/GO

Le polymère désigné pour cette étude est le PAN utilisé dans les deux parties précédentes du chapitre. Les feuillets d'oxyde de graphène exfoliés ont été utilisés comme matériau de remplissage. Les solutions de filage sont préparées en appliquant le même protocole suivi lors de la préparation des dispersions de PAN/NTCs par dispersion d'une quantité contrôlée de GO de fraction massique 0,05; 0,1 et 0,25 wt% dans le DMF pendant 1 heure puis par l'addition du polymère PAN (10wt%) dans la solution de GO/DMF. La dernière étape, comme expliqué dans les paragraphes précédentes, est l'agitation mécanique durant 1h suivi d'un chauffage à 80°C pendant 10 min ce qui permet d'obtenir des solutions visqueuses adaptées à la technique d'ES.

Le processus de filage est identique à l'étude précédente, le collecteur est couvert d'une feuille d'aluminium pour faciliter la récupération des fibres, la distance entre l'extrémité de l'aiguille et le collecteur est fixée à 20 cm. Une seringue (5 mL) et la pompe contrôlent le débit d'alimentation de la solution de polymère qui est égal à $1\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$, à travers une aiguille métallique standard de 0,5 mm de diamètre. Le gradient de tension cette fois est de 15 kV, appliqué entre la pointe de l'aiguille et le collecteur à la pression et la température ambiante.

IV.5.5 Caractérisation des fibre PAN/GO

IV.5.5.a Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage

Le PAN et le GO peuvent être mélangés dans des conditions permettant la formation d'une solution homogène et stable dans le DMF. Par filage de ces solutions, dans leurs états visqueux, des fibres ont été produites. Il est bien connu que la dispersion/distribution des nanomatériaux au sein de la matrice polymère est l'un des facteurs les plus critiques dans la réalisation des

nanocomposites polymères de hautes performances. Dans l'objectif de caractériser la morphologie et la dispersion/distribution de GO au sein des fibres de PAN, des photographies du MEB ont été prises à différentes fractions massique de GO pour le système PAN/GO.

La **Figure IV.22** montre des images du MEB obtenues à partir des fibres nanocomposites de PAN/GO avec des fractions massiques de GO de 0,05; 0,1 et 0,25 wt %. Les images du MEB montrent clairement une compatibilité de GO avec le polymère ainsi qu'une très bonne dispersion/distribution d'oxyde de graphène dans la matrice PAN. A grande fraction massique de GO (0,25wt %), les fibres produites sont devenues plus espacées et plus aérées. Cela peut être attribué à la présence des interactions entre les charges négatifs des fonctions oxygénés à la surface et les bords de chaque feuillet d'oxyde de graphène, spécialement les groupements carbonyle (-C=O),

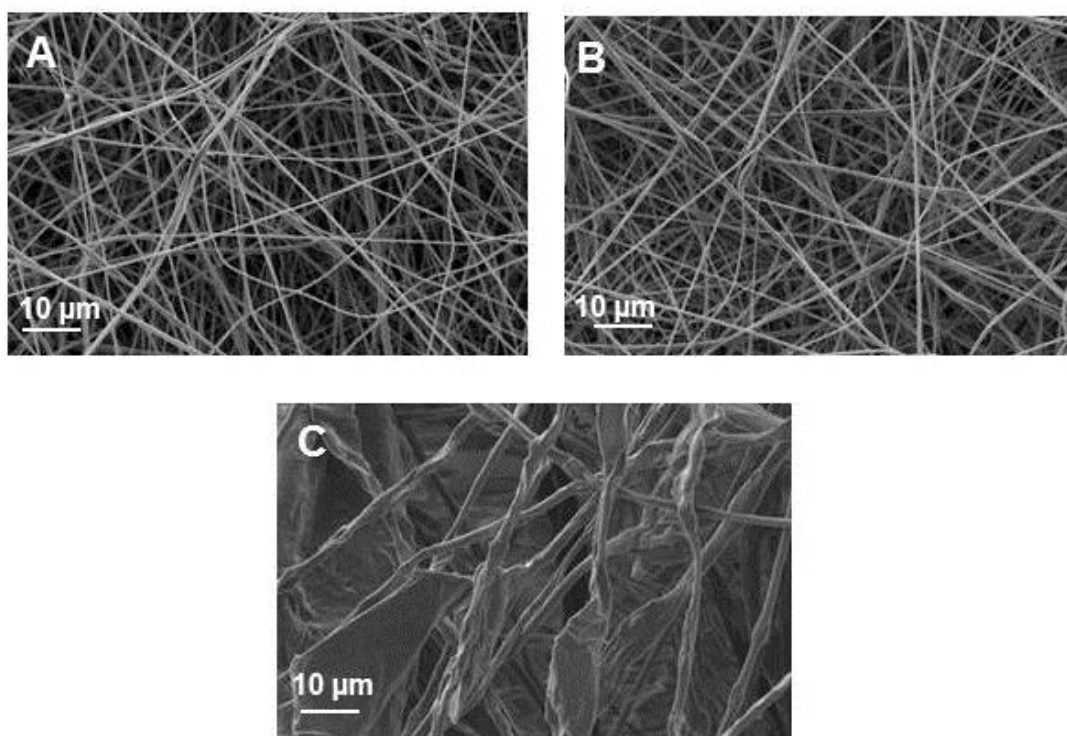


Figure IV.22. Clichés obtenus en microscopie électronique à balayage pour des fibres de PAN à 0,05%wt GO (A), 0,1%wt GO (B) et 0,25 %wt GO (C).

IV.5.5.b Caractérisations mécaniques

Des essais de traction à température ambiante sont réalisés afin de déterminer les propriétés mécaniques des fibres de PAN avec et sans oxyde de graphène. Le test consiste à étirer une fibre de longueur initiale $l_0 = 1,5$ cm à une vitesse de 1% de déformation par minute jusqu'à la rupture. Le capteur enregistre la force nécessaire à l'allongement de la fibre. La contrainte est déduite en

normalisant la force par la section. Celle-ci est calculée en chaque point de la courbe par extrapolation à partir de la section finale du film. Le module de Young est obtenu en calculant la pente de la courbe contrainte-déformation à l'origine. L'énergie de rupture est obtenue en intégrant l'aire sous la courbe et en normalisant par la densité du film. Bien que nous ne présentions à chaque fois que les courbes d'un seul échantillon, nous baserons l'interprétation des résultats sur une moyenne réalisée sur au moins trois échantillons.

Les courbes de traction sont présentées sur la **figure IV.23**. La comparaison des modules de Young et des contraintes à la rupture nous indique que le GO apporte un renfort mécanique qui double le module d'Young et augmente la contrainte à la rupture. Par exemple, pour une fraction massique de seulement 0,05wt% en GO, la contrainte à la rupture et le module d'Young augmentent de 18% de 324 à 381 GPa et de 8% de 559 à 607 GPa, respectivement **tableau IV.3**. L'oxyde de graphène apporte donc de la rigidité aux fibres de PAN.

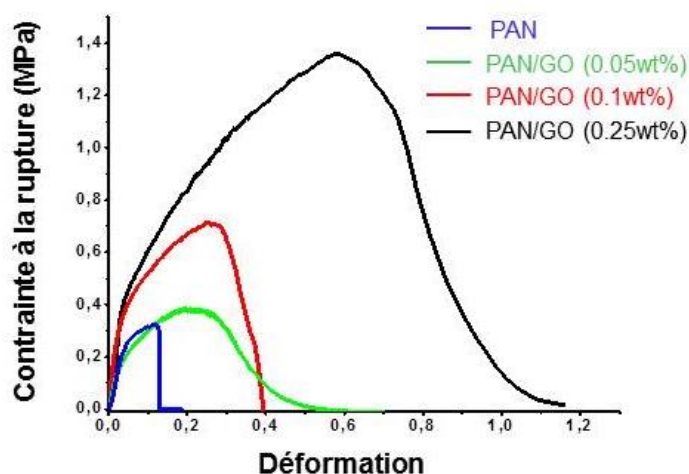


Figure IV.23. Courbe présentant la contrainte à la rupture en fonction de l'allongement des fibres de PAN et de PAN/GO.

Table IV.3. Données caractéristiques des propriétés mécaniques des fibres PAN et PAN/GO issues d'électrofilage.

Electrode	PAN	PAN/GO (0,05wt%)	PAN/GO (0,1wt%)	PAN/GO (0,25wt%)
Contrainte à la rupture (GPa)	324	381	698	1364
Module d'Young (GPa)	559	607	1356	1361

IV.5.6 Production des fibres de PAN/rGO par la réduction chimique des fibres de PAN/GO

Il est bien connu que l'oxyde de graphène est un matériau électriquement isolant, dû à la présence des groupes fonctionnels oxygénés, dans les bords et les surfaces de chaque feuillet, et qui sont formés durant l'oxydation chimique du graphite; d'où l'intérêt des méthodes de réduction chimique, permettant la préparation des feuillets de graphène possédant une bonne conductivité électrique [35, 36]. Dans ce contexte, nous avons utilisé l'hydrate d'hydrazine comme réducteur chimique pour désoxygéner l'oxyde de graphène présent dans les fibres de PAN afin de préparer des fibres contenant du graphène chimiquement réduit et possédant des meilleurs propriétés électriques et une large surface spécifique. Dans un procédé typique, une solution d'hydrazine (10 μ L pour 3 mg de fibre de PAN/GO et 5 mL d'eau distillé) a été ajoutée aux fibres PAN/GO de différentes fractions massiques de GO (0,05; 0,1; 0,25wt%), Le mélange a été maintenu à 60 °C pendant 24 h, puis lavé plusieurs fois avec l'eau distillée. Finalement, une quantité des fibres de graphène sous forme de feuillets agglomérés de couleur noire a été obtenue après un séchage à 80 °C pendant 24 heures. Le schéma IV.6. montre deux photos d'un tissu de fibres de PAN/GO avant et après réduction chimique.

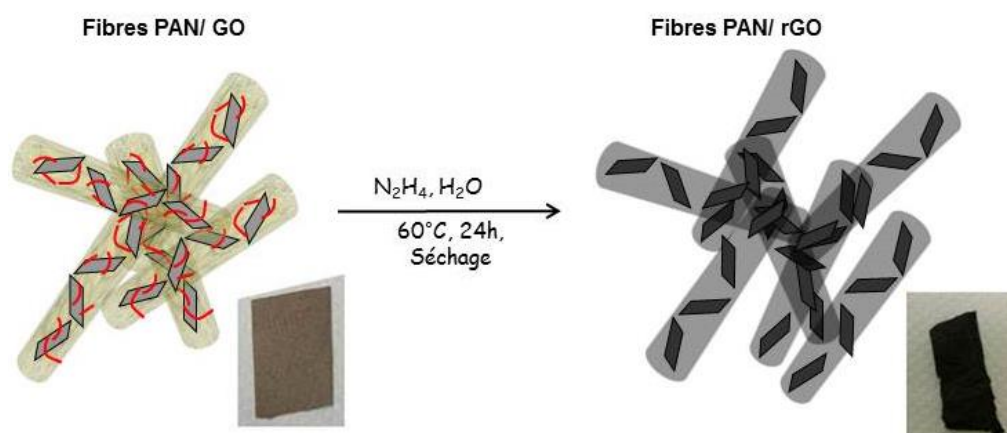


Schéma IV.6. Schématisation de la procédure de préparation des fibres PAN/rGO par la technique de réduction chimique en utilisant l'hydrate d'hydrazine comme réducteur chimique.

IV.5.7 Caractérisation des fibres PAN/rGO

IV.5.7.a Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage

La morphologie et la structure des fibres de graphène (rGO) obtenues par la réduction chimique de l'oxyde de graphène a été observée par microscopie électronique à balayage (MEB). La figure IV.24 montre l'existence d'une bonne adhésion entre le polymère et le Go réduit. Il peut être vu aussi que les fibres sont devenues plus lisses. Il est clair que les rGO sont aléatoirement dispersés au sein de la matrice montrant une structure froissée qui est généralement reliée à l'épaisseur la plus fine des feuillets. Comme mentionné ci-dessus, la réduction de l'oxyde

de graphène se traduit souvent par une augmentation d'hydrophobicité résultant en des agglomérations significatives des feuillets individuels.

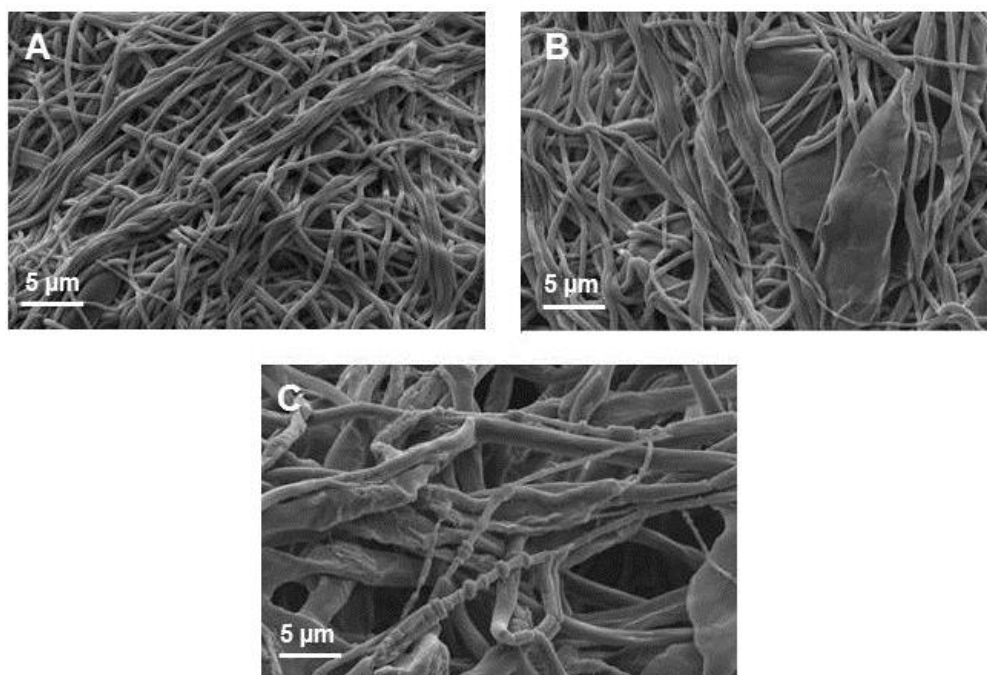


Figure IV.24. Clichés obtenus en microscopie électronique à balayage pour des fibres de PAN/rGO à A) 0,05%wt GO, B) 0,1%wt GO et C) 0,25 %wt GO.

IV.5.7.b Caractérisation électrochimique

Afin d'utiliser les fibres PAN/GO et PAN/rGO à différentes fractions massiques d'oxyde de graphène comme électrode de travail de surface géométrique égale à 1 cm^2 , ces dernières ont été connectées à une pince crocodile puis immergée dans une solution contenant un électrolyte KCl (1 mol.L^{-1}) et $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$). Le voltampérométrie cyclique permet de caractériser les processus diffusionnels intervenant à l'interface électrode/solution. Les CVs sur ce type d'électrodes sont enregistrés à très faibles vitesses de balayage, 2 mV.s^{-1} en balayant le potentiel entre -0,6 et 0,4 V vs. ECS **figure IV.25**.

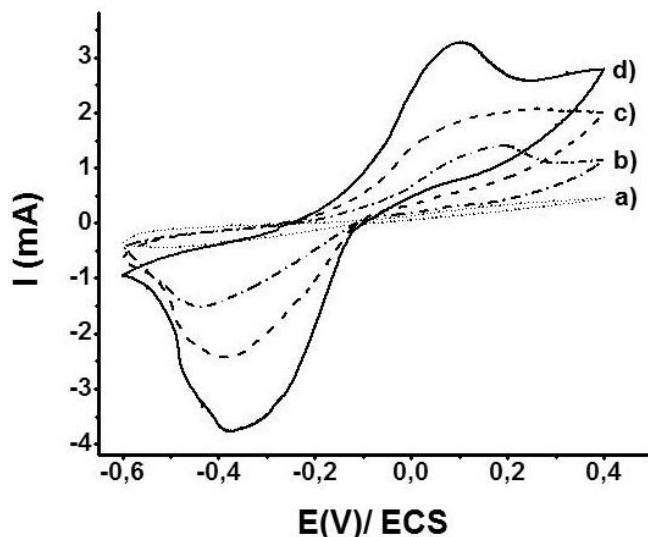


Figure IV.25. CVs d'une solution de $K_4Fe(CN)_6$ ($10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) dans une solution de KCl (1 mol.L^{-1}) sur des fibres **a)** PAN/GO (0,05wt%), **b)** PAN/rGO (0,05wt%), **c)** PAN/rGO (0,1wt%) et **d)** PAN/rGO(0,25wt%), $V = 2 \text{ mV.s}^{-1}$.

Bien que le GO puisse être utilisé pour la production de composites polymères/oxyde de graphène, cependant, sa faible conductivité électrique présente un inconvénient. La **figure IV.25.a** présente le CV de $K_4Fe(CN)_6$ sur une électrode de PAN/GO (0,05wt%). Le voltampérogramme est caractérisé par une faible intensité de courant des pics. Ce résultat est lié principalement aux propriétés isolantes d'oxyde de graphène. En effet, ce dernier est composé de plusieurs feuillets de graphène décorés par des groupements d'oxygène sur leurs bords qui diminuent ses propriétés de conduction électrique. C'est pourquoi, une réduction partielle de l'oxyde de graphène est nécessaire pour rétablir sa conductivité électrique.

La **figure IV.25.b,c,d** illustre les voltampérogrammes de $K_4Fe(CN)_6$ dissout dans une solution de $H_2O + KCl$ (1 mol.L^{-1}) sur des fibres de PAN/rGO contenant 0,05; 0,1; et 0,25wt% respectivement. Les CVs présentent une augmentation des courants de pics en fonction de la quantité de GO, ce qui s'explique par une amélioration de la conductivité électrique de matériau d'électrode. Egalement, nous observons une diminution légère de ΔE_p , notamment pour l'électrode PAN/rGO(0,25wt%), qui traduit une meilleure diffusion de la sonde redox à travers l'électrode. Cette diminution est attribuée principalement à une réduction des forces répulsives entre les groupements oxygénés ionisés de GO chargés négativement et la sonde $Fe(CN)_6^{4-}$.

IV.5.8 Conclusions et Perspectives

Dans cette dernière partie, les propriétés obtenues en étudiant des nanocomposites à matrice PAN renforcées par l'oxyde de graphène sont présentées. L'étude a porté, d'une part, sur des fibres PAN/GO et d'autre part, sur des fibres PAN/rGO issues de la réduction chimique des fibres PAN/GO en présence du réducteur chimique l'hydrate d'hydrazine. Les feuillets d'oxyde de graphène ont été obtenus à partir d'oxyde de graphite. Des techniques de caractérisation expérimentales, telles que la spectroscopie Raman et la microscopie électronique à transmission ont confirmé que les feuillets d'oxyde de graphène ont été bien formés en large quantité avec une haute qualité structurale.

Les propriétés physico-chimiques et mécaniques des fibres PAN/GO et PAN/rGO ont été évaluées en utilisant une variété de techniques de caractérisation. Les résultats obtenus montrent que l'ajout des fractions massiques croissantes d'oxyde de graphène dans les solutions de filage a entraîné des améliorations des propriétés des fibres par comparaison à la matrice vierge.

Cette étude a montré l'efficacité du rGO comme nano-objet de renforcement pour atteindre des propriétés spécifiques importantes dans des fibres fabriquées par le procédé d'électrospinning. Les améliorations obtenues au niveau des propriétés sélectionnées peuvent élargir le champ d'application de ces nanostructurés carbonés ouvrant ainsi la voie à plusieurs perspectives pour des applications dans les domaines de stockage d'énergie, de biocapteurs et dans l'électrocatalyse.

Pour cela, nous avons fait des premiers essais de carbonisation de fibres PAN/ rGO afin d'améliorer leurs propriétés électriques, les fibres obtenues après recuits sont trop fragiles, limitant ainsi leur utilisation comme électrode pour des applications analytiques ou pour la bioconversion d'énergie.

- [1] Z. Su; J. Ding; G. Wei. RSC Adv., 2014, 4, 52598.
- [2] A.L.Yarin; S.Koombhongse; D.H.Reneker. Journal of Applied Physics, 2001, 90, No. 9.
- [3] A.L.Yarin, S.Koombhongse, D.H.Reneker. Journal of Applied Physics, 2001, 89, No. 5, 3018-3026.
- [4] Y.M.Shina; M.M.Hohmanb; M.P.Brennerc; G.C.Rutledge. Polymer, 2001, 42, Issue 25, 09955–09967.
- [5] H. Fong; I. Chun; D. H. Reneker. Polymer, 1999, 40, 4585–4592.
- [6] S. L. Shenoy; W. D. Bates; H. L. Frisch; G. E. Wnek. Polymer, 2005, 46, 3372-3384.
- [7] M. Demir; I. Yilgor; E. Yilgor; B. Erman. Polymer, 2002, 43, 3303-3309.
- [8] X. Zong; K. Kim; D. Fong; S. Ran; B. S. Hsiao; B. Chu. Polymer, 2002, 43, 4403-4412.
- [9] K. Ohgo; C. Zhao; M. Kobayashi, T. Asakura. Polymer, 2003, 44, Issue 3, 841–846.
- [10] J.-H. He; Y.-Q. Wan; J.-Y. Yu. Fibers and polymer, 2008, 9, 140-142.
- [11] A. K. Haghi; M. Akbari. Physica Status Solidi (a), 2007, 204, Issue 6, 1830–1834.
- [12] C. Zhang; X.Yuan; L.Wu. European Polymer Journal, 2005, 41, 423–432.
- [13] K. Pawlowski; H. Belvin; D. Raney; J. Su; J. Harrison; E. Siochi. Polymer, 2003, 44, 1309-1314.
- [14] J.M.Deitzel; J.Kleinmeyer; D.Harris; N.C.Beck Tan. Polymer, 2001, Vol. 42, 261-272.
- [15] S.Megelski, J.S.Stephens, D.B. Chase. Macromolecules, 2002, 35, 8456-8466.
- [16] D. H. Reneker; A. L. Yarin; H. Fong; S. Koombhongse. J. Appl. Phys, 2000, 87, 4531-4547.
- [17] S. Zhao; X. Wu; L. Wang; Y. Huang. J. Appl. Polym. Sci, 2004, 91, 242-246.
- [18] J. Ayutsede; M. Gandhi; S. Sukigara; M. Micklus; H.-E. Chen; F. Ko. Polymer, 2005, 46, 1625-1634.
- [19] C.S. Ki; D.H. Baek; K.D. Gang; Polymer, 2005, 46, 5094-5102.
- [20] J.S. Lee; K. Choi; H. Ghim. Journal of Applied Polymer Science, 2004, 93, 1638–1646.
- [21] J. S. Lee; K. H. Choi; H. D. Ghim; S. S. Kim; D. H. Chun; H. Y. Kim; W. S. Lyoo. J. Appl. Polym. Sci., 2004, 93, 1638-1646.
- [22] O. Hardick; B. Stevens; D. Bracewell. J. Mater. Sci., 2011, 46, 3890-3898.
- [23] P. K. Baumgarten. J. Colloid Interface Sci., 1971, 36, 71-79.
- [24] C. L. Casper; J. S. Stephens; N. G. Tassi; D. B. Chase; J. F. Rabolt. Macromolecules, 2004, 37, 573-578.
- [25] A. T. Kalashnik; T. N. Smirnova; O. P. Chernova; V. V. Kozlov. Polymer Science Series A, 2010, 52, Issue 11, 1233-1238.
- [26] A-F. Che; V. Germain; M. Cretin; D. Cornu; C. Innocent; S. Tingry. New J. Chem., 2011, 35, 2848-2853.

- [27] M.S.A. Rahaman; A.F. Ismail; A. Mustafa. *Polymer Degradation and Stability*, 2007, 92, 1421-1432.
- [28] S. Stankovich, *Nature*, 2006, 442, 282-286.
- [29] X. Hu; R. Qi; J. Zhu; J. Lu; Y. Luo; J. Jin; P. Jiang, *J. Appl. Polym. Sci*, 2014, DOI: 10.1002/APP.39754
- [30] D. Papkov; A. Goponenko; O. C. Compton; Z. An; A. Moravsky; X-Z. Li; S.T. Nguyen; Y. A. Dzenis, *Adv. Funct. Mater*, 2013, 23, 5763-5770.
- [31] W.S. Hummers, R.E. Offeman. *J. Am. Chem. Soc*, 1958, 80, 1339.
- [32] J.I. Parades; S. V. Rodil; A. M. Alonso, *Langmuir*, 2008, 24, 10560.
- [33] B. J. Liang; Y. Huang; L.Zhang; Y. Wang; Y. Ma; T. Guo; Y. Chen, *Adv.Funct. Mater*, 2009, 19, 2297-2302.
- [34] S. Park; J. An; J. R. Potts; A. Velamakanni; S. Murali; R.S. Ruoff, *Carbon*, 2011, 49, 3019-3023.
- [35] W. Chen; L. Yan; P. R. Bangal; *J. Phys. Chem. C*, 2010,114,19885.

Conclusion Générale

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au département de Chimie Moléculaire de Grenoble (DCM) au sein de l'équipe « Biosystèmes Electrochimiques et Analytiques » (BEA) en cotutelle avec le laboratoire des Interfaces et des Matériaux Avancés (LIMA) à la Faculté des Sciences de Monastir. L'objet de cette thèse a été la mise au point de matériaux d'électrode pour la conception de bioélectrodes utilisables dans le domaine des technologies analytiques et énergétiques.

Les électrodes nanostructurées développées au cours de cette thèse qui sont à base de nanotubes de carbone (NTCs) et d'oxyde de graphène (GO) ont permis de développer des dispositifs électrochimiques robustes. Les procédés de fabrication de celles-ci autorisent l'ajout des additifs dans leurs formulations permettant ainsi d'adapter leur conception selon le type d'application visée.

Après un premier chapitre de synthèse bibliographique, la deuxième partie de ce travail de thèse s'est concentrée sur la fabrication de biocathodes sans médiateurs, à base de CNTs et de laccase, fonctionnant avec un transfert d'électrons direct entre la protéine et l'électrode. Nous avons examiné plusieurs approches pour immobiliser la laccase tout en l'orientant afin d'améliorer les performances catalytiques de la biocathode. Ces immobilisations et orientations ont été réalisées par fonctionnalisation des électrodes de nanotubes de carbone par deux dérivés d'antraquinone (le pyrène-mono-antraquinone et le pyrène-bis-antraquinone). Les performances catalytiques obtenues ($\sim 1 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$) avec la configuration utilisant le pyrène-bis-antraquinone sont largement plus élevées que les densités de courant obtenues avec la même conception de biocathode utilisant le pyrène-mono-antraquinone ($0,4 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$) ce qui a permis de confirmer la disponibilité de l'antraquinone favorisant l'immobilisation et l'orientation optimale de la laccase.

Dans la troisième partie a été présentée une approche originale de mise en forme de bioélectrodes catalytiques à base de nanotubes de carbone utilisant un médiateur ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6- acide sulfonique) modifié avec deux groupements pyrène jouant le rôle de réticulant pour former une feuille stable (Buckypaper). Nous avons montré que ces feuilles redox en présence de laccase ont des propriétés électrocatalytiques très intéressantes pour la réduction d'oxygène et représentent ainsi une alternative prometteuse de matériaux pour une biocathode «classique» pour la conversion d'énergie. La caractérisation de ces buckypapers ayant la forme d'un tapis de NTCs dont l'épaisseur est de l'ordre de 100

μm a montré qu'ils sont conducteurs, flexibles, stables mécaniquement et qu'ils possèdent une large surface spécifique.

La dernière partie de ce travail a été consacrée à la production de fibres par filage électrostatique à partir de deux mélanges différents: nanotubes de carbone/ polyacrylonitrile et oxyde de graphène/polyacrylonitrile. Les propriétés physico-chimiques des fibres électrofilées obtenues ont été étudiées afin d'évaluer toute leur potentialité. À l'aide de la microscopie électronique à balayage, nous avons montré que les fibres récoltées présentent des diamètres inférieurs à $1 \mu\text{m}$. Le travail s'est ensuite porté sur l'utilisation des nanofibres à base de nanotubes de carbone carbonisées à $850 \text{ }^\circ\text{C}$ pour élaborer une biocathode performante fonctionnant avec un transfert d'électrons indirect en présence de médiateur rédox.

En deuxième application, les fibres NTCs/PAN ont été utilisées pour réaliser un biocapteur ampérométrique à base de polyphénol oxydase (PPO) pour la détection de catéchol. Pour cela, ces fibres ont été modifiées chimiquement afin de créer des fonctions amines à leur surface. Celles-ci ont été ensuite activées par l'intermédiaire d'un agent réticulant (glutaraldéhyde) permettant une post-fonctionnalisation avec la polyphénol oxydase via un couplage covalent. Les résultats obtenus, en termes de sensibilité, temps de réponse et courant maximal, sont intéressants.

En dernière partie, nous avons produit des fibres à base de polyacrylonitrile et d'oxyde de graphène. Le GO a été choisi parce qu'il est électriquement isolant, ce qui nous a permis de l'introduire en fort pourcentage et d'éviter par conséquent les court-circuits produits dans le cas de filage des nanotubes de carbone et du PAN. Les propriétés électrochimiques des fibres à base d'oxyde de graphène ont été largement améliorées après réduction chimique de GO en rGO en présence d'hydrate d'hydrazine. Cette étude a montré l'efficacité du graphène comme nanomatériaux de renforcement pour atteindre des propriétés spécifiques importantes dans les matériaux carbonés fabriqués par le procédé d'electrospinning. Néanmoins, les fibres rGO/PAN ne semblent pas assez conductrices pour son utilisation en tant que bioélectrode et même l'approche de recuit à 850°C , qui a été envisagée, a rendu ces fibres trop fragiles pour tout type de post-fonctionnalisation.

V. Experimental Part

V. Experimental Part	137
V.1 Solvents, reagents and apparatus	138
V.1.1 Solvents	138
V.1.2 Reagents	138
V.1.3 Enzymes	138
V1.4 Apparatus	139
V.1.4.1 Electrochemistry measurements	139
V.1.4.2. Product analysis and characterizations	139
V.2 Synthesis	140
V.2.1 Synthesis of 1-(2-Anthraquinonylaminoethyl)pyrene [pyr-(AQ)]	140
V.2.2 Synthesis of 1-[Bis(2-anthraquinonyl)aminoethyl]pyrene [pyr-(AQ) ₂]	140
V.2.3 Synthesis of Bis-pyrene2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	141

V.1 Solvents, reagents and apparatus

V.1.1 Solvents

All organic solvents used for synthesis: dichloromethane (CH_2Cl_2), acetonitrile (MeCN), acetone, dimethylformamide (DMF), diethyl ether (Et_2O), ethanol (EtOH), Hydrogen chloride (HCl) and methanol (MeOH) were used as received from Sigma-Aldrich.

Acetonitrile used for electrochemistry experiments was purchased from Rathburn (HPLC grade S).

All aqueous solutions were prepared using deionized water from purelab UHQ system (ELGA) (Resistivity = 15 $\text{M}\Omega$).

V.1.2 Reagents

All reagents: Pyrenemethylammonium hydrochloride, 2-Bromomethylantraquinone, potassium carbonate, Magnesium sulfate (MgSO_4), Sodium hydroxide (NaOH), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) potassium salt (ABTS), potassium tert-butoxide, Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphate (BOP), Polyacrylonitrile (PAN, $\text{Mw} = 150.000$), Lithium aluminium hydride (LiAlH_4), glutaraldehyde, catechol, tetrabutylammonium tetrafluoroborate (NBu_4BF_4), tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF_6), hexaamineruthenium(II) chloride, Potassium ferrocyanide, N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC) and Commercial-grade thin multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs, 9.5 nm diameter, purity >95%), obtained from Nanocyl, were used as received from Sigma-Aldrich.

For buffer solutions and electrolytes preparation: dibasic monohydrogen phosphate (K_2HPO_4) and monobasic dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), lithium perchlorate (LiClO_4), potassium chloride (KCl) and were used as received from Sigma Aldrich.

V.1.3 Enzymes

Laccase (120 U mg^{-1}) and (3.10 U mg^{-1} solid) from *Trametes versicolor* and Polyphenol oxidase (120 U mg^{-1}) were used as received from Sigma-Aldrich.

V.1.4 Apparatus

V.1.4.1 Electrochemistry measurements

Organic media

The electrochemical experiments performed in MeCN were carried out in a three-electrode electrochemical cell under dry argon atmosphere and in a glove box ($[O_2] < 20$ ppm). The surface of glassy carbon (GC) electrodes ($S = 0.07$ cm²) were polished with a 2 μ m diamond paste purchased from Presi (France), and rinsed successively with water and ethanol. A Pt wire placed in a separated compartment was used as counter electrode and the Ag/AgNO₃ 10 mM in MeCN + TBAP (0.1 M) served as reference electrode in organic media. Potentials given in organic is referred to the (Ag/AgNO₃) electrode. All electrochemical experiments were recorded on an Autolab PGSTAT100 potentiostat.

Aqueous media

The electrochemical characterizations of all electrodes (cyclic voltammetry and chronoamperometry) in aqueous solutions were carried out in a three-electrode electrochemical cell. A platinum grid was used as the counter electrode and a saturated calomel electrode (SCE) served as reference electrode. All potentials given in this work are referred to the SCE reference electrode. The BP films and fibers were studied as working electrode with a geometric surface of 1 cm².

V.1.4.2. Product analysis and characterizations

- ¹H-NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 operating at 400.0 MHz.
- ESI mass spectra were recorded with a Bruker APEX-Qe ESI FT-ICR mass spectrometer.
- FE-SEM images were recorded using ULTRA 55 FESEM based on the GEMINI FESEM based on the GEMINI FESEM column with beam booster (Nanotechnology Systems Division, Carl Zeiss NTS GmbH, Germany) and tungsten gun with an accelerating voltage of 3 kV and WD of 5.4 mm. The texture properties were analyzed using advanced data processing software (ADP version 5.1, Thermo Electron Corporation).
- The electric resistance of the buckypaper and fibers was measured by a standard programmable DC voltage/current four-point probe method using a Jandel, Universal probe connected to a current generator (Jandel, RM3).

- FTIR spectra were recorded using a Nicolet ‘Magna 550’ spectrometer using ATR (Attenuated Total Reflexion).
- BET surface area measurements were done using a Micromeritics ASAP 2020– serial 157 (700VA).
- Spectroscopy Raman

V.2 Synthesis

V.2.1 Synthesis of 1-(2-Anthraquinonylamino)methylpyrene [pyr-(AQ)]

1-Pyrenemethylamine was obtained from 1-pyrenemethylamine hydrochloride by extraction with dichloromethane from an aqueous NaOH solution. 1-Pyrenemethylamine hydrochloride (268 mg, 1.0 mmol) was added to a solution of NaOH (60 mg, 1.5 mmol) in water (30 mL). The resulting suspension was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 20 mL). Removal of the solvent under vacuum yielded a white powder of pyrenemethylamine (205 mg, 0.9 mmol).

2-Bromomethylantraquinone (100 mg, 0.33 mmol), potassium carbonate (230 mg, 1.66 mmol) and (pyren-1-yl)methylamine (76 mg, 0.33 mmol) were dissolved in acetonitrile (20 mL). The resulting suspension was heated at 60°C for 12 h under argon atmosphere. After cooling to room temperature, the light brown precipitate was filtered off and washed with water and 0.1 M HCl. The crude product was purified by column chromatography on silica gel eluted with CH₂Cl₂/EtOH (99/1, v/v). The pure product was obtained as a light brown solid (110 mg, 0.24 mmol, 73%).

¹H NMR (DMSO, 300 MHz): δ = 9.83 (s, 1H), 8.54 (d, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.35 (m, 5H), 8.21 (m, 5H), 8.10 (m, 2H), 7.95 (d, 2H), 5.04 (s, 2H), 4.65 ppm (s, 2H).

ESI-MS (in ethanol): m/z: 452 [M+H]⁺.

V.2.2 Synthesis of 1-[Bis(2-anthraquinonyl)amino)methyl]pyrene [pyr-(AQ)₂]

2-Bromomethylantraquinone (150 mg, 0.50 mmol), potassium carbonate (152 mg, 1.10 mmol) and (pyren-1-yl)methylamine (51 mg, 0.22 mmol) were dissolved in acetonitrile (30 mL). The mixture was stirred at 60°C for 24 h under argon. After cooling to room temperature and removing the solvent under vacuum, the reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ and successively washed with water and 0.1 M HCl. The organic phase was dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated. Purification by column chromatography on silica gel with dichloromethane as eluent gave the product as a yellow solid (125 mg, 0.16 mmol, 75%).

¹H NMR (DMSO, 300 MHz): δ=8.36 (s, 1H), 8.28–8.25 (m, 2H), 8.23–8.21 (m, 4H), 8.178.02 (m, 7H), 7.97–7.87 (m, 3H), 7.79–7.74 (d, 6H), 4.37 (s, 2H), 3.87 ppm (s, 4H).

ESI-MS (in ethanol): m/z: 672 [M+H]⁺, 694[M+Na]⁺, 709.9 [M+K]⁺.

V.2.3 Synthesis of Bis-pyrene 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) potassium salt was obtained from 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt by treatment with potassium tert-butoxide in methanol. Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (500 mg, 0.91 mmol) was added to a solution of potassium tert-butoxide (204 mg, 1.82 mmol) in methanol (50 mL). After 30 min, the resulting suspension was filtered and yielded a white powder of 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) potassium salt (490 mg). Pyrenemethylamine was obtained from pyrenemethylammonium hydrochloride by extraction with dichloromethane from an aqueous NaOH solution: pyrenemethylammonium hydrochloride (268 mg, 1.0 mmol) was added to a solution of NaOH (60 mg, 1.5 mmol) in water (30 mL). The resulting suspension was extracted with CH₂Cl₂ (3×20 mL). Removal of the solvent under vacuum yields a white powder of pyrenemethylamine (205 mg, 0.9 mmol, 90%). 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) potassium salt (300 mg, 0.51 mmol), BOP Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphate (272 mg, 1.02 mmol) and pyrenemethylamine (451 mg, 1.02 mmol) were dissolved in dichloromethane, CH₂Cl₂ (20 mL) and an excess on triethylamine was added. The resulting suspension was stirred at room temperature for 24 h under argon atmosphere. The reaction mixture was filtered off and the precipitated solid was washed successively with 0.1 M NaOH, dichloromethane and CF₃COOH (pH 3). Finally, the pure product was obtained as a greenish white solid (250 mg, 65 %).

¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) = 1.30 (6H, t), 4.03 (4H, q), 4.84 (4H, s), 7-7.8(6H, d), 7.8-8.6 (18H, m).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) = 11.46, 38.5, 40.0, 107.7, 119.8, 122.5, 122.8, 123.5, 123.5, 124.0, 125.4, 124.7, 125.6, 126.5, 127.1, 127.3, 127.7, 127.8, 128.0, 128.5, 130.0, 130.6, 131.0, 124.7, 140.2, 141.2, 157.1.

Liste des abréviations

ABTS: 2,2-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulphonique)
ADN : Acide désoxyribonucléique
AEBA: Acide 4-(2-aminoéthyl) benzoïque
Ag/Ag⁺ : Electrode de référence en solution organique, [Ag] = [NO₃⁻] = 10⁻² mol.L⁻¹
AQH₂: Hydroquinone
BET: Brunauer, Emmet et Teller
Bis-pyr-ABTS: Bis-pyrène-2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulphonique)
BOD: Bilirubin Oxydases
BP: Buckypaper
CNTF: Forêt de nanotube de carbone
CPD: Carboxyphényldiazonium
CV: Voltampérométrie cyclique
DET: Transfert d'électrons direct
DMF: N,N-diméthylformamide
ECS: Electrode au calomel saturé
EDC: N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthyl-carbodiimideHydrochloride
ES: Electrospinning
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy
GC: Carbone graphite
GO: Oxyde de graphène
GOx: Glucose oxydase
KM : constante de Michaelis-Menten
MEB: Microscopie électronique à balayage
MET: Microscopie électronique à transmission
MET: Transfert d'électrons médiaté
MeCN: Acétonitrile
MWCNTs: Multi Wall Carbon Nanotube
NFC: Nanofibre de carbone

NMP: N-méthyl-2-pyrrolidone
NTCs: Nanotubes de carbone
OCM: Oxydases à cuivres multiples
PAN: Polyacrylonitrile
PMMA: Polyméthacrylate de méthyle
PPO: Polyphénol oxydase
PTFE: Polytétrafluoroéthylène
PVA: Polyvinyl Alcohol
Pyr-AQ(1): Pyrène mono-anthraquinone
Pyr-AQ(2): Pyrène Bis-anthraquinone
rGO: Reduced graphene oxide
SDBS: Dodécyl Benzène Sulfate de sodium
SDS: Dodécyl Sulfate de sodium
SWCNTs: Single Walled Carbon Nanotubes
TBAPF₆: Tetrabutylammonium hexafluorophosphate
v: Vitesse de balayage en tension

1. Liste des publications

1. Supramolecular Immobilization of Laccase on Carbon Nanotube Electrodes Functionalized with (Methylpyrenylaminomethyl) anthraquinone for Direct Electron Reduction of Oxygen.

Mariem Bourourou, Kamal Elouarzaki, Noémie Lalaoui, Charles Agnès, Alain Le Goff, Michael Holzinger, Abderrazak Maaref, Serge Cosnier. *Chemistry A European Journal* (2013), Vol 19, 28, 9371-9375. **Impact Factor: 5,731**

2. Freestanding redox buckypaper electrodes from multi-wall carbon nanotubes for bioelectrocatalytic oxygen reduction via mediated electron transfer.

Mariem Bourourou, Kamal Elouarzaki, Michael Holzinger, Charles Agnès, Alain Le Goff, Nadege Reverdy-Bruas, Didier Chaussy, Mikael Party, Abderrazak Maaref Serge Cosnier. *Chemical Science* (2014), 5, 2885-2888. **Impact Factor: 9,211**

3. Chemically reduced electrospun polyacrylonitrile carbon nanotube nanofibers hydrogels as electrode material for bioelectrochemical applications.

Mariem Bourourou, Michael Holzinger, Frédéric Bossard, Frédéric Hugenell, Abderrazak Maaref, Serge Cosnier. *Carbon Journal* (2015), Vol 87, 233-238. **Impact Factor: 6,196**

4. Laccase wiring on free-standing electrospun carbon nanofibers using a mediator plug.

Mariem Bourourou, Michael Holzinger, Kamal Elouarzaki, Alain Le Goff, Frédéric Bossard, Cécile Rossignol, Elizabeth Djurado, Vincent Martin; Denis Curtil, Didier Chaussy, Abderrazak Maaref, Serge Cosnier. *Chem. Commun* (2015), DOI: 10.1039/C5CC03906A. **Impact Factor: 6,834**

5. Impedimetric Biosensor for Cancer Cell Detection.

Basak Seven, **Mariem Bourourou**, Kamal Elouarzaki, Jean Francois Constant, Chantal Gondran, Michael Holzinger, Serge Cosnier, Suna Timur. *Electrochemistry Communications* (2013), Vol 37, 36-39. **Impact Factor: 4,847**

6. Freestanding HRPGo redox buckypaper as oxygen-reducing biocathode for biofuel cell applications.

Kamal Elouarzaki, **Mariem Bourourou**, Michael Holzinger, Alain Le Goff, Robert. S. Marks, Serge Cosnier. *Energy & Environmental Science*. (2015), 8, 2069-2074. **Impact Factor: 20,523**

2. Liste des présentations

1. Développement de « buckypapers » à base de nanotubes de carbone pour la réduction électrocatalytique d'oxygène via un transfert d'électrons médiaté.

M. Bourourou, K. Elouarzaki, C. Agnès, A. Le Goff, A. Maaref, M. Holzinger, S. Cosnier.

XIV ÈME Colloque du Groupe Français de Bioelectrochimie, 22-25 Septembre 2014 Sète, France (**Présentation orale**).

2. Laccase wiring on free-standing electrospun carbon nanofibres using a mediator plug.

M. Bourourou, M. Holzinger, K. Elouarzaki, A. Le Goff, F. Bossard, C. Rossignol, D. Chaussy, A. Maaref, S. Cosnier. Journées d'Electrochimie, 6-10 Juillet 2015 Rome, Italie (**Présentation orale**)

3. Oriented immobilization of laccases on carbon nanotube electrodes functionalized with(methylpyrenylaminomethyl)anthraquinone for direct electron reduction of oxygen.

M. Bourourou K. Elouarzaki, C.Agnés, Alan Le Goff, M. Holzinger,A. Maaref, S. Cosnier. Journée de Printemps de la Société Chimique de France, 13 Juin 2013 et Journée des Doctorants 21 juin 2013, Université de Grenoble-France (**Présentation par affiche**).

Design of enzymatic bioelectrodes based on nano-materials for fuel cells and sensors

This thesis is devoted to the development of a new class of freestanding nanostructured bioelectrodes mainly based on carbon nanotubes (CNTs) Graphene oxide (GO) was also evaluated for its appropriateness for the treated bioelectrochemical approaches. The developed manufacturing processes forming CNTs slides (Buckypapers) or electrospun tissues also allow the confinement with additives like mediators or polymers. The optimization of the enzymatic connection of laccase, for O₂ reduction on carbon nanotube arrays, and the polyphenol oxidase (PPO) for the electrochemical detection of enzymatically generated electroactive ortho-quinone was studied. Initially, direct electron transfer of laccase is optimized in a nanostructured CNTs matrix. We examined several approaches to immobilize and orient the laccase using anthraquinone derivatives while improving the catalytic performance of the biocathode. These immobilisation and orientation strategies on electrodes are performed by functionalization using pyrene-mono-Anthraquinone and pyrene-bis-anthraquinone. The second part of this thesis shows the preparation of another biocathode based on the indirect connection of laccase in nanostructured CNT buckypapers containing bis-pyrene-ABTS as a redox mediator and cross-linker, enhancing the mechanic stability of the buckypaper. The last part of this work was devoted to the production of nanofibers by electrospinning from two different blends: CNT / PAN and GO / PAN. Such fiber electrodes were used as bioelectrodes for bioanalytical applications and biological energy conversion.

Keywords: carbon nanotubes, graphene oxide, biocathodes, biosensors, redox mediators

Conception des bioélectrodes enzymatiques à base de nanomatériaux dans des piles à combustible et des capteurs

Le travail présenté dans ce manuscrit est une contribution à la recherche sur la mise en forme d'une nouvelle classe de bioélectrodes nanostructurées, principalement à base de nanotubes de carbone (NTCs). L'oxyde de graphène (GO) a été également évalué pour des applications bioélectrochimiques. Les procédés de fabrication développés autorisent l'ajout d'additifs tels que des médiateurs et des polymères. L'optimisation de la connexion enzymatique de la laccase pour la réduction de l'O₂ sur des matrices de nanotubes de carbone ainsi que de la polyphénol oxydase (PPO) pour la détection électrochimique de l'ortho-quinone généré enzymatiquement a été étudiée. Dans un premier temps, le transfert d'électrons direct avec la laccase a été optimisé dans une matrice nanostructurée de NTCs. Dans ce contexte, nous avons examiné plusieurs approches pour immobiliser la laccase tout en l'orientant grâce à l'utilisation de dérivés de l'anthraquinone afin d'améliorer les performances catalytiques de la biocathode. L'immobilisation et l'orientation de l'enzyme ont été réalisées par fonctionnalisation des électrodes par le pyrène-mono-anthraquinone et le pyrène-bis-anthraquinone. La seconde partie présente la préparation d'une autre cathode basée sur la connexion indirecte de la laccase à une matrice nanostructurée de NTCs (buckypaper) contenant du bis-pyrène-ABTS comme médiateur rédox et comme réticulant pour la stabilité mécanique améliorée de ce buckypaper. La dernière partie de ce travail a été consacrée à la production de fibres par filage électrostatique à partir de deux mélanges différents: NTCs/ PAN (polyacrylonitrile) et GO/PAN. De telles fibres ont été utilisées comme électrodes pour des applications bioanalytiques et la bioconversion d'énergie.

Mots clefs: nanotubes de carbone, oxyde de graphène, biocathodes, biocapteurs, médiateurs rédox