



HAL
open science

Réduction bioélectrocatalytique du dioxygène par des enzymes à cuivres connectées sur des électrodes nanostructurées et fonctionnalisées : intégration aux biopiles enzymatiques

Noémie Lalaoui

► To cite this version:

Noémie Lalaoui. Réduction bioélectrocatalytique du dioxygène par des enzymes à cuivres connectées sur des électrodes nanostructurées et fonctionnalisées : intégration aux biopiles enzymatiques. Autre. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAI110 . tel-01288202

HAL Id: tel-01288202

<https://theses.hal.science/tel-01288202v1>

Submitted on 14 Mar 2016

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

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

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Noémie Lalaoui

Thèse dirigée par **le Dr. Alan Le Goff** et
codirigée par **le Dr. Michael Holzinger**

préparée au sein du **laboratoire Biosystèmes Electrochimiques
et Analytiques du Département de Chimie Moléculaire**
dans l'école Doctorale I-MEP2

Réduction bioélectrocatalytique du dioxygène par des enzymes à cuivre connectées sur des électrodes nanostructurées et fonctionnalisées : Intégration aux biopiles enzymatiques

Thèse soutenue publiquement le « **10 décembre 2015** »,
devant le jury composé de :

M Serge Cosnier

Directeur de Recherche CNRS, Grenoble, Membre

M Bruno Jusselme

Chercheur CEA, CEA-Saclay, Rapporteur

M Frédéric Barrière

Maître de Conférences, Rennes, Rapporteur

M Thierry Tron

Directeur de Recherche CNRS, Marseille, Examinateur

M Alain Deronzier

Directeur de Recherche Émérite du CNRS, Grenoble, Président du jury

M Alan Le Goff

Chargé de Recherche CNRS, Grenoble, Directeur de Thèse

M Michael Holzinger

Chargé de Recherche CNRS, Grenoble, Invité



Remerciements

Je débute ces remerciements par ceux adressés aux membres de mon jury. Tout d'abord, le président du jury, M Alain Deronzier. Non seulement pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse, mais aussi pour son aide précieuse lors de ma recherche de post-doc. Je suis particulièrement reconnaissante envers mes deux rapporteurs de thèse, M Frédéric Barrière et M Bruno Jusselme qui ont montré un grand intérêt à ces travaux de recherche y compris dans des domaines qui ne sont pas spécifiquement leurs domaines de prédilection. Pour toutes leurs remarques, leurs questions ainsi que la rigueur scientifique de leurs évaluations, je les en remercie. Enfin, je remercie M Thierry Tron de m'avoir également fait l'honneur de juger ces travaux.

Ce doctorat a été l'une des expériences les plus marquantes de ma vie, qui m'a énormément apporté tant sur le plan professionnel que personnel. A l'issue de ces trois années de recherche et de la rédaction de ce manuscrit vient le temps du bilan, et l'une des conclusions que je tire de cette expérience est que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ces travaux sans le soutien d'un grand nombre de personnes, dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt porté à ma recherche m'ont permis d'apprendre, de progresser, et de garder le sourire durant cette période délicate qu'est la thèse.

Ces travaux de thèse ont été réalisés au Département de Chimie Moléculaire de l'université Grenoble Alpes au sein de l'équipe Biosystème Electrochimique Analytique dirigés par M Serge Cosnier. Je tiens donc personnellement à le remercier de m'avoir accueilli dans son équipe. Mais également, pour sa confiance et son soutien tout au long de mon doctorat, ainsi que pour sa motivation et ses idées pour faire avancer les différents projets de recherche.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse Alan Le Goff qui a dirigé ces travaux avec beaucoup d'enthousiasme et d'optimisme !!! C'est d'ailleurs son éternel optimisme et sa ferveur envers ces activités de recherche qui m'ont permis de continuer à avancer. Je souhaite le remercier pour toute la confiance et la liberté qu'il m'a laissée pour mener à bien ces travaux. J'ai beaucoup appris de lui, scientifiquement et humainement, même s'il me reste encore beaucoup de choses à apprendre à ses côtés. Sa patience, sa disponibilité, son écoute, sa bienveillance et l'ensemble de ses conseils ont été précieux durant ces trois années. Je tiens à lui exprimer dans ses quelques mots ma plus profonde gratitude et mon plus grand respect.

Je tiens aussi à remercier sincèrement mon co-directeur de thèse Mickael Holzinger, qui a gardé un œil attentif et bienveillant sur l'ensemble de ces travaux durant ces trois années. Toute l'aide qu'il m'a apportée, sa disponibilité et bien entendu ses remarques pertinentes m'ont été très précieuses.

A eux trois et chacun à leur manière, ils ont su apporter leurs contributions à ces travaux et éclairer très souvent mes lanternes. Je tiens à nouveau à leur exprimer mes remerciements les plus sincères non seulement pour ce travail mais aussi pour les opportunités qu'ils m'ont offertes.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de BEA pour leur soutien, leur compagnie et toute l'aide qu'ils ont pu m'apporter. Karine Gorgy et Chantal Gondran qui ont été très attentionnées et ont veillé à

ma sécurité au cours de ce doctorat. Arielle Le Pellec pour toujours trouver tout ce dont on a besoin en un rien de temps et nous permettre chaque jour de travailler dans de bonnes conditions. Je souhaite également remercier tous les thésards, post-docs et stagiaires qui sont passés au laboratoire durant ces années. Trop de noms pour pouvoir tous vous nommer mais sachez que vous avez su animer la vie du laboratoire, le bureau, les soirées, parfois même les week-ends. Votre compagnie et votre bonne humeur ont été un des éléments primordiaux au cours de ces trois années. D'ailleurs certains d'entre vous ne sont pas restés de simples collègues, mais sont devenus des ami(e)s!

Je tiens également à remercier les personnes avec qui j'ai eu la possibilité de travailler dans le cadre de collaboration et sans qui tout ce travail n'aurait pu aboutir. Mes remerciements vont donc à M Thierry Tron et M Pierre Rousselot Pailley du laboratoire iSm2 de Marseille qui m'ont fourni les laccases spécifiquement fonctionnalisées par des pyrènes, et à M Nicolas Mano du CRPP de Bordeaux pour m'avoir fourni la BOD *Bp*. Je remercie également Mme Elisabeth Lojou et Mme Anne De Poulpiquet du BIP de Marseille pour m'avoir fourni les hydrogénases et initié à leur connexion sur électrode. Je remercie vivement Mme Hélène Jamet du laboratoire de chimie théorique de Grenoble pour tout le travail de modélisation réalisé à ses côtés. Cette étude n'aurait jamais été possible sans sa pédagogie et son dynamisme. M Michel Mermoux du LEPMI de Grenoble pour toutes les caractérisations Raman des nouveaux matériaux synthétisés au laboratoire.

Je souhaiterais remercier les membres du bâtiment Nanobio pour leur soutien et leur compagnie. Vous avez su égayer mon quotidien. Je vais en citer quelques-uns, notamment Hugues, Liliane et Jérôme pour toutes leurs sympathies, humour, et pour cette « magnifique » piste noire gelée descendue en votre compagnie ! Hein Liliane... Régine, pour son peps au quotidien et sa gestion hors pairs. Sabine pour son sourire et sa grande gentillesse.

Les personnes les plus importantes au cours d'une thèse sont de loin celles qui n'y participent pas directement. J'entends par là que l'apport indirect des gens qui vous soutiennent au quotidien, qui vous offrent leur amitié et leur présence en toutes circonstances est, de loin, le facteur principal qui détermine la qualité des résultats. C'est là le rôle des amis, des proches et des parents.

A ce titre, mes pensées les plus reconnaissantes vont à mes amis Grenoblois et Parisiens! Les filles (Flavia, Flo et Emma), Anne-So, Manu, Mel, ma petite chiasse, gros lardon, Fatoumata, Laureen, mes colocataires (Sylvain, Manon, Pablo), Carlo, Deonildo, Bertrand et JR. Je considère l'amitié dont ils m'honorent comme un bien précieux et rare. Merci à tous pour les moments passés ensemble, qui ont été des plus joviales et des plus « vivifiant ». Petite dédicace pour toi Mélanie, merci pour les cours de chimie orga de L3 ☺. Merci encore à vous tous pour votre joie de vivre. Certes nos choix de vie, de parcours sont bien différents mais j'espère que les liens qui nous unissent resteront.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble de ma famille, pour leur soutien sans faille même de loin. Ils ont toujours su me porter vers le haut de par leurs encouragements et leurs soutiens moral. Vous avez toujours cru en moi et pour cela je vous remercie.

Pour finir, je voudrais remercier de tout mon cœur Fabien, pour sa patience quotidienne, son soutien à toute épreuve, et tout simplement sa présence à mes côtés.

Table des Matières

Introduction générale

1

Chapitre I – Étude Bibliographique

A- Les biopiles enzymatiques

I. LES PILES A COMBUSTIBLE	7
I.1 PRINCIPE.....	7
I.2. GRANDEURS CARACTERISTIQUES	8
I.3. PERFORMANCES ET LIMITATIONS	10
II-LES BIOPILES A COMBUSTIBLE	10
II.1 LES BIOPILES MICROBIENNES	11
II.2 LES BIOPILES A MITOCHONDRIE	13
II.3 LES BIOPILES ENZYMATIQUES.....	13
<i>II.3.1 Les enzymes : des biocatalyseurs aux multiples avantages.....</i>	<i>14</i>
<i>II.3.2 Quelles enzymes pour quels substrats ?</i>	<i>14</i>

B- Un biocatalyseur cathodique pour les biopiles enzymatiques: Les MCOs

I- STRUCTURE DU SITE ACTIF DES MCOS.....	18
II- MECANISMES DE REDUCTION DE O₂ PAR LES MCOS	19
III- LE CENTRE T1.....	20
IV- LE CLUSTER T2/T3.....	21
IV- EFFETS DU PH, DU CHLORE ET DE L'URATE	21

C-Vers l'élaboration de bioélectrodes efficaces: Connexion et immobilisation des enzymes à l'électrode

I- IMMOBILISATION DES ENZYMES A L'ELECTRODE.....	23
I.1 L'ADSORPTION OU PHYSISORPTION.....	24
I.2 LA RETICULATION.....	24
I.3 L'ENCAPSULATION (POLYMERES, SOL-GELS)	25
I.4 FORMATION D'ASSEMBLAGES SUPRAMOLECULAIRES	26
I.5 LA LIAISON COVALENTE	28
II- TRANSFERT INTERFACIAL D'ELECTRON PROTEINE-ELECTRODE.....	29
II.1 MECANISME DU TRANSFERT ELECTRONIQUE DIRECT ET INDIRECT	29
III-STRATEGIE DE CONNEXION SUIVANT LE COFACTEUR DE LA PROTEINE	32
III.1 ENZYME AVEC UN COFACTEUR PROFONDEMENT ENFOUI DANS SON ENVELOPPE PROTEIQUE : CAS DE LA GOX	32
III.2 ENZYME AVEC UN COFACTEUR PROCHE DE LA SURFACE PROTEIQUE: CAS DES MCOs ET DES HYDROGENASES.....	33
III.3 ENZYME AVEC UN COFACTEUR LABILE : CAS DES GDH NAD ⁺ -DEPENDANTES	37

D-Les nanotubes de carbone: un matériau de choix pour l'immobilisation fonctionnelle des enzymes

I- LA NANOSTRUCTURATION DES ELECTRODES.....	40
II- LES NANOTUBES DE CARBONE.....	40
II.1 STRUCTURES ET PROPRIETES	40
II.2 LES NANOTUBES DE CARBONE COMME MATERIAU D'ELECTRODE.....	42
II.3 STRUCTURATION DE L'INTERFACE PAR DES CNTS.....	43
II.4 CHIMIE DE SURFACE DES CNTS.....	44
II.4.1 Fonctionnalisations non covalentes des CNTs	45
II.4.2 Fonctionnalisations covalentes des CNTs	47
III- AUTRES MATERIAUX D'ELECTRODES.....	50
III.1 LE GRAPHENE.....	50
III.2 LES NANOPARTICULES D'OR	51

E- Evolution des performances des biopiles enzymatiques et applications

I- LES BIOPILES GLUCOSE/O₂.....	52
II- LES BIOPILES H₂/O₂.....	53

Chapitre II – Biocathodes enzymatique à base de Laccase pour la réduction d'O₂

I- GENERALITES.....	69
I.1 AMELIORATION DU DET DE LA LACCASE	69
I.2 ORIENTATION ET CONNEXION DIRECTE DE LA LACCASE SUR CNTS FONCTIONNALISES	71

A- Fonctionnalisation non covalente de MWCNTs pour l'immobilisation et l'orientation de la laccase Tv

I- FONCTIONNALISATION NON-COVALENTE DE MWCNTS PAR UN POLYMERE ORGANIQUE.....	74
I.1 PRINCIPE ET CARACTERISATION DU POLYMERE ORGANIQUE	74
I.2 ELABORATION DES BIOCATHODES ET CATALYSE ENZYMATIQUE DE LA REDUCTION DE O ₂	77
I.3 OPTIMISATION DE LA QUANTITE DE POLYMERE ELECTRODEPOSEE.....	78
II- FONCTIONNALISATION COVALENTE D'OXYDE DE GRAPHENE REDUIT (RGO) PAR DES GROUPEMENTS ANTHRAQUINONES	80
II.1 FONCTIONNALISATION COVALENTE D'OXYDE DE GRAPHENE REDUIT.....	81
II.2 CARACTERISATION DU F-RGO	82
II.3 ELABORATION DES BIOCATHODES.....	86
III- FONCTIONNALISATION NON COVALENTE DE MWCNTS PAR UN DERIVE PYRENE-ADAMANTANE	89
III.1 IMMOBILISATION D'UN DERIVE PYRENE-ADAMANTANE SUR UNE MATRICE DE MWCNTS	89
II.2 ELABORATION DE LA BIOCATHODE MWCNTS/PYR-ADA/LAC	91
IV- EVALUATION DE LA STABILITE DES BIOELECTRODES.....	93
V- ETUDES THEORIQUES ET RATIONALISATION DES PERFORMANCES	93

V.1 MODELISATION ELECTROCHIMIQUE	93
V.2 MODELISATION MOLECULAIRE	98

B- FONCTIONNALISATION SUPRAMOLECULAIRE DE MWCNTs PAR DES LACCASES MODIFIEES SPECIFIQUEMENT A LA SURFACE PAR DES GROUPEMENTS PYRENES

I- INGENIERIE DE LA LACCASE <i>TRAMETES SP.C30</i>	104
II- REDUCTION DU DIOXYGENE PAR DES BIOCATHODES A BASE DE MWCNTS ET DE LACCASE-PYRENE	106
II.1 ELABORATION DES BIOCATHODES	106
II.1 REDUCTION BIOELECTROCATALYTIQUE DE O ₂	106
III- MODELISATION ELECTROCHIMIQUE DES ELECTRODES MWCNTS ET MWCNTS/AUNPS	109
III.1 MODELISATION DES ELECTRODES MWCNTS	109
III.2 MODELISATION DES ELECTRODES MWCNTS/AUNPS	111
IV- CONCLUSION DU CHAPITRE II	114

Chapitre III – Biocathodes enzymatique à base de Bilirubine Oxydase pour la réduction d'O₂

I- GENERALITES.....	123
I.1 LA BILIRUBINE OXYDASE : UNE MCO PROMETTEUSE.....	123
I.2 VERS L'ELABORATION DE BIOCATHODES EFFICACES: CONNEXION EN TRANSFERT DIRECT D'ELECTRON	123
I.2.1 Immobilisation par réticulation de la BOD	124
I.2.2 Immobilisation par encapsulation de la BOD au sein d'un polymère	124
I.2.3 Immobilisation par formation d'un lien covalent	125
I.2.4 Immobilisation par adsorption de l'enzyme	125
II- MODIFICATION SUPRAMOLECULAIRE DES MWCNTS POUR L'IMMOBILISATION ET LA CONNEXION DE LA BOD <i>MV</i>.....	128
II.1 CARACTERISATION DES ELECTRODES EN ABSENCE DE SUBSTRAT	129
II.2 REDUCTION BIOELECTROCATALYTIQUE DE O ₂	131
II.3 MODELISATION ELECTROCHIMIQUE	132
II.4 CARACTERISATION DES BIOCATHODES EN MET.....	135
III- MODIFICATION COVALENTES DE CNTS POUR LA CONNEXION ET L'IMMOBILISATION DE LA BOD <i>MV</i>.....	137
III.1 FONCTIONNALISATION COVALENTE DE CNTs PAR L'ACIDE 6-AMINO-2-NAPHTHOÏQUE	137
III.2 FONCTIONNALISATION COVALENTE PAR LE 4-(2-AMINOETHYL) BENZENE DIAZONIUM TETRAFLUOROBORATE	139
III.3 CARACTERISATION DES ELECTRODES EN PRESENCE ET EN ABSENCE DE SUBSTRAT	142
III.4 MODELISATION ELECTROCHIMIQUE	144
IV- ELABORATION DE BIOCATHODE A AIR A BASE DE BOD EN TRANSFERT DIRECT D'ELECTRON:	146
IV.1 ADAPTATION DES STRATEGIES D'IMMOBILISATION ET D'ORIENTATION DE LA BOD AUX BIOCATHODES RESPIRANTES :	148
IV.1.1 Elaboration des électrodes	148
IV.1.2 Réduction bioélectrocatalytique du dioxygène :	149
IV.2 ELABORATION DE BIOCATHODES RESPIRANTES A BASE DE BOD <i>BACILLUS PUMILUS</i>	151
IV.2.1 Généralités	151
IV.2.2 Immobilisation et connexion de la BOD <i>Bp</i>	152

V- COMPARAISON DES BIOCATHODES A AIR A BASE DE BOD BP ET BOD MV	155
VI- CONCLUSION DU CHAPITRE III	155

Chapitre IV – Élaboration de biopiles enzymatiques glucose/O₂ et H₂/O₂

A - Élaboration de biopiles enzymatiques glucose/O₂

I- OXYDATION DU GLUCOSE PAR LA BIOANODE MWCNTS/RUQ-PYRENE/GDH	163
II- CONCEPTION D'UNE BIOPILE GLUCOSE/O ₂ PAR COMBINAISON DE LA BIOANODE ET DE LA BIOCATHODE MWCNTS/PYR-ADA/LAC.....	165
III- CONCEPTION D'UNE BIOPILE GLUCOSE/O ₂ PAR COMBINAISON DE LA BIOANODE ET DE LA CATHODE MWCNTS/F-MWCNTS-COO ⁻ /BOD	166
IV- CONCLUSION DE LA PARTIE A	168

B- Conception d'une biopile H₂/O₂ sans membrane basée sur la connexion d'enzymes thermostables sur des électrodes de MWCNTs

I- GENERALITES.....	169
I.1 UN BIOCATALYSEUR POUR L'OXYDATION DU DIHYDROGENE: L'HYDROGENASE [NiFe] MbH1 Aa.....	170
I.1.1 Structures de l'hydrogénase [NiFe] MbH1 Aa.....	170
I.1.2 Mécanisme d'oxydation d'H ₂ et d'inactivation du site actif [NiFe].....	171
I.1.3 Tolérance au dioxygène	172
I.1.4 Tolérance à la température	173
I.1.5 Connexion de l'hydrogénase [NiFe] MbH1 Aa	173
I.2 LES BIOPILES ENZYMATIQUES H ₂ /O ₂	175
I.2.1 Préambule.....	175
I.2.2 Développement des biopiles enzymatiques H ₂ /O ₂ et évolution des performances	176
I.2.3 Limites et stabilité des biopiles H ₂ /O ₂	180
II- OXYDATION DE H ₂ PAR MBH1 IMMOBILISEE SUR F-MWCNTS.....	181
III- APPLICATION DE LA BIOANODE A UNE BIOPILE H ₂ /O ₂ SANS MEMBRANE	184
III.1 DISPOSITIF EXPERIMENTALE	184
III.2 PERFORMANCES DE LA BIOPILE H ₂ /O ₂ SANS MEMBRANE	185
III.3 STABILITE DU SYSTEME.....	186
IV- CONCLUSION DE LA PARTIE B	186

Conclusion générale et perspectives 191

Materials and Methods	199
Liste des abréviations utilisées	207
Publications	209

Introduction générale

A l'heure actuelle, la consommation énergétique mondiale ne cesse de croître avec le développement industriel de nombreux pays, ainsi que l'utilisation de nombreux dispositifs portables. Il en découle des problèmes liés à l'épuisement des ressources fossiles, mais aussi environnementaux du fait des dommages causés par leurs fabrication et consommation.

Ces dernières années, le développement de nouvelles sources d'énergies renouvelables et non polluantes est devenu un enjeu majeur de notre société. Parmi les alternatives proposées, les piles à combustible ou PACs sont particulièrement étudiées pour la production d'énergie verte. Ces piles, en particulier les PACs H_2/O_2 sont destinées à remplacer de nombreux générateurs d'énergie basés sur la combustion par exemple. Ce domaine de recherche est particulièrement actif, et la thématique s'est récemment élargie à la production d'énergie par les biopiles à combustible (BFCs). A l'inverse des PACs classiques qui utilisent des catalyseurs métalliques pour convertir l'énergie chimique en énergie électrique, ces biopiles s'appuient sur des catalyseurs biologiques tels que les micro-organismes ou les enzymes. Cependant, il faut préciser que ces biopiles n'ont pas la prétention de remplacer les générateurs d'énergie les plus puissants : les centrales nucléaires thermiques offrent une puissance de 12 ordres de grandeurs supérieure à celle des biopiles enzymatiques. Elles sont destinées à alimenter de petits dispositifs spécifiques. La grande diversité de biocatalyseur offerte par la nature permet l'utilisation d'une grande variété de combustibles, ce qui rend ces biopiles particulièrement attrayantes pour de nombreux secteurs des biotechnologies. En effet, chaque type de biopile peut être adapté en fonction du biocatalyseur utilisé et du rapport puissance/volume, à l'application envisagée.

Les biopiles à combustible enzymatique sont une sous-classe de BFC et utilisent, comme leur nom l'indique, des enzymes comme catalyseurs. Ces dernières années, le développement de la bioélectrochimie et plus précisément des biocapteurs enzymatiques a particulièrement contribué à leur essor. Les enzymes sont des biomolécules, biocompatibles, capables de catalyser des réactions spécifiques, ce qui offre de grandes possibilités de miniaturisation. Les applications de ces biopiles enzymatiques sont très variées, de l'alimentation de petits dispositifs électroniques portatifs à leur implantation dans le vivant pour des applications dans le domaine biomédical ou agricole. Pour optimiser ces dispositifs, de nombreux défis doivent être relevés. En effet, la pile doit permettre une configuration idéale aux enzymes pour garantir leur connexion, une activité bioélectrocatalytique efficace ainsi que leur stabilité dans le temps. Pour la plupart des biopiles enzymatiques développées, les limitations de puissance et de stabilité émanent de la biocathode.

Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux est de développer de nouvelles architectures de bioélectrodes ; et plus particulièrement de biocathodes ; à base de nanotubes de carbone afin d'optimiser le transfert électronique et la stabilité des bioélectrodes. En effet, les nanotubes de

carbone (CNTs) sont particulièrement étudiés ces dernières années comme matériaux d'électrode pour leurs excellentes propriétés morphologiques et électriques. Leur utilisation permettra le développement de plateforme fonctionnelle pour l'immobilisation et la connexion des enzymes.

Le premier chapitre constitue une étude bibliographique structurée en cinq sous-parties. La première partie présente le contexte général du développement des biopiles à combustible, ainsi que les différents catalyseurs enzymatiques utilisés. Une revue plus précise de la classe d'enzymes utilisées à la biocathode est détaillée dans la deuxième partie. La troisième partie s'articule autour des différentes méthodes d'immobilisations généralement appliquées pour greffer les enzymes à la surface des électrodes. La connexion des enzymes à l'électrode via différents mécanismes de transfert d'électron est également présentée. La partie suivante présente les avantages de l'utilisation des nanotubes de carbone comme matériau d'électrode pour immobiliser et connecter les enzymes. Enfin, un bilan de l'état de l'art des biopiles glucose/O₂ est présenté.

Le deuxième chapitre présente des travaux sur l'optimisation de l'immobilisation et de la connexion de la laccase. Dans une première partie, différentes fonctionnalisations de CNTs ont été développées pour greffer et connecter l'enzyme ; et les performances de ces nouvelles biocathodes ont été évaluées en électrochimie. Une étude théorique complète cette première partie et permet de rationaliser les performances des bioélectrodes. Enfin, la seconde partie présente une autre stratégie d'immobilisation de la laccase basée à la fois sur la fonctionnalisation de l'enzyme et de l'électrode.

Le troisième chapitre présente le développement d'autres biocathodes basées sur la bilirubine oxydase (BOD) ; une autre enzyme largement utilisée pour réduire O₂ à la cathode. Cette partie présente différentes méthodes de fonctionnalisation des CNTs permettant l'immobilisation de la protéine et l'obtention de courants catalytiques importants.

Enfin, le dernier chapitre est consacré à l'utilisation des biocathodes présentées précédemment au sein de biopiles enzymatiques. L'association des biocathodes avec une bioanode oxydant le glucose permet de développer deux biopiles glucose/O₂. Pour finir le développement d'une bioanode basée sur l'oxydation d'H₂ par une hydrogénase sera détaillé, ainsi que son utilisation au sein d'un nouveau dispositif de biopile H₂/O₂.

Chapitre I – Étude bibliographique

A- Les biopiles enzymatiques

I. LES PILES A COMBUSTIBLE	7
I.1 PRINCIPE.....	7
I.2. GRANDEURS CARACTERISTIQUES	8
I.3. PERFORMANCES ET LIMITATIONS	10
II-LES BIOPILES A COMBUSTIBLE	10
II.1 LES BIOPILES MICROBIENNES	11
II.2 LES BIOPILES A MITOCHONDRIES	12
II.3 LES BIOPILES ENZYMATIQUES.....	13
<i>II.3.1 Les enzymes : des biocatalyseurs aux multiples avantages.....</i>	<i>14</i>
<i>II.3.2 Quelles enzymes pour quels substrats ?</i>	<i>14</i>

B- Un biocatalyseur cathodique pour les biopiles enzymatiques: Les MCOs

I- STRUCTURE DU SITE ACTIF DES MCOS.....	18
II- MECANISME DE REDUCTION DE O₂ PAR LES MCOS.....	19
III- LE CENTRE T1.....	20
IV- LE CLUSTER T2/T3.....	21
IV- EFFETS DU PH, DU CHLORE ET DE L'URATE.....	21

C-Vers l'élaboration de bioélectrodes efficaces: Connexion et immobilisation des enzymes à l'électrode

I- IMMOBILISATION DES ENZYMES A L'ELECTRODE.....	23
I.1 L'ADSORPTION OU PHYSISORPTION.....	24
I.2 LA RETICULATION.....	24
I.3 L'ENCAPSULATION (POLYMERES, SOL-GELS)	25
I.4 FORMATION D'ASSEMBLAGES SUPRAMOLECULAIRES	26
I.5 LA LIAISON COVALENTE	27
II- TRANSFERT INTERFACIAL D'ELECTRON PROTEINE-ELECTRODE.....	29
II.1 MECANISME DU TRANSFERT ELECTRONIQUE DIRECT ET INDIRECT	29
III-STRATEGIE DE CONNEXION SUIVANT LE COFACTEUR DE LA PROTEINE	32
III.1 ENZYME AVEC UN COFACTEUR PROFONDEMENT ENFOUI DANS SON ENVELOPPE PROTEIQUE : CAS DE LA GOX	32
III.2 ENZYME AVEC UN COFACTEUR PROCHE DE LA SURFACE PROTEIQUE: CAS DES MCOs ET DES HYDROGENASES.....	33
III.3 ENZYME AVEC UN COFACTEUR LABILE : CAS DES GDH NAD ⁺ -DEPENDANTES	37

D- Les nanotubes de carbone: un matériau de choix pour l'immobilisation fonctionnelle des enzymes

I- LA NANOSTRUCTURATION DES ELECTRODES.....	40
II- LES NANOTUBES DE CARBONE	40
II.1 STRUCTURES ET PROPRIETES	40
II.2 LES NANOTUBES DE CARBONE COMME MATERIAU D'ELECTRODE.....	42
II.3 STRUCTURATION DE L'INTERFACE PAR DES CNTS.....	43
II.4 CHIMIE DE SURFACE DES CNTS.....	44
<i>II.4.1 Fonctionnalisations non covalentes des CNTs</i>	<i>45</i>
<i>II.4.2 Fonctionnalisations covalentes des CNTs</i>	<i>47</i>
III- AUTRES MATERIAUX D'ELECTRODES	50
III.1 LE GRAPHENE.....	50
III.2 LES NANOPARTICULES D'OR	51

E- Evolution des performances des biopiles enzymatiques et applications

I- LES BIOPILES GLUCOSE/O₂	52
II- LES BIOPILES H₂/O₂.....	53

A- Les biopiles enzymatiques

La production d'énergie a longtemps été basée sur l'utilisation des ressources fossiles naturelles telles que les hydrocarbures, le charbon ou encore le gaz naturel. L'augmentation de la population mondiale ainsi que la modernisation des sociétés a eu l'effet logique d'accroître les demandes en énergie, et donc d'accélérer la consommation de ces ressources, présentes en quantité finie sur notre terre. Leur quantité disponible diminue de manière exponentielle avec le temps. De plus, les carburants fossiles ont le désavantage de produire des gaz à effet de serre comme le CO₂ lors de leur combustion. L'énergie nucléaire basée sur la fission des ressources fossiles semblait être une alternative prometteuse pour la production d'énergie du fait qu'elle ne génère pas de gaz à effet de serre. Néanmoins la gestion des déchets toxiques produits par cette méthode est un réel problème à l'heure actuelle, car aucune solution viable n'a encore été trouvée. Aussi, les événements récents ; comme l'accident nucléaire de Fukushima ; ont mis en évidence la dangerosité de ces systèmes ainsi que les conséquences humanitaires et écologiques désastreuses que pouvaient avoir ces dernières. Dans ce contexte, la recherche et la conception de nouveaux systèmes de production d'énergie se sont développées. L'une des alternatives particulièrement en vue pour remplacer un jour la combustion des ressources fossiles est l'utilisation de piles à combustible.

I. Les piles à combustible

I.1 Principe

Le concept de pile à combustible (PAC) a été introduit en 1839 par les travaux de Grove et Schoenbein.^{1,2} Les PACs sont des dispositifs capables de convertir l'énergie chimique en énergie électrique. L'oxydation d'un combustible à l'anode tel que le dihydrogène par exemple, est couplée à la réduction du dioxygène à la cathode ; le dihydrogène et l'oxygène étant respectivement le combustible et l'oxydant les plus largement utilisés pour ces dispositifs. Ces réactions génèrent un flux d'électrons (ou courant électrique) de l'anode vers la cathode lorsque les deux électrodes sont connectées par un circuit externe. Ce flux d'électrons est compensé par un flux de protons à travers la membrane perméable qui sépare le compartiment anodique et cathodique (Figure 1). A l'instar des batteries, les PACs permettent l'obtention d'énergie électrique à partir d'une réaction chimique à l'électrode. Elles ont l'avantage en théorie de pouvoir fonctionner à l'infini, tant que H₂ et O₂ sont disponibles aux électrodes.³ Le matériau d'électrode doit lui aussi être suffisamment stable pour perpétuer la réaction, idéalement indéfiniment. L'utilisation de PACs offre de nombreux avantages environnementaux, en particulier les produits des réactions chimiques sont souvent non polluants.

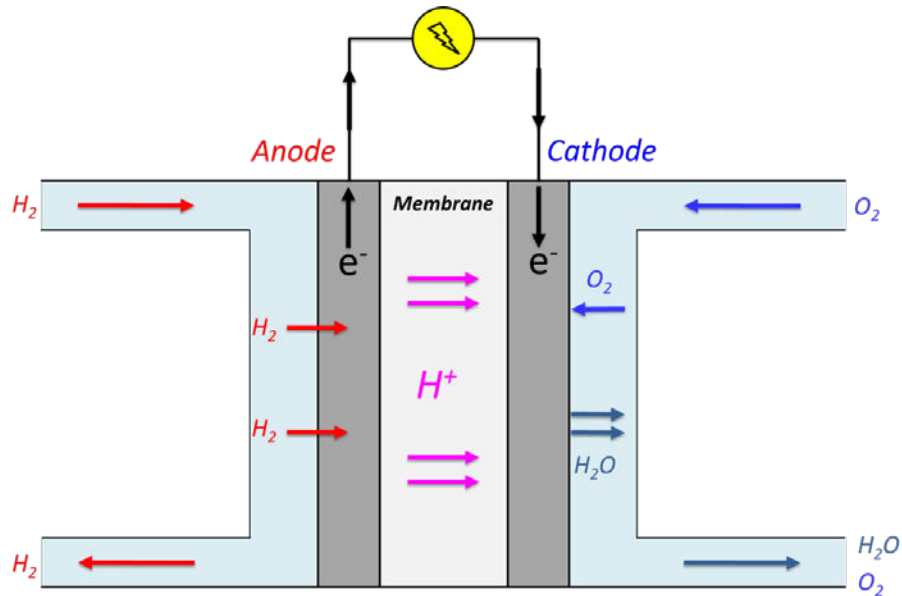


Figure 1 : Principe d'une pile à combustible H_2/O_2

I.2. Grandeurs caractéristiques

Les courbes de polarisation (Figure 2) permettent d'étudier les performances de chaque électrode. Plusieurs paramètres importants sont mis en évidence, tels que les potentiels de départ pour l'oxydation et la réduction, les courants maximaux obtenus pour chaque électrode ainsi que la tension en circuit ouvert théorique (OCV : Open Circuit Voltage). L'OCV est la tension de la pile à courant nul. Sur la base des études en demi-pile, il est possible d'identifier l'électrode limitante.

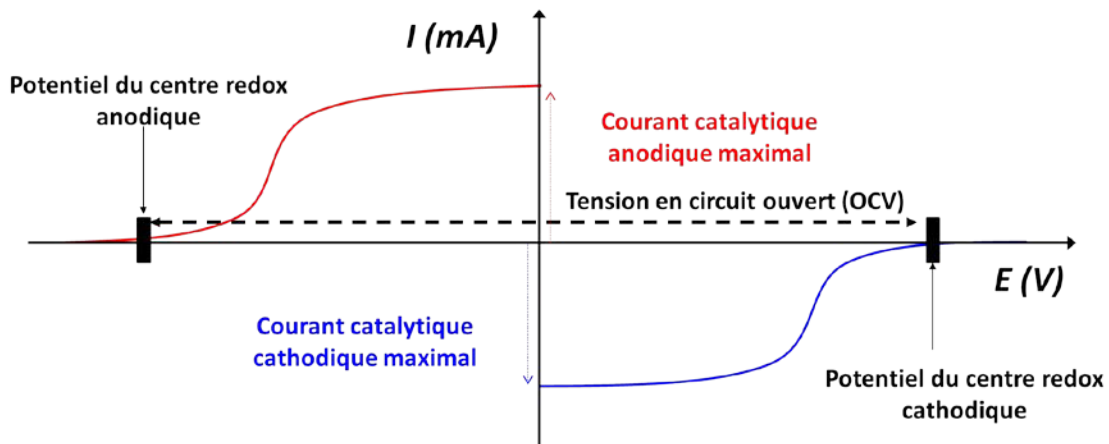


Figure 2 : Représentation sur diagramme potentiel-courant des courbes de polarisations d'une anode (rouge) et d'une cathode (bleu)

Une pile à combustible est caractérisée par deux paramètres : la tension entre les deux électrodes E (V), l'intensité du courant I (A) ou la densité surfacique de courant J (A m^{-2})

traversant les électrodes. La mesure simultanée du potentiel et du courant généré par la pile permet de déterminer la puissance $P(W)$ ou la densité surfacique de puissance $P_{\text{surfacique}} (W m^{-2})$ produite suivant :

$$P = E \times I$$

$$P_{\text{surfacique}} = E \times J$$

La tension de la pile E pour un courant I donné dépend de la différence de potentiel entre l'anode (E_a) et la cathode (E_c) mais également des pertes de surtensions (η) :

$$E = E_a - E_c - \eta$$

Trois types de perte contribuent à la détermination de la surtension : les surtensions d'activations, les surtensions dues au transport de matière, et les pertes ohmiques dues à diverses résistances internes.

Les performances d'une PAC sont généralement décrites par son OCV, sa puissance maximale, ses courbes de polarisation ($E = f(J)$) et de puissance ($P_{\text{surfacique}} = f(J)$). Toutes ces caractéristiques sont résumées sur la figure 3.

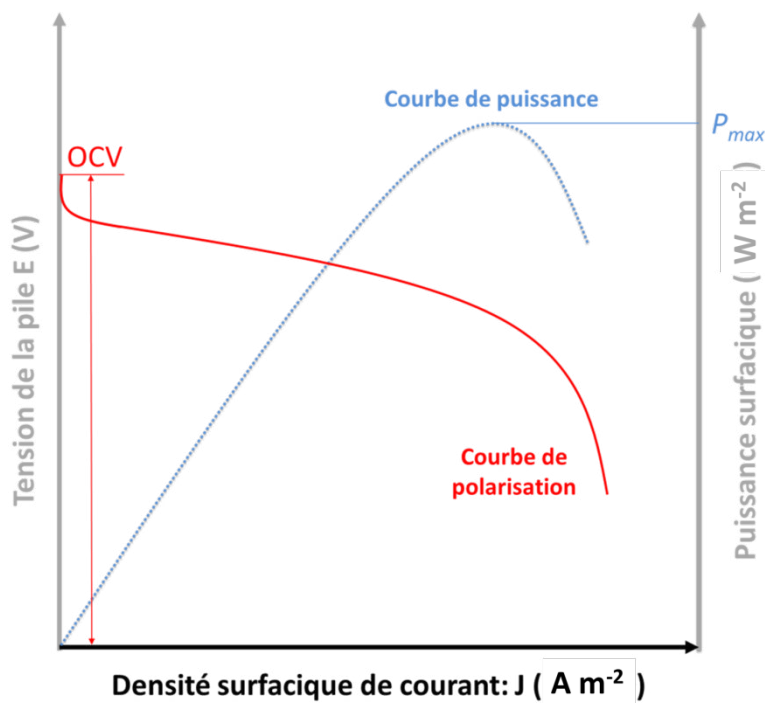


Figure 3 : Variations typiques de la tension et de la densité de puissance d'une pile à combustible en fonction de la densité de courant

I.3. Performances et limitations

Les piles à combustible fournissent des densités de puissance importantes de un à une dizaine de kW m^{-2} , avec une stabilité élevée. En effet, l'efficacité énergétique de celles-ci est supérieure aux moteurs à combustion utilisant des carburants fossiles.⁴ Les puissances délivrées et le peu de déchets produits représentent les principaux avantages de ces dispositifs.

Cependant, la grande majorité des PACs H_2/O_2 utilisent des catalyseurs métalliques comme le platine pour catalyser les réactions d'oxydation et de réduction.⁵ Ces catalyseurs sont particulièrement coûteux du fait de leur rareté sur la planète, et limitent donc la fabrication et l'utilisation à grande échelle de ces PACs et ce malgré leur développement. D'autre part, ces piles souffrent aussi d'empoisonnements relatifs à la présence d'espèces telles que le CO, le CO_2 ou encore Cl_2 qui diminuent leurs performances dans le temps.^{6,7}

Des études récentes décrivent de nouvelles architectures d'électrode tentant de minimiser les quantités de catalyseurs,^{8,9} ou l'utilisation de métaux non nobles pour l'oxydation de H_2 .^{10,11} Les alliages d'iridium et de vanadium montrent des performances prometteuses en termes d'activité et de stabilité. Les porphyrines de fer ou de cobalt, les nitrures de fer et de manganèse, et les chalcogénures de ruthénium sont les catalyseurs les plus étudiés comme alternatives au platine pour réduire O_2 . Néanmoins, à l'heure actuelle aucune de ces alternatives n'est aussi efficace que le platine.

La nature offre cependant des alternatives séduisantes de catalyseurs anodiques et cathodiques pour remplacer le platine. La biodiversité possède un large choix de catalyseurs naturels tels que les bactéries, les mitochondries ou les enzymes. Les enzymes sont des protéines capables de réaliser toutes sortes de réactions complexes et présentent l'avantage d'être spécifiques, abondantes, et biodégradables. De l'utilisation de ces biocatalyseurs découle le concept de biopile à combustible développé dans la partie suivante.

II-Les Biopiles à combustible

Une biopile à combustible (BFC), comme une PAC classique, combine l'oxydation d'un combustible (H_2 ,^{12,13} alcools,¹⁴⁻¹⁶ glucose^{17,18} ...) à l'anode à la réduction d'un comburant (essentiellement O_2) à la cathode : la première réaction libère des électrons qui seront consommés par la seconde, générant ainsi un courant électrique. Les réactions aux deux électrodes ne sont plus catalysées par des métaux, mais par des catalyseurs biologiques tels que des cellules entières, des organites cellulaires comme la mitochondrie, ou des enzymes. L'électrode joue le « rôle de substrat naturel » impliqué dans la réaction redox en tant que donneur ou accepteur d'électrons. L'utilisation de ce matériel biologique offre de nombreux avantages pour élaborer une biopile. Notamment, la structure des enzymes est conçue pour

être spécifique de leur substrat, et ces protéines catalysent des réactions redox à des potentiels proches des potentiels thermodynamiques des substrats concernés. Les potentiels des deux électrodes sont alors fixés par la valeur des potentiels des systèmes redox responsables de la réponse électrochimique (Figure 4). Les courants mesurés pour chacune des bioélectrodes sont dépendants de l'activité du matériel biologique vis-à-vis du substrat, et de nombreuses autres conditions telles que la vitesse de transfert d'électron à l'interface, la diffusion des substrats, la température, la salinité...

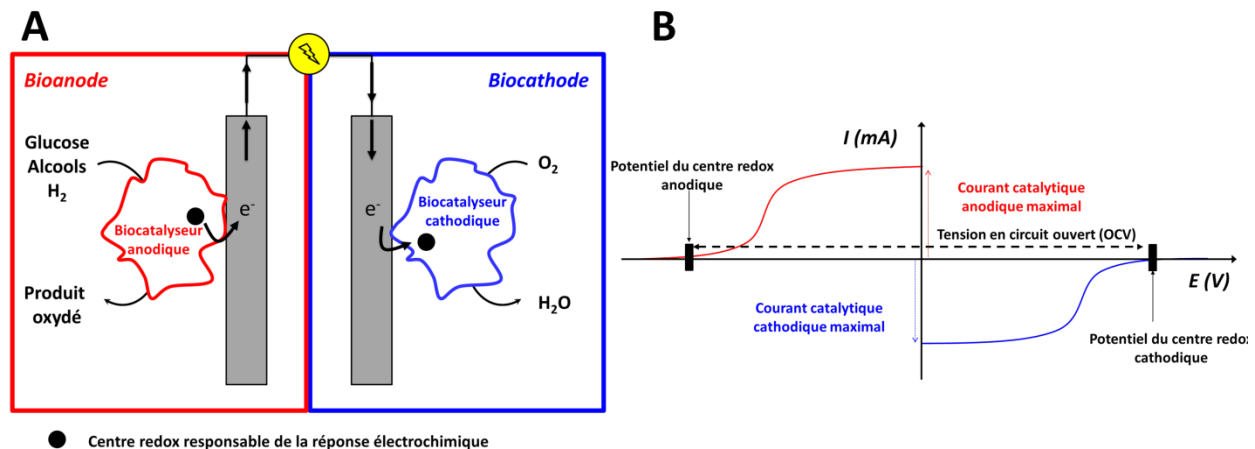


Figure 4 : A) Représentation schématique du fonctionnement d'une biopile à combustible ; B) Représentation sur diagramme potentiel-courant des contributions anodique et cathodique permettant l'obtention de l'OCV de la biopile et des courants catalytiques

Ces biopiles n'ont pas vocation à alimenter des dispositifs électriques à haute demande en énergie. En effet, l'objectif de ces biopiles est de se substituer aux piles dites « classiques » et aux batteries utilisées pour des appareils à faibles demandes énergétiques tels que des petits appareils portables ou encore des dispositifs biomédicaux comme des capteurs à glucose ou des stimulateurs cardiaques.

II.1 Les biopiles microbiennes

Les piles à combustibles microbiennes (PACMs) utilisent un organisme à part entière ; bactérie ou levure; comme biocatalyseur pour l'oxydation de matière organique à l'anode et la réduction d' O_2 à la cathode.¹⁹⁻²³ La production d'électricité est couplée à la biodégradation de matière organique ou de déchets. Outre la production d'électricité, les PACMs sont également utilisées pour la production d' H_2 à partir de la biomasse, le traitement des eaux usées et comme biocapteurs.^{22,24}

Ces biopiles ont l'intérêt d'utiliser des bio-organismes complets. La présence de nombreuses enzymes redox au sein de ces organismes s'accompagne de l'oxydation d'une très large variété de combustibles à l'anode, différents selon les souches microbiennes utilisées.²⁵ Les combustibles tels que les glucides, sont plus efficacement consommés par les PACMs, car ils

mettent en jeu une cascade de réactions enzymatiques permettant l'oxydation complète du substrat en CO_2 . Les micro-organismes (MOs) sont capables de régénérer eux-mêmes leurs enzymes ou cofacteurs nécessaires à l'oxydation de la matière organique. Ainsi, les PACMs disposent d'une durée de vie très longue, de l'ordre de plusieurs années.²⁴ Cependant, en raison de la nature vivante des biocatalyseurs, les PACMs ont une période initiale de croissance bactérienne pour former un « biofilm », d'intégration des électrodes aux mécanismes de transfert d'électron, ce qui induit des temps de réponse longs. De plus, ce type de générateur souffre en général d'une faible densité de puissance provoquée par une limitation du transport de matière à travers la membrane des cellules et d'un faible transfert électronique.²⁶ Comme les MOs peuvent se développer naturellement, il est nécessaire de séparer les deux électrodes par une membrane. En l'absence de compartimentation des bioélectrodes, les MOs utilisés à l'anode sont souvent capables de se développer à la surface de la cathode et conduisent à une diminution des performances.²⁷

Il y a encore quelques années, les cathodes utilisées dans les PACMs étaient en platine ou utilisaient des catalyseurs moléculaires tels que des porphyrines et des phtalocyanines de cobalt pour réduire le dioxygène.^{28,29} En 2005, Bergel et al. ont montré la croissance d'un biofilm marin sur une électrode d'acier inoxydable capable de réduire O_2 .³⁰ Cependant dans cette étude, l'anode utilisée était abiotique. Depuis, diverses biopiles comprenant un biofilm comme catalyseur à l'anode et à la cathode ont été développées. En 2008, Rabaey et al. ont élaboré une PACM dont la biocathode était en contact direct avec l'air.³¹ La biocathode composée d'un biofilm développé sur une surface de carbone était capable de générer $2,2 \text{ A m}^{-2}$. La combinaison de cette bioélectrode à une anode microbienne, a permis de concevoir une biopile d'une puissance de l'ordre de $0,3 \text{ A m}^{-2}$. De plus, après analyse du biofilm, la population bactérienne dominante a été identifiée et isolée. L'espèce la plus favorable à la réduction d' O_2 a ainsi été sélectionnée pour améliorer la biocathode.

Une autre approche employée pour améliorer les performances de la biocathode est l'utilisation d'une biocathode enzymatique. L'utilisation d'une biocathode à base de laccase pour la réduction du dioxygène a permis d'augmenter l'OCV de la pile à $1,1 \text{ V}$ ($0,8 \text{ V}$ avec une cathode en platine) et la puissance augmente de $4,6$ à environ 46 mW cm^{-2} .³² Plus récemment, cette stratégie a été utilisée avec une biocathode à base d'une autre enzyme ; la bilirubine oxydase ; directement au contact de l'air.³³

II.2 Les biopiles à mitochondries

Les biocatalyseurs utilisés dans les BFCs sont majoritairement les enzymes redox et les MOs entiers. Les bioélectrodes à mitochondrie sont un compromis entre l'utilisation d'une protéine et d'une cellule. Les mitochondries sont des organelles présentes dans les cellules eucaryotes. Leur rôle physiologique est essentiel puisqu'elles sont le siège du stockage de l'énergie par la

synthèse de l'ATP (Adénosine Triphosphate), grâce à la transformation de petites molécules organiques. Elles possèdent comme les MOs tout le matériel enzymatique nécessaire à la transformation totale de substrats organiques, et n'offrent pas de limitations (en termes de transport de matière ou de transfert d'électron) aussi importantes que les bactéries. Cependant, comme les enzymes redox, elles ne peuvent pas se reproduire comme les MOs. L'espèce doit donc être immobilisée sur l'électrode pour améliorer sa durée de vie qui est limitée en solution.

L'élaboration de biopile utilisant ces systèmes est assez récente, et la plupart des recherches sont menées par l'équipe de Minteer. Cette équipe s'intéresse à l'oxydation totale de substrats biologiques tels que le lactate et le pyruvate. Ils ont noté que les biopiles enzymatiques utilisant la glucose oxydase (GOx) ou la glucose déshydrogénase (GDH) à l'anode ne permettaient de collecter que deux électrons par molécule de glucose oxydée. Pourtant, son oxydation totale jusqu'au CO₂ permet de récupérer 24 électrons grâce à la glycolyse et au cycle de Krebs réalisés au sein de la mitochondrie, ce qui pourrait augmenter l'efficacité de la pile. En 2008, ils ont élaboré la première bioanode basée sur l'oxydation complète du pyruvate par des mitochondries immobilisées sur des électrodes.³⁴ L'association de cette bioanode avec une cathode à base de platine a permis de développer une biopile à mitochondrie.³⁵ Les travaux d'Archederra et al. ont confirmé que ces organites pouvaient transférer directement les électrons à l'électrode grâce à la présence d'une protéine redox membranaire, le cytochrome c.³⁶ Néanmoins, l'identité du relai responsable du transfert d'électron est controversé, puisque d'autres études suggèrent le cytochrome c et la FAD³⁷ ou encore l'ubiquinone.³⁸ La gamme de combustible de ces PACs peut aussi être élargie en utilisant le métabolisme des acides gras et des acides aminés pour la génération d'un courant anodique. En couplant une cathode de platine et une anode utilisant la cystéine comme oxydant, une densité de puissances de l'ordre de 10 μW cm⁻² a été obtenue.³⁹

II.3 Les biopiles enzymatiques

A l'inverse des PACMs qui utilisent des organismes entiers comme biocatalyseurs, les biopiles enzymatiques (PACEs) utilisent des enzymes isolées de leur organisme d'origine. Les enzymes sont des protéines capables de réaliser toutes sortes de réactions complexes tout en étant constituées d'atomes abondants comme le carbone, l'oxygène et l'azote pour la matière organique, et un certain nombre d'entre elles : les métalloenzymes, utilisent des métaux non nobles tels que le fer, le cuivre ou le nickel. Les enzymes utilisées dans les biopiles sont des oxydoréductases. Elles sont capables de catalyser une très grande variété de réaction redox sur de nombreux substrats naturels.

C'est en 1964 que la première biopile enzymatique a été décrite par Yahiro, Lee et Kimble.⁴⁰ La glucose oxydase (GOx) catalyse de l'oxydation du glucose, tandis que la réduction du dioxygène

est catalysée par une cathode en platine. Néanmoins, en raison des très faibles puissances obtenues (99 nW cm^{-2}) ainsi que la durée de vie des enzymes en solution, ces recherches sont restées très minoritaires au profit des recherches sur les PACs abiotiques qui produisent plus de courant.

Ces vingt dernières années, l'essor de la technologie des biocapteurs et l'arrivée de nouveaux matériaux d'électrodes ont contribué au développement de ces biocatalyseurs. Avec les biopiles microbiennes, les biopiles enzymatiques sont les biopiles les plus étudiées à ce jour.

II.3.1 Les enzymes : des biocatalyseurs aux multiples avantages

Les enzymes sont des électrocatalyseurs très actifs, capables à faible concentration d'accroître la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier le résultat. La biodiversité offre un large choix de protéines capables d'opérer sur des gammes très étendues de pH et de température avec de faibles surtensions. De plus, de nombreux substrats peuvent être envisagés selon la nature de l'enzyme. Les densités de courant et de puissance obtenues grâce à l'utilisation de ces protéines redox sont bien souvent supérieures à celles obtenues avec des PACMs. En effet, la diffusion du substrat est facilitée par rapport aux électrodes à base de MOs, du fait de l'absence de biofilm et de membrane cellulaire. Ces protéines sont aussi extrêmement spécifiques de leurs substrats, et permettent donc de se dispenser de la compartimentation des électrodes, coûteuses mais nécessaire dans les PACs classiques pour éviter les réactions croisées et les phénomènes de passivation qui peuvent avoir lieu aux électrodes de platine. La conception et la miniaturisation de ces biopiles sont ainsi simplifiées.

II.3.2 Quelles enzymes pour quels substrats ?

Dans certaines biopiles qui ne seront pas décrites dans ce manuscrit, il est possible de coupler une bioélectrode à une électrode abiotique. Quand le catalyseur anodique est d'origine biologique, le platine est alors généralement utilisé à la cathode pour la réduction catalytique du dioxygène.^{40,41} Quant au contraire, seul le catalyseur cathodique est d'origine biologique, l'anode peut être une électrode de zinc,^{42,43} ou de platine pour l'oxydation de H_2 .⁴⁴

Dans les biopiles enzymatiques, les biocatalyseurs sont des oxydoréductases, enzymes capables de catalyser une réaction chimique, d'oxydation ou de réduction, faisant intervenir le transfert d'un ou plusieurs électrons.

- Les biocatalyseurs enzymatiques cathodiques

A l'exception de quelques rares dispositifs utilisant le peroxyde d'hydrogène,⁴⁵ le dioxygène est le comburant le plus largement utilisé à la cathode. La réduction à quatre électrons de O_2 en eau par une enzyme dans une biopile est réalisée pour la première fois en 1999.⁴⁴ Les

métalloprotéines catalysant cette réaction appartiennent à une famille particulière, la famille des « Multicopper Oxidases » (MCOs). Comme leur nom l'indique, ces enzymes contiennent plusieurs centres cuivre au sein de leur site actif où a lieu la réduction d'O₂.⁴⁶ La laccase (Lac)^{47,48} et la bilirubine oxydase (BOD)⁴⁹ sont de loin les deux MCOs les plus largement utilisées à la biocathode. Néanmoins, il existe quelques exemples de biocathodes utilisant une autre MCO, la CueO⁵⁰ ou d'autres enzymes redox telles que la polyphénol oxydase (PPO)⁵¹ ou encore la cytochrome oxydase (Cyt Ox).⁵²

Les enzymes catalysant l'électroréduction à deux électrons de H₂O₂ en H₂O font partie de la classe des peroxydases. Elles sont souvent composées d'un hème comme site catalytique. Ces différentes enzymes ainsi que les demi-réactions redox mis en jeu dans le processus catalytique sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Couples oxydant/biocatalyseur majoritairement utilisés dans la conception de biocathodes enzymatiques

Oxydants	Enzymes	Métal	Demi-réaction
O ₂	Laccase (Lac)	Cu	$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2 H_2O$
	Bilirubine Oxydase (BOD)	Cu	
	CueO	Cu	
	Polyphénol Oxydase (PPO)	Cu	
	Cytochrome Oxydase (Cyt Ox)	Cu/Fe/hème	
H ₂ O ₂	Peroxydase de Raifort (HRP)	Fe/hème	$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2 H_2O$

- Les biocatalyseurs enzymatiques anodiques

L'un des principaux intérêts des biopiles enzymatiques est de pouvoir utiliser un grand nombre de combustibles à oxyder à l'anode pour collecter les électrons. Le choix du combustible détermine le système enzymatique utilisé à la bioanode, et définit donc le type de biopile développé. Un large éventail de biopiles enzymatiques est donc possible selon les applications visées. Les carburants sont essentiellement les sucres (glucose, lactose, fructose), certains alcools (éthanol, méthanol) et le dihydrogène. Une liste représentative des enzymes utilisées à l'anode est présentée dans le tableau 2.

Depuis la première biopile glucose/O₂ développée en 1964, la GOx reste l'un des catalyseurs préférentiels des bioanodes enzymatiques.^{18,53,54} Ces enzymes ont une très forte sélectivité pour le β-glucose, qu'elles oxydent grâce à leur cofacteur Flavine Adénine Dinucléotide (FAD).

Les glucoses déshydrogénases (GDH) sont des enzymes dépendantes d'un cofacteur comme la pyrroloquinoléine quinone (PQQ) ou le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Elles sont aussi très largement utilisées pour oxyder le glucose.⁵⁵⁻⁵⁷ Le fructose est quant à lui oxydé par la fructose déshydrogénase (FDH) qui utilise comme cofacteur la FAD.^{58,59} Les GDHs et FDHs

présentent l'avantage de ne pas réduire le dioxygène, contrairement à la GOx. Elles évitent donc la compétition entre l'oxydation du substrat et la réduction d'O₂ à l'anode qui peut provoquer une baisse du voltage de la biopile, et une diminution des courants à un potentiel donné.

D'autres substrats comme le cellobiose,⁶⁰ le lactate,^{61,62} des aldéhydes,¹⁵ ou encore certains alcools⁶³⁻⁶⁵, peuvent être oxydés à l'anode, respectivement par les cellobiose, lactate, aldéhyde et alcool déshydrogénases.

Enfin, comme le glucose, le dihydrogène est un combustible très attractif. Les hydrogénases sont des métalloprotéines capables d'oxyder H₂ à de très faibles surtensions.¹² L'utilisation de ce combustible présente l'avantage d'augmenter la tension de la biopile. Le voltage d'une biopile enzymatique H₂/O₂ est proche de celui observé pour les PACs H₂/O₂ abiotiques. Néanmoins, ces protéines présentent le désavantage de se désactiver en présence de dioxygène.⁶⁶ Actuellement, de nombreux travaux sont menés sur la découverte et l'utilisation d'hydrogénases tolérantes à O₂ pour contourner ces limitations.⁶⁷⁻⁷¹

Tableau 2 : Couples combustible/biocatalyseur principalement utilisés dans la conception de bioanode enzymatique

Combustibles	Enzymes	Cofacteur/ Métal	Demi-réactions
Glucose	Glucose oxydase (GOx) Glucose déshydrogénase (GDH)	FAD NAD ⁺ ou PQQ	D-Glucose → Acide gluconique
Fructose	Fructose déshydrogénase (FDH)	FAD/hème	D-fructose → 5-céto-fructose
Cellobiose	Cellobiose déshydrogénase (CDH)	FAD/hème	Lactose → Lactone
Lactate	Lactate déshydrogénase (LDH)	NADH	Lactate → Pyruvate
Ethanol Méthanol	Alcool déshydrogénase (ADH)	NAD ⁺	Alcool → Aldéhyde
Aldéhydes	Aldéhyde déshydrogénase (AIDH)	NAD ⁺	Aldéhyde → Acide
H₂	Hydrogénase (H ₂ ase)	[NiFe] ou [FeFe]	H ₂ → 2H ⁺ + 2e ⁻

B- Un biocatalyseur cathodique pour les biopiles enzymatiques : Les MCOs

Quel que soit le type de biopile développée, le dioxygène est le comburant le plus largement réduit à la cathode. Les systèmes enzymatiques utilisés pour catalyser cette réaction ont été présentés dans la partie A. Les « Multicopper Oxidases » telles que les laccases (Lac) et les bilirubines oxydases (BOD) sont les métalloprotéines principalement utilisées pour réduire le dioxygène à la biocathode. Ces MCOs ont énormément été utilisées dans des applications biotechnologiques comme le blanchiment de la pâte de papier, la décoloration des colorants synthétiques, la synthèse de polymères complexes, l'assainissement des sols pollués, les biocapteurs et les biopiles... Ces enzymes couplent l'oxydation de multiples substrats (des phénols, l'ascorbate ou divers amines aromatiques) à la réduction à quatre électrons de O_2 en eau, ce qui en fait des enzymes de choix pour l'élaboration de biocathode enzymatique.⁴⁶ Ces métalloprotéines sont classées en deux sous familles selon leur capacité à oxyder ou non la bilirubine. Les BOD des champignons *Myrothecium verrucaria* (BOD *Mv*) et *Trachyderma tsunodae* (BOD *Tt*) ainsi que les Lac fongiques de *Trametes versicolor* (Lac *Tv*) et *Trametes hirsuta* (Lac *Th*) ont particulièrement été étudiées, notamment du fait de leur capacité à réduire O_2 à haut potentiel. Néanmoins, d'autres MCOs, comme par exemple la Lac *Rhus vernicifera* (Lac *Rv*) qui provient des plantes, et la BOD bactérienne de *Bacillus pumilus* (BOD *Bp*) ont aussi été étudiées.

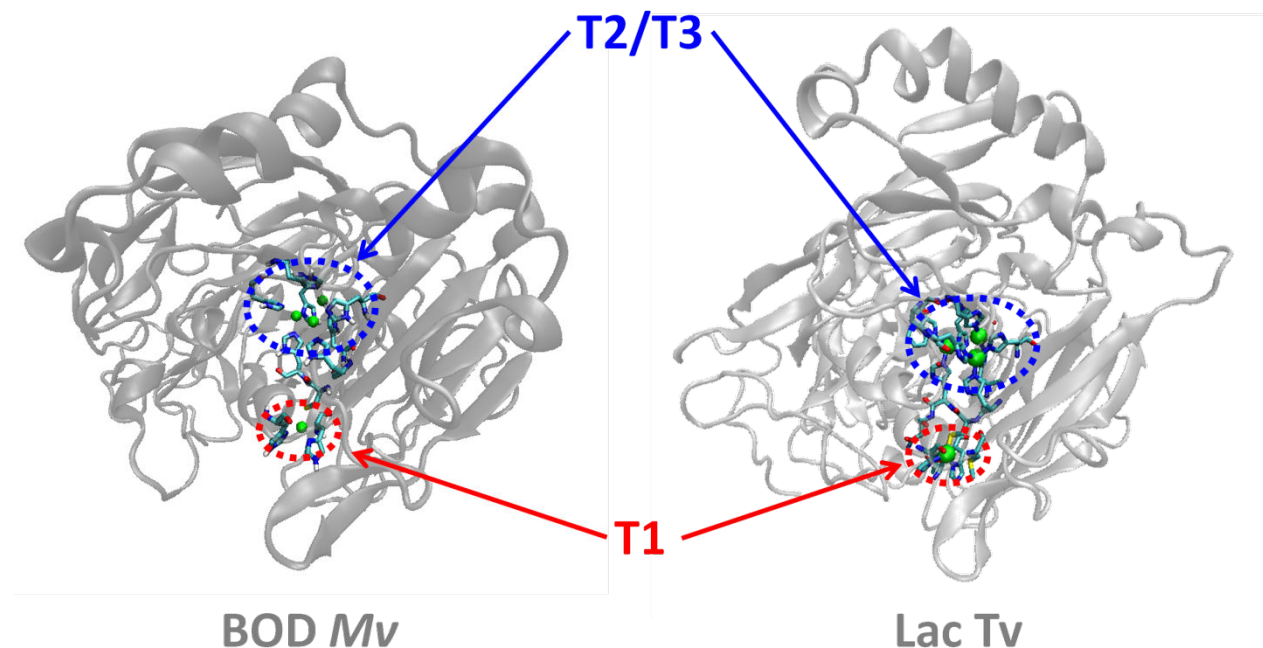


Figure 5 : Structure cristalline de la Lac Tv et de la BOD Mv. Les centres cuivre sont colorés en vert

Bien que la structure de ces enzymes varie d'une protéine à l'autre, le site catalytique est bien conservé. Comme illustré en figure 5, elles possèdent quatre centres cuivre classés en trois types en fonction de leurs propriétés optiques et magnétiques ; appelés cuivre de type 1, cuivre de type 2 et cuivre de type 3.

I- Structure du site actif des MCOs

Au site actif, l'oxydation de divers substrats est couplée à la réduction de l'oxygène en eau (Figure 6). Plusieurs mécanismes ont été proposés ;^{46,72,73} mais le chemin électronique exact n'a pas encore été élucidé. Néanmoins, il est largement supposé que le centre T1 ; dit « cuivre bleu » ; récupère les électrons du substrat qu'il oxyde, et les relaie au cluster T2/T3 (TNC Trinuclear Cluster en anglais) responsable de la réduction à quatre protons et quatre électrons d'O₂ en eau. Le relai électronique T1 est relié au centre T2/T3 par une triade d'acides aminés Histidine-Cystéine-Histidine (His-Cys-His) ; qui est commune à toutes ces métalloenzymes. La distance entre ces deux sites est d'environ 12 à 14 Å,⁷⁴ ce qui permet une connexion électronique efficace via un transfert intra protéique.⁷⁵

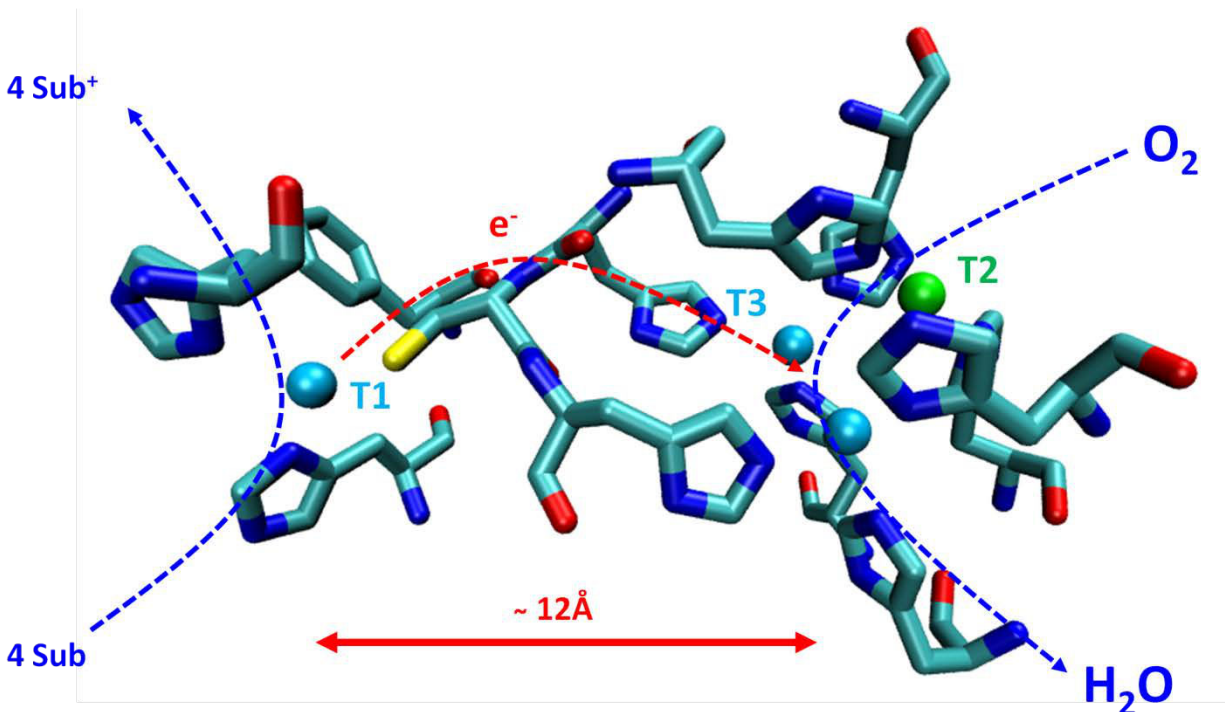


Figure 6 : Représentation du site actif de la Lac Tv (PDB 1KYA). Les centres T1 et T3 sont représentés en bleu tandis que le centre T2 est représenté en vert. Les flèches symbolisent les échanges d'électrons et les réactions d'oxydoréductions

II- Mécanisme de réduction de O₂ par les MCOs

Le mécanisme de réduction du dioxygène par les MCOs n'est pas encore totalement élucidé. Néanmoins, le mécanisme présenté en figure 7 est communément admis. Il met en jeu deux transferts consécutifs d'électron à partir d'une enzyme entièrement réduite. Le dioxygène se lie au TNC, et est réduit par deux électrons, formant un intermédiaire peroxyde (PI). Cette étape est suivie d'un second transfert à deux électrons qui clive la liaison O-O et forme l'état intermédiaire natif. La régénération de l'état totalement réduit s'effectue grâce à l'oxydation de quatre molécules de substrats.

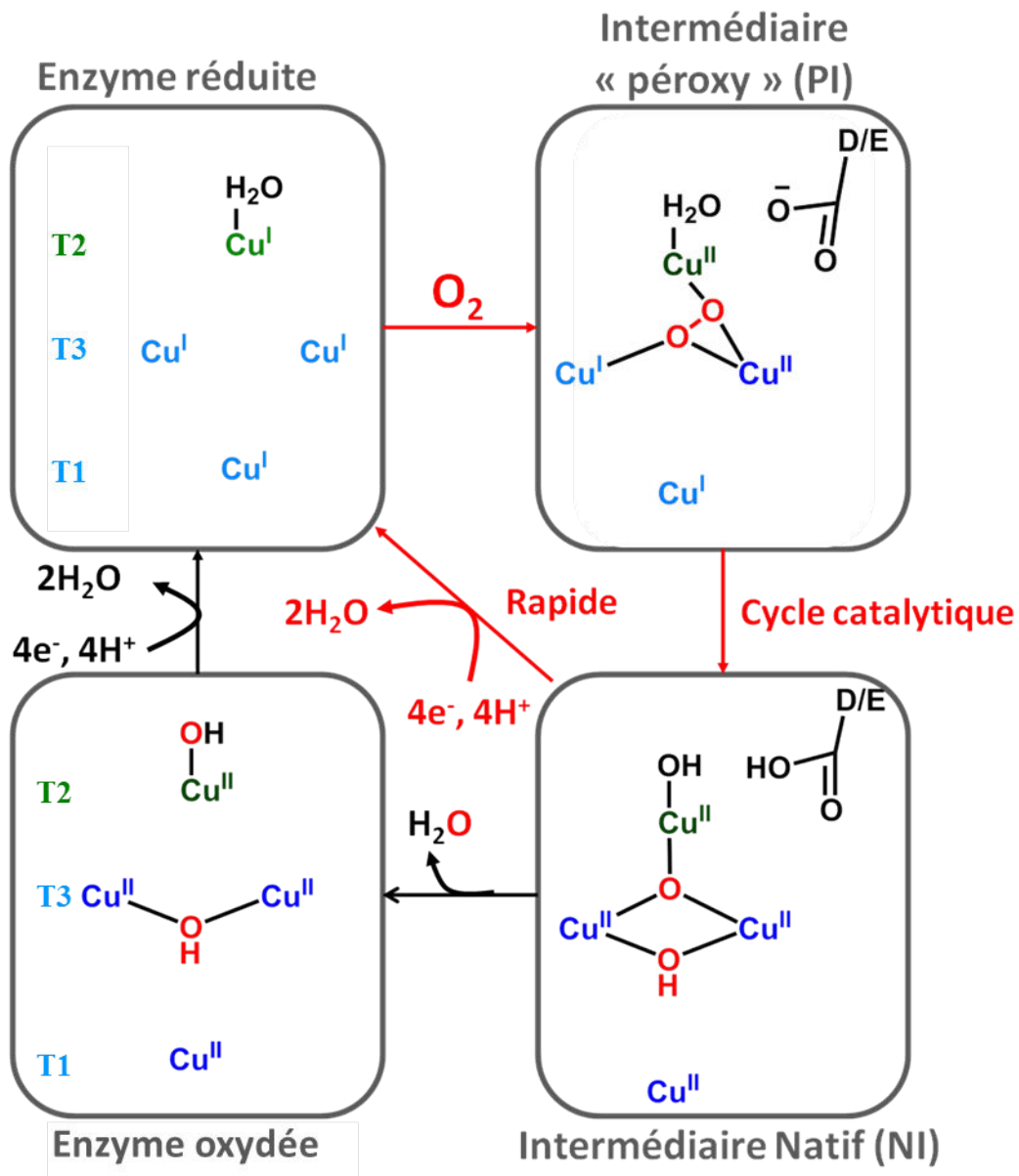


Figure 7 : Mécanisme de réduction du dioxygène par les MCOs. Les flèches rouges indiquent les étapes du cycle catalytique. Adapté de^[76]

L'existence d'une forme oxydée de l'enzyme, inactive pour la catalyse a été décrite. Sa formation ainsi que sa réduction sont des étapes lentes. Il a d'abord été suggéré que cette forme ne pouvait réintégrer le site catalytique que par réduction.⁷⁷ Cependant, Cracknell et al. ont réalisé une étude qui suggère que cette forme est en équilibre avec la forme oxydée active NI, et peut donc être transformée en forme active sans étape de réduction.

III- Le centre T1

Le centre cuivre T1 des MCOs est classiquement coordiné à une cystéine (Cys), une méthionine (Met) et deux histidines (His) (Figure 8A). Cependant, pour certaines protéines fongiques comme la Lac Tv et Th ainsi que la BOD Tt la méthionine peut être remplacée par une phénylalanine (Phe). En conséquence le cuivre se retrouve tricoordiné (Figure 8B).⁷³

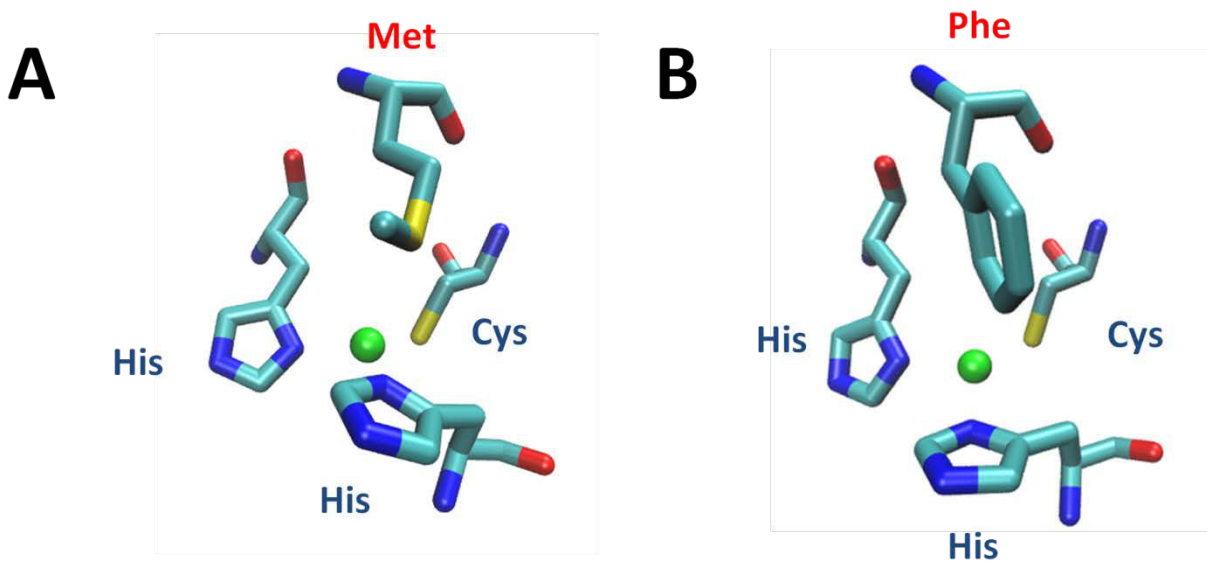


Figure 8 : Structure du centre T1 : A) BOD Mv et B) Lac Tv

Cette plus faible sphère de coordination, accompagnée de la présence d'un acide aminé encombrant et hydrophobe augmente le potentiel redox du centre T1. En effet, le potentiel redox de la transition $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ dépend de la géométrie du centre cuivre, de sa sphère de coordination ainsi que de la nature et de l'hydrophobicité des ligands.^{73,78} Les enzymes pour lesquelles le centre T1 est tricoordiné sont dites à « haut potentiel » tandis que les enzymes ayant un centre T1 présentant quatre ligands dans leur sphère de coordination sont dites à « faible potentiel ». Le tableau 3 souligne l'effet de la sphère de coordination du centre T1 sur son potentiel redox.

Tableau 3 : Comparaison du potentiel redox du centre T1 et des séquences d'acides aminés de plusieurs MCOs. En rouge acides aminés entourant le T1, et en bleu le T3.^{72,73,79,80}

Enzymes	Séquence peptidique	E_{T1} vs. ENH	Accession number
<i>Trametes versicolor</i>	450 HCHIDFHLEAGF	780 (pH 6)	A35883
<i>Trametes Hirsurta</i>	474 HCHIDFHLEAGF	780 (pH 6)	Q02497
<i>Rhus vernicifera</i>	492 HCHFERHTEGM	430 (pH 7,5)	BAB63411
<i>Basilus pumilus</i>	491 HCHILEHEDYDM	570 (pH 7)	A8FAG9
<i>Myrothecium verrucaria</i>	454 HCHNLIHEDHDM	650 (pH 7)	Q12737
<i>Trachyderma tsunodae</i>	474 HCHIDFHLEAGF	>650 (pH 7)	BAA28668

Des travaux récents sur les cuprédoxines ont mis en évidence une dépendance linéaire du potentiel redox avec l'hydrophobicité des ligands ; et donc l'accessibilité au solvant.⁸¹ Il est supposé qu'en présence d'eau, le centre T1 interagit avec l'atome d'oxygène de l'eau ce qui stabilise la forme Cu^{II}. La stabilisation de la forme oxydée a pour conséquence la diminution du pouvoir oxydant, et donc la diminution du potentiel redox du couple. Par conséquent, un environnement hydrophobe limite l'accès de l'eau, ce qui stabilise préférentiellement la forme Cu^I et donc augmente le potentiel du couple Cu^{II}/Cu^I.^{78,82}

IV- Le cluster T2/T3

Les ligands du TNC sont exclusivement des histidines (Figure 7). Chaque atome de cuivre du centre T3 est coordiné à trois His tandis que le centre T2 est coordiné à deux His et une molécule d'eau.⁸³ Étant donné sa position plus en profondeur dans l'enzyme, seules quelques études ont rapporté le potentiel du TNC. En 2006, les études de Shleev et Gorton suggèrent que le potentiel du T2 est aux alentours de 780 mV vs. NHE (pH 4) pour la Lac *Th*,⁸⁴ tandis que pour les BOD de *Tt* et *Mv* le potentiel du T2 est estimé à 400 mV vs. NHE (pH 7).⁷⁹ En 2008, les travaux de Ramirez et al. semblent confirmer le potentiel du centre T2 de la BOD *Tt*.⁸⁵ Néanmoins, Ivnitsky et al. ont montré que les valeurs de potentiels des centres T1 et T2/T3 étaient dépendantes du procédé d'immobilisation des enzymes ainsi que du pH du tampon d'analyse.⁸⁶

IV- Effets du pH, du chlore et de l'urate

Les BOD sont actives sur une plus large gamme de pH comparées aux laccases. En effet, ces enzymes sont capables de catalyser la réduction du dioxygène à pH 7 ; tandis que les laccases sont majoritairement inactives à ce pH. Ces propriétés font donc des BODs de bonnes candidates pour la conception de biopiles glucose/O₂ destinées à être implantées dans les

organismes vivants. De plus, en milieu physiologique, les ions chlorures sont présents à hauteur de 150 mM. À cette concentration les laccases voient leur activité catalytique grandement diminuée.⁸⁷ À l'inverse, les BOD sont plus tolérantes aux ions chlorure ; l'activité catalytique de BOD *Bp* est quasiment indépendante de la concentration en chlore à partir de 100 mM.⁸⁸ Ces enzymes sont en revanche sensibles à l'urate qui est un autre constituant des fluides physiologiques.^{89,90} Encore une fois la BOD *Bp* se montre plus résistante vis-à-vis de cette espèce.⁸⁸ Cependant, il est à noter que la Lac *Tv* a un potentiel de son centre T1 bien plus élevé que celui des BOD. Ceci est un avantage non négligeable pour la conception de biopiles.

Selon l'application et les conditions opératoires envisagées pour les biopiles enzymatiques développées, certaines MCOs seront privilégiées comme biocatalyseurs.

C- Vers l'élaboration de bioélectrodes efficaces : Connexion et immobilisation des enzymes à l'électrode

Les biopiles enzymatiques utilisent donc la biocatalyse. Une enzyme spécifique de son substrat est placée à chaque électrode pour réaliser une réaction d'oxydation à l'anode ou de réduction à la cathode. Pour qu'un courant électrique soit généré à partir de ces deux réactions, l'électrode doit se substituer au cosubstrat de l'enzyme pour pouvoir récupérer les électrons à l'anode et les fournir à la cathode. La connexion électrique entre l'enzyme et l'électrode s'avère donc être l'un des défis majeurs dans l'élaboration de biopiles efficaces. Dans le premier dispositif développé par Yahiro en 1964,⁴⁰ la GOx, utilisée comme catalyseur anodique, est présente dans la solution électrolytique ainsi qu'un complexe de Fe(III). L'oxydation du glucose a donc lieu en phase homogène. Les électrons générés par la réaction sont transférés aux complexes de fer qui diffusent jusqu'à l'électrode et cédés lors de collisions entre les complexes et l'électrode. La puissance générée est alors très faible, de l'ordre de la centaine de nW cm⁻². Depuis, la bioélectrochimie a permis de mieux comprendre les échanges d'électrons entre l'électrode et les protéines redox.⁹¹ Pour étudier ces systèmes biologiques, l'interaction entre la protéine et l'électrode s'est avérée capitale. Dans des applications telles que les biopiles enzymatiques ou les biocapteurs, l'immobilisation des enzymes est devenue fondamentale dans le développement de dispositifs efficaces et stables dans le temps.⁹² De plus, la bioélectrocatalyse mise en jeu dans la conception de biopiles enzymatiques consiste en des transferts d'électrons entre la protéine et l'électrode. Ces échanges sont capitaux et dicteront l'efficacité catalytique des systèmes. Les protéines doivent donc être immobilisées de manière stable, non dénaturante et de telle sorte à effectuer un transfert d'électron efficace avec l'électrode. La durabilité et l'efficacité des systèmes sont des enjeux clés pour une éventuelle commercialisation.

I- Immobilisation des enzymes à l'électrode

L'immobilisation des enzymes s'appuie sur des méthodes physico-chimiques de confinement des biomolécules au sein d'édifices à 2 ou 3 dimensions. Elle doit être suffisamment stable, tout en conservant les propriétés structurales de l'enzyme, sans quoi la réactivité, la cinétique et la sélectivité des enzymes peuvent être altérées ; et donc l'efficacité catalytique également. De plus, le confinement des biocatalyseurs doit permettre l'accès du substrat au site actif ou au site de reconnaissance. Divers techniques d'immobilisation des enzymes ont été développées ces vingt dernières années.⁹³ L'adsorption (physisorption), le greffage sur monocouche auto-

assemblées, l'encapsulation, la réticulation, la formation d'un lien covalent et les assemblages supramoléculaires constituent les principales méthodes utilisées.

I.1 L'adsorption ou physisorption

Cette méthode est à priori la plus simple et la plus douce pour immobiliser les protéines. Elle repose sur la simple physisorption de l'enzyme sur la surface modifiée ou non de l'électrode. Elle ne fait intervenir que des interactions faibles et non spécifiques de types hydrophobes, électrostatiques ou de Van der Waals.

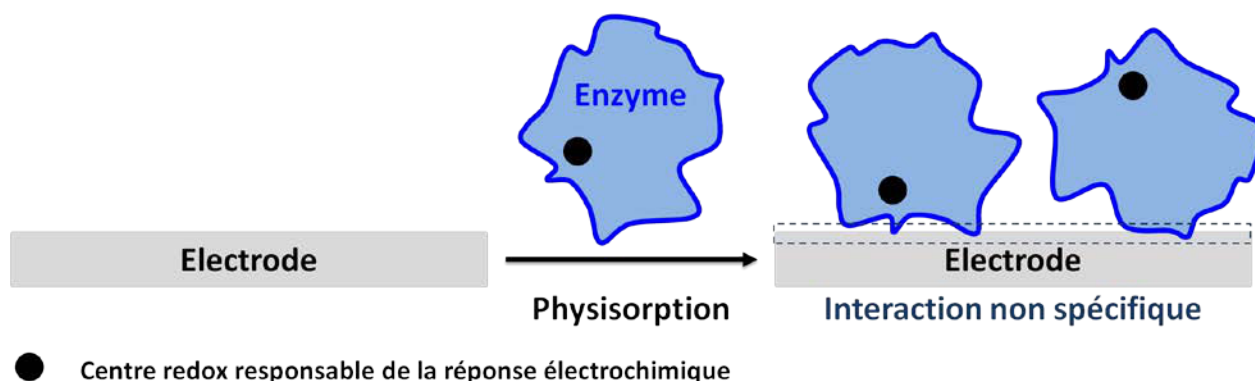


Figure 9 : Représentation schématique d'une fonctionnalisation de surface par simple physisorption de l'enzyme sur la surface de l'électrode

Cette méthode a l'avantage d'être facile à mettre en place, et ne limite pas la diffusion du substrat vers l'enzyme. Néanmoins, les phénomènes de désorption de la protéine diminuent la stabilité des systèmes développés avec cette technique.

I.2 La réticulation

Cette technique relativement ancienne permet la formation d'agrégats de protéines par réaction intermoléculaire avec un agent de couplage ou « cross linker » (Figure 10).⁹⁴ Ce dernier possède à ses extrémités des fonctions réactives qui vont se coupler aux protéines par réaction avec les résidus $-NH_2$ situés en surface. L'agent de couplage le plus utilisé est le glutaraldéhyde,⁹⁵ mais d'autres molécules portant des extrémités esters activés ou époxydes sont aussi fréquemment utilisées.⁹⁶ Cette technique donne lieu à la formation d'agrégats en solution difficiles à manipuler. La réticulation des protéines a donc souvent lieu sur l'électrode modifiée ou non. L'immobilisation est beaucoup plus stable dans le temps que la simple adsorption. Cette méthode a l'avantage d'être simple à mettre en œuvre et elle est plus stable que la simple physisorption. Cependant, elle a l'inconvénient de pouvoir dénaturer les protéines et donc de diminuer l'activité et la spécificité de celles-ci.

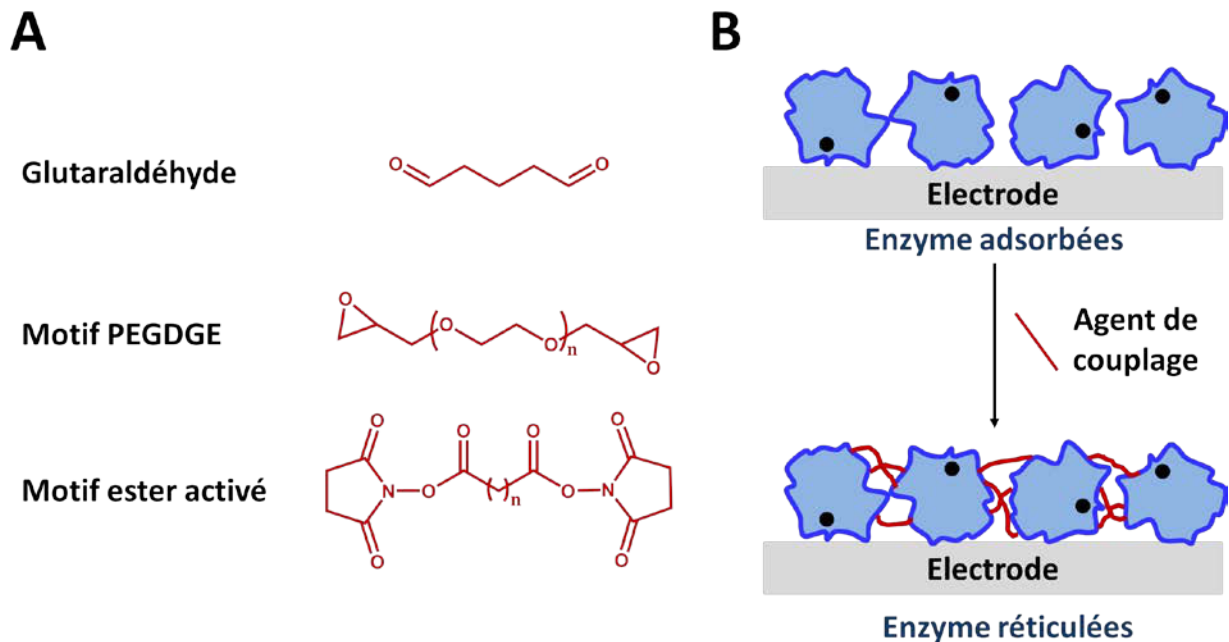


Figure 10 : A) Structures des agents de couplages couramment utilisés pour la réticulation de protéines ; B) schéma de la réticulation d'enzyme à la surface d'une électrode

I.3 L'encapsulation (polymères, sol-gels)

Cette technique consiste en la capture des protéines dans un environnement tridimensionnel. Des polymères non conducteurs tels que le Nafion,⁹⁷ le chitosan⁹⁸ ou encore la cellulose¹⁸ permettent de former des membranes qui assurent un confinement étroit de l'enzyme à l'électrode (Figure 11A). L'enzyme peut également être encapsulée dans des matrices inorganiques telles que les sol-gels de silice.⁹⁹ Les transferts d'électrons entre ces dépôts et l'électrode peuvent être améliorés par le piégeage simultané de nanoparticules conductrices au sein de la matière organique.¹⁰⁰ Les polymères électrogénérés constituent une sous-catégorie. Ils ont l'avantage de pouvoir être formés par l'oxydation chimique ou électrochimique d'un monomère de base pour obtenir un polymère conducteur (Figure 11B). Cet outil est extrêmement puissant sur surface pour encapsuler et retenir l'espèce biologique. Les polymères les plus connus et les plus utilisés sont le polypyrrole, la polyaniline, le polythiophène... En mélangeant l'enzyme et le monomère (ou le polymère directement) il est possible de former par oxydation un dépôt constitué de l'entité biologique encapsulée dans le polymère à la surface de l'électrode.¹⁰¹⁻¹⁰⁴ Ces films électrogénérés offrent une couche de protection à l'enzyme qui prévient ainsi la dénaturation de l'espèce dans le temps (Figure 11C). La chaîne latérale R portée par ces polymères peut également être modulée afin de faire varier les propriétés finales du polymère.

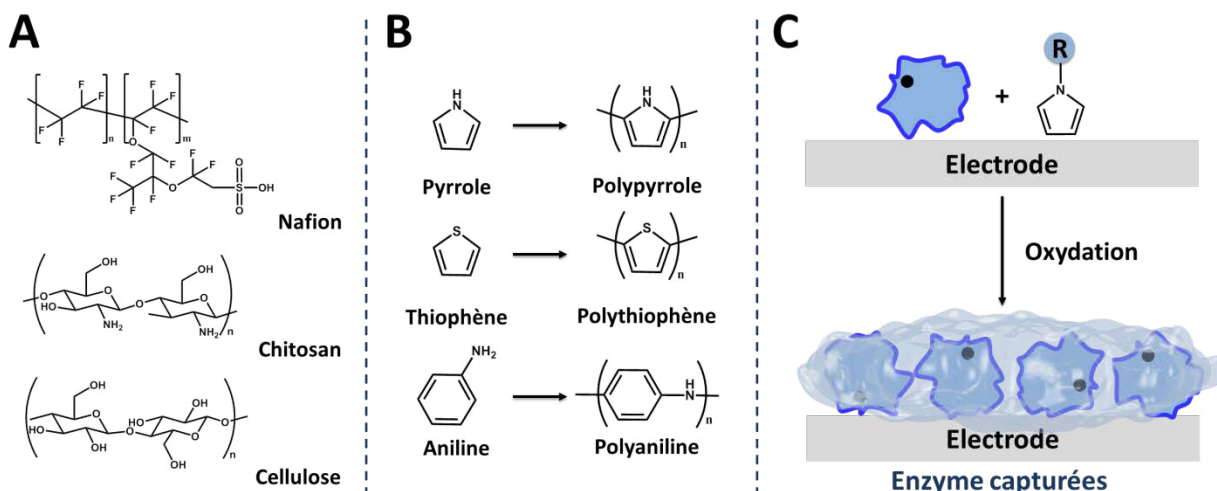


Figure 11 : Structure de polymères pour la capture de biomolécule ; B) Exemples de monomères polymérisables par oxydation chimique ou électrochimique et C) Représentation schématique de la capture d'enzyme au sein d'un film de polypyrrole fonctionnalisable électrogénéré sur l'électrode

Une grande quantité de biocatalyseurs peut être immobilisée par la formation de ces structures 3D, cependant le polymère peut aussi diminuer la diffusion du substrat vers l'enzyme et donc limiter les performances des bioélectrodes.

I.4 Formation d'assemblages supramoléculaires

Une technique élégante pour réaliser l'immobilisation de biomolécules est de tirer avantage des interactions d'affinité ou hôte invité entre une molécule biologique modifiée ou non et une autre molécule (Figure 12). Le but est de reproduire ce qui existe déjà dans la nature comme l'hybridation du double brin de l'ADN, la reconnaissance de certaines structures saccharidiques par des lectines, ou encore l'interaction entre le substrat et son site de fixation au sein de l'enzyme. Des modifications peuvent être effectuées sur la protéine mais également à la surface du matériau d'électrode. Il existe de nombreuses méthodes de fonctionnalisation des surfaces comme l'utilisation de polymères, de sels d'aryle diazoniums ou encore la formation de monocouches auto-assemblées (SAM « self-assembled monolayer »).^{104,105} Ces modifications permettent l'incorporation de divers groupements chimiques permettant de nombreux types d'interactions. Ces méthodes de fonctionnalisation sont plus amplement détaillées dans la suite de ce manuscrit. Afin de mimer ces interactions affines, il existe actuellement toute une panoplie de stratégies. L'une des plus largement employée repose sur la fonctionnalisation de la surface de l'électrode et de l'enzyme par un dérivé biotine. Comme l'illustre la figure 12A, ces biotines vont interagir avec un dérivé (strept)avidine pour former un assemblage supramoléculaire stable ; la constante d'affinité entre ces molécules K_a est de $10^{15} \text{ L mol}^{-1}$.¹⁰⁶ Une autre stratégie beaucoup utilisée et schématisée en figure 12B, repose sur l'utilisation de

cyclodextrine (CD).¹⁰⁷ De nombreuses études décrivent notamment l'interaction entre des dérivés ferrocènes¹⁰⁸ et adamantanes¹⁰⁹ ($K_a = 10^5 \text{ L mol}^{-1}$) avec les cyclodextrines. Une troisième méthode repose sur la formation d'un complexe de coordination autour d'un ion cuivre ou nickel avec un résidu acide nitrilotriacétique (NTA) et l'enzyme fonctionnalisée par un tag histidine ou des biotines (Figure 12C).^{110,111} Enfin, il existe une autre technique reposant sur l'affinité de l'enzyme pour son substrat. La surface de l'électrode est alors fonctionnalisée par le substrat ou une partie du substrat.^{48,112}

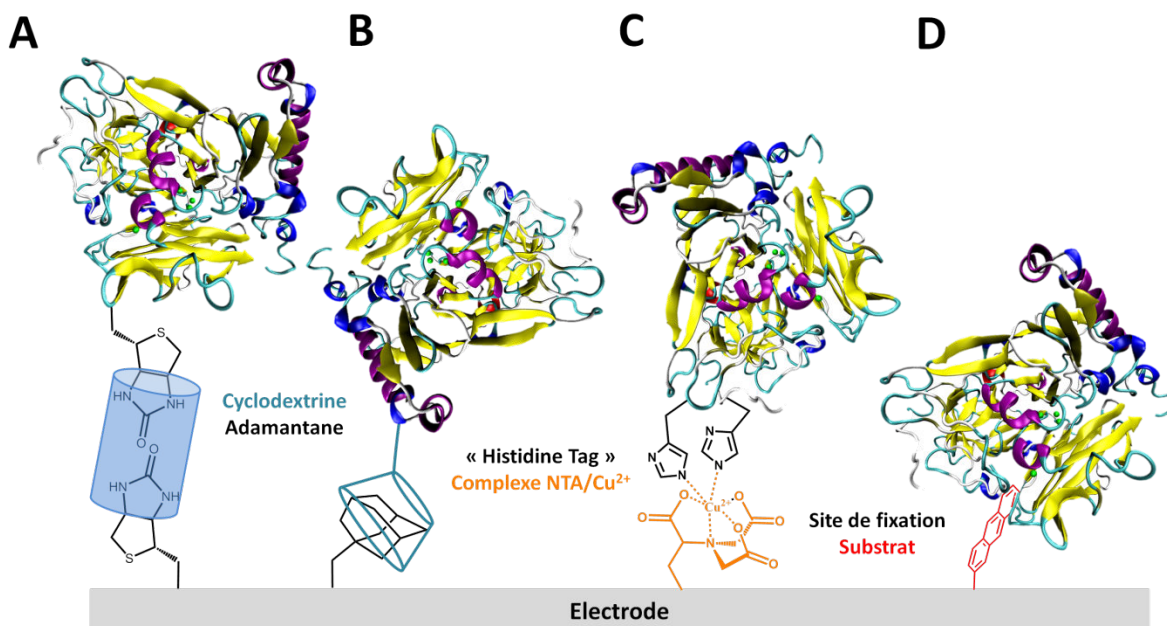


Figure 12 : Représentation schématique de différentes méthodes d'immobilisation par interactions supramoléculaires A) Dépôt couche par couche biotine/avidine/enzyme fonctionnalisée par une biotine ; B) interaction entre l'adamantane et une enzyme fonctionnalisée par une cyclodextrine ; C) formation d'un complexe NTA/Cu(II)/enzyme fonctionnalisée par des histidines et D) interaction entre la poche de fixation du substrat de l'enzyme et le substrat

Ces techniques sont parmi les plus développées, mais il en existe bien d'autres se basant par exemple sur des interactions électrostatiques ou hydrophobes.¹¹³ Ces différents assemblages supramoléculaires ont l'avantage d'être spécifiques et de s'effectuer dans des conditions douces qui n'altèrent pas les propriétés de l'enzyme. Cependant, la plupart d'entre elles nécessitent la fonctionnalisation de la biomolécule afin d'incorporer le groupement nécessaire à la formation de l'assemblage, mais le contrôle de la position de la molécule d'assemblage (cyclodextrine, tag His...) permet de contrôler l'orientation de l'enzyme à la surface des électrodes.

1.5 La liaison covalente

Il est aussi possible de lier covalamment les protéines à la surface de l'électrode. Cette méthode nécessite la fonctionnalisation préalable de la surface de l'électrode et dans certains cas de

l'enzyme par des fonctions chimiques réactives. Elle permet l'immobilisation efficace et théoriquement irréversible de l'enzyme. De nombreuses études utilisent la réactivité de certains acides aminés présents au sein des enzymes pour former un lien covalent (Figure 13A, B et C).¹¹⁴ Les méthodes les plus utilisées font généralement intervenir la réactivité des résidus lysines (-NH₂) sur des fonctions esters activés (Figure 13A) ou aldéhydes, pour former respectivement un lien amide ou amine. La réactivité entre les fonctions thiols (-SH) des cystéines et des groupements maléimide sur surface (Figure 13B) est également abondamment décrite. Enfin, la plupart des fonctions nucléophiles présentes sur les acides aminés ont la capacité de réagir sur un époxyde (Figure 13C). Pour toutes ces immobilisations, la modification de l'enzyme n'est pas nécessaire car les fonctions réactives sont naturellement présentes, ce qui simplifie la conception des bioélectrodes. Toutefois, on ne contrôle pas à quel endroit l'enzyme sera greffée. Cela peut se traduire par une mauvaise orientation de celle-ci ce qui induirait une limitation des performances de la bioélectrode. En effet, si lors de ce greffage aléatoire le site responsable de la réponse électrochimique est très éloigné de la surface de l'électrode, le transfert d'électron entre l'enzyme et l'électrode n'aura pas lieu.

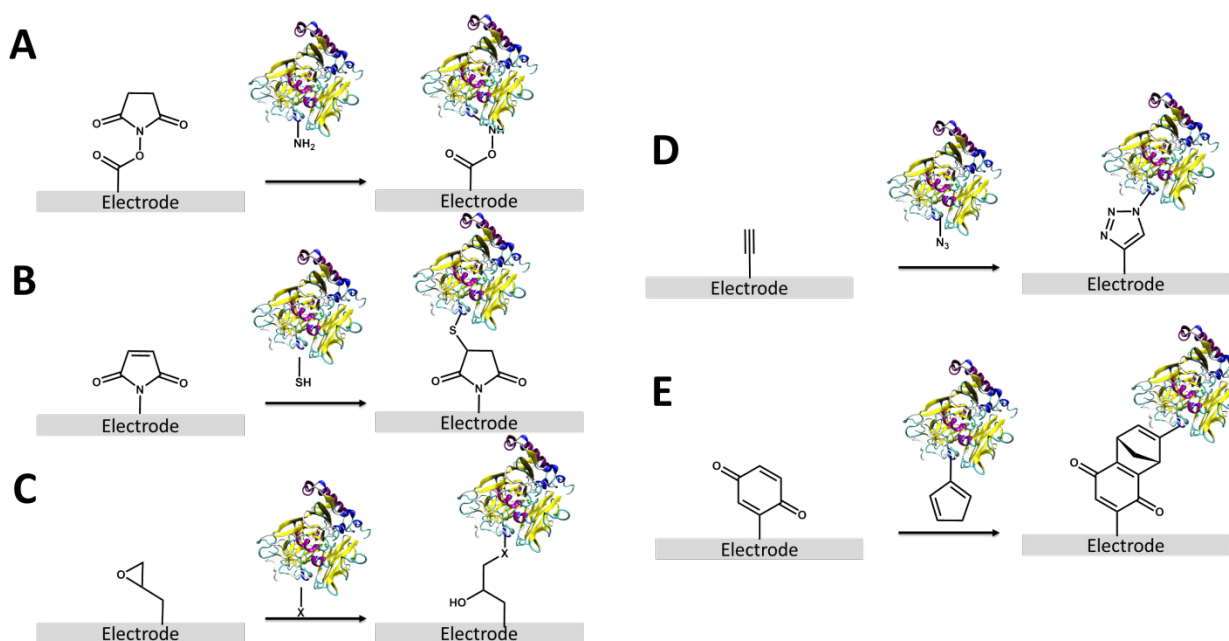


Figure 13 : Synthèse simplifiée de l'immobilisation covalente d'enzyme sur surface d'électrode : A) formation d'un lien amide à partir de la réaction d'un ester activé N-Hydroxysuccinimide (NHS) et une amine de l'enzyme, B) réaction d'un résidu cystéine sur un groupement maléimide, C) réaction d'un résidu nucléophile de la protéine avec un groupement époxy sur la surface de l'électrode, D) réaction « click » catalysée au cuivre entre un alcyne immobilisé et une enzyme fonctionnalisée par une fonction azide, E) réaction de Diels-Alder entre une surface portant un accepteur et une enzyme portant un donneur

Afin de contrôler l'endroit où le lien covalent sera formé entre l'enzyme et l'électrode, la protéine doit préalablement être modifiée par des groupements chimiques spécifiques. L'une des ligations chimiosélectives la plus utilisée pour greffer l'enzyme sur la surface est la réaction

de « chimie click » (Figure 13D). Un groupement azide ($-N_3$) est alors préalablement introduit sur un site spécifique de l'enzyme par ingénierie moléculaire. La cycloaddition de Diels-Alder illustrée en figure 13E est également utilisée.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Malgré la tâche supplémentaire de modification des protéines, ces méthodes sont particulièrement intéressantes, comparées au couplage exploitant les résidus peptidiques de l'enzyme, pour contrôler spécifiquement l'orientation de l'enzyme à la surface de l'électrode.

II- Transfert interfacial d'électron protéine-électrode

II.1 Mécanisme du transfert électronique direct et indirect

L'échange d'électron entre la protéine immobilisée et l'électrode peut avoir lieu suivant deux mécanismes : le transfert direct d'électron (DET pour Direct electron transfer en anglais) ou le transfert indirect d'électron (MET pour mediated electron transfer en anglais). Ces deux mécanismes sont représentés schématiquement sur la figure 14.

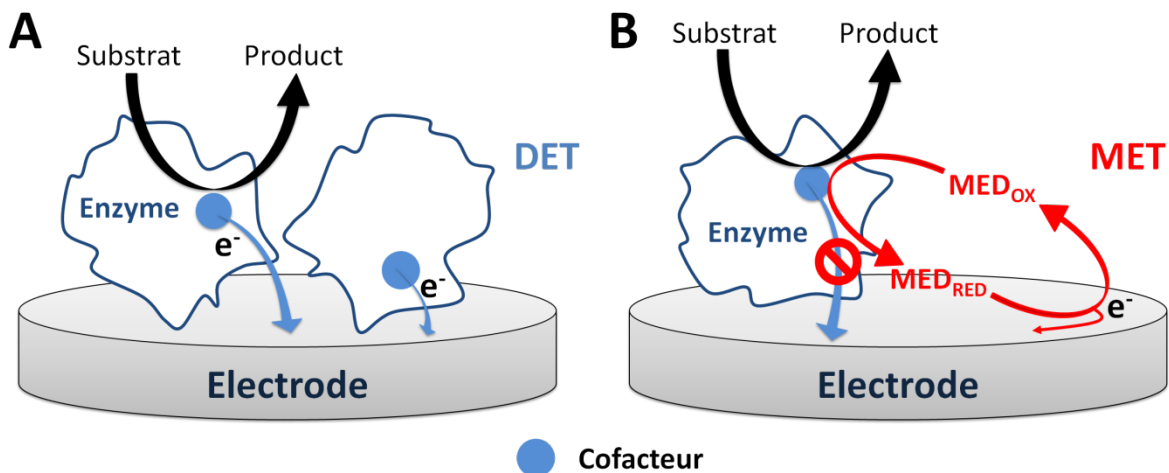


Figure 14 : Représentation schématique du transfert d'électron de protéines immobilisées à l'électrode via A) un transfert direct d'électron et B) un transfert indirect d'électron en présence d'un médiateur redox

Les enzymes redox sont composées d'une structure protéique (apoenzyme) contenant un cofacteur redox capable de transférer les électrons du substrat au cosubstrat. On parle de transfert direct d'électron lorsque l'enzyme échange directement ses électrons avec l'électrode (Figure 14A), c'est-à-dire lorsque l'électrode peut se substituer au substrat ou au cosubstrat classique de l'enzyme.

Ce phénomène décrit il y a plus de 30 ans¹¹⁷⁻¹¹⁹ a été observé pour de nombreuses protéines redox. Cependant, le DET n'est pas observable pour toutes les enzymes.^{120,121} En effet, suivant l'oxydoréductase étudiée et le matériau d'électrode utilisé, le DET n'est pas toujours favorisé. Afin d'étudier l'activité bioélectrocatalytique d'une enzyme pour laquelle le DET n'est pas

favorisé, il est nécessaire d'ajouter un médiateur redox qui aura le rôle de « navette électronique » c'est-à-dire qu'il transportera les électrons entre l'enzyme et l'électrode. On parle alors de transfert « médié » d'électron (Figure 14B).

Le mécanisme de transfert électronique (DET ou MET) dépend beaucoup du matériau de l'électrode et de la protéine redox utilisée, à savoir, sa taille ainsi que la nature et du degré d'enfouissement de son cofacteur ou relai électronique au sein de l'enveloppe peptidique. Plusieurs études ont démontré la possibilité de connecter efficacement sur l'électrode diverses protéines redox contenant des cofacteurs inorganiques (cluster fer-souffre, centres cuivres ou hèmes).^{48,122-126} Ces enzymes sont généralement de petites tailles et le cofacteur ou le site actif est relativement proche de la surface de l'enzyme. En fonction de leur orientation sur la surface, c'est à dire la distance entre le cofacteur (ou site actif) et l'électrode un DET par effet tunnel est possible (Figure 14). A l'inverse, peu ou pas de DET a été observé pour des protéines redox contenant des cofacteurs organiques (FAD, NAD, PQQ...), qui sont plus souvent enfouis profondément au sein de la protéine, rendant difficile le DET. De plus, la structure du matériau d'électrode influence aussi le DET, le cas particulier des nanotubes de carbone est abordé dans la partie D.

Chaque mécanisme de transfert d'électron présente des avantages et des inconvénients. Pour la conception de biopiles enzymatiques, le DET permet d'obtenir la bioélectrocatalyse au potentiel redox de la protéine, qui est souvent très proche des valeurs thermodynamiques d'oxydation et de réduction du substrat. Néanmoins, il est très difficile d'orienter et de connecter en DET toutes les enzymes présentes à la surface de l'électrode. Par conséquent, une certaine quantité d'enzymes immobilisées n'est pas impliquée dans la bioélectrocatalyse. L'utilisation d'un médiateur redox permet d'optimiser la quantité d'enzymes impliquées dans le transfert d'électron. L'augmentation du nombre d'enzymes connectées se traduit par une augmentation de l'intensité du courant catalytique. Cependant, en MET, la bioélectrocatalyse a lieu au potentiel redox du médiateur et non plus au potentiel de la protéine (Figure 15). Dans certains cas, un mélange de DET et MET est observé.¹²⁶

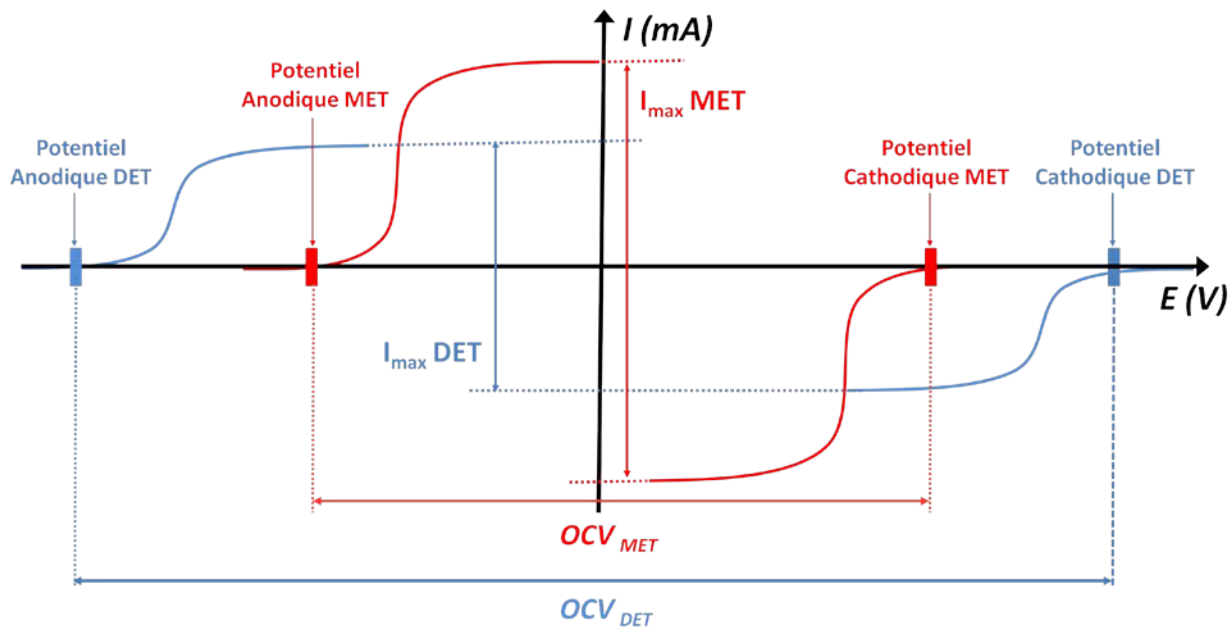


Figure 15 : Représentation sur diagramme potentiel-courant de l'impact de l'utilisation d'un médiateur redox (rouge) par rapport au transfert direct d'électron (bleu)

Une biopile enzymatique effectuant un DET à chaque bioélectrode garantira un voltage maximal de la pile (Figure 15). A l'inverse, le MET aux deux électrodes permettra d'améliorer les courants catalytiques en connectant un maximum d'enzyme. En effet, dans le cas où toutes les enzymes ne sont pas favorablement orientées à la surface de l'électrode pour effectuer un DET efficace, l'utilisation d'un médiateur permettra la connexion des enzymes dont le cofacteur est éloigné de la surface de l'électrode. Cependant l'OCV sera diminué et limité aux bornes des potentiels redox des médiateurs. La bioélectrode idéale pour la conception de biopile enzymatique serait donc, d'un point de vue cinétique, celle où l'intégralité des enzymes utilisées serait connectées directement à l'électrode, afin d'optimiser à la fois les densités de courant ainsi que l'OCV de la pile, donnant accès à des puissances accrues. Cependant, la possibilité d'obtenir un DET à l'anode et à la cathode n'est pas toujours envisageable. Si certaines enzymes sont facilement connectées sur l'électrode, d'autres nécessitent la présence d'un médiateur.

Plusieurs médiateurs ont été largement utilisés dans l'élaboration de biopiles tels que des complexes de coordination (complexes d'osmium, ferrocène), des dérivés de quinones, azines ou viologène. La médiation peut s'effectuer en solution, mais pour supprimer la compartimentation des électrodes, les deux espèces (enzyme et médiateur) sont co-immobilisées à la surface de l'électrode. Un bon médiateur redox doit remplir plusieurs critères :¹²⁷

1- Le potentiel du médiateur doit être supérieur à celui de la protéine à l'anode (ou inférieur à la cathode) pour favoriser thermodynamiquement la réaction de catalyse. De plus, si le potentiel

du médiateur est trop proche de celui de l'enzyme, le faible ΔE peut diminuer l'efficacité de l'échange électronique entre les deux espèces, et donc diminuer l'efficacité de la catalyse.

2- Le système redox du médiateur doit être parfaitement réversible

3- Le médiateur doit avoir une taille raisonnable. En effet, la protéine étant stériquement encombrée, un médiateur trop volumineux n'aura pas accès au cofacteur (ou site actif) pour donner ou collecter les électrons. De plus, lorsque celui-ci est immobilisé à l'électrode la taille et la nature du lien d'ancrage doivent être contrôlées. Il doit être flexible et suffisamment grand pour permettre la diffusion du médiateur vers la protéine, et solvaté, pour permettre le transfert d'électron dans le milieu.¹²⁸

Il existe un grand nombre d'exemples de DET et MET pour de nombreuses enzymes utilisées dans l'élaboration de biopiles enzymatiques glucose/O₂ et H₂/O₂, que ce soit à l'anode pour l'oxydation du glucose et de H₂ ou à la cathode pour la réduction d'O₂.

III-Stratégie de connexion suivant le cofacteur de la protéine

III.1 Enzyme avec un cofacteur profondément enfoui dans son enveloppe protéique : Cas de la GOx

- Connexion de la GOx par DET

Cette enzyme est l'une des plus étudiées pour son application dans divers domaines liés aux biotechnologies,¹²⁹ comme le développement de biocapteur à glucose¹³⁰ ou de biopile glucose/O₂ pour l'implantable.¹³¹ Cette enzyme est constituée de deux sous-unités identiques à l'intérieur desquelles est enfoui un cofacteur redox organique responsable de l'oxydation du glucose : la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD). De nombreuses études ont présenté la possibilité de connecter la FAD de la GOx de manière directe sur divers matériaux d'électrodes.^{18,132-135} Toutefois le DET de la GOx reste controversé puisque plusieurs études soulignent l'impossibilité d'un DET entre la GOx(FADH₂) et l'électrode du fait de l'encombrement stérique (≈ 150 kDa et très glycosylée) de celle-ci qui défavorise le DET. Le pic réversible du FAD/FADH₂ observé après l'immobilisation de la GOx ne serait pas dû au cofacteur à l'intérieur de l'enzyme mais au FAD libre adsorbé sur l'électrode.¹³⁶ Néanmoins, il existe quelques exemples où la GOx a été modifiée par ingénierie des protéines pour observer un DET. En 2009, l'équipe de Mano a déglycosylé la GOx et l'a immobilisée sur des électrodes de carbone vitreux (GC). Ils ont observé l'oxydation du glucose à $-0,49$ V vs. Ag/AgCl accompagnée d'une densité maximum de courant de $235 \mu\text{A cm}^{-2}$ à $-0,2$ V vs. Ag/AgCl en présence de 45 mM de glucose, ce qui en fait l'un des exemples de DET de GOx les plus efficaces.¹³⁷ En 2011, l'équipe d'Atanassov a produit un mutant de GOx portant des cystéines dans l'environnement

du site actif, qui ont été utilisées pour lier covalamment la protéine sur des nanoparticules d'or.¹³⁸ Bien que cette stratégie permette une certaine orientation de l'enzyme, le DET observé ne permet pas l'obtention de forts courants catalytiques à proximité du potentiel redox de la FAD. C'est également ce qu'observait l'équipe de Willner après avoir reconstitué la GOx par réaction de l'apoenzyme avec des nanoparticules modifiées par la FAD.¹³⁹

- Connexion de la GOx en MET

Étant donné la difficulté de connecter cette enzyme en DET sans modifier sa structure protéique, la connexion en MET pour son utilisation en bioélectrocatalyse a été privilégiée. De nombreux travaux, notamment ceux de l'équipe d'Heller ou de Leech ont décrit l'utilisation de férrocène et d'hydrogel d'osmium pour connecter la GOx à l'électrode.¹⁴⁰⁻¹⁴⁵ L'intérêt des hydrogels d'osmium est de pouvoir faire varier chaque composante du polymère. En effet, la sphère de coordination de l'osmium peut être composée de ligands bipyridine, terpyridine ou bisimidazole ; eux même fonctionnalisés par diverses fonctions chimiques afin de faire varier le potentiel redox du couple Os(III)/Os(II).^{143,146,147} Le squelette de la chaîne polymérique peut également être modulé. De nombreux exemples de polymères à base de poly(vinyle-imidazole) (PVI), de poly(vinyle-pyridine) (PVP) ou de copolymère PVI/poly(vinyle-acrylamide) (PVI/PVA) ont été développés. Enfin, la longueur de l'espaceur entre la chaîne polymérique et le complexe peut aussi être modulée.¹²⁸ La possibilité d'optimiser tous ces paramètres rend l'utilisation de ces polymères très attractive pour la médiation d'oxydoréductases ; particulièrement la possibilité d'ajuster le potentiel redox de l'osmium tout en le solvant. Grâce à ces hydrogels une grande quantité d'enzyme peut ainsi être connectée, ce qui explique qu'encore aujourd'hui ils sont abondamment utilisés.

De plus, avec la nanostructuration de l'électrode par des matériaux carbonés,^{148,149} les puissances des piles associant ces hydrogels sur des nanostructures sont devenues très proches des valeurs demandées pour certaines applications. D'autres médiateurs tels que des dérivés de viologènes ou de quinones ont été utilisés pour connecter la GOx en MET.^{51,150,151}

III.2 Enzyme avec un cofacteur proche de la surface protéique: Cas des MCOs et des hydrogénases

- Connexion de la BOD et de la Lac en DET

Le centre T1 de ces enzymes est relativement proche de la surface de la protéine, ce qui en fait de bonnes candidates pour effectuer un DET. Depuis les travaux de Tarasevich et al.,¹¹⁷ de nombreuses études ont reporté la possibilité de réduire O₂ à haut potentiel par ces enzymes, adsorbées à la surface de divers matériaux d'électrodes.^{87,152,153} Cependant, l'adsorption des enzymes ne favorise pas d'orientation préférentielle et se traduit par une dispersion des

constantes de transfert d'électron interfaciales, qui sont particulièrement influencées par la distance T1 – électrode.¹⁵⁴ Un certain nombre de ces enzymes immobilisées sur l'électrode n'est alors pas connecté.

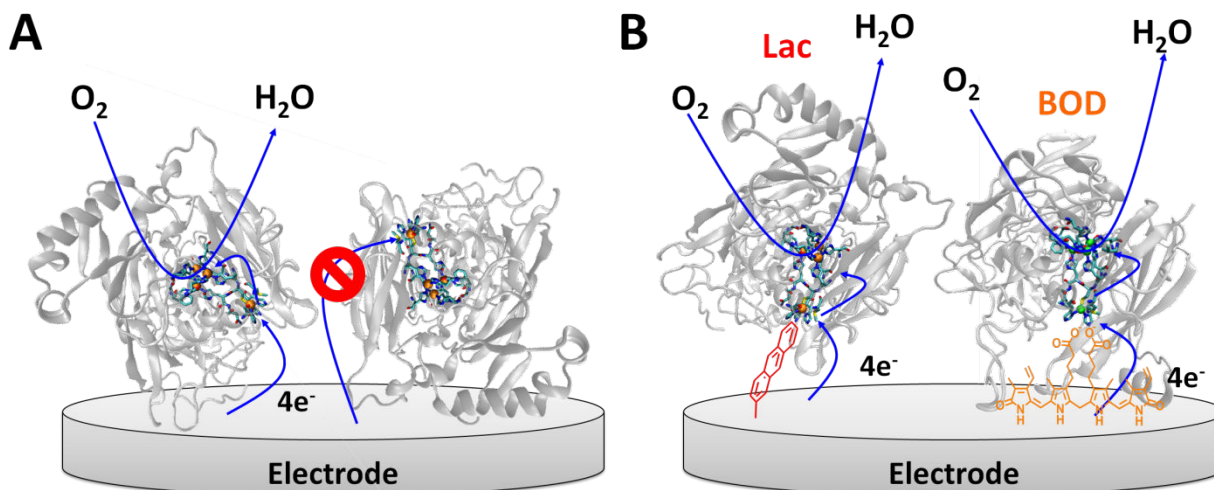


Figure 16 : Représentation schématique de A) l'adsorption avec une orientation « statistique » de la laccase et B) l'orientation contrôlée de la laccase et de la BOD par la reconnaissance supramoléculaire, respectivement, de l'antracène par la poche hydrophobe et de la bilirubine par la poche hydrophile

La résolution des structures cristallines de ces enzymes^{83,125} a permis de mieux comprendre les phénomènes qui gouvernent l'orientation de la Lac et de la BOD à la surface de l'électrode. Les sites de fixations des substrats de ces enzymes (la poche hydrophobe de la Lac et la poche hydrophile de la BOD) sont devenus des cibles très intéressantes pour les immobiliser tout en rapprochant le centre T1 de la surface de l'électrode afin d'effectuer un DET efficace.

Armstrong et al. ont été les premiers à tirer avantage de la poche hydrophobe de la laccase pour l'orienter et l'immobiliser sur une électrode fonctionnalisée par un dérivé de l'antracène qui est un analogue structurale du substrat de la Lac.⁴⁸ Les courants obtenus par cette stratégie sont de l'ordre de $-0,65 \text{ mA cm}^{-2}$, soit quatre fois plus importants qu'une adsorption classique et sont accompagnés d'une augmentation de la stabilité sur une dizaine de jours. Depuis, plusieurs travaux ont décrit la modification de la surface de l'électrode avec divers dérivés hydrophobes permettant une augmentation du DET ainsi que de la stabilité et sont plus amplement décrit dans le chapitre 2.^{155,156}

L'optimisation du DET de la BOD via le centre T1, a également été réalisée. Dans le cas de cette enzyme, ce sont des molécules chargés négativement,^{157,158} voire même le substrat de l'enzyme, la bilirubine⁴⁸, qui ont montré des propriétés d'orientation favorables de l'enzyme à la surface des électrodes. Grâce à cette stratégie les densités de courant catalytique ont été multipliées par deux. Une approche similaire utilisant la syringaldazine (un autre substrat de la

BOD) a été développée.¹⁵⁹ Là encore, l'activité bioélectrocatalytique a été multipliée par deux. Enfin, Ramirez et al. ont montré que l'orientation de la BOD dépend du matériau d'électrode utilisé.⁸⁵ Le centre T1 est à proximité de la surface de l'électrode lorsque celle-ci est en graphite, tandis que le TNC est à proximité de la surface des électrodes d'or. Le DET de la BOD sur divers matériaux d'électrode est plus largement détaillé dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

- Connexion de l'H₂ase en DET

L'hydrogénase est une protéine constituée de deux sous-unités. Une grande sous-unité contenant le site actif [NiFe] ou [FeFe] qui catalyse l'oxydation du dihydrogène, et une petite sous-unité comportant trois centres relais [FeS], proximal, médian, et distal selon leur distance au site actif.¹⁶⁰ Le centre relié [FeS] distal ; le plus proche de la surface de l'enzyme ; est le centre responsable d'un DET de l'hydrogénase à la surface de l'électrode (Figure 17).¹⁶⁰

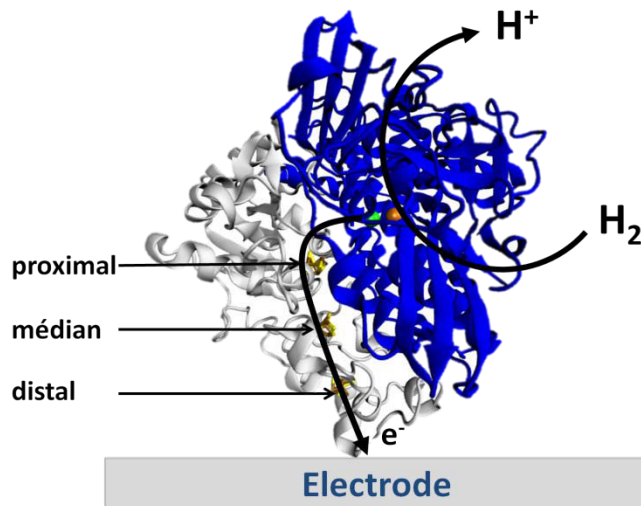


Figure 17 : Représentation schématique du DET d'une hydrogénase [NiFe] orientée à la surface de l'électrode

Un DET a été observé pour plusieurs hydrogénases solubles de l'espèce *Desulfovibrio*. Par exemple l'immobilisation sur des surfaces chargées positivement permet de positionner l'enzyme dans une orientation favorable au DET.^{161,162} En effet, l'environnement du centre [FeS] de cette espèce est surtout constitué de composés glutamates qui sont chargés négativement à pH 7. Les hydrogénases [NiFe] membranaires sont le deuxième type d'hydrogénases utilisées pour la conception de biopiles enzymatiques. Elles ont la particularité de posséder une hélice hydrophobe au sein de la petite sous-unité. Ces hydrogénases sont particulièrement intéressantes du fait de leur plus grande tolérance au dioxygène. Un DET a aussi été observé pour ces enzymes.^{69,126,163,164} Le cas particulier de l'hydrogénase membranaire d'*aquifex aoelicus* est détaillé dans le chapitre 4.

- Connexion de la laccase et de la BOD en MET

Lorsque le DET de la Lac et de la BOD n'est pas optimal ou que les matériaux d'électrodes ne sont pas fonctionnalisés par des groupements favorisant le DET, le MET devient indispensable pour obtenir de fortes densités de courant catalytique de réduction de O₂. Dès le début de l'utilisation de ces MCO de nombreux médiateurs redox ont été utilisés pour connecter ces protéines. L'un des plus connus est l'ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). Ses propriétés de médiateur redox de ces enzymes ont été largement décrites, en phase homogène et hétérogène (Figure 18A).^{44,165-167}

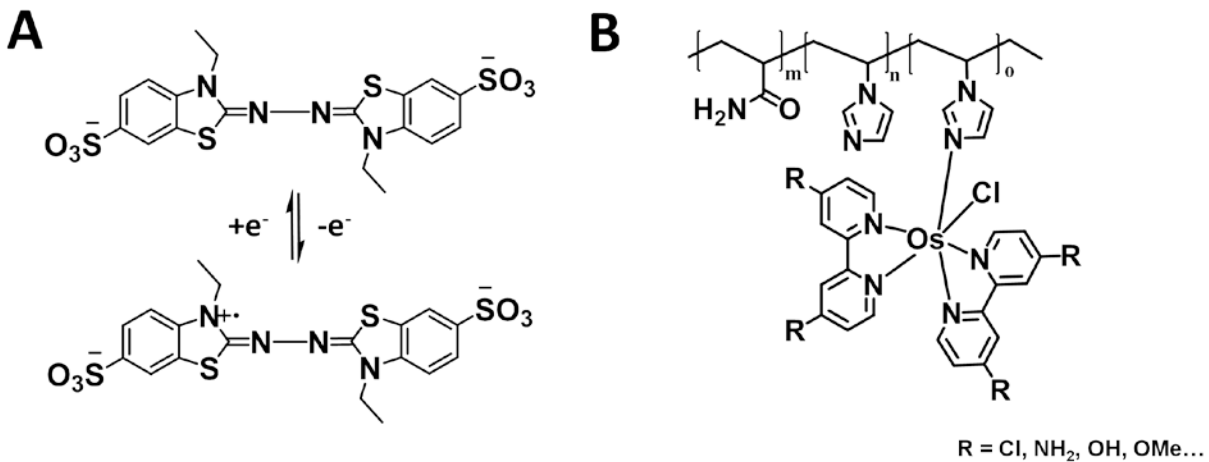


Figure 18 : Médiateurs de la Lac et de la BOD. A) système redox de l'ABTS et B) Structure du polymère PAA/PVI fonctionnalisé par des complexes d'osmium

Une autre grande classe de médiateur des MCO est constituée d'une série de polymères cationiques fonctionnalisés par des complexes d'osmium, comme décrit précédemment pour la connexion de GOx (Figure 18B).¹⁶⁸ Ils restent encore des médiateurs de choix pour le MET de la Lac et de la BOD pour la conception de biocathodes réduisant O₂.^{88,142,169-172}

- Connexion de l'H2ase en MET

La connexion de l'hydrogénase sur l'électrode a principalement été réalisée en DET. La plupart des études en MET ont été effectuées avec un médiateur en solution comme le bleu de méthylène ou le viologène. Pourtant, certaines études ont mené à l'élaboration de matrices dans lesquelles l'enzyme et le médiateur sont immobilisés. Les hydrogénases [NiFe] de *Thiocapsa roseopersicina*,¹⁷³ *Pyrococcus furiosus*,¹⁷⁴ et *Desulfovibrio fructosovorans*¹⁷⁵ ont respectivement été immobilisées sur^{173,174} ou piégées dans¹⁷⁵ des films de polypyrrole fonctionnalisés par des molécules de méthylviologènes pour assurer un MET. Enfin, Plumeré et al. ont récemment montré que l'intégration d'une hydrogénase sensible à l'oxygène au sein d'un polymère de viologène permettait de protéger l'enzyme des dommages causés par

l'oxygène ainsi que de sa désactivation à haut potentiel tout en permettant sa connexion en MET.^{71,176}

III.3 Enzyme avec un cofacteur labile : Cas des GDH NAD⁺-dépendantes

Ces déshydrogénases utilisent comme cofacteur le NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) pour oxyder le glucose. Cette réaction est concomitante à la réduction à un proton et deux électrons de NAD⁺ en NADH.¹⁷⁷ Elles ont l'avantage de ne pas utiliser le dioxygène comme accepteur électronique naturel à l'inverse de la GOx.¹⁷⁸ Cependant, chez ces enzymes, le cofacteur est labile, c'est-à-dire qu'il est faiblement lié au site actif de celles-ci. Par conséquent, ces enzymes ne peuvent pas être connectées directement à l'électrode,¹⁷⁹ De plus, la régénération de ce dernier nécessite bien souvent l'utilisation d'un catalyseur d'oxydation de NADH. Pour contourner cette limitation, l'électrode peut être fonctionnalisée par des catalyseurs ou des biocatalyseurs moléculaires. Selon la stratégie employée, l'oxydation de NADH sera bioélectrocatalytique ou électrocatalytique. Les protéines redox utilisées pour la régénération du cofacteur sont la Diaphorase^{17,180} et la Flavine réductase.¹⁸¹ Divers catalyseurs aux structures variés ont aussi été utilisés, comme les azines,¹²⁰ divers quinones,¹⁸²⁻¹⁸⁵ des complexes d'osmium¹⁸⁶ et des complexes de ruthénium portant des ligands phendiones.^{183,187} Le potentiel de l'électrode est alors celui de l'espèce connectée à l'électrode, c'est-à-dire le médiateur de l'enzyme (Figure 19A) ou le catalyseur moléculaire (Figure 19B) qui régénère NADH. Cependant ce type de bioanode nécessite la présence de NAD⁺ en solution. Certaines études se sont portées sur la co-immobilisation de NAD⁺, de la GDH et d'un catalyseur moléculaire pour la régénération de NADH. Des polymères tels que le nafion ou le chitosan ont été utilisés pour piéger ces molécules.¹⁸⁸ Enfin, Willner et al. ont lié covalamment NAD⁺ et un catalyseur moléculaire à la surface de l'électrode créant ainsi une sorte de « chaîne relais » pour la connexion de la GDH (Figure 19C).¹⁸⁹

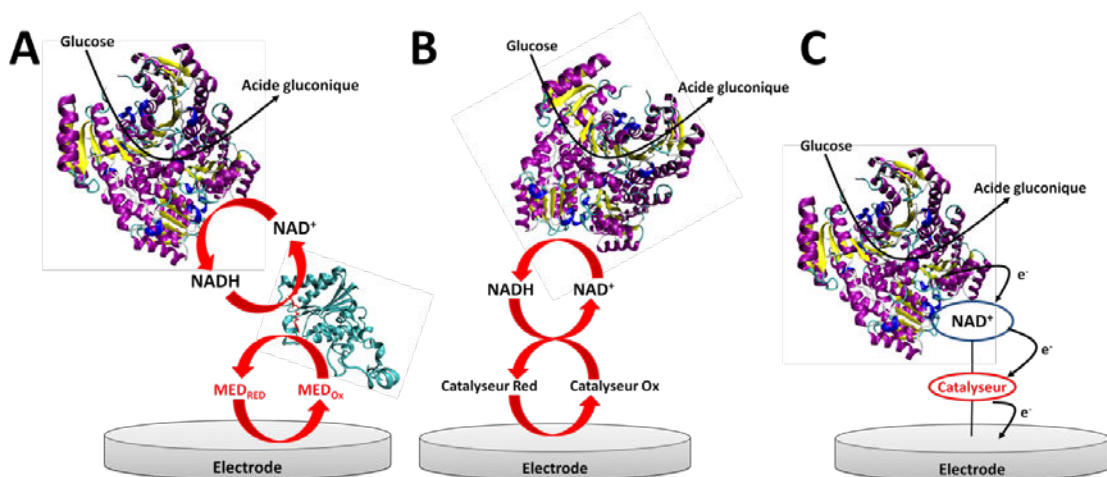


Figure 19 : Représentation schématique de la connexion d'une GDH NAD⁺-dépendante avec régénération de NAD⁺ par une enzyme (A) ou par un catalyseur moléculaire (B) et (C)

La connexion des enzymes à la surface des électrodes dépend donc de la position du cofacteur au sein de l'enveloppe protéique. Si le cofacteur est profondément enfoui ou labile la connexion en MET est privilégiée. A l'inverse, lorsque celui-ci est relativement proche de la surface protéique, la fonctionnalisation de la surface de l'électrode pour favoriser le DET sera favorisée afin de maximiser le potentiel et les densités de courant délivrées par la bioélectrode.

D- Les nanotubes de carbone, un matériau de choix pour l'immobilisation fonctionnelle des enzymes

De l'utilisation des enzymes comme électrocatalyseurs découle plusieurs difficultés liées à la fragilité de leurs structures protéiques ainsi qu'à l'anisotropie de leurs propriétés électroniques et de leurs tailles importantes qui limitent l'efficacité bioélectrocatalytique surfacique. Comme présentée précédemment, l'élaboration de bioélectrodes repose sur une immobilisation stable et non dénaturante des protéines, pour conserver leurs propriétés catalytiques, tout en permettant une connexion électrique efficace entre le centre redox responsable de la réponse électrochimique et l'électrode. La figure ci-dessous représente quatre cas limites de l'immobilisation d'enzymes à l'électrode.

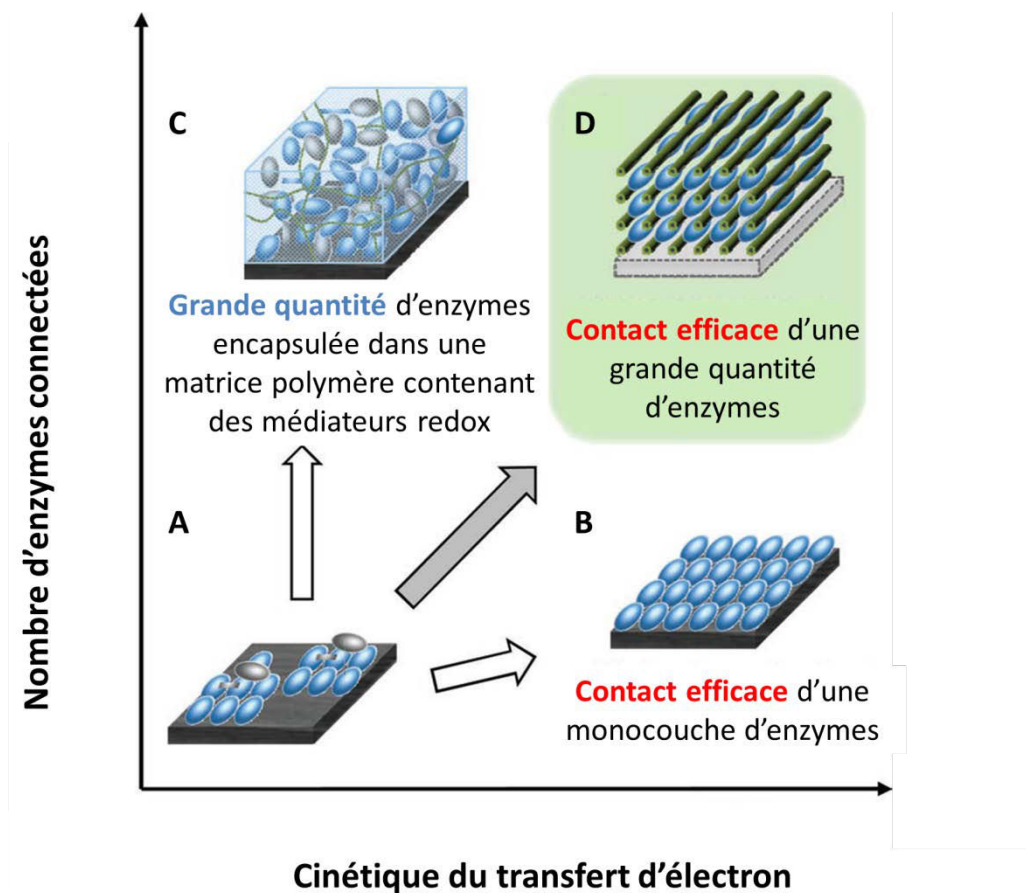


Figure 20 : Représentation schématique de différentes immobilisations de l'enzyme à l'électrode. A) Monocouche non compacte d'enzyme ; B) monocouche compacte d'enzyme connectée efficacement ; C) encapsulation d'une grande quantité d'enzyme au sein d'une matrice polymère redox et D) grande quantité d'enzyme connectée efficacement au sein d'une architecture 3D. Adapté de [149]

Dans le cas A, une faible quantité d'enzymes connectées ainsi qu'une faible constante de vitesse de transfert interfacial d'électron sont obtenues par une couche non compacte de protéines non orientées à la surface de l'électrode. Dans le cas B, le transfert d'électrons est optimisé, notamment grâce à l'orientation des enzymes. De plus, le nombre d'enzymes connectées augmente car une monocouche compacte de protéines orientées est greffée. L'optimisation de la quantité de protéines peut être obtenue par l'utilisation d'une matrice polymère redox (Cas C). Néanmoins, les transferts d'électrons peuvent être ralentis du fait de l'ajout d'une étape de transport de charges par le polymère redox. De plus, avec cette approche le voltage de la pile est diminué. Le cas D représente le cas idéal où une grande quantité d'enzymes (plus d'une monocouche) est connectée pour permettre un DET efficace.

L'élaboration des bioélectrodes s'articule donc autour de deux problématiques : l'amélioration de la connexion de l'enzyme (cf. II partie C), et l'augmentation de la quantité de protéines immobilisées sur une surface donnée. Comment peut-on connecter efficacement plus d'une monocouche ?

I- La nanostructuration des électrodes

L'utilisation d'électrode plane ne permet de connecter au maximum qu'une monocouche d'enzyme. Pour augmenter la densité d'enzymes à la surface de l'électrode et donc la densité de courant, il est nécessaire d'augmenter la surface des électrodes. La nanostructuration permet d'augmenter la surface développée des électrodes sans augmenter sa surface géométrique. En effet, il est possible de développer un réseau tridimensionnel par l'arrangement d'un matériau poreux. Ces matériaux doivent présenter une grande porosité, une bonne conductivité électrique, et être fonctionnalisable afin de modifier leur chimie de surface pour la connexion des enzymes. Les matériaux carbonés sont les plus utilisés en raison de leur faible coût, leur fenêtre de potentiel, leur facilité d'utilisation et de modification. Parmi cette famille de matériaux carbonés, les nanotubes de carbone sont particulièrement en vue dans de nombreux et divers domaines d'applications.¹⁹⁰

II- Les nanotubes de carbone

II.1 Structures et propriétés

En 1991, Iijima démontra la possibilité de former grâce à un arc électrique (utilisé pour la fabrication des fullerènes) des tubes de carbone.¹⁹¹ Pour l'anecdote, il n'a jamais reçu le prix Nobel pour cette découverte car les CNTs avaient déjà été décrits dès 1952 en russe dans *Журнал физической химии* (Russian Journal of Physical Chemistry),¹⁹² puis en 1960 par R. Bacon.¹⁹³ Leur appellation initiale de « microtubules graphitiques hélicoïdaux » évolua par la suite en nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs pour Multi Walled Carbon Nanotube en

anglais). En effet, ils sont composés de plusieurs feuillets de graphène enroulés les uns sur les autres. En 1993, un autre type de CNTs a été décrit les nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNT pour Single Walled Carbon Nanotube en anglais), composés d'un unique feuillet de graphène enroulé sur lui-même.¹⁹⁴ Les diamètres sont de 0,4 à 3nm pour les SWCNTs, et de 1,4 à plus de 100 nm pour les MWCNTs.¹⁹⁵

La majorité des CNTs sont synthétisés en utilisant l'ablation par arc électrique,¹⁹⁶ l'ablation par laser¹⁹⁷ ou par la déposition chimique en phase vapeur¹⁹⁸ (CVD pour Chemical Vapor Deposition en anglais). A l'heure actuelle, la technique de CVD est la plus employée pour produire les CNTs. Elle se base sur la combinaison de catalyseurs métalliques (majoritairement fer, nickel ou cobalt) et d'un gaz contenant une source de carbone (acétylène, éthylène) à haute température (entre 700 et 900°C). Les CNTs se forment et croissent au niveau des sites catalytiques.

Chaque méthode de synthèse conduit à la formation de CNTs avec une grande quantité d'impuretés.¹⁹⁹ Un mélange de CNTs aux propriétés non homogènes est produit par l'ablation par arc électrique ou laser en plus des impuretés. La CVD quant à elle permet un meilleur contrôle de la synthèse des CNTs, mais elle n'élimine pas la présence des impuretés métalliques provenant des catalyseurs. Enfin, des lots de CNTs d'une pureté variable, de 65% à 95%, sont obtenus suivant le procédé HipCo (High Pressure Carbon Monoxyde en anglais). Une étape de purification des CNTs est donc nécessaire après leurs synthèses. Elle repose généralement sur une combinaison d'étapes de filtration, oxydation, dissolution et suspension.²⁰⁰

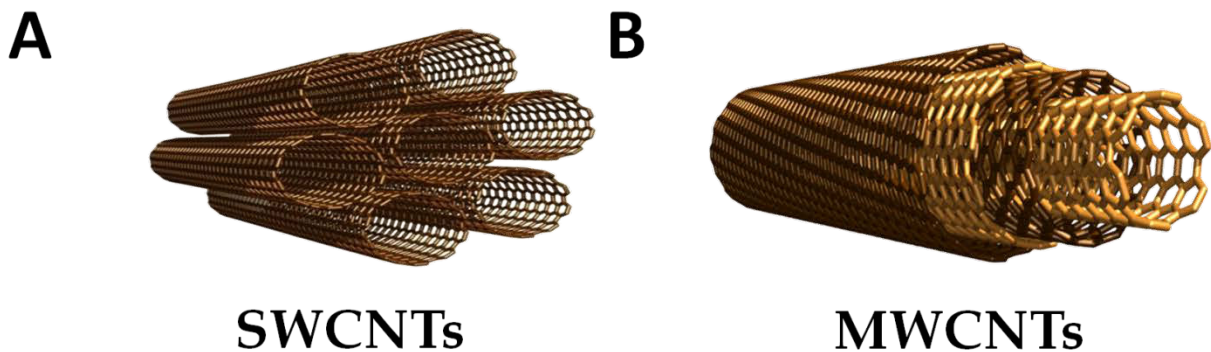


Figure 21 : Représentation des structures moléculaires des nanotubes mono-feuille (SWCNTs) et d'un nanotube multifeuillets (MWCNTs)

Suivant leur chiralité, c'est-à-dire en fonction de l'orientation de l'axe du tube par rapport au réseau carboné aromatique, différents types de CNTs peuvent être obtenus.²⁰¹ Ils sont décrits par les indices de leur vecteur chiral n et m . Les CNTs de type « armchair » ($n=m$) présentent la plupart du temps une conductivité de type métallique tandis que les CNTs dont les vecteurs d'unités (n, m) obéissent la formule $2n + m = 3L$ (« zigzag » ($m=0$) ou chiraux ($m \neq n$)) sont des « zero gap » semi-conducteurs. Si deux tiers des SWCNTs sont semi-conducteurs, les MWCNTs

composés de plusieurs SWCNTs emboîtés les uns dans les autres sont en général classés comme conducteurs métalliques. En effet, un facteur non-négligeable pour les tubes en quantités est la résistance de contact inter-tube qui est meilleure pour les MWCNTs car ils présentent plus de défauts oxygénés. En effet, outre la différence de chiralité entre les CNTs, la conductivité de ces derniers peut aussi être affectée par la présence de défauts dans la paroi. La structure normalement constituées de carbone de type sp^2 peut présenter des carbones de type sp^3 portant des fonctions oxydées : alcool, carbonyle ou acide carboxylique.

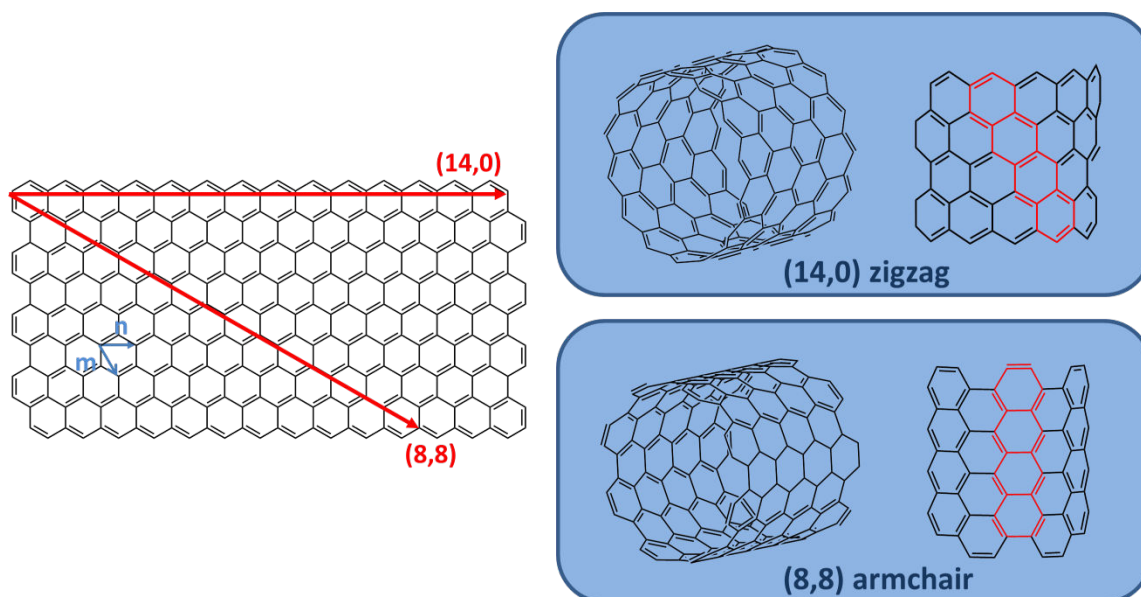


Figure 22 : Représentation schématique de l'orientation des CNTs de type « zigzag » et « armchair » par rapport au plan de la feuille de graphène

Ces matériaux possèdent de nombreuses propriétés très attractives pour l'élaboration d'électrodes, notamment une excellente conductivité, une importante surface spécifique et une grande stabilité thermique et mécanique.¹⁹⁹ De plus, ils sont assez faciles à modifier chimiquement, pour introduire toutes sortes de fonctions nécessaires à l'immobilisation des protéines. Néanmoins, leur caractère très hydrophobe et leur morphologie les rend insolubles dans un très grand nombre de solvants aqueux et organiques, ce qui ne facilite pas leur manipulation.²⁰² Leur fonctionnalisation ou l'utilisation de surfactant permet dans certains cas d'améliorer leur solubilité.²⁰³

II.2 Les nanotubes de carbone comme matériau d'électrode

Depuis leur découverte, l'usage des CNTs n'a cessé de se développer. Ils sont désormais utilisés dans de nombreux domaines liés à l'électrochimie comme les piles à combustibles, les supers condensateurs, les batteries Li-ion, l'électrocatalyse ou encore les capteurs électrochimiques.²⁰¹ Au sein de ces applications les CNTs sont utilisés comme matériau d'électrode. En effet, leur

propriété à conduire les électrons sur de très larges surfaces développées fait d'eux une matrice de choix pour toutes les technologies impliquant des transferts électroniques.¹⁹⁵ Les CNTs permettent de former des architectures d'électrode particulièrement variées. Elles sont souvent avantageuses dans de nombreux domaines d'applications, notamment pour le stockage et la conversion d'énergie. Les performances des batteries Li-ion, des supers condensateurs électrochimiques et de capteurs électrochimiques ont déjà été améliorées par la substitution des matériaux graphitiques par des CNTs.^{201,204–207}

De plus, la nanostructuration des électrodes par des CNTs permet d'améliorer le DET des enzymes. En effet, grâce à la dimension nanométrique de ces derniers, ils peuvent s'approcher suffisamment près du centre redox responsable de la réponse électrochimique pour jouer le rôle de nanofils conducteurs pour connecter l'enzyme.^{208–210}

II.3 Structuration de l'interface par des CNTs

La structuration de l'électrode ne dépend pas seulement des propriétés intrinsèques des CNTs, mais aussi de la méthode utilisée pour former ou modifier la surface des CNTs. Il existe diverses méthodes d'élaboration de nanostructures de CNTs et une méthode bien particulière est la fabrication de films fins. Ces films sont particulièrement intéressants de par la possibilité de moduler leurs propriétés en fonction du type de CNTs utilisés et de la méthode de conception.

Certaines techniques conduisent à une interface très ordonnée. Les CNTs directement synthétisés par CVD sur le support conducteur de l'électrode permettent la formation de forêts de CNTs alignés verticalement comme le montre la figure 23A. Le principal désavantage de cette technique provient de l'éventuelle pollution de l'échantillon par des impuretés métalliques restantes ainsi que de l'instabilité mécanique de ces forêts sur le substrat.²¹¹

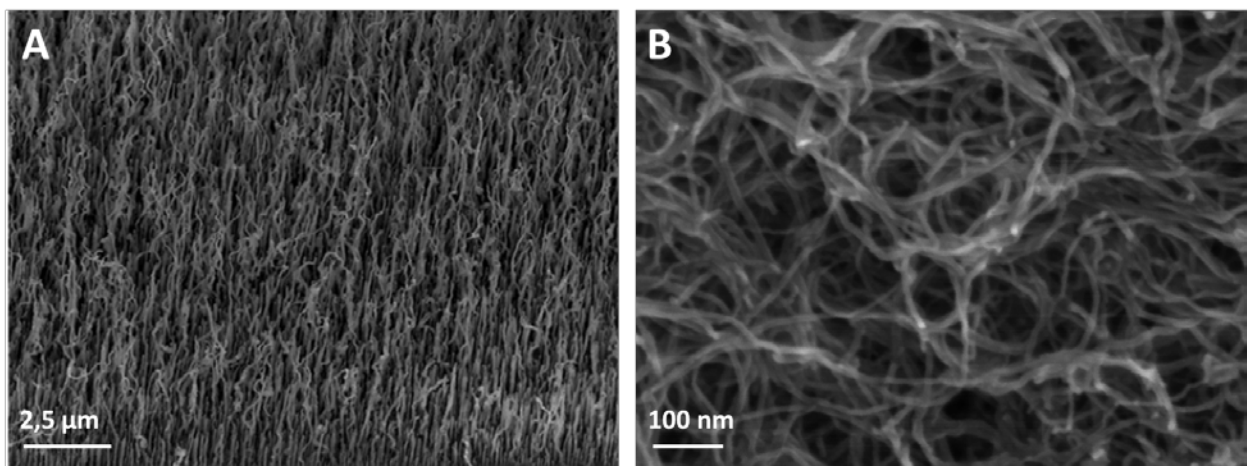


Figure 23 : Image en microscopie électronique à balayage de : A) une forêts de CNTs. Adapté de [²¹²] et B) un film de MWCNTs

L'élaboration de ces films peut aussi être réalisée par la déposition d'une phase liquide sur le substrat. Celle-ci nécessite la dispersion préalable des CNTs. Les surfactants sont couramment employés pour obtenir une bonne dispersion de CNTs, d'autant plus si le solvant utilisé est l'eau.²¹³ Le caractère amphiphile du surfactant permet de « séparer » les agrégats de CNTs par interaction de leur partie hydrophobe avec la paroi des CNTs, tandis que leur partie hydrophile interagit avec l'eau. Des polymères peuvent également être utilisés.²¹⁴ Ces stratégies ont l'avantage de ne pas détruire les propriétés des CNTs, mais elles rajoutent une étape supplémentaire de lavage si le surfactant ou le polymère ne sont pas désirés au sein du film.²¹¹ Suite à l'obtention d'une bonne dispersion de CNTs, le film de CNTs est déposé sur le substrat suivant plusieurs méthodes. Les méthodes de « Langmuir-Blodgett » (LB), d'auto assemblage couche par couche (LBL), le « dip coating » (DC), la formation de bucky papers (BP) ou encore le « drop coating » d'encres à base de CNTs sont particulièrement utilisées.²¹¹ Brièvement, les techniques de LB et DC consistent à plonger le substrat dans la dispersion puis à l'émerger entraînant ainsi la déposition d'une couche de CNTs sur la surface. La filtration de la suspension permet la formation de BP. Ces films ont l'avantage d'être parfaitement réguliers et leur épaisseur peut être contrôlée par le volume de dispersion filtré. Le « drop coating » consiste à déposer et sécher un volume fini de dispersion (parfois accompagné de surfactants) à la surface de l'électrode.

Ces procédés peuvent également être accompagnés par des méthodes de transfert de film d'un substrat à un autre par l'utilisation d'une membrane soluble,²¹⁵ d'une surface adhésive²¹⁶ ou par impression par microcontact.²¹⁷ Ces films offrent de nombreux avantages pour l'élaboration de matériaux d'électrode. Outre, l'augmentation de la surface spécifique pour immobiliser un plus grand nombre de catalyseurs, il est possible d'ajouter divers fonctionnalités à ces dépôts pour élaborer des matériaux et des électrodes modifiées.

II.4 Chimie de surface des CNTs

Comme présenté précédemment, l'efficacité et la stabilité des biopiles enzymatiques reposent sur l'immobilisation et le transfert électronique interfacial d'électron. La forte anisotropie des propriétés électroniques des protéines impose de minimiser la distance entre le centre relais responsable de la réponse électrochimique et l'électrode pour améliorer le transfert électronique interfacial, et maximiser le DET. La nanostructuration de l'électrode par des CNTs a été introduite en partie pour lever ce verrou. La modification de la chimie de surface des CNTs a l'avantage supplémentaire d'introduire des fonctionnalités afin d'immobiliser tout en contraignant et contrôlant l'orientation des enzymes à la surface de l'électrode grâce à des interactions favorisant un positionnement approprié.^{48,112,126}

Les CNTs sont considérés comme des macromolécules constituées d'une succession de cycles aromatiques et d'une certaine quantité de fonctions réactives telles que des carbonyles ou des

acides carboxyliques. Il est donc possible de les modifier chimiquement ou électrochimiquement en ciblant le squelette sp^2 ou les fonctions chimiques présentes à leur surface. Diverses méthodes ont été mises en place pour fonctionnaliser les CNTs. On distingue deux types d'approches : la fonctionnalisation non covalente et covalente.^{218,219}

II.4.1 Fonctionnalisations non covalentes des CNTs

La fonctionnalisation non covalente des CNTs a été étudiée ces dernières années pour rendre les nanotubes plus solubles ou ajouter des fonctionnalités d'intérêts. Ces modifications se basent sur des interactions π - π de molécules aromatiques avec la paroi des CNTs ou l'utilisation de polymères.^{220,221} Les molécules aromatiques telles que le pyrène, l'antracène ou les porphyrines comportent d'importants systèmes électroniques conjugués, capables d'interagir fortement avec la paroi des CNTs par interaction de type « π -stacking » comme l'illustre la figure 24. L'adsorption de ces composés par interaction hydrophobe permet une fonctionnalisation particulièrement simple et efficace des CNTs. De nombreuses fonctions peuvent être greffées aux CNTs par cette technique, afin d'améliorer leur solubilité ou pour le greffage d'autres entités.

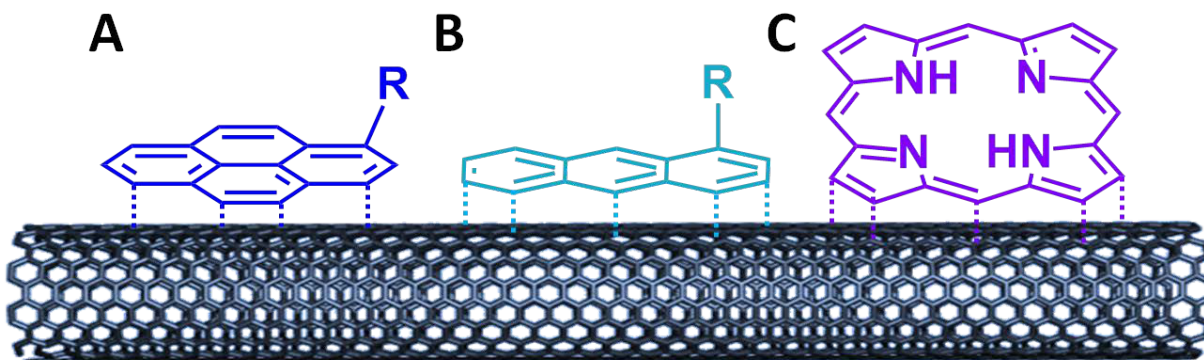


Figure 24 : Interaction de type « π -stacking » entre des composés aromatiques et la paroi des CNTs : A) dérivé du pyrène ; B) dérivé de l'antracène et C) dérivé de porphyrine

En 2001, le groupe de Dai a décrit l'immobilisation covalente de protéines, par le greffage peptidique de celles-ci sur des CNTs préalablement fonctionnalisés par un dérivé du pyrène portant une fonction ester activé (Pyr-NHS, cf. Figure 13A).²²² Ce système CNTs/Pyr-NHS est toujours très utilisé pour le greffage covalent de protéine.²²³ La possibilité de faire varier la fonction chimique portée par l'entité adsorbée sur les CNTs ouvre d'importantes possibilités de fonctionnalisation de la surface avec de nombreuses espèces chimiques ou biologiques (Figure 25). Par cette stratégie, les CNTs ont été fonctionnalisés par une large gamme de dérivés conférant ainsi de nouvelles propriétés aux CNTs. Pour l'élaboration de bioélectrodes cette stratégie permet notamment de greffer efficacement des médiateurs redox à la surface des CNTs.²²⁴ L'immobilisation d'un dérivé de pyrène-cyclodextrine (pyr-CD) sur des CNTs permet

d'immobiliser par des interactions supramoléculaires des molécules portant des groupements hydrophobes capables d'interagir avec la CD.²²⁵ Des exemples de greffages de catalyseurs moléculaires par π -stacking ont également été envisagés.²²⁶

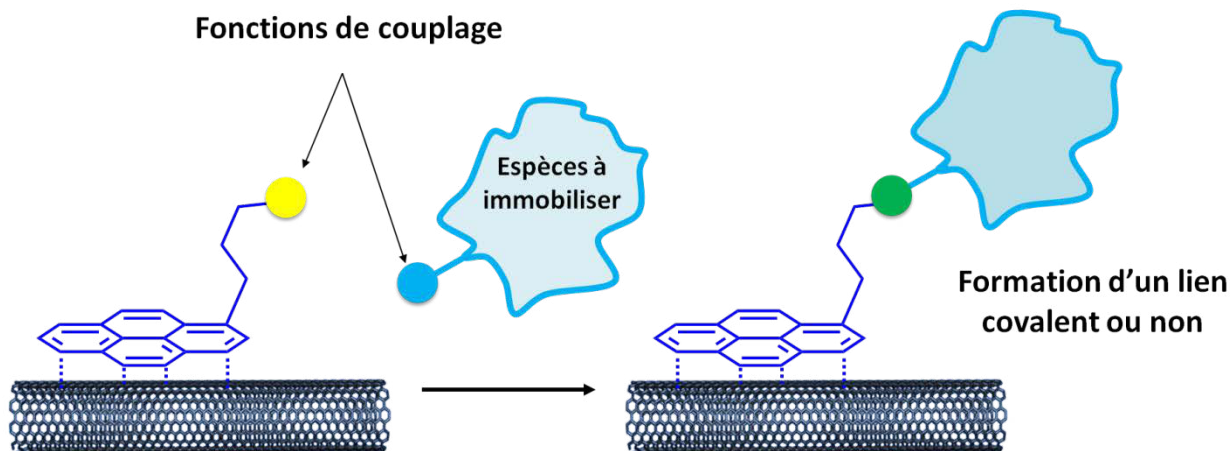


Figure 25 : Représentation schématique du greffage covalent ou non covalent d'une molécule chimique ou biologique sur des CNTs fonctionnalisés de manière non covalente

L'autre méthode de choix pour modifier de manière non covalente les CNTs est l'utilisation de polymères organiques ou inorganiques. Les nouvelles propriétés du matériau composite CNTs/polymère dépendent des groupements portés par le polymère. Cette technique a beaucoup été utilisée pour solubiliser les CNTs afin de créer des encres.²²⁷⁻²³⁰ L'intégration de nouvelles propriétés physicochimiques, électrochimiques et catalytiques aux CNTs a aussi été largement étudiée. Ces matériaux composites CNTs/polymère sont obtenus par le mélange du polymère au sein de la dispersion de CNTs. Dans certains cas, le polymère peut être électrogénéré à la surface de film de CNTs.^{110,187,231} Cette dernière stratégie a beaucoup été utilisée dans la conception de bioélectrodes pour les biopiles ou les biocapteurs. Comme pour la fonctionnalisation des CNTs par des interactions « π -stacking », de nombreuses fonctionnalités d'intérêts peuvent être intégrées au matériau composite selon la nature du polymère. Un parfait exemple d'utilisation de matériau composite CNTs/polymère pour la conception de bioélectrode est l'utilisation des hydrogels d'osmium présentés précédemment pour la médiation des enzymes redox.¹⁴⁴

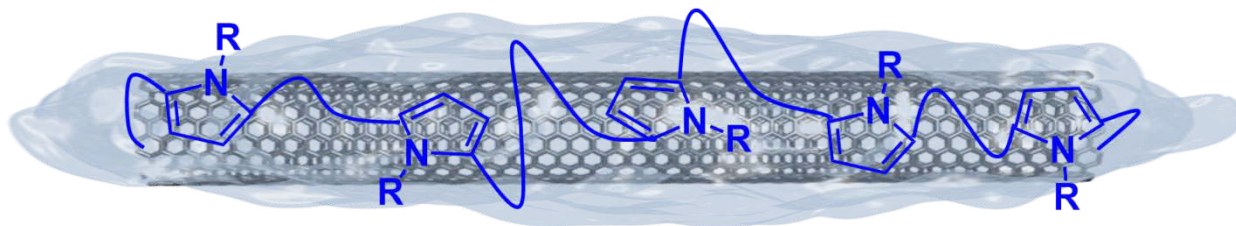


Figure 26 : Représentation schématique d'un polymère de polypyrrole électrogénéré à la surface d'un film de CNTs

La fonctionnalisation non covalente des CNTs permet donc l'intégration d'une grande variété de fonctionnalités aux CNTs sans altérer les propriétés structurales et de conductions d'électrons de ces derniers. La fonctionnalisation non covalente de CNTs, par des dérivés du pyrène, de porphyrines ainsi que l'électrogénération de polypyrrole, a été réalisée lors de cette thèse.

II.4.2 Fonctionnalisations covalentes des CNTs

Le greffage covalent des CNTs est basé sur la création de liaisons covalentes stables d'entités fonctionnelles sur le réseau π -conjugué. La fonctionnalisation est associée simultanément à un changement d'hybridation du carbone sp^2 vers un carbone sp^3 , brisant la délocalisation des électrons π à cet endroit. Cette technique a l'inconvénient de créer des défauts au sein du système π -conjugué, ce qui peut altérer les propriétés conductrices et mécaniques des CNTs. Ces techniques de fonctionnalisations sont divisées en deux catégories : l'estérification ou l'amidation de CNTs oxydés et les réactions d'addition.²³²

Divers traitements oxydants permettent la génération de fonctions superficielles oxygénées comme les groupements carboxyliques, quinones ou hydroxyles à la surface des CNTs. L'une des techniques les plus utilisées est l'immersion des CNTs dans un milieu acide et oxydant. L'utilisation simultanée d'un bain à ultrason peut favoriser la réaction ainsi que la dispersion des CNTs. Lorsque ces traitements durs sont réalisés pendant une longue période, ils peuvent fortement endommager les propriétés électroniques des CNTs par la destruction du système π -conjugué. Le degré d'oxydation des CNTs augmente avec la dureté et la durée du traitement.²³³ Comme illustrée en figure 27, la présence de ces groupements activables comme les acides carboxyliques ; principalement aux extrémités des CNTs, rend possible la fonctionnalisation de ces CNTs oxydés par estérification ou couplage peptidique.

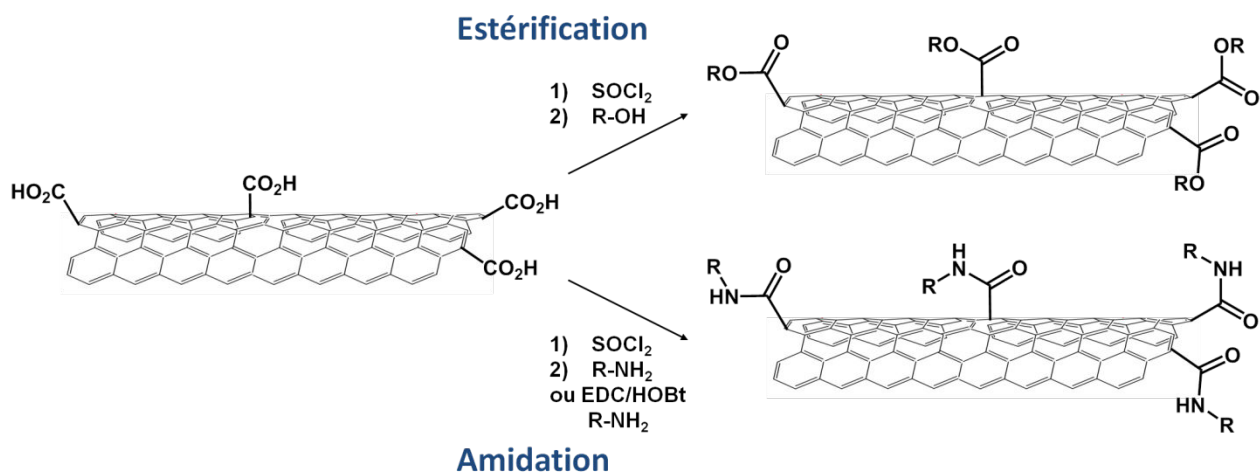


Figure 27 : Schéma de l'estérification ou amidation (couplage peptidique si R est une enzyme) de CNTs oxydés

Les réactions d'additions quant à elles permettent à la fois la fonctionnalisation des extrémités et des parois des CNTs. Néanmoins, la réactivité des extrémités est bien plus importante que celle des parties latérales des CNTs. Les CNTs ne sont pas des structures idéales. En effet, de nombreux défauts sont présents le long de ces derniers. Plusieurs études ont montré que les réactions d'additions avaient lieu préférentiellement au niveau de ces défauts.²³⁴ Ces techniques de fonctionnalisation peuvent donc être effectuées sur les CNTs non oxydés, mais le rendement de fonctionnalisation sera plus important sur les CNTs oxydés.

Diverses réactions d'addition ont été décrites pour modifier les CNTs. L'addition de carbènes sur la paroi des CNTs est l'un des premiers exemples à avoir été décrit (Figure 28A).²³⁵ Un autre exemple d'addition passe par la formation d'intermédiaires nitrènes (Figure 28B).^{236,237} Les cycloaddition 1,3-dipolaires ont également été étudiées pour modifier la paroi des CNTs (Figure 28C). Le groupe de Prato a développé une méthode basée sur la formation d'ylure de méthine.²³⁸

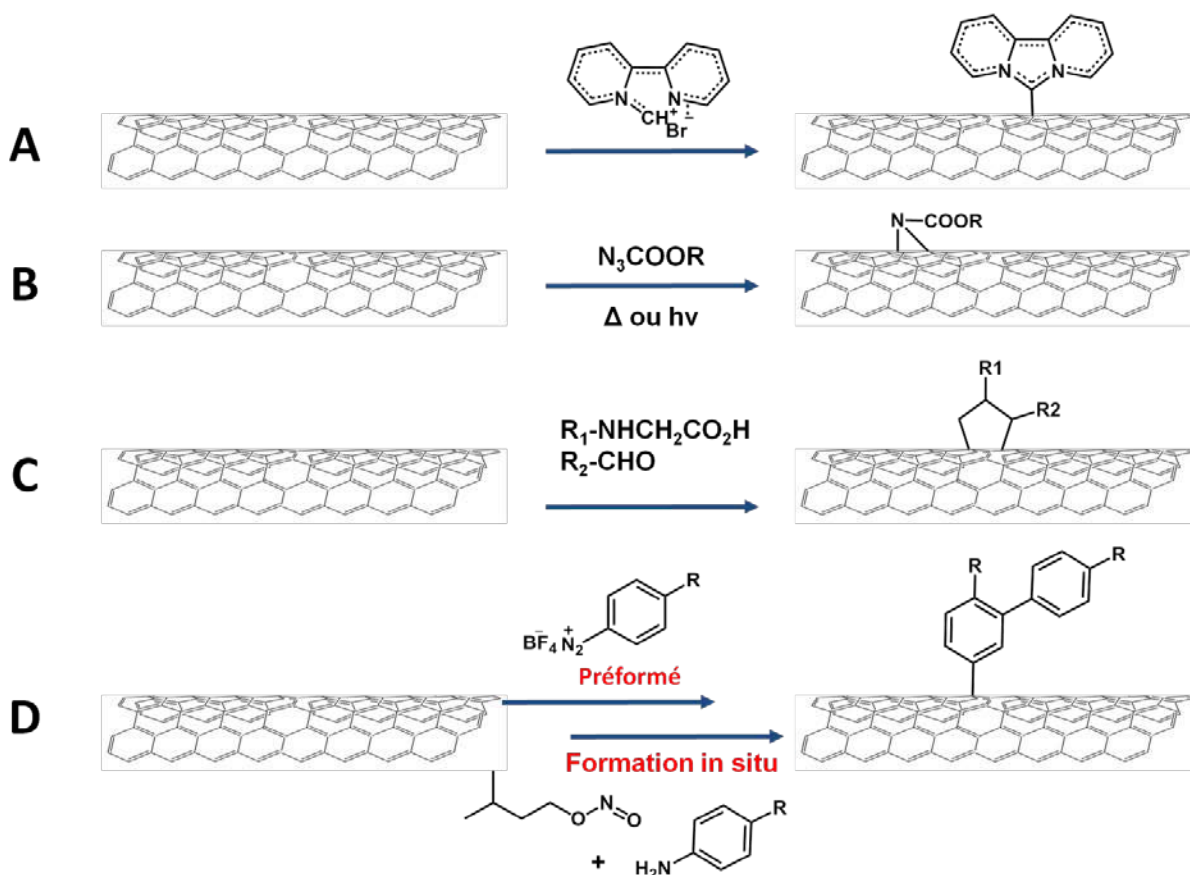
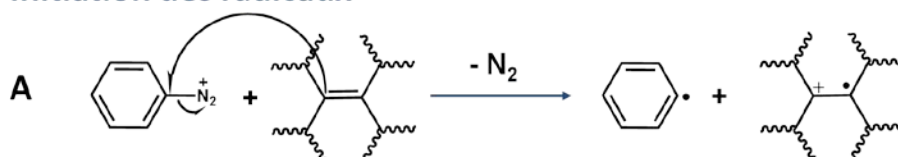


Figure 28 : Fonctionnalisation covalente des CNTs par des réactions d'additions A) addition d'un carbène ;B) addition d'un dérivé nitrène ;C) addition d'un ylure de méthine et D) addition d'un aryle diazonium préformé ou formé in situ

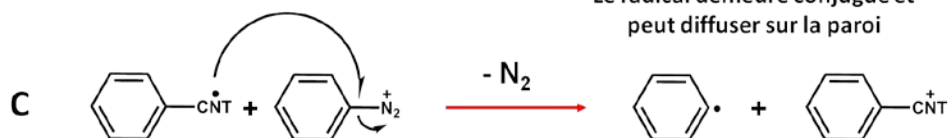
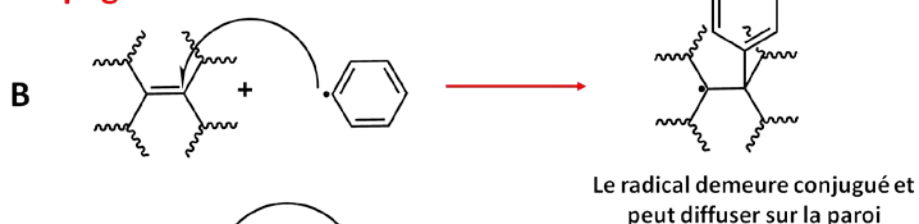
Enfin, l'une des méthodes les plus prisées pour fonctionnaliser covalamment les CNTs est l'addition radicalaire de phényldiazonium (Figure 28D). Décrite pour la première fois par Pinson

et Savéant en 1992 pour la modification électrochimique de matériaux carbonés par la réduction d'un sel de diazonium aromatique.^{239,240} Cette réaction sur CNTs a ensuite été décrite en 2001 par J.M. Tour.^{241,242} La popularité de cette réaction est liée à son haut rendement et au fait que la chimie des phényles est riche et bien connue. Après avoir greffé les groupements phényles sur la paroi des CNTs, il est possible de les modifier ou de les coupler à d'autres molécules.²⁴³ Cette méthode est la seule fonctionnalisation covalente effectuée au cours de cette thèse. Elle peut être effectuée en milieu aqueux, organique ou encore sans solvant. Nous avons effectué toutes nos fonctionnalisations covalentes en milieu organique. Le phényldiazonium peut être formé in situ ou pré-synthétisé, il réagira ensuite avec la paroi des CNTs suivant le mécanisme présenté en figure 29.²⁴⁴

Initiation des radicaux



Propagation des radicaux



Propagation des radicaux

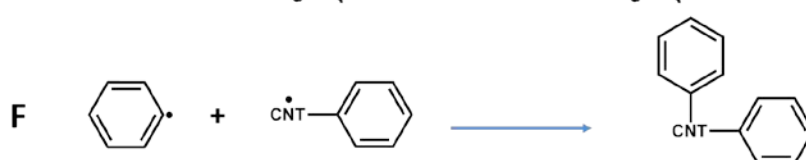
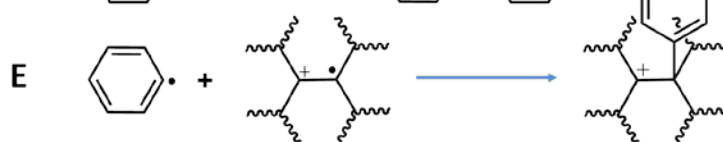


Figure 29 : Mécanisme de réaction entre le phényldiazonium et la paroi des CNTs. Adapté de [244]

Dans un premier temps, le phényldiazonium se décompose pour former un phényle radicalaire via un transfert d'électron à partir des CNTs (étape A). Ensuite, le radical peut s'ajouter aux CNTs pour former un radical CNT-phényle (étape B). Ce radical peut réduire des

phényldiazoniums générant alors d'autres radicaux phényles (étape C). Finalement, il y a trois processus de terminaison (Figure 29D, E et F). Un radical phényle peut se coupler à un autre radical phényle, avec un CNT déjà oxydé ou avec un radical CNT-phényle. Ce mécanisme engendre irrémédiablement la formation d'une couche de polyphénylène qui peut engendrer une passivation de la surface si elle n'est pas contrôlée.

La fonctionnalisation covalente des CNTs modifie les propriétés optiques et électroniques des MWCNTs. Les CNTs fonctionnalisés sont généralement caractérisés par diverses techniques, par exemple la spectroscopie Raman permet de confirmer les modifications structurales.

Les CNTs sont donc des matériaux de choix pour l'élaboration de bioélectrodes. Ils sont très conducteurs, résistants et diverses nanostructurations de la surface de l'électrode peuvent être réalisées grâce à eux pour optimiser la quantité immobilisée de biocatalyseurs. De plus, tout le panel de fonctionnalisation de ce matériau permet d'envisager un certain nombre de stratégies pour orienter et immobiliser l'enzyme (pour effectuer un DET efficace) ; ou co-immobiliser un médiateur et l'enzyme (pour observer un MET efficace). Enfin, de par leurs propriétés conductrices et leur dimension nanométrique, ils interagissent particulièrement bien avec les protéines. Ces aspects facilitent le DET entre l'enzyme et l'électrode. En effet, pour certaines protéines le DET était difficile à obtenir, elles ont pu être connectées grâce à leur incorporation au sein d'une matrice 3D de CNTs. Les enzymes pour lesquelles un DET avait déjà été observé ont vu ce dernier s'accroître sur CNTs.

III- Autres matériaux d'électrodes

III.1 Le graphène

Tout comme les CNTs, le graphène est un matériau carboné qui présente d'excellentes propriétés pour ce qui est de la conductivité, de la surface spécifique et de la stabilité. Il est donc également envisagé ces dernières années, en tant que matériau d'électrodes²⁴⁵ pour l'immobilisation de protéines et la bioélectrocatalyse.²⁴⁶⁻²⁴⁸ De récents travaux dans le domaine de l'électrochimie du graphène et de l'oxyde de graphène (GO) ont démontré que ce matériau est une nouvelle alternative pour les électrodes à base de matériaux carbonés.²⁴⁹⁻²⁵² L'électrochimie du graphène est un outil puissant pour explorer l'effet de sa fonctionnalisation, la vraie nature des échantillons, ainsi que la cinétique de transfert d'électron de ces types de nanomatériaux.^{249,252-254} Le graphène peut être produit selon diverses techniques de décomposition thermique, CVD ou encore des méthodes chimiques.²⁵⁵ Comme les CNTs, il peut lui aussi être fonctionnalisé de manière non covalente ou covalente en ciblant les carbonés sp^2 .^{256,257} Des structures tridimensionnelles sont formées grâce à l'empilement de plusieurs feuillets de graphène liés par des interactions de Van der Waals.²⁵⁸ L'étude par électrochimie directe d'enzyme redox est particulièrement explorée dans le domaine des biocapteurs et des

biopiles,²⁵⁹ néanmoins peu d'études ont été menées sur des protéines redox à la surface de matériaux à base de graphène.²⁴⁶ Ces études se sont essentiellement concentrées sur la glucose oxydase²⁴⁷ ou les enzymes héminiques comme la peroxydase de raifort, le cytochrome c, ou l'hémoglobine.^{248,260} Néanmoins, l'avantage du graphène comparé aux CNTs reste à démontrer.

III.2 Les nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or présentent des propriétés très intéressantes pour l'élaboration d'électrode, en particulier leurs propriétés de ET. En effet, leur surface électronique est élevée, leur surface spécifique très importante grâce à leur taille nanométrique variant de 3,5²⁶¹ à 20 nm environ.²⁶² Comme les CNTs, leur surface peut être fonctionnalisée aisément pour y apporter des fonctions d'intérêts. Ces modifications sont en particulier effectuées par des monocouches auto assemblées (SAMs) de thiol portant la fonction terminale désirée. Comme mentionné précédemment, elles ont été utilisées dans la connexion directe de GOx.^{138,139} D'autres études ont porté sur l'amélioration de la connexion directe de la CDH via son immobilisation sur des d'AuNPs.²⁶²⁻²⁶⁵ Une GDH FAD-dépendante a également été connectée suivant la création d'un assemblage AuNPs/FAD/GDH.²⁶¹ L'assemblage supramoléculaire de nanoparticules de carbone chargées négativement et d'AuNPs chargées positivement s'est avéré être une plateforme intéressante pour la connexion en DET de la BOD.²⁶⁶ Enfin, Gutierrez-Sanchez et al. ont récemment reporté la fonctionnalisation de nanoparticules d'or avec la laccase de *Trametes Hirsuta*, proposant une orientation favorable de la protéine pour le DET.¹⁵⁴

E- Evolution des performances des biopiles enzymatiques et applications

I- Les biopiles Glucose/O₂

Le tableau 4 décrit les caractéristiques de certaines biopiles enzymatiques parmi les plus puissantes, ainsi que plusieurs stratégies mises en œuvre pour améliorer la stabilité et la puissance de ces biopiles. Pour comparaison, la première ligne reporte les performances de la première biopile comportant un biocatalyseur d'origine enzymatique à l'anode et à la cathode. Les densités de courant et de puissance sont calculées par rapport à la surface géométrique de l'électrode et non la surface développée. Ce système de calcul est le plus répandu même s'il fait souvent débat.

On observe que les densités de courants sont augmentées par la structuration de l'électrode par divers matériaux carbonés comme les fibres de carbone, les CNTs ou encore le carbone mésoporeux. L'utilisation de médiateur à l'anode comme les hydrogels d'osmium permet également une meilleure connexion de la GOx ce qui augmente aussi les densités de puissance des biopiles glucose/O₂. La capacité de ses dispositifs à alimenter des dispositifs réels a dans certains cas été évaluée.^{267,268}

Plusieurs biopiles glucose/O₂ ont été implantées dans divers organismes vivants. Ceci démontre la capacité de ces systèmes à fonctionner dans des conditions complexes de disponibilité en substrat, de pH, et de concentration en chlorure et urate. De plus, ces études confirment la biocompatibilité de ces dispositifs et la possibilité de tirer profit de l'énergie des organismes vivants. Ainsi en 2010, le laboratoire a implanté pour la première fois une biopile glucose-O₂ dans un rat. Dans ces conditions, la biopile délivre une puissance de 6 μW accompagnée d'une tension de 0,25 V.²⁶⁹ Des systèmes similaires ont ensuite été implantés dans des palourdes,²⁷⁰ des escargots,²⁷¹ des cafards,²⁷² et des homards, et qui montés en série étaient capables d'alimenter une montre.²⁷³ Enfin, un dispositif a été implanté dans un rat pour alimenter un dispositif électronique.²⁷⁴

Néanmoins, malgré les efforts menés pour optimiser ces dispositifs, les densités de puissance des plus performants (de l'ordre du mW) restent négligeables comparées aux centaines de kW générés par les PACs conventionnelles. Les applications envisagées sont donc de moindres puissances : petits dispositifs électroniques implantables, dispositifs portables, capteurs autosuffisants... Aussi, la stabilité de ces systèmes évaluée sur des courtes durées, ne répond pas encore aux attentes nécessaires à leurs commercialisations.

Pour que cette alternative énergétique soit viable, plusieurs points restent à optimiser. L'immobilisation et la connexion des enzymes aux électrodes doivent être améliorées afin de permettre un transfert d'électron efficace entre l'enzyme et l'électrode, qui soit stable dans le temps. De plus, des efforts doivent être menés dans l'élaboration et la structuration des surfaces d'électrodes, afin de maximiser le nombre d'enzymes connectées efficacement à l'électrode.

II- Les biopiles H₂/O₂

Le développement des biopiles H₂/O₂ s'est principalement articulé autour de la connexion en DET des enzymes et de l'élaboration de mélange non explosifs H₂/O₂ afin de pouvoir s'affranchir de la compartimentation des électrodes.^{268,275} Pourtant, des travaux récents ont relancé l'utilisation de médiateurs redox à l'anode. En effet, il a été montré que l'incorporation d'une hydrogénase au sein d'un polymère redox à base de viologène permettait non seulement de connecter l'enzyme mais aussi de la protéger du dioxygène et de son inactivation à haut potentiel.^{71,176} Dans cette configuration, la compartimentation des électrodes n'est plus nécessaire pour protéger l'hydrogénase. Les biopiles H₂/O₂ sont plus largement détaillées dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

Tableau 4 : Caractéristiques et performances de quelques biopiles glucose/O₂

Année	Enzyme anodique	Enzyme cathodique	Matériau d'électrode	Conditions d'expérience	Substrats	Membrane	P _{max} (μW cm ⁻²)	OCV (V)	Stabilité	Ref
1999	GOx + PQQ (MET)	Cyt Ox + cytochrome c (MET)	Or + SAMs	pH 7	1 mM glucose air	Non	5	0,11	Performances stables sur 48h	276
2004	GOx + Hydrogel d'osmium (MET)	Lac + Hydrogel d'osmium (MET)	Fibres de carbone	0,1 M citrate pH 5 37°C	15 mM glucose air	Non	400	1	∅	277
2009	GDH + NADH +Diaphorase/ VK3 (MET)	BOD + K ₃ Fe(CN) ₆ (MET)	Fibres de carbone	PBS pH 7	400 mM glucose- air	Oui	1450	0,8	∅	17
2010	GOx + Hydrogel d'osmium (MET)	BOD + Hydrogel d'osmium (MET)	Microfibres de CNTs	PBS pH 7,2 37°C	15 mM glucose air	Non	740	0,73	20% de perte après 150 h	148

Année	Enzyme anodique	Enzyme cathodique	Matériau d'électrode	Conditions d'expérience	Substrats	Membrane	P ($\mu\text{W cm}^{-2}$)	OCV (V)	Stabilité	Ref
2013	GOx + NQ + catalase (MET)	Lac (DET)	Disque de MWCNTs	PBS pH 7, 40°C	50 mM glucose O ₂	Non	1540	0,5	40 % conservé après 7 jours Alimentation d'une Del	267
2013	GDH + menadione (MET)	Lac (DET)	Disque de CNTs	PBS pH 7	5 mM glucose air	Non	800	1,2	∅	278
2014	GOx + Hydrogel d'osmium (MET)	BOD + Hydrogel d'osmium (MET)	MWCNTs + PEDOT	PBS pH 7, 37°C	60 mM glucose-O ₂ Serum	Non	2180 1020	0,7	83 % conservé après 24 h	279

- (1) Grove, W. R. *Philos. Mag. Ser. 3* **1839**, 14 (86), 127–130.
- (2) Schöenbein, P. C. F. *Philos. Mag. Ser. 3* **1839**, 14 (85), 43–45.
- (3) Winter, M.; Brodd, R. J. *Chem. Rev.* **2004**, 104 (10), 4245–4270.
- (4) Cracknell, J. A.; Vincent, K. A.; Armstrong, F. A. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (7), 2439–2461.
- (5) Steele, B. C. H.; Heinzl, A. *Nature* **2001**, 414 (6861), 345–352.
- (6) Haga, K.; Adachi, S.; Shiratori, Y.; Itoh, K.; Sasaki, K. *Solid State Ion.* **2008**, 179 (27–32), 1427–1431.
- (7) Yan, W.-M.; Chu, H.-S.; Lu, M.-X.; Weng, F.-B.; Jung, G.-B.; Lee, C.-Y. *J. Power Sources* **2009**, 188 (1), 141–147.
- (8) Zhang, J.; Sasaki, K.; Sutter, E.; Adzic, R. R. *Science* **2007**, 315 (5809), 220–222.
- (9) Sasaki, K.; Naohara, H.; Cai, Y.; Choi, Y. M.; Liu, P.; Vukmirovic, M. B.; Wang, J. X.; Adzic, R. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49 (46), 8602–8607.
- (10) Serov, A.; Kwak, C. *Appl. Catal. B Environ.* **2009**, 90 (3–4), 313–320.
- (11) Brouzgou, A.; Song, S. Q.; Tsiakaras, P. *Appl. Catal. B Environ.* **2012**, 127, 371–388.
- (12) Vincent, K. A.; Parkin, A.; Armstrong, F. A. *Chem. Rev.* **2007**, 107 (10), 4366–4413.
- (13) Wait, A. F.; Parkin, A.; Morley, G. M.; dos Santos, L.; Armstrong, F. A. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114 (27), 12003–12009.
- (14) Yan, Y.-M.; Baravik, I.; Tel-Vered, R.; Willner, I. *Adv. Mater.* **2009**, 21 (42), 4275–4279.
- (15) Arechederra, R. L.; Minteer, S. D. *Fuel Cells* **2009**, 9 (1), 63–69.
- (16) Kim, Y. H.; Campbell, E.; Yu, J.; Minteer, S. D.; Banta, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52 (5), 1437–1440.
- (17) Sakai, H.; Nakagawa, T.; Tokita, Y.; Hatazawa, T.; Ikeda, T.; Tsujimura, S.; Kano, K. *Energy Env. Sci* **2009**, 2 (1), 133–138.
- (18) Zebda, A.; Gondran, C.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cinquin, P.; Cosnier, S. *Nat. Commun.* **2011**, 2, 370.
- (19) Allen, R. M.; Bennetto, H. P. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1993**, 39-40 (1), 27–40.
- (20) Rabaey, K.; Verstraete, W. *Trends Biotechnol.* **2005**, 23 (6), 291–298.
- (21) Logan, B. E.; Hamelers, B.; Rozendal, R.; Schröder, U.; Keller, J.; Freguia, S.; Aelterman, P.; Verstraete, W.; Rabaey, K. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40 (17), 5181–5192.
- (22) Du, Z.; Li, H.; Gu, T. *Biotechnol. Adv.* **2007**, 25 (5), 464–482.
- (23) Schaetzle, O.; Barrière, F.; Baronian, K. *Energy Environ. Sci.* **2008**, 1 (6), 607.
- (24) Davis, F.; Higson, S. P. J. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22 (7), 1224–1235.
- (25) Pant, D.; Van Bogaert, G.; Diels, L.; Vanbroekhoven, K. *Bioresour. Technol.* **2010**, 101 (6), 1533–1543.
- (26) Ter Heijne, A.; Schaetzle, O.; Gimenez, S.; Fabregat-Santiago, F.; Bisquert, J.; Strik, D. P. B. T. B.; Barrière, F.; Buisman, C. J. N.; Hamelers, H. V. M. *Energy Environ. Sci.* **2011**, 4 (12), 5035.
- (27) Ren, Z.; Ramasamy, R. P.; Cloud-Owen, S. R.; Yan, H.; Mench, M. M.; Regan, J. M. *Bioresour. Technol.* **2011**, 102 (1), 416–421.
- (28) Zhao, F.; Harnisch, F.; Schröder, U.; Scholz, F.; Bogdanoff, P.; Herrmann, I. *Electrochem. Commun.* **2005**, 7 (12), 1405–1410.
- (29) Cheng, S.; Liu, H.; Logan, B. E. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40 (1), 364–369.
- (30) Bergel, A.; Féron, D.; Mollica, A. *Electrochem. Commun.* **2005**, 7 (9), 900–904.

- (31) Rabaey, K.; Read, S. T.; Clauwaert, P.; Freguia, S.; Bond, P. L.; Blackall, L. L.; Keller, J. *ISME J.* **2008**, *2* (5), 519–527.
- (32) Schaetzle, O.; Barrière, F.; Schröder, U. *Energy Env. Sci* **2009**, *2* (1), 96–99.
- (33) Santoro, C.; Babanova, S.; Atanassov, P.; Li, B.; Ieropoulos, I.; Cristiani, P. *J. Electrochem. Soc.* **2013**, *160* (10), H720–H726.
- (34) Arechederra, R.; Minteer, S. D. *Electrochimica Acta* **2008**, *53* (23), 6698–6703.
- (35) Moehlenbrock, M. J.; Toby, T. K.; Waheed, A.; Minteer, S. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (18), 6288–6289.
- (36) Arechederra, R. L.; Boehm, K.; Minteer, S. D. *Electrochimica Acta* **2009**, *54* (28), 7268–7273.
- (37) Zhao, J.; Meng, F.; Zhu, X.; Han, K.; Liu, S.; Li, G. *Electroanalysis* **2008**, *20* (14), 1593–1598.
- (38) Giroud, F.; Nicolo, T. A.; Koepke, S. J.; Minteer, S. D. *Electrochimica Acta* **2013**, *110*, 112–119.
- (39) Bhatnagar, D.; Xu, S.; Fischer, C.; Arechederra, R. L.; Minteer, S. D. *Phys Chem Chem Phys* **2011**, *13* (1), 86–92.
- (40) Yahiro, A. T.; Lee, S. M.; Kimble, D. O. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Spec. Sect. Biophys. Subj.* **1964**, *88* (2), 375–383.
- (41) Hickey, D. P.; Giroud, F.; Schmidtke, D. W.; Glatzhofer, D. T.; Minteer, S. D. *ACS Catal.* **2013**, *3* (12), 2729–2737.
- (42) Skunik-Nuckowska, M.; Grzejszczyk, K.; Stolarczyk, K.; Bilewicz, R.; Kulesza, P. J. *J. Appl. Electrochem.* **2014**, *44* (4), 497–507.
- (43) Stolarczyk, K.; Kizling, M.; Majdecka, D.; Żelechowska, K.; Biernat, J. F.; Rogalski, J.; Bilewicz, R. *J. Power Sources* **2014**, *249*, 263–269.
- (44) Palmore, G. T. R.; Kim, H.-H. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *464* (1), 110–117.
- (45) Agnès, C.; Reuillard, B.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cosnier, S. *Electrochem. Commun.* **2013**, *34*, 105–108.
- (46) Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. E. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (7), 2563–2606.
- (47) Shleev, S.; Jarosz-Wilkolazka, A.; Khalunina, A.; Morozova, O.; Yaropolov, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Bioelectrochemistry* **2005**, *67* (1), 115–124.
- (48) Blanford, C. F.; Heath, R. S.; Armstrong, F. A. *Chem. Commun.* **2007**, No. 17, 1710.
- (49) Mano, N.; Kim, H.-H.; Zhang, Y.; Heller, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (22), 6480–6486.
- (50) Miura, Y.; Tsujimura, S.; Kurose, S.; Kamitaka, Y.; Kataoka, K.; Sakurai, T.; Kano, K. *Fuel Cells* **2009**, *9* (1), 70–78.
- (51) Giroud, F.; Gondran, C.; Gorgy, K.; Vivier, V.; Cosnier, S. *Electrochimica Acta* **2012**, *85*, 278–282.
- (52) Katz, E.; Lioubashevski, O.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (11), 3979–3988.
- (53) Miyake, T.; Haneda, K.; Yoshino, S.; Nishizawa, M. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *40* (1), 45–49.
- (54) Flexer, V.; Brun, N.; Destribats, M.; Backov, R.; Mano, N. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (17), 6437.
- (55) Durand, F.; Stines-Chaumeil, C.; Flexer, V.; André, I.; Mano, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *402* (4), 750–754.

- (56) Deng, L.; Wang, F.; Chen, H.; Shang, L.; Wang, L.; Wang, T.; Dong, S. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24* (2), 329–333.
- (57) Scherbahn, V.; Putze, M. T.; Dietzel, B.; Heinlein, T.; Schneider, J. J.; Lisdat, F. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *61*, 631–638.
- (58) Kamitaka, Y.; Tsujimura, S.; Setoyama, N.; Kajino, T.; Kano, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9* (15), 1793.
- (59) So, K.; Kawai, S.; Hamano, Y.; Kitazumi, Y.; Shirai, O.; Hibi, M.; Ogawa, J.; Kano, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (10), 4823.
- (60) Salaj-Kosla, U.; Scanlon, M. D.; Baumeister, T.; Zahma, K.; Ludwig, R.; Conghaile, P. Ó.; MacAodha, D.; Leech, D.; Magner, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *405* (11), 3823–3830.
- (61) Di, J.; Cheng, J.; Xu, Q.; Zheng, H.; Zhuang, J.; Sun, Y.; Wang, K.; Mo, X.; Bi, S. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23* (5), 682–687.
- (62) Gao, F.; Guo, X.; Yin, J.; Zhao, D.; Li, M.; Wang, L. *RSC Adv.* **2011**, *1* (7), 1301.
- (63) Deng, L.; Shang, L.; Wen, D.; Zhai, J.; Dong, S. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26* (1), 70–73.
- (64) Rincón, R. A.; Lau, C.; Luckarift, H. R.; Garcia, K. E.; Adkins, E.; Johnson, G. R.; Atanassov, P. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *27* (1), 132–136.
- (65) Masuda, M.; Motoyama, Y.; Murata, K.; Nakamura, N.; Ohno, H. *Electroanalysis* **2011**, *23* (10), 2297–2301.
- (66) De Lacey, A. L.; Fernández, V. M.; Rousset, M.; Cammack, R. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (10), 4304–4330.
- (67) Vincent, K. A.; Cracknell, J. A.; Lenz, O.; Zebger, I.; Friedrich, B.; Armstrong, F. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (47), 16951–16954.
- (68) Pandelia, M.-E.; Fourmond, V.; Tron-Infossi, P.; Lojou, E.; Bertrand, P.; Léger, C.; Giudici-Ortoni, M.-T.; Lubitz, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (20), 6991–7004.
- (69) Ciaccafava, A.; De Poulpiquet, A.; Techer, V.; Giudici-Ortoni, M. T.; Tingry, S.; Innocent, C.; Lojou, E. *Electrochem. Commun.* **2012**, *23*, 25–28.
- (70) Krishnan, S.; Armstrong, F. A. *Chem. Sci.* **2012**, *3* (4), 1015.
- (71) Plumeré, N.; Rüdiger, O.; Oughli, A. A.; Williams, R.; Vivekananthan, J.; Pöller, S.; Schuhmann, W.; Lubitz, W. *Nat. Chem.* **2014**, *6* (9), 822–827.
- (72) Shleev, S.; Tkac, J.; Christenson, A.; Ruzgas, T.; Yaropolov, A. I.; Whittaker, J. W.; Gorton, L. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20* (12), 2517–2554.
- (73) Sakurai, T.; Kataoka, K. *Chem. Rec.* **2007**, *7* (4), 220–229.
- (74) Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (40), 37663–37669.
- (75) Page, C. C.; Moser, C. C.; Chen, X.; Dutton, P. L. *Nature* **1999**, *402* (6757), 47–52.
- (76) Jones, S. M.; Solomon, E. I. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72* (5), 869–883.
- (77) Cracknell, J. A.; Blanford, C. F. *Chem. Sci.* **2012**, *3* (5), 1567.
- (78) Kamitaka, Y.; Tsujimura, S.; Kataoka, K.; Sakurai, T.; Ikeda, T.; Kano, K. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *601* (1-2), 119–124.
- (79) Christenson, A.; Shleev, S.; Mano, N.; Heller, A.; Gorton, L. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2006**, *1757* (12), 1634–1641.
- (80) Durand, F.; Kjaergaard, C. H.; Suraniti, E.; Gounel, S.; Hadt, R. G.; Solomon, E. I.; Mano, N. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *35* (1), 140–146.
- (81) Marshall, N. M.; Garner, D. K.; Wilson, T. D.; Gao, Y.-G.; Robinson, H.; Nilges, M. J.; Lu, Y. *Nature* **2009**, *462* (7269), 113–116.

- (82) Li, H.; Webb, S. P.; Ivanic, J.; Jensen, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (25), 8010–8019.
- (83) Bertrand, T.; Jolival, C.; Briozzo, P.; Caminade, E.; Joly, N.; Madzak, C.; Mougin, C. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, *41* (23), 7325–7333.
- (84) Shleev, S.; Pita, M.; Yaropolov, A. I.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Electroanalysis* **2006**, *18* (19–20), 1901–1908.
- (85) Ramírez, P.; Mano, N.; Andreu, R.; Ruzgas, T.; Heller, A.; Gorton, L.; Shleev, S. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2008**, *1777* (10), 1364–1369.
- (86) Ivnitski, D.; Artyushkova, K.; Atanassov, P. *Bioelectrochemistry* **2008**, *74* (1), 101–110.
- (87) Vaz-Dominguez, C.; Campuzano, S.; Rüdiger, O.; Pita, M.; Gorbacheva, M.; Shleev, S.; Fernandez, V. M.; De Lacey, A. L. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24* (4), 531–537.
- (88) Edembe, L.; Gounel, S.; Cadet, M.; Durand, F.; Mano, N. *Electrochem. Commun.* **2012**, *23*, 80–82.
- (89) Kang, C.; Shin, H.; Zhang, Y.; Heller, A. *Bioelectrochemistry* **2004**, *65* (1), 83–88.
- (90) Shin, H.; Kang, C.; Heller, A. *Electroanalysis* **2007**, *19* (6), 638–643.
- (91) Bartlett, P. N. *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*, Wiley & Sons.; 2008.
- (92) Armstrong, F. A.; Wilson, G. S. *Electrochimica Acta* **2000**, *45* (15), 2623–2645.
- (93) Sarma, A. K.; Vatsyayan, P.; Goswami, P.; Minteer, S. D. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (8), 2313–2322.
- (94) Richards, F. M.; Knowles, J. R. *J. Mol. Biol.* **1968**, *37* (1), 231–233.
- (95) Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. *Biotechniques* **2004**, *37* (5), 790–806.
- (96) de Lumley-Woodyear, T.; Rocca, P.; Lindsay, J.; Dror, Y.; Freeman, A.; Heller, A. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (8), 1332–1338.
- (97) Klotzbach, T.; Watt, M.; Ansari, Y.; Minteer, S. *J. Membr. Sci.* **2006**, *282* (1–2), 276–283.
- (98) Krajewska, B. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35* (2–3), 126–139.
- (99) Lim, J.; Cirigliano, N.; Wang, J.; Dunn, B. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9* (15), 1809.
- (100) Szot, K.; de Poulpiquet, A.; Ciaccafava, A.; Marques, H.; Jönsson-Niedziolka, M.; Niedziolka-Jönsson, J.; Marken, F.; Lojou, E.; Opallo, M. *Electrochimica Acta* **2013**, *111*, 434–440.
- (101) Cosnier, S. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14* (5), 443–456.
- (102) Cosnier, S. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *89* (2–3), 127–138.
- (103) Cosnier, S.; Holzinger, M. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 2146.
- (104) Cosnier, S. *Anal. Lett.* **2007**, *40* (7), 1260–1279.
- (105) Samanta, D.; Sarkar, A. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 2567.
- (106) Takahashi, S.; Sato, K.; Anzai, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *402* (5), 1749–1758.
- (107) Villalonga, R.; Cao, R.; Fragoso, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (7), 3088–3116.
- (108) Dubacheva, G. V.; Van Der Heyden, A.; Dumy, P.; Kaftan, O.; Auzély-Velty, R.; Coche-Guerente, L.; Labbé, P. *Langmuir* **2010**, *26* (17), 13976–13986.
- (109) Holzinger, M.; Bouffier, L.; Villalonga, R.; Cosnier, S. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (5), 1128–1134.
- (110) Haddour, N.; Cosnier, S.; Gondran, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (16), 5752–5753.
- (111) Balland, V.; Hureau, C.; Cusano, A. M.; Liu, Y.; Tron, T.; Limoges, B. *Chem. – Eur. J.* **2008**, *14* (24), 7186–7192.

- (112) Cracknell, J. A.; McNamara, T. P.; Lowe, E. D.; Blanford, C. F. *Dalton Trans.* **2011**, 40 (25), 6668.
- (113) Holzinger, M.; Goff, A. L.; Cosnier, S. *Front. Chem.* **2014**, 2.
- (114) Wong, L. S.; Khan, F.; Micklefield, J. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (9), 4025–4053.
- (115) Soellner, M. B.; Dickson, K. A.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (39), 11790–11791.
- (116) Rusmini, F.; Zhong, Z.; Feijen, J. *Biomacromolecules* **2007**, 8 (6), 1775–1789.
- (117) Tarasevich, M. R.; Yaropolov, A. I.; Bogdanovskaya, V. A.; Varfolomeev, S. D. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1979**, 6 (3), 393–403.
- (118) Yaropolov, A. I.; Tarasevich, M. R.; Varfolomeev, S. D. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1978**, 5 (1), 18–24.
- (119) Armstrong, F. A.; Hill, H. A. O.; Walton, N. J. *Acc. Chem. Res.* **1988**, 21 (11), 407–413.
- (120) Cooney, M. J.; Svoboda, V.; Lau, C.; Martin, G.; Minteer, S. D. *Energy Environ. Sci.* **2008**, 1 (3), 320.
- (121) Leech, D.; Kavanagh, P.; Schuhmann, W. *Electrochimica Acta* **2012**, 84, 223–234.
- (122) Gorton, L.; Lindgren, A.; Larsson, T.; Munteanu, F. D.; Ruzgas, T.; Gazaryan, I. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 400 (1–3), 91–108.
- (123) Christenson, A.; Dimcheva, N.; Ferapontova, E. E.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Stoica, L.; Shleev, S.; Yaropolov, A. I.; Haltrich, D.; Thorneley, R. N. F.; Aust, S. D. *Electroanalysis* **2004**, 16 (13–14), 1074–1092.
- (124) Tsujimura, S.; Nakagawa, T.; Kano, K.; Ikeda, T. *Electrochemistry* **2004**, 72, 437–439.
- (125) Cracknell, J. A.; McNamara, T. P.; Lowe, E. D.; Blanford, C. F. *Dalton Trans.* **2011**, 40 (25), 6668.
- (126) Ciaccafava, A.; Infossi, P.; Ilbert, M.; Guiral, M.; Lecomte, S.; Giudici-Orticoni, M. T.; Lojou, E. *Angew. Chem.* **2012**, 124 (4), 977–980.
- (127) Kavanagh, P.; Leech, D. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15 (14), 4859.
- (128) Mao, F.; Mano, N.; Heller, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (16), 4951–4957.
- (129) Bankar, S. B.; Bule, M. V.; Singhal, R. S.; Ananthanarayan, L. *Biotechnol. Adv.* **2009**, 27 (4), 489–501.
- (130) Wang, J. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (2), 814–825.
- (131) Cosnier, S.; Le Goff, A.; Holzinger, M. *Electrochem. Commun.* **2014**, 38, 19–23.
- (132) Ivnitski, D.; Branch, B.; Atanassov, P.; Apblett, C. *Electrochem. Commun.* **2006**, 8 (8), 1204–1210.
- (133) Salimi, A.; Sharifi, E.; Noorbakhsh, A.; Soltanian, S. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22 (12), 3146–3153.
- (134) Ivnitski, D.; Artyushkova, K.; Rincón, R. A.; Atanassov, P.; Luckarift, H. R.; Johnson, G. R. *Small* **2008**, 4 (3), 357–364.
- (135) Gao, R.; Zheng, J. *Electrochem. Commun.* **2009**, 11 (3), 608–611.
- (136) Goran, J. M.; Mantilla, S. M.; Stevenson, K. J. *Anal. Chem.* **2013**, 85 (3), 1571–1581.
- (137) Courjean, O.; Gao, F.; Mano, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (32), 5897–5899.
- (138) Holland, J. T.; Lau, C.; Brozik, S.; Atanassov, P.; Banta, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (48), 19262–19265.
- (139) Xiao, Y.; Patolsky, F.; Katz, E.; Hainfeld, J. F.; Willner, I. *Science* **2003**, 299 (5614), 1877–1881.

- (140) Degani, Y.; Heller, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (6), 2357–2358.
- (141) Gregg, B. A.; Heller, A. *Anal. Chem.* **1990**, *62* (3), 258–263.
- (142) Mano, N.; Mao, F.; Heller, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (44), 12962–12963.
- (143) Barrière, F.; Kavanagh, P.; Leech, D. *Electrochimica Acta* **2006**, *51* (24), 5187–5192.
- (144) MacAodha, D.; Ferrer, M. L.; Conghaile, P. Ó.; Kavanagh, P.; Leech, D. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14* (42), 14667.
- (145) Schuhmann, W.; Ohara, T. J.; Schmidt, H. L.; Heller, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (4), 1394–1397.
- (146) Barrière, F.; Ferry, Y.; Rochefort, D.; Leech, D. *Electrochem. Commun.* **2004**, *6* (3), 237–241.
- (147) Guschin, D. A.; Castillo, J.; Dimcheva, N.; Schuhmann, W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398* (4), 1661–1673.
- (148) Gao, F.; Viry, L.; Maugey, M.; Poulin, P.; Mano, N. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 2.
- (149) Yoshino, S.; Miyake, T.; Yamada, T.; Hata, K.; Nishizawa, M. *Adv. Energy Mater.* **2013**, *3* (1), 60–64.
- (150) Zayats, M.; Katz, E.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (49), 14724–14735.
- (151) Katz, E.; Sheeney-Haj-Ichia, L.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (25), 3292–3300.
- (152) Gutiérrez-Sánchez, C.; Jia, W.; Beyl, Y.; Pita, M.; Schuhmann, W.; De Lacey, A. L.; Stoica, L. *Electrochimica Acta* **2012**, *82*, 218–223.
- (153) Pang, H. L.; Liu, J.; Hu, D.; Zhang, X. H.; Chen, J. H. *Electrochimica Acta* **2010**, *55* (22), 6611–6616.
- (154) Gutiérrez-Sánchez, C.; Pita, M.; Vaz-Domínguez, C.; Shleev, S.; De Lacey, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (41), 17212–17220.
- (155) Sosna, M.; Stoica, L.; Wright, E.; Kilburn, J. D.; Schuhmann, W.; Bartlett, P. N. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14* (34), 11882.
- (156) Karaśkiewicz, M.; Nazaruk, E.; Żelechowska, K.; Biernat, J. F.; Rogalski, J.; Bilewicz, R. *Electrochem. Commun.* **2012**, *20*, 124–127.
- (157) Tominaga, M.; Ohtani, M.; Taniguchi, I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10* (46), 6928–6934.
- (158) Santos, L. dos; Climent, V.; Blanford, C. F.; Armstrong, F. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (42), 13962–13974.
- (159) Ulyanova, Y.; Babanova, S.; Pinchon, E.; Matanovic, I.; Singhal, S.; Atanassov, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (26), 13367.
- (160) Fontecilla-Camps, J. C.; Volbeda, A.; Cavazza, C.; Nicolet, Y. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (10), 4273–4303.
- (161) Alonso-Lomillo, M. A.; Rüdiger, O.; Maroto-Valiente, A.; Velez, M.; Rodríguez-Ramos, I.; Muñoz, F. J.; Fernández, V. M.; De Lacey, A. L. *Nano Lett.* **2007**, *7* (6), 1603–1608.
- (162) Rüdiger, O.; Abad, J. M.; Hatchikian, E. C.; Fernandez, V. M.; De Lacey, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 16008–16009.
- (163) Luo, X.; Brugna, M.; Tron-Infossi, P.; Giudici-Orticoni, M. T.; Lojou, É. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14* (8), 1275–1288.
- (164) Gutiérrez-Sánchez, C.; Olea, D.; Marques, M.; Fernández, V. M.; Pereira, I. A. C.; Vélez, M.; De Lacey, A. L. *Langmuir* **2011**, *27* (10), 6449–6457.

- (165) Karnicka, K.; Miecznikowski, K.; Kowalewska, B.; Skunik, M.; Opallo, M.; Rogalski, J.; Schuhmann, W.; Kulesza, P. *J. Anal. Chem.* **2008**, *80* (19), 7643–7648.
- (166) Bourourou, M.; Elouarzaki, K.; Holzinger, M.; Agnès, C.; Le Goff, A.; Reverdy-Bruas, N.; Chaussy, D.; Party, M.; Maaref, A.; Cosnier, S. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (7), 2885.
- (167) Tsujimura, S.; Tatsumi, H.; Ogawa, J.; Shimizu, S.; Kano, K.; Ikeda, T. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *496* (1–2), 69–75.
- (168) Heller, A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10* (6), 664–672.
- (169) Mano, N.; Soukharev, V.; Heller, A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (23), 11180–11187.
- (170) Kavanagh, P.; Boland, S.; Jenkins, P.; Leech, D. *Fuel Cells* **2009**, *9* (1), 79–84.
- (171) Beyl, Y.; Guschin, D. A.; Shleev, S.; Schuhmann, W. *Electrochem. Commun.* **2011**, *13* (5), 474–476.
- (172) Boland, S.; Jenkins, P.; Kavanagh, P.; Leech, D. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *626* (1–2), 111–115.
- (173) Morozov, S. V.; Karyakina, E. E.; Zorin, N. A.; Varfolomeyev, S. D.; Cosnier, S.; Karyakin, A. A. *Bioelectrochemistry* **2002**, *55* (1–2), 169–171.
- (174) Karyakin, A. A.; Vinogradova, D. V.; Morozov, S. V.; Karyakina, E. E. *Electrochimica Acta* **2010**, *55* (26), 7696–7700.
- (175) Baur, J.; Le Goff, A.; Dementin, S.; Holzinger, M.; Rousset, M.; Cosnier, S. *Int. J. Hydrog. Energy* **2011**, *36* (19), 12096–12101.
- (176) Oughli, A. A.; Conzuelo, F.; Winkler, M.; Happe, T.; Lubitz, W.; Schuhmann, W.; Rüdiger, O.; Plumeré, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (42), 12329–12333.
- (177) Carlson, B. W.; Miller, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (2), 479–485.
- (178) Lobo, M. J.; Miranda, A. J.; Tuñón, P. *Electroanalysis* **1997**, *9* (3), 191–202.
- (179) Ghindilis, A. L.; Atanasov, P.; Wilkins, E. *Electroanalysis* **1997**, *9* (9), 661–674.
- (180) Sugiyama, T.; Goto, Y.; Matsumoto, R.; Sakai, H.; Tokita, Y.; Hatazawa, T. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26* (2), 452–457.
- (181) Cosnier, S.; Fontecave, M.; Innocent, C.; Niviere, V. *Electroanalysis* **1997**, *9* (9), 685–688.
- (182) Degrand, C.; Miller, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (18), 5728–5732.
- (183) Goss, C. A.; Abruna, H. D. *Inorg. Chem.* **1985**, *24* (25), 4263–4267.
- (184) Jaegfeldt, H.; Kuwana, T.; Johansson, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (7), 1805–1814.
- (185) Geng, L.; Boguslavsky, L. I.; Kovalev, I. P.; Sahni, S. K.; Kalash, H.; Skotheim, T. A.; Lee, H. S.; Laurinavicius, V. *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11* (12), 1267–1275.
- (186) Catalin Popescu, I.; Domínguez, E.; Narváez, A.; Pavlov, V.; Katakis, I. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *464* (2), 208–214.
- (187) Reuillard, B.; Le Goff, A.; Cosnier, S. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (9), 4409–4415.
- (188) Klotzbach, T. L.; Watt, M.; Ansari, Y.; Minter, S. D. *J. Membr. Sci.* **2008**, *311* (1–2), 81–88.
- (189) Yan, Y.-M.; Yehezkeli, O.; Willner, I. *Chem. – Eur. J.* **2007**, *13* (36), 10168–10175.
- (190) O’Connell, M. J. *Carbon Nanotubes: Properties and Applications*; CRC Press, 2006.
- (191) Iijima, S. *Nature* **1991**, *354*, 56–58.
- (192) Radushkevich, L. V.; Lukyanovich, V. M. *Zurn Fis. Chim* **1952**, *26* (1), 88–95.
- (193) Bacon, R. *J. Appl. Phys.* **1960**, *31* (2), 283–290.
- (194) Iijima, S.; Ichihashi, T. *Nature* **1993**, *363* (6430), 603–605.
- (195) Baughman, R. H.; Zakhidov, A. A.; de Heer, W. A. *Science* **2002**, *297* (5582), 787–792.

- (196) Journet, C.; Maser, W. K.; Bernier, P.; Loiseau, A.; de la Chapelle, M. L.; Lefrant, S.; Deniard, P.; Lee, R.; Fischer, J. E. *Nature* **1997**, *388* (6644), 756–758.
- (197) Thess, A.; Lee, R.; Nikolaev, P.; Dai, H.; Petit, P.; Robert, J.; Xu, C.; Lee, Y. H.; Kim, S. G.; Rinzler, A. G.; Colbert, D. T.; Scuseria, G. E.; Tomanek, D.; Fisher, J. E.; Smalley, R. *Science* **1996**, *273*, 483–487.
- (198) Flahaut, E.; Laurent, C.; Peigney, A. *Carbon* **2005**, *43* (2), 375–383.
- (199) Valcárcel, M.; Cárdenas, S.; Simonet, B. M. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (13), 4788–4797.
- (200) Hou, P. X.; Bai, S.; Yang, Q. H.; Liu, C.; Cheng, H. M. *Carbon* **2002**, *40* (1), 81–85.
- (201) Schnorr, J. M.; Swager, T. M. *Chem. Mater.* **2011**, *23* (3), 646–657.
- (202) Ausman, K. D.; Piner, R.; Lourie, O.; Ruoff, R. S.; Korobov, M. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (38), 8911–8915.
- (203) Vaisman, L.; Wagner, H. D.; Marom, G. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *128-130*, 37–46.
- (204) Lee, S. W.; Yabuuchi, N.; Gallant, B. M.; Chen, S.; Kim, B.-S.; Hammond, P. T.; Shao-Horn, Y. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5* (7), 531–537.
- (205) Signorelli, R.; Ku, D. C.; Kassakian, J. G.; Schindall, J. E. *Proc. IEEE* **2009**, *97* (11), 1837–1847.
- (206) Gooding, J. J. *Electrochimica Acta* **2005**, *50* (15), 3049–3060.
- (207) Trojanowicz, M. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2006**, *25* (5), 480–489.
- (208) Chen, J.; Zheng, X.; Miao, F.; Zhang, J.; Cui, X.; Zheng, W. *J. Appl. Electrochem.* **2012**, *42* (10), 875–881.
- (209) Kihara, T.; Liu, X.-Y.; Nakamura, C.; Park, K.-M.; Han, S.-W.; Qian, D.-J.; Kawasaki, K.; Zorin, N. A.; Yasuda, S.; Hata, K.; Wakayama, T.; Miyake, J. *Int. J. Hydrog. Energy* **2011**, *36* (13), 7523–7529.
- (210) Tasca, F.; Harreither, W.; Ludwig, R.; Gooding, J. J.; Gorton, L. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (8), 3042–3049.
- (211) Hu, L.; Hecht, D. S.; Grüner, G. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (10), 5790–5844.
- (212) Zhu, Z. G.; Garcia-Gancedo, L.; Chen, C.; Zhu, X. R.; Xie, H. Q.; Flewitt, A. J.; Milne, W. I. *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, *178*, 586–592.
- (213) Matarredona, O.; Rhoads, H.; Li, Z.; Harwell, J. H.; Balzano, L.; Resasco, D. E. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (48), 13357–13367.
- (214) Star, A.; Stoddart, J. F.; Steuerman, D.; Diehl, M.; Boukai, A.; Wong, E. W.; Yang, X.; Chung, S.-W.; Choi, H.; Heath, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (9), 1721–1725.
- (215) Wu, Z.; Chen, Z.; Du, X.; Logan, J. M.; Sippel, J.; Nikolou, M.; Kamaras, K.; Reynolds, J. R.; Tanner, D. B.; Hebard, A. F.; Rinzler, A. G. *Science* **2004**, *305* (5688), 1273–1276.
- (216) Zhang, M.; Fang, S.; Zakhidov, A. A.; Lee, S. B.; Aliev, A. E.; Williams, C. D.; Atkinson, K. R.; Baughman, R. H. *Science* **2005**, *309* (5738), 1215–1219.
- (217) Fuchsberger, K.; Goff, A. L.; Gambazzi, L.; Toma, F. M.; Goldoni, A.; Giugliano, M.; Stelzle, M.; Prato, M. *Small* **2011**, *7* (4), 524–530.
- (218) Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (3), 1105–1136.
- (219) Karousis, N.; Tagmatarchis, N.; Tasis, D. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (9), 5366–5397.
- (220) Zhao, Y.-L.; Stoddart, J. F. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (8), 1161–1171.
- (221) Gavrel, G.; Jusselme, B.; Filoramo, A.; Campidelli, S. In *Making and Exploiting Fullerenes, Graphene, and Carbon Nanotubes*; Marcaccio, M., Paolucci, F., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; Vol. 348, pp 95–126.

- (222) Chen, R. J.; Zhang, Y.; Wang, D.; Dai, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (16), 3838–3839.
- (223) Ramasamy, R. P.; Luckarift, H. R.; Ivnitski, D. M.; Atanassov, P. B.; Johnson, G. R. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (33), 6045.
- (224) Goff, A. L.; Moggia, F.; Debou, N.; Jegou, P.; Artero, V.; Fontecave, M.; Jusselme, B.; Palacin, S. *J. Electroanal. Chem.* **2010**, *641* (1–2), 57–63.
- (225) Zhao, Y.-L.; Hu, L.; Stoddart, J. F.; Grüner, G. *Adv. Mater.* **2008**, *20* (10), 1910–1915.
- (226) Tran, P. D.; Le Goff, A.; Heidkamp, J.; Jusselme, B.; Guillet, N.; Palacin, S.; Dau, H.; Fontecave, M.; Artero, V. *Angew. Chem.* **2011**, *123* (6), 1407–1410.
- (227) Wang, J.; Musameh, M.; Lin, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (9), 2408–2409.
- (228) Zhang, M.; Smith, A.; Gorski, W. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (17), 5045–5050.
- (229) Miyake, T.; Haneda, K.; Nagai, N.; Yatagawa, Y.; Onami, H.; Yoshino, S.; Abe, T.; Nishizawa, M. *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4* (12), 5008.
- (230) Chen, M. Y.; Chen, X. D.; Wu, X. E. *Chem. Lett.* **2014**, *43* (7), 1081–1083.
- (231) Cosnier, S.; Holzinger, M. *Electrochimica Acta* **2008**, *53* (11), 3948–3954.
- (232) Singh, P.; Campidelli, S.; Giordani, S.; Bonifazi, D.; Bianco, A.; Prato, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (8), 2214.
- (233) Xing, Y.; Li, L.; Chusuei, C. C.; Hull, R. V. *Langmuir* **2005**, *21* (9), 4185–4190.
- (234) Srivastava, D.; Brenner, D. W.; Schall, J. D.; Ausman, K. D.; Yu, M.; Ruoff, R. S. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (21), 4330–4337.
- (235) Chen, J.; Hamon, M. A.; Hu, H.; Chen, Y.; Rao, A. M.; Eklund, P. C.; Haddon, R. C. *Science* **1998**, *282* (5386), 95–98.
- (236) Holzinger, M.; Vostrowsky, O.; Hirsch, A.; Hennrich, F.; Kappes, M.; Weiss, R.; Jellen, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (21), 4002–4005.
- (237) Holzinger, M.; Abraham, J.; Whelan, P.; Graupner, R.; Ley, L.; Hennrich, F.; Kappes, M.; Hirsch, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (28), 8566–8580.
- (238) Tagmatarchis, N.; Prato, M. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14* (4), 437.
- (239) Delamar, M.; Hitmi, R.; Pinson, J.; Saveant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (14), 5883–5884.
- (240) Allongue, P.; Delamar, M.; Desbat, B.; Fagebaume, O.; Hitmi, R.; Pinson, J.; Savéant, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (1), 201–207.
- (241) Bahr, J. L.; Yang, J.; Kosynkin, D. V.; Bronikowski, M. J.; Smalley, R. E.; Tour, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (27), 6536–6542.
- (242) Bahr, J. L.; Tour, J. M. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (11), 3823–3824.
- (243) Boland, S.; Barrière, F.; Leech, D. *Langmuir* **2008**, *24* (12), 6351–6358.
- (244) Schmidt, G.; Gallon, S.; Esnouf, S.; Bourgoin, J.-P.; Chenevier, P. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15* (9), 2101–2110.
- (245) McCreery, R. L. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (7), 2646–2687.
- (246) Filip, J.; Tkac, J. *Electrochimica Acta* **2014**, *136*, 340–354.
- (247) Shan, C.; Yang, H.; Song, J.; Han, D.; Ivaska, A.; Niu, L. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (6), 2378–2382.
- (248) Liu, K.; Zhang, J.; Yang, G.; Wang, C.; Zhu, J.-J. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12* (3), 402–405.
- (249) Pumera, M. *Chem. Rec.* **2012**, *12* (1), 201–213.

- (250) Brownson, D. A. C.; Lacombe, A. C.; Gómez-Mingot, M.; Banks, C. E. *RSC Adv* **2012**, *2* (2), 665–668.
- (251) Brownson, D. A. C.; Munro, L. J.; Kampouris, D. K.; Banks, C. E. *RSC Adv* **2011**, *1* (6), 978.
- (252) Kampouris, D. K.; Banks, C. E. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (47), 8986.
- (253) Güell, A. G.; Ebejer, N.; Snowden, M. E.; Macpherson, J. V.; Unwin, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (17), 7258–7261.
- (254) Le Goff, A.; Reuillard, B.; Cosnier, S. *Langmuir* **2013**, *29* (27), 8736–8742.
- (255) Choi, W.; Lahiri, I.; Seelaboyina, R.; Kang, Y. S. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2010**, *35* (1), 52–71.
- (256) Paulus, G. L. C.; Wang, Q. H.; Strano, M. S. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (1), 160–170.
- (257) Bekyarova, E.; Itkis, M. E.; Ramesh, P.; Berger, C.; Sprinkle, M.; de Heer, W. A.; Haddon, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (4), 1336–1337.
- (258) Krishna, K. V.; Ménard-Moyon, C.; Verma, S.; Bianco, A. *Nanomed.* **2013**, *8* (10), 1669–1688.
- (259) Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. *Electrochimica Acta* **2012**, *82*, 179–190.
- (260) Zuo, X.; He, S.; Li, D.; Peng, C.; Huang, Q.; Song, S.; Fan, C. *Langmuir* **2010**, *26* (3), 1936–1939.
- (261) Yehezkeli, O.; Tel-Vered, R.; Raichlin, S.; Willner, I. *ACS Nano* **2011**, *5* (3), 2385–2391.
- (262) Matsumura, H.; Ortiz, R.; Ludwig, R.; Igarashi, K.; Samejima, M.; Gorton, L. *Langmuir* **2012**, *28* (29), 10925–10933.
- (263) Wang, X.; Falk, M.; Ortiz, R.; Matsumura, H.; Bobacka, J.; Ludwig, R.; Bergelin, M.; Gorton, L.; Shleev, S. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *31* (1), 219–225.
- (264) Falk, M.; Andoralov, V.; Blum, Z.; Sotres, J.; Suyatin, D. B.; Ruzgas, T.; Arnebrant, T.; Shleev, S. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *37* (1), 38–45.
- (265) Falk, M.; Blum, Z.; Shleev, S. *Electrochimica Acta* **2012**, *82*, 191–202.
- (266) Lesniewski, A.; Paszewski, M.; Opallo, M. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12* (3), 435–437.
- (267) Reuillard, B.; Le Goff, A.; Agnès, C.; Holzinger, M.; Zebda, A.; Gondran, C.; Elouarzaki, K.; Cosnier, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (14), 4892.
- (268) Vincent, K. A.; Cracknell, J. A.; Clark, J. R.; Ludwig, M.; Lenz, O.; Friedrich, B.; Armstrong, F. A. *Chem. Commun.* **2006**, No. 48, 5033.
- (269) Cinquin, P.; Gondran, C.; Giroud, F.; Mazabrard, S.; Pellissier, A.; Boucher, F.; Alcaraz, J.-P.; Gorgy, K.; Lenouvel, F.; Mathé, S.; Porcu, P.; Cosnier, S. *PLoS ONE* **2010**, *5* (5), e10476.
- (270) Szczupak, A.; Halámek, J.; Halámková, L.; Bocharova, V.; Alfonta, L.; Katz, E. *Energy Environ. Sci.* **2012**, *5* (10), 8891.
- (271) Halámková, L.; Halámek, J.; Bocharova, V.; Szczupak, A.; Alfonta, L.; Katz, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (11), 5040–5043.
- (272) Shoji, K.; Akiyama, Y.; Suzuki, M.; Hoshino, T.; Nakamura, N.; Ohno, H.; Morishima, K. *Biomed. Microdevices* **2012**, *14* (6), 1063–1068.
- (273) MacVittie, K.; Halámek, J.; Halámková, L.; Southcott, M.; Jemison, W. D.; Lobel, R.; Katz, E. *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6* (1), 81–86.
- (274) Zebda, A.; Cosnier, S.; Alcaraz, J.-P.; Holzinger, M.; Le Goff, A.; Gondran, C.; Boucher, F.; Giroud, F.; Gorgy, K.; Lamraoui, H.; Cinquin, P. *Sci. Rep.* **2013**, *3*.
- (275) Xu, L.; Armstrong, F. A. *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6* (7), 2166.
- (276) Katz, E.; Willner, I.; Kotlyar, A. B. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *479* (1), 64–68.

- (277) Soukharev, V.; Mano, N.; Heller, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (27), 8368–8369.
- (278) Fapyane, D.; Lee, S.-J.; Kang, S.-H.; Lim, D.-H.; Cho, K.-K.; Nam, T.; Ahn, J.-P.; Ahn, J.-H.; Kim, S.-W.; Chang, I. S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (24), 9508.
- (279) Kwon, C. H.; Lee, S.-H.; Choi, Y.-B.; Lee, J. A.; Kim, S. H.; Kim, H.-H.; Spinks, G. M.; Wallace, G. G.; Lima, M. D.; Kozlov, M. E.; Baughman, R. H.; Kim, S. J. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3928.

Chapitre II – Biocathodes enzymatique à base de Laccase pour la réduction d'O₂

I- GENERALITES.....	69
I.1 AMELIORATION DU DET DE LA LACCASE	69
I.2 ORIENTATION ET CONNEXION DIRECTE DE LA LACCASE SUR CNTS FONCTIONNALISES	71

A- Fonctionnalisation non covalente de MWCNTs pour l'immobilisation et l'orientation de la laccase Tv

I- FONCTIONNALISATION NON-COVALENTE DE MWCNTS PAR UN POLYMERE ORGANIQUE	74
I.1 PRINCIPE ET CARACTERISATION DU POLYMERE ORGANIQUE	74
I.2 ELABORATION DES BIOCATHODES ET CATALYSE ENZYMATIQUE DE LA REDUCTION D' O ₂	77
I.3 OPTIMISATION DE LA QUANTITE DE POLYMERE ELECTRODEPOSEE.....	78
II- FONCTIONNALISATION COVALENTE D'OXYDE DE GRAPHENE REDUIT (RGO) PAR DES GROUPEMENTS ANTHRAQUINONES	80
II.1 FONCTIONNALISATION COVALENTE D'OXYDE DE GRAPHENE REDUIT	81
II.2 CARACTERISATION DU F-RGO	82
II.3 ELABORATION DES BIOCATHODES	86
III- FONCTIONNALISATION NON COVALENTE DE MWCNTS PAR UN DERIVE PYRENE-ADAMANTANE	89
III.1 IMMOBILISATION D'UN DERIVE PYRENE-ADAMANTANE SUR UNE MATRICE DE MWCNTS	89
II.2 ELABORATION DE LA BIOCATHODE MWCNTS/PYR-ADA/LAC	91
IV- EVALUATION DE LA STABILITE DES BIOELECTRODES.....	93
V- ETUDES THEORIQUES ET RATIONALISATION DES PERFORMANCES	93
V.1 MODELISATION ELECTROCHIMIQUE	93
V.2 MODELISATION MOLECULAIRE	98

B- Fonctionnalisation supramoléculaire de MWCNTs par des laccases modifiées spécifiquement à la surface par des groupements pyrènes

I- INGENIERIE DE LA LACCASE <i>TRAMETES SP. C30</i>	104
II- REDUCTION DU DIOXYGENE PAR DES BIOCATHODES A BASE DE MWCNTS ET DE LACCASE-PYRENE	106
II.1 ELABORATION DES BIOCATHODES	106
II.1 REDUCTION BIOELECTROCATALYTIQUE DE O ₂	106
III- MODELISATION ELECTROCHIMIQUE DES ELECTRODES MWCNTS ET MWCNTS/AUNPS.....	109
III.1 MODELISATION DES ELECTRODES MWCNTS.....	109
III.2 MODELISATION DES ELECTRODES MWCNTS/AUNPS.....	111
IV- CONCLUSION DU CHAPITRE II	114

I- Généralités

La laccase (Lac) est l'une des plus anciennes protéines pour laquelle un DET a été obtenu pour la réduction de O_2 .¹ Plusieurs Lac ont particulièrement été étudiées, notamment les Lac fongiques de *Trametes hirsuta* (Lac Th) et de *Trametes versicolor* (Lac Tv). Ces laccases ont l'avantage d'avoir un potentiel plus élevé du centre cuivre T1, comparé à celui d'autres Lac.² En utilisant ces enzymes comme catalyseurs, l'oxygène peut donc être réduit à haut potentiel (0,6 V vs. ECS) si le DET à l'électrode est efficace. En effet, le centre T1 ; qui est responsable de la réponse électrochimique de la Lac ; est proche de la surface de la protéine. Lorsque il est suffisamment proche de la surface de l'électrode ; à une distance maximale d'environ 2,5 nm ;³ un DET est observé à un potentiel proche de celui du centre T1.⁴ De plus, d'un point de vue pratique, l'absence de médiateur redox simplifie la fabrication des biocathodes et supprime les problèmes de stabilité liés au « relargage » du médiateur en solution.

Depuis les premiers travaux en 1979 de Tarasevich et al.,¹ diverses études ont fait état de la connexion en DET de la laccase sur divers matériaux d'électrodes. Elle a notamment été greffée sur des électrodes d'or modifiées,^{5,6} ou simplement adsorbée sur divers matériaux carbonés.^{7,8} Néanmoins, ces approches ne permettent pas de contrôler l'orientation de l'enzyme, ce qui se traduit par l'obtention de faibles densités de courant de réduction d' O_2 .

I.1 Amélioration du DET de la laccase

I.1.1 Contrôle de l'orientation de l'enzyme à la surface de l'électrode

La résolution de la structure cristalline de la Lac Tv en 2002^{9,10} a grandement aidé à la compréhension des phénomènes qui gouvernent l'immobilisation et la connexion du centre T1 à l'électrode. Il a été démontré, qu'à proximité du centre mononucléaire T1 responsable du transfert d'électron entre l'électrode et l'enzyme, se trouvait la poche de fixation du substrat. Il s'agit d'une large cavité hydrophobe (dimension approximative 10×10×20 Å), riche en acides aminés hydrophobes tels que la phénylalanine et la leucine où une grande variété de substrats organiques peut se lier et y subir une oxydation rapide à un électron.¹¹

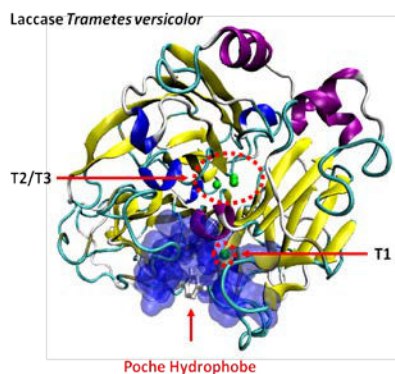


Figure 1 : Structure cristalline de la Lac Tv complexée à une arylamine. (PDB 1KYA)

En 2007, Armstrong et al. ont tiré avantage de cette cavité hydrophobe pour immobiliser et orienter la laccase *Pycnoporus cinnabarinus* (84 % d'homologie de séquence avec *Tv*) sur une électrode de graphite modifiée par l'antracène.⁴ Cette stratégie a permis l'immobilisation stable d'une grande quantité d'enzymes ; via des interactions hydrophobes entre la cavité et l'antracène ; dans une orientation favorable au DET.¹² En effet, une large augmentation du courant de réduction a été observée, passant de -0,2 à -0,6 mA cm⁻² à 0,2 V vs. ECS.

I.1.2 Nanostructuration de l'électrode par des CNTs

Outre l'orientation de l'enzyme, l'utilisation de nanomatériaux comme les nanotubes de carbone permet aussi d'améliorer le DET. En effet, grâce à leur dimension nanométrique, ils peuvent s'approcher suffisamment près du centre redox responsable de la réponse électrochimique pour jouer le rôle de nanofils conducteurs afin de connecter l'enzyme tout en permettant le développement d'une large surface spécifique conductrice.^{13,14} Dans ce contexte, et suite à l'augmentation des connaissances des propriétés de ces matériaux, ils sont devenus des matériaux de choix pour la connexion directe de laccases.¹⁵

Beaucoup d'études ont porté sur l'incorporation de la Lac au sein de matrice de CNTs pour la conception de biocathodes performantes. Le piégeage de la laccase au sein d'une forêt de CNTs s'est montré être une approche très efficace, et a permis l'élaboration d'une biocathode générant une densité de courant de -2 mA cm⁻² à -45 mV vs. ECS dans du tampon pH 5 saturé en O₂.¹⁶ Une autre approche a été la compression d'un mélange de laccases et de MWCNTs afin de former des pastilles. Ces électrodes 3D délivrent une densité de courant maximal de -3,7 mA cm⁻² à 0 V vs. ECS.¹⁷ Enfin, d'autres stratégies ont utilisé des polymères ; tels que le Nafion ou la poly-L-Lysine ; pour stabiliser la connexion et l'immobilisation de la Lac au sein d'un film de CNTs.^{18,19}

Le greffage covalent de la Lac à la surface des CNTs a aussi été étudié via la fonctionnalisation préalable des CNTs par des fonctions ester activés (NHS) ou d'aminophenyls ; illustrées en figure 2. Le pyr-NHS pour fonctionnaliser les CNTs et immobiliser coalement la laccase a largement été employé.²⁰⁻²⁴ En 2012, Gutiérrez-Sanchez et al. ont comparé différentes méthodes de liaison de la Lac sur des CNTs fonctionnalisés coalement par des groupements aminophenyls (Figure 2). Un lien covalent amide peut être créé avec les résidus acides carboxyliques de l'enzyme et imines avec les résidus aldéhydes obtenus lors de l'oxydation des résidus glycosylés.²⁵ D'importantes densités de courant bioélectrocatalytique de réduction d'O₂ ont été obtenues pour toutes ces bioélectrodes à base de laccase. La formation d'un lien imine a été particulièrement efficace avec une densité de courant de catalyse de -1,5 mA cm⁻² à -45 mV vs. ECS (pH 4,2, 1000 rpm, sous O₂).

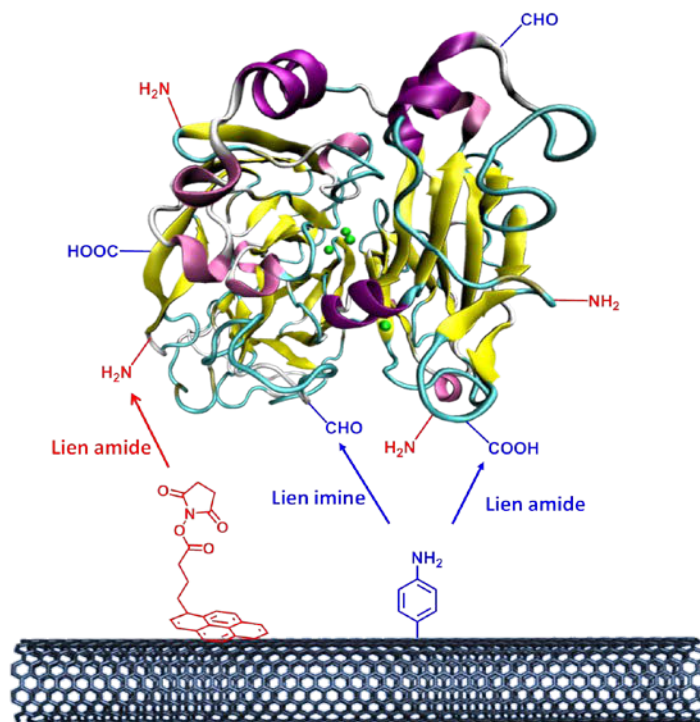


Figure 2 : Fonctionnalisation covalente (bleu) et non covalente (rouge) pour l'immobilisation covalente de la Lac à la surface de CNTs

I.2 Orientation et connexion directe de la laccase sur CNTs fonctionnalisés

Comme décrit précédemment, l'utilisation de CNTs comme matériaux d'électrode permet de développer de large surface spécifique conductrice favorable à l'immobilisation et à la connexion de Lac. De plus, ces plateformes sont facilement fonctionnalisables suivant divers procédés (Cf. l'étude bibliographique) afin d'améliorer l'orientation et donc le DET de l'enzyme à la surface de l'électrode. Récemment, la modification covalente de CNTs par diverses molécules aromatiques telles que l'antraquinone, le naphthalène ou l'anthracène a été réalisée pour orienter la laccase via sa poche hydrophobe. Les nanotubes ont été fonctionnalisés suivant divers approches covalentes comme l'amination réductrice,²⁶ la chimie des sels d'aryldiazonium,²⁷⁻²⁹ ou l'amidation des défauts acides carboxyliques présents sur la paroi des CNTs³⁰ (Figure 3). Ces biocathodes se sont avérées particulièrement efficaces pour réduire le dioxygène. Par exemple, la biocathode basée sur des anthraquinone-CNTs fonctionnalisés par amination réductrice délivre une densité de courant maximal de $-3,5 \text{ mA cm}^{-2}$ à $0,3 \text{ V vs. ECS}$ (2500 rpm et sous O_2).²⁶

Néanmoins, comparée à la fonctionnalisation covalente des CNTs, la fonctionnalisation non covalente des CNTs via des méthodes plus rapides et faciles est particulièrement intéressante pour préserver les propriétés physiques et électroniques des CNTs (Figure 3). De plus, une fonctionnalisation plus uniforme des CNTs peut ainsi être obtenue par rapport à la fonctionnalisation covalente qui cible préférentiellement les défauts des CNTs.

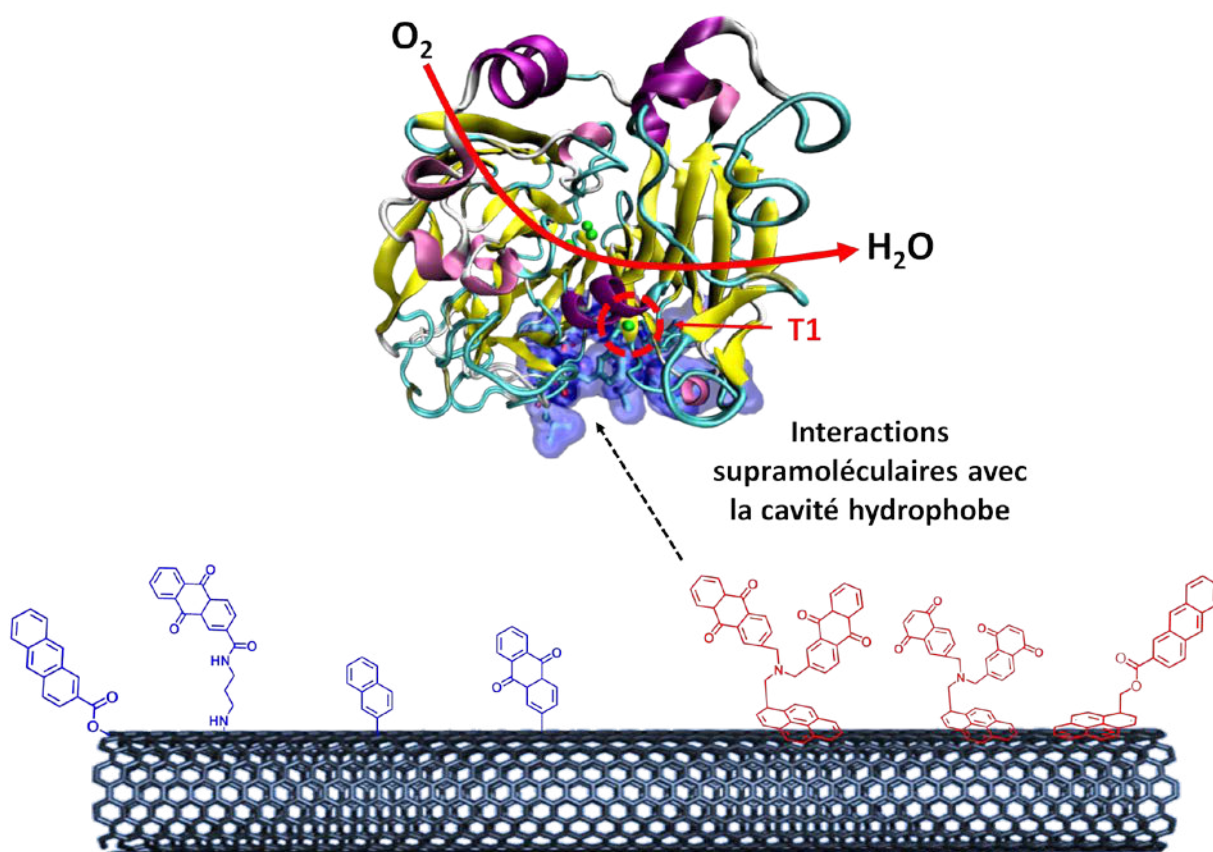


Figure 3 : Différentes approches de fonctionnalisation covalente (bleu) et non covalente (rouge) de CNTs par des groupements aromatiques hydrophobes pour l'immobilisation orientée de la laccase

La première fonctionnalisation non covalente de CNTs pour l'immobilisation de la laccase a été développée au laboratoire.³¹ Un nouveau dérivé pyrène portant deux groupements anthraquinones a été synthétisé. Le groupement pyrène permet la fonctionnalisation des CNTs via des interactions « π - π stacking » fortes, tandis que l'antraquinone interagit avec la cavité hydrophobe de l'enzyme. Cette méthode a permis l'élaboration d'une biocathode efficace délivrant une densité de courant maximal de -1 mA cm^{-2} à $0,2 \text{ V vs. ECS}$ dans du tampon pH 5 saturé en O_2 . Cette stratégie a par la suite été reprise par Giroud et al. qui ont synthétisé de nouveaux dérivés pyrènes portant deux groupements naphtoquinones³² ou un anthracène³³ (Figure 3). Ces biocathodes délivrent respectivement $-0,12 \text{ mA cm}^{-2}$ et $-0,5 \text{ mA cm}^{-2}$ à 0 V vs. ECS dans du tampon pH 4,5 sous air et sous saturation en O_2 respectivement.

Cependant, les groupements hydrophobes plans utilisés pour orienter la laccase sont aussi capables d'interagir avec la paroi des CNTs ; diminuant ainsi le nombre de « sites » disponibles pour orienter et immobiliser l'enzyme. En effet, il y a alors compétition entre l'interaction avec l'enzyme et la paroi des CNTs. Dans ce contexte, nous avons cherché à développer d'autres stratégies de fonctionnalisation non covalente des CNTs pour connecter en DET la Lac commerciale de *Tv*. La première partie de ce chapitre est consacrée à la fonctionnalisation non covalente de CNTs par des molécules qui entrent moins (ou pas) en compétition avec la paroi des CNTs.

Une étude théorique basée sur la modélisation électrochimique et la modélisation moléculaire a été réalisée afin de rationaliser les performances des différentes biocathodes élaborées. Dans la deuxième partie de ce chapitre, une autre approche a été élaborée en coopération avec le Dr. Thierry Tron et le Dr. Pierre Rousselot-Pailley de l'iSm2 (Institut des Sciences Moléculaire de Marseille). La laccase *sp.C30* a été produite et spécifiquement modifiée par un groupement pyrène proche du centre T1 ou du TNC. L'influence de la connexion de l'enzyme via son centre T1 ou son cluster T2/T3 à la surface d'électrodes de MWCNTs et MWCNTs/AuNPs a été étudiée.

Tous les résultats expérimentaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés sur au moins trois électrodes pour vérifier la reproductibilité de la mesure.

A- Fonctionnalisation non covalente de MWCNTs pour l'immobilisation et l'orientation de la laccase Tv

I- Fonctionnalisation non-covalente de MWCNTs par un polymère organique

I.1 Principe et caractérisation du polymère organique

Dans l'optique de développer une méthode reproductible d'immobilisation de la laccase sur nanosurface, avec une résolution spatiale bien précise, la fonctionnalisation de MWCNTs via l'électrogénération d'un polypyrrole modifié par une fonction pyrène a été envisagée (Figure 4). Nous avons d'une part émis l'hypothèse que le pyrène se comporte de la même manière envers la cavité hydrophobe de l'enzyme, que les composés aromatiques précédemment cités pour l'orientation et l'immobilisation de la Lac. De plus, la fonction pyrrole permet l'électrogénération contrôlée d'un polymère à la surface des nanotubes de carbone sans en détruire la paroi externe. Cette méthode permet ainsi d'obtenir, une fonctionnalisation non covalente des MWCNTs contrôlée, stable et uniforme.

Les électrodes de MWCNTs ont été élaborées en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les MWCNTs ont été dispersés dans du N-méthyl-2-pyrrolidinone (NMP) à 5 mg mL^{-1} jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Ensuite, $20 \mu\text{L}$ de cette solution ont été déposés à la surface d'électrodes de carbone vitreux (GC), puis séchés sous vide. Cette méthode permet l'obtention de films de MWCNTs stables et reproductibles, d'une épaisseur de l'ordre de $5 \mu\text{m}$.

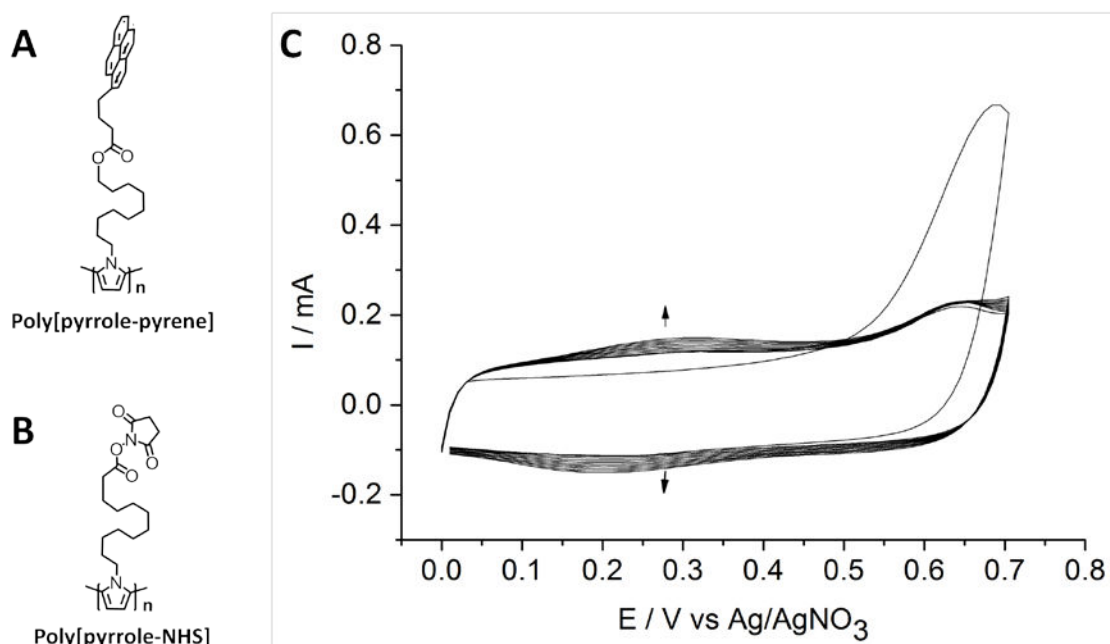


Figure 4: Représentation schématique du polymère électrogénéré sur MWCNTs. A) Poly(pyrrole-pyrène) B) Poly(pyrrole-NHS) ; C) Électropolymérisation caractéristique des dérivés pyrroles sur électrodes de MWCNTs, par voltammétrie cyclique de 0 à 0,7 V vs. Ag/AgNO₃ ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, 0.1 M TBAP dans MeCN)

Afin de comparer les propriétés d'accroche et de transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode en fonction de la stratégie d'immobilisation, un dérivé pyrrole portant à son extrémité un ester activé N-hydroxysuccinimide (NHS) a aussi été utilisé. Contrairement au dérivé pyrène qui permet une immobilisation par interaction supramoléculaire avec l'enzyme, le dérivé NHS forme un lien covalent amide avec les groupements NH_2 libres à la surface de celle-ci. L'enzyme est immobilisée sans favoriser une orientation privilégiée comme l'illustre la figure 5. Les monomères pyrrole-pyrène et pyrrole-NHS ont été synthétisés comme décrit précédemment.^{34,35}

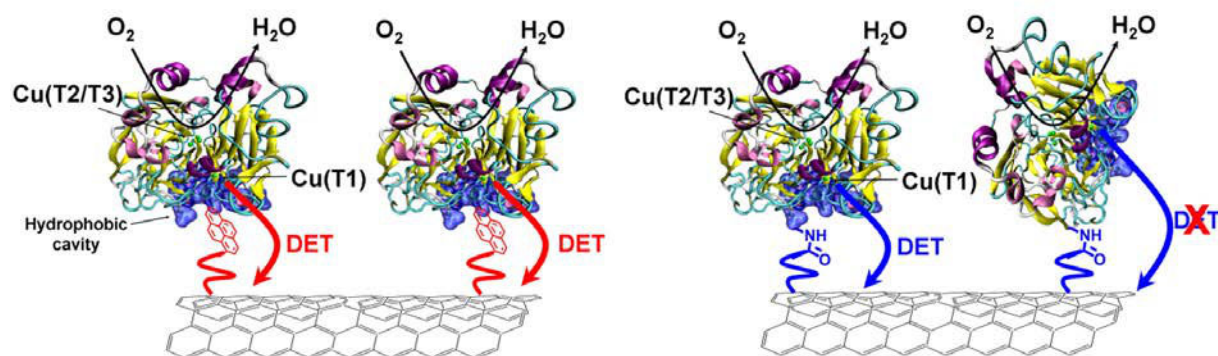


Figure 5 : Représentation schématique de l'orientation favorable de la laccase sur MWCNTs fonctionnalisés par le poly(pyrrole-pyrène) en rouge comparé au greffage covalent sur le poly(pyrrole-NHS) en bleu

Suite à la formation du film de MWCNTs sur l'électrode, les dépôts ont été fonctionnalisés par l'électropolymérisation du monomère pyrrole-pyrène ou pyrrole-NHS à 1 mM dans une solution d'acétonitrile contenant 0,1 M de TBAP comme électrolyte support. La figure 4 montre une représentation schématique des deux polymères électrogénérés, ainsi qu'un voltammogramme classique de l'électropolymérisation des deux polymères. L'oxydation du monomère conduit à la formation d'un radical cation qui va réagir avec les autres monomères présents en solution pour former des oligomères puis des polymères. Le mécanisme de formation du polymère est illustré en figure 6. L'électrodéposition du polymère à l'électrode au fur et à mesure des balayages se manifeste par l'apparition et l'augmentation d'un pic réversible à $E_{\text{ox}} = 0,25 \text{ V vs. Ag/AgNO}_3$, correspondant à l'électroactivité du polypyrrole. L'augmentation de la conjugaison dans le polymère ainsi formé, entraîne une diminution du potentiel d'oxydation comparé à celui du monomère.³⁶ Ce système redox est accompagné d'un courant capacitif important qui provient de la grande surface spécifique apportée par les MWCNTs.

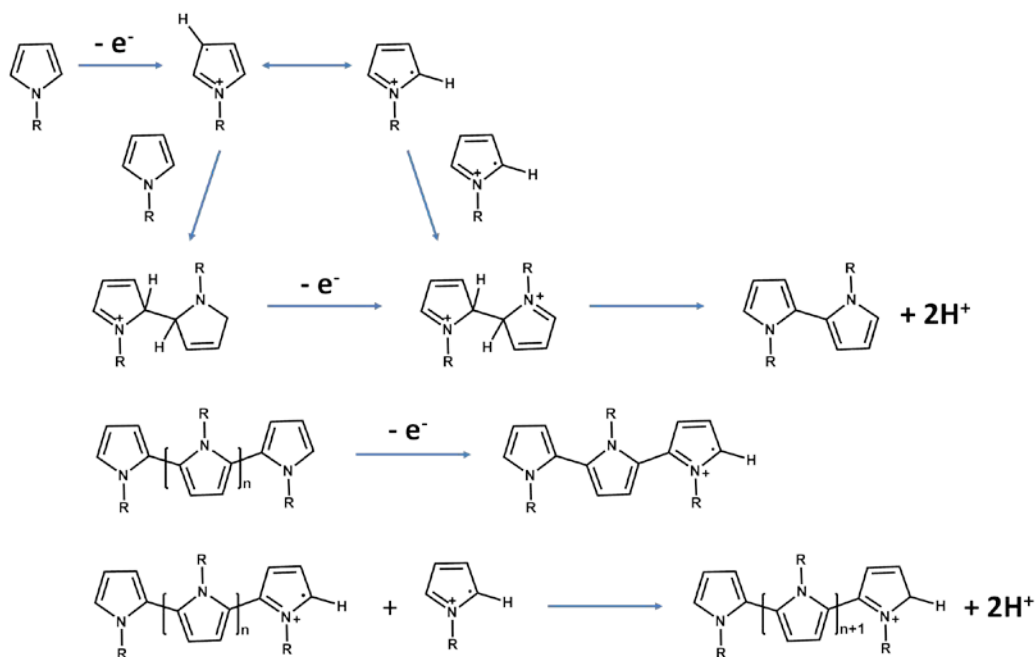


Figure 6 : Mécanisme d'électropolymérisation du pyrrole

Cette approche permet la déposition stable et uniforme d'un polymère présentant des fonctions libres pyrène ou NHS pour l'immobilisation de la laccase. Cependant, toutes les fonctions libres ne sont pas présentes à la surface du polymère, certaines sont enfouies à l'intérieur du polymère et donc non accessibles pour l'enzyme.

La figure 7 montre des clichés obtenus par microscopie électronique à balayage (MEB) pour des électrodes de MWCNTs et de MWCNTs fonctionnalisées par le film de poly(pyrrole-pyrène) (P-Pyr). En comparant ces électrodes, avant et après électropolymérisation (Figure 7A et 7B), on observe une déposition homogène du polymère sur toute la surface des MWCNTs, qui possèdent un diamètre de l'ordre de 9-10 nm. La formation du polymère entraîne l'augmentation de 3 à 5 fois le diamètre apparent des nanotubes. Ces images soulignent également la conservation de la grande surface spécifique induite par le réseau de MWCNTs pour les électrodes MWCNTs/P-Pyr.

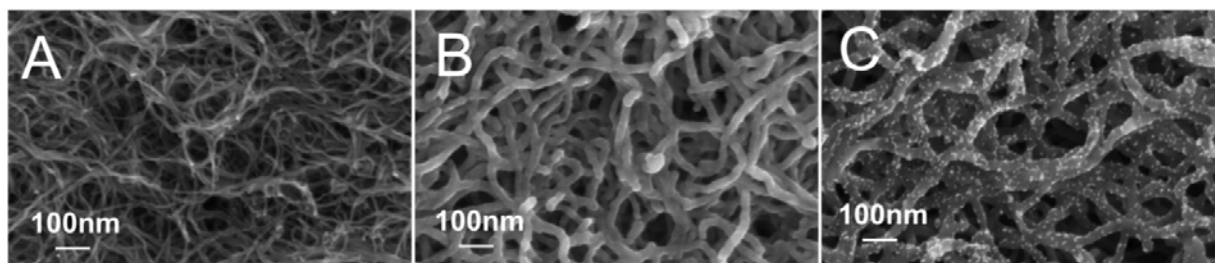


Figure 7 : Image MEB de A) électrode de MWCNTs seuls ; B) électrode de MWCNTs fonctionnalisés avec le poly(pyrrole-pyrène) et C) électrode de MWCNTs fonctionnalisés par le poly(pyrrole-pyrène) suivit de l'immobilisation de nanoparticules d'or modifiées par des β -cyclodextrines

Dans le but d'illustrer la capacité de ces MWCNTs fonctionnalisés par des groupements pyrènes à immobiliser des nano-objets par des interactions supramoléculaires hydrophobes,

des nanoparticules d'or modifiées par des β -cyclodextrines (β -CD-AuNPs) ont été utilisées pour mimer l'accroche de la laccase sur ce type d'électrode. Ces nanoparticules ont environ la même dimension que la laccase (3 nm de diamètre environ) et sont mieux visualisées par un faisceau d'électron que des protéines. La β -CD sert à mimer la poche hydrophobe de la laccase, et va donc interagir avec les groupements pyrènes à la surface du polymère.

Les électrodes MWCNTs/P-Pyr ont été incubées dans une solution aqueuse de β -CD-AuNPs puis soigneusement rincées. Les nanoparticules d'or apparaissent en MEB comme des petits points lumineux de quelques nanomètres de diamètre (Figure 7C). On observe que les β -CD-AuNPs recouvrent de manière homogène la couche de poly(pyrrole-pyrène). Ceci reflète les interactions fortes entre les groupements pyrènes à la surface des MWCNTs fonctionnalisés et la cavité β -cyclodextrine.³⁷ De plus, dans le cas d'électrodes fonctionnalisées uniquement par des MWCNTs, nous observons une immobilisation négligeable de ces AuNPs.

I.2 Elaboration des biocathodes et catalyse enzymatique de la réduction de O_2

Les électrodes de MWCNTs/Polypyrrole ont par la suite été utilisées pour l'immobilisation de la laccase *Tv* obtenue commercialement et utilisée sans purification préalable. Cette modification a été effectuée par simple incubation des électrodes dans une solution d'enzyme à 5 mg mL^{-1} dans du tampon phosphate (0,2 M TP, pH 5) pendant une nuit à 4°C . Pour les électrodes fonctionnalisées avec du poly(pyrrole-NHS), un tampon TP pH 7 a été utilisé pour permettre la formation du lien covalent. Suite à cette incubation, les électrodes sont rincées abondamment. Les propriétés catalytiques de ces biocathodes ont été évaluées par voltammétrie cyclique sous argon et sous oxygène (Figure 8). Pour estimer la contribution de la laccase adsorbée non spécifiquement à la surface de l'électrode, des électrodes de MWCNTs ont aussi été incubées avec l'enzyme.

En présence d'oxygène, on observe pour toutes ces bioélectrodes une vague de réduction d' O_2 , accompagnée d'un potentiel en circuit ouvert (OCP) de l'ordre de $0,6 \text{ V vs. ECS}$. Ce potentiel est proche de celui estimé pour le centre T1 de la laccase *Tv* ($E = 0,68 \text{ V}$ à pH 5),² témoignant de la connexion directe de l'enzyme via son centre T1. En prenant en compte la surface géométrique de l'électrode ($0,07 \text{ cm}^2$), la liaison covalente de l'enzyme sur le poly(pyrrole-NHS) permet d'obtenir une vague de réduction sous oxygène qui atteint un maximum de $-0,77 \text{ mA cm}^{-2}$ à 0 V vs. ECS , tandis que l'adsorption non spécifique de la laccase mène à une densité de courant de $-0,32 \text{ mA cm}^{-2}$ dans les mêmes conditions. A l'inverse, en utilisant l'approche supramoléculaire d'immobilisation de la laccase, la densité de courant est augmentée de 2,5 fois, atteignant une valeur maximale de $-1,85 \text{ mA cm}^{-2}$ pour des conditions identiques d'analyse. On observe aussi que l'OCP pour ces électrodes est particulièrement élevé, autour de $0,65 \text{ vs. ECS}$ (Figure 8). Ces résultats témoignent d'une meilleure connexion de l'enzyme via l'approche supramoléculaire visant la cavité

hydrophobe, comparée à celles mettant en jeu l'adsorption non spécifique ou le greffage covalent.

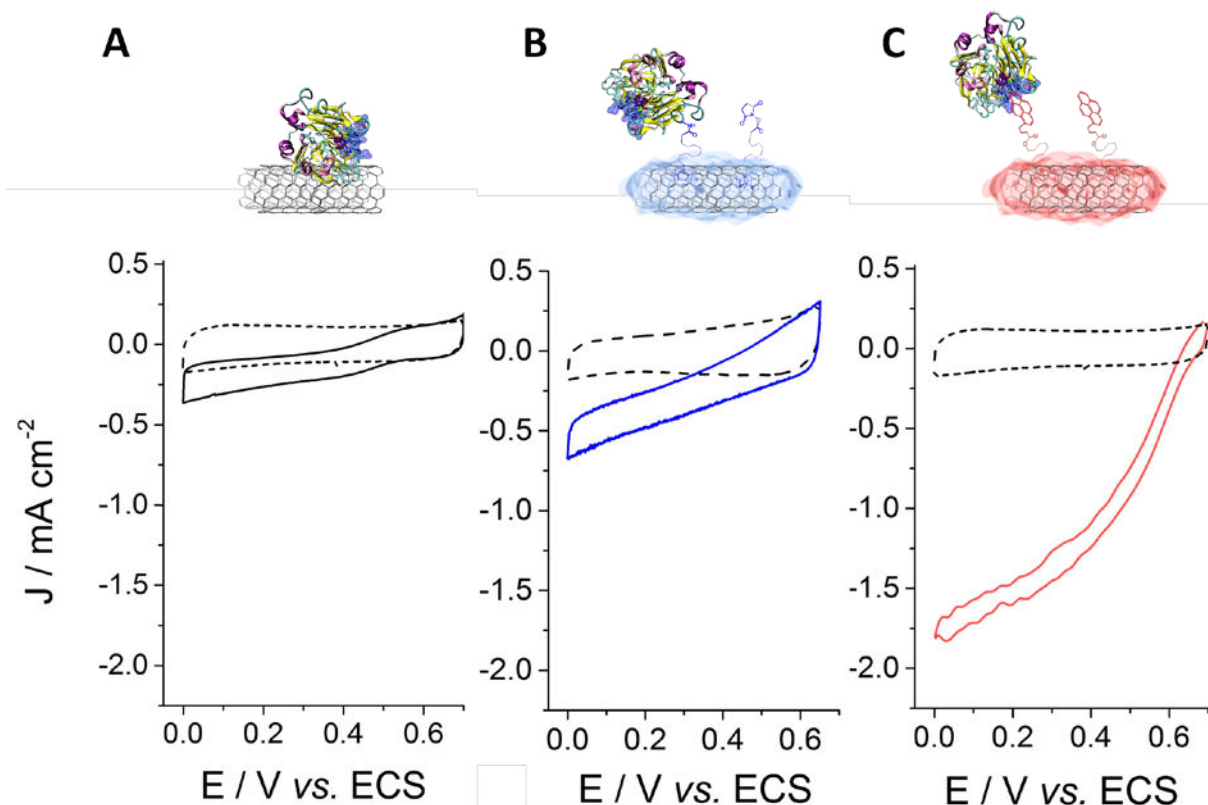


Figure 8 : Voltammétrie cyclique des électrodes de MWCNTs fonctionnalisées avec la laccase sous atmosphère saturée en argon (pointillé) et sous atmosphère saturée en oxygène (trait plein) pour A) MWCNTs/Lac ; B) MWCNTs/poly(pyrrole-NHS)/Lac ; C) MWCNTs/ poly(pyrrole-pyrène)/Lac dans TP (0,2 M, pH 5), $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$

L'un des inconvénients majeurs de la laccase est son inhibition par les ions chlorures présents dans l'organisme vivant, ce qui rend difficile une application *in vivo* pour des biocapteurs ou des biopiles. Il a été montré que lorsque l'enzyme est bien orientée à la surface de l'électrode, elle est plus résistante aux ions chlorures.³⁸ Toutes les électrodes ont donc été étudiées en présence de 150 mM d'ions chlorures en solution, ce qui correspond à la concentration dans le milieu physiologique. Lorsque l'enzyme n'est pas orientée à la surface de l'électrode, ce qui est le cas de la laccase adsorbée ou liée covalamment au poly(pyrrole-NHS), on observe une diminution importante de l'activité catalytique envers la réduction du dioxygène respectivement de 62 et 56 %. A contrario, lorsque l'enzyme est immobilisée par sa cavité hydrophobe, on observe une meilleure résistance aux ions chlorures, avec une diminution de 41 %.

I.3 Optimisation de la quantité de polymère électrodéposée

Pour connaître l'influence de l'épaisseur du film de polymère sur l'efficacité de la catalyse, différentes quantités de polymère ont été déposées. En effet, en contrôlant le nombre de scans effectués lors de la polymérisation, différentes épaisseurs de polymère peuvent être

déposées. La figure 9 montre l'effet du taux de recouvrement du P-Pyr sur les densités de courant de catalyse déterminées par chronoampérométrie.

Le taux de recouvrement réel (Γ) de l'électrode a été estimé à partir de l'électroactivité du polypyrrole selon l'équation 1.

$$\Gamma = \frac{Q_{\text{intégrée}}}{nFS} \quad (1)$$

Où, $Q_{\text{intégrée}}$ est la quantité d'électricité intégrée sous le signal du P-pyr après le transfert de l'électrode dans un électrolyte exempt de monomère, n le nombre d'électron échangé par le système (ici 0,33), F la constante de faraday et S la surface de l'électrode.

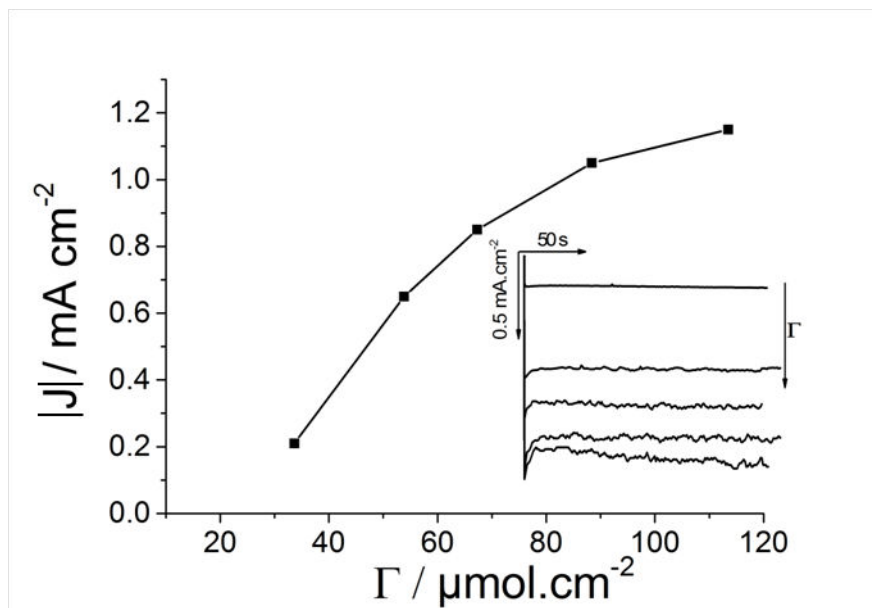


Figure 9 : Densité de courant des électrodes MWCNTs/P-Pyr/Lac en fonction du taux de recouvrement Γ . Insert : Réponse d'une décharge de 5 min par chronoampérométrie à $E_p = 0,2$ V vs. ECS dans du TP (0,2 M, pH 5) saturé en oxygène

On observe que la densité de courant augmente avec l'épaisseur du film jusqu'à atteindre un plateau correspondant à une polymérisation entre 60 et 80 scans ($200 - 250$ mC cm⁻²) et une densité de courant de $-1,2$ mA cm⁻² à $0,2$ V vs. ECS. Au-delà de cette quantité de polymère, la densité de courant chute significativement. L'augmentation de la quantité de polymère garantit un recouvrement maximal de la paroi des MWCNTs avec des groupements pyrènes, permettant ainsi d'optimiser leur interaction avec la laccase. Cependant, l'augmentation de l'épaisseur du film entraîne une perte de connexion directe quand le film devient trop épais et peu conducteur. L'épaisseur est bénéfique car on augmente la surface disponible pour immobiliser l'enzyme, mais cela peut être contrebalancé par la diminution de la conductivité du polypyrrole lorsque le film devient trop épais.

La laccase ancrée sur le film de poly(pyrrole-pyrène) montre un OCP plus élevé ($0,65$ V vs. ECS), un meilleur transfert d'électron entre le centre T1 et l'électrode, ainsi qu'une catalyse de la réduction du dioxygène plus efficace, et une meilleure résistance à l'inhibition par les

ions chlorures. De plus, les performances sont dépendantes de la quantité de polymère déposée à la surface de l'électrode. Ce comportement confirme sans ambiguïté que les laccases immobilisées sur ces électrodes sont très actives envers la réduction du dioxygène ; grâce à leur orientation favorable, stabilisée par l'interaction hydrophobe avec le pyrène.

Ce travail démontre la facilité de fonctionnalisation spatialement contrôlée des MWCNTs avec des groupements pyrènes pour l'immobilisation orientée de l'enzyme, grâce à l'utilisation d'un monomère de pyrrole modifié. Comme le montre les images MEB et l'électrochimie, l'interaction entre le pyrène et la cavité hydrophobe permet d'améliorer l'efficacité de la bioélectrocatalyse ainsi que sa stabilité (cf. IV). Néanmoins, toutes les enzymes à la surface de l'électrode ne sont pas connectées par cette fonctionnalisation. En effet, lorsque l'on ajoute en solution de l'ABTS qui est un médiateur redox de cette enzyme, on observe que la densité de courant est doublée. Nous nous sommes donc orientés vers d'autres stratégies de fonctionnalisation non covalente des MWCNTs, utilisant cette fois-ci le « π -stacking ».

II- Fonctionnalisation covalente d'oxyde de graphène réduit (RGO) par des groupements anthraquinones

Le graphène est très prometteur en chimie des matériaux, et sa fonctionnalisation par liaison covalente ou méthodes non covalentes devient un domaine de recherche en pleine croissance pour deux raisons principales : le contrôle de sa transformation sur surface, en solution, ou dans des matériaux mous, et la découverte de matériaux hybrides présentant de nouvelles propriétés physico-chimiques. Le graphène présente d'excellentes propriétés en termes de conductivité, de surface spécifique et de stabilité ; il est donc également envisagé en tant que matériaux d'électrodes pour l'électrocatalyse.³⁹ De récents travaux dans le domaine de l'électrochimie du graphène et de l'oxyde de graphène (GO) ont démontré que ce matériau est une nouvelle alternative pour les électrodes à base de matériaux carbonés.⁴⁰⁻⁴³ L'électrochimie est un outil puissant pour explorer l'effet de sa fonctionnalisation, la vraie nature des échantillons, ainsi que la cinétique de transfert d'électron de ces types de nanomatériaux.^{40,43-45}

Au vu de tous ces éléments, et en accord avec les études approfondies sur les nanotubes de carbone, le graphène peut lui aussi être fonctionnalisé de manière non covalente ou covalente ciblant les carbones sp^2 . Selon le type de groupement fonctionnel à greffer, différentes méthodes peuvent être employées. La fonctionnalisation par des aryles diazoniums développée pour les CNTs a déjà démontré sa capacité de fonctionnalisation du graphène produit par CVD^{46,47} et du RGO.^{48,49}

Les propriétés du graphène en tant que matériau d'électrode sont particulièrement dépendantes de son mode de production. Bien que les procédés CVD permettent d'obtenir des feuillets de graphène bien définis en taille et en nombre de feuillets (de 1 à plusieurs), ils

ne permettent pas de fabriquer des électrodes en quantité suffisante pour mener nos études en bioélectrochimie et ne fournissent pas d'électrodes de grande surface spécifique nécessaire aux greffages d'un grand nombre de catalyseurs par unité de surface. Nous avons donc opté pour l'utilisation d'oxyde de graphène réduit d'origine commerciale. Celui-ci permet de manipuler du graphène à l'échelle du gramme. La structure de ce type de graphène est éloignée du graphène produit par CVD car il est majoritairement composé de flocons de RGO composés de plusieurs feuillets de graphène et non d'un seul.

L'étude par électrochimie directe d'enzymes redox est particulièrement étudiée dans le domaine des biocapteurs et des biopiles,¹³ mais seulement peu d'études ont été menées sur des protéines redox à la surface de matériaux à base de graphène.⁵⁰ De plus, ces études ce sont essentiellement concentrées sur la glucose oxydase⁵¹ ou les enzymes héminiques comme la peroxydase de raifort, le cytochrome c, ou l'hémoglobine.^{52,53}

Nous nous sommes donc intéressés à l'immobilisation et à l'orientation de la laccase sur de l'oxyde de graphène réduit fonctionnalisé covalentement par des sels d'antraquinone-diazonium. Comme déjà mentionné, ce type de fonctionnalisation a été employé pour la fonctionnalisation de CNTs. Nous avons donc cherché à évaluer les propriétés du graphène vis-à-vis de la fonctionnalisation covalente et vis-à-vis de la connexion directe de métalloenzymes telles que les laccases.

II.1 Fonctionnalisation covalente d'oxyde de graphène réduit

Comme pour les CNTs, le greffage covalent ou chimique du graphène est basé sur la création de liaisons covalentes d'entités fonctionnelles sur le réseau π -conjugué. La fonctionnalisation est associée simultanément à un changement d'hybridation du carbone sp^2 vers un carbone sp^3 , et à une perte du système π sur la couche (Figure 10).

La fonctionnalisation du RGO a été faite suivant des protocoles, qui ont particulièrement été développés par James Tour, et réalisés avec divers arylamines.⁴⁶⁻⁴⁸ Dans un premier temps, le RGO a été dispersé dans du DMF, puis cette dispersion a été chauffée à 80 °C pendant une nuit en présence d'isopentyl nitrite et du dérivé 2-aminoanthraquinone. La figure 10 schématise la fonctionnalisation covalente du RGO avec des groupements anthraquinones que l'on appelle f-RGO. Les radicaux arylamines sont formés *in situ* puis réagissent avec le système π de la surface. Il est important de noter que, bien qu'on cherche à l'éviter, la fonctionnalisation covalente à partir de sels de diazonium entraîne invariablement la formation d'une multicouche de polyphénylène. Le RGO ainsi modifié a ensuite été lavé par dispersions successives dans du DMF, ultrasonication, et filtration jusqu'à ce que le filtrat soit incolore. Le but est de retirer au maximum les dérivés anthraquinones qui n'ont pas réagi, ainsi que les produits secondaires qui sont restés adsorbés à la surface du graphène.

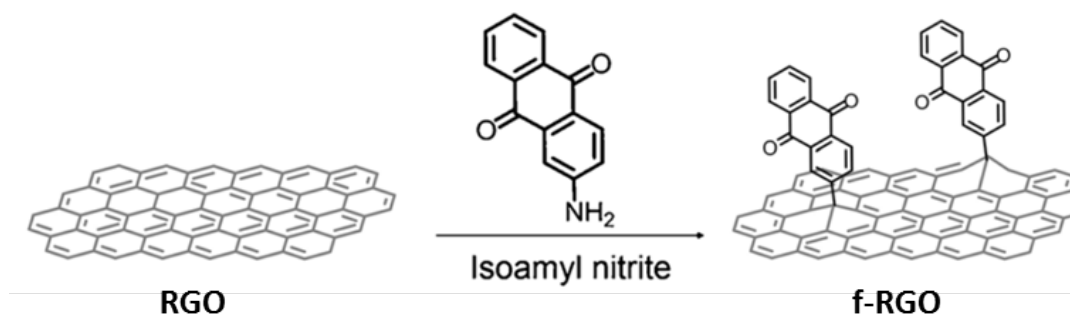


Figure 10 : Schéma de la fonctionnalisation covalente du RGO par des dérivés amino-anthraquinones.

II.2 Caractérisation du f-RGO

II.2.1 Caractérisation du f-RGO par spectroscopie Raman et infrarouge

Le f-RGO a été analysé par spectroscopie Raman et infrarouge afin de caractériser la fonctionnalisation du RGO par les groupements anthraquinones (AQ) (figure 7). Le spectre Raman a été analysé au niveau des bandes D et G. Les bandes G sont causées par le déplacement hors phase de deux atomes voisins, parallèlement à la paroi de graphène. Elles sont habituellement les plus intenses du spectre Raman. L'intensité de la bande D quant à elle est causée par les défauts structuraux qui viennent briser la symétrie de la structure, comme des molécules greffées ou des lacunes. Son intensité, comparée à celle d'une bande indépendante aux défauts (la bande G), fournit donc un indice de la « qualité » de la structure du feuillet de graphène. Cet indice est souvent rapporté sous la forme d'un ratio des bandes D et G, qui augmente lors de l'introduction de défauts supplémentaires. Il n'existe toutefois pas de relation quantitative entre l'intensité relative de la bande D et la quantité de défauts.

La longueur d'onde d'excitation est de 514,5 nm pour un laser Ar⁺. On observe que l'intensité des bandes D et G et donc le ratio D/G est inchangé par la fonctionnalisation covalente du RGO par l'anthraquinone. Il a été montré par Tour et al.⁴⁸ que le spectre Raman de quelques épaisseurs de graphène a une intense bande D autour de 1350 cm⁻¹, correspondant à la présence d'une grande quantité de défauts sur les bords. Étant donné que la modification par les aryles diazoniums se produit majoritairement au niveau des défauts de bord du graphène, il n'est pas anormal de ne pas observer une augmentation apparente du désordre dans le f-RGO. Néanmoins, pour le f-RGO, on observe sur le spectre Raman que les bandes D et G sont toutes les deux chevauchées par des pics à 1170 cm⁻¹ et 1670 cm⁻¹ qui correspondent aux fréquences Raman de la signature de l'anthraquinone.

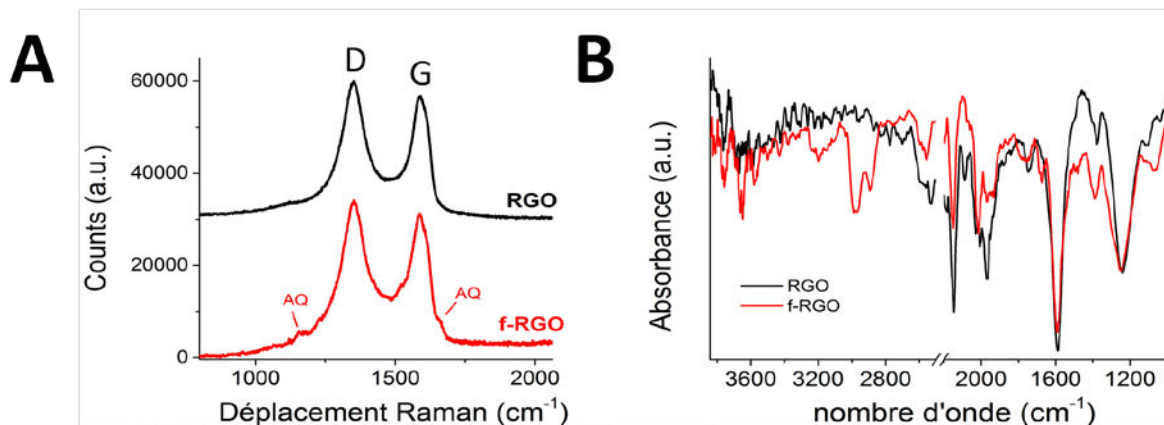


Figure 11 : A) Spectre Raman du RGO et f-RGO entre 1000 et 2000 cm^{-1} ; B) Spectre IR du RGO et f-RGO entre 1000 et 3800 cm^{-1}

En spectroscopie infrarouge, les spectres du RGO et du f-RGO sont similaires. En effet, le RGO et l'antraquinone ont des structures voisines, et le nombre d'antraquinones greffées est faible comme discuté plus loin. La principale différence entre les deux spectres est la présence d'une bande à 2980 cm^{-1} , attribuée sans ambiguïté aux liaisons C-H de l'antraquinone.

II.2.2 Solubilité du f-RGO

Afin d'évaluer la solubilité du RGO et du f-RGO dans du NMP, 3 mg de RGO ou de f-RGO ont été dispersés dans 3 mL de NMP par sonication durant 5 min (Figure 12A), suivi d'une centrifugation pendant 15 min à 3200 rpm. Ensuite 2 mL de chaque surnageant (Figure 12B) ont été prélevés et précipités dans l'acétone. La solution est ensuite filtrée, et le filtre lavé avec de l'acétone, séché puis pesé. A l'inverse du RGO, une dispersion noire a été obtenue avec le f-RGO. Le RGO montre une solubilité négligeable dans le NMP tandis que pour le f-RGO une solution stable d'une concentration de 0,22 mg mL^{-1} est obtenue.

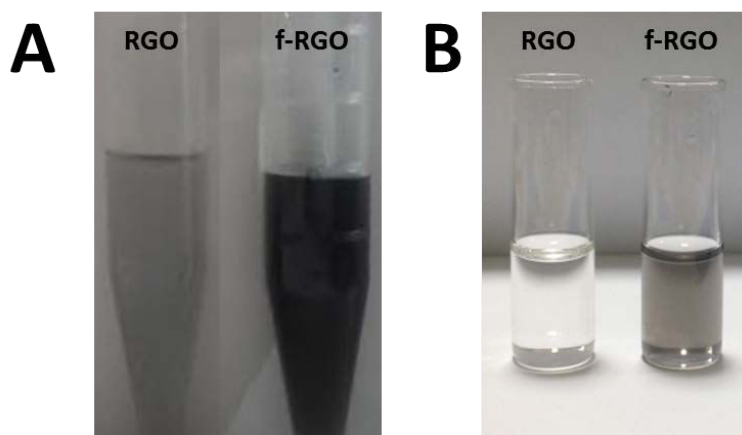


Figure 12 : Photographies des solutions de NMP à 3 mg mL^{-1} du RGO et f-RGO, A) après sonication B) surnageant après centrifugation à 3200 rpm pendant 15 minutes

II.3.3 Caractérisation électrochimique du f-RGO

Pour confirmer la présence d'antraquinone à la surface du f-RGO, des expériences de voltammétrie cyclique ont été réalisées dans du TP pH 5. 20 μL d'une solution à 0.22 mg mL^{-1} dans du NMP ont été déposés sur des électrodes de carbone vitreux et de MWCNTs puis séchés. On observe un système redox réversible à $E_{1/2} = -0,54 \text{ V vs. ECS}$. Ce potentiel est en accord avec le système à deux électrons et deux protons de l'AQ dans l'eau (Figure 13).

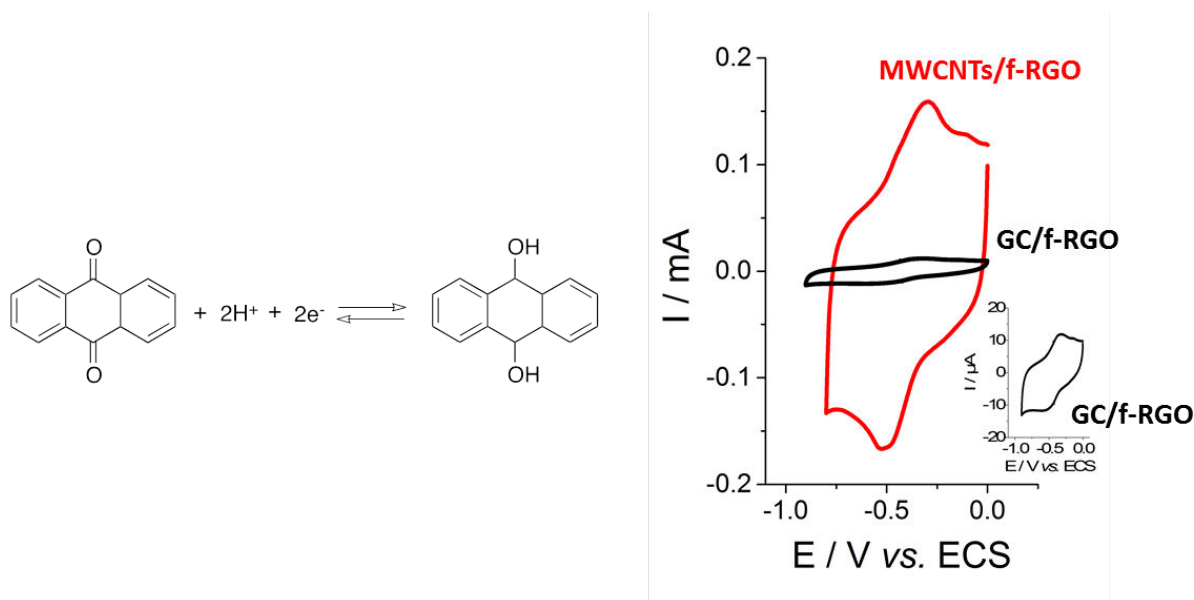


Figure 13 : Voltammétrie cyclique dans TP (0,2 M, pH 5) sous argon des électrodes de MWCNTs/f-RGO (rouge) et GC/f-RGO (noir), $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$

Les courants des pics anodiques et cathodiques varient de manière linéaire avec la vitesse de balayage, confirmant le greffage de l'antraquinone sur le f-RGO. Le signal redox de l'AQ est beaucoup plus intense après déposition du f-RGO sur l'électrode de MWCNTs comparée à l'électrode de GC. De plus, lors d'un balayage en continue de l'électrode (50 scans), une diminution négligeable du signal redox de l'antraquinone est observée pour les électrodes MWCNTs/f-RGO confirmant une immobilisation stable du f-RGO à la surface des nanotubes. La sous couche de CNTs augmente donc sensiblement la quantité d'antraquinones observée et la stabilité du signal redox.

Le transfert d'électron interfacial de ce type d'électrode a aussi été étudié par CV en présence d'une sonde redox ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$). Le ΔE est de l'ordre de 60 mV pour les électrodes de carbone vitreux, MWCNTs, MWCNTs/f-RGO et GC/f-RGO démontrant ainsi d'excellentes propriétés de transfert d'électron, similaires pour toutes ces électrodes.

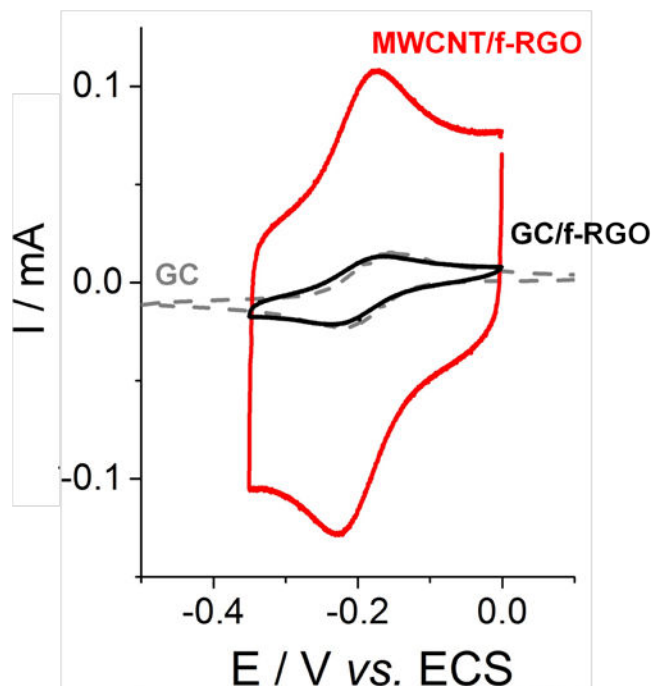


Figure 14 : Voltammétrie cyclique d'une solution à 1 mM de $Ru(NH_3)_6^+$ dans du TP pH 5 pour les électrodes GC (gris), GC/f-RGO (noir), et MWCNTs/f-RGO (rouge), $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$

L'intensité du signal de la sonde redox est multipliée par 10 par l'ajout d'une sous couche de MWCNTs aux électrodes de f-RGO, l'intensité du pic anodique passe de 0,01 à 0,1 mA. Cette augmentation de l'intensité du courant faradique, associée à l'augmentation du courant capacitif, observée pour les électrodes MWCNTs/f-RGO comparées aux GC et GC/f-RGO illustre l'augmentation de la surface électroactive accompagnée d'une excellente propriété de transfert interfacial d'électron.

Le taux de recouvrement de l'antraquinone sur le f-RGO a été estimé en intégrant la charge sous le pic d'oxydation ou de réduction. Il est estimé à $0,19 \times 10^{-9}$ et $3,6 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, pour le f-RGO déposé sur GC et MWCNTs respectivement. Le système MWCNTs/f-RGO montre qu'il est possible d'immobiliser une quantité plus importante d'AQ à la surface des électrodes comparées aux électrodes nues de GC. Cette augmentation peut atteindre jusqu'à un ordre de grandeur entre les deux systèmes. En accord avec le fait que la même quantité de f-RGO a été déposée, les électrodes de carbone vitreux montrent une faible capacité à connecter électriquement le graphène fonctionnalisé comparées aux électrodes de MWCNTs.

En prenant en compte l'estimation de la quantité d'antraquinones déposée à la surface pour un taux de recouvrement maximal et la quantité d'atomes de carbone estimée par la masse déposée de f-RGO ($5,2 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-2}$) le ratio antraquinone sur RGO donne accès au taux maximal de recouvrement d'un feuillet qui est d'une molécule AQ pour 1400 atomes de carbone. Pour comparaison, le taux de recouvrement est d'un ordre de grandeur plus faible que la fonctionnalisation covalente utilisée pour d'autres dérivés aryldiazoniums.⁴⁸ Ce plus faible taux de recouvrement est peut-être dû à l'encombrement stérique de l'antraquinone, qui est un dérivé phénylamine volumineux.

II.2.4 Microscopie électronique à balayage

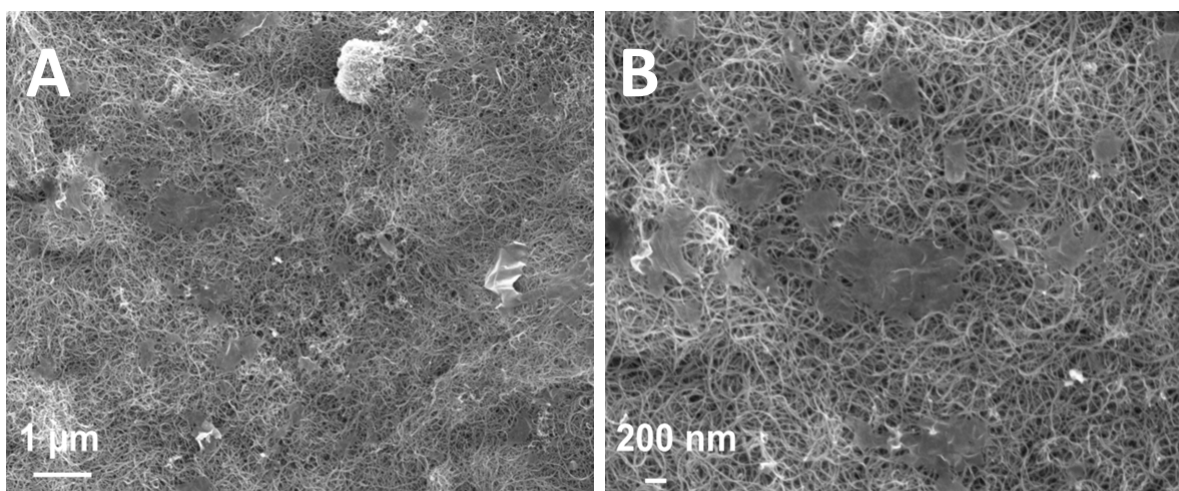


Figure 15 : Images MEB des surfaces d'électrodes MWCNTs/f-RGO à différents grossissements

Les images MEB en figure 15 montrent une dispersion homogène des feuillets de f-RGO à la surface des CNTs. Ils sont efficacement étalés sur la surface grâce aux interactions de type « π -stacking » qu'ils établissent avec les CNTs. Ces nano-feuillets de f-RGO présentent des surfaces comprises entre 100 nm^2 et $0.3 \mu\text{m}^2$ environ. Les CNTs semblent empêcher l'agrégation des feuillets de graphène entre eux et permettent l'excellente immobilisation du f-RGO à la surface de l'électrode.

II.3 Elaboration des biocathodes

Les électrodes GC/f-RGO et MWCNTs/f-RGO, ainsi que les électrodes utilisées comme contrôle MWCNTs et GC/RGO, ont été incubées dans une solution de laccase suivant la procédure décrite précédemment (Cf. I.2). Des expériences de voltammétrie cyclique ont été menées pour caractériser l'immobilisation de l'enzyme ainsi que pour évaluer ses propriétés bioélectrocatalytiques en transfert direct d'électron avec l'électrode (Figure 16 et 17).

Les propriétés capacitives du graphène sont bien connues, et comme attendu, la présence de RGO ou de f-RGO à la surface de l'électrode est confirmée par l'augmentation du courant capacitif des scans de voltammétrie cyclique (Figure 16A et 16B ; figure 17). Sous oxygène une vague de réduction du dioxygène débutant à $0,63 \text{ V vs. ECS}$ a été observée pour toutes les électrodes fonctionnalisées avec le f-RGO. Ce potentiel est proche du potentiel redox du centre T1, ce qui confirme l'excellent transfert d'électron direct entre le f-RGO et la laccase. A 0 V vs. ECS , les densités de courant bioélectrocatalytique de réduction de O_2 sont de $-0,2 \text{ mA cm}^{-2}$ pour les électrodes de MWCNTs/Lac, $-0,3 \text{ mA cm}^{-2}$ pour les électrodes f-RGO/Lac et $-0,8 \text{ mA cm}^{-2}$ pour les électrodes MWCNTs/f-RGO/Lac. Il est à noter que le RGO non fonctionnalisé ne montre aucune adsorption non spécifique, ni connexion de la laccase contrairement aux MWCNTs ou au f-RGO.

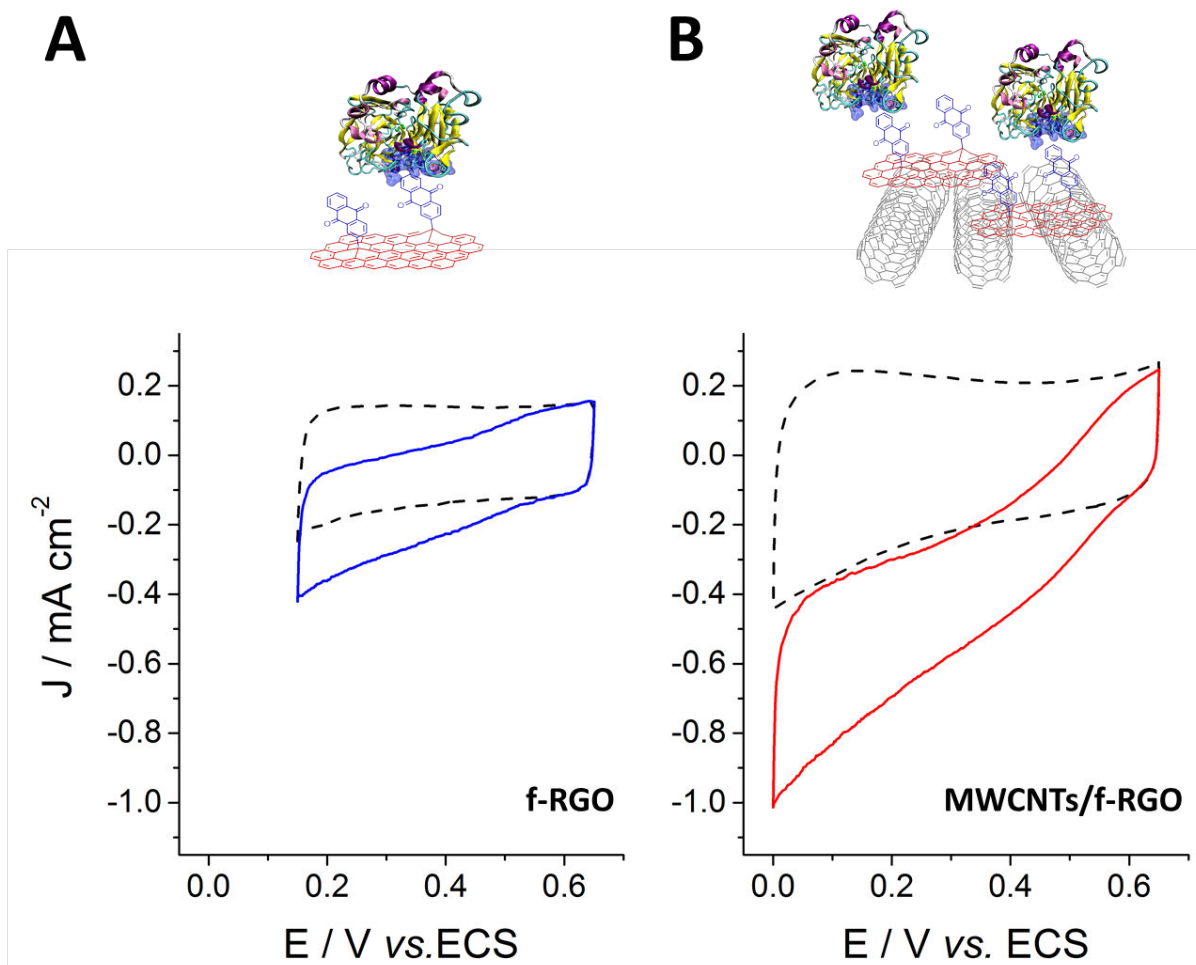


Figure 16 : Voltammétrie cyclique des électrodes fonctionnalisées avec la laccase sous atmosphère saturée en argon (pointillé) et sous atmosphère saturée en oxygène (trait plein) pour A) f-RGO/Lac B) MWCNTs/f-RGO/Lac dans TP (0,2 M, pH 5), $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$

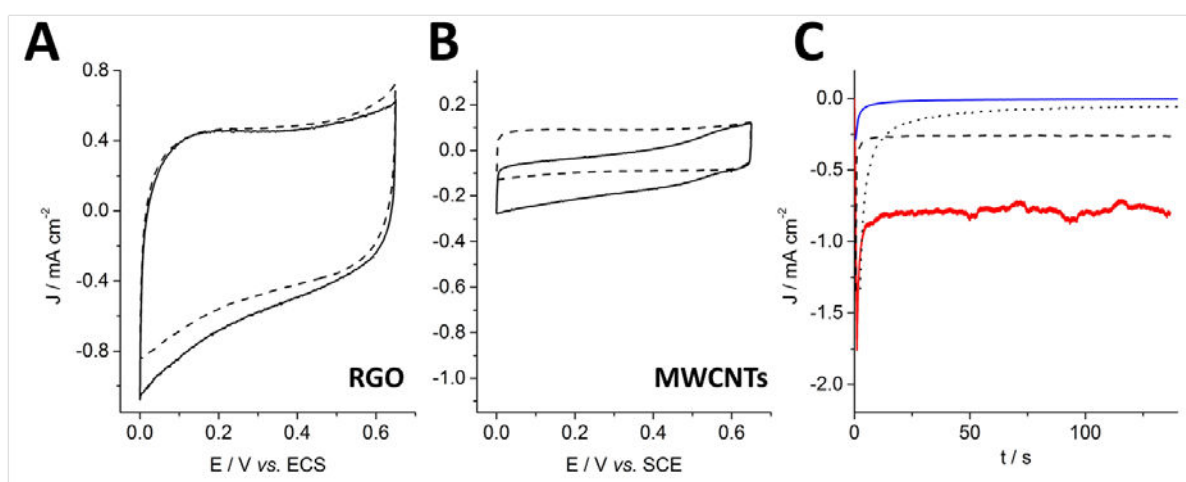


Figure 17 : Voltammétrie cyclique des électrodes fonctionnalisées avec la laccase sous atmosphère saturée en argon (pointillé) et sous atmosphère saturée en oxygène (trait plein) pour A) RGO/Lac B) MWCNTs/Lac dans TP (0,2 M, pH 5), $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$; et C) Réponse d'une décharge par chronoampérométrie à $E_p = 0,2 \text{ V vs. ECS}$ dans du TP (0,2 M, pH 5) saturé en oxygène pour f-RGO/Lac (bleu), RGO/Lac (pointillés), MWCNTs/Lac (tirets) et MWCNTs/f-RGO/Lac (rouge)

D'autres expériences de chronoampérométrie ont aussi été menées en parallèle des expériences de voltammétrie cyclique afin d'évaluer l'efficacité des électrodes en s'affranchissant du courant capacitif (Figure 17C). A 0,2 V vs. ECS et sous oxygène, une densité de courant de bioélectrocatalyse de $-0,90 \text{ mA cm}^{-2}$ a été mesurée pour les électrodes de MWCNTs/f-RGO. Ceci correspond à une augmentation de 3,5 fois, comparée aux électrodes où la laccase est absorbée non spécifiquement sur les MWCNTs qui délivrent une densité de courant maximal de $-0,26 \text{ mA cm}^{-2}$ dans les mêmes conditions. Les électrodes de f-RGO seul ainsi que de MWCNTs/RGO ne réalisent aucune activité de bioélectrocatalyse stable, et montrent une décroissance rapide du courant catalytique vers de faibles valeurs respectivement de $-0,06 \text{ mA cm}^{-2}$ et $-0,003 \text{ mA cm}^{-2}$. Les films de f-RGO et RGO ne sont pas stables à la surface des électrodes de carbone vitreux. Ces expériences montrent que la « sous-couche » de MWCNTs est un prérequis pour observer une orientation et un DET stable de la laccase sur le graphène fonctionnalisé.

Nous avons ensuite cherché à comparer les résultats obtenus pour les électrodes de MWCNTs/f-RGO avec des résultats précédemment obtenus au laboratoire où des films similaires de MWCNTs ont été modifiés par des dérivés pyrène-antraquinone.³¹ Les MWCNTs sont d'abord fonctionnalisés par un dérivé pyrène portant une molécule d'antraquinone (Pyr-AQ₁) via une fonctionnalisation basé sur du « π -stacking », puis par la laccase (Figure 18a).

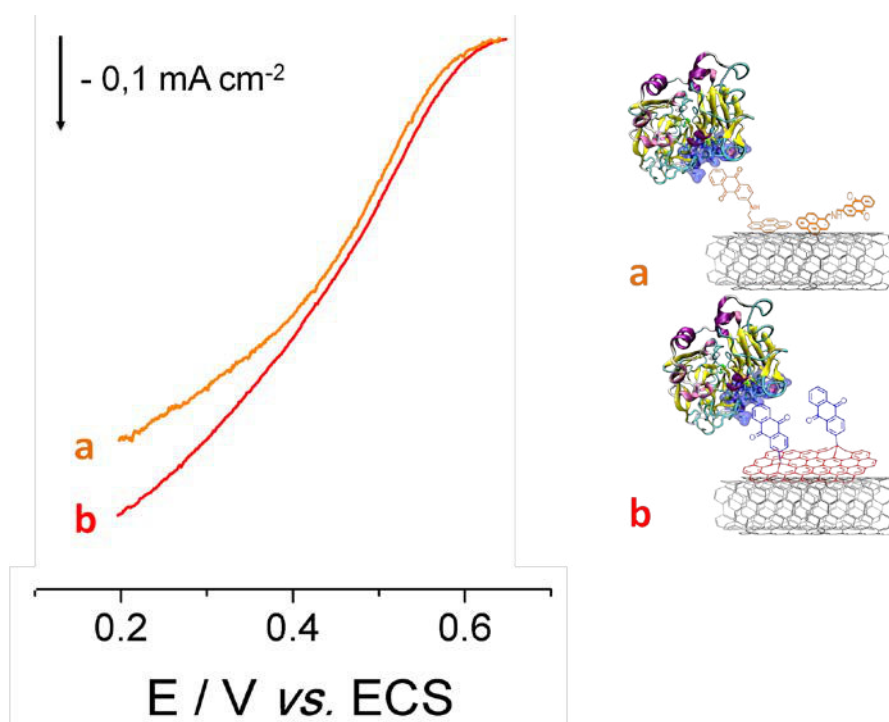


Figure 18 : CVs expérimentales dans du TP (0,2 M, pH 5) saturé en oxygène des électrodes A) MWCNTs/Pyr-AQ₁/Lac et B) MWCNTs/f-RGO/Lac. La contribution capacitif des MWCNTs a été soustraite

On observe que les vagues de réduction bioélectrocatalytique du dioxygène sont très similaires (après soustraction de la contribution du courant capacitif), que ce soit au niveau

des potentiels redox, des densités de courant ou de la forme des courbes. Cette comparaison semble indiquer que les feuillets de graphène modifiés par l'antraquinone se comportent comme une macromolécule π -conjuguée, capable de s'adsorber de façon stable à la surface des MWCNTs et d'opérer une connexion directe des laccases.

La fonctionnalisation covalente du RGO combiné aux MWCNTs permet une immobilisation stable et efficace de la laccase en vue de la réduction du dioxygène. Cette approche est prometteuse, cependant les taux de recouvrement doivent être améliorés afin de maximiser la quantité d'enzymes immobilisées. L'utilisation directe du RGO comme matériaux d'électrode ne semble pas être une bonne alternative aux électrodes de MWCNTs, en raison de la faible stabilité des films et des surfaces électroactives plus faibles. Cependant, nous avons montré que le graphène modifié de manière covalente peut opérer un DET avec les laccases et peut également se comporter comme un pendant macromoléculaire aux molécules de type pyrène généralement utilisées pour la fonctionnalisation non covalente des CNTs. Le f-RGO est ainsi capable de fonctionnaliser des films de MWCNTs et de fournir une nano-plateforme macromoléculaire pour l'immobilisation et la connexion d'enzymes.

III- Fonctionnalisation non covalente de MWCNTs par un dérivé pyrène-adamantane

Jusqu'à présent, l'orientation de la laccase via sa poche hydrophobe n'a été réalisée qu'avec des molécules hydrophobes planes telles que l'antraquinone, l'antracène ou encore le pyrène. Au laboratoire, nous avons principalement cherché à fonctionnaliser de manière non covalente la paroi des MWCNTs afin de préserver leurs propriétés de conductivité électrique. Si l'on envisage la fonctionnalisation d'un dérivé pyrène par une de ces molécules ; comme avec le Pyr-AQ₁ présenté précédemment ; se pose le problème de la compétition d'interaction avec la paroi des CNTs. En effet, les molécules qui interagissent favorablement avec la poche enzymatique, antraquinone, pyrène, etc..., sont aussi celles qui induisent du « π -stacking » avec la paroi des CNTs. Ceci engendre une compétition de l'antraquinone pour la poche hydrophobe et pour la paroi des CNTs. Nous avons donc envisagé d'utiliser non plus des molécules planes hydrophobes, mais l'adamantane pour interagir avec l'enzyme. D'après la structure cristalline, la cavité hydrophobe est plutôt vaste environ 10×10×20 Å et peut accueillir de gros substrats hydrophobes.⁹ De plus l'adamantane établit des complexes hôte-invité très stables avec les cyclodextrines. Nous avons donc choisi un dérivé pyrène portant un adamantane (Pyr-Ada) pour la fonctionnalisation de MWCNTs avec la laccase. Ce dérivé a été synthétisé précédemment au laboratoire.⁵⁴

III.1 Immobilisation d'un dérivé Pyrène-Adamantane sur une matrice de MWCNTs

Les interactions « π -stacking » entre les pyrènes et la paroi des MWCNTs permettent la physisorption du dérivé Pyr-Ada à la surface de l'électrode. Pour fonctionnaliser les

électrodes de MWCNTs, ces dernières ont été incubées pendant 1 h dans une solution à 10 mM en dérivés Pyr-Ada dans le DMF. Les électrodes ont ensuite été abondamment rincées au DMF puis à l'eau distillée.

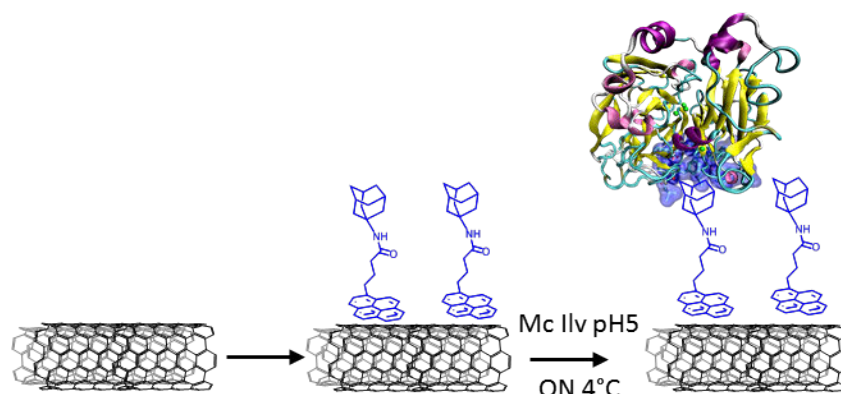


Figure 19 : Représentation schématique de la fonctionnalisation supramoléculaire des MWCNTs par le pyrène-adamantane dans du DMF suivit de l'immobilisation de la laccase dans du tampon McIlvaine pH 5

L'adamantane n'étant pas une molécule électrochimiquement active, sa présence à la surface de l'électrode n'a pu être vérifiée par électrochimie comme ce fut le cas pour le P-Pyr et le f-RGO. Pour caractériser l'immobilisation du pyrène-adamantane, la microscopie électronique à balayage a été utilisée. Les électrodes modifiées par les MWCNTs et le Pyr-Ada ont été incubées dans une solution aqueuse de nanoparticules d'or modifiées par des groupements β -cyclodextrine (β -CD-AuNPs) puis rincées à l'eau. Les β -CD-AuNPs ont été utilisées à la fois pour sonder la présence de l'adamantane à la surface ainsi que comme nano-objet pour mimer la laccase. Il est bien connu que l'adamantane interagit fortement avec les β -CD pour former un système hôte-invité.⁵⁴ Cette stratégie nous permet d'une part de confirmer l'immobilisation du Pyr-Ada à la surface des CNTs, et d'autre part de mimer l'immobilisation de la laccase à la surface de l'électrode.

La figure 20 montre des images MEB des électrodes de MWCNTs avant et après fonctionnalisations successives via le Pyr-Ada et les β -CD-AuNPs. Ces images soulignent la déposition homogène d'un film de CNTs de 10 nm de diamètre. De plus, comparé au film nu de MWCNTs (insert de la figure 20), grâce à la fonctionnalisation des CNTs par des adamantanes, un dépôt homogène sur toute la surface des tubes de nanoparticules d'or est confirmé par la présence de points brillants. Ceci démontre sans ambiguïté l'excellente immobilisation homogène des β -CD-AuNPs sur les films de MWCNTs modifiés avec l'adamantane.

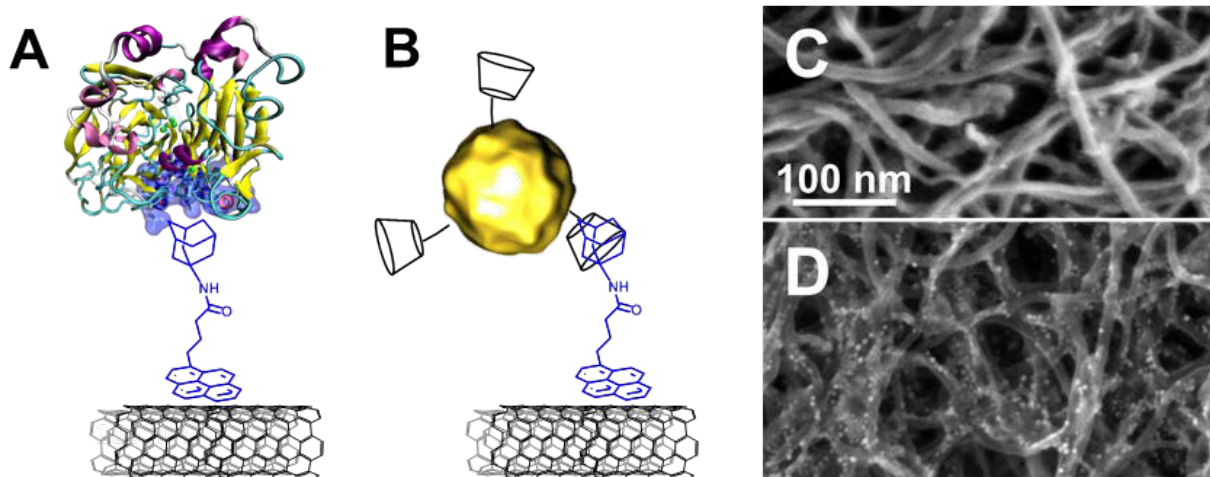


Figure 20 : Représentation de A) MWCNTs/Pyr-Ada/Lac et B) MWCNTs/Pyr-Ada/ β -CD-AuNPs ; Images MEB d'un film de MWCNTs C) avant et D) après fonctionnalisation successive par le Pyr-Ada et les β -CD-AuNPs

II.2 Elaboration de la biocathode MWCNTs/Pyr-Ada/Lac

Afin d'explorer l'interaction de ces électrodes avec la laccase, les électrodes modifiées ont par la suite été incubées dans une solution d'enzyme toute une nuit, puis rincées abondamment. La figure 19 illustre l'immobilisation du pyrène-adamantane et de la laccase par une procédure en deux étapes. Les voltammogrammes obtenus dans des solutions saturées en argon et en oxygène à pH 5 sont présentés figure 21. Ces biocathodes ont été comparées aux électrodes de MWCNTs non modifiées et incubées de manière similaire avec la protéine.

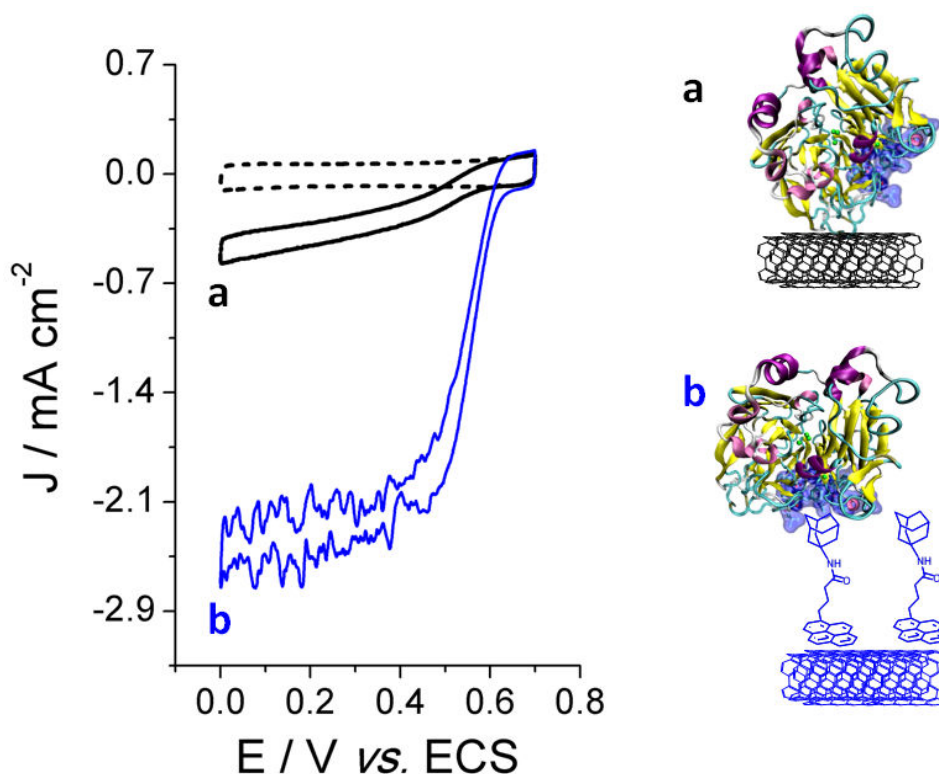


Figure 21 : CVs des électrodes sous argon (pointillés) et oxygène pour a) MWCNTs/Lac et b) MWCNTs/Pyr-Ada/Lac dans du tampon McIlvaine pH 5, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$

Sous oxygène les forts courants catalytiques de réduction du dioxygène sont accompagnés d'un OCP proche de 0,6 V vs. ECS, toujours en accord avec la connexion directe et efficace de la laccase. En prenant en compte la surface géométrique de l'électrode ($0,07 \text{ cm}^2$), une densité de courant catalytique de $-2,4 \text{ mA cm}^{-2}$ est mesurée pour les électrodes MWCNTs/Pyr-Ada/Lac à 0 V vs. ECS. Cette densité correspond à une augmentation de quatre fois de la densité de courant catalytique comparée à celle mesurée pour les électrodes où la laccase a été absorbée non spécifiquement sur les MWCNTs ; et pour lesquelles on observe une densité de courant maximal de $-0,6 \text{ mA cm}^{-2}$.

Nous avons comparé ces résultats avec d'autres résultats précédemment obtenus au laboratoire³¹ et présentés en figure 22. Les MWCNTs avaient d'abord été fonctionnalisés par un dérivé pyrène portant deux molécules d'antraquinones (Pyr-AQ₂) puis par l'enzyme. Ce dérivé avait été synthétisé dans le but d'améliorer le taux de recouvrement de l'électrode par l'antraquinone comparé au Pyr-AQ₁.

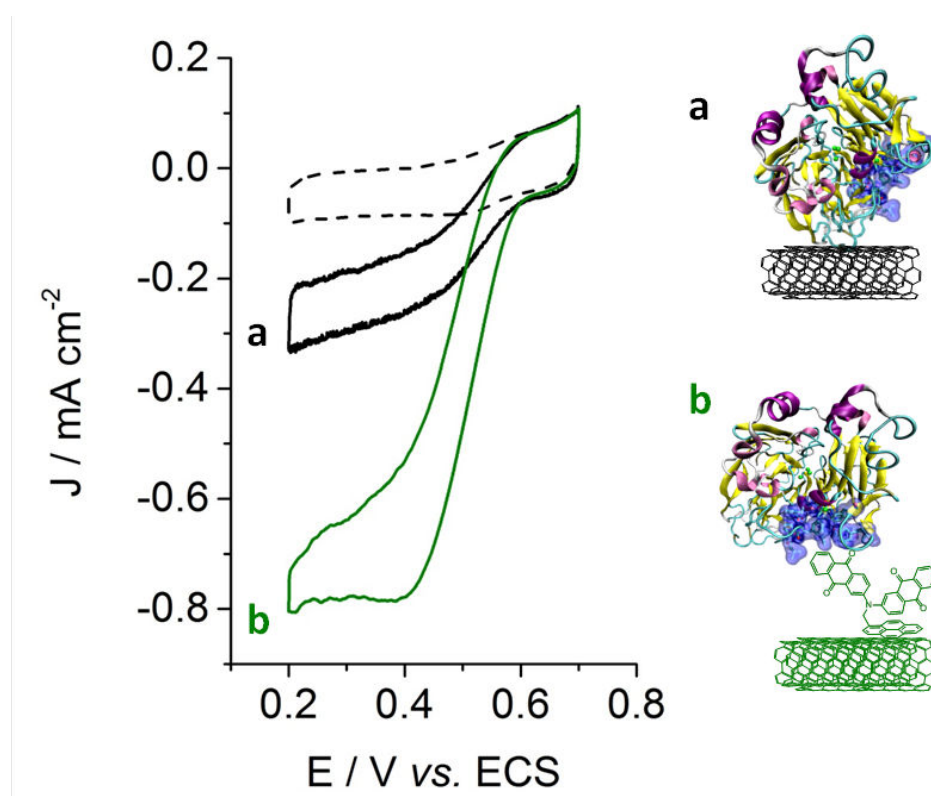


Figure 22 : Voltammétrie cyclique des électrodes sous argon (pointillés) et oxygène pour a) MWCNTs/Lac et b) MWCNTs/Pyr-AQ₂/Lac dans du tampon McIlvaine pH 5, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$

La forme du voltammogramme est la même que celle obtenue avec le Pyr-Ada, c'est-à-dire une importante vague de catalyse qui commence autour de 0,6 V, suivit d'un plateau à 0,4 V. Cette forme est typique des laccases bien orientées.⁵⁵ Pour estimer la quantité de laccase connectée, l'ABTS a été ajouté en solution lors d'expériences de chronoampérométrie, et aucune augmentation du courant n'a été observée pour ces deux bioélectrodes (Pyr-Ada et Pyr-AQ₂), confirmant la connexion de toutes les enzymes présentes à la surface de ces électrodes.

IV- Evaluation de la stabilité des bioélectrodes

La stabilité à long terme de ces électrodes a aussi été étudiée en réalisant des décharges quotidiennes d'une heure à 0,2 V vs. ECS (Figure 23). Les électrodes plus faiblement fonctionnalisées par la laccase (MWCNTs/Pyr-AQ₁ et MWCNTs/f-RGO) montrent une décroissance plus rapide de l'activité catalytique comparée aux autres qui sont beaucoup plus stables. Les électrodes MWCNTs/PyrAQ₂ et MWCNTs/P-Pyr montrent une excellente stabilité, continuant à délivrer 50 % de leur activité initiale après 20 jours d'utilisation discontinue, soit respectivement -0,5 mA cm⁻² et -0,7 mA cm⁻². Ces activités sont supérieures à celles des électrodes MWCNTs/Lac et MWCNTs/P-NHS/Lac au premier jour. Les électrodes MWCNTs/Pyr-Ada/Lac montrent la meilleure stabilité sur plusieurs semaines, elles catalysent toujours 66 % de leur activité initial après un mois, soit -1,2 mA cm⁻². Au contraire, les laccases adsorbées non spécifiquement montrent une décroissance rapide du courant catalytique sous 5 % de la valeur initial après 20 jours.

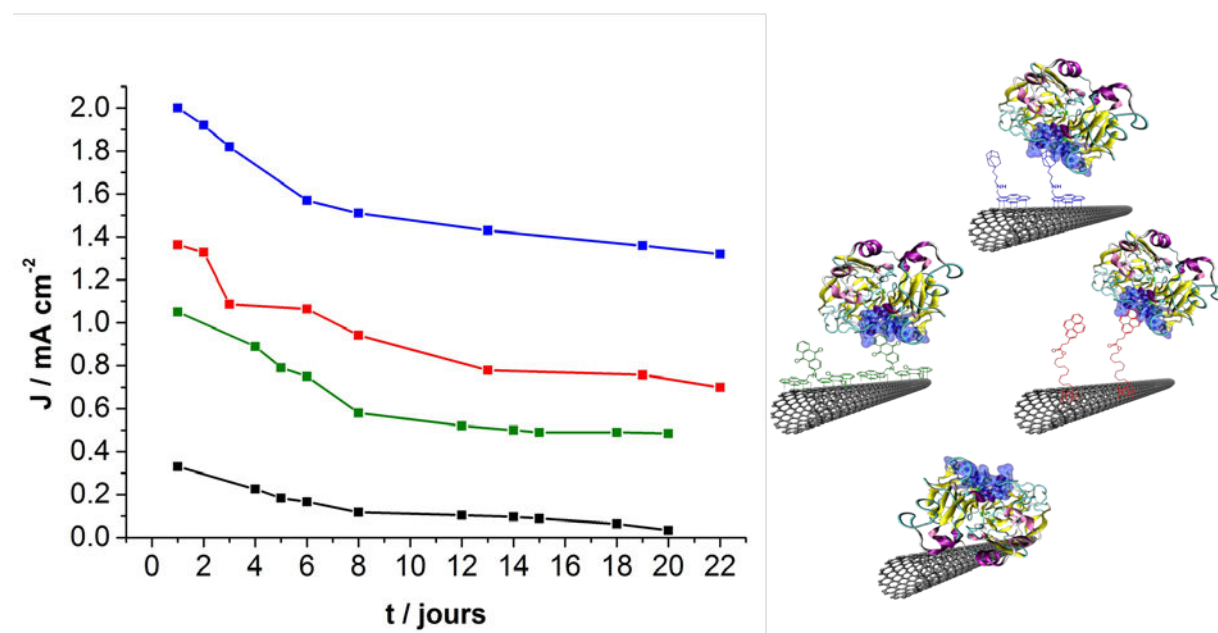


Figure 23 : Stabilité des bioélectrodes MWCNTs/Pyr-Ada/Lac (bleu), MWCNTs/P-Pyr/Lac (rouge), MWCNTs/Pyr-AQ₂/Lac (vert) et MWCNTs/Lac (noir). Densités de courant catalytique mesurées par des décharges à $E = 0,2$ V vs. ECS pendant 1h dans du tampon pH 5 saturé en oxygène

V- Etudes théoriques et rationalisation des performances

V.1 Modélisation électrochimique

Toutes les bioélectrodes décrites précédemment montrent une activité bioélectrocatalytique envers la réduction du dioxygène avec un potentiel de départ autour de 0,6 V vs. ECS. Cependant, la forme du voltammogramme est très différente selon la molécule utilisée pour orienter et accrocher l'enzyme, ainsi que suivant la stratégie utilisée pour immobiliser cette dernière à la surface des CNTs, polymérisation ou « π -stacking ». La principale différence est la pente de la courbe lorsque l'on balaye vers de plus faibles

potentiels. Elle est peut être corrélée à différents taux de recouvrement et/ou différentes orientations de l'enzyme à la surface de l'électrode. Pour obtenir plus d'informations sur le mécanisme de DET de la laccase sur nos électrodes structurées, différents modèles théoriques de la réduction bioélectrocatalytique du dioxygène ont été étudiés.

V.1.2 Modèle cinétique de la dispersion du transfert d'électron

Différents modèles ont été étudiés pour élucider le DET des oxydases multi-cuivre (MCOs) à l'électrode.⁵⁶⁻⁵⁹ Le groupe de Fraser Armstrong a effectué des travaux de recherches majeurs dans la modélisation de la voltammétrie d'un film fin de métalloprotéine, en particulier pour l'hydrogénase. Notamment, ils ont développé un modèle basé sur la dispersion de l'orientation de l'enzyme à la surface de l'électrode qui s'accompagne de la dispersion des constantes de transfert d'électron.^{56,60,61} Le modèle de base décrit les étapes successives de transfert monoélectronique entre l'électrode et le centre de contrôle de la réponse électrochimique (site actif, centre relai de ET ou chaîne de relai de ET situés à la surface de l'enzyme) concomitantes à l'oxydation d'un petit substrat comme l'hydrogène. Ce modèle a pu être appliqué avec succès aux MCOs comme la bilirubine oxydase ou la laccase. Pour ces enzymes, le centre T1 joue le rôle de relai de transfert d'électron et assure les quatre transferts monoélectroniques aux centres T2/T3, nécessaire pour la réduction du dioxygène.⁵⁵⁻⁵⁷ Ce modèle implique que la vague d'électrocatalyse est limitée par la cinétique et non par le transport de masse. Ce modèle est décrit en figure 24. Le transfert interfacial d'électron entre le centre T1 et l'électrode est séparé de tous les autres événements catalytiques survenant au sein de l'enzyme comme la fixation du substrat, les transferts de protons, les transferts intramoléculaires d'électrons... La constante de transfert interfacial k_1 dépend du potentiel de l'électrode, et k_2 représente les autres événements.

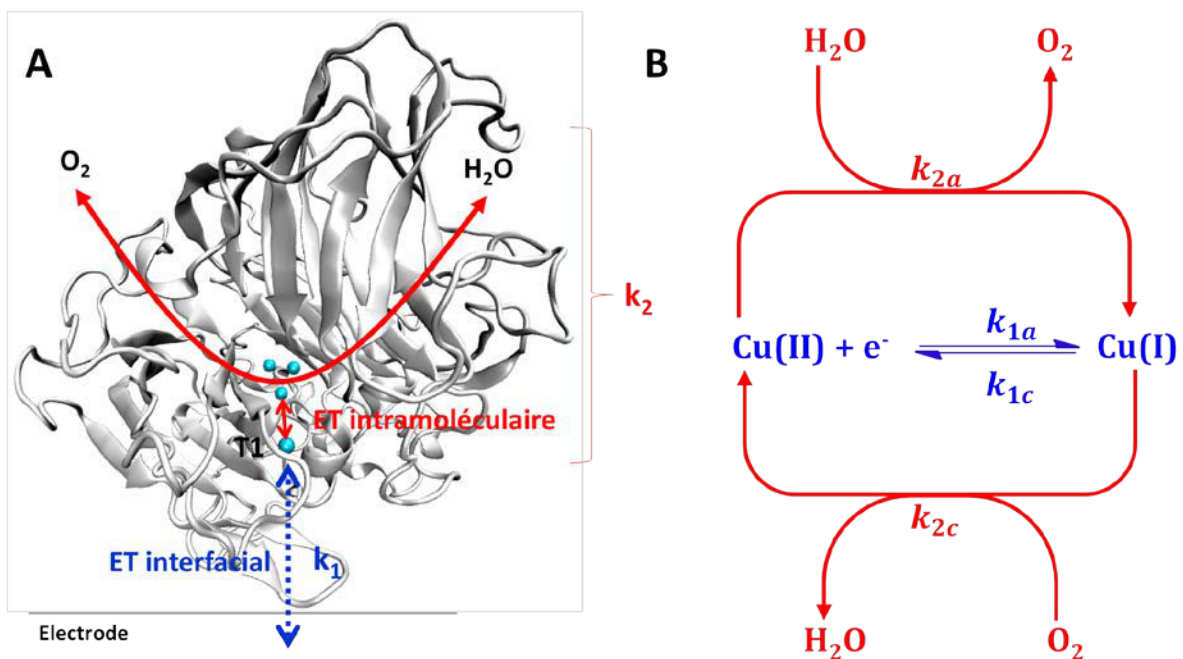


Figure 24 : A) Illustration du modèle du transfert d'électron interfacial et intramoléculaire appliqué à la laccase immobilisée à l'électrode. B) Modèle mathématique de l'électrocatalyse réversible

Ce modèle décrit les transferts monoélectroniques successifs entre le centre T1 qui peut être situé à différentes distances de l'électrode selon l'orientation de l'enzyme. Les courants d'électrocatalyse suivent l'équation 2.⁶¹

$$J = \frac{J_{lim}}{\beta d_0} \frac{e_1 - e_2}{1 + e_1} \ln \frac{pe_1^\alpha + 1 + e_1}{pe_1^\alpha + (1 + e_1)\exp(-\beta d_0)} \quad (2)$$

Le terme α correspond au coefficient de transfert et est fixé à 0,5. Le facteur βd_0 est un facteur effet tunnel qui prend en compte les différentes orientations que peut adopter l'enzyme à la surface de l'électrode, et est pertinent dans le cas de grosses molécules anisotropes comme la laccase. Le terme $\exp(-\beta d_0)$ prend en compte les différentes constantes de transfert interfacial d'électron et varie entre $k_{min} = k^0 \exp(-\beta d_0)$ et $k_{max} = k^0$, avec k^0 la constante standard de transfert interfacial d'électron, β est la constante de décroissance du milieu et d_0 la distance entre le centre T1 et l'électrode au-delà de laquelle a lieu le transfert d'électrons. Une grande valeur de βd_0 témoigne d'une grande distribution des transferts d'électrons à l'interface et l'effet est une décroissance apparente du courant catalytique lorsque l'on augmente la surtension. Les autres paramètres sont définis comme suit :

$$e_1 = \exp \left[\left(-\frac{nF}{RT} \right) (E - E_{Cu(T1)}^0) \right] = \frac{k_{1a}}{k_{1c}}$$

e_1 est la force électromotrice pour le transfert d'électron interfacial selon le potentiel appliqué. n est le nombre d'électron échangé, $E_{Cu(T1)}^0$ est le potentiel standard du centre T1 de l'enzyme. k_{1a} et k_{1c} sont les constantes de transfert d'électron entre l'électrode et le centre T1 (Figure 24). Elles sont dépendantes du potentiel appliqué à l'électrode.

$$e_2 = \exp \left[\left(-\frac{4F}{RT} \right) (E_{Cu(T1)}^0 - E_{O_2/H_2O}^0) \right] = \frac{k_{2c}}{k_{2a}}$$

Les constantes de vitesse k_{2a} et k_{2c} sont les fréquences de turnover de l'enzyme pour l'oxydation de l'eau et la réduction de O_2 respectivement. Elles sont indépendantes du potentiel appliqué à l'électrode et incluent toutes les réactions chimiques qui suivent le transfert d'électron entre le T1 et l'électrode : les ET intramoléculaires nécessaires à l'accumulation d'électrons pour la catalyse, les transferts de protons, la fixation du substrat et la libération du produit. Chacune de ces étapes pouvant être l'étape limitant l'efficacité de l'enzyme (Figure 24). e_2 correspond au bias catalytique de l'enzyme. Dans notre cas la réaction est largement déplacée vers la réduction du dioxygène, c'est-à-dire k_{2c} bien plus grand que k_{2a} . On attend donc de très grandes valeurs pour e_2 . Le potentiel d'équilibre du substrat est fixé à $E_{O_2/H_2O}^0 = 0,69$ V vs. ECS à pH 5.

$$p = \frac{(k_{2a} + k_{2c})}{k_0^{max}}$$

P est le ratio qui compare l'efficacité du catalyseur pour la réduction du dioxygène par rapport à son efficacité à transférer ses électrons à l'électrode. k_0^{max} est la constante de transfert interfacial d'électron pour la distance minimale d_0 du centre T1 /électrode.

$$J_{lim} = nF\Gamma_{enzyme}k_{2c}$$

Enfin, J_{lim} est le courant limite de catalyse, due à la réduction du dioxygène dans notre cas.

V.1.2 Modélisation des biocathodes

Ce modèle a été utilisé pour étudier l'influence de la modification des nanotubes de carbone sur l'activité électrocatalytique et par conséquent sur l'orientation de la laccase. Pour tous nos systèmes, que l'on travaille avec un flux constant d'oxygène en solution ou sur électrode tournante à plus de 1000 rpm, aucune augmentation du courant catalytique associée au transport de masse n'a été observée. La figure 25 montre les vagues de catalyses expérimentales obtenues pour les différentes biocathodes (courbes noires), après soustraction des courants capacitifs dus aux MWCNTs, et issues de la simulation (courbes rouges).

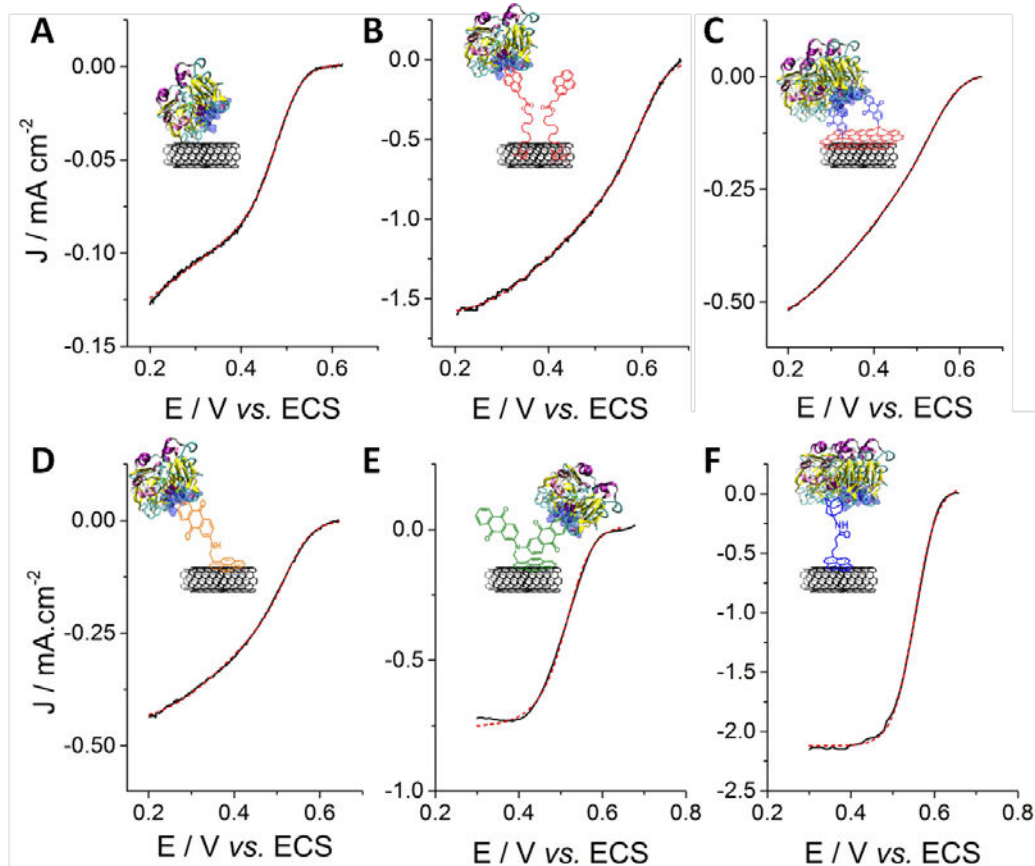


Figure 25 : Courbes expérimentales (noir) et simulées (rouge) des CVs sous oxygène pour A) MWCNTs/Lac, B) MWCNTs/P-Pyr/Lac, C) MWCNTs/f-RGO/Lac, D) MWCNTs/Pyr-AQ₁/Lac, E) MWCNTs/Pyr-AQ₂/Lac et F) MWCNTs Pyr-Ada/Lac. La contribution du courant capacitif a été soustraite. Pour toutes ces électrodes la meilleure modélisation est obtenue avec $n=1$

Tableau 1 : Paramètres de simulation obtenus pour chaque MWCNTs-bioélectrode

	E_0 (V vs. ECS)	J_{lim} (mA cm ⁻²)	p	βD_0
MWCNTs	0,50	-0,25	0,001	15
MWCNTs/P-Pyr	0,60	-1,6	0,02	10
MWCNTs/f-RGO	0,55	-0,54	0,1	9
MWCNTs/Pyr-AQ₁	0,53	-0,44	0,03	8
MWCNTs/Pyr-AQ₂	0,53	-0,75	0,5	-
MWCNTs/Pyr-ADA	0,55	-2,14	-	-

Le tableau 1 résume les paramètres utilisés pour la modélisation de chacune des courbes avec $n=1$. Lorsque les laccases sont adsorbées non spécifiquement, ou ne sont pas complètement orientées à la surface des CNTs, la vague de réduction est bien modélisée en utilisant l'équation 2. Ceci est le cas pour les MWCNTs seuls et fonctionnalisés par le pyrrole-pyrène, le pyrène-AQ₁ et le f-RGO. On observe des valeurs importantes de βD_0 (Tableau 1), qui sont dues à la dispersion du transfert d'électron. Néanmoins, la valeur de βD_0 la plus élevée est obtenue pour les électrodes de MWCNTs non fonctionnalisés, ce qui montre que ce type d'électrode ne favorise pas d'orientation particulière de la laccase comparé aux autres bioélectrodes.

Dans le cas du pyr-AQ₂, la vague de catalyse suit une cinétique plus simple en accord avec l'équation 3, sans dispersion du transfert d'électron.⁶¹

$$J = J_{lim} \frac{e_1 - e_2}{1 + e_1 + p e_1^\alpha} \quad (3)$$

Enfin, les électrodes modifiées avec l'adamantane suivent simplement l'équation 4 de Nernst :⁶²

$$J = J_{lim} \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{F}{RT} (E - E_{Cu(T1)}^0)\right)} \quad (4)$$

Dans ce cas, il n'y a plus de dispersion du transfert d'électron ni de limitation par le transfert hétérogène de l'électron. L'activité electrocatalytique est seulement limitée par la quantité d'enzymes immobilisées et son activité catalytique. Seulement deux paramètres, E_0 et J_{lim} sont pris en compte dans la modélisation de cette courbe.

La fonctionnalisation par le polypyrrole-pyrène, le pyrène-AQ₁ et le f-RGO ne permet pas d'obtenir une fonctionnalisation suffisante de la surface pour que toutes les enzymes soient correctement orientées. Le faible taux de recouvrement du f-RGO par l'antraquinone ou du dérivé pyrène-AQ₁ ne garantit pas que toutes les enzymes soient correctement orientées à la surface des MWCNTs. De plus, la possibilité de « π -stacking » de l'AQ à la surface des MWCNTs peut empêcher une bonne interaction de l'antraquinone avec l'enzyme. Dans le

cas du polypyrrole, une hétérogénéité de l'épaisseur du polymère peut également entraîner une dispersion des constantes de transfert d'électron.

Dans le cas du pyrène-AQ₂, un nombre supérieur de groupements anthraquinones est présent à la surface de l'électrode et l'architecture de ce dérivé favorise la présence d'une molécule d'anthraquinone ou de pyrène « libre » à la surface pour interagir avec l'enzyme et l'orienter favorablement. De plus, toutes les enzymes immobilisées sont connectées via cette approche.

Enfin, dans le cas du Pyr-Ada, le comportement purement nernstien de l'électrocatalyse indique : une orientation particulièrement favorable des enzymes à la surface des MWCNTs, l'absence de limitation par le transfert d'électron et donne accès à des densités de courant bioélectrocatalytique particulièrement élevées de l'ordre de -2 mA cm^{-2} .

Bien qu'il n'y ait pas de dispersion du transfert d'électron avec le pyr-AQ₂, l'approche utilisant le Pyr-Ada est trois fois plus performante que celle du Pyr-AQ₂ qui atteint une densité de courant maximal dans les mêmes conditions de $-0,75 \text{ mA cm}^{-2}$. Cette différence de performance est due à une plus grande quantité d'enzymes immobilisées par l'adamantane comparé à l'anthraquinone car pour ces deux molécules la cinétique du transfert d'électron n'est pas le facteur limitant la bioélectrocatalyse. On peut supposer que soit l'enzyme a une meilleure affinité envers l'adamantane comparé à l'anthraquinone, soit les Pyr-AQ₂ recouvrent plus faiblement la surface comme ils sont plus volumineux, et/ou qu'ils interagissent avec les nanotubes comme un tripode. Par conséquent moins d'anthraquinones sont disponibles à la surface de l'électrode pour interagir avec l'enzyme et donc moins d'enzymes sont immobilisées.

V.2 Modélisation moléculaire

Afin d'expliquer les résultats expérimentaux et de vérifier l'interaction qui existe entre les molécules d'ancrage (Pyrène, anthraquinone et adamantane) et l'enzyme, des études de modélisation moléculaire (MM) et de dynamique moléculaire (MD) ont été réalisées. Ces deux approches sont importantes pour estimer les énergies d'interaction et prédire les structures possibles des assemblages ligands/enzyme. Ces travaux ont été menés en collaboration avec le Dr. Hélène Jamet de l'équipe de chimie théorique du DCM à Grenoble.

Différentes approches classiques allant des études de docking aux simulations de dynamique moléculaire ont été menées conjointement afin de décrire l'interaction ligand/laccase, le but final étant la compréhension du mode d'interaction des molécules d'ancrage avec l'enzyme et la rationalisation des performances de chaque biocathode. En effet, on supposait que plus la molécule d'ancrage avait une affinité forte pour l'enzyme, plus la quantité de biomolécules immobilisées à la surface de l'électrode serait grande et/ou plus la distance T1 électrode serait faible et donc plus la biocathode serait performante.

Sur la base de la structure cristallographique, du docking⁶³ du complexe laccase Tv / 2,5-Xylidine, et en utilisant les méthodes de mécanique et dynamiques moléculaires, nous

avons entrepris de décrire les interactions entre le pyrène, l'antraquinone et l'adamantane avec l'enzyme. La 2,5-Xylidine est un inhibiteur qui interagit avec la poche hydrophobe de l'enzyme et qui a été co-cristallisé avec cette dernière.

V.2.1 Le docking

Pour étudier l'interaction entre les molécules d'ancrages et la laccase, chaque molécule a été « dockée » dans l'enzyme avec le programme Autodock.⁶⁴ Le docking permet de déterminer une position d'ancrage du ligand dans l'enzyme mais aussi d'évaluer les interactions entre les deux molécules. Son concept est basé sur le principe clé (ligand)/serrure (Laccase).

Les ligands ont été construits via l'interface graphique GaussView puis les géométries optimisées en mécanique quantique à l'aide de calculs type théorie de la fonctionnelle de la densité. Le logiciel utilisé est Gaussian09, la fonctionnelle B3LYP, et la base pour tous les atomes 6-31G. Pour le docking, des charges Gasteiger-huckel ont été attribuées aux ligands, ces charges étant généralement utilisées avec Autodock. Dans ce logiciel, les différentes interactions entre le ligand et la macromolécule sont calculées à partir d'un champ de force empirique (tel un jeu de paramètres décrivant les interactions entre atomes dans un système moléculaire) afin de trouver la position la plus favorable entre le ligand et la macromolécule. Un pré-calcul des interactions est effectué sur la macromolécule à l'aide du module Autogrid d'Autodock. Un cube de taille assez grande est placé au niveau de la macromolécule et en chaque point du cube est calculée l'énergie d'interaction (électrostatique et Van Der Waals) entre un atome sonde et la macromolécule (Figure 26). Le calcul est réalisé pour chaque type d'atome présent dans le ligand. Ensuite différentes positions du ligand dans le cube sont envisagées avec le module Autodock du logiciel. L'énergie de chaque position est évaluée à l'aide du calcul précédent d'Autogrid entre les atomes sondes et les points de la grille. À la fin de la simulation, un histogramme est obtenu et classe les différentes positions du ligand dans la macromolécule ainsi que leurs valeurs énergétiques. La meilleure position est celle qui revient le plus souvent et dont l'énergie est la plus basse. Lors du calcul, la macromolécule est fixée, donc seule la flexibilité du ligand est engagée.

La position la plus faible en énergie et la plus fréquente de tous les « runs » a été choisie comme mode de liaison. Nous avons aussi vérifié que l'interaction ligand/enzyme était en accord avec l'existence d'une chaîne d'ancrage au niveau du ligand avec les nanotubes de carbone. Toutes les molécules ont pénétré dans la cavité du substrat prouvant une fois de plus l'interaction entre chaque molécule d'ancrage et l'enzyme.

Ensuite des études de dynamique moléculaire ont été réalisées sur la position dockée pour prendre en compte la flexibilité de la protéine et étudier la stabilité de l'interaction macromolécule/ligand.

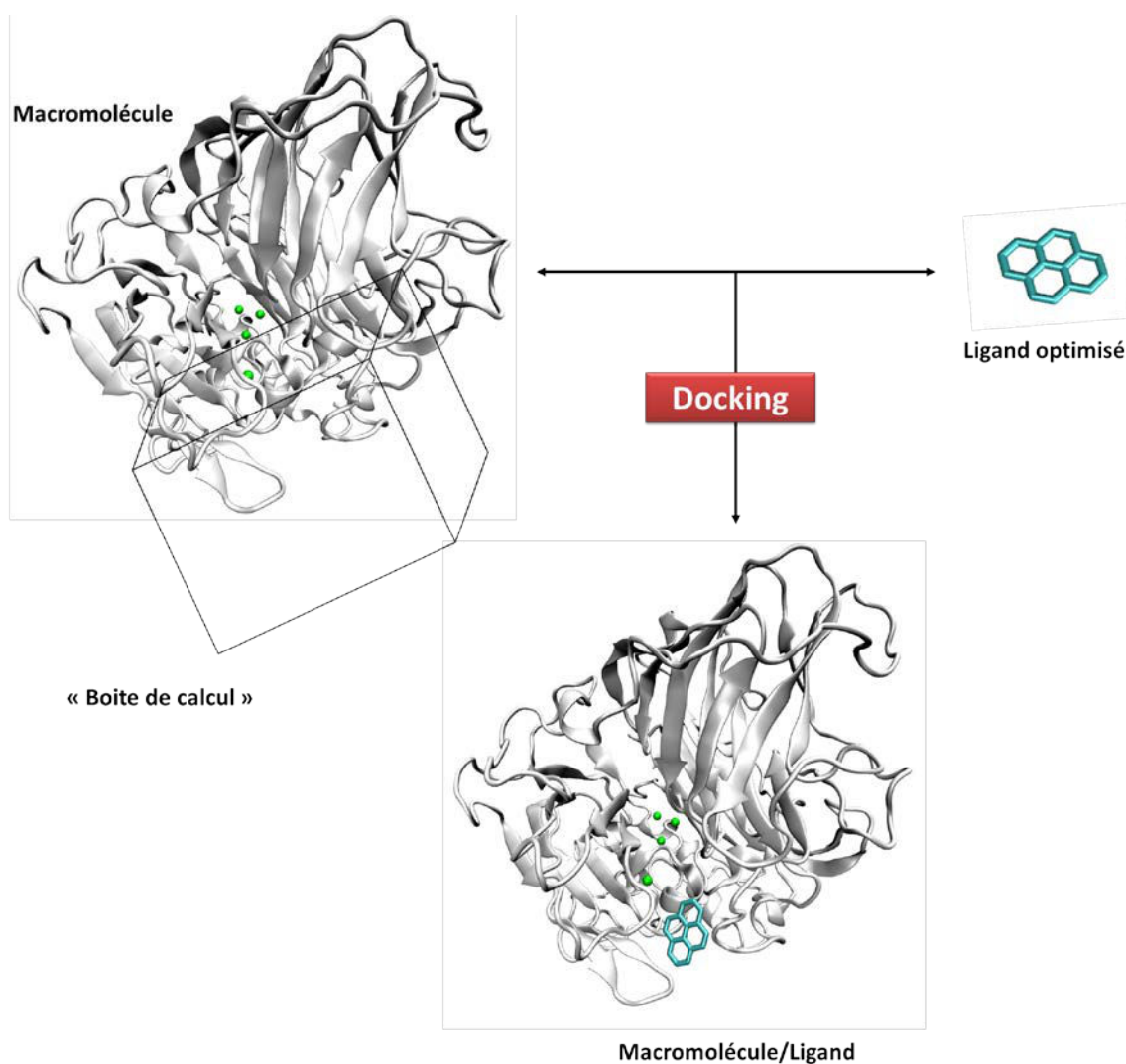


Figure 26 : Résumé du principe des études de Docking

V.2.2 La dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire permet par le calcul informatique de simuler l'évolution de l'interaction du complexe macromolécule/ligand au cours du temps. Dans ce calcul, la flexibilité de l'enzyme ainsi que la solvatation sont prises en compte (Figure 27).

Les dynamiques moléculaires ont été réalisées avec le logiciel Amber (version 12). Amber désigne à la fois le code et le champ de force empirique paramétrés pour simuler les biomolécules. Dans le cas de métalloenzymes, comme la laccase, des paramètres spécifiques doivent être développés pour définir les cuivres ainsi que les acides aminés liés à ces atomes. Pour cela, le programme MCPB (Metal Center Parameter Builder), basé sur un modèle électrostatique de liaison a été utilisé.⁶⁵ Les forces et les angles de liaison (entre les atomes métalliques et les acides aminés liés dans la métalloenzyme) ont été déterminés dans le cas du site T1 au niveau B3LYP/6-31G*. Les charges ont été obtenues par l'approche RESP (Restrained Electrostatic Potential) après un calcul B3LYP/6-31G*. Pour le site T2/T3, plus éloigné du site d'ancrage des ligands, un modèle non lié pour les cuivres a été utilisé.

Une dynamique moléculaire de 4ns sur la laccase sans ligand, solvatée, en mettant des contraintes sur le site T1 et en laissant le reste de la protéine et le solvant flexible a été réalisée. L'analyse de la trajectoire avec notamment le calcul des déviations des atomes par rapport à la conformation de départ (calcul du RMSD pour Root Mean Square Deviation) montre que la structure reste stable et valide nos paramètres. Ces derniers ont donc pu par la suite, être utilisés pour étudier la stabilité des complexes ligands/laccase obtenue par docking.

Des dynamiques moléculaires de 4 ns ont donc également été réalisées en présence explicite de molécules d'eau pour les complexes ligand/laccase. Le RMSD le long de la trajectoire de chaque complexe a été calculé par rapport à la position initiale du docking. Ce dernier augmente puis converge autour de 1.6 Å ce qui montre que pour chaque complexe une conformation stable et proche de la conformation initiale est obtenue. Les modes d'interactions de chaque ligand avec l'enzyme sont décrites en figure 28.

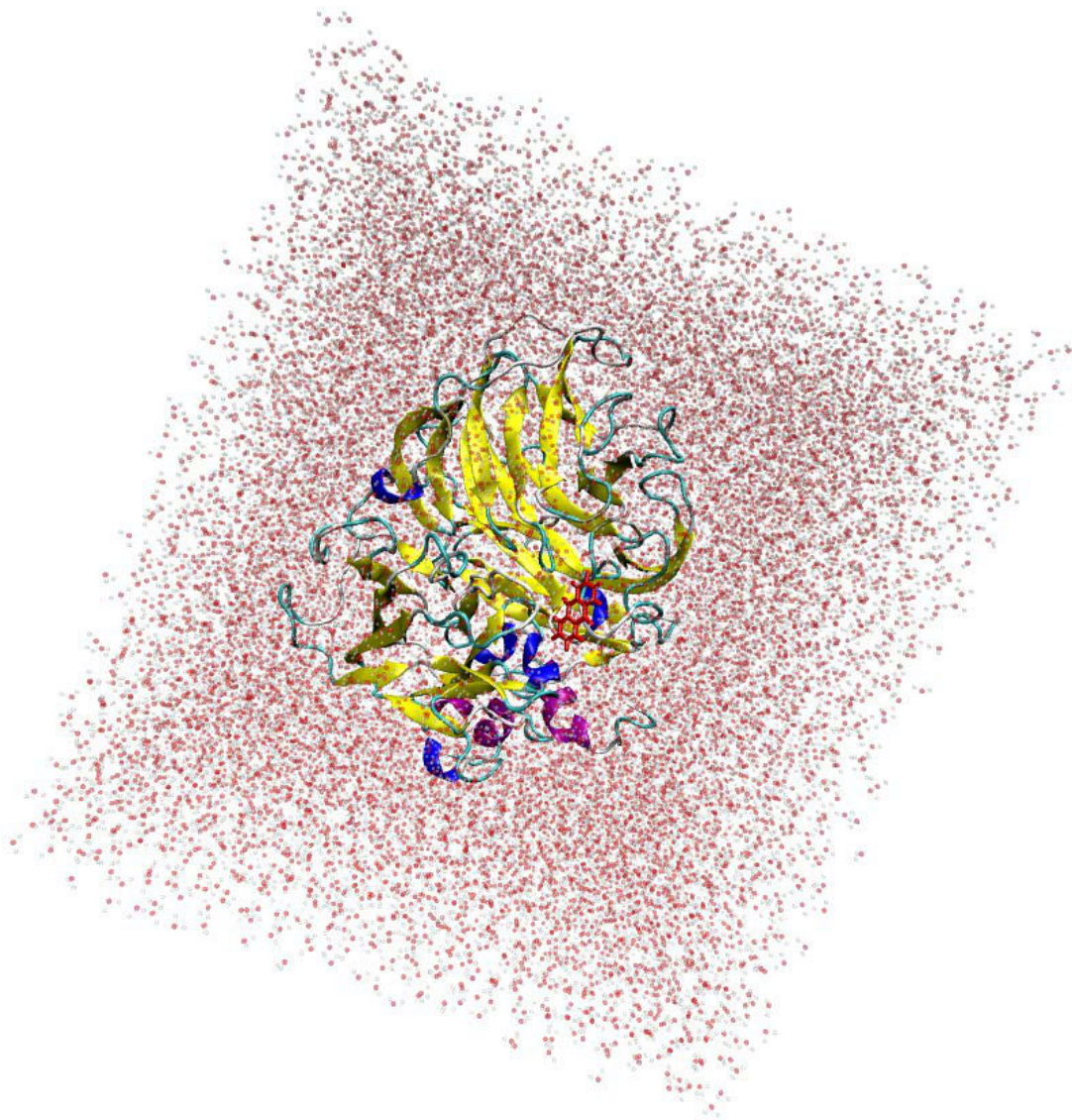


Figure 27 : Image issue de la dynamique moléculaire de la laccase avec l'anthraquinone. Les points rouges et blancs représentent l'eau

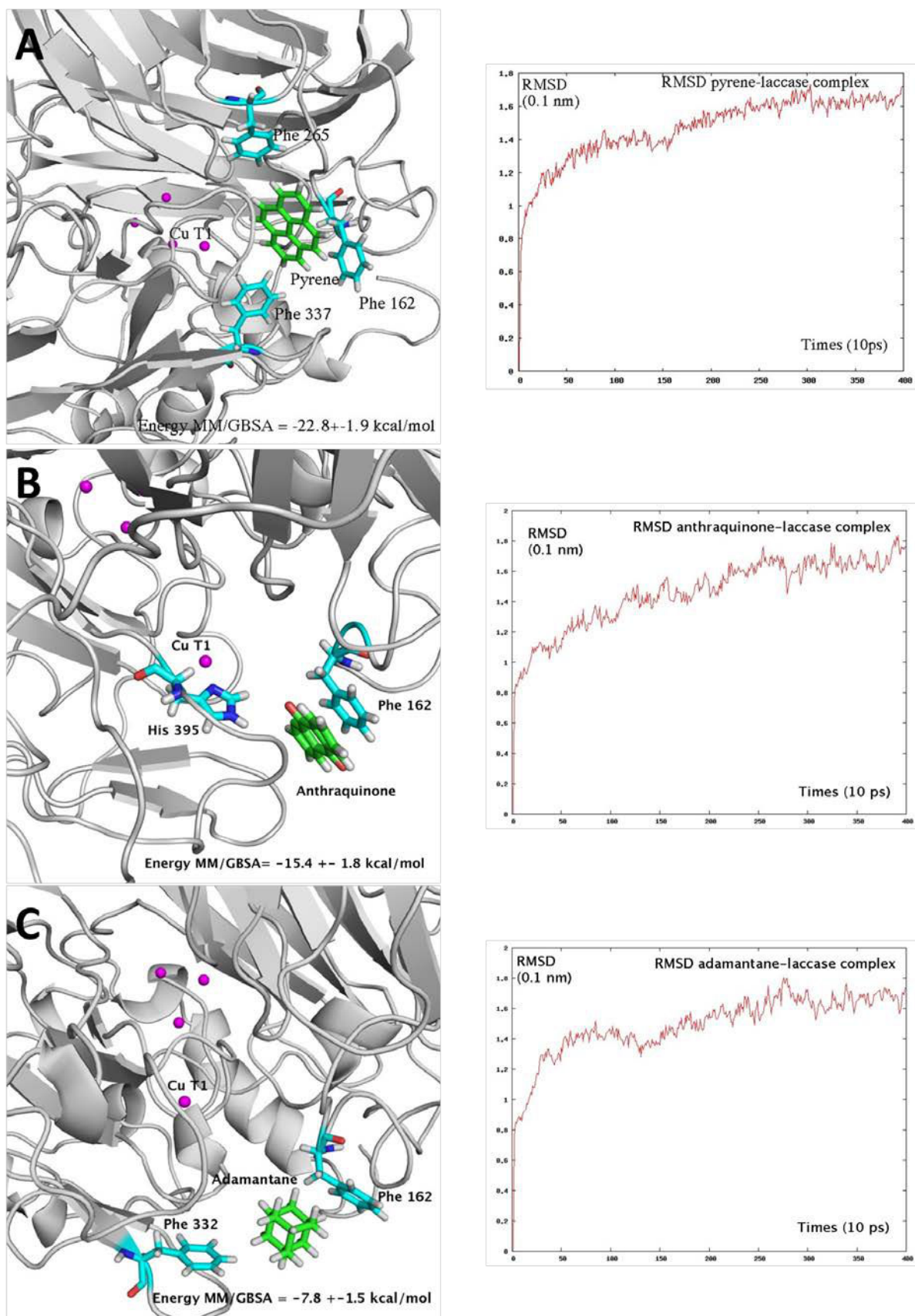


Figure 28 : Description des interactions protéine/ligand et énergie MM-GBSA ainsi que le RMSD calculé le long de la trajectoire de la DM (4ns): A) Pyrene/Laccase, B) Anthraquinone/Laccase et C) Adamantane/Laccase

La distance moyenne entre le centre T1 et le pyrène est de 8 Å, l'antraquinone 7,1 Å et l'adamantane 11,9 Å. L'adamantane semble moins retenu dans la cavité hydrophobe. Chaque ligand interagit avec la cavité par des interactions « faibles » de type hydrophobe ou van der Waals. Toutefois, on observe des interactions très nettes avec certains résidus comme l'illustre la figure 28. La position du pyrène est stabilisée par des interactions de type CH- π et « π -stacking » avec les phénylalanines 162, 265 et 337. L'antraquinone a une position assez proche de celle du pyrène, il interagit aussi par « π -stacking » avec la Phe 162 qui oriente sa position. De plus, le carbonyle forme une liaison hydrogène avec l'Histidine 395 qui est coordonnée au centre T1. Bien que l'adamantane soit moins retenu, sa position est stable grâce à deux interactions avec la même phénylalanine 162 (qui interagit avec l'antraquinone et le pyrène) mais également avec la phénylalanine 332. Des interactions de type CH- π sont formées entre ces résidus et l'adamantane, ce qui explique sa position stable.

L'énergie libre d'interaction des différents ligands avec la protéine a été estimée en post-traitement de la dynamique par la méthode MM-GBSA.⁶⁶ Cette dernière calcule à partir de différentes structures de la dynamique les contributions à cette énergie libre. À savoir les interactions électrostatiques et de van der Waals entre les ligands et la protéine (partie MM), ainsi que les contributions liées au solvant. Pour ce dernier, le calcul est effectué en utilisant un modèle implicite pour le solvant, le modèle de Born généralisé pour la partie polaire. Pour la partie non polaire la surface accessible au solvant a été calculée (GBSA).⁶⁶ Cela donne à moindre coût une bonne estimation des énergies libres d'interaction entre la protéine et un ligand.

En accord avec la description des interactions, l'énergie de liaison du pyrène et de l'antraquinone sont les plus importantes, respectivement -22,9 et -15,4 Kcal mol⁻¹ (Figure 28). Cependant la valeur obtenue avec l'adamantane (-7,8 Kcal mol⁻¹) illustre les interactions positives de la molécule avec la cavité hydrophobe de l'enzyme. Ces calculs théoriques démontrent que le groupement adamantane, à l'instar des groupements polycycliques interagit aussi de manière forte avec le domaine hydrophobe à la surface de l'enzyme. Cette étude théorique de modélisation moléculaire nous a permis de démontrer que toutes nos molécules utilisées pour immobiliser la laccase pénètrent bien et de manière stable au sein de la cavité hydrophobe de la protéine. Cependant, l'enzyme a une affinité plus forte pour le pyrène et l'antraquinone que pour l'adamantane, ce qui ne correspond pas aux résultats obtenus en électrochimie. Nous pouvons alors supposer que la fonctionnalisation des CNTs par des groupements pyrènes et anthraquinones entraîne une compétition d'interaction entre la paroi des CNTs et la cavité hydrophobe de l'enzyme. La stratégie du pyrène-adamantane est donc la meilleure approche pour fonctionnaliser les CNTs. En effet, la structure de l'adamantane n'est pas favorable à une interaction avec des CNTs mais elle est propice à une interaction avec l'enzyme. On obtient donc un taux de recouvrement maximal de la surface avec l'enzyme accompagné d'une réduction efficace du dioxygène sans dispersion du transfert d'électron et un transfert d'électron optimal.

B- Fonctionnalisation supramoléculaire de MWCNTs par des laccases modifiées spécifiquement à la surface par des groupements pyrènes

Outre la fonctionnalisation de la surface d'électrode pour immobiliser et orienter la laccase via sa poche hydrophobe comme présentée dans la première partie de ce chapitre ; d'autres approches peuvent être envisagées pour améliorer le transfert direct d'électron. En effet, l'immobilisation covalente de la laccase sur des nano-objets a montré une amélioration du DET avec le centre T1. Récemment, Gutierrez-Sanchez et al. ont reporté la fonctionnalisation d'électrode de graphite poreux par des nanoparticules d'or pour l'immobilisation orientée de la Lac *Th*.⁵⁵ Grâce à l'immobilisation covalente des nanoparticules et de la laccase, un DET efficace entre le T1 et l'électrode via les AuNPs est observé avec une constante de transfert d'électron supérieur à 400 s^{-1} . Atanassov et al. ont proposé la fonctionnalisation non covalente de CNTs avec des dérivés pyrènes portant un ester activé pour immobiliser efficacement la laccase, et ont obtenu d'excellentes densités de courant de réduction du dioxygène.^{21,22} Cependant, ces techniques covalentes s'appuient sur une réaction de formation de liaison avec la surface de l'enzyme dont la spécificité et l'efficacité est difficile à évaluer.

Dans cette partie, nous avons étudié l'immobilisation supramoléculaire orientée de la laccase sur des électrodes nanostructurées. La protéine utilisée pour cette étude est la laccase *Trametes sp. C30*, qui n'a jusqu'à présent jamais été étudiée en bioélectrochimie directe. Seules des expériences de MET en présence de $[\text{Os}(\text{III})(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^{2+}$ comme médiateur ont été réalisées avec l'enzyme native immobilisée sur électrode d'or.⁶⁷ La surface de l'enzyme a été modifiée spécifiquement par l'ajout d'un lien covalent portant à son extrémité un pyrène. La modification a eu lieu au niveau de deux lysines naturellement présentes aux environs du centre T2/T3. Nous avons également choisi un mutant de cette enzyme dans lequel les deux lysines précédentes ont été supprimées, et une nouvelle lysine a été introduite à proximité du centre T1. Ainsi, la même enzyme a pu être modifiée spécifiquement aux environs du centre T1 et du centre T2/T3. Ces deux enzymes modifiées ont été immobilisées à la fois sur des MWCNTs par « π -stacking » et sur β -CD-AuNPs par une interaction hôte-invité entre les β -CD et le pyrène. Les propriétés de transfert d'électron, ainsi que la réduction bioélectrocatalytique de l'oxygène ont été étudiées et modélisées. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. Thierry Tron et le Dr. Pierre Rousselot-Pailley de l'iSm2 (Institut des Sciences Moléculaire de Marseille).

I- Ingénierie de la Laccase *Trametes sp.C30*

L'expression, la purification et la modification des enzymes ont été réalisées au sein du laboratoire iSm2. L'enzyme LAC3 de *Trametes sp.C30* utilisée est une laccase fongique classique, exprimée de manière hétérologue et purifiée avec de haut rendement.^{68,69}

Sa séquence peptidique ne contient naturellement que deux lysines (K), K₄₀ et K₇₁ (GENEBANK AAR00925.1) situées à la surface du domaine N-terminal. Cette enzyme a été mutée pour obtenir le mutant UNIK₁₆₁, qui ne comporte qu'une seule lysine à sa surface. Brièvement, dans le cas du mutant, les lysines K₄₀ et K₇₁ ont été remplacées par une méthionine (M₄₀) et une histidine (H₇₁) respectivement ; et l'arginine 161 (R₁₆₁) a été remplacée par une lysine (K₁₆₁). Les structures cristallines de ces enzymes n'ont pas encore été obtenues, mais des modèles moléculaires ont été élaborés à partir de leurs séquences peptidiques (Figure 29). On peut ainsi observer que le mutant UNIK₁₆₁ à une seule lysine, située à la surface de la protéine et proche du centre cuivre T1. Inversement, dans le cas de LAC3, K₄₀ et K₇₁ sont localisées loin du site T1 dans la matrice de l'enzyme.

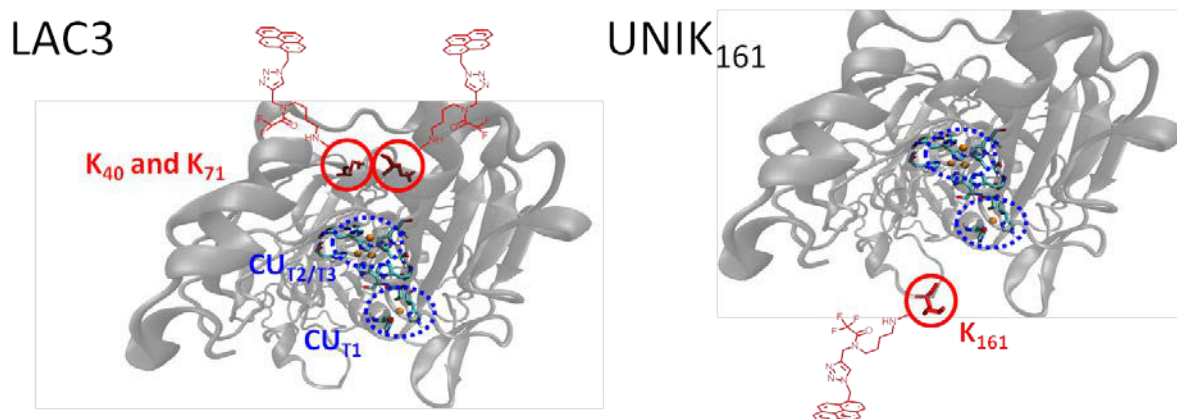


Figure 29 : Site spécifique de modification par des groupements pyrène pour LAC3 (K40 et K71) et UNIK161 (161 R>K). Les deux enzymes ont réagi avec le N-[1-(10b,10c-dihydro-pyren-4-ylmethyl)-1H-[1,2,3]triazol-4-ylmethyl]-2,2,2-trifluoro-N-(4-oxo-butyl)-acetamide

Des modifications hautement sélectives d'amines primaires présentes à la surface de protéines peuvent être obtenues dans des conditions douces.⁷⁰ Un réactif acétamide original, le (N-[1-(10b, 10c-dihydro-pyren-4-ylmethyl)-1H-[1,2,3]triazol-4-ylmethyl]-2,2,2-trifluoro-N-(4-oxo-butyl)-acetamide) a été synthétisé et utilisé pour la fonctionnalisation de laccase avec des pyrènes grâce à une réaction d'amination réductrice adaptée des travaux de Mc Farland et Francis.⁷⁰

L'efficacité de la fonctionnalisation a été évaluée à partir du ratio de l'absorbance relative des pyrènes ($\epsilon_{345} = 37500 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) et de l'enzyme ($\epsilon_{610} = 5600 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$). Typiquement, les résultats ont montré une fonctionnalisation par deux groupements pyrènes pour LAC3, et un groupement pyrène pour UNIK₁₆₁. Ces résultats sont en accord avec les séquences peptidiques des enzymes, et confirment bien la fonctionnalisation efficace de ces dernières.

II- Réduction du dioxygène par des biocathodes à base de MWCNTs et de laccase-pyrène

II.1 Elaboration des biocathodes

Deux stratégies différentes d'immobilisation des enzymes modifiées ont été évaluées. Dans un premier temps, l'immobilisation via des interactions de type « π -stacking » entre les pyrènes et la paroi des MWCNTs a été envisagée (Figure 30). Un deuxième type d'électrode nanostructurée a été élaboré par la modification d'un film de nanotube avec des AuNPs. Comme il a été décrit pour des protéines modifiées par des cyclodextrines, les MWCNTs ont été préalablement fonctionnalisés avec le pyrène adamantane (Figure 30).⁷¹ Une simple incubation de l'électrode de MWCNTs dans une solution de Pyr-Ada permet de recouvrir la surface de MWCNTs par ces groupements. Grâce à l'interaction forte qui existe entre l'adamantane et les β -CD dans l'eau, les β -CD-AuNPs sont immobilisées par des interactions supramoléculaires à la surface de la paroi des MWCNTs (Figure 20).

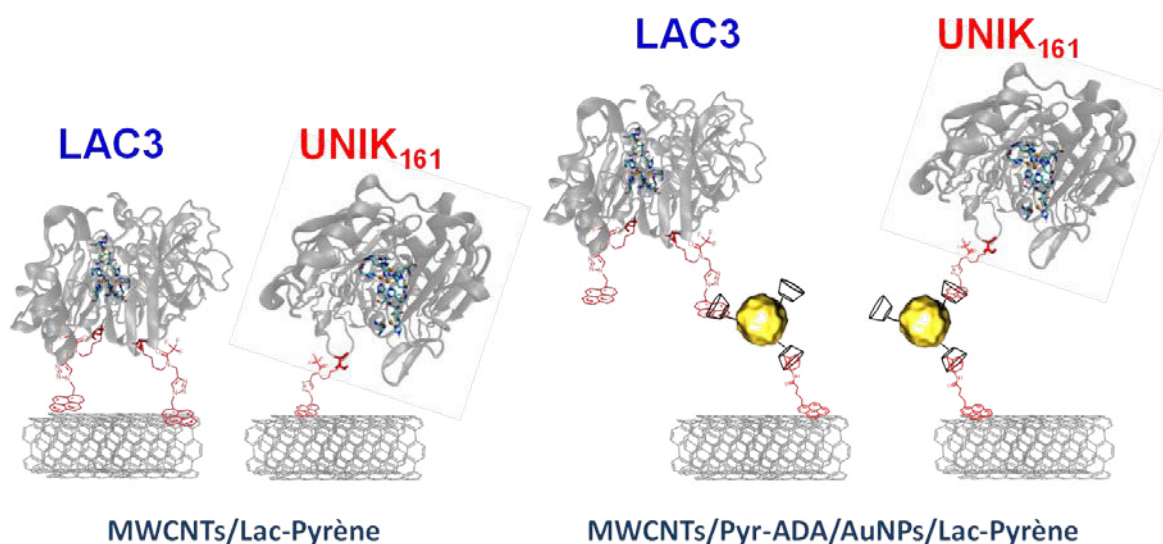


Figure 30 : Schéma représentatif de l'interaction par « π -stacking » des enzymes avec la paroi des MWCNTs et via une interaction hôte-invité avec les β -CD-AuNPs

II.1 Réduction bioélectrocatalytique de O₂

II.1.1 Electrodes MWCNTs/LAC3 et MWCNTs/UNIK₁₆₁

Les enzymes LAC3 et UNIK₁₆₁ modifiées par le pyrène ont été déposées par l'incubation des électrodes de MWCNTs dans des solutions d'enzymes à 70 μ M dans du tampon acétate (50 mM, pH 5). Une représentation schématique de la structure des électrodes ainsi que les voltammogrammes obtenus sous argon et sous oxygène sont exposés en figure 31. Des expériences de contrôles ont d'abord été effectuées sur les enzymes non modifiées par le pyrène et sur des enzymes modifiées par un dérivé pyrène-NHS, ciblant non-spécifiquement les groupements OH ou NH₂ à la surface des enzymes. Pour les deux enzymes, de faibles

courants catalytiques de réduction du dioxygène ont été observés par voltammétrie cyclique sous oxygène, montrant un faible transfert direct d'électron pour les enzymes directement adsorbées (CVs (a) en figure 31) et pour les enzymes immobilisées via les groupements pyrène-NHS (CVs (b) en figure 31). Pour ces dernières, une vague d'électrocatalyse est tout de même observée mais avec des densités de courant faibles de l'ordre de $-0,3 \text{ mA cm}^{-2}$ à 0 V vs. ECS . Inversement, lorsque les enzymes sont modifiées de manière spécifique par un pyrène via la réaction d'amination réductrice sur les résidus lysines, d'excellentes propriétés de transfert direct d'électron ont été observées (CVs (c) en figure 31). Le potentiel de départ de $0,6 \text{ V}$ a été mesuré pour les deux enzymes, suggérant que le transfert d'électron est réalisé via le centre T1 pour l'enzyme favorablement orientée, UNIK₁₆₁, mais aussi a priori pour l'enzyme native LAC3, orientée moins favorablement. Quel que soit le type de laccase-pyrène, une catalyse efficace de la réduction du dioxygène est observée avec des densités de courant maximal à 0 V de $-1,5 \text{ mA cm}^{-2}$ et $-1,15 \text{ mA cm}^{-2}$ pour LAC3 et UNIK₁₆₁ respectivement. De plus, la forme des vagues de catalyse est similaire. Ces observations sont discutées plus loin.

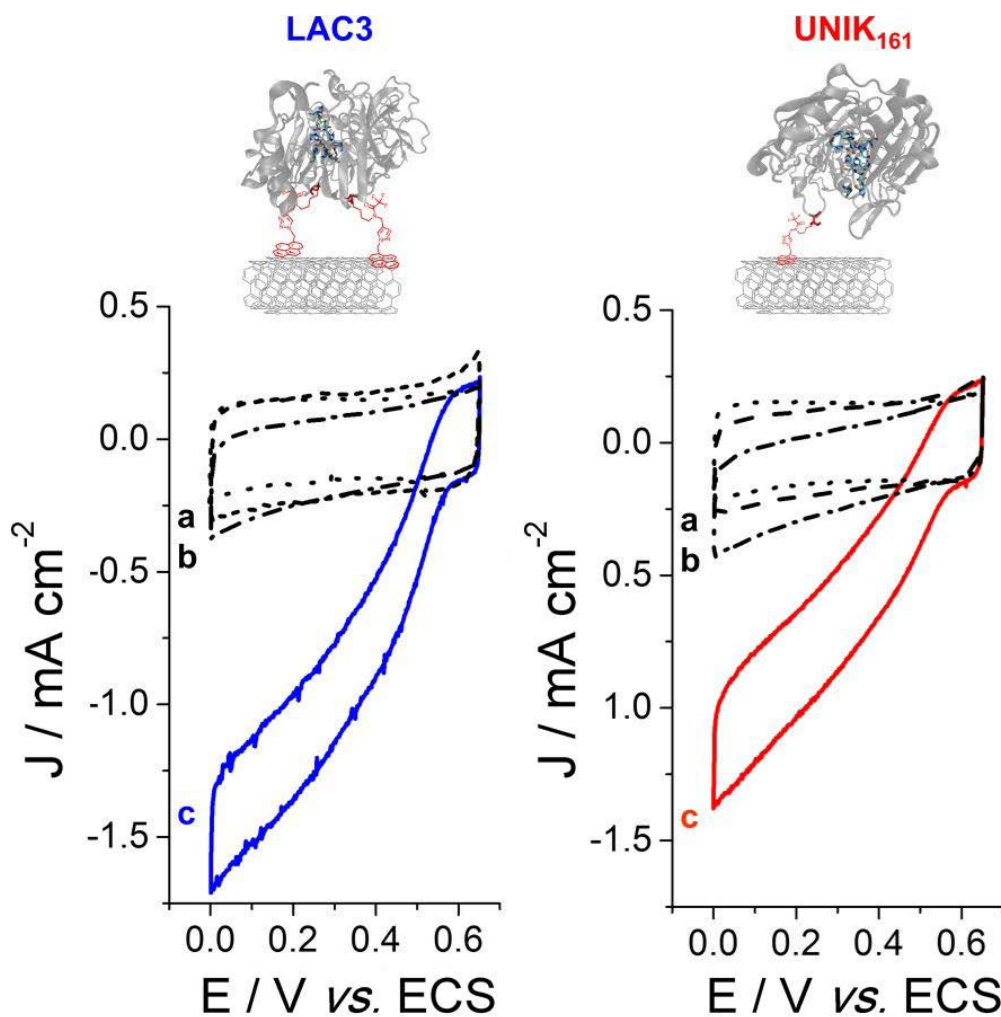


Figure 31 : CVs dans du TP ($0,2 \text{ M}$ pH 5) des électrodes de MWCNTs fonctionnalisées par LAC3 (bleu) et UNIK₁₆₁ (rouge) sous oxygène. (a, tiret) : enzyme native ; (b, tiret-pointillé) enzyme modifiée par le pyrène-NHS et (c, trait plein) : enzymes fonctionnalisées par le pyrène via amination réductrice. La CV en pointillé correspond à la CV de contrôle sous argon, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$

II.1.2 Electrodes MWCNTs/AuNPs/LAC3 et UNIK₁₆₁

Ces deux enzymes ont aussi été immobilisées sur des électrodes MWCNTs/Pyr-Ada/ β -CD-AuNPs. Les voltammogrammes obtenus pour ces électrodes sont présentés figure 32. Un potentiel de départ de 0,6 V a été observé comme sur les nanotubes non fonctionnalisés. Par rapport aux électrodes de MWCNTs, la principale différence repose sur une plus grande efficacité électrocatalytique des deux enzymes et d'une vague sigmoïdale pour les deux électrodes. Les deux enzymes montrent de fortes densités de courant électrocatalytique à 0 V de $-3,35 \text{ mA cm}^{-2}$ et $-2,75 \text{ mA cm}^{-2}$ pour LAC3 et UNIK₁₆₁ respectivement. Il est à noter que toutes ces électrodes montrent des CVs stables durant plusieurs heures de balayage continu en potentiel.

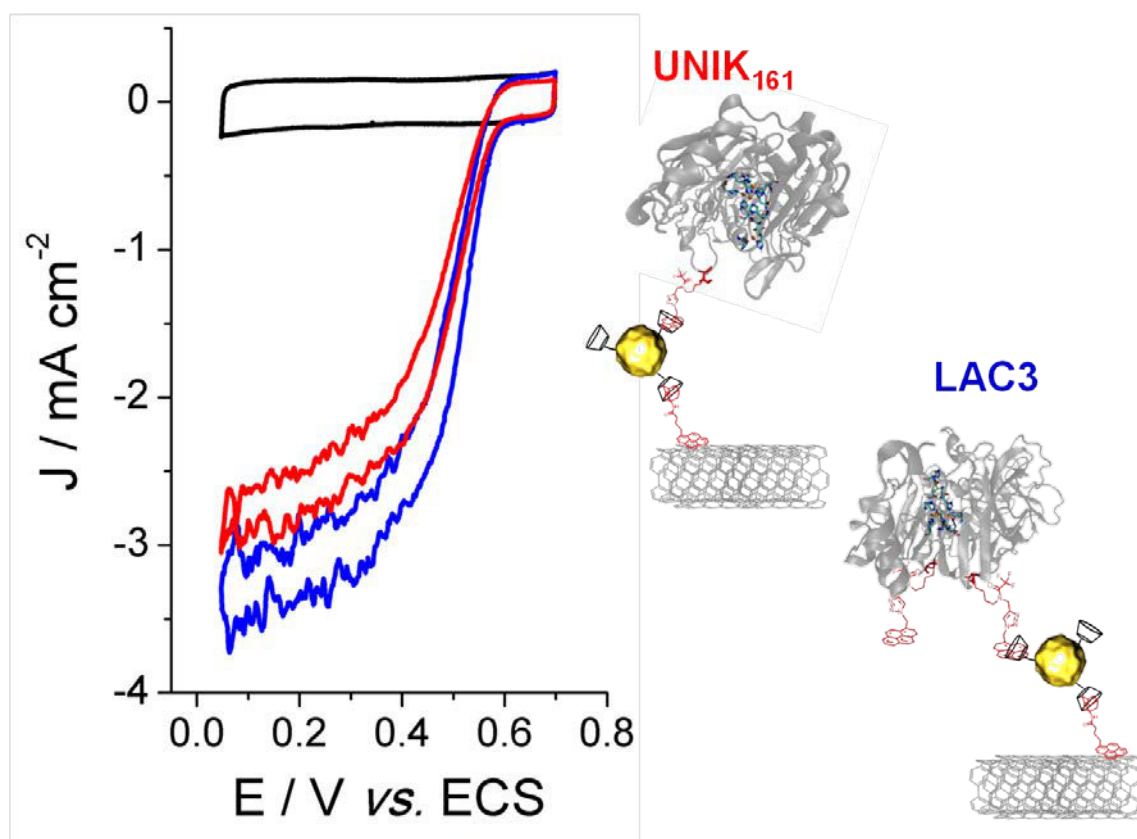


Figure 32 : CVs dans du TP (0,2 M, pH 5) pour LAC3-pyrène (bleu) et UNIK₁₆₁-pyrène (rouge) sur les électrodes MWCNTs/Pyr-Ada/AuNPs sous oxygène, (noir) CV contrôle sous argon. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$

Des expériences de chronoampérométrie ont également été réalisées pendant une heure à 0,2 V dans une solution saturée en dioxygène (Figure 33). Ces expériences témoignent de la stabilité du courant catalytique. Après une semaine de stockage, toutes les électrodes ont gardé environ 50 % de leur activité initiale et ont maintenu ces performances durant au moins un mois.

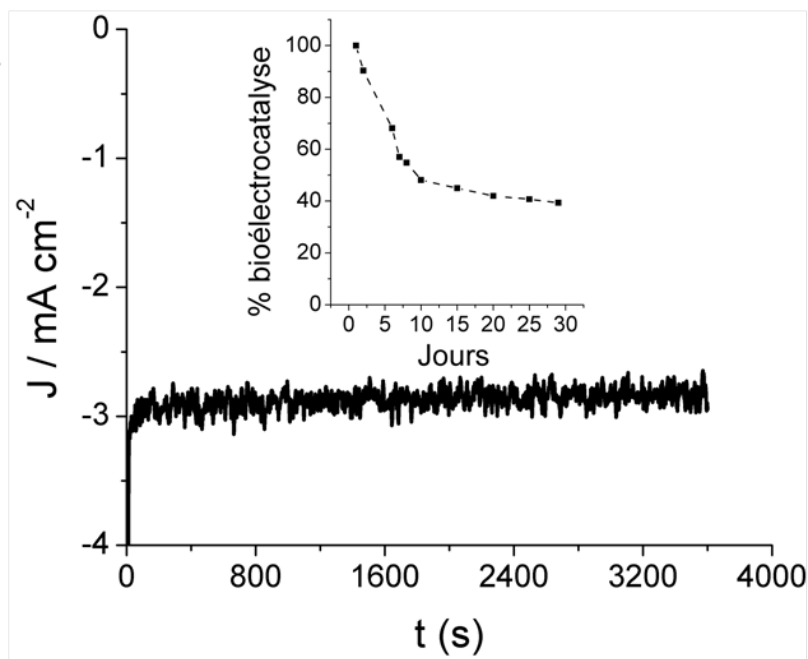


Figure 33 : Décharge de 1h par chronoampérométrie à $E_p = 0,2$ V vs. ECS dans du TP (0,2 M, pH 5) sous oxygène. Insert : Stabilité des bioélectrodes MWCNTs/Pyr-Ada/AuNPs/Laccase-pyrène mesurée par des décharges discontinues

Pour obtenir plus d'informations sur le mécanisme en DET pour les deux enzymes modifiées par le pyrène, le modèle de la dispersion du transfert d'électron a été utilisé (Cf. partie A V.1).

III- Modélisation électrochimique des électrodes MWCNTs et MWCNTs/AuNPs

III.1 Modélisation des électrodes MWCNTs

Les vagues de bioélectrocatalyse de LAC3 et UNIK₁₆₁-pyrène immobilisées sur MWCNTs sont bien modélisées avec $n = 1$ électron selon l'équation 2 (cf. V.1). Les courbes expérimentales et modélisées sont exposées en figure 34, et le tableau 2 résume les différents paramètres de modélisation des deux électrodes pour $n=1$.

Tableau 2 : Récapitulatif des paramètres de modélisation

	E_0 (V vs. ECS)	J_{lim} (mA cm ⁻²)	p	βD_0
MWCNTs/UNIK ₁₆₁	0,51	-1,29	0,04	13
MWCNTs/LAC3	0,51	-1,54	0,01	13

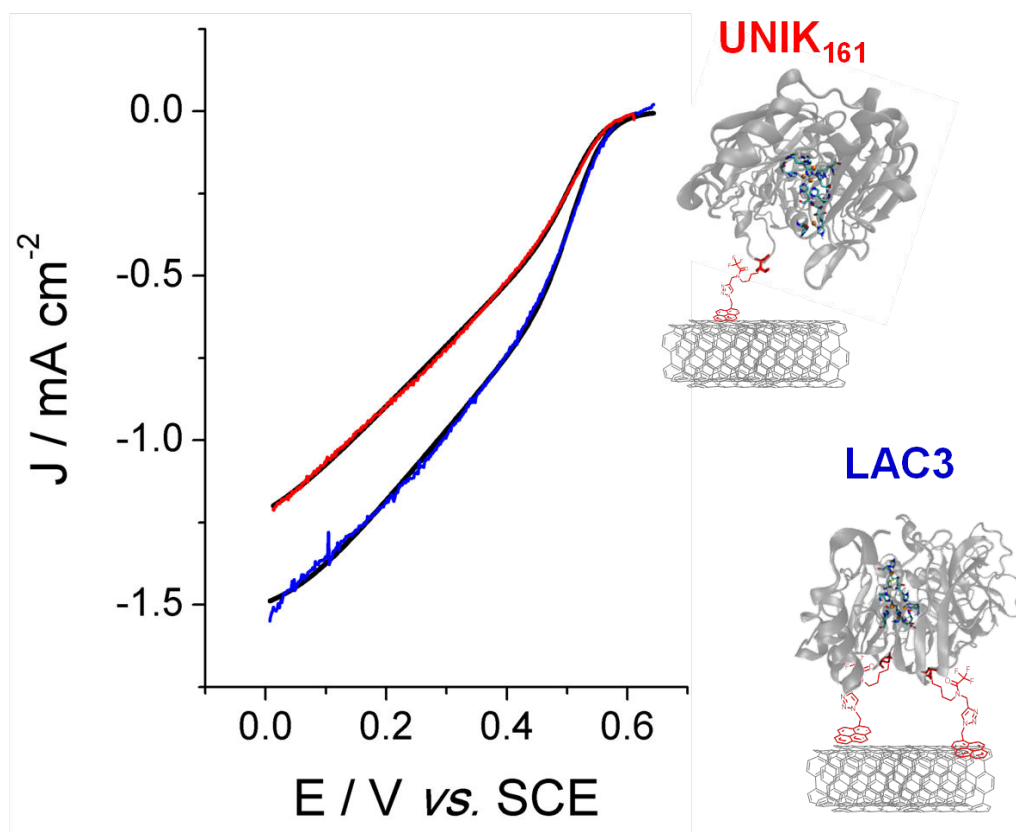


Figure 34 : Courbes simulées (noir) et expérimentales pour MWCNTs/LAC3-Pyrène (bleu) et MWCNTs/UNIK₁₆₁-pyrène (rouge) sous oxygène. Le background a été soustrait pour retirer la contribution du courant capacitif

Les simulations donnent $E_{\text{Cu(T1)}}^0$ autour de 0,51 V vs. ECS à pH 5 pour ces deux bioélectrodes. Cette valeur est en accord avec le potentiel redox précédemment estimé pour le centre T1 de LAC3 de *Trametes sp. C30* : 0,44 V vs. ECS à pH 6.⁶⁷ Cette valeur confirme aussi, comme il l'a été démontré pour la laccase de *Trametes versicolor* et *Trametes hirsuta*, que le centre T1 est le centre de contrôle de la réponse électrochimique dans les deux cas.

Pour ces deux enzymes, on observe une dispersion du transfert d'électron soulignée par les valeurs importantes de βD_0 . Les valeurs de p sont également du même ordre de grandeur pour les deux enzymes. Les densités de courant sont supérieures dans le cas de l'enzyme native avec des densités de courant de l'ordre de -1,54 et -1,29 mA cm⁻² pour LAC3 et UNIK₁₆₁ respectivement. Ces expériences montrent qu'UNIK₁₆₁ et LAC3 se comportent de manière très similaire sur MWCNTs malgré la position opposée des groupements pyrènes dans ces deux enzymes. En effet, nous aurions pu nous attendre à une orientation radicalement différente de chaque enzyme à la surface des MWCNTs, localisant le centre T1 de UNIK₁₆₁ plus proche de la surface de l'électrode que le centre T1 de LAC3. La présence d'une hétérogénéité similaire des constantes de transfert d'électron interfacial sur les électrodes de MWCNTs est confirmée par des valeurs similaires de βD_0 (13). Considérant le fait que les valeurs de β sont autour de 11 nm⁻¹ comme mesurées dans les enzymes à cuivre.³ Ceci permet d'estimer des distances de transfert d'électron variant de 1,2 nm, aussi bien pour LAC3 que pour UNIK₁₆₁. La modification spécifique de la laccase qui introduit un

pyrène à proximité du T1 de UNIK₁₆₁-pyrène n'apporte donc aucun avantage concernant le chemin du transfert d'électron comparé à LAC3-pyrène. Au contraire, la valeur de p plus faible obtenue pour LAC3-pyrène pourrait impliquer une valeur supérieure de k_0^{max} comparé à UNIK-pyrène ; comme les valeurs de k_{cat} sont similaires pour LAC3-pyrène et UNIK₁₆₁-pyrène (128 et 122 s⁻¹ respectivement, mesurées en solution en présence ABTS). Ceci suppose que le chemin du transfert d'électron est très efficace au sein des enzymes natives.

Les performances équivalentes des deux enzymes fonctionnalisées peuvent être expliquées par une position sous optimale du groupement pyrène de UNIK₁₆₁. Ce comportement peut indiquer que le T1 n'est pas suffisamment situé à la surface des enzymes pour une orientation favorable, qui est un facteur crucial pour améliorer l'activité bioélectrocatalytique et induire un gain au niveau des courants électrocatalytiques. La possibilité que le centre T2/T3 soit directement accessible à la surface de l'enzyme pour un DET avec les CNTs peut également être envisagée.⁷² Des expériences précédentes sur LAC3 ont montré que le potentiel redox du centre T3 n'était que de 6 mV plus bas que le centre T1.⁷³ Par conséquent, indépendamment de la localisation du pyrène à la surface de l'enzyme, l'avantage principal de la « pyrénisation » est de rapprocher efficacement l'enzyme des CNTs, par l'introduction localisée d'un domaine hydrophobe artificiel à la surface de l'enzyme et de permettre une interaction très intime avec la surface des MWCNTs.

III.2 Modélisation des électrodes MWCNTs/AuNPs

La modélisation des électrodes MWCNTs/AuNPs/enzyme-pyrène n'est pas satisfaisante selon l'équation 2. Dans ce cas, nous avons envisagé l'hypothèse que la vague d'électrocatalyse est décrite par la contribution d'enzymes directement immobilisées sur la surface des CNTs et d'enzymes immobilisées sur les AuNPs. Nous arrivons ainsi à une modélisation satisfaisante par la simple addition d'un processus catalytique nernstien (courbe c) aux courbes précédemment obtenues pour les enzymes immobilisées sur MWCNTs (courbe b). La somme des deux termes permet l'obtention, d'une courbe d qui modélise de manière très satisfaisante les courants catalytiques sur l'ensemble de la gamme de potentiel (Figure 35 et 36). Ce modèle montre que pour les bioélectrodes MWCNTs/AuNPs la bioélectrocatalyse correspond à la contribution des laccases connectées sur MWCNTs et sur AuNPs. Par conséquent, les laccases immobilisées sur β -AuNPs sont modélisées par un comportement purement nernstien avec seulement deux paramètres E_0 et J_{lim} . Les constantes obtenues pour chaque simulation sont récapitulées dans le tableau 3.

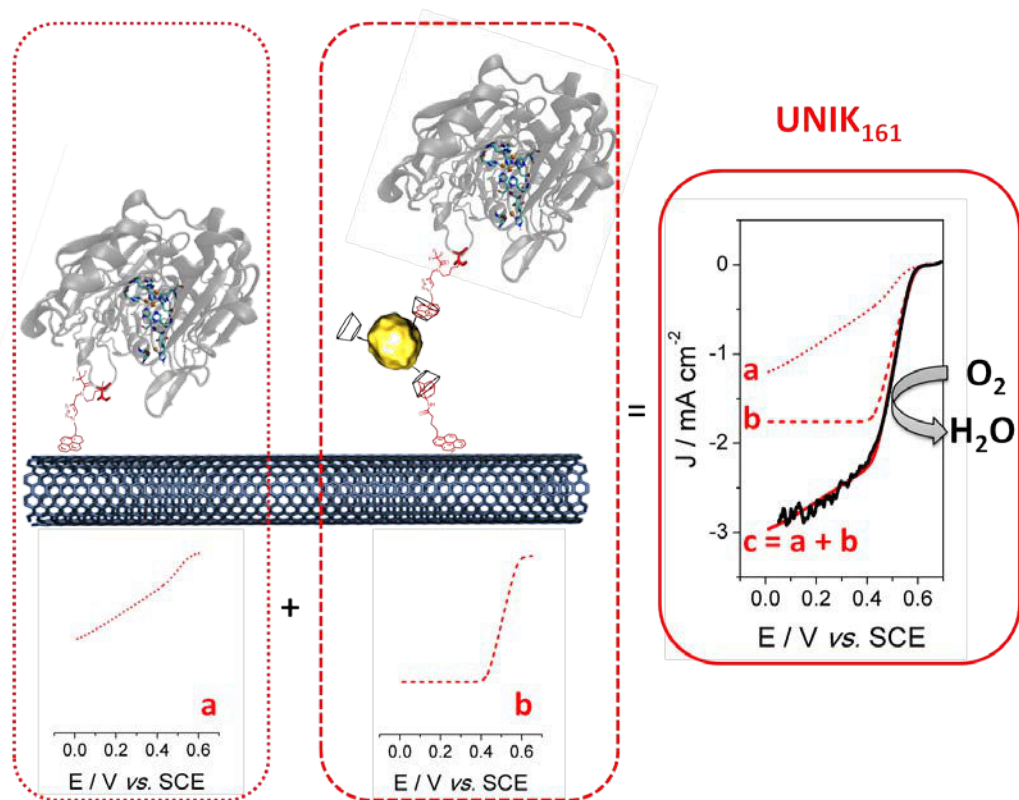


Figure 35 : a) Courbe de simulation des électrodes MWCNTs/UNIK161; b) Courbe de simulation de la contribution purement nernstienne des électrodes MWCNTs/Pyr-Ada/AuNPs/UNIK161 c) Courbe de simulation des électrodes MWCNTs/Pyr-Ada/AuNPs/UNIK161, qui correspond à la somme de (a)+(b). La courbe noire correspond à la courbe expérimentale. La contribution du courant capacitif a été soustraite

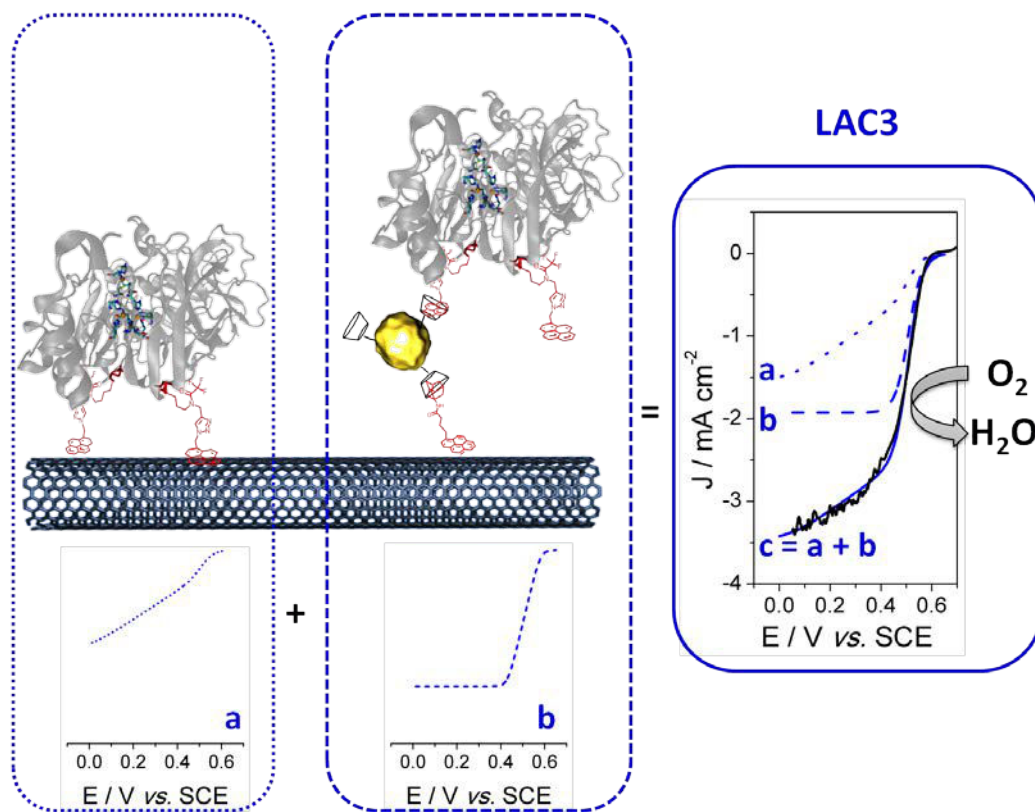


Figure 36 : Même résultats que la figure 35 mais pour LAC3

Tableau 3 : Récapitulatif des paramètres de modélisation

	E_0 (V vs. ECS)	J_{lim} (mA cm ⁻²)	p	βD_0
MWCNTs/Pyr-ADA/AuNPs/UNIK₁₆₁	0,51	-1,8	-	-
MWCNTs/Pyr-ADA/AuNPs/LAC3	0,51	-1,9	-	-

La principale différence dans les performances électrocatalytiques de ces enzymes immobilisées est comprise entre les MWCNTs et les AuNPs. Alors que les performances des laccases immobilisées sur MWCNTs sont bien modélisées en prenant en compte la dispersion des constantes de transfert d'électron, les performances de ces enzymes sur des AuNPs (après la soustraction de la contribution de la laccase immobilisée sur MWCNTs) sont bien modélisées en utilisant un modèle catalytique nernstien.

Grâce à la contribution séparée du modèle bioélectrocatalytique des MWCNTs et AuNPs, les propriétés supérieures des électrodes MWCNTs/AuNPs peuvent être attribuées aux excellentes propriétés du ET des AuNPs. Les AuNPs ont un effet très important sur l'homogénéisation des constantes du transfert d'électron menant à un modèle théorique sans dispersion du transfert d'électron observable. Cet effet des nanoparticules ainsi que le mélange du comportement du DET, entre les AuNPs et les électrodes de graphite de faible densité ont déjà été démontrés pour la laccase de *Trametes Hirsuta*.⁵⁵ Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'orientation de la laccase a un effet limité sur les propriétés du DET. Ce sont principalement les propriétés intrinsèques du ET des AuNPs qui sont responsables d'un DET efficace.

Les valeurs de J_{lim} à la fois des électrodes MWCNTs et MWCNTs/AuNPs indiquent que l'immobilisation des β -CD-AuNPs a un effet additionnel sur le taux de recouvrement de l'enzyme, augmentant les densités de courant catalytique, et est associée à un taux de recouvrement de l'enzyme de 130 %. Ceci est en accord avec les images MEB (Figure 20D) qui soulignent la grande surface couverte par les nanoparticules ainsi que la grande surface spécifique offerte par les CNTs. Les valeurs de J_{lim} plus élevées pour LAC3 comparées à UNIK₁₆₁, que ce soit pour les électrodes de MWCNTs et les électrodes MWCNTs/AuNPs sont probablement dues à un taux de recouvrement de LAC3 un peu plus élevé que celui obtenu pour UNIK₁₆₁. Ceci est probablement causé par la présence de deux groupements pyrènes sur LAC3 à la surface des MWCNTs et des β -CD-AuNPs alors que UNIK₁₆₁ qui n'en possède qu'un seul.

En conclusion, nous avons montré que la modification covalente et localisée de la surface de la laccase par un groupement pyrène permet un ciblage efficace des électrodes de MWCNTs et β -CD-AuNPs. Des courants catalytiques de plusieurs mA cm⁻² associés à des potentiels de réduction élevés font de cette laccase une alternative aux laccases commerciales. De manière inattendue, pour cette laccase, l'orientation par les centres T2/T3 ou par le centre T1 de l'enzyme a une influence négligeable sur le DET sur ces électrodes nanostructurées. Nous avons aussi clairement souligné la combinaison synergique des MWCNTs et des AuNPs.

Les MWCNTs montrent un DET efficace accompagné d'une dispersion du DET, tandis que les AuNPs montrent des propriétés de transfert d'électrons supérieures aux MWCNTs, augmentant le nombre d'enzymes connectées.

IV- Conclusion du chapitre II

Ce chapitre s'est focalisé sur l'élaboration de différentes architectures d'électrodes visant à utiliser les biocatalyseurs de type Laccase pour la réduction du dioxygène. La première partie a permis de décrire le développement de surfaces poreuses à base de MWCNTs et leurs fonctionnalisations non covalente par différentes molécules pour orienter favorablement l'enzyme et favoriser un transfert direct d'électron.

Une première stratégie basée sur l'électropolymérisation du P-Pyr à la surface des MWCNTs a permis d'élaborer une cathode générant une densité de courant maximal de $-1,8 \text{ mA cm}^{-2}$. De plus, après plus de deux semaines de décharge discontinue 50 % de l'activité catalytique initiale était maintenue. Ces travaux ont permis de démontrer la facilité de fonctionnalisation spatialement contrôlée des MWCNTs avec des groupements pyrènes pour l'immobilisation orientée de l'enzyme, grâce à l'utilisation d'un monomère de pyrrole modifié.

La fonctionnalisation covalente du RGO combinée à son immobilisation sur des MWCNTs s'est avérée être une autre approche très prometteuse pour le développement de biocathodes stables et efficaces. L'association de MWCNTs a permis de stabiliser le f-RGO à la surface des électrodes ainsi que d'augmenter la surface électroactive. Grâce à cette stratégie une biocathode délivrant une densité maximale de puissance de -1 mA cm^{-2} a été développée. Néanmoins, les taux de recouvrement doivent être améliorés afin de maximiser la quantité d'enzymes immobilisées. Seule la fonctionnalisation covalente de CNTs par amination réductrice d'un dérivé anthraquinone ($-3,5 \text{ mA cm}^{-2}$ sur électrode tournante)²⁶ ou la fonctionnalisation non covalente par un dérivé pyr-AQ₂ (-1 mA cm^{-2})³¹ réalise de meilleures performances.

Enfin, la stratégie basée sur la fonctionnalisation des MWCNTs par un dérivé Pyr-Ada s'est avérée être la plus efficace. En effet, ces nouvelles biocathodes délivrent une densité maximale de courant de $-2,5 \text{ mA cm}^{-2}$, et après 22 jours de décharges discontinues elles conservent 70 % de leur activité catalytique initiale. Cette biocathode est l'une des plus efficaces développées à ce jour. L'homogénéisation des constantes de transfert d'électron accompagnée de l'augmentation du taux de recouvrement de l'enzyme ont permis le développement d'une biocathode très performante pour réduire le dioxygène. L'association de cette électrode avec une anode à base d'une GDH-NAD⁺ dépendante pour le développement d'une biopile glucose/O₂ est présentée dans le chapitre IV.

Les performances de ces bioélectrodes ont été rationalisées grâce à la modélisation électrochimique et la modélisation moléculaire. La modélisation moléculaire a d'une part confirmé et décrit les interactions des différentes molécules avec la poche hydrophobe de l'enzyme. D'autre part, cette étude a démontré que l'affinité de l'enzyme pour la molécule

d'ancrage n'est pas le facteur qui détermine le taux de recouvrement de l'enzyme et donc l'activité bioélectrocatalytique des électrodes. En effet, la laccase a une plus grande affinité pour le pyrène et l'antraquinone que pour l'adamantane. La modélisation électrochimique a confirmé que toutes les enzymes présentes à la surface des électrodes MWCNTs/Pyr-Ada sont bien connectées et orientées. En effet, les vagues bioélectrocatalytiques de ces électrodes sont bien modélisées suivant l'équation de Nernst, en accord avec l'absence de dispersion des constantes de transfert d'électron. De plus, si l'on compare ces résultats à ceux obtenus avec le Pyr-AQ₂ pour lequel aucune dispersion des constantes cinétiques n'a également été observée, on observe que le dérivé adamantane permet l'immobilisation de trois fois plus d'enzymes. En accord avec la théorie, on suppose que l'interaction de la molécule d'ancrage avec la paroi des CNTs ou la taille de ces dernières sont les facteurs qui déterminent le taux de recouvrement de l'enzyme ainsi que l'homogénéisation des constantes cinétiques. Le Pyr-AQ₂ est plutôt volumineux comparé au Pyr-Ada. On présume que sa taille ou bien sa possibilité d'interaction avec la surface des CNTs limite la quantité d'antraquinone disponible pour immobiliser la laccase, ce qui expliquerait le plus faible taux de recouvrement de l'enzyme sur cette plateforme. Enfin, dans le cas du P-Pyr et du f-RGO, l'interaction du pyrène pour la paroi des CNTs ainsi que le faible taux de fonctionnalisation du f-RGO laissent des espaces où la laccase peut s'adsorber sans favoriser une orientation particulière à la surface de l'électrode. Ceci expliquerait la dispersion des constantes de transfert d'électron observée avec ces deux stratégies. D'autre part, la présence d'un matériau relativement peu conducteur (polymère ou feuillets de graphène) entre l'électrode et le site actif de l'enzyme peut également inhiber les transferts d'électrons et entraîner une dispersion apparente des transferts électroniques.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons étudié la fonctionnalisation supramoléculaire de MWCNTs par des laccases modifiées spécifiquement à la surface par des groupements pyrènes. La fonctionnalisation ciblée des enzymes ainsi que leurs immobilisations sur des plateformes de MWCNTs ou MWCNTs/AuNPs ont permis de développer de nouvelles architectures de biocathodes délivrant des densités de courant catalytique de plusieurs mA cm⁻² associées à des potentiels de réductions élevés. De plus ces travaux ont été réalisés avec une laccase qui n'avait jusqu'à présent jamais été connectée directement à l'électrode. L'introduction d'un pyrène à proximité du T1 ou du T2/T3 n'a qu'un effet négligeable sur l'homogénéisation des constantes de transfert d'électron entre l'enzyme et ces plateformes nanostructurées. L'avantage principal de la « pyrénisation » semble être un rapprochement efficace entre l'enzyme et les CNTs, par l'introduction d'un domaine hydrophobe artificiel à la surface de l'enzyme afin de permettre une interaction très intime avec la surface des MWCNTs. D'autre part, l'utilisation des AuNPs permet d'améliorer le DET. En effet, les MWCNTs montrent un DET efficace accompagné d'une dispersion du DET, tandis que les AuNPs montrent des propriétés de transfert d'électrons supérieures aux MWCNTs, augmentant le nombre d'enzymes connectées. Néanmoins, des études de modélisation moléculaires sont en cours afin de mieux appréhender le chemin du transfert d'électron dans le cas des enzymes orientées par le centre T1 ou par le TNC.

Ces travaux ont démontré que l'amélioration du DET de l'enzyme à la surface de l'électrode pouvait être obtenue par l'orientation de l'enzyme ainsi que par l'utilisation synergique de MWCNTs et des AuNPs. Grâce à ces deux stratégies des électrodes délivrant des densités de courant de plusieurs mA cm^{-2} sans dispersion des constantes de transfert d'électrons ont été obtenues. Le développement de biocathode 3D associées à ces stratégies permettrait d'immobiliser plus d'enzymes dans une orientation favorable pour augmenter l'activité catalytique de ces électrodes.

- (1) Tarasevich, M. R.; Yaropolov, A. I.; Bogdanovskaya, V. A.; Varfolomeev, S. D. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1979**, *6* (3), 393–403.
- (2) Morozova, O. V.; Shumakovich, G. P.; Gorbacheva, M. A.; Shleev, S. V.; Yaropolov, A. I. *Biochem. Mosc.* **2007**, *72* (10), 1136–1150.
- (3) Winkler, J. R.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (8), 2930–2939.
- (4) Blanford, C. F.; Heath, R. S.; Armstrong, F. A. *Chem. Commun.* **2007**, No. 17, 1710.
- (5) Johnson, D. L.; Thompson, J. L.; Brinkmann, S. M.; Schuller, K. A.; Martin, L. L. *Biochemistry (Mosc.)* **2003**, *42* (34), 10229–10237.
- (6) Shleev, S.; Pita, M.; Yaropolov, A. I.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Electroanalysis* **2006**, *18* (19–20), 1901–1908.
- (7) Shleev, S.; Tkac, J.; Christenson, A.; Ruzgas, T.; Yaropolov, A. I.; Whittaker, J. W.; Gorton, L. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20* (12), 2517–2554.
- (8) Shleev, S.; Jarosz-Wilkolazka, A.; Khalunina, A.; Morozova, O.; Yaropolov, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Bioelectrochemistry* **2005**, *67* (1), 115–124.
- (9) Bertrand, T.; Jolival, C.; Briozzo, P.; Caminade, E.; Joly, N.; Madzak, C.; Mougin, C. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, *41* (23), 7325–7333.
- (10) Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (40), 37663–37669.
- (11) Claus, H. *Micron* **2004**, *35* (1–2), 93–96.
- (12) Blanford, C. F.; Foster, C. E.; Heath, R. S.; Armstrong, F. A. *Faraday Discuss* **2009**, *140*, 319–335.
- (13) Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. *Electrochimica Acta* **2012**, *82*, 179–190.
- (14) de Poulpiquet, A.; Ciaccafava, A.; Lojou, E. *Electrochimica Acta* **2014**, *126*, 104–114.
- (15) Goff, A. L.; Holzinger, M.; Cosnier, S. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72* (5), 941–952.
- (16) Miyake, T.; Yoshino, S.; Yamada, T.; Hata, K.; Nishizawa, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (13), 5129–5134.
- (17) Zebda, A.; Gondran, C.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cinquin, P.; Cosnier, S. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 370.
- (18) Reuillard, B.; Le Goff, A.; Agnès, C.; Holzinger, M.; Zebda, A.; Gondran, C.; Elouarzaki, K.; Cosnier, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (14), 4892.
- (19) Deng, L.; Shang, L.; Wang, Y.; Wang, T.; Chen, H.; Dong, S. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10* (7), 1012–1015.
- (20) Halámková, L.; Halámek, J.; Bocharova, V.; Szczupak, A.; Alfonta, L.; Katz, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (11), 5040–5043.
- (21) Ramasamy, R. P.; Luckarift, H. R.; Ivnitski, D. M.; Atanassov, P. B.; Johnson, G. R. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (33), 6045.
- (22) Lau, C.; Adkins, E. R.; Ramasamy, R. P.; Luckarift, H. R.; Johnson, G. R.; Atanassov, P. *Adv. Energy Mater.* **2012**, *2* (1), 162–168.
- (23) Szczupak, A.; Halámek, J.; Halámková, L.; Bocharova, V.; Alfonta, L.; Katz, E. *Energy Environ. Sci.* **2012**, *5* (10), 8891.
- (24) MacVittie, K.; Halámek, J.; Halámková, L.; Southcott, M.; Jemison, W. D.; Lobel, R.; Katz, E. *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6* (1), 81–86.
- (25) Gutiérrez-Sánchez, C.; Jia, W.; Beyl, Y.; Pita, M.; Schuhmann, W.; De Lacey, A. L.; Stoica, L. *Electrochimica Acta* **2012**, *82*, 218–223.
- (26) Sosna, M.; Stoica, L.; Wright, E.; Kilburn, J. D.; Schuhmann, W.; Bartlett, P. N. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14* (34), 11882.
- (27) Stolarczyk, K.; Sepelowska, M.; Lyp, D.; Żelechowska, K.; Biernat, J. F.; Rogalski, J.; Farmer, K. D.; Roberts, K. N.; Bilewicz, R. *Bioelectrochemistry* **2012**, *87*, 154–163.

- (28) Karaśkiewicz, M.; Nazaruk, E.; Żelechowska, K.; Biernat, J. F.; Rogalski, J.; Bilewicz, R. *Electrochem. Commun.* **2012**, *20*, 124–127.
- (29) Stolarczyk, K.; Łyp, D.; Żelechowska, K.; Biernat, J. F.; Rogalski, J.; Bilewicz, R. *Electrochimica Acta* **2012**, *79*, 74–81.
- (30) Meredith, M. T.; Minson, M.; Hickey, D.; Artyushkova, K.; Glatzhofer, D. T.; Minteer, S. D. *ACS Catal.* **2011**, *1* (12), 1683–1690.
- (31) Bourourou, M.; Elouarzaki, K.; Lalaoui, N.; Agnès, C.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Maaref, A.; Cosnier, S. *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19* (28), 9371–9375.
- (32) Giroud, F.; Milton, R. D.; Tan, B.-X.; Minteer, S. D. *ACS Catal.* **2015**, *5* (2), 1240–1244.
- (33) Giroud, F.; Minteer, S. D. *Electrochem. Commun.* **2013**, *34*, 157–160.
- (34) Ding, S.-N.; Cosnier, S.; Holzinger, M.; Wang, X. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10* (10), 1423–1426.
- (35) Ionescu, R. E.; Jaffrezic-Renault, N.; Bouffier, L.; Gondran, C.; Cosnier, S.; Pinacho, D. G.; Marco, M.-P.; Sánchez-Baeza, F. J.; Healy, T.; Martelet, C. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23* (4), 549–555.
- (36) Sabouraud, G.; Sadki, S.; Brodie, N. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29* (5), 283–293.
- (37) Le Goff, A.; Gorgy, K.; Holzinger, M.; Haddad, R.; Zimmerman, M.; Cosnier, S. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17* (37), 10216–10221.
- (38) Vaz-Dominguez, C.; Campuzano, S.; Rüdiger, O.; Pita, M.; Gorbacheva, M.; Shleev, S.; Fernandez, V. M.; De Lacey, A. L. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24* (4), 531–537.
- (39) McCreery, R. L. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (7), 2646–2687.
- (40) Pumera, M. *Chem. Rec.* **2012**, *12* (1), 201–213.
- (41) Brownson, D. A. C.; Lacombe, A. C.; Gómez-Mingot, M.; Banks, C. E. *RSC Adv* **2012**, *2* (2), 665–668.
- (42) Brownson, D. A. C.; Munro, L. J.; Kampouris, D. K.; Banks, C. E. *RSC Adv.* **2011**, *1* (6), 978.
- (43) Kampouris, D. K.; Banks, C. E. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (47), 8986.
- (44) Güell, A. G.; Ebejer, N.; Snowden, M. E.; Macpherson, J. V.; Unwin, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (17), 7258–7261.
- (45) Le Goff, A.; Reuillard, B.; Cosnier, S. *Langmuir* **2013**, *29* (27), 8736–8742.
- (46) Paulus, G. L. C.; Wang, Q. H.; Strano, M. S. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (1), 160–170.
- (47) Bekyarova, E.; Itkis, M. E.; Ramesh, P.; Berger, C.; Sprinkle, M.; de Heer, W. A.; Haddon, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (4), 1336–1337.
- (48) Lomeda, J. R.; Doyle, C. D.; Kosynkin, D. V.; Hwang, W.-F.; Tour, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (48), 16201–16206.
- (49) Fang, M.; Wang, K.; Lu, H.; Yang, Y.; Nutt, S. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (38), 7098.
- (50) Filip, J.; Tkac, J. *Electrochimica Acta* **2014**, *136*, 340–354.
- (51) Shan, C.; Yang, H.; Song, J.; Han, D.; Ivaska, A.; Niu, L. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (6), 2378–2382.
- (52) Zuo, X.; He, S.; Li, D.; Peng, C.; Huang, Q.; Song, S.; Fan, C. *Langmuir* **2010**, *26* (3), 1936–1939.
- (53) Liu, K.; Zhang, J.; Yang, G.; Wang, C.; Zhu, J.-J. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12* (3), 402–405.
- (54) Haddad, R.; Holzinger, M.; Villalonga, R.; Neumann, A.; Roots, J.; Maaref, A.; Cosnier, S. *Carbon* **2011**, *49* (7), 2571–2578.
- (55) Gutiérrez-Sánchez, C.; Pita, M.; Vaz-Domínguez, C.; Shleev, S.; De Lacey, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (41), 17212–17220.

- (56) Hexter, S. V.; Esterle, T. F.; Armstrong, F. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (24), 11822–11833.
- (57) dos Santos, L.; Climent, V.; Blanford, C. F.; Armstrong, F. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (42), 13962.
- (58) Agbo, P.; Heath, J. R.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (39), 13882–13887.
- (59) Kamitaka, Y.; Tsujimura, S.; Kataoka, K.; Sakurai, T.; Ikeda, T.; Kano, K. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *601* (1-2), 119–124.
- (60) Léger, C.; Jones, A. K.; Albracht, S. P. J.; Armstrong, F. A. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (50), 13058–13063.
- (61) Hexter, S. V.; Grey, F.; Happe, T.; Climent, V.; Armstrong, F. A. *PNAS* **2012**, *109* (44), 18233.
- (62) Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; others. *Electrochem. Methods 2nd Ed Wiley N. Y.* **2001**.
- (63) Cambria, M. T.; Di Marino, D.; Falconi, M.; Garavaglia, S.; Cambria, A. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2010**, *27* (4), 501–509.
- (64) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J.; others. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19* (14), 1639–1662.
- (65) Peters, M. B.; Yang, Y.; Wang, B.; Füstí-Molnár, L.; Weaver, M. N.; Merz, K. M. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6* (9), 2935–2947.
- (66) Kollman, P. A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D. A.; Cheatham, T. E. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33* (12), 889–897.
- (67) Balland, V.; Hureau, C.; Cusano, A. M.; Liu, Y.; Tron, T.; Limoges, B. *Chem. – Eur. J.* **2008**, *14* (24), 7186–7192.
- (68) Klonowska, A.; Gaudin, C.; Asso, M.; Fournel, A.; Réglie, M.; Tron, T. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *36* (1), 34–41.
- (69) Mekmouche, Y.; Zhou, S.; Cusano, A. M.; Record, E.; Lomascolo, A.; Robert, V.; Simaan, A. J.; Rousselot-Pailley, P.; Ullah, S.; Chaspoul, F.; Tron, T. *J. Biosci. Bioeng.* **2014**, *117* (1), 25–27.
- (70) McFarland, J. M.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (39), 13490–13491.
- (71) Holzinger, M.; Baur, J.; Haddad, R.; Wang, X.; Cosnier, S. *Chem Commun* **2011**, *47* (8), 2450–2452.
- (72) Farver, O.; Wherland, S.; Koroleva, O.; Loginov, D. S.; Pecht, I. *FEBS J.* **2011**, *278* (18), 3463–3471.
- (73) Lazarides, T.; Sazanovich, I. V.; Simaan, A. J.; Kafentzi, M. C.; Delor, M.; Mekmouche, Y.; Faure, B.; Réglie, M.; Weinstein, J. A.; Coutsolelos, A. G.; Tron, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (8), 3095–3103.

Chapitre III - Biocathodes enzymatiques à base de Bilirubine Oxydase pour la réduction d'O₂

I- GENERALITES.....	123
I.1 LA BILIRUBINE OXYDASE : UNE MCO PROMETTEUSE.....	123
I.2 VERS L'ELABORATION DE BIOCATHODES EFFICACES: CONNEXION EN TRANSFERT DIRECT D'ELECTRON.....	123
I.2.1 Immobilisation par réticulation de la BOD	124
I.2.2 Immobilisation par encapsulation de la BOD au sein d'un polymère	124
I.2.3 Immobilisation par formation d'un lien covalent	125
I.2.4 Immobilisation par adsorption de l'enzyme	125
II- MODIFICATION SUPRAMOLECULAIRE DES MWCNTS POUR L'IMMOBILISATION ET LA CONNEXION DE LA BOD MV.....	128
II.1 CARACTERISATION DES ELECTRODES EN ABSENCE DE SUBSTRAT	129
II.2 REDUCTION BIOELECTROCATALYTIQUE DE O ₂	131
II.3 MODELISATION ELECTROCHIMIQUE	132
II.4 CARACTERISATION DES BIOCATHODES EN MET.....	135
III- MODIFICATION COVALENTES DE CNTS POUR LA CONNEXION ET L'IMMOBILISATION DE LA BOD MV.....	137
III.1 FONCTIONNALISATION COVALENTE DE CNTS PAR L'ACIDE 6-AMINO-2-NAPHTHOÏQUE	137
III.2 FONCTIONNALISATION COVALENTE PAR LE 4-(2-AMINOETHYL) BENZENE DIAZONIUM TETRAFLUOROBORATE.....	139
III.3 CARACTERISATION DES ELECTRODES EN PRESENCE ET EN ABSENCE DE SUBSTRAT	142
III.4 MODELISATION ELECTROCHIMIQUE	144
IV- ELABORATION DE BIOCATHODE A AIR A BASE DE BOD EN TRANSFERT DIRECT D'ELECTRON	146
IV.1 ADAPTATION DES STRATEGIES D'IMMOBILISATION ET D'ORIENTATION DE LA BOD AUX BIOCATHODES RESPIRANTES :	148
IV.1.1 Elaboration des électrodes	148
IV.1.2 Réduction bioélectrocatalytique du dioxygène	149
IV.2 ELABORATION DE BIOCATHODES RESPIRANTES A BASE DE BOD <i>BACILLUS PUMILUS</i>	151
IV.2.1 Généralités	151
IV.2.2 Immobilisation et connexion de la BOD <i>Bp</i>	152
V- COMPARAISON DES BIOCATHODES A AIR A BASE DE BOD <i>BP</i> ET BOD <i>MV</i>	155
VI- CONCLUSION DU CHAPITRE III	155

I- Généralités

I.1 La Bilirubine oxydase : une MCO prometteuse

La Bilirubine oxydase (BOD) est une autre enzyme de la famille des MCOs. Comme les autres enzymes appartenant à cette famille, elle possède les mêmes centres cuivre T1, T2 et T3 que les laccases. Ces enzymes sont capables d'oxyder de multiples substrats tels que la bilirubine, les phénols, l'ascorbate et divers ions métalliques. La BOD catalyse également la réduction concomitante à quatre électrons de l'oxygène en eau, ce qui en fait une autre enzyme de choix pour l'élaboration de cathodes enzymatiques.¹

Découvertes en 1981 par Tanaka et Murao,² elles ont d'abord été utilisées pour la détection de la bilirubine, dont la quantification est essentielle pour le diagnostic de la jaunisse. Ces enzymes ont donc été utilisées pour la construction de biocapteurs³ biochimiques⁴ ou bioélectrochimiques⁵ de la bilirubine. Ce n'est qu'en 2001 que Tsujimura a intégré pour la première fois cette enzyme aux biocathodes enzymatiques via un transfert d'électron médié par l'ABTS.⁶

Elles se différencient des laccases notamment par leur résistance aux ions chlorures à pH neutre, ainsi que par leur activité catalytique sur une plus grande gamme de pH.^{3,7} A l'heure actuelle, ces enzymes sont énormément étudiées pour leur capacité à réduire l'oxygène dans des conditions physiologiques.^{3,7} Les BOD des champignons *Myrothecium verrucaria* (BOD *Mv*) et *Trachyderma tsunodae* (BOD *Tt*) ont particulièrement été étudiées, notamment à cause de leur disponibilité commerciale. Cependant, des bilirubine oxydases de diverses origines ont été identifiées, isolées et caractérisées comme la BOD bactérienne de *Bacillus pumilus* (BOD *Bp*).⁸

Malgré de nombreuses similarités structurales avec la Lac, la poche de fixation du substrat de la BOD *Mv* est majoritairement hydrophile, bien que la surface environnante montre un caractère hydrophobe.⁹ Cette caractéristique contraste avec les laccases fongiques, comme celle de *Trametes versicolor* où le site de fixation du substrat est majoritairement hydrophobe.¹⁰

I.2 Vers l'élaboration de biocathodes efficaces: Connexion en transfert direct d'électron

La connexion directe de la BOD a été réalisée pour la première fois en 2004,¹¹ et a depuis été largement étudiée sur différents matériaux d'électrode.⁷ L'élaboration de cathode efficace basée sur le DET repose sur plusieurs facteurs clés : l'élaboration de grande surface spécifique conductrice, l'immobilisation stable de l'enzyme à la surface de l'électrode et l'orientation favorable de l'enzyme. En effet, les constantes de transfert d'électron entre le centre T1 et l'électrode diminuent exponentiellement avec l'augmentation de la distance

entre ces derniers.¹² En conséquence, l'orientation de la BOD est un facteur clé pour améliorer l'efficacité des biocathodes. Plusieurs stratégies ont été mises en œuvre pour optimiser les biocathodes à base de BOD en utilisant différentes méthodes pour immobiliser un maximum d'enzyme à la surface de l'électrode.

I.2.1 Immobilisation par réticulation de la BOD

En 2006, Mao et al. ont mis en évidence la réduction de O₂ par la BOD *Mv* réticulée avec du glutaraldéhyde et de l'albumine bovine sérique (BSA) sur des nanotubes de carbone fonctionnalisés de façon non covalentes avec des dérivés du cellulose.¹³ Par la suite, les mêmes auteurs ont utilisé cette stratégie sur des électrodes composites de SWCNTs et de fibres de carbone. Cette cathode délivre à pH neutre une densité de courant de -0,3 mA cm⁻² à 0,1 V vs. Ag/AgCl sous air, et a été utilisée dans une biopile miniature glucose/O₂.¹⁴ Plus récemment, Shim et al. ont développé un système de détection du glucose auto alimenté par une cathode de BOD *Mv* réticulée sur du kejeten black.¹⁵

Cette méthode est avantageuse du fait de sa simplicité de mise en œuvre et de la possibilité d'immobiliser de manière stable une grande quantité d'enzymes. Cependant elle présente l'inconvénient de pouvoir dénaturer les protéines et donc de diminuer l'activité et la spécificité de ces dernières. Les autres méthodes d'immobilisation de la BOD ont donc été plus largement étudiées.

I.2.2 Immobilisation par encapsulation de la BOD au sein d'un polymère

Plusieurs études sur l'encapsulation de la protéine au sein de polymères ont été menées. En 2005, Tsujimara et al. ont décrit une biocathode basée sur l'immobilisation électrostatique de la BOD *Mv* dans une matrice cationique de poly-lysine.¹⁶ Depuis, diverses encres à base de polymères, d'enzymes et de matériaux carbonés ont été mises en œuvre pour étudier le DET.

Habrioux et al. ont élaboré une encre à base de Vulcan® XC72 et de nafion, qu'ils ont déposé sur des électrodes de carbone vitreux.¹⁷ Cette bioélectrode délivre une densité de courant de -0,2 mA cm⁻² à 0,2 V vs. Ag/AgCl sous air et à pH 7,4.

Dunn et al. ont montré que la BOD encapsulée au sein d'une électrode composite de CNTs et de silice sol-gel catalyse la réduction de O₂.¹⁸ Enfin, Tkac et al. ont élaboré une cathode composite de kejeten black, de chitosan et de CNTs.¹⁹

Plus récemment, Atanassov et al. ont développé une bioélectrode à air à base d'une encre de MWCNTs, de gel de silice et de la BOD *Mv*. Ces cathodes respirantes réduisent directement l'oxygène provenant de l'air qui diffuse à travers l'électrode et génèrent des densités de courant de -0,4 mA cm⁻² à 0 V vs. Ag/AgCl à pH 7.²⁰ Enfin, cette enzyme a aussi été encapsulée dans un aérogel constitué d'un alliage de palladium et de platine avec du

nafion.²¹ La nanostructuration de l'électrode ainsi que l'apport adéquat en substrat ont permis d'améliorer les densités de courant.

I.2.3 Immobilisation par formation d'un lien covalent

En 2007, Lisdat et al. ont lié de manière covalente la bilirubine oxydase via un couplage EDC/NHS. Les électrodes de carbone vitreux ont été préalablement modifiées par des MWCNTs portant des fonctions acides carboxyliques.²² Récemment, Lojou et al. ont adapté cette stratégie sur des SWCNT-COOH (Figure 1D).²³ Cette stratégie a aussi été appliquée sur des électrodes de carbone vitreux préalablement traitées à l'acide,²⁴ fonctionnalisées par des MWCNTs modifiés par des Pyr-NHS²⁵ et sur des électrodes d'or, modifiées par des MWCNTs-thiol via un couplage avec le sulfo-GMBS (N-γ-maleimidobutyryl-oxysulfosuccinimide-ester),²⁶⁻²⁸ ou fonctionnalisées par des composés aromatiques portant des fonctions acides carboxyliques.²⁹ Ces électrodes génèrent des courants catalytiques allant jusqu'à $-0,5 \text{ mA cm}^{-2}$ à 0 V vs. Ag/AgCl sous O₂ à pH 7.

Puis, De Lacey et al. ont immobilisé l'enzyme sur des nanoparticules d'or. Cette électrode produit une densité de courant de $-0,14 \text{ mA cm}^{-2}$ à 0,2 V vs. Ag/AgCl dans des conditions mimant celles du sérum physiologique.³⁰

La pyrroloquinoléine quinone (PQQ) a aussi servi d'interface pour la fixation covalente de la BOD.^{28,31} La cathode obtenue par la fonctionnalisation de CNTs avec la PQQ génère sous air et à pH 7 une densité de courant de $-0,55 \text{ mA cm}^{-2}$ à 0 V vs. Ag/AgCl.³¹

En 2014, la BOD *Mv* a été immobilisée de façon covalente sur une matrice tridimensionnelle composée de fibres et de nanotubes de carbone modifiés covalamment par des molécules portant des fonctions carboxylates. Les molécules possédaient une extrémité phénylamine pour permettre leurs immobilisations à la surface de la matrice 3D par formation et électroréduction du diazonium correspondant (Figure 1E). La cathode obtenue génère sous O₂ et à pH 7 une densité de courant de $-1,6 \text{ mA cm}^{-2}$ à 0 V vs. Ag/AgCl.³²

Le greffage covalent ne permet pas une orientation précise en soit de l'enzyme à la surface de l'électrode, car ces réactions font intervenir aléatoirement les NH₂ des lysines ou les SH des cystéines qui ne sont pas forcément présents à proximité du centre T1. Les stratégies d'immobilisation visant à orienter l'enzyme en ciblant l'environnement hydrophile du centre T1 ont été développées par l'adsorption de l'enzyme sur des surfaces fonctionnalisées.

I.2.4 Immobilisation par adsorption de l'enzyme

La physisorption des enzymes à la surface d'électrodes modifiées ou non est l'une des techniques les plus simples pour immobiliser les protéines. Son utilisation a donc été très largement employée pour la BOD.

Le développement de biocathode à air à base de BOD a engendré la fabrication de diverses encres conductrices pour l'adsorption et la connexion de la BOD. Des MWCNTs ont été dispersés dans des liquides ioniques,³³ des mélanges liquides ioniques-cellulose.³⁴ D'autres matériaux carbonés comme l'oxyde de graphène ou le keijten black ont été dispersés dans le polyacide lactique.^{35,36} L'intérêt est de produire des encres suffisamment hydrophiles pour pouvoir être déposées par spray sur du papier et servir de couche catalytique support à l'enzyme. Ce type de biocathode est plus largement discuté dans la suite de ce chapitre.

La BOD *Mv* a été adsorbée sur diverses matrices 3D carbonées, comme des aérogels de carbone³⁷ et de particules de carbone.³⁸ Mano et al. ont utilisé des mousses carbonées micro et macro cellulaire pour la BOD *Tt*.^{39,40} Les nano fibres de carbone peuvent aussi être utilisées. Un traitement préalable par un plasma UV/ozone, les rendant plus hydrophiles, permet d'accroître les performances de courant obtenu.⁴¹ Plus récemment, l'adsorption de la BOD *Bp* sur des électrodes mésoporeuses à base de cryogel de carbone⁴² et de nanofibres hydrophiles de carbone en arête de poisson a été réalisée.⁴³ Cette biocathode délivre à pH 4 une densité de courant de -4 mA cm^{-2} à 0 V vs. Ag/AgCl sous O_2 et à 60 °C.

Pour favoriser la connexion directe, le contrôle de l'orientation de la BOD *Mv* peut être réalisé en recouvrant le matériau d'électrode par des carboxylates.⁴⁴⁻⁴⁶ L'efficacité de la bioélectrocatalyse de la BOD *Mv* est en revanche diminuée par le greffage sur l'électrode d'ammoniums^{44,46} ou de composés hydrophobes.⁴⁵ En 2009, Ohno et al. ont adsorbé la BOD *Mv* sur des électrodes tridimensionnelles à base de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des dérivés thiols portant des carboxylates. Ces électrodes délivrent à pH 7 et sous O_2 des densités de courant de $-5,2 \text{ mA cm}^{-2}$ à 0 V vs. Ag/AgCl et 4000 rpm^{-1} .⁴⁶

Plus récemment, Cracknell et al. ont montré que la bilirubine permettait de favoriser l'orientation de la BOD et d'améliorer le transfert interfacial d'électron sur des électrodes de graphite pyrolytique. L'activité électrocatalytique est doublée par rapport à la simple adsorption de l'enzyme.⁹ Cette technique a par la suite été adaptée sur des électrodes de MWCNTs⁴⁷ comme l'illustre la figure 1B et sur des électrodes respirantes à base de MWCNTs⁴⁸ ou de Keijten Black.⁴⁹

Récemment, Atanassov et al. ont décrit l'immobilisation covalente orientée de la BOD sur des électrodes de MWCNTs. Les MWCNTs ont été bi-fonctionnalisés par la bilirubine et le pyrène-NHS.⁴⁸ Tandis que la bilirubine permet une orientation favorable de l'enzyme, le Pyr-NHS permet à la fois la réalisation d'un lien covalent avec l'enzyme, et une forte interaction avec la paroi des CNTs par interaction « π -stacking ». Cette stratégie a ensuite été adaptée sur des biocathodes respirantes en utilisant la syringaldazine qui est un autre substrat de la BOD.⁵⁰ La cathode génère alors une densité de courant de $-0,65 \text{ mA cm}^{-2}$ à 0,1 V vs. Ag/AgCl et sous O_2 , soit un courant 2,5 fois plus important que celui des cathodes non modifiées.⁵⁰

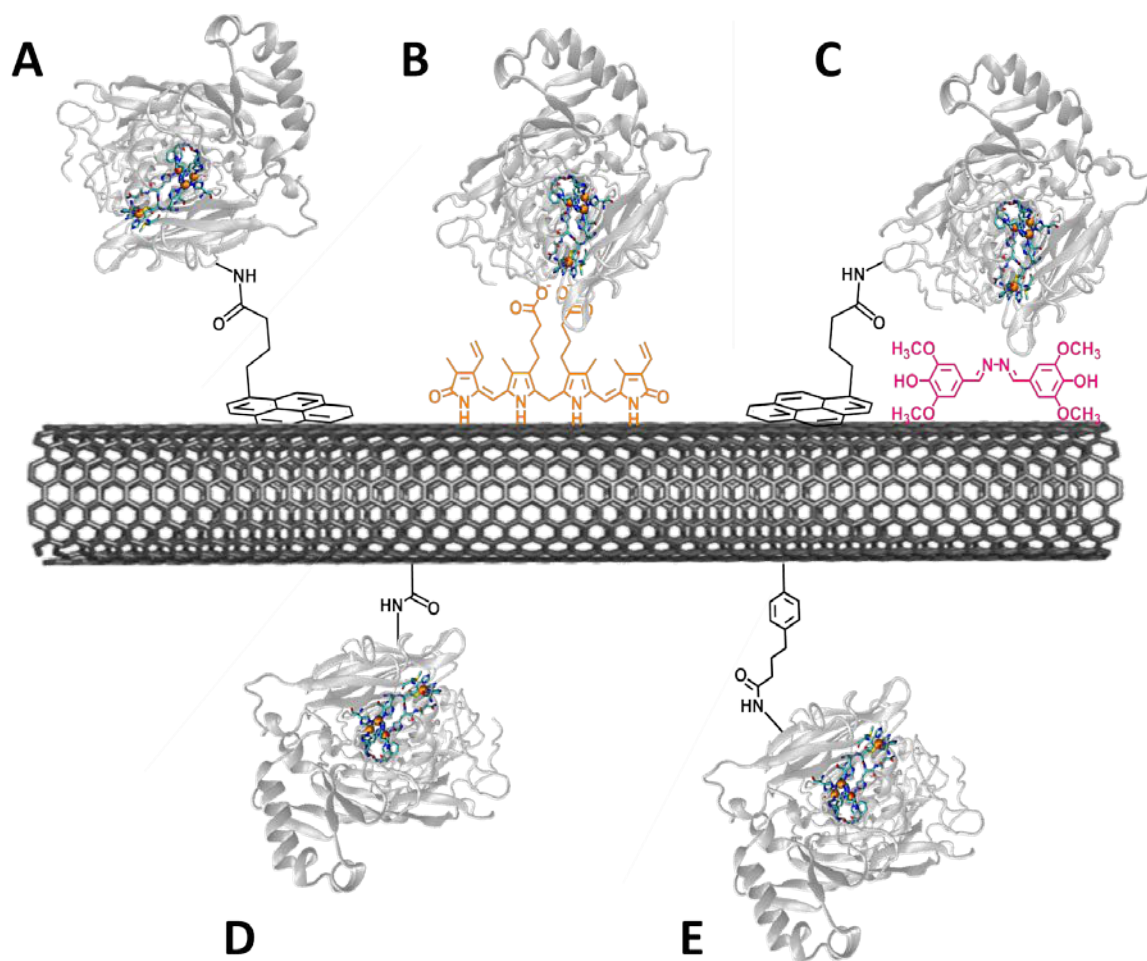


Figure 1 : Représentation schématique de différentes stratégies d'immobilisation de la BOD sur nanotube de carbone A) Pyrène-NHS ; B) Bilirubine ; C) Pyrène-NHS + Syringaldazine ; et greffage covalent sur D) des CNTs traités à l'acide et E) des CNTs fonctionnalisés covalamment par une molécule portant des fonctions carboxylates

Dans ce chapitre, nous avons étudié la modification non covalente et covalente de CNTs pour l'orientation et la connexion efficace de la BOD *Mv* et de la BOD *Bp*. Les CNTs sont des matériaux de choix pour l'élaboration d'électrodes nanostructurées. Leur utilisation permet le développement de grande surface spécifique conductrice, facilement fonctionnalisable pour contrôler l'orientation favorable de l'enzyme, et ainsi développer des biocathodes performantes. L'objectif est de développer de nouvelles techniques de fonctionnalisation des CNTs par des méthodes non-covalentes et covalentes. Ce chapitre décrit en particulier la fonctionnalisation non-covalente des CNTs par différents types de porphyrines et la fonctionnalisation covalente par des sels de diazonium par voie chimique et électrochimique. Ces techniques doivent permettre de créer une fonctionnalisation particulièrement stable et une orientation favorable de l'enzyme. De plus, certaines méthodes de fonctionnalisation permettent d'obtenir des CNTs modifiés avec une processabilité accrue grâce à l'amélioration de la solubilité, de l'individualisation et de la pureté des CNTs. Ces stratégies nous ont ainsi permis de développer dans un deuxième temps des biocathodes flexibles et respirantes.

II- Modification supramoléculaire des MWCNTs pour l'immobilisation et la connexion de la BOD *Mv*

Outre les pyrènes présentés dans le chapitre précédent, d'autres molécules peuvent être utilisées pour la fonctionnalisation non covalente de CNTs. Des macrocycles aromatiques, telles que les porphyrines ont déjà démontré leurs capacités à interagir très fortement avec la paroi des CNTs par « π -stacking » pour former des matériaux hybrides.⁵¹ En s'appuyant sur ces fortes interactions π - π , des MWCNTs ont été fonctionnalisés par divers dérivés porphyrines afin d'étudier les propriétés de ces matériaux hybrides sur l'immobilisation et l'orientation favorable de la BOD de *Myrothecium verrucaria* (*Mv*).

Le substrat naturel de l'enzyme, la bilirubine, est un tétrapyrrole linéaire issu de la dégradation des protéines hémiques.⁵² Des structures proches ont donc été choisies pour former les matériaux hybrides MWCNTs-porphyrines, notamment la protoporphyrine IX (PP), l'hémine (PPFe^{III}), la protoporphyrine IX diméthyl ester (PPDE) et l'octaéthylporphyrine (OEP). L'influence de ces différentes structures sur l'immobilisation, l'orientation et les constantes cinétiques de transfert d'électron a été étudiée.

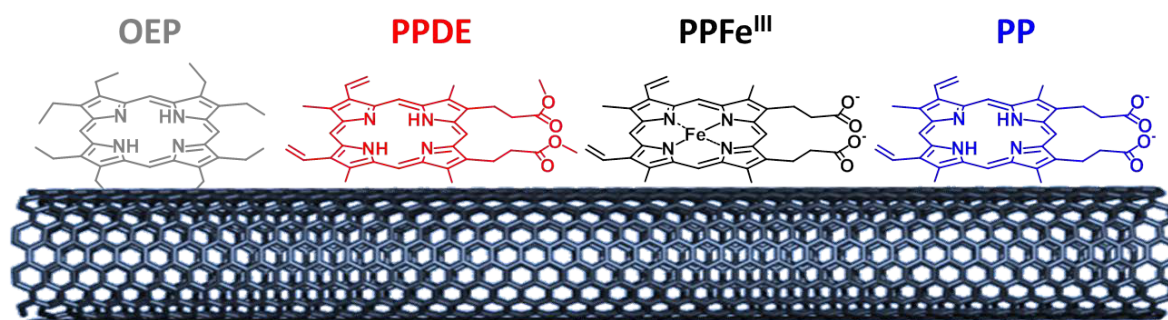


Figure 2 : Représentation de l'interaction de « π -stacking » entre les CNTs et les différents dérivés porphyrines

Pour fonctionnaliser les électrodes de MWCNTs, ces dernières ont été incubées dans des solutions de DMF contenant les différents dérivés, PP, PPFe^{III}, PPDE et OEP à 0,3 mM pendant 1 h. Après avoir été abondamment rincées à l'eau distillée, les électrodes ont été incubées pendant la nuit dans une solution contenant 2,5 mg mL⁻¹ de BOD *Mv* dans du tampon McIlvaine pH 7. Une électrode témoin, n'ayant pas été fonctionnalisée par un dérivé porphyrine, a également été réalisée par simple physisorption de la protéine dans les mêmes conditions.

II.1 Caractérisation des électrodes en absence de substrat

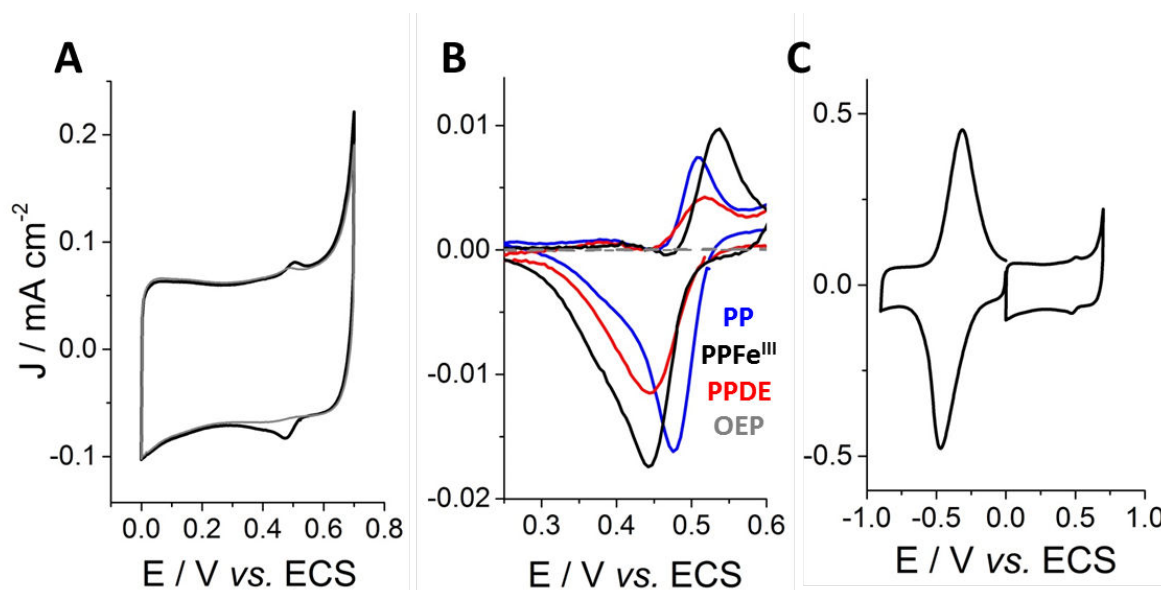


Figure 3 : CVs de la bioélectrode MWCNTs/PP/BOD dans du tampon McIlvaine pH 7 saturé en argon avant (noir) et après (gris) ajout de NaF ; B) CVs après soustraction de la contribution du courant capacitif des bioélectrodes MWCNTs/Porphyrines/BOD pour OEP (gris), PPDE (rouge), PPFer^{III} (noir) et PP (bleu) sous argon à pH 7 ; C) CV de la bioélectrode MWCNTs/PPFer^{III}/BOD sous argon à pH 7, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$

Les CVs dans du tampon saturé en argon des bioélectrodes ayant été incubées avec l'enzyme ont été réalisées après rinçage (Figure 3). Un système redox bien défini et réversible est observé à $E_{1/2} = 0,49 \text{ V vs. ECS}$ avec un $\Delta EP = 30 \text{ mV}$ à pH 7 pour les électrodes fonctionnalisées par PP, PPDE et PPFer^{III}. Comme l'illustre la figure 3A, ce système redox est partiellement inhibé par l'ajout d'ions fluorures en solution, ce qui est en accord avec le comportement des MCOs observé par électrochimie en transfert direct d'électron.⁵³ En effet, les ions fluorures sont des inhibiteurs du centre T1. De plus, ce potentiel est proche du potentiel redox du centre T1 : 0,43 V vs. ECS à pH 7 mesuré par titration redox,⁵⁴ ainsi que des potentiels mesurés en DET de la BOD sur différents types d'électrodes.^{22,55,56} Ce couple redox correspond donc certainement au couple Cu(II)/Cu(I) du centre T1 ($E_{1/2,T1}$).

Pour toutes les électrodes où le centre T1 est observé (Figure 3B), le pic cathodique est plus intense que le pic anodique, probablement en raison de traces d'oxygène en solution. Il est à noter, que le T1 de la BOD n'est pas observé pour l'électrode témoin MWCNTs/BOD, ni pour l'électrode MWCNTs/OEP/BOD.

L'observation directe du centre cuivre T1, témoigne de sa proximité avec la surface de l'électrode ainsi que du transfert d'électron favorable pour les électrodes de MWCNTs modifiées, particulièrement pour PP et PPFer^{III}. Cette dernière montre un pic redox plus intense et mieux défini. A partir de l'intégration du pic d'oxydation de ce signal, un taux de recouvrement maximal Γ_{BOD}^{max} de $5,0 \cdot 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ a été calculé pour les BOD directement connectées. L'adsorption stable des porphyrines sur les MWCNTs a pu être vérifiée grâce à l'électrochimie des électrodes MWCNTs/PPFer^{III} (Figure 3C). On observe un

système de pics réversibles à $E_{1/2} = -0,39$ V vs. ECS, et linéairement proportionnels à la vitesse de balayage. Ce signal correspond au couple $PPFe^{III}/PPFe^{II}$, et démontre son immobilisation stable. Grâce à ce système redox, le taux de recouvrement maximal des porphyrines à la surface des électrodes $\Gamma_{PPFe^{III}}^{max}$ est évalué à $6,8 \cdot 10^{-10}$ mol cm^{-2} . Si l'on compare Γ_{BOD}^{max} et $\Gamma_{PPFe^{III}}^{max}$, on constate que le taux de recouvrement des dérivés porphyrines est approximativement 140 fois supérieur à celui des enzymes connectées.

La dépendance du signal du T1 en fonction de la vitesse de balayage n'a pu être évaluée, en raison des faibles courants faradiques du système et des forts courants capacitifs associés aux électrodes de MWCNTs. Cependant, la variation de $E_{1/2,T1}$ en fonction du pH a été réalisée entre pH 3 et pH 8 (Figure 4). Au-delà de cette gamme, le pic s'élargit jusqu'à disparition.

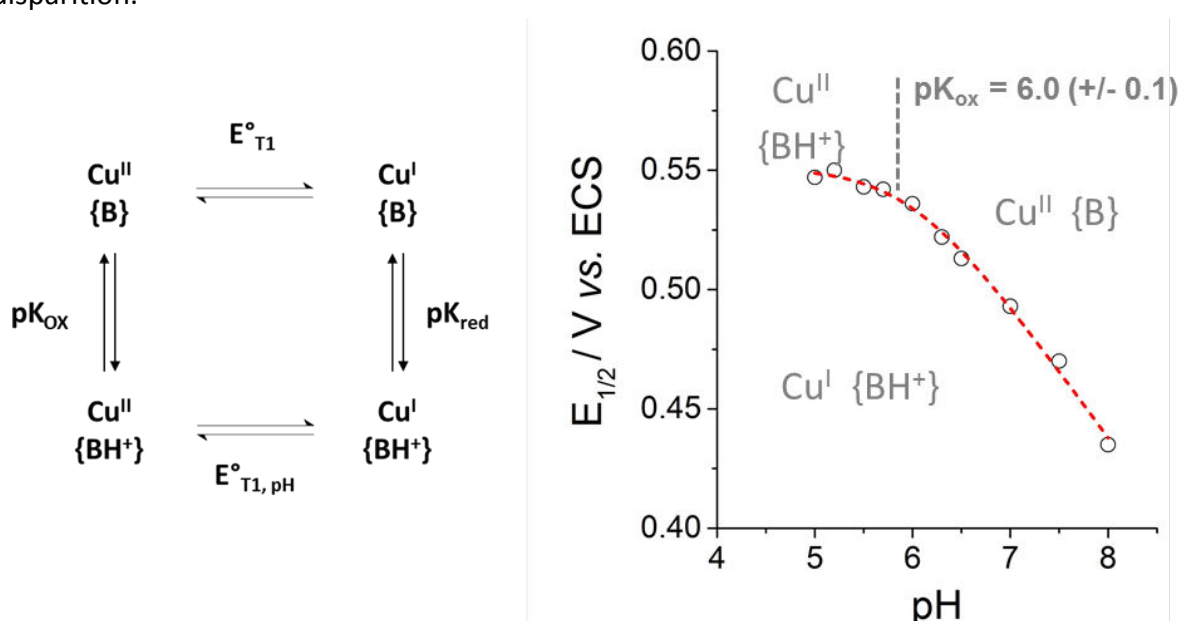


Figure 4 : Dépendance en fonction du pH de $E_{1/2,T1}$, mesurée à partir de la voltammétrie cyclique des électrodes MWCNTs/PP/BOD dans du tampon saturé en argon. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles données en figure 3A excepté pour le pH des solutions. (o) points expérimentales (- -) courbe de simulation

Cette variation conduit à l'obtention d'un diagramme de Pourbaix apparent dont la dépendance en pH a été modélisée suivant l'équation 1 :

$$E_{1/2} = E_{1/2(T1,acide)} + \frac{2,3 RT}{nF} \times \log \left(1 + \frac{[K_{ox}]}{[H^+]} \right) \quad (1)$$

Où R est la constante des gaz parfaits, T la température, F la constante de Faraday, et n le nombre d'électron échangé. K_{ox} est la constante de dissociation des protons pour la forme oxydée du centre T1 ($Cu^{II}\{BH^+\}$), et $E_{1/2(T1,acide)}$ est la valeur limite de $E_{1/2,T1}$ à pH plus acide que pK_{ox} . Cette équation est établie pour un transfert couplé proton-électron gouverné par les formes oxydées acide et basique du T1. Les valeurs expérimentales obéissent de manière satisfaisante au modèle et conduisent à l'obtention des paramètres $n = 1$, $E_{1/2(T1,acide)} = 551 (\pm 2)$ mV et $pK_{ox} = 6 (\pm 0,1)$.

Ce diagramme est en accord avec différentes études potentiel-pH réalisées sur d'autres enzymes à cuivre, tel que l'azurine⁵⁷ et CueO.⁵⁸ Le pK_{ox} de 6 est lié au couple acide/base d'un acide aminé au voisinage du T1, influençant le réarrangement structural du cuivre durant le processus de réduction/oxydation. La valeur de pK_{ox} ainsi que les précédentes études sur les MCOs^{57,58} laissent à penser que cet acide aminé est une histidine (pKa imidazole = 6). De plus, le pK_{red} n'est pas observé sur le diagramme, il est donc supérieur à 8. Cette grande différence entre $pK_{ox} = 6$ et $pK_{red} > 8$ présume que ce résidu histidine impliqué dans le PCET n'est pas localisé dans la sphère de coordination du cuivre, mais à une plus grande distance ; la réduction de Cu^{II} en Cu^I induit un large réarrangement dans la structure « locale » de la protéine.^{58,59}

II.2 Réduction bioélectrocatalytique de O_2

Les CVs des bioélectrodes ont ensuite été effectuées dans du tampon saturé en oxygène (Figure 5). Toutes les électrodes catalysent la réduction de O_2 à un potentiel de départ de 0,5 V vs. ECS, toutefois on observe que cette catalyse est bien plus efficace pour les électrodes où le système redox Cu^{II}/Cu^I correspondant au centre T1 a pu être observé.

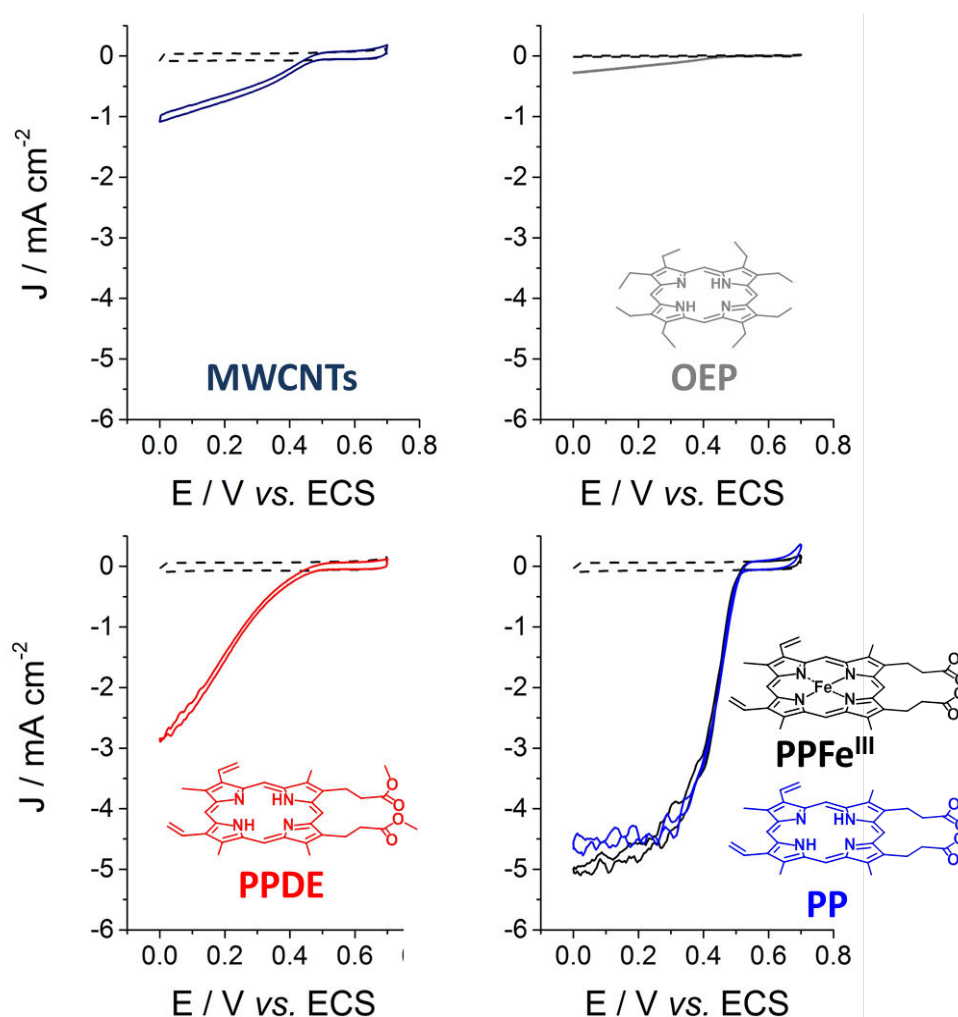


Figure 5 : CVs des électrodes de MWCNTs fonctionnalisées dans du tampon McIlvaine pH 7 saturé en argon (tirets) et sous oxygène (trait plein) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$

Une forte densité de courant catalytique, supérieure à -4 mA cm^{-2} est observée pour les électrodes PP et PPF^{III} à 0 V vs. ECS. En revanche, les électrodes fonctionnalisées par OEP présentent une densité de courant de réduction très faible ($-0,3 \text{ mA cm}^{-2}$ à 0 V vs. ECS) comparé aux électrodes témoins de MWCNTs (-1 mA cm^{-2} à 0 V vs. ECS). Enfin, les bioélectrodes fonctionnalisées par PPDE permettent d'obtenir une densité de courant moins importante (-3 mA cm^{-2} à 0 V vs. ECS) que celles fonctionnalisées avec PP et PPF^{III}.

Une importante disparité dans l'allure des courbes est observée durant la catalyse selon la porphyrine utilisée pour connecter l'enzyme. Mis-à-part les densités de courants, la principale différence est la pente de la courbe lorsque l'on balaye vers les bas potentiels, surtout pour les électrodes fonctionnalisées par PPDE et OEP. Cette observation est en accord avec une dispersion des orientations de la BOD à la surface de l'électrode faisant varier les constantes cinétiques de transfert d'électron Cu(T1)-électrode.

II.3 Modélisation électrochimique

Le modèle de la dispersion du transfert d'électron⁶⁰ présenté dans le chapitre précédent portant sur la laccase a été appliqué à toutes les bioélectrodes MWCNTs/Porphyrines/BOD ainsi qu'aux électrodes témoins MWCNTs/BOD. Pour rappel, ce modèle décrit les transferts monoélectroniques successifs entre le centre T1, situé à différentes distances de l'électrode selon l'orientation de l'enzyme. Les densités de courant de catalyse ont été modélisées suivant l'équation 2 :⁶⁰

$$J = \frac{J_{lim} e_1 - e_2}{\beta d_0 (1 + e_1)} \ln \frac{p e_1^\alpha + 1 + e_1}{p e_1^\alpha + (1 + e_1) \exp(-\beta d_0)} \quad (2)$$

Les vagues de catalyse (après soustraction de la contribution capacitive des MWCNTs) obtenues expérimentalement ainsi que les vagues simulées (pour $n=1$) des électrodes fonctionnalisées sont exposées en figure 6. Pour des raisons de clarté, puisque les résultats obtenus avec PP et PPF^{III} sont identiques, seules les courbes acquises avec PP sont présentées. La présence du centre Fe(III) au sein de la porphyrine n'a pas d'influence notable sur les propriétés du DET. Les paramètres associés à chaque simulation sont reportés dans le tableau 1.

Les vagues de catalyse obtenues avec les bioélectrodes de MWCNTs non modifiées ainsi que celles fonctionnalisées par OEP et PPDE sont très bien modélisées suivant l'équation 2. Inversement, les électrodes à base de PP et PPF^{III} suivent un comportement nernstien ; modélisé selon l'équation 3 ; où les densités de courant sont seulement limitées par la catalyse enzymatique ainsi que par le taux de recouvrement de l'enzyme Γ_{BOD}^{max} . Aucune dispersion du transfert d'électron n'est observée, et la modélisation est définie selon deux paramètres uniquement : J_{lim} et E_0 .

$$J = J_{lim} \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{nF}{RT} (E - E_{Cu(T1)}^0)\right)} \quad (3)$$

Tableau 1 : Paramètres des simulations selon l'équation 2 et 3, obtenues pour toutes pour les électrodes MWCNTs/Porphyrine/BOD et l'électrode témoin MWCNTs/BOD

	E_0 (V vs. ECS)	J_{lim} (mA cm ⁻²)	p	βD_0	% ABTS
MWCNTs	0,41	-1,15	0,03	12.2	53
OEP	0,42	-0,33	0,14	11,4	71
PPDE	0,47	-3,08	6	6,6	75
PP	0,43	-4,39	-	-	100
PPFe^{III}	0,43	-4,66	-	-	100

Pour toutes les électrodes, la meilleure modélisation a été obtenue avec $n = 1$. Le potentiel redox E_0 estimé pour chaque simulation est proche du potentiel mesuré par titration redox du centre T1 pour la BOD (Mv) de 0,43 V vs. ECS à pH 7.⁵⁴ De plus, la dépendance en pH de la catalyse de réduction du dioxygène montre un comportement similaire à l'étude réalisée sous argon. Toutes ces observations confirment que le centre T1 est le centre de la réponse électrochimique pour toutes ces électrodes.

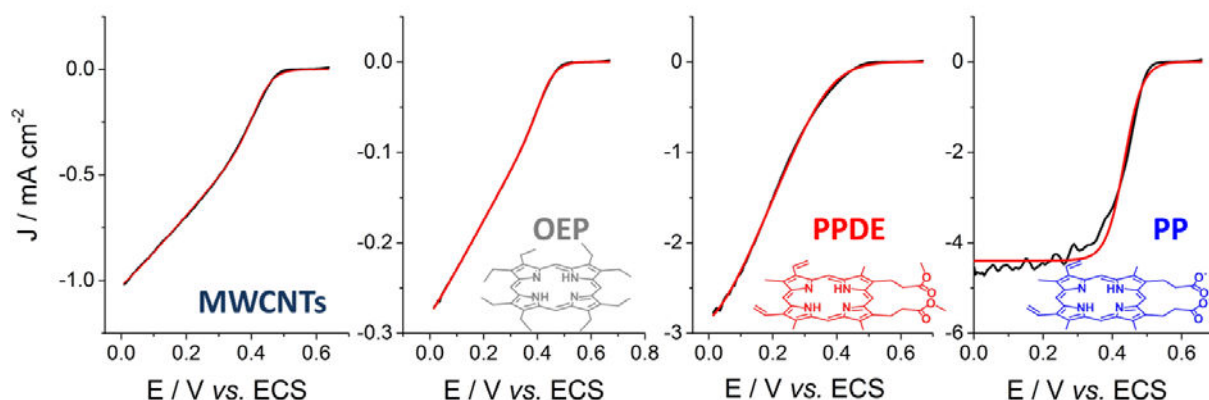


Figure 6 : CVs expérimentales (noir) et simulés (rouge) pour les électrodes MWCNTs/Porphyrine/BOD et les électrodes témoins MWCNTs/BOD obtenues sous oxygène. La contribution capacitive des MWCNTs a été soustraite

La principale différence entre les électrodes se trouve dans le facteur βD_0 . Les valeurs obtenues sont de 12,2 pour les MWCNTs non modifiés, 11,4 pour OEP et 6,6 pour PPDE. Ces différentes valeurs soulignent les différentes orientations de la BOD sur les électrodes. Pour MWCNTs et OEP les dispersions des constantes de transfert d'électron (donc les différentes orientations de la BOD) sont les plus grandes, ce qui explique que ces électrodes montrent les plus faibles activités catalytiques. Pour PPDE, βD_0 est significativement plus faible témoignant d'une moins grande dispersion dans l'orientation de l'enzyme accompagnée d'une meilleure catalyse. En supposant que β (la constante de décroissance du milieu de la BOD) est similaire à celle mesurée pour l'azurine ($1,1 \text{ \AA}^{-1}$)⁶¹, les constantes de transfert d'électron varient sur une distance moyenne de 6,1 Å pour PPDE, 10 Å et 11,1 Å respectivement pour OEP et MWCNTs. Enfin, pour PP et PPFe^{III}, il n'y a pas de dispersion du

transfert d'électron. L'orientation complète de l'enzyme s'accompagne de fortes densités de courant de réduction de l'oxygène.

Le paramètre p est le ratio qui compare l'efficacité du catalyseur envers la réduction du dioxygène ($k_{2c} \gg k_{2a}$ du fait de la réduction irréversible du dioxygène) par rapport à son efficacité à transférer ses électrons à l'électrode :

$$p = \frac{(k_{2a} + k_{2c})}{k_0^{max}}$$

avec k_0^{max} la constante de transfert interfacial d'électron pour la distance minimale d_0 T1/électrode.

L'activité catalytique de la BOD étant la même pour toutes les électrodes (k_{2c}), la plus grande valeur de p obtenue pour PPDE, indique que k_0^{max} est plus petit pour PPDE comparé à OEP et MWCNTs. Ceci implique que malgré une plus grande dispersion des transferts d'électrons pour OEP et MWCNTs comparé à PPDE, le T1 est plus proche de l'électrode pour les électrodes MWCNTs et OEP, donnant accès à de plus grandes valeurs de k_0^{max} . La même conclusion s'applique si l'on compare les électrodes MWCNTs et OEP. Pour ces deux électrodes la dispersion du transfert d'électron est identique. Cependant, k_0^{max} est plus grand dans le cas des MWCNTs, ce qui explique les plus faibles densités de courant observées avec les électrodes OEP comparées aux électrodes de MWCNTs seuls. On peut supposer que les méthyles de OEP sont responsables de l'éloignement du centre T1 de la surface de l'électrode.

La meilleure orientation et connexion de l'enzyme est obtenue avec les porphyrines ayant la structure la plus proche de la bilirubine. Les électrodes de PP et PPF^{III} montrent des vagues catalytiques quasi-idéales qui sont très bien modélisées par l'équation de Nernst. Pourtant, à des surtensions élevées, l'existence d'une faible inclinaison du plateau (correspondant à la densité de courant maximal) indique la contribution probable de BOD adsorbées non spécifiquement sur les CNTs au courant faradique total. Pour autant, pour ces deux électrodes, les fortes densités de courant limite de réduction approchent de -5 mA cm^{-2} démontrant la connexion efficace de la BOD.

Comme pour les électrodes à base de laccase, la stabilité des biocathodes a été étudiée par des décharges d'une heure par chronoampérométrie (Figure 7). On observe qu'après deux semaines de décharges discontinues, les densités de courant ont seulement diminué de 10 % pour les électrodes PP. Tandis que la stabilité des biocathodes MWCNTs, PPDE et OEP ne semble pas non plus diminuer drastiquement, elles délivrent en revanche moins de 10 % du courant initial des électrodes PP au bout de 15 jours.

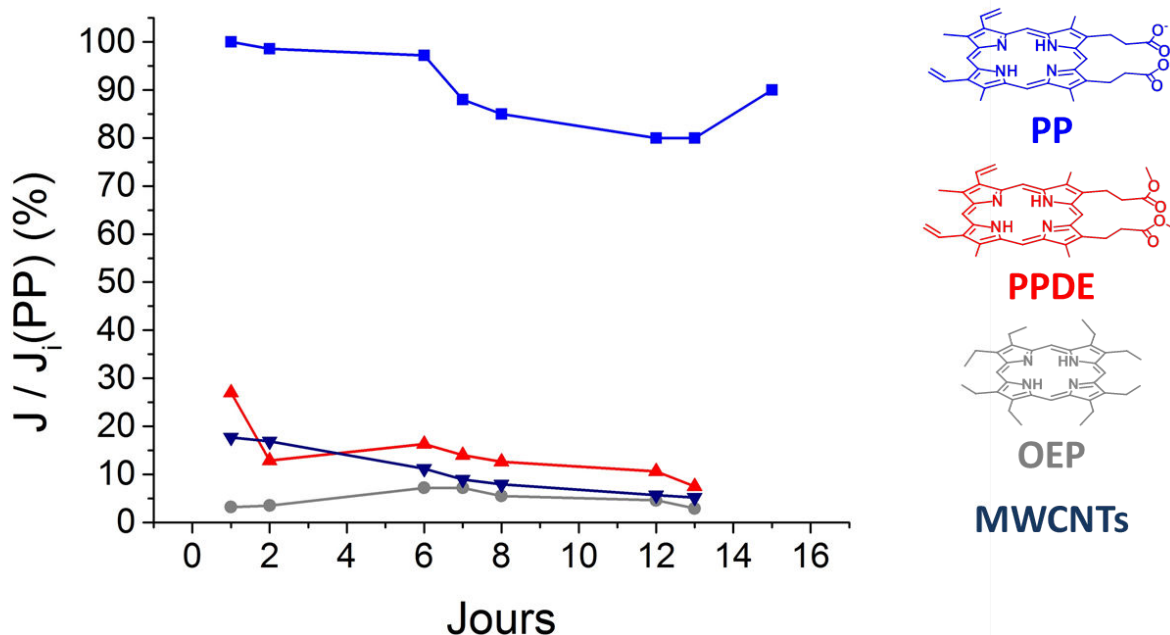


Figure 7 : Stabilité des biocathodes des MWCNTs/PP (bleu), MWCNTs/PPDE (rouge), MWCNTs/OEP (gris) et MWCNTs (bleu foncé). Densités de courant catalytique mesurées par des décharges à $E = 0,2$ V vs. ECS pendant 1h dans du tampon McIlvaine pH 7 sous oxygène

II.4 Caractérisation des biocathodes en MET

L'ABTS a été utilisé pour évaluer l'efficacité de l'immobilisation et de l'orientation de l'enzyme à la surface des bioélectrodes. Les CVs obtenues en présence de ce médiateur redox sont exposées en figure 8. La comparaison de l'activité catalytique en présence et en absence d'ABTS, permet de mettre en évidence les enzymes immobilisées qui réalisent peu ou pas de DET à cause de leurs orientations non favorables et qui ne participent donc pas à la catalyse directe.

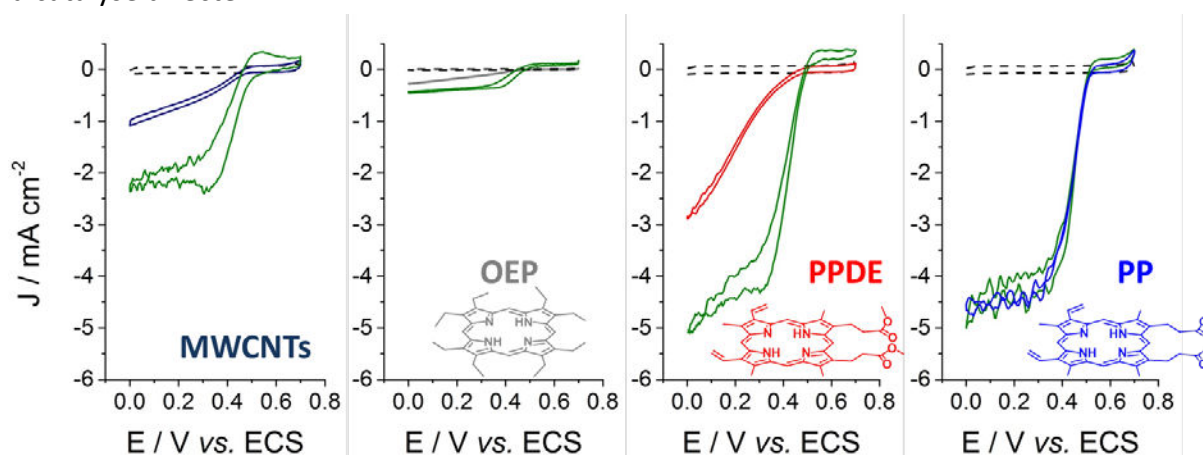


Figure 8 : CVs des électrodes MWCNTs/BOD et MWCNTs/porphyrine/BOD avant et après (vert) ajout de 0,3 mM d'ABTS dans du tampon McIlvaine pH 7 saturé en oxygène et sous flux de O_2

L'addition d'ABTS en solution a une influence négligeable sur la forme de la vague de catalyse des électrodes PP et PPFe^{III}, ce qui confirme une immobilisation orientée favorable de la BOD et l'absence de BOD non-connectées. A l'inverse, pour toutes les autres

bioélectrodes, une augmentation des densités de courant catalytique est observée, confirmant la présence de BOD immobilisées mais ne participant pas au DET. En effectuant la supposition que la BOD possède les mêmes constantes de vitesse de catalyse de réduction de O_2 par DET et par MET via l'ABTS, la comparaison des densités maximales de courant en présence ou en absence de médiateur nous a permis d'évaluer que, pour PPDE 75% des enzymes présentes sur l'électrode sont effectivement connectées en transfert direct d'électron. Pour OEP et MWCNTs un pourcentage de 71% et 53% respectivement a été estimé. Ceci est en accord avec les valeurs de βD_0 qui confirment aussi l'orientation moins favorable induite par OEP. De plus, les densités de courant plus importantes avant et après l'addition de médiateur pour toutes les électrodes comparées à celles obtenues avec les électrodes EOP montrent que la structure de la porphyrine a non seulement une influence sur l'orientation de l'enzyme mais aussi sur le taux de recouvrement de l'enzyme Γ_{BOD}^{max} .

Enfin, étant donné que les performances des électrodes PP et PPF^{III} sont seulement limitées par le taux de recouvrement de l'enzyme ($\Gamma_{BOD}^{max} = 5 \cdot 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$), la constante catalytique de l'électroréduction du dioxygène peut être évaluée selon l'équation 4 :

$$J_{lim} = 4F\Gamma_{BOD}^{max}k_{2c} \quad (4)$$

Suivant cette équation on estime $k_{2c} = 2,4 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$. Cette valeur est largement supérieure au $k_{cat} = 115 \text{ s}^{-1}$ déterminé pour la BOD *Mv* en phase homogène avec l'ABTS à pH 6,5.⁶² Étant donné que cette constante prend en compte les étapes de fixation du substrat, de libération du produit, de formation et de coupure de liaisons, on peut supposer, que comme l'enzyme est parfaitement orientée, et que l'électrode se substitue à l'ABTS, aucune des étapes précédemment citées ne limite la catalyse effectuée par l'enzyme immobilisée. Ceci pourrait expliquer cette valeur beaucoup plus élevée.

Ces expériences démontrent que la fonctionnalisation de MWCNTs avec des porphyrines est une solution efficace pour immobiliser et orienter la BOD. La grande surface spécifique apportée par les nanotubes associée à l'immobilisation d'une grande quantité d'enzymes dans une orientation favorable au DET permet non seulement d'observer le signal redox du centre cuivre T1 mais également d'obtenir une excellente activité des bioélectrodes, de l'ordre de -5 mA cm^{-2} et particulièrement stable dans le temps. La structure de la porphyrine joue un rôle prépondérant dans l'interaction de la BOD avec la surface de l'électrode, que ce soit au niveau de la quantité d'enzymes immobilisées ou au niveau de son orientation. Au-delà de la quantité d'enzymes immobilisées, la présence de charges négatives au niveau des groupements carboxylates a une influence importante sur l'orientation. Dans l'optique de fonctionnaliser les CNTs de manière covalente, nous avons en particulier cherché à moduler la charge portée par les espèces greffés à la surface des CNTs.

III- Modification covalentes de CNTs pour la connexion et l'immobilisation de la BOD *Mv*

Que ce soit dans les propriétés d'orientation de la BOD par la bilirubine ou les porphyrines, ou dans la modification d'électrodes par des groupements carboxylates ou sulfonates,⁴⁵ il a été démontré que ces groupements ont un rôle majeur dans l'orientation et la connexion de la BOD *Mv*. Nous avons donc étudié l'influence de la présence de charges positives ou négatives à la surface des CNTs sur l'orientation de l'enzyme à l'électrode. Des CNTs ont été covalamment modifiés par des carboxylates grâce à un dérivé de l'acide naphthoïque, tandis que des charges positives ont été apportées par un dérivé de la phenyléthylamine. Pour la fonctionnalisation des CNTs par ces groupements, nous avons choisi de développer la réduction de sels d'aryldiazonium, que ce soit par voie électrochimique ou par voie chimique, selon le mode opératoire développé par J. Tour et al.⁶³

Ce type de fonctionnalisation a déjà été utilisé sur le RGO dans le chapitre 2. Cependant, les nanotubes de carbone sont bien plus réactifs que les feuillets de graphène.⁶⁴ En effet, le fait d'enrouler le graphène pour former des CNTs augmente la tension imposée aux liaisons C-C. Ces carbones sp^2 sont forcés d'adopter une géométrie non idéale pour cette hybridation, qui permet un meilleur recouvrement orbitalaire avec les réactifs s'approchant de la surface.^{64,65} Cette déviation dans la géométrie favorise les réactions d'addition. L'avantage de la fonctionnalisation covalente des CNTs est qu'une importante surface va pouvoir être recouverte par des groupements carboxylates grâce à la grande réactivité des radicaux aryles.⁶³ L'un des autres objectifs de l'utilisation de la fonctionnalisation covalente est l'obtention de CNTs modifiés individualisés et dont la solubilité est accrue afin de développer des encres conductrices pour l'élaboration de biocathodes à air.

III.1 Fonctionnalisation covalente de CNTs par l'acide 6-amino-2-naphthoïque

Des SWCNTs et MWCNTs ont été modifiés covalamment avec l'acide 6-amino-2-naphthoïque (6A2N) suivant une procédure déjà développée pour la génération d'aryldiazoniums *in situ*⁶³ et utilisée pour la formation du f-RGO (Cf. Chapitre II). Les CNTs ont été dispersés dans du DMF, puis cette dispersion a été chauffée à 80 °C pendant une nuit en présence d'isopentyl nitrite et de 6A2N. Les f-CNTs-COO⁻ ainsi modifiés ont été lavés par des étapes successives d'ultrasonication dans du DMF et de filtration jusqu'à ce que le filtrat soit incolore.

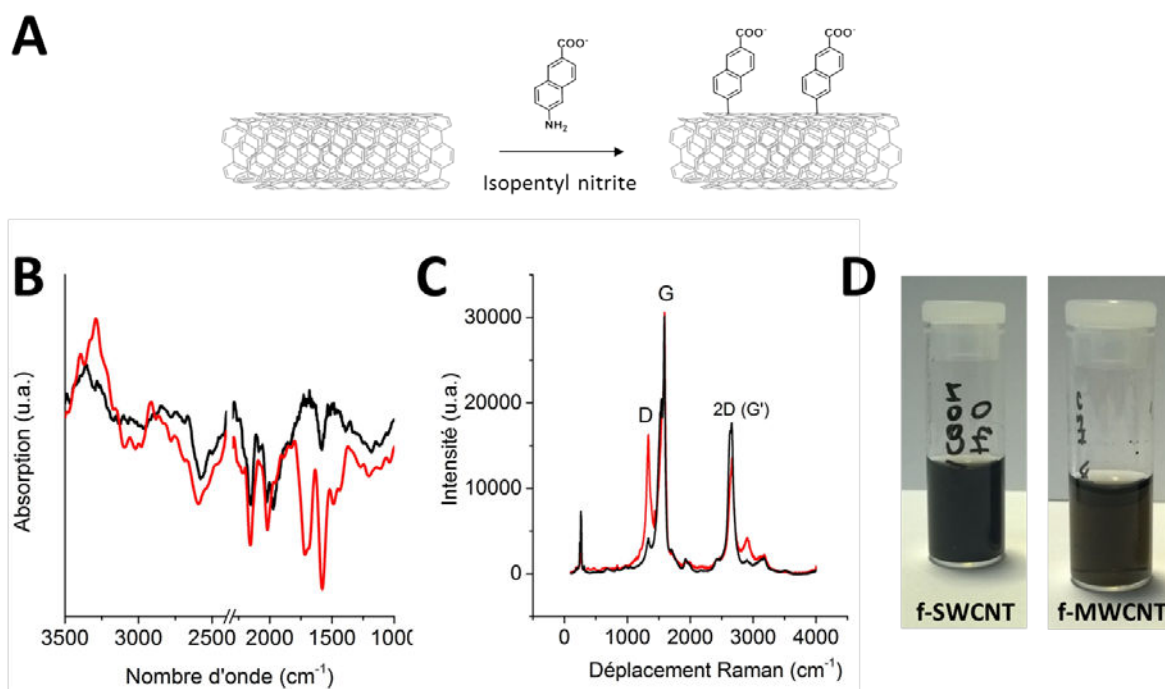


Figure 9 : A) Schéma de la fonctionnalisation covalente des CNTs par l'acide 2-amino-6-naphtoiïque ; B) Spectre infrarouge des MWCNTs (noir) et des f-MWCNTs (rouge) entre 1000 et 3500 cm^{-1} ; C) Spectre Raman des SWCNTs (noir) et des f-SWCNTs (rouge) entre 0 et 4000 cm^{-1} . La longueur d'onde d'excitation est de 514 nm pour un laser Ar^+ et D) Photographies du surnageant des solutions dans l'eau à 3 mg mL^{-1} du f-SWCNT et f-MWCNTs après centrifugation à 3200 rpm pendant 15 minutes

Les spectres des caractérisations infrarouge et Raman sont présentés en figure 9. En IR, la présence des groupements naphthoates est révélée par l'apparition d'une bande à 1715 cm^{-1} correspondant aux liaisons doubles CO des carboxylates. Une autre bande, plus large est observée à 3000 cm^{-1} , et est attribuée aux liaisons C-H des cycles aromatiques (Figure 9B). En spectroscopie Raman, on observe une augmentation de l'intensité de la bande D à 1350 cm^{-1} comparé à la bande G située à 1590 cm^{-1} , après réaction (Figure 9C). Le ratio D/G est passé de 0,14 à 0,44 après la fonctionnalisation des SWCNTs. L'augmentation de ce ratio est associée à la formation de défauts par les radicaux aryles qui brisent la périodicité de la structure en nid d'abeille le long de la paroi des CNTs et confirme la fonctionnalisation covalente des nanotubes suivant ce procédé. La spectroscopie Raman des f-MWCNTs ne permet pas d'observer l'augmentation du ratio D/G car de nombreux défauts sont déjà présents à la surface des MWCNTs avant modification. De plus, l'importante fonctionnalisation par des groupements naphthoates permet de solubiliser les f-CNTs dans l'eau comme l'illustre les photographies de la figure 9D. Respectivement, les f-SWCNTs et f-MWCNTs montrent une excellente solubilité de 12 et $37 \mu\text{g mL}^{-1}$ dans l'eau.

Pour l'élaboration des biocathodes, les f-MWCNTs ont été préférés aux f-SWCNTs en raison de leur courant capacitif moins important et de la possible perte de conductivité des f-SWCNTs après fonctionnalisation covalente. Des électrodes GC ont été fonctionnalisées avec les f-MWCNTs. $20 \mu\text{L}$ d'une solution à $171 \mu\text{g mL}^{-1}$ dans du NMP ont été déposés puis séchés.

La solubilité des f-MWCNTs permet de former des films fins et reproductibles. Les électrodes ont ensuite été incubées toute une nuit dans une solution de BOD *Mv* (2,5 mg mL⁻¹ dans du tampon McIlvaine pH 7).

III.2 Fonctionnalisation covalente par le 4-(2-aminoéthyl)benzène diazonium tétrafluoroborate

L'intégration de charges positives à la surface des nanotubes a été réalisée par la greffage covalent de la fonction (4-aminoéthyl)phenyl sur des MWCNTs. Cette fonctionnalisation n'a pu être réalisée suivant la procédure de génération des dérivés aryldiazonium *in situ*. En effet, l'amine primaire est capable de réagir avec l'isopentyl nitrite, et d'être détruite durant cette réaction. Ceci explique qu'après fonctionnalisation des MWCNTs par cette technique, aucune modification du spectre IR ainsi que de la solubilité de ces nanotubes dans l'eau et dans des solvants organiques n'a été observée comparée aux MWCNTs initiaux. Un sel de diazonium a donc d'abord été synthétisé et isolé à partir du (4-aminoéthyl)aniline,⁶⁶ donnant le (4-aminoéthyl)benzène diazonium tétrafluoroborate (AEBD). La synthèse de ce dérivé a lieu en condition acide, l'amine primaire est alors protonée et par conséquent protégée durant la formation du diazonium. Ce composé a d'abord été caractérisé par des méthodes spectroscopiques, puis il a été électroréduit à la surface des électrodes de MWCNTs. Le greffage d'AEBD sur les électrodes de GC et de MWCNTs par voltammétrie cyclique est présenté ci-dessous.

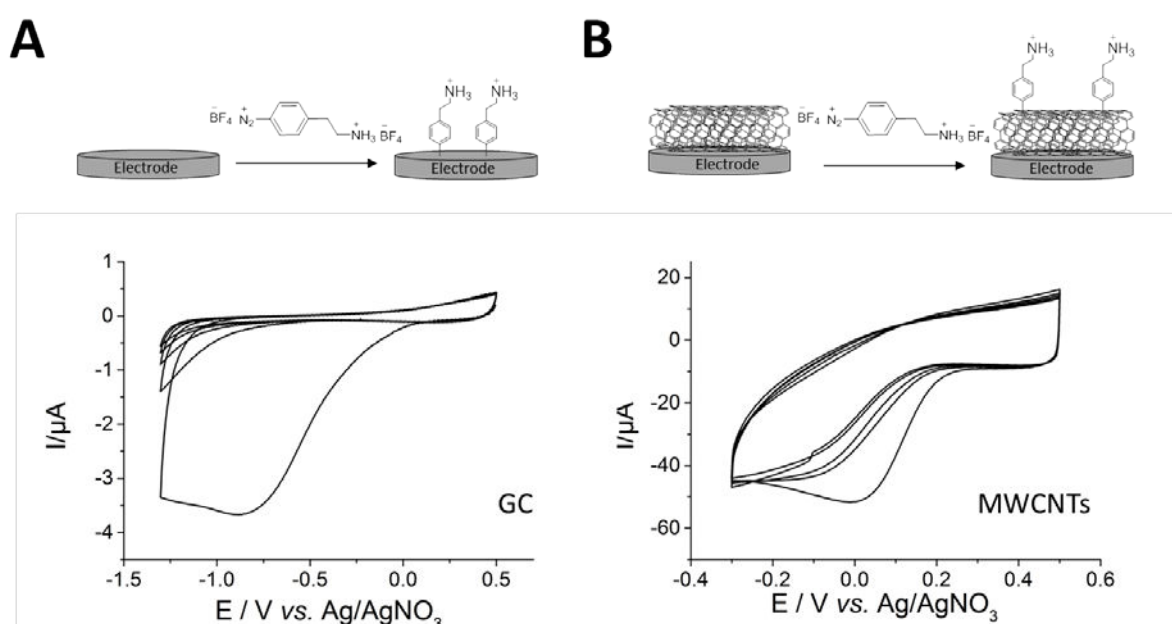


Figure 10 : Schéma de l'électrogreffage du sel de diazonium AEBD et CVs dans MeCN 0,1 M TBAP sous argon sur A) carbone vitreux et B) MWCNTs, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$

Les expériences ont été réalisées dans une solution d'acétonitrile contenant 2 mM de sels de diazonium. Pour ces deux électrodes, un pic large de réduction est obtenu au premier scan, à

$E_p = -0,7 \text{ V vs. Ag/AgNO}_3$ et $-0,5 \text{ V vs. Ag/AgNO}_3$, pour les électrodes de GC et de MWCNTs respectivement. Ce pic n'est plus observé dès le deuxième cycle indiquant la passivation de l'électrode. Ce comportement électrochimique est similaire à celui de divers sels d'aryldiazonium substitués,⁶⁶⁻⁶⁹ et il est en accord avec le greffage du diazonium à la surface de l'électrode.

La passivation de la surface des électrodes GC après la modification avec le sel d'aryldiazonium est confirmée en utilisant le $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ comme sonde redox. La figure 11A montre les CVs avant et après modification des électrodes GC et MWCNTs par AEBD dans une solution à 3 mM de $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ dans du tampon McIlvaine pH 7 saturé en argon. Après modification, le système redox $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$ observé sur GC est presque complètement supprimé, ce qui suggère qu'une couche uniforme de diazonium a été déposée à la surface de l'électrode bloquant le passage de la sonde.

A l'inverse, le signal $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$ avant et après fonctionnalisation des MWCNTs est quasiment inchangé. On observe une légère augmentation du ΔE_p soulignant un transfert d'électron un peu plus lent. Ceci suggère que la surface spécifique de ces électrodes est tellement grande que l'électroréduction du diazonium ne permet pas la formation d'une couche compacte qui bloquerait le passage de la sonde redox.⁶⁸

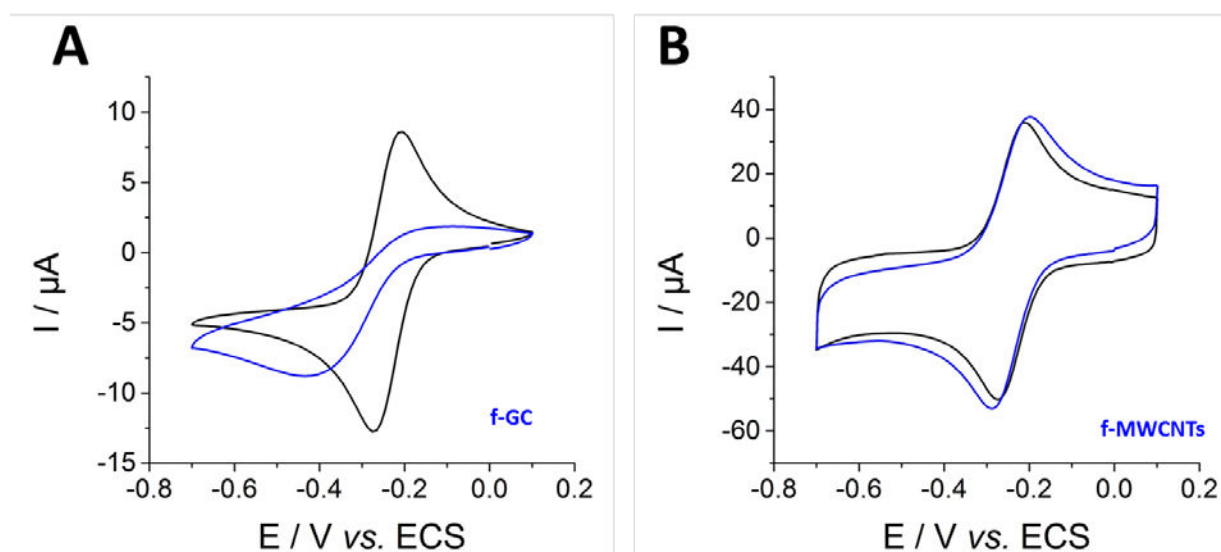


Figure 11 : CVs dans une solution de $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ à 3 mM dans du tampon McIlvaine pH 7 saturé en argon avant et après fonctionnalisation des électrode par AEBD pour les électrodes A) GC et B) MWCNTs, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$

Le greffage des fonctions terminales NH_2 à la surface des CNTs, a été démontré par électrochimie. Le 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acide (TNBS) a été lié covalentement par une réaction de substitution nucléophile aromatique aux amines immobilisées, puis le TNBS greffé a été détecté par électrochimie (Figure 12). Le TNBS est un colorant classiquement utilisé en biologie pour marquer les lysines (amine primaire) des protéines.^{70,71} La spectroscopie UV-Vis à 420 nm est généralement utilisée pour détecter ce dernier. Ici, le TNBS a été utilisé comme sonde redox et non comme marqueur spectroscopique grâce à ces

trois groupements nitro qui peuvent être détectés électrochimiquement. Les marqueurs immobilisés sur la surface servent de marqueur aux amines immobilisées. La figure 12 illustre le principe de réaction entre le TNBS et les amines immobilisées, menant à la liaison covalente du trinitrobenzène à la couche pré-greffée d'amines.

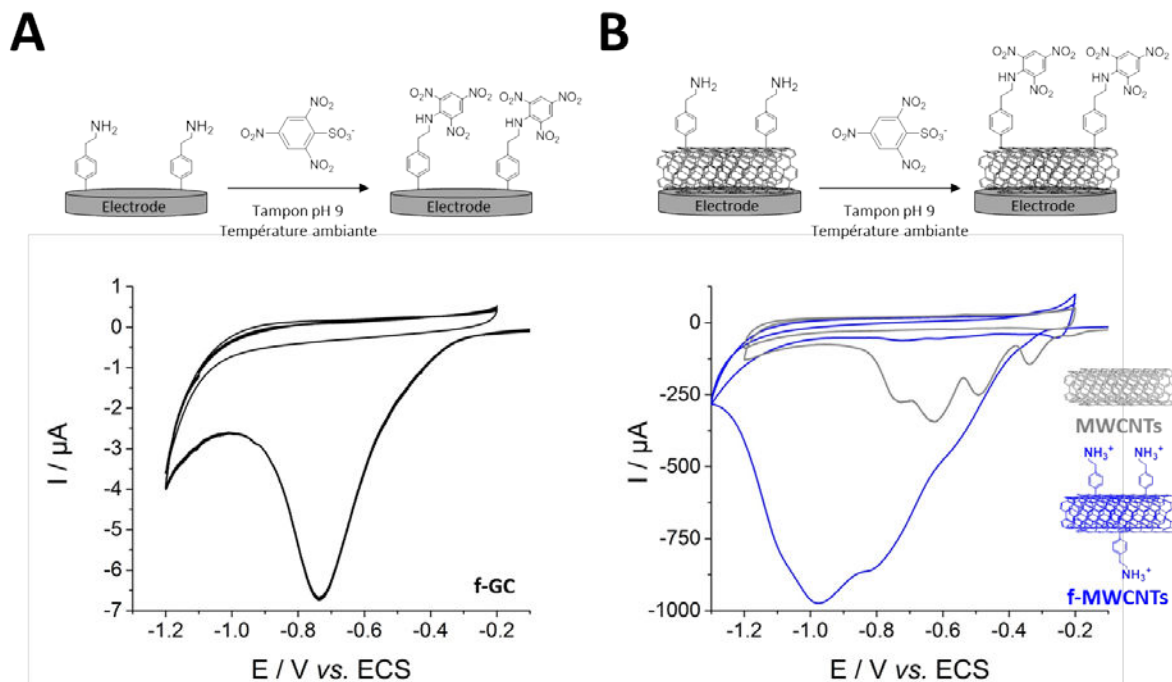


Figure 12 : Représentation schématique de la réaction chimique entre les amines greffées et le TNBS ainsi que les voltammogrammes (1^{er} et 2^{ème} cycles) obtenus dans du tampon McIlvaine pH 7 sous argon après immersion des électrodes dans une solution de TNBS pendant 1 h pour A) GC et B) MWCNTs, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$

Suite à la modification des électrodes GC et de MWCNTs par AEBD dans des conditions similaires à la figure 10, les électrodes ont été rincées dans l'acétonitrile et dans l'eau, puis elles ont été immergées dans une solution de TNBS à 1 mM dans du tampon Britton Robinson à pH 9 pendant 1 h. Des électrodes témoins GC et MWCNTs non modifiées par AEBD ont aussi été préparées. Après 10 minutes de rinçage, ces électrodes fonctionnalisées ont été caractérisées électrochimiquement dans du tampon McIlvaine pH 7.

Les voltammogrammes obtenus sont exposés en figure 12. Pour les électrodes préalablement modifiées par des fonctions amines, on observe un pic intense de réduction irréversible à $E_p = -0,75 \text{ V vs. ECS}$ et -1 V vs. ECS au premier balayage, respectivement sur GC et sur MWCNTs. Ce pic est attribué à la réduction des trois groupements nitro immobilisés à la surface de l'électrode. Les électrodes de GC immergées dans le TNBS sans avoir subi de greffage préalable de fonctions amines ne montrent aucun pic de réduction. Le pic observé n'est donc pas dû à l'adsorption du TNBS sur les électrodes de GC. Néanmoins, pour les électrodes à base de MWCNTs, des pics beaucoup moins intenses sont observés avec les électrodes de MWCNTs non modifiées par AEBD. Ces pics sont attribués à la réduction du TNBS, capable de s'adsorber sur ces électrodes par interactions π - π avec la

paroi des MWCNTs. Ces résultats confirment la présence d'amines terminales à la surface des électrodes modifiées par l'électroréduction d'AEBD.

Les biocathodes ont été préparées selon cette procédure. Suite à la formation du film de MWCNTs et à sa modification électrochimique par AEBD. Les électrodes ont été rincées dans l'acétonitrile et dans l'eau, puis incubées dans une solution d'enzyme (2,5 mg mL⁻¹ dans du tampon McIlvaine pH 7) toute une nuit à 4 °C.

III.3 Caractérisation des électrodes en présence et en absence de substrat

Les CVs dans du tampon saturé en argon et en oxygène des bioélectrodes ayant été incubées avec l'enzyme ont été réalisées après rinçage (Figure 13).

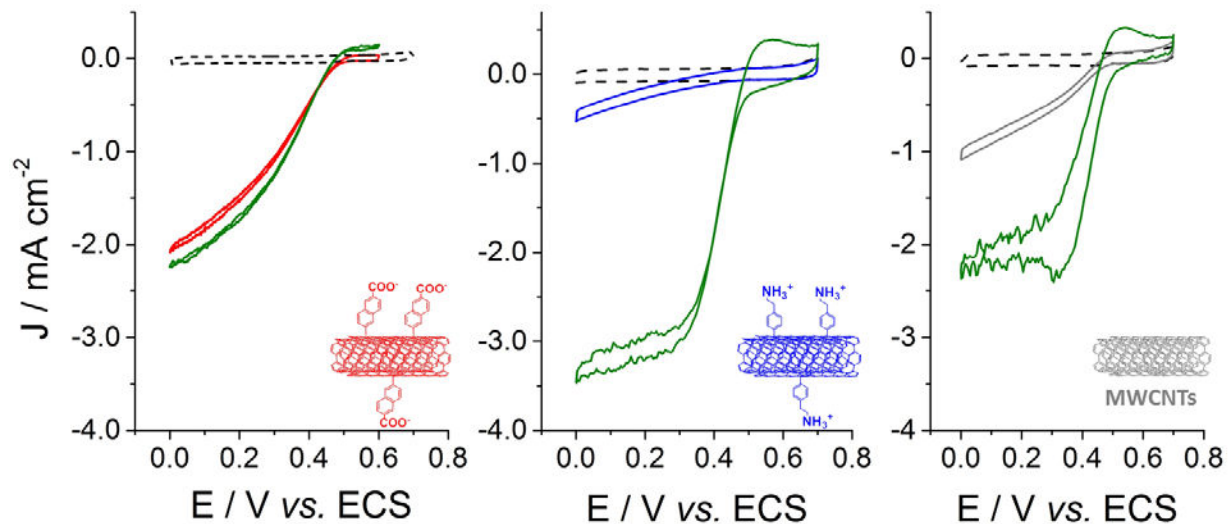


Figure 13 : CVs des électrodes de GC fonctionnalisées par les f-MWCNTs-COO⁻/BOD (rouge), f-MWCNTs-NH₃⁺/BOD (bleu) et MWCNTs/BOD (gris) dans du tampon McIlvaine pH 7 saturé en argon (tirets) et en oxygène (trait plein) et après (vert) ajout de 0,3 mM d'ABTS sous agitation, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$

Toutes les électrodes catalysent la réduction d'O₂ à un potentiel de départ proche de 0,5 V vs. ECS. Néanmoins, on observe que cette catalyse est bien plus efficace pour les électrodes de MWCNTs fonctionnalisées par les groupements naphthoates. Ces électrodes délivrent une densité maximale de courant de -2 mA cm⁻² à 0 V vs. ECS. A l'inverse, les électrodes de MWCNTs fonctionnalisées par des groupements ammoniums délivrent une densité de courant encore plus faible que celle des électrodes témoins de -0,5 mA cm⁻² à 0 V vs. ECS. De plus, la forme du voltammogramme rappelle les résultats obtenus pour les électrodes MWCNTs/OEP où l'enzyme n'était pas favorablement orientée (Figure 5).

En présence de 0,3 mM d'ABTS en solution, les densités de courant sont augmentées pour toutes les électrodes. Ce résultat démontre que toutes les enzymes immobilisées à la surface des électrodes ne sont pas connectées. Pour les électrodes à base d'AEBD, la densité de courant maximum atteint un palier à -3 mA cm⁻² tandis que les électrodes de MWCNTs

atteignent un palier à -2 mA cm^{-2} . De ces expériences, nous déduisons que respectivement 14% et 53 % des enzymes sont connectées par DET sur ces électrodes. La plus faible augmentation est obtenue pour les électrodes à base d'acide naphthoïque qui atteignent un palier à $-2,2 \text{ mA cm}^{-2}$. Ceci montre encore une fois que les charges négatives favorisent la bonne orientation de la BOD par son centre T1 puisque 92 % des enzymes immobilisées sont connectées sans médiateur redox en solution.

Bien que la porosité des films de MWCNTs et f-MWCNTs-NH₃⁺ soit identique, la plus importante densité de courant en MET des électrodes à base de f-MWCNTs-NH₃⁺ sous-entend que les charges positives (NH₃⁺) permettent d'immobiliser plus d'enzyme à la surface de l'électrode mais dans une orientation défavorable au DET comparé aux MWCNTs.

Enfin, pour les électrodes de f-MWCNTs-COO⁻, on observe que les vagues catalytiques en DET ou en MET n'ont pas la forme classique obtenue lorsque les enzymes sont bien connectées. En effet, même en présence d'ABTS on n'observe pas une importante vague de catalyse commençant à 0,5 V, suivie d'un plateau. De plus, la densité maximale en MET est inférieure à celle obtenue avec les films de f-MWCNTs-NH₃⁺. Ces observations sont attribuées à une plus grande densité du film de f-MWCNTs-COO⁻. Les films de f-MWCNTs-COO⁻ sont réalisés grâce à une solution de f-MWCNTs et non une suspension comme pour les films de MWCNTs ou de f-MWCNTs-NH₃⁺. Ceci permet l'obtention de films fins et faiblement rugueux comme le souligne la figure 14. On observe par microscopie laser que les films de MWCNTs sont beaucoup plus rugueux accompagnés de plus larges pores dans le réseau de CNTs par rapport aux films de f-MWCNTs-COO⁻.

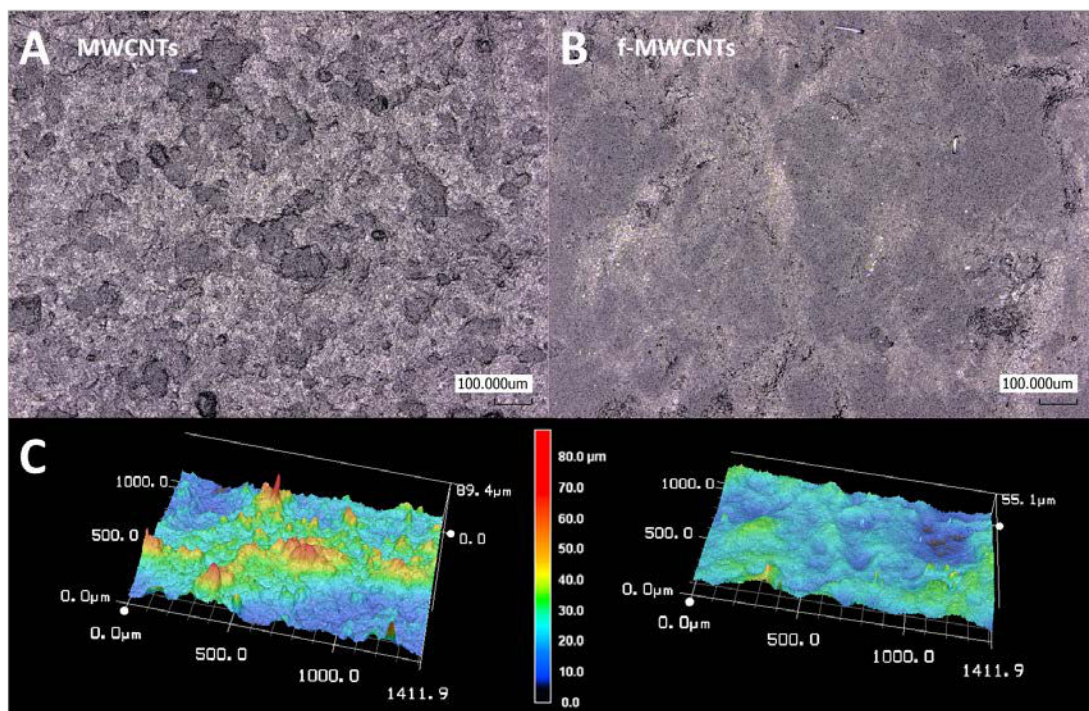


Figure 14 : Image en microscopie laser des films de A) MWCNTs et de B) f-MWCNTs-COO⁻ ; C) comparaison de la topographie des films de MWCNTs (gauche) et f-MWCNTs-COO⁻ (droite)

La plus faible rugosité de ces films, associée à une plus grande densité du film de f-MWCNTs-COO⁻ induit l'obtention d'une surface très plane avec des pores plus petits. Ceci limite probablement le nombre d'enzymes immobilisées à la surface des électrodes (lors de l'incubation avec la solution d'enzymes), ainsi que la diffusion de l'oxygène à travers ces films. Ceci vient alors contrebalancer les propriétés d'orientation des f-MWCNTs-COO⁻. Pour confirmer cette hypothèse de nouvelles électrodes ont été préparées, basées sur la formation d'un film de f-MWCNTs-COO⁻ sur un film de MWCNTs présentant des pores plus larges. 20 μl de la solution de f-MWCNTs-COO⁻ ont été déposés sur les électrodes de MWCNTs puis séchés sous vide. Ces électrodes ont ensuite été incubées avec l'enzyme comme il l'a été précédemment décrit. La caractérisation sous argon et sous oxygène par voltammétrie cyclique est exposée en figure 15.

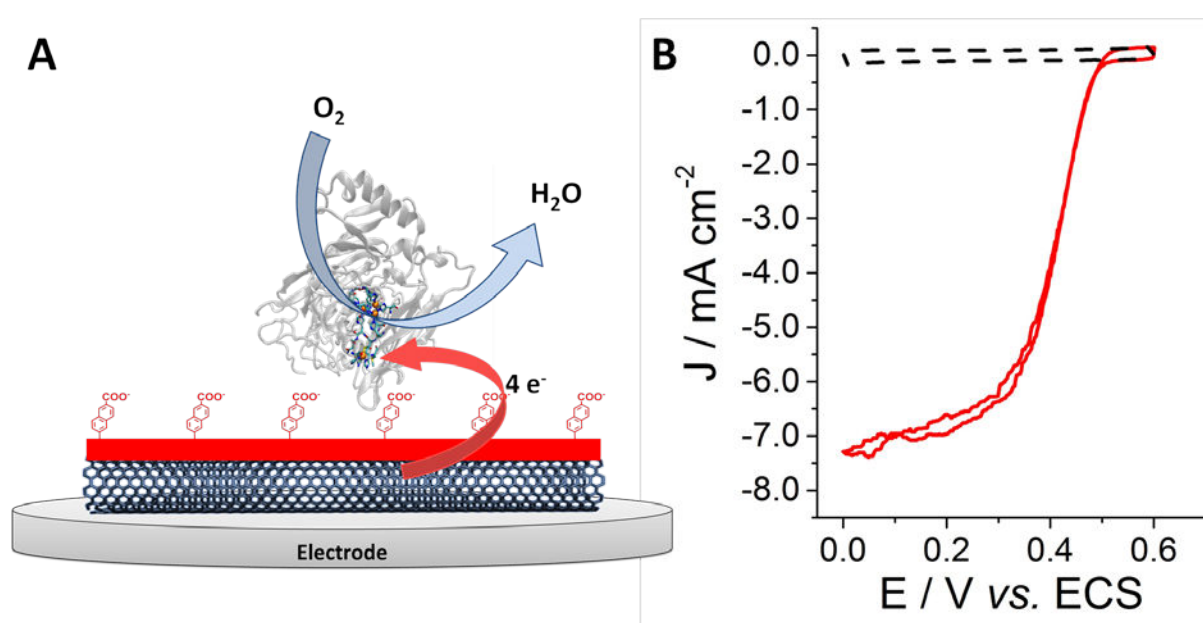


Figure 15 : A) représentation schématique de la biocathode MWCNTs/f-MWCNTs-COO⁻/BOD et B) CVs de la biocathode dans du tampon McIlvaine pH 7 saturée en argon (noir) et en oxygène (rouge), $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$

On observe sous oxygène que l'incorporation d'une sous couche de MWCNTs permet une augmentation importante de la densité de courant de réduction ; passant de -2 à -7,3 mA cm^{-2} à 0 V vs. ECS dans les mêmes conditions, ce qui confirme notre hypothèse. Pour cette nouvelle biocathode, la sous-couche de MWCNTs permet d'une part le développement d'une plus grande surface spécifique permettant l'immobilisation d'une plus grande quantité d'enzymes, et d'autre part, l'introduction d'une « porosité » plus élevée pour permettre au substrat de diffuser. Ces différents effets ont pour conséquence l'augmentation de la densité de courant.

III.4 Modélisation électrochimique

La figure 16 montre les vagues de catalyse expérimentale obtenues pour les différentes biocathodes (courbe noire), après soustraction des courants capacitifs dus aux MWCNTs, et issues de la simulation (courbe rouge) selon le modèle de la dispersion du transfert

d'électron. Les paramètres associés à chaque simulation pour $n = 1$ sont reportés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Paramètres des simulations obtenues pour les bioélectrodes MWCNTs/BOD et f-MWCNTs/BOD

	E_0 (V vs. ECS)	J_{lim} (mA cm ⁻²)	p	βD_0	% ABTS
MWCNTs	0,41	-1,15	0,03	12.2	53
MWCNTs-f-MWCNTs-COO ⁻	0,42	-7	0,9	-	-
f-MWCNTs-NH ₃ ⁺	0,41	-0,47	1,77	10,1	14

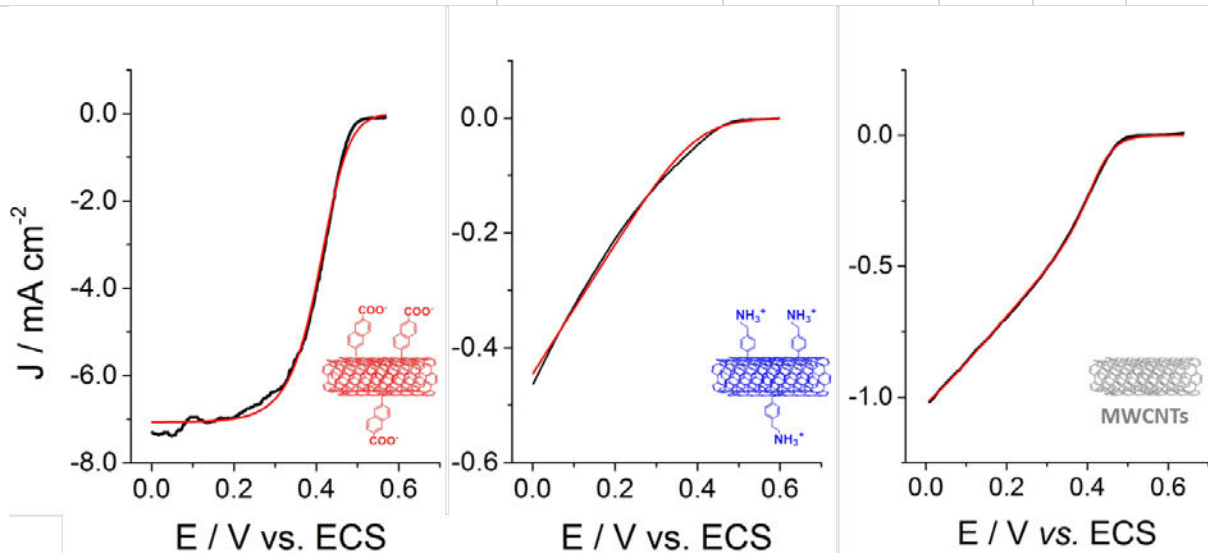


Figure 16 : CVs expérimentales (noir) et simulés (rouge) pour les bioélectrodes MWCNTs/f-MWCNTs-COO⁻/BOD, f-MWCNTs-NH₃⁺/BOD et MWCNTs/BOD obtenues sous oxygène (Cf. Figure 13 et 15). La contribution capacitive des MWCNTs a été soustraite

Les vagues de catalyse des électrodes MWCNTs et f-MWCNTs-NH₃⁺ sont bien modélisées suivant l'équation 2 :⁶⁰

$$J = \frac{J_{lim}}{\beta d_0} \frac{e_1 - e_2}{1 + e_1} \ln \frac{pe_1^\alpha + 1 + e_1}{pe_1^\alpha + (1 + e_1)\exp(-\beta d_0)} \quad (2)$$

Pour ces électrodes, de larges valeurs de βD_0 sont observées (Tableau 2) soulignant la dispersion des constantes de transfert d'électron due aux enzymes non orientées. De plus, la valeur de p est plus faible pour les électrodes de MWCNTs comparées aux électrodes de f-MWCNTs-NH₃⁺. On passe d'une valeur aux alentours de 0,05 à plus de 1,5. Ce résultat suggère que la charge positive à la surface des MWCNTs entraîne une orientation non favorable de la BOD qui augmente la distance entre le centre T1 et la surface de l'électrode.

Dans le cas des MWCNTs/f-MWCNTs-COO⁻, la vague de catalyse suit une cinétique plus simple, comme pour le laccase avec le Pyr-AQ₂, en accord avec l'équation 4 sans dispersion du transfert d'électron.⁶⁰

$$J = J_{lim} \frac{e_1 - e_2}{1 + e_1 + p e_1^\alpha} \quad (4)$$

Les charges négatives à la surface des CNTs permettent donc une orientation favorable à un DET de la BOD qui homogénéise les constantes de transfert.

Des MWCNTs ont donc été fonctionnalisés coalement suivant deux stratégies différentes pour introduire des charges à la surface des électrodes. La fonctionnalisation par la formation d'un dérivé aryldiazonium *in situ* a permis l'incorporation de charges négatives, tandis que l'électroréduction d'un sel aryldiazonium préalablement synthétisé a permis l'incorporation de charges positives. Les charges négatives permettent une orientation favorable de la BOD pour le DET. A l'inverse, les charges positives entraînent une orientation défavorable de l'enzyme qui éloigne le centre T1 de la surface de l'électrode et donc diminue le DET. Les f-MWCNTs-COO⁻ sont solubles dans l'eau et dans divers solvants organiques ce qui rend leur manipulation beaucoup plus facile comparée aux MWCNTs non fonctionnalisés. Ils vont pouvoir être intégrés à des encres pour l'élaboration de biocathodes respirantes. De plus, l'emploi synergique de films de MWCNTs (plus « rugueux » et présentant des pores plus larges) et de films de f-MWCNTs-COO⁻ a permis le développement d'une biocathode extrêmement efficace pour la réduction du dioxygène, délivrant une densité de courant maximum de -7 mA cm⁻². La conception d'une biopile glucose/O₂ basée sur la réduction d'O₂ par cette biocathode est détaillée dans le chapitre IV.

IV- Elaboration de Biocathode à air à base de BOD en transfert direct d'électron:

La faible solubilité et valeur du coefficient de diffusion de l'oxygène dissout en solution aqueuse contribuent à limiter les réactions biocatalytiques. Combiner les MCOs à des électrodes respirantes contribue à élaborer des électrodes capables de réduire l'oxygène de l'air en s'affranchissant des contraintes de solubilité et de diffusion de l'oxygène dans l'électrolyte. Ce type d'électrode a largement été développé pour les piles à combustibles alcalines et acides ainsi que pour les batteries métal-air. Néanmoins, le transfert de cette technique à la biocatalyse est toujours en développement.

En général, ces électrodes sont composées d'une couche de GDL hydrophobe (Gaz Diffusion Layer) et d'une couche de catalyseur hydrophile. L'enzyme est à l'interface de trois phases liquide, solide et gaz (Figure 17). La phase liquide composée du tampon procure l'environnement chimique nécessaire à la protéine, en termes de pH et de force ionique, ainsi que l'électrolyte support pour l'électrochimie. La phase solide constituée de la GDL joue le rôle de support d'électrode et de collecteur de courant. Cette surface hydrophobe permet aussi d'éviter une humidification trop importante de la surface, en diminuant la quantité de solution présente. Ceci permet l'amélioration du transport de masse de l'oxygène présent

dans l'air comparé à la même électrode immergée en solution. L'oxygène diffuse mieux à la surface de l'électrode tout en gardant la même solubilité dans l'eau.

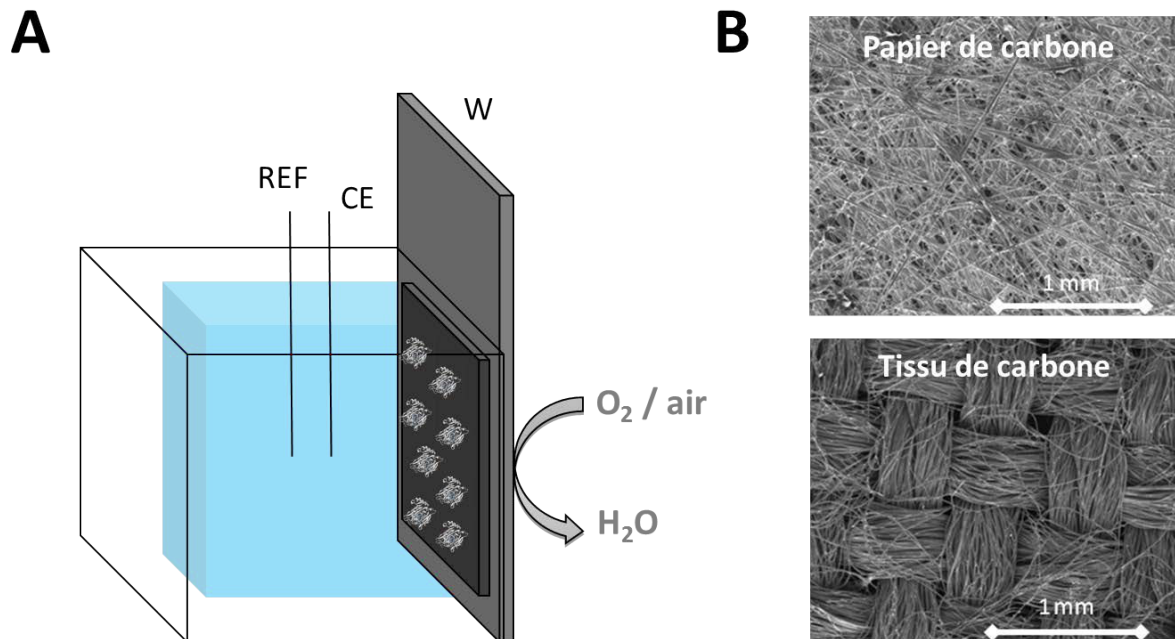


Figure 17 : A) Représentation schématique d'une biocathode respirante ; B) Images MEB des GDL en papier et tissu de carbone

Les GDLs sont des matériaux supports très utilisés dans le domaine des piles à combustibles, du fait de la grande porosité apportée par le réseau dense de fibres de carbone. Outre la flexibilité et la porosité, et comme son nom l'indique ce type d'électrodes présente un autre avantage non négligeable pour la conception de biocathode respirante, qui est la diffusion des gaz à travers la membrane. Les deux types de GDLs les plus couramment utilisés sont le papier de carbone et le tissu de carbone. Dans le premier cas, un liant est utilisé pour assembler les fibres de carbone tandis que dans le second cas, les fibres sont tissées.

De nombreux travaux sur des biocathodes à air ont été menés, particulièrement par Atanassov et ses collaborateurs. Ils ont notamment élaboré en 2011, une cathode respirante à base de BOD *Mv*. Du noir de carbone téflonisé (CB/PTFE) est pressé sur un papier de carbone, puis la BOD est immobilisée par simple adsorption sur la surface. Dans les conditions physiologiques, cette électrode fournit une densité de courant de réduction proche de $-0,35 \text{ mA cm}^{-2}$ à 0 V vs. Ag/AgCl ; soit une densité trois fois supérieure à celle obtenue en milieu aqueux saturé en oxygène.⁷² Par la suite, cette électrode a été optimisée pour produire une densité de courant de $-0,5 \text{ mA cm}^{-2}$ dans les mêmes conditions.^{73,74}

Ensuite, Nishiwaza et al. ont fonctionnalisé un tissu de carbone avec un mélange de Kejten Black, de téflon et de BOD *Mv*. Cette cathode délivre une densité de -2 mA cm^{-2} à $0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ à pH 5.^{75,76} Le remplacement du Kejten Black par des MWCNTs permet de doubler la densité de courant.⁷⁷ Tsujimura et al. ont réalisé une cathode similaire sur papier de carbone, atteignant un maximum de -1 mA cm^{-2} à 0 V vs. Ag/AgCl à pH 7.⁴²

Plus récemment, sur un papier de carbone la BOD *Mv* a été encapsulée dans un gel de silice composé de SWCNTs fonctionnalisés par des pyrène-tétrasilfonique. Une densité de réduction de $-1,5 \text{ mA cm}^{-2}$ à $0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ a été obtenue à pH 5.^{78,79}

En 2014, une cathode souple à base d'une feuille de silicone revêtue d'un mélange de BOD *Mv*, chitosan et MWCNTs a été élaborée.⁸⁰ Cette électrode génère une densité maximale de courant de $-0,4 \text{ mA cm}^{-2}$ à $0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ à pH 5. Atanassov et al. ont élaboré de nouvelles biocathodes respirantes à base de noir de carbone téflonisé. Ils ont intégré les CNTs à leurs électrodes, soit en encapsulant des MWCNTs dans un gel de silice avec l'enzyme,²⁰ soit en compressant un buckypaper sur l'électrode avant le dépôt de l'enzyme.⁸¹ Ces électrodes délivrent respectivement $-0,4 \text{ mA cm}^{-2}$ et $-0,6 \text{ mA cm}^{-2}$ à 0 V vs. Ag/AgCl à pH 7.

De nouvelles stratégies d'immobilisation basées sur l'orientation de la BOD *Mv* commencent à être développées pour les biocathodes respirantes. Récemment, Atanassov et al. ont bifonctionnalisés leurs électrodes de CB/PTFE avec la syringaldazine et un pyrène-NHS. Une densité de courant de $-0,65 \text{ mA cm}^{-2}$ à $0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ à pH 7,5 a été obtenue.⁵⁰ Enfin, Kano et al. ont reporté l'orientation de la BOD par la bilirubine⁴⁸ sur des électrodes respirante à base de Kejten Black/PTFE,⁴⁹ atteignant -15 mA cm^{-2} à $0,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ sous air à pH 5.

Dans cette partie, nous avons étudié la modification de papier de carbone par les MWCNTs fonctionnalisés développés précédemment sur carbone vitreux pour l'orientation et l'immobilisation de la BOD *Mv*. Les stratégies d'immobilisation de l'enzyme par la protoporphyrine IX (PP) ainsi que par les f-MWCNTs-COO⁻ ont été transférés aux biocathodes respirantes. D'autre part, nous nous sommes intéressés à la connexion en transfert direct d'électron d'une autre BOD sur ce genre d'électrode : la bilirubine oxydase de *Bacillus Pumilus*.

IV.1 Adaptation des stratégies d'immobilisation et d'orientation de la BOD aux biocathodes respirantes :

IV.1.1 Elaboration des électrodes

Les biocathodes ont été préparées de manières similaires à celles présentés dans la partie précédente, excepté que le support d'électrode n'est plus une électrode de carbone vitreux mais du papier de carbone. Brièvement, $20 \mu\text{l}$ d'une dispersion de $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de MWCNTs dans du NMP ont été déposés sur du papier de carbone et séchés sous vide. Ensuite, ces dépôts de MWCNTs ont été incubés avec une solution de DMF contenant la protoporphyrine IX (PP), à $0,3 \text{ mM}$ pendant 1 h. Après avoir été abondamment rincées à l'eau distillée, les électrodes ont été incubées pendant la nuit dans une solution contenant $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de BOD (*Mv*) dans du tampon McIlvaine pH 7. Des électrodes témoins, n'ayant pas été fonctionnalisées par PP ont également été réalisées par simple physisorption de la protéine dans les mêmes conditions. Pour le second type d'électrode, une solution de f-MWCNTs-

COO^- de $171 \mu\text{g mL}^{-1}$ dans du NMP a été préparée. Puis, $20 \mu\text{L}$ ont été déposés sur du papier de carbone recouvert d'une couche de microporeux et séchés sous vide. Cette GDL a été préférée au feutre de carbone utilisé pour les électrodes MWCNTs/PP/BOD, car elle permet une meilleure déposition des f-MWCNTs. Enfin ces électrodes ont été incubées avec l'enzyme toute une nuit à 4°C . Les représentations schématiques des électrodes en figure 18A et B résument l'architecture de ces électrodes.

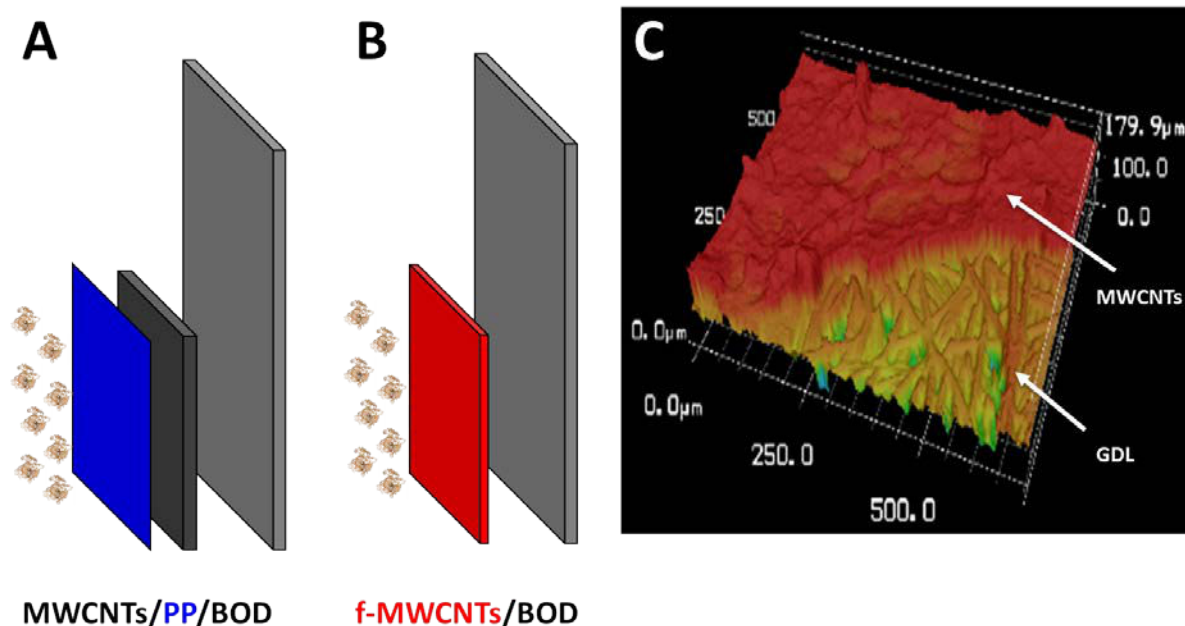


Figure 18 : Représentation schématique de l'architecture des électrodes respirantes A) MWCNTs/PP/BOD et B) f-MWCNTs/BOD ; C) Image du film de MWCNTs obtenue sur feutre de carbone par microscopie confocale à balayage laser

L'épaisseur des dépôts de MWCNTs et f-MWCNTs a été estimée par microscopie confocale à balayage laser (MCBL) (Figure 18C). Les dépôts de MWCNTs sont plus épais que ceux de f-MWCNTs, l'épaisseur moyenne varie respectivement entre $4\text{-}20 \mu\text{m}$ et $3\text{-}9 \mu\text{m}$ pour une monocouche déposée.

IV.1.2 Réduction bioélectrocatalytique du dioxygène :

Suite à l'adsorption de l'enzyme, ces électrodes ont été analysées dans une chambre respirante illustrée en figure 19A. De l'argon a été bullé dans le tampon afin d'éviter toute contribution de l'oxygène dissout dans les performances des électrodes. Les CVs sous argon, air et oxygène pour toutes les bioélectrodes testées sont exposées figure 19.

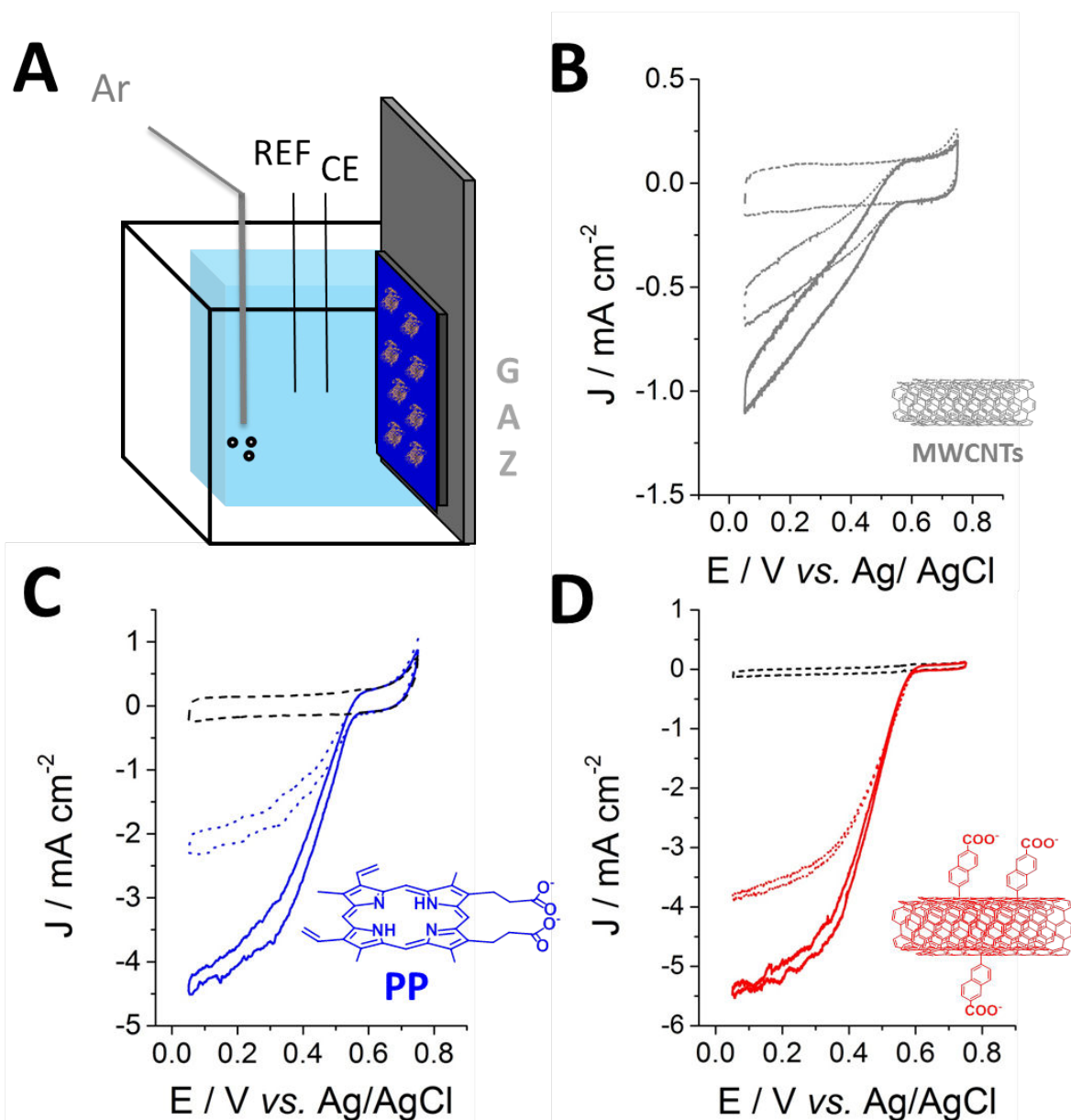


Figure 19 : A) Représentation du dispositif utilisé pour tester les bioélectrodes ; CVs des électrodes respirantes sous argon (tirets), air (pointillés) et O₂ (trait plein) dans du tampon McIlvaine pH 7 saturé en argon pour B) MWCNTs/BOD, C) MWCNTs/PP/BOD et D) f-MWCNTs/BOD, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$

Toutes les électrodes catalysent la réduction de O₂ à un potentiel de départ de 0,55 V vs. Ag/AgCl, sous air et sous O₂, néanmoins on observe que cette catalyse est bien plus efficace pour les électrodes où les nanotubes ont été fonctionnalisés.

Les plus fortes densités de courant de réduction sont observées pour les électrodes à base de f-MWCNTs où un maximum de -4 et -5,5 mA cm⁻² sont obtenues à 0,05 V vs. Ag/AgCl respectivement sous air et sous O₂. Les électrodes à base de MWCNTs/PP atteignent -2,2 et -4,5 mA cm⁻² dans les mêmes conditions. Enfin, les électrodes témoin à base de MWCNTS seuls réalisent les plus faibles densités de courant avec des maximums de -0,6 mA cm⁻² sous

air et -1 mA cm^{-2} sous O_2 . Ces résultats confirment l'intérêt de l'orientation de la BOD pour améliorer la bioélectrocatalyse.

Lorsque l'on ajoute du dioxygène en solution, de telle sorte que l'électrode est en contact avec l'oxygène aussi bien en solution que dans la chambre gazeuse, on observe une faible augmentation (1%) du courant catalytique pour les électrodes f-MWCNTs/BOD. A l'inverse, pour les électrodes MWCNTs/PP/BOD, les densités de courant de catalyse augmentent (12%) pour atteindre un palier à -5 mA cm^{-2} à $0,05\text{V vs. Ag/AgCl}$. Dans ces conditions, la vague de catalyse est similaire à celle obtenue en solution (Cf. figure 5).

Ce résultat suggère que pour les électrodes respirantes MWCNTs/PP/BOD, la diffusion du dioxygène à travers l'électrode est limitante. Deux hypothèses peuvent expliquer cette limitation. Premièrement, nous avons observé en MCBL que le film de MWCNTs est plus épais que celui de f-MWCNTs. L'oxygène a donc plus de mal à diffuser à travers cette épaisseur. Une deuxième hypothèse plus plausible est basée sur l'hydrophobicité de la couche catalytique. Les f-MWCNTs sont bien plus hydrophiles que les MWCNTs/PP. La solution d'enzyme a donc plus d'affinité pour cette surface ce qui aide à la pénétration de l'enzyme dans le film et ainsi rapproche celle-ci du compartiment gazeux. Les MWCNTs/PP sont trop hydrophobes pour permettre à l'enzyme de pénétrer à l'intérieur des pores du film. Cette hypothèse est supportée par les travaux de Kano et al., où la densité d'une biocathode respirante a été augmentée par l'incorporation d'un tensio-actif non-ionique à la solution d'enzyme déposée.⁸²

Enfin, si l'on compare les performances sous O_2 des électrodes respirantes à celles obtenues sur carbone vitreux pour les f-MWCNTs ; on observe que la densité de courant est 2 fois plus importante pour les électrodes respirante (cf. figure 13). On passe de -2 mA cm^{-2} à $-5,5 \text{ mA cm}^{-2}$ à 0 V vs. ECS dans les mêmes conditions. Ceci démontre encore une fois que le passage d'un support plan (électrode de carbone vitreux) à un support poreux (GDL ou film de MWCNTs) permet d'introduire de la porosité dans l'architecture de l'électrode. La surface spécifique de l'électrode ainsi que la quantité d'enzymes immobilisées sont alors augmentées. D'après les images en MCBL, les films de MWCNTs ont des porosités similaires sur carbone vitreux et sur GDL ce qui explique qu'aucune augmentation de la densité de courant de catalyse n'est observée pour les électrodes MWCNTs/BOD et MWCNTs/PP/BOD réalisées sur GDL.

IV.2 Elaboration de biocathodes respirantes à base de BOD *Bacillus Pumilus*.

IV.2.1 Généralités

Récemment, une nouvelle MCO a été découverte : la BOD de *Bacillus pumilus*.^{8,83} Les études biochimiques ont montré une grande stabilité thermique de cette enzyme, ainsi qu'une plus grande tolérance aux chlorures et à l'urate comparé à la laccase *Tv* et à la BOD *Mv*.⁸ La BOD

Bp semble donc très prometteuse pour l'élaboration de biocathodes. Néanmoins peu de travaux ont été réalisés sur le MET^{8,42,84-86} et le DET^{42,43} avec cette enzyme

Nous avons cherché à étudier le DET de cette enzyme sur des électrodes de MWCNTs respirantes afin d'obtenir la meilleure catalyse possible grâce à l'oxygène présent dans l'air. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe Biocapteur et Biopiles du Dr. Nicolas Mano de Bordeaux. La production ainsi que la purification de la BOD *Bp* ont été faites par le CRPP (Centre de Recherche Paul Pascal).

IV.2.2 Immobilisation et connexion de la BOD *Bp*

La BOD *Bp* a initialement été répertoriée comme laccase et ne présente que 26 % d'homologie de séquence avec la BOD *Mv*. De plus, sa structure cristalline étant encore méconnue, nous avons donc cherché à appliquer les stratégies précédemment développées pour la connexion de la laccase *Tv* et de la BOD *Mv* à cette enzyme. Des GDLs ont été fonctionnalisées avec des MWCNTs, des MWCNTs/PP et des f-MWCNTs avec l'antraquinone, l'acide naphthoïque ou AEED. Ces électrodes ont ensuite été incubées avec 10 μ L d'une solution à 10 μ M d'enzyme pendant 1 h à température ambiante.

Les CVs de ces électrodes respirantes dans du tampon pH 7,2 saturé en argon sont reportées en figure 20A. Les électrodes modifiées par des acides carboxyliques (PP ou f-MWCNTs) ainsi que par des NH_3^+ présentent un très faible DET avec cette enzyme. A l'inverse de la BOD *Mv*, *B. pumilus* n'est pas favorablement orientée et connectée par cette stratégie. Les autres électrodes montrent de forts courants électrocatalytiques, accompagnés d'un potentiel de départ de 0,4 V vs. Ag/AgCl. La présence d'antraquinones à la surface des MWCNTs, n'empêche pas un bon transfert d'électron. Une densité maximale de courant de -2,2 mA cm^{-2} à 0 V vs. Ag/AgCl est mesurée pour la réduction du dioxygène de l'air dans ces conditions. Néanmoins, la meilleure connexion de l'enzyme est obtenue avec les MWCNTs non fonctionnalisés. La densité maximum de courant atteint -3 mA cm^{-2} à 0 V vs. Ag/AgCl sous air.

Dans un deuxième temps, l'influence du type de CNTs utilisé pour connecter l'enzyme a été étudiée. Des électrodes à base de SWCNTs et DWCNTs ont été élaborées suivant le protocole utilisé pour les MWCNTs. Comme l'illustre la figure 20B, ces CNTs sont bien moins performants pour connecter la BOD. On observe une augmentation du courant capacitif, accompagnée d'une catalyse de réduction trois fois moins efficace que pour les MWCNTs.

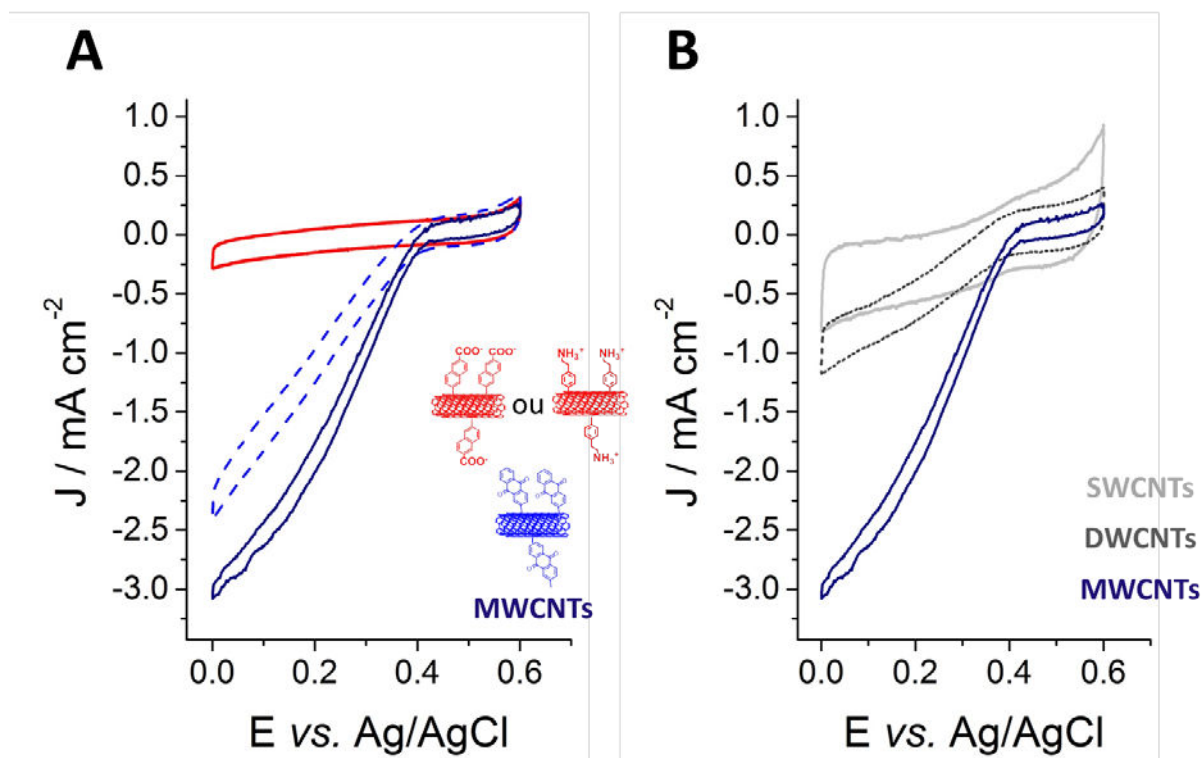


Figure 20 : CVs des électrodes respirantes sous air dans du tampon McIlvaine pH 7,2 saturé en argon, 45 °C, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$

La préférence de la BOD *Bp* pour les MWCNTs s'explique par la présence de domaines hydrophobes à la surface de la protéine. Ces domaines favorisent des interactions hydrophobes avec la paroi des MWCNTs. La figure 21A montre un modèle de la structure de l'enzyme construit à partir de la structure cristallographique de CotA de *Bacillus subtilis*. Cette enzyme présente 67% d'homologie de séquence avec la BOD *Bp*. De plus, cette enzyme a un fort moment dipolaire de 2073 Debye pointant vers un patch chargé positivement à la surface de la protéine, à l'opposé du centre T1.⁴³ Ceci empêche l'orientation favorable de l'enzyme sur les MWCNTs chargés négativement. Le centre T1 se retrouve éloigné de la surface de l'électrode et en conséquence le DET est largement diminué. On peut également supposer que les SWCNTs et les DWCNTs sont bien trop hydrophobe comparé aux MWCNTs, ainsi l'ensemble partie hydrophobe des MWCNTs et défauts oxygénés favorise la connexion de la BOD *Bp*.

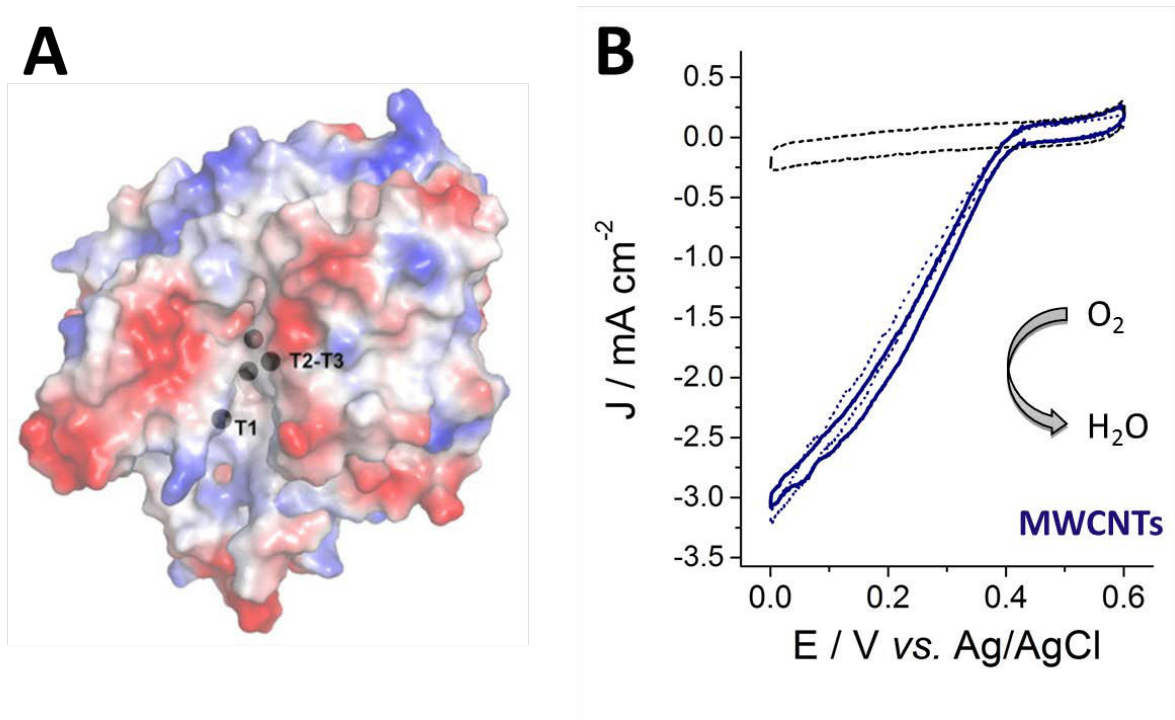


Figure 21 : A) Modèle de la structure de la BOD Bp basé sur la structure cristallographique de CotA Bs (pdb ID: 1GSK). Les acides aminés hydrophobes (blanc), chargés positivement (bleu) et négativement (rouge). Reproduit de [43] et B) CVs des électrodes respirantes MWCNTs/BOD Bp sous argon (tirets), air (pointillés) et O₂ (trait plein) dans du tampon McIlvaine pH 7,2 saturé en argon, 45 °C, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$

L'influence de l'épaisseur du film sur la catalyse a été étudiée. Des films d'épaisseur variant entre 4 et 40 μm (mesuré par MCBL) ont été déposés à la surface des GDL. Aucune augmentation ou diminution de la biocatalyse n'a été observée ; ce qui traduit l'excellent DET des BOD adsorbées. Il est aussi à noter que lorsque l'on place un flux d'oxygène dans la chambre gazeuse, aucune augmentation notable de la densité de courant est observée (Figure 21B). Ceci démontre l'excellente diffusion de l'oxygène à travers l'électrode permettant une concentration optimale d'O₂ pour la catalyse.

Cependant, l'ajout d'un médiateur redox en solution entraîne une importante augmentation de la densité de courant de catalyse. De plus, la forme de la vague de catalyse ne suit pas un système nernstien. Ces éléments suggèrent que l'intégralité des BOD immobilisées n'est pas connectée à la surface des électrodes. Il existe une dispersion dans l'orientation de l'enzyme à la surface des MWCNTs. A ce jour, cette électrode est l'une des meilleures biocathodes développées avec la BOD *B. pumilus*. Néanmoins, une stratégie d'immobilisation et d'orientation plus efficace de cette enzyme reste à élucider.

V- Comparaison des biocathodes à air à base de BOD *Bp* et BOD *Mv*

La superposition des CVs obtenues dans les meilleures conditions des électrodes respirantes à base de BOD *B. pumillus* et BOD *M. verrucaria* sont exposées en figure 22.

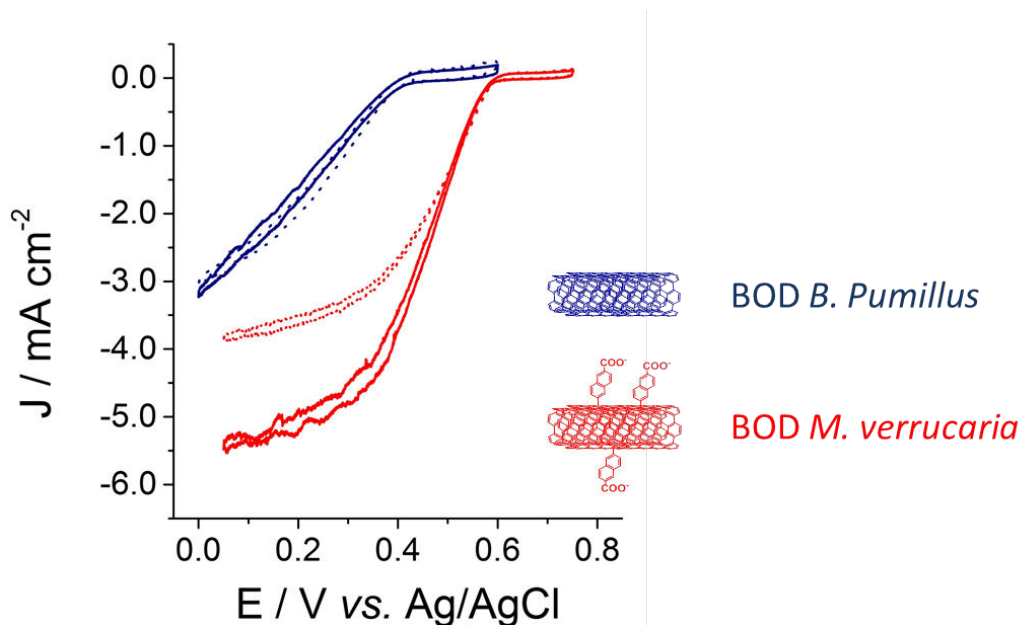


Figure 22 : Superposition des figures 19D et 20B

On observe le potentiel de la BOD *Mv* (0,55 V vs. Ag/AgCl) est bien supérieur à celui de la BOD *Bp* (0,40 V vs. Ag/AgCl) à pH 7. Les densités de courant de réduction du dioxygène sous air et sous O₂ sont aussi bien plus efficaces pour les électrodes f-MWCNTs-COO⁻/BOD *Mv*. La catalyse est plus importante de 33 % sous air et 85 % sous O₂ comparée aux électrodes MWCNTs/BOD *Bp*. Il faut noter que les CVs obtenues pour la BOD *Bp* sont obtenues à 45 °C et non à 60 °C qui est la température optimum de cette enzyme,⁴³ et que la stratégie permettant l'orientation de toutes les BOD à la surface de l'électrode n'a pas encore été découverte.

La BOD *Mv* apparaît être un meilleur catalyseur pour la conception de biocathode en DET du fait de son meilleur potentiel de départ à pH 7, de sa meilleure efficacité catalytique, ainsi que de ses conditions d'utilisation. La BOD *Bp* est néanmoins plus résistante à l'urate et aux ions chlorures, mais nécessite de plus hautes températures d'utilisation.

VI- Conclusion du chapitre III

Ce chapitre s'est focalisé sur l'élaboration de différentes architectures d'électrodes visant à utiliser les biocatalyseurs de type BOD pour la réduction du dioxygène.

La première partie a permis de décrire le développement de surfaces poreuses à base de MWCNTs et de porphyrines. Les MWCNTs ont permis d'accroître la surface spécifique de l'électrode pour immobiliser un maximum d'enzyme tandis que les porphyrines ont joué un rôle très important dans l'orientation de la BOD. Le squelette de la porphyrine ainsi que les charges négatives portées par les groupements carboxylates permettent d'orienter la quasi-totalité des enzymes immobilisées à la surface des électrodes de MWCNTs/PP et MWCNTs/PPFe^{III} afin de favoriser le transfert direct d'électron. Cette stratégie a permis de réaliser des biocathodes performantes, avec un potentiel de départ de 0,43 V vs. ECS à pH 7 et une densité de courant maximal sous oxygène de -4,7 mA cm⁻². L'association de ces porphyrines à la BOD *Mv* est un outil utile pour le développement de biocathodes. En effet, ces électrodes sont uniquement limitées par l'efficacité de la catalyse réalisée par l'enzyme ainsi que par son taux de recouvrement. L'optimisation de la surface de MWCNTs utilisées pour l'immobilisation des porphyrines et des protéines devrait pouvoir permettre d'améliorer les propriétés catalytiques de ce type de biocathodes. Le développement de biocathode 3D associées à cette stratégie permettrait d'immobiliser plus d'enzyme dans une orientation favorable pour augmenter l'activité catalytique de ces électrodes.

Dans la deuxième partie, l'élaboration d'une seconde électrode pour la réduction du dioxygène par la BOD a été obtenue par la fonctionnalisation covalente de MWCNTs. L'incorporation d'acide naphthoïque à la surface des CNTs a permis d'améliorer leur solubilité dans l'eau ainsi que dans divers solvants organiques. Ces CNTs sont plus faciles à manipuler et ils ont permis l'obtention de films fins, et très reproductibles. L'incorporation de phényléthylamine à la surface des nanotubes a été réalisée par l'électroréduction d'un sel de diazonium sur un film de MWCNTs. L'influence de la présence de charge à la surface des électrodes sur l'orientation de la BOD a pu être étudiée. Les charges positives ont un effet défavorable sur l'orientation de la BOD et donc sur le DET. Le centre T1 se retrouve éloigné de la surface de l'électrode. A l'inverse, et en accord avec les résultats de la première partie, les charges négatives favorisent l'orientation de l'enzyme et donc amplifient le DET. Cette biocathode délivrait une densité maximale de courant de -2 mA cm⁻² sous oxygène. La faible taille des pores du film est un facteur limitant du taux de recouvrement de l'enzyme ainsi que la diffusion de O₂, et donc de l'activité catalytique des électrodes. Cette limite a été contournée par l'ajout d'une sous couche de MWCNTs. Cette nouvelle électrode est extrêmement efficace pour réduire O₂, puisqu'elles génèrent une densité maximale de courant de -7 mA cm⁻² sous oxygène, sans dispersion des constantes de transfert d'électron.

Ces deux stratégies d'immobilisation et de connexion de la BOD ont pu être utilisées pour des biocathodes respirantes. L'utilisation de surface microporeuse a permis d'intensifier les densités de courant obtenues avec l'association de f-MWCNTs-COO⁻/BOD. Des densités de courant de -4 mA cm⁻² et de -5,5 mA cm⁻² ont été obtenues respectivement sous air et sous O₂. La porosité des électrodes associées au caractère hydrophile et chargé des f-MWCNTs-COO⁻ est l'une des meilleures stratégies développées pour les biocathodes respirantes.

L'adaptation de l'association entre les MWCNTs et les porphyrines a pu être adaptée avec succès aux biocathodes respirantes. Une densité de courant de -2 mA cm^{-2} et de $-4,5 \text{ mA cm}^{-2}$ ont été obtenues respectivement sous air et sous O_2 . Néanmoins, cette stratégie est limitée par la diffusion du dioxygène à travers le film hydrophobe de MWCNTs et par la pénétration des enzymes au sein de ce film.

Selon les matériaux supports et le type d'électrode que nous voulons utiliser pour élaborer les biopiles, l'une ou l'autre des deux stratégies sera privilégié.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre s'est focalisée sur l'immobilisation et la connexion d'une autre BOD, celle de *B. pumillus*. A l'inverse de la BOD *Mv*, la présence de charges négatives à la surface des électrodes handicapent l'orientation de l'enzyme. Les électrodes à base de MWCNTs se sont avérées être les meilleures plateformes pour la connexion de cette enzyme. Une densité maximum de courant de -3 mA cm^{-2} a ainsi été obtenue sous air et sous O_2 à pH 7,2 et 45 °C. Cette biocathode est la première électrode à air développée pour cette enzyme et fait partie des plus performantes déjà publiées.

Cette enzyme présente un OCP plus faible de 0,15 V comparé à la BOD *Mv*, mais est particulièrement stable en présence d'urate, et à hautes températures. L'association de cette électrode avec une anode à base d'une hydrogénase thermophile est présentée dans le chapitre suivant.

- (1) Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. E. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (7), 2563.
- (2) Murao, S.; Tanaka, N. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45* (10), 2383.
- (3) Mano, N. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *96* (2), 301.
- (4) Kosaka, A.; Yamamoto, C.; Morishita, Y.; Nakane, K. *Clin. Biochem.* **1987**, *20* (6), 451.
- (5) Klemm, J.; Prodromidis, M. I.; Karayannis, M. I. *Electroanalysis* **2000**, *12* (4), 292.
- (6) Tsujimura, S.; Tatsumi, H.; Ogawa, J.; Shimizu, S.; Kano, K.; Ikeda, T. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *496* (1–2), 69.
- (7) Mano, N.; Edembe, L. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *50*, 478.
- (8) Durand, F.; Kjaergaard, C. H.; Suraniti, E.; Gounel, S.; Hadt, R. G.; Solomon, E. I.; Mano, N. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *35* (1), 140.
- (9) Cracknell, J. A.; McNamara, T. P.; Lowe, E. D.; Blanford, C. F. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (25), 6668.
- (10) Bertrand, T.; Jolival, C.; Briozzo, P.; Caminade, E.; Joly, N.; Madzak, C.; Mougin, C. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, *41* (23), 7325.
- (11) Tsujimura, S.; Nakagawa, T.; Kano, K.; Ikeda, T. *Electrochemistry* **2004**, *72*, 437.
- (12) Page, C. C.; Moser, C. C.; Chen, X.; Dutton, P. L. *Nature* **1999**, *402* (6757), 47.
- (13) Zheng, W.; Li, Q.; Su, L.; Yan, Y.; Zhang, J.; Mao, L. *Electroanalysis* **2006**, *18* (6), 587.
- (14) Li, X.; Zhang, L.; Su, L.; Ohsaka, T.; Mao, L. *Fuel Cells* **2009**, *9* (1), 85.
- (15) Hanashi, T.; Yamazaki, T.; Tsugawa, W.; Ikebukuro, K.; Sode, K. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2011**, *5* (5), 1030.
- (16) Tsujimura, S.; Kano, K.; Ikeda, T. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *576* (1), 113.
- (17) Habrioux, A.; Napporn, T.; Servat, K.; Tingry, S.; Kokoh, K. B. *Electrochimica Acta* **2010**, *55* (26), 7701.
- (18) Lim, J.; Cirigliano, N.; Wang, J.; Dunn, B. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9* (15), 1809.
- (19) Filip, J.; Šeřčovičová, J.; Gemeiner, P.; Tkac, J. *Electrochimica Acta* **2013**, *87*, 366.
- (20) Garcia, S. O.; Villarrubia, C. N.; Falase, A.; Atanassov, P. *J. Electrochem. Soc.* **2014**, *161* (9), H523.
- (21) Wen, D.; Liu, W.; Herrmann, A.-K.; Eychmüller, A. *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20* (15), 4380.
- (22) Weigel, M. C.; Tritscher, E.; Lisdat, F. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9* (4), 689.
- (23) Ciaccafava, A.; De Poulpique, A.; Techer, V.; Giudici-Ortoni, M. T.; Tingry, S.; Innocent, C.; Lojou, E. *Electrochem. Commun.* **2012**, *23*, 25.
- (24) Shim, J.; Kim, G.-Y.; Moon, S.-H. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *653* (1–2), 14.
- (25) Krishnan, S.; Armstrong, F. A. *Chem. Sci.* **2012**, *3* (4), 1015.
- (26) Schubert, K.; Goebel, G.; Lisdat, F. *Electrochimica Acta* **2009**, *54* (11), 3033.
- (27) Göbel, G.; Dietz, T.; Lisdat, F. *Procedia Chem.* **2009**, *1* (1), 273.
- (28) Tanne, C.; Göbel, G.; Lisdat, F. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26* (2), 530.
- (29) Göbel, G.; Lisdat, F. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10* (11), 1691.
- (30) Gutiérrez-Sánchez, C.; Pita, M.; Toscano, M. D.; De Lacey, A. L. *Electroanalysis* **2013**, *25* (6), 1359.
- (31) Scherbahn, V.; Putze, M. T.; Dietzel, B.; Heinlein, T.; Schneider, J. J.; Lisdat, F. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *61*, 631.
- (32) Vivekananthan, J.; Rincón, R. A.; Kuznetsov, V.; Pöller, S.; Schuhmann, W. *ChemElectroChem* **2014**, *1* (11), 1901.
- (33) Zhang, L.; Zhou, M.; Wen, D.; Bai, L.; Lou, B.; Dong, S. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *35* (1), 155.
- (34) Wu, X. E.; Guo, Y. Z.; Chen, M. Y.; Chen, X. D. *Electrochimica Acta* **2013**, *98*, 20.
- (35) Filip, J.; Tkac, J. *J. Biotechnol.* **2014**, *185*, Supplement, S21.

- (36) Filip, J.; Monosik, rastislav; Tkac, J. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2014**, *9*, 2497.
- (37) Tsujimura, S.; Kamitaka, Y.; Kano, K. *Fuel Cells* **2007**, *7* (6), 463.
- (38) Kamitaka, Y.; Tsujimura, S.; Kataoka, K.; Sakurai, T.; Ikeda, T.; Kano, K. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *601* (1-2), 119.
- (39) Flexer, V.; Brun, N.; Courjean, O.; Backov, R.; Mano, N. *Energy Env. Sci* **2011**, *4* (6), 2097.
- (40) Flexer, V.; Brun, N.; Destribats, M.; Backov, R.; Mano, N. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (17), 6437.
- (41) Xue, Q.; Kato, D.; Kamata, T.; Guo, Q.; You, T.; Niwa, O. *Anal. Sci.* **2013**, *29* (6), 611.
- (42) Tsujimura, S.; Suraniti, E.; Durand, F.; Mano, N. *Electrochimica Acta* **2014**, *117*, 263.
- (43) de Poulpiquet, A.; Ciaccafava, A.; Gadiou, R.; Gounel, S.; Giudici-Ortoni, M. T.; Mano, N.; Lojou, E. *Electrochem. Commun.* **2014**, *42*, 72.
- (44) Tominaga, M.; Ohtani, M.; Taniguchi, I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10* (46), 6928.
- (45) dos Santos, L.; Climent, V.; Blanford, C. F.; Armstrong, F. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (42), 13962.
- (46) Murata, K.; Kajiya, K.; Nakamura, N.; Ohno, H. *Energy Environ. Sci.* **2009**, *2* (12), 1280.
- (47) Korani, A.; Salimi, A. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *50*, 186.
- (48) Lopez, R. J.; Babanova, S.; Ulyanova, Y.; Singhal, S.; Atanassov, P. *ChemElectroChem* **2014**, *1* (1), 241.
- (49) So, K.; Kawai, S.; Hamano, Y.; Kitazumi, Y.; Shirai, O.; Hibi, M.; Ogawa, J.; Kano, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (10), 4823.
- (50) Ulyanova, Y.; Babanova, S.; Pinchon, E.; Matanovic, I.; Singhal, S.; Atanassov, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (26), 13367.
- (51) Morozan, A.; Campidelli, S.; Filoramo, A.; Jusselme, B.; Palacin, S. *Carbon* **2011**, *49* (14), 4839.
- (52) Murao, S.; Tanaka, N. *Agric. Biol. Chem.* **1982**, *46* (8), 2031.
- (53) Johnson, D. L.; Thompson, J. L.; Brinkmann, S. M.; Schuller, K. A.; Martin, L. L. *Biochemistry (Mosc.)* **2003**, *42* (34), 10229.
- (54) Christenson, A.; Shleev, S.; Mano, N.; Heller, A.; Gorton, L. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2006**, *1757* (12), 1634.
- (55) Ramírez, P.; Mano, N.; Andreu, R.; Ruzgas, T.; Heller, A.; Gorton, L.; Shleev, S. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2008**, *1777* (10), 1364.
- (56) Ivnitski, D.; Artyushkova, K.; Atanassov, P. *Bioelectrochemistry* **2008**, *74* (1), 101.
- (57) Jeuken, L. J. C.; Wisson, L.-J.; Armstrong, F. A. *Inorganica Chim. Acta* **2002**, *331* (1), 216.
- (58) Miura, Y.; Tsujimura, S.; Kurose, S.; Kamitaka, Y.; Kataoka, K.; Sakurai, T.; Kano, K. *Fuel Cells* **2009**, *9* (1), 70.
- (59) St. Clair, C.; Ellis Jr, W. R.; Gray, H. B. *Inorganica Chim. Acta* **1992**, *191* (1), 149.
- (60) Hexter, S. V.; Grey, F.; Happe, T.; Climent, V.; Armstrong, F. A. *PNAS* **2012**, *109* (44), 18233.
- (61) Winkler, J. R.; Gray, H. B. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (7), 3369.
- (62) Kataoka, K.; Tanaka, K.; Sakai, Y.; Sakurai, T. *Protein Expr. Purif.* **2005**, *41* (1), 77.
- (63) Bahr, J. L.; Tour, J. M. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (11), 3823.
- (64) Niyogi, S.; Hamon, M. A.; Hu, H.; Zhao, B.; Bhowmik, P.; Sen, R.; Itkis, M. E.; Haddon, R. C. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35* (12), 1105.
- (65) Haddon, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (9), 3385.

- (66) Griveau, S.; Mercier, D.; Vautrin-UI, C.; Chaussé, A. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9* (12), 2768.
- (67) Pinson, J.; Podvorica, F. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34* (5), 429.
- (68) Goff, A. L.; Moggia, F.; Debou, N.; Jegou, P.; Artero, V.; Fontecave, M.; Joussetme, B.; Palacin, S. *J. Electroanal. Chem.* **2010**, *641* (1-2), 57.
- (69) Abiman, P.; Wildgoose, G. G.; Compton, R. G. *Int J Electrochem Sci* **2008**, *3*, 104.
- (70) Spadaro, A. C. C.; Draghetta, W.; Del Lama, S. N.; Camargo, A. C. M.; Greene, L. J. *Anal. Biochem.* **1979**, *96* (2), 317.
- (71) Snyder, S. L.; Sobocinski, P. Z. *Anal. Biochem.* **1975**, *64*, 284.
- (72) Gupta, G.; Lau, C.; Rajendran, V.; Colon, F.; Branch, B.; Ivnitski, D.; Atanassov, P. *Electrochem. Commun.* **2011**, *13* (3), 247.
- (73) Ciniciato, G. P. M. K.; Lau, C.; Cochran, A.; Sibbett, S. S.; Gonzalez, E. R.; Atanassov, P. *Electrochimica Acta* **2012**, *82*, 208.
- (74) Santoro, C.; Babanova, S.; Atanassov, P.; Li, B.; Ieropoulos, I.; Cristiani, P. *J. Electrochem. Soc.* **2013**, *160* (10), H720.
- (75) Haneda, K.; Yoshino, S.; Ofuji, T.; Miyake, T.; Nishizawa, M. *Electrochimica Acta* **2012**, *82*, 175.
- (76) Miyake, T.; Haneda, K.; Nagai, N.; Yatagawa, Y.; Onami, H.; Yoshino, S.; Abe, T.; Nishizawa, M. *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4* (12), 5008.
- (77) Miyake, T.; Haneda, K.; Yoshino, S.; Nishizawa, M. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *40* (1), 45.
- (78) Zloczewska, A.; Jönsson-Niedziolka, M. *J. Power Sources* **2013**, *228*, 104.
- (79) Filipiak, M. S.; Zloczewska, A.; Grzeskowiak, P.; Lynch, R.; Jönsson-Niedziolka, M. *J. Power Sources* **2015**, *289*, 17.
- (80) Chen, M. Y.; Chen, X. D.; Wu, X. E. *Chem. Lett.* **2014**, *43* (7), 1081.
- (81) Babanova, S.; Artyushkova, K.; Ulyanova, Y.; Singhal, S.; Atanassov, P. *J. Power Sources* **2014**, *245*, 389.
- (82) Asano, I.; Hamano, Y.; Tsujimura, S.; Shirai, O.; Kano, K. *Electrochemistry* **2012**, *80* (5), 324.
- (83) Reiss, R.; Ihssen, J.; Thöny-Meyer, L. *BMC Biotechnol.* **2011**, *11* (1), 9.
- (84) Edembe, L.; Gounel, S.; Cadet, M.; Durand, F.; Mano, N. *Electrochem. Commun.* **2012**, *23*, 80.
- (85) Suraniti, E.; Abintou, M.; Durand, F.; Mano, N. *Bioelectrochemistry* **2012**, *88*, 65.
- (86) Suraniti, E.; Tsujimura, S.; Durand, F.; Mano, N. *Electrochem. Commun.* **2013**, *26*, 41.

Chapitre IV –Élaboration de biopiles enzymatiques glucose/O₂ et H₂/O₂

A - Élaboration de biopiles enzymatiques glucose/O₂

I- OXYDATION DU GLUCOSE PAR LA BIOANODE MWCNTS/RUQ-PYRENE/GDH	163
II- CONCEPTION D'UNE BIOPILE GLUCOSE/O ₂ PAR COMBINAISON DE LA BIOANODE ET DE LA BIOCATHODE MWCNTS/PYR-ADA/LAC.....	165
III- CONCEPTION D'UNE BIOPILE GLUCOSE/O ₂ PAR COMBINAISON DE LA BIOANODE ET DE LA CATHODE MWCNTS/F-MWCNTS-COO ⁻ /BOD	166
IV- CONCLUSION DE LA PARTIE A	168

B- Conception d'une biopile H₂/O₂ sans membrane basée sur la connexion d'enzymes thermostables sur des électrodes de MWCNTs

I- GENERALITES.....	169
I.1 UN BIOCATALYSEUR POUR L'OXYDATION DU DIHYDROGENE: L'HYDROGENASE [NiFe] MbH1 AA.....	170
I.1.1 Structures de l'hydrogénase [NiFe] MbH1 Aa.....	170
I.1.2 Mécanisme d'oxydation d'H ₂ et d'inactivation du site actif [NiFe].....	171
I.1.3 Tolérance au dioxygène	172
I.1.4 Tolérance à la température	173
I.1.5 Connexion de l'hydrogénase [NiFe] MbH1 Aa	173
I.2 LES BIOPILES ENZYMATIQUES H ₂ /O ₂	175
I.2.1 Préambule.....	175
I.2.2 Développement des biopiles enzymatiques H ₂ /O ₂ et évolution des performances	176
I.2.3 Limites et stabilité des biopiles H ₂ /O ₂	180
II- OXYDATION DE H ₂ PAR MBH1 IMMOBILISEE SUR F-MWCNTS.....	181
III- APPLICATION DE LA BIOANODE A UNE BIOPILE H ₂ /O ₂ SANS MEMBRANE	184
III.1 DISPOSITIF EXPERIMENTALE	184
III.2 PERFORMANCES DE LA BIOPILE H ₂ /O ₂ SANS MEMBRANE	185
III.3 STABILITE DU SYSTEME.....	186
IV- CONCLUSION DE LA PARTIE B	186

Comme il l'a été décrit lors de l'étude bibliographique, l'association d'une biocathode réduisant l'oxygène à une bioanode oxydant un substrat permet l'élaboration de biopiles enzymatiques. Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à l'utilisation de nos biocathodes au sein de biopiles glucose/O₂ et H₂/O₂. Ce chapitre se divise en deux parties. Dans un premier temps, une bioanode à base de GDH précédemment développée au laboratoire¹ a été utilisée pour élaborer des biopiles glucose/O₂ par son association avec les biocathodes MWCNTs/Pyr-Ada/Lac et MWCNTs/f-MWCNTs-COO⁻/BOD présentées auparavant. Ces deux biopiles glucose/O₂ ont été caractérisées en présence de différentes concentrations en substrats. Ensuite, la deuxième partie de ce chapitre présente l'élaboration d'une nouvelle bioanode oxydant H₂ à base de l'hydrogénase thermophile d'*aquifex aeolicus* et de CNTs fonctionnalisés. Son association à la biocathode respirante à base de la BOD thermostable *Bp* a permis d'élaborer un nouveau design de biopile H₂/O₂. Au sein de ce dispositif, la biocathode à diffusion de gaz réduit directement l'oxygène provenant de l'air, ce qui permet de s'affranchir de l'utilisation d'une membrane séparatrice tout en protégeant l'hydrogénase de sa désactivation en présence d'oxygène

A - Élaboration de biopiles enzymatiques glucose/O₂

I- Oxydation du glucose par la bioanode MWCNTs/RuQ-pyrène/GDH

La glucose déshydrogénase de *Pseudomas sp.* (GDH) utilisée pour concevoir cette bioanode est une enzyme NAD⁺-dépendante. L'ajout de ce cofacteur en solution est nécessaire à la réaction bioélectrocatalytique, de plus ce dernier doit pouvoir être régénéré à l'électrode. Dans cette optique, les CNTs ont été bi-fonctionnalisés par deux motifs pyrène différents comme l'illustre la figure 1. Le premier, le RuQpyrène permet la régénération du cofacteur NAD⁺ présent en solution grâce aux ligands 1,10-phénanthroline-5,6-dione. Le deuxième, un dérivé commercial de pyrène portant à son extrémité un ester activé (NHS), rend possible le greffage covalent de l'enzyme déshydrogénase.

La bi-fonctionnalisation des électrodes est effectuée par incubation de l'électrode de MWCNTs dans une solution de DMF contenant un ratio 1 :1 de RuQpyrène et de Pyr-NHS, pendant une heure, suivit d'un rinçage à l'eau distillée. Ces électrodes de MWCNTs fonctionnalisées ont par la suite été incubées dans une solution de GDH à 2 mg mL⁻¹ dans du tampon McIlvaine pH 7 pendant une nuit à 4 °C pour permettre le greffage covalent de l'enzyme.¹

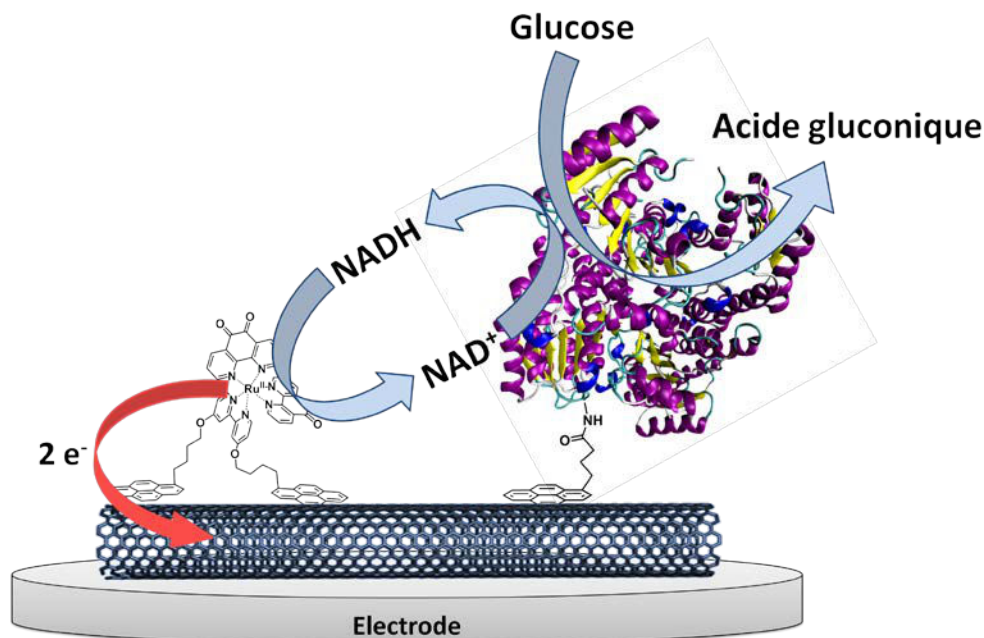


Figure 1 : Représentation schématique de la bioanode MWCNTs/RuQpyrène/GDH

Suite à l'immobilisation de l'enzyme, les électrodes sont rincées et leurs propriétés catalytiques ont été évaluées par CVs en présence de 10 mM de NAD^+ (Figure 2).

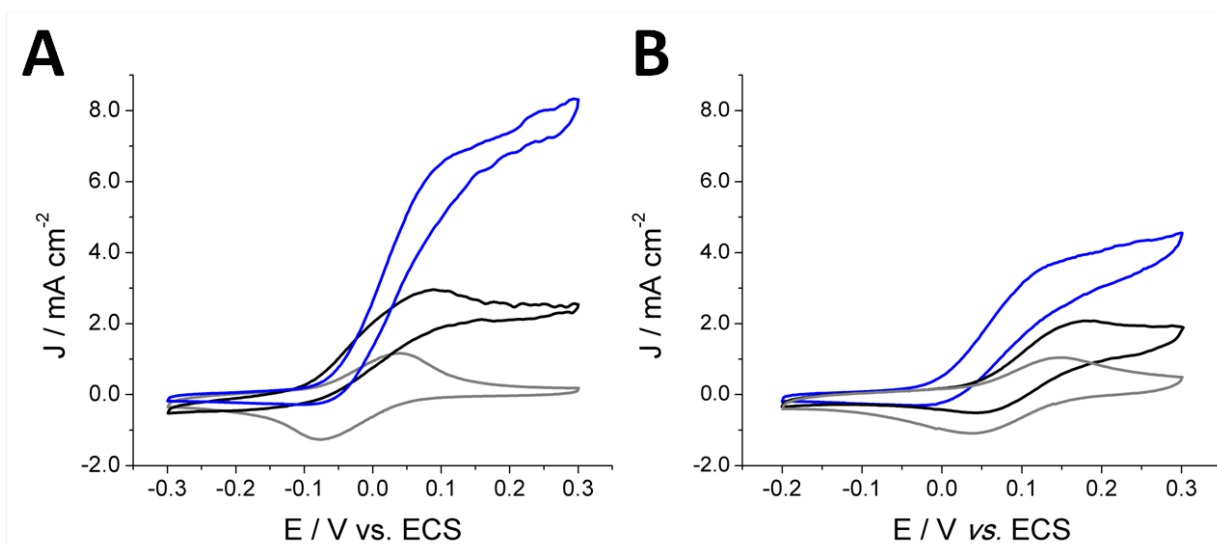


Figure 2 : CVs de la bioanode MWCNTs/RuQpyrène/GDH en absence (gris) et présence de 5 mM (noir) ou de 100 mM de glucose (bleu) dans du tampon Mcllvaine pour A) pH 7 ; 10 mM NAD^+ et B) pH 5 ; 10 mM NAD^+

A pH 7, la présence de glucose permet d'obtenir une vague d'oxydation irréversible qui débute dès -0,1 V vs. ECS et correspondant à l'oxydation de NADH produit par l'oxydation du glucose par la GDH (Figure 2A). La densité de courant maximum est de 2,5 mA cm^{-2} en présence de 5 mM de glucose et de 7,5 mA cm^{-2} en présence de 100 mM de glucose à 0,2 V vs. ECS (Figure 2A). A pH 5, l'activité de la bioanode est diminuée comme l'illustre les CVs exposées en figure 2B. La

vague d'oxydation débute aux alentours de 0 V vs. ECS et les densités maximum de courant en présence de 5 mM ou de 100 mM de glucose sont respectivement de 1,9 et 4,3 mA cm⁻² à 0,25 V vs. ECS. Le potentiel de départ plus haut pour l'oxydation de NADH à pH 5 est dû à la dépendance du potentiel des quinones des ligands 1,10-phénanthroline-5,6-dione en fonction du pH.

II- Conception d'une biopile glucose/O₂ par combinaison de la bioanode et de la biocathode MWCNTs/Pyr-Ada/Lac

La biocathode la plus performante basée sur l'orientation de la laccase Tv a été utilisée. La représentation schématique de cette biopile est illustrée en figure 3.

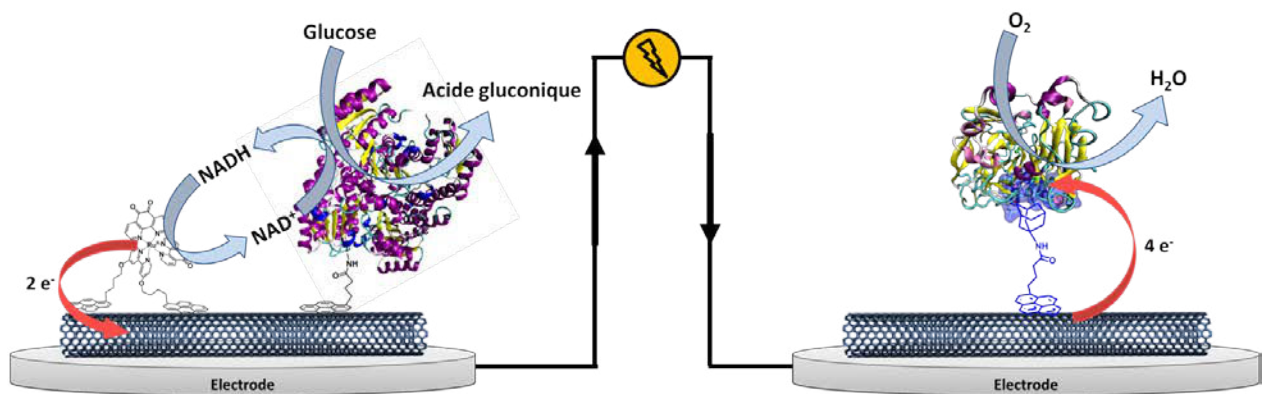


Figure 3 : Représentation schématique de la biopile glucose/O₂ composée de la bioanode MWCNTs/RuQpyrène/GDH et de la biocathode MWCNTs/Pyr-Ada/Lac

La biopile a été caractérisée à pH 5, dans des conditions en substrats proches de celles du milieu physiologique, c'est-à-dire 5 mM de glucose et sous air. Une autre étude en conditions non limitantes en substrats a également été réalisée. Les courbes de polarisation et de puissance obtenues grâce à des décharges d'une minute par chronopotentiométrie sont exposées en figure 4.

En concentration physiologique en substrat, la biopile GDH/Lac possède un OCV de 0,64 V, et délivre une densité de puissance maximum de 263 μW cm⁻² ; soit 0,58 mA cm⁻² à 0,45 V (courbe noire figure 4). En conditions non limitantes en substrats, l'OCV est similaire à celui obtenu précédemment. Une densité de puissance maximum de 546 μW cm⁻² est obtenue soit 1,5 mA cm⁻² à 0,36 V (courbe bleu figure 4). Enfin, en conditions en présence de 5 mM de glucose et sous O₂ des performances similaires sont obtenues, confirmant que la biocathode est l'électrode limitante de ce système (courbe grise figure 4).

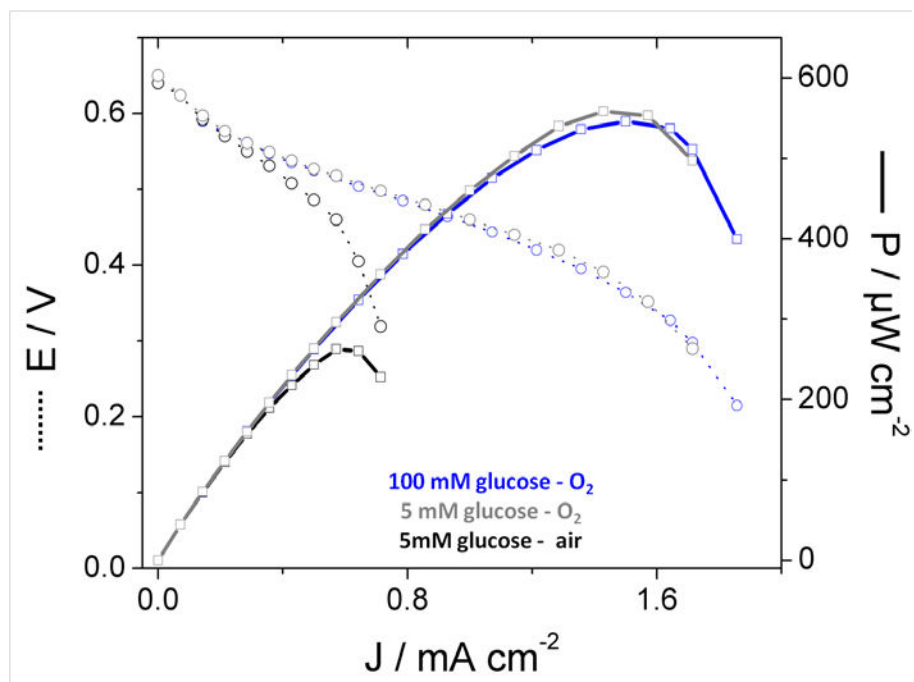


Figure 4 : Courbe de polarisation et de puissance des biopiles glucose/ O_2 obtenues par chronopotentiométrie dans du tampon McIlvaine pH 5, 10 mM NAD^+ et en présence de : 5 mM de glucose et sous air (noir), 5 mM de glucose et sous O_2 (gris) et 100 mM de glucose et sous O_2 (bleu)

III- Conception d'une biopile glucose/ O_2 par combinaison de la bioanode et de la cathode MWCNTs/f-MWCNTs-COO⁻/BOD

Comme l'illustre la figure 5, la deuxième biopile glucose/ O_2 réalisée est basée sur l'association de la bioanode vu dans le paragraphe précédent à la meilleure biocathode à base de BOD : la biocathode MWCNTs/f-MWCNTs-COO⁻/BOD.

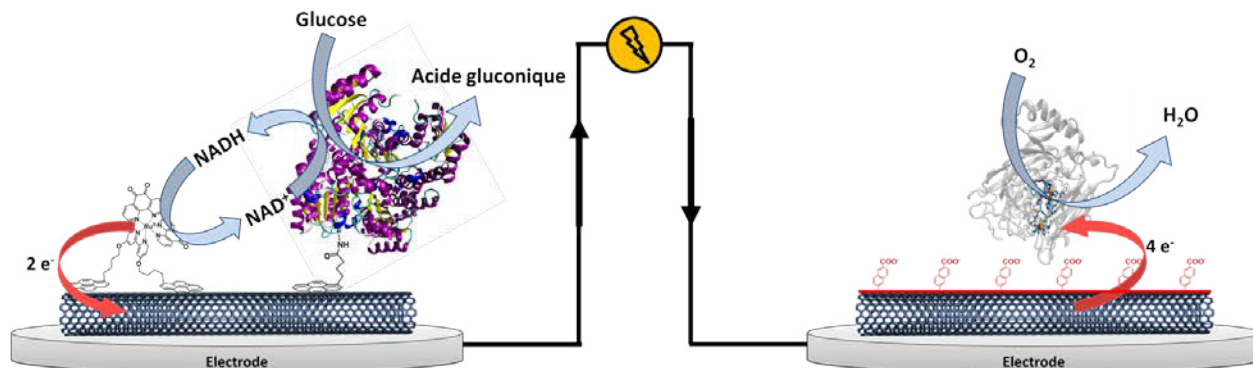


Figure 5 : Représentation schématique de la biopile glucose/ O_2 composée de la bioanode MWCNTs/RuQpyrène/GDH et de la biocathode MWCNTs/f-MWCNTs-COO⁻/BOD

Cette biopile a aussi été caractérisée dans des conditions en substrats proches de celles du milieu physiologique, c'est-à-dire 5 mM de glucose et sous air et à pH 7. Une autre étude en

conditions non limitantes en substrats et à pH 5 a également été réalisée. Les courbes de polarisation et de puissance obtenues grâce à des décharges d'une minute par chronopotentiométrie sont exposées en figure 6.

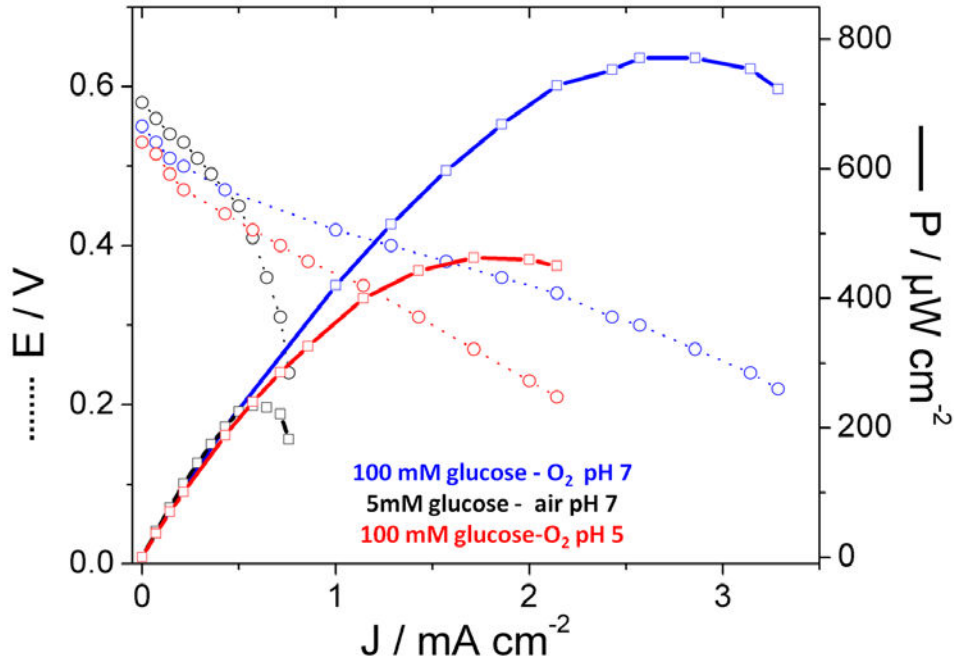


Figure 6 : Courbe de polarisation et de puissance des biopiles glucose/O₂ en présence de 10 mM NAD⁺ et de : 5 mM de glucose et sous air ; pH 7 (noir) ; 100 mM de glucose et sous O₂ ; pH 7 (bleu) ; et 100 mM de glucose et sous O₂ ; pH 5 (rouge)

A pH 7 et en concentration physiologique en substrat, la biopile GDH/BOD possède un OCV de 0,57 V, et délivre une densité de puissance maximum de 235 $\mu\text{W cm}^{-2}$; soit 0,57 mA cm^{-2} à 0,41 V (courbe noire, figure 6). En conditions non limitantes en substrats, l'OCV est proche de celui obtenue précédemment, 0,55 V. Une densité de puissance maximum de 772 $\mu\text{W cm}^{-2}$ est obtenue soit 2,86 mA cm^{-2} à 0,27 V (courbe bleue, figure 6).

A pH 5, l'OCV de la biopile est de 0,53 V, ce qui est proche de l'OCP obtenue à pH 5. En effet, l'augmentation de l'OCP de la biocathode est contrebalancée par l'augmentation de l'OCP de la bioanode. En conditions non limitantes en substrats, on observe une diminution importante de la densité de puissance de la biopile à ce pH, notamment à cause de la plus faible activité de la bioanode (courbe rouge, figure 6). En effet, à pH 5 la biocathode délivre la même densité de courant maximale, accompagné d'un OCP plus élevée que celui à pH 7. Dans ces conditions la biopile délivre une densité maximale de puissance de 463 $\mu\text{W cm}^{-2}$ soit 1,7 mA cm^{-2} à 0,27 V.

Bien que dans ces conditions la biocathode ne soit pas l'électrode limitante et qu'elle est plus performante que la biocathode à base de laccase, la densité de puissance maximale de la biopile GDH/BOD est inférieure à celle de la biopile GDH/laccase de 463 et 546 $\mu\text{W cm}^{-2}$

respectivement. Cette plus faible performance est due au plus faible potentiel du centre T1 de la BOD *Mv* comparé à celui de la laccase *Tv*.

IV- Conclusion de la partie A

Cette partie s'est focalisée sur l'élaboration de biopile glucose/O₂ combinant une anode MWCNTs/RuQpyrène/GDH et les meilleures biocathodes à base de Lac et de BOD développées précédemment. Les performances des différentes biopiles selon les conditions d'expériences sont résumées dans tableau 1.

		Densité de puissance maximum ($\mu\text{W cm}^{-2}$)		OCV (V)	
		Biopile GDH/Lac	Biopile GDH/BOD	Biopile GDH/Lac	Biopile GDH/BOD
pH 5	5mM Glu - air	263	-	0,64	-
	100 mM Glu – O ₂	546	463	0,64	0,53
pH 7	5mM Glu - air	0	235	-	0,57
	100 mM Glu – O ₂	0	772	-	0,55

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des densités de puissance obtenues pour les deux biopiles suivant les conditions expérimentales

La biopile la plus performante à pH 5 est celle utilisant la laccase à la biocathode. En condition non limitante en substrat, une densité de puissance maximum de $546 \mu\text{W cm}^{-2}$ est obtenue, ce qui est supérieur aux $463 \mu\text{W cm}^{-2}$ obtenus avec la BOD dans les mêmes conditions. Cette plus faible performance est attribuable au plus faible potentiel du centre T1 de la BOD qui est responsable de la réponse électrochimique. Néanmoins, à ce pH la bioanode est l'électrode limitante pour la biopile GDH/BOD à l'inverse de la pile GDH/Lac. La laccase étant inactive à pH 7 l'élaboration d'une biopile à ce pH est difficile. A l'inverse, les biocathodes à base de BOD permettent l'élaboration de biopile à ce pH. Cette pile délivre des densités de puissance intéressantes de l'ordre de $235 \mu\text{W cm}^{-2}$ en milieu restreint et proche du milieu physiologique et de l'ordre de $772 \mu\text{W cm}^{-2}$ en milieu non limitant en substrat.

Ces expériences montrent la possible application de ces biocathodes au sein de biopiles glucose/O₂. Les performances des biopiles sont intéressantes mais un verrou subsiste : la présence de NAD⁺ dans le milieu. Son immobilisation à la bioanode est à envisager pour rendre le dispositif viable dans d'éventuelles applications.

B- Conception d'une biopile H₂/O₂ sans membrane basée sur la connexion d'enzymes thermostables sur des électrodes de MWCNTs

I- Généralités

Outre les biopiles glucose/O₂ présentées dans la partie précédente, une autre grande classe de biopile enzymatique est particulièrement étudiée : les biopiles enzymatiques H₂/O₂. Elles s'appuient sur la connexion de l'hydrogénase à l'anode pour oxyder le dihydrogène, et la réduction du dioxygène à la cathode par des MCOs. Les hydrogénases sont des métalloprotéines qui catalysent la réaction de coupure hétérolytique du dihydrogène en protons. Elles sont classées en trois catégories selon la nature du ou des métaux contenus au sein du site actif : un ou deux atomes de fer pour les hydrogénases [Fe] et [FeFe], et un atome de nickel et de fer pour les hydrogénases [NiFe].

Les hydrogénases à centre [NiFe] sont les plus nombreuses et se retrouvent essentiellement chez les procaryotes (bactéries et archées). Elles sont surtout mises en jeu dans l'oxydation du dihydrogène afin de mettre le fort pouvoir réducteur de ce substrat à disposition de l'organisme. Les hydrogénases [NiFeSe] forment une sous classe des [NiFe] où l'une des quatre cystéines qui coordine classiquement le nickel est remplacée par une sélénocystéine. Les hydrogénases [FeFe] sont, quant à elles, présentes chez les eubactéries et eucaryotes, et sont beaucoup moins fonctionnelles.

Ces enzymes apparaissent à l'heure actuelle comme une alternative prometteuse à la production d'énergie² à partir du dihydrogène du fait de la réversibilité de la réaction qu'elles catalysent et de leurs fréquences de turnovers particulièrement élevées, capables de concurrencer les métaux nobles comme le platine.³ Cependant, un obstacle majeur à leur utilisation est leur grande sensibilité au dioxygène présent en quantité suffisante dans l'air pour les désactiver.⁴ Toutefois, cette inhibition est réversible pour la classe des [NiFe], tandis que pour les deux autres catégories, l'exposition au dioxygène conduit à des dégradations irréversibles.⁵ L'étude d'hydrogénases de certains organismes telles que les hydrogénases [NiFeSe] de *Desulfomicrobium baculatum*⁶ et [NiFe] d'*Aquifex aeolicus*⁵ ont montré des résistances à l'oxygène particulièrement intéressantes. Aussi, des mutants d'hydrogénases [NiFe] de *Desulfovibrio fructosovorans*, où les canaux de diffusion de gaz intraprotéiques ont été spécifiquement modifiés, ont également démontré une résistance accrue à l'O₂.^{7,8}

Ce chapitre se focalisera essentiellement sur l'hydrogénase [NiFe] de la bactérie hyperthermophile *Aquifex aeolicus*, (MbH1 Aa) qui est particulièrement tolérante au dioxygène. Cette hydrogénase est produite et étudiée par le groupe du Dr. Elisabeth Lojou au BIP de Marseille avec qui nous avons collaboré sur ce travail.

I.1 Un biocatalyseur pour l'oxydation du dihydrogène: L'hydrogénase [NiFe] MbH1 Aa

I.1.1 Structures de l'hydrogénase [NiFe] MbH1 Aa

Aquifex aeolicus est une bactérie hyperthermophile cultivée à 85°C sous atmosphère H₂/CO₂/O₂. Son métabolisme énergétique fait intervenir trois hydrogénases [NiFe], notées I, II et III.⁹ Nous avons exclusivement travaillé avec l'hydrogénase I notée MbH1. Cette enzyme est une hydrogénase membranaire thermophile qui appartient à la chaîne respiratoire qui couple l'oxydation de H₂ à la réduction d'O₂ en eau. Cette protéine catalyse principalement l'oxydation de H₂, même si de faibles activités de réduction des protons ont pu être détectées.^{9,10} L'hydrogénase MbH1 dont la structure cristalline n'a pas encore été résolue, a une structure commune aux hydrogénases [NiFe]. Elle est constituée de deux sous-unités exposées dans le périplasma : une grande sous-unité, dans laquelle le site actif est profondément enfoui, et une petite sous-unité qui comporte les trois relais électroniques composés d'atomes de fer et de soufre. Ces trois relais sont désignés comme les clusters [FeS] proximal, médian et distal selon leur distance respective au site actif (Figure 7).¹¹ Ce dernier est constitué d'un atome de nickel et d'un atome de fer.¹² L'atome de nickel est coordonné par quatre cystéines dont deux sont communes à la sphère de coordination du fer. Les autres ligands du fer sont deux ligands cyanures et un carbonyle, qui peuvent être qualifiés d'exotiques pour le monde biologique du fait de leur habituelle toxicité pour la cellule. La petite sous-unité de MbH1 comporte une hélice transmembranaire permettant des interactions avec un cytochrome de type b1 dihéminique qui assure l'ancrage de l'hydrogénase à la membrane.⁵

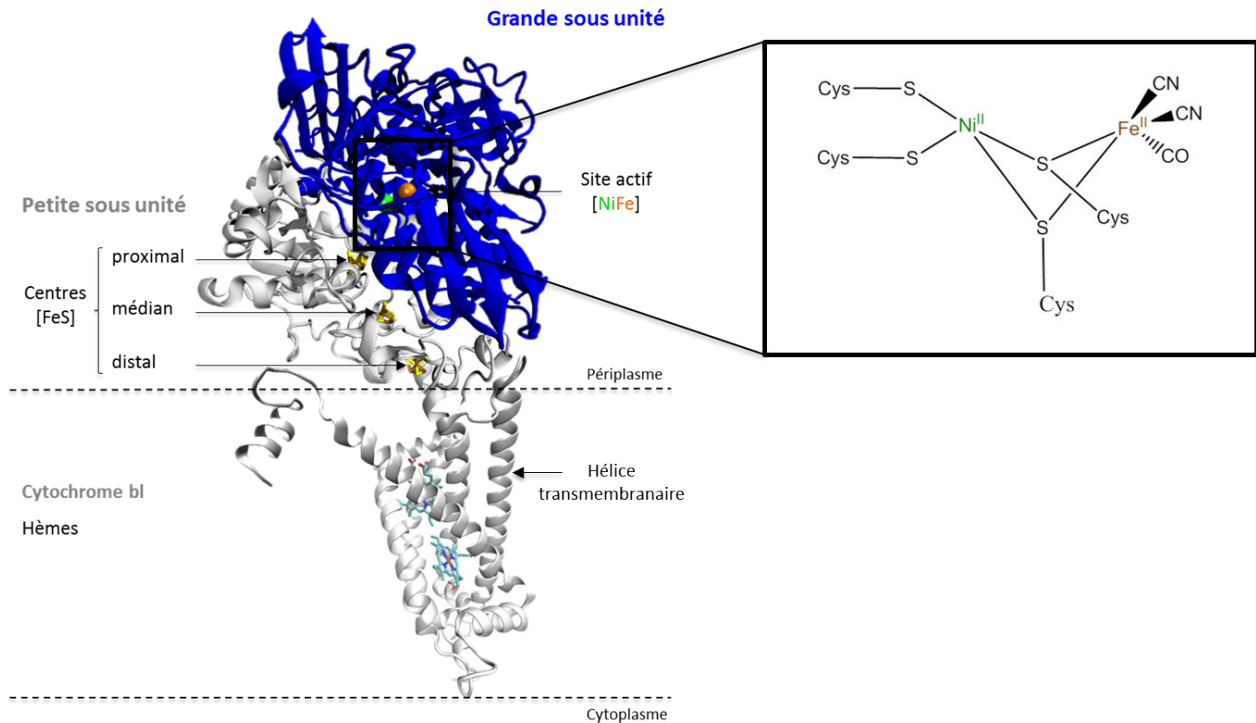


Figure 7: Modèle de l'hydrogénase MbH1 Aa construit à partir de la petite et de la grande sous-unité de l'hydrogénase [NiFe] standard de *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (pdb 1WUJ) et de la sous-unité cytochrome b1 de *wolinellasuccinogenes* (pdb 2BS2). Adapté de [5]. La grande sous-unité est représentée en bleu et la petite sous unité comportant l'hélice transmembranaire ainsi que le cytochrome b1 en gris. (droite) Structure du site actif [NiFe]

I.1.2 Mécanisme d'oxydation de H₂ et d'inactivation du site actif [NiFe]

Le mécanisme catalytique d'oxydation de H₂ par les hydrogénases [NiFe] a été élucidé¹² et est illustré en figure 8. Le dihydrogène se lie au site actif lorsque celui-ci est dans une forme oxydée active Ni-SI_a (Ni^{II}-Fe^{II}). Le nickel polarise H₂ et provoque sa rupture hétérolytique ainsi que la formation de l'état Ni-R où un hydruire pont le nickel et le fer. L'ion H⁺ est lié au soufre d'une cystéine. La libération du proton et une oxydation à un électron conduisent à la formation de Ni-C où l'hydruire pont les ions Ni^{III} et Fe^{II}. Une dernière oxydation à un électron et la libération du proton issu de l'hydruire pontant complète le cycle catalytique.

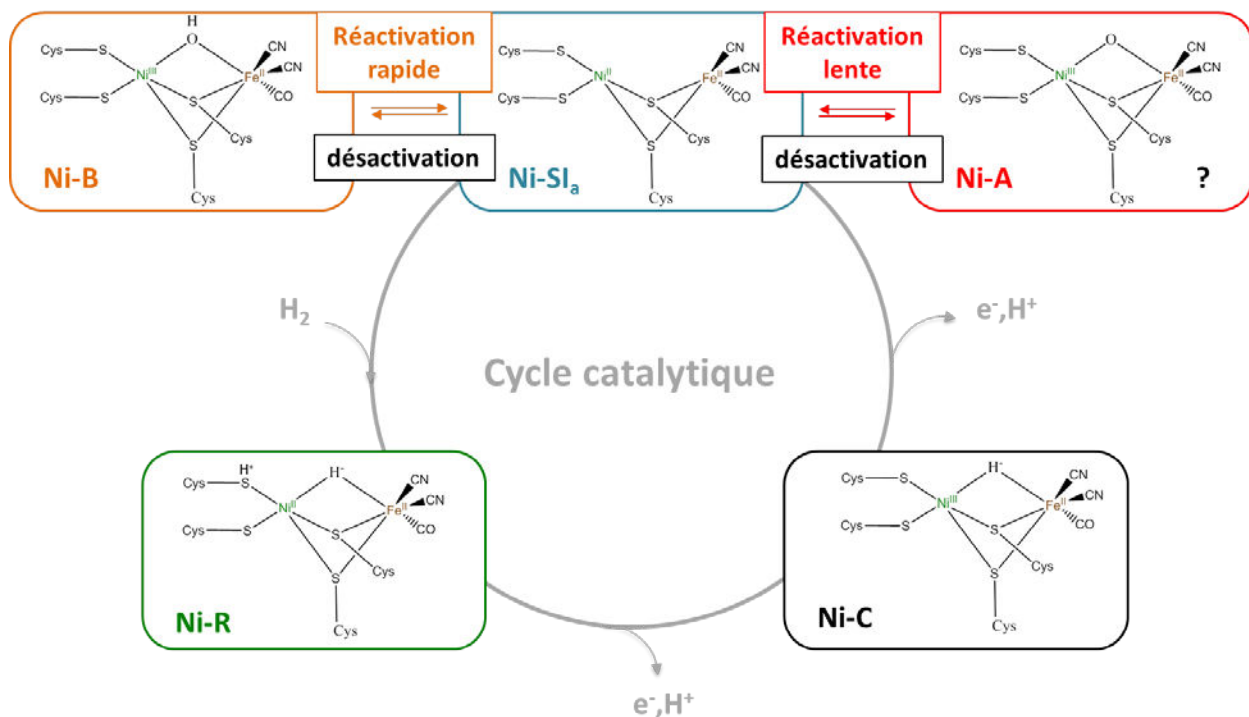


Figure 8 : Schéma du mécanisme général d'oxydation de l'hydrogène par une hydrogénase [NiFe], et de la désactivation/réactivation du site actif

L'oxydation de la forme active Ni-SI_a conduit aux états inactifs Ni-A et Ni-B, dans lesquels le nickel et le fer sont pontés par une espèce oxygénée.¹² En effet, en présence de O₂, les hydrogénases [NiFe] produisent un mélange de ces états inactifs.¹³ L'état Ni-A est dit « unready » et se réactive lentement par passage prolongé à un potentiel réducteur. Dans cet état, la nature du ligand pontant reste controversée. L'état Ni-B est quant à lui dit « ready » et se réactive rapidement par passage à un potentiel modérément réducteur. Ces états peuvent également être formés en condition oxydantes anaérobies où le ligand pontant provient de l'eau.

I.1.3 Tolérance au dioxygène

MbH1 appartient à une classe d'hydrogénases dites « tolérantes » à O₂, capable d'oxyder H₂ en présence d'O₂; à l'inverse des hydrogénases dites « sensibles » où la perte complète de l'activité bioélectrocatalytique est observée. Des études électrochimiques et spectroscopiques montrent que chez ces hydrogénases tolérantes, seul l'état inactif Ni-B est observé.^{5,12} Des études FTIR et RPE confirment l'absence de la forme Ni-A du site actif de MbH1 lorsqu'elle est soumise à des conditions oxydantes.⁵

MbH1 présente des caractéristiques structurales communes aux hydrogénases tolérantes à O₂, et qui explique cette résistance. Deux ligands cystéines supplémentaires du cluster [FeS] proximal (le plus proche du site actif) ont été identifiés dans la séquence protéique, et suggère que ce cluster [FeS] proximal est coordonné par 6 cystéines, comme chez les hydrogénases tolérantes. A l'inverse, seulement 4 cystéines sont observées pour les hydrogénases sensibles. Le centre [FeS] peut alors adopter une configuration Cys₆[4Fe-3S] ouverte et flexible, permettant des transitions redox inusuelles, et non plus une configuration Cys₄[4Fe-4S]. Les clusters [FeS] médian et distal ont des propriétés architecturales et électroniques semblables aux hydrogénases sensibles ; néanmoins leurs potentiels sont plus élevés comme chez les autres hydrogénases tolérantes. Les 1^{ère} et 2^{ème} sphères de coordination du site actif [NiFe] sont communes à toutes les hydrogénases [NiFe]. Cependant, leurs potentiels sont plus élevés pour les hydrogénases tolérantes.

Enfin, ces hydrogénases sont également tolérantes au monoxyde de carbone,¹⁴ qui est un inhibiteur compétitif des hydrogénases sensibles à l'oxygène. Aucune diminution de l'activité catalytique d'oxydation de H₂ n'est observée pour MbH1 immobilisée sur SWCNTs après ajout d'une solution saturée en CO au tampon d'étude.¹⁰

I.1.4 Tolérance à la température

MbH1 catalyse l'oxydation du dihydrogène sur une large gamme de température, allant de 20 à 90°C. En spectroscopie UV-vis, l'activité en catalyse homogène avec le méthylviologène (médiateur de l'hydrogénase) a été évaluée. L'activité augmente avec la température et atteint un maximum à 80°C. Lorsque MbH1 est immobilisée sur une électrode de graphite pyrolytique ou sur des nanofibres de carbone, les courants d'oxydation augmentent de 25 °C à 70 °C.^{9,15}

I.1.5 Connexion de l'hydrogénase [NiFe] MbH1 Aa

Majoritairement les hydrogénases ont été immobilisées à la surface des électrodes en vue d'obtenir un DET. Néanmoins, la possibilité d'obtenir un MET n'est pas abandonnée. En effet, Plumeré et al. ont montré récemment que l'intégration d'une hydrogénase sensible à l'oxygène au sein d'un polymère de méthylviologène permettait de protéger l'enzyme des dommages causés par l'oxygène ainsi que de la désactivation à haut potentiel.¹⁶ En DET, les électrons sont cédés à l'électrode via le centre [4Fe-3S] distal. Ce relai électronique est le plus éloigné du site actif et le plus proche de la surface de l'enzyme. A l'instar du centre cuivre T1 décrit dans les chapitres précédents, une orientation favorable de l'enzyme situant ce relai à proximité de la surface des électrodes permettrait un DET efficace sans dispersion des constantes de transfert.

Le DET de MbH1 a été étudié sur plusieurs matériaux d'électrode. L'adsorption de cette enzyme sans favoriser une orientation particulière sur électrodes d'or ou de graphite pyrolytique

s'accompagne de faible densité de courant en DET, aux alentours de $180 \mu\text{A cm}^{-2}$ à 60°C sous bullage de H_2 ,¹⁰ du fait de la faible quantité d'enzymes connectées ainsi que de la dispersion des constantes de transfert d'électron.

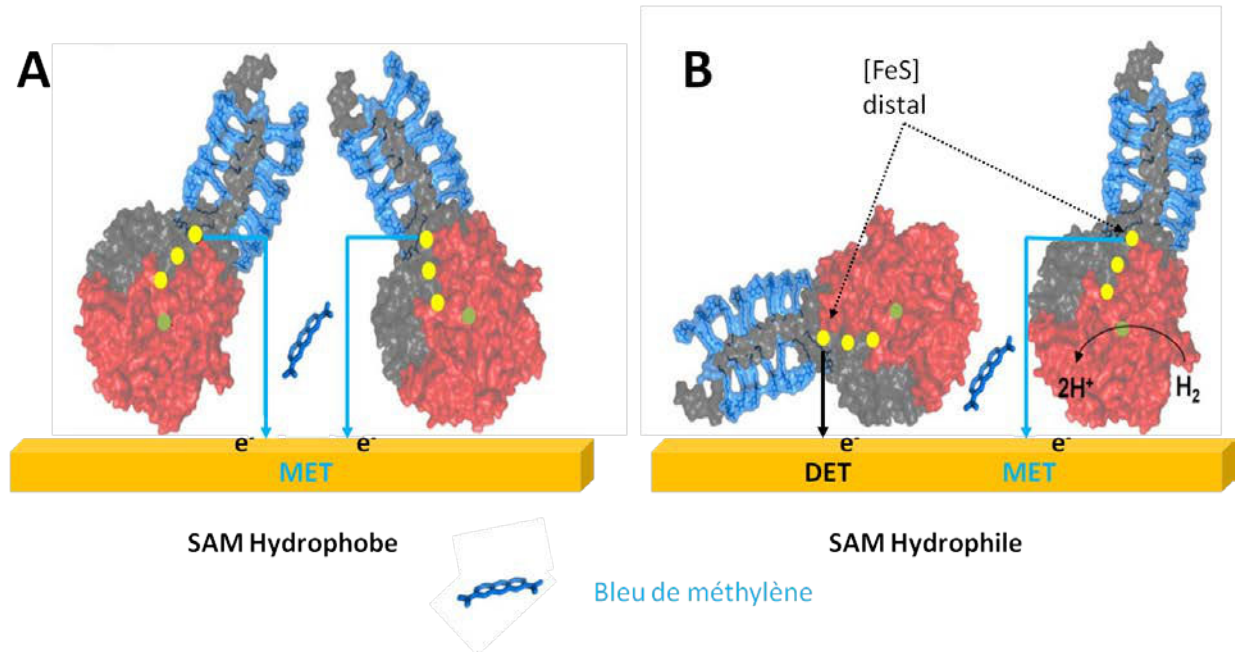


Figure 9 : Modèle de l'orientation de MbH1 Aa immobilisées sur des SAMs hydrophobes (A) et hydrophiles (B). L'hélice transmembranaire entourée de détergent à proximité du centre distal contrôle le transfert électronique pour l'oxydation de H_2 . Le centre actif [NiFe] et les clusters [FeS] sont respectivement représentés par les sphères vertes et jaunes. Adapté de [17]

Afin de favoriser le DET et d'augmenter les densités de courant, des efforts ont été menés pour contrôler l'orientation de MbH1. Son immobilisation sur des SAMs hydrophobes favorise largement le MET quelle que soit la longueur de la chaîne alkyle.^{10,17} Le centre [FeS] se retrouve éloigné de la surface de l'électrode comme l'illustre la figure 9A. Inversement, un DET et un MET sont observés simultanément lorsque MbH1 est immobilisée sur des SAMs hydrophiles chargées ou neutres (Figure 9B). Aucun de ces deux processus ne semble être favorisé lorsque les chaînes alkyles ont moins de dix groupements méthyles. Ces résultats s'expliquent d'une part par la présence d'un détergent neutre (utilisé lors de l'extraction de l'enzyme) ; lié à la queue transmembranaire hydrophobe située à moins de 15 \AA du centre [FeS]. L'environnement du cluster est rendu hydrophile par la tête hydrophile du détergent,¹⁷ ce qui défavorise le DET sur surface hydrophobe plane. D'autre part, une région non structurée de 20 acides aminés connecte l'hélice à la partie soluble de l'enzyme. Cette boucle permet à l'hélice de se déplacer en solution afin d'éviter la répulsion stérique entre l'électrode et le centre [FeS] distal et d'observer du DET sur les surfaces hydrophiles.¹⁸

L'autre approche pour augmenter les densités de courant obtenues en DET est d'augmenter le nombre d'enzymes immobilisées à l'électrode. La nanostructuration de l'électrode par l'ajout de

nanoparticules de carbone,¹⁹ de nanofibres²⁰ ou de nanotubes de carbone,^{10,21} et plus récemment de nanoparticules d'or a été envisagée.²²

Une bioanode basée sur la liaison covalente de l'enzyme sur des SWCNTs préalablement traités à l'acide chaud délivre une densité maximale de courant de $0,6 \text{ mA cm}^{-2}$ à $-0,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ à 60 °C dans du tampon saturé en H_2 . La meilleure bioanode développée avec cette enzyme est obtenue par l'adsorption de MbH1 sur des nanofibres de carbone hydrophobes (CNFs). Cette bioanode délivre une densité de courant maximale de $3,5 \text{ mA cm}^{-2}$ à $-0,3 \text{ V}$ à 60 °C sous bullage de H_2 . Cette dernière étude suggère que l'incorporation de structure 3D est capable de réduire les limites de l'orientation de l'hydrogénase obtenues sur des électrodes planes hydrophobes.

I.2 Les biopiles enzymatiques H_2/O_2

I.2.1 Préambule

Dans les années 1970s apparaît pour la première fois l'idée d'utiliser les hydrogénases comme catalyseurs dans les piles à combustible.²³ La possibilité de remplacer les nanoparticules de platine par l'hydrogénase a été étudiée avant même que n'apparaisse les structures cristallines des hydrogénases tolérantes à O_2 . En 2002, une étude a montré que l'hydrogénase était aussi active que le platine dans certaines conditions de pression de H_2 et de surtension.³ L'hydrogénase sensible à O_2 de *Allochromatium vinosum* immobilisée sur du graphite a été comparée à des nanoparticules de platine immobilisées sur des électrodes d'or et de graphite. Il a été démontré que pour une pression d'un bar de H_2 , les densités de courant en fonction de la vitesse de rotation sont similaires pour la bioélectrodes et les électrodes de platine à $38 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$, pH 7 et 40 °C .

Une autre étude a comparé l'activité d'oxydation de H_2 du platine et de l'hydrogénase tolérante de *Ralstonia eutropha* dans des conditions de faibles pressions de H_2 , et en présence d'un mélange gazeux H_2/O_2 . Elle a montré, qu'en raison de la très forte affinité pour H_2 , l'enzyme conserve une activité d'oxydation de H_2 bien plus élevée que le platine à de faibles pressions de H_2 et des surtensions peu élevées. De plus, en présence d'un mélange 80 % H_2 - 20 % O_2 l'enzyme conserve 80 % de son activité contre 40 % pour le platine.

Enfin, les hydrogénases sont plus résistantes au monoxyde de carbone, dont des traces suffisent à inhiber irréversiblement le platine. L'efficacité electrocatalytique du platine est divisée par 10 en présence de 0,1 % de CO. Or ce gaz est présent à hauteur de 1 à 25 % dans H_2 issu du reformage du pétrole. A ces pourcentages seuls les hydrogénases sensibles sont inhibées de façon réversible.

Néanmoins, avant les années 2000, l'utilisation d'une bioanode basée sur l'hydrogénase comme catalyseur reste de l'ordre du concept ; du fait de l'extrême sensibilité de ces enzymes au

dioxygène. Il faudra attendre la découverte des hydrogénases tolérantes pour voir le développement de biopiles H_2/O_2 plus performantes, bien que l'instabilité de ces biocatalyseurs reste le frein majeur à l'idée d'un rêve d'une possibilité d'alternative crédible, à une véritable application de ces enzymes dans une pile compétitive.

I.2.2 Développement des biopiles enzymatiques H_2/O_2 et évolution des performances

L'ensemble des biopiles complètement enzymatique développées jusqu'à aujourd'hui est répertorié dans le tableau 2. Le développement de la première pile enzymatique utilisant l'hydrogénase à l'anode est revendiqué en 2002 par une équipe russe.²⁴ Cependant, aucun détail n'a été donné sur l'origine des enzymes, la réalisation du dispositif ainsi que les méthodes utilisées pour évaluer les performances. En 2005, Armstrong et al. proposent une biopile basée sur l'immobilisation de l'hydrogénase tolérante de *R. Eutropha* à l'anode et de la Lac *Tv* à la cathode sur des électrodes de graphite pyrolytique. Une puissance de $5 \mu W cm^{-2}$ a été générée sous atmosphère d'air et de H_2 .²⁵ En 2006, une expérience similaire est réalisée en utilisant l'hydrogénase tolérante de *R. metallidurans*.²⁶ En 2010, l'orientation de la BOD à la cathode permet d'augmenter la densité de puissance, cette nouvelle biopile générait $10 \mu W cm^{-2}$ dans des conditions comparables aux précédentes.²⁷

Durant ces cinq dernières années, plusieurs hydrogénases tolérantes et divers MCOs ont été impliquées dans le développement de biopiles H_2/O_2 . L'amélioration des performances durant cette courte période repose principalement sur l'augmentation des densités de courant des électrodes ; notamment par la structuration de la surface des électrodes. Comme décrit précédemment, les densités peuvent être améliorées essentiellement de deux manières : une meilleure connexion de l'enzyme à l'électrode (orientation), et l'utilisation de grande surface spécifique pour immobiliser un plus grand nombre d'enzymes.

Ainsi, en 2012, l'incorporation de MWCNTs permet d'augmenter les performances de la biopile d'un ordre de grandeur. Dans les mêmes conditions expérimentales, les densités de puissances sont de $12 \pm 4 \mu W cm^{-2}$ pour les enzymes simplement adsorbées sur des électrodes de graphite et $119 \pm 11 \mu W cm^{-2}$ pour les enzymes immobilisées sur MWCNTs. La même année, des SWCNTs préalablement traités à l'acide ont été utilisés pour immobiliser covalamment l'hydrogénase à l'électrode. Une densité maximale de $300 \mu W cm^{-2}$ est obtenue, soit 300 fois plus par rapport au même dispositif où les enzymes avaient été directement adsorbées sur des électrodes de graphite pyrolytique.

D'autres matériaux carbonés plus adaptés à la formation d'un réseau à porosité hiérarchisée ont ensuite été proposés.^{15,30} En 2013, le compactage d'une poudre de carbone mésoporeux permet la formation d'une importante plateforme pour immobiliser les enzymes. Une densité

maximale de puissance de $1,67 \text{ mW cm}^{-2}$ est obtenue pour cette biopile.³⁰ Sur le même principe, une grande surface développée est obtenue par l'utilisation de nanofibres de carbone en écailles de poisson. Cette biopile délivrent une densité puissance de $1,5 \text{ mW cm}^{-2}$.¹⁵

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des biopiles H_2/O_2 décrites dans la littérature. Seuls les systèmes utilisant des enzymes comme catalyseur à l'anode et à la cathode sont décrits.

Année	Enzyme anodique	Enzyme cathodique	Matériau d'électrode	Conditions d'expérience	Substrat	Membrane	P ($\mu W cm^{-2}$)	OCP (V)	Stabilité	Ref
2005	MbH <i>R.e</i>	Lac <i>Tv</i>	Graphite	0,1 M citrate pH 5	H_2 /Air	Oui	5	0,97	> 15 min à R fixée à 330 k Ω	25
2006	MbH <i>R.m</i>	Lac <i>Tv</i>	Graphite	0,1 M citrate pH 5	3% H_2 dans l'air	Non	5,2	0,95	Alimentation d'une montre pendant 24h	26
2010	Hyd.1 <i>E. coli</i>	BOD <i>Mv</i>	PGE, modifiée avec un dérivé de l'acide naphtoïque pour la BOD	0,1 M TP pH 5; RT	A : 100% H_2 et O_2 B: 96% H_2 - 4% O_2 C: 4% H_2 et O_2	Oui Non Non	63 12,9 10,1	0,99 0,95 0,93	\emptyset	27
2012	Hyd.1 <i>E. coli</i>	BOD <i>Mv</i>	MWCNTs/ Pyr-NHS	0,1 M phosphate pH5; RT	80% H_2 - 20% Air	Non	119	1,1	Mesure à 0,98 V: 60% conservé après 24h	28
2012	MbH1 <i>Aa</i>	BOD <i>Mv</i>	SWCNTs-COOH	0,05 M Hepes pH 6,8 $T_{anodique} = 60^\circ C$ $T_{cathodique} = 25^\circ C$	100% H_2 et O_2	Oui	300	1,1	Mesure à 0,65 V: 60% conservé après 24h	29

Année	Enzyme anodique	Enzyme cathodique	Matériau d'électrode	Conditions d'expérience	Substrat	Membrane	P ($\mu\text{W cm}^{-2}$)	OCP (V)	Stabilité	Ref
2013	Hyd.1 <i>E. coli</i>	BOD <i>Mv</i>	Carbone mésoporeux compacté	0, 0,1 M TP pH 6; 25°C	78% H ₂ - 22% Air	Non	1670	1,07	Mesure à 0,8V: 90% conservé après 24h, 54 % après 7 jours	30
2014	MbH1 <i>Aa</i>	BOD <i>Bp</i>	Nanofibres de carbone en écaille de poisson	0,1 M TP pH 6; 60°C	100% H ₂ and O ₂	Oui	1500	0,75	Mesure à 0,5 V: 40% conservé après 24h	15
2014	Hyd sensible <i>Desulfovibrio Miyazaki F / MV</i>	BOD <i>Mv</i>	Hydrogel de MV sur GC / GDL tissé	pH7; 40°C	90% H ₂ - 5%O ₂ - 5% N ₂	Non	178	0,95	∅	16
2015	MbH1 <i>Aa</i>	BOD <i>Mv</i>	Nanoparticules d'or	0,01 M TP pH 7 T _{anodique} = 60 °C T _{cathodique} = 25°C	100% H ₂ et O ₂	Oui	250	1,08	∅	22

I.2.3 Limites et stabilité des biopiles H₂/O₂

Les limitations de ce type de dispositif découlent d'une part de la difficulté d'utilisation des enzymes comme catalyseurs, et d'autre part dans l'ingénierie du dispositif de la biopile. L'immobilisation des hydrogénases aux électrodes n'est pas optimale. En effet, la constante de turnover de l'hydrogénase immobilisée sur carbone mésoporeux est estimée à 6 s⁻¹, soit une valeur bien inférieure à la valeur attendue. De plus, on observe une dispersion du transfert d'électron entre l'enzyme et l'électrode soulignant que l'hydrogénase n'est pas complètement orientée favorablement.

Le transport du substrat vers les enzymes est également problématique du fait de la faible concentration des gaz dissous. L'injection de H₂ et de O₂ dans l'électrolyte nécessite l'utilisation d'une membrane séparatrice. S'affranchir de la membrane impose de travailler dans des conditions de mélange non explosif des deux gaz, et donc pauvre en l'un des substrats. Les conditions expérimentales les plus efficaces sont obtenues pour un mélange non explosif H₂/O₂ riche en H₂ : 80% H₂ et 20 % d'air soit 4 % de O₂. Dans ces conditions, des expériences utilisant l'électrode tournante montrent clairement que le système est limité par la cathode.²⁸

Par ailleurs, en l'absence de membrane, O₂ est présent en quantité non négligeable pour inhiber l'hydrogénase, et la réduction non enzymatique du dioxygène sur les électrodes de graphite peut être observée à l'anode aux potentiels négatifs.²⁷ Néanmoins, Plumeré et al. ont développé récemment une biopile sans membrane où l'hydrogénase est protégée du dioxygène par son encapsulation au sein d'un hydrogel de méthylviologène (MV).¹⁶ Les molécules de MV de la couche superficielle du polymère réduisent O₂.

Enfin, la faible stabilité des biopiles enzymatiques H₂/O₂ provient d'une part de la fragilité intrinsèque des protéines, et de l'instabilité de l'immobilisation des enzymes à la surface des électrodes. Des dommages irréversibles du site actif [NiFe] ont été démontrés lorsque l'enzyme est immobilisée à l'électrode et est soumise à un potentiel fixe ou à un balayage en potentiel. Des expériences de microbalance à quartz avec module de dissipation (QCM-D) couplées à l'électrochimie ont également montré pour la BOD *Mv*, que la diminution du signal électrocatalytique de réduction de O₂ n'est pas due à une perte d'enzyme, mais à un réarrangement structural provoquant une perte d'activité.³¹

Les efforts pour améliorer la stabilité du système se sont essentiellement portés sur la formation d'un lien covalent entre l'hydrogénase et l'électrode.^{22,28,29} La liaison covalente nécessite cependant la présence d'une importante densité de fonction à la surface de l'électrode. De plus, les résidus utilisés au niveau de l'enzyme pour former le lien covalent doivent être situés à proximité du relai [FeS] proximal pour permettre un DET efficace.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la connexion directe de MbH1 sur des électrodes de MWCNTs. Comme illustré préalablement, la structuration de l'électrode par des matériaux carbonés permet d'augmenter significativement les performances de la bioanode. Suite à l'optimisation des performances de la bioanode, un nouveau design de biopile H_2/O_2 sans membrane a été élaboré, par l'intégration de la biocathode respirante développée avec la BOD thermostable de *Bp*. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Elisabeth Lojou du Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des protéines de Marseille pour la partie élaboration de la bioanode.

II- Oxydation de H_2 par MbH1 immobilisée sur f-MWCNTS

En accord avec les travaux précédents, décrivant l'orientation plus favorable à un DET de MbH1 sur des surfaces hydrophiles planes, et des structures 3D hydrophobes, nous avons immobilisé MbH1 sur des électrodes de MWCNTs et f-MWCNTs-COO⁻ (cf. Chapitre III) pour immobiliser et connecter l'enzyme. Nous avons montré dans le chapitre précédent que la fonctionnalisation des SWCNTs et des MWCNTs permet d'augmenter l'hydrophilicité des CNTs. Il nous est donc apparu intéressant d'étudier les propriétés de DET de ces CNTs avec MbH1.

Une dispersion de 2,5 mg mL⁻¹ de MWCNTS dans du NMP ainsi qu'une solution aqueuse de f-MWCNTs de 37 µg mL⁻¹ ont été préparées et utilisées pour fonctionnaliser les électrodes de carbone vitreux. 20 µL d'une solution de 5 µM d'enzyme dans du TP (0,2M, pH 7,2) ont ensuite été déposés et laissés incuber 4 h à 4 °C. Les CVs des bioanodes à base de MWCNTs, f-MWCNTs après rinçage avec du tampon sont exposés figure 10.

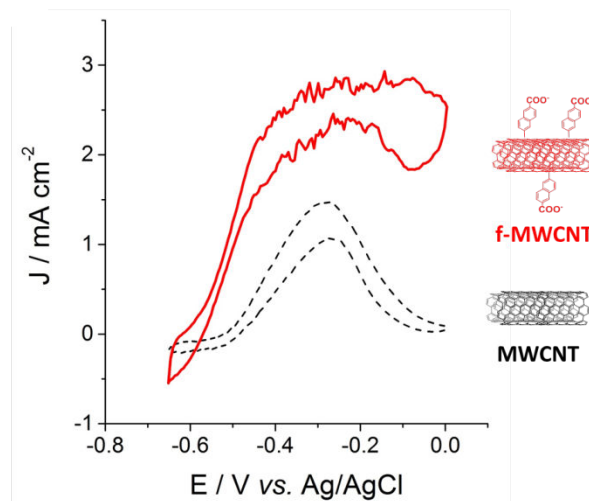


Figure 10 : CVs dans TP (0,2M pH 7,2) des bioanodes MWCNTs/MbH1 (noir) et f-MWCNTs/MbH1 (rouge); 60°C ; bullage de H_2 ; $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$

En présence de dihydrogène, on observe un courant catalytique d'oxydation de H₂ pour toutes ces électrodes (Figure 10) avec un biais catalytique en faveur de cette oxydation. Les potentiels à courant nul sont de l'ordre de -0,59 V vs. Ag/AgCl. Ces résultats sont en accord avec les études électrochimiques précédentes de MbH1 immobilisées sur des SWCNTs oxydés et des fibres de carbone, et soulignent que cette hydrogénase peut réaliser du DET sur des structures 3D à la fois hydrophiles et hydrophobes.²⁰ Afin d'optimiser le taux de recouvrement de MbH1 connectée, nous avons étudié l'influence de l'épaisseur du film de nanotubes sur les courants catalytiques d'oxydation de H₂ (Figure 11A et B). Les épaisseurs des films ont été mesurées par microscopie électronique laser et la même quantité d'enzymes a été déposée (20μl à 5μM).

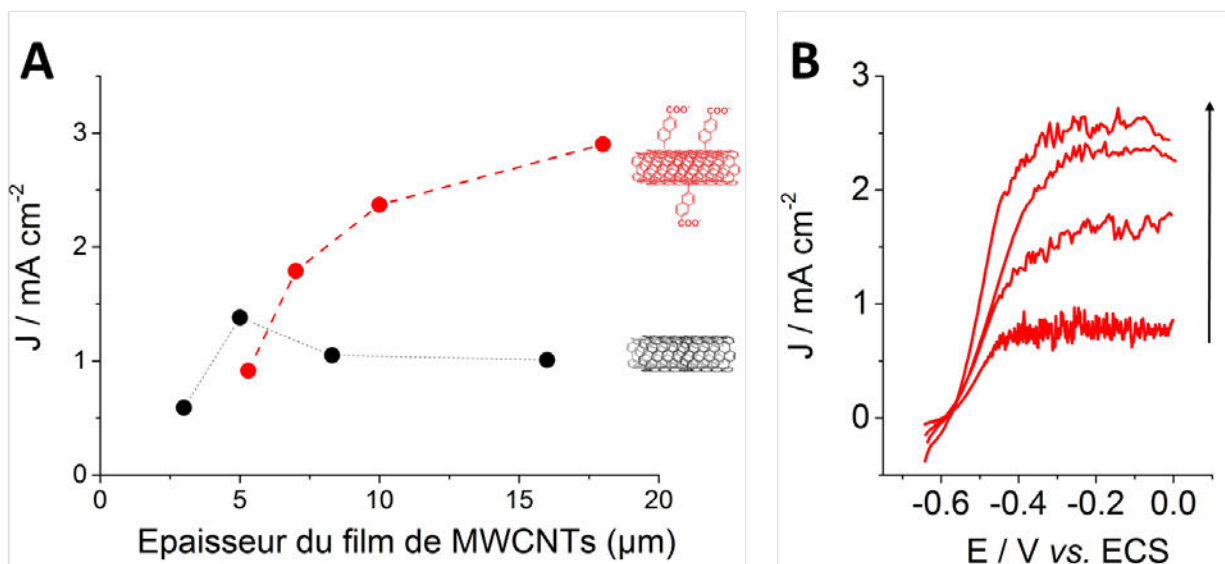


Figure 11 : A) Densités de courant maximales mesurées en CV pour l'oxydation bioélectrocatalytique de H₂ en fonction de l'épaisseur du film de MWCNTs (noir) et f-MWCNTs (rouge) et B) CVs des bioanodes f-MWCNTs/MbH1 pour différentes épaisseurs de films : 5, 7, 10 et 18 μm après soustraction du courant capacitif. (TP 0,2M pH 7,2 ; $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$, bullage de H₂)

Les CVs en figure 10 et 4B montrent que la meilleure densité maximale de courant est obtenue avec un film de f-MWCNTs de plus de 10 μm d'épaisseur (2,7 mA cm⁻² à 0 V vs. Ag/AgCl à pH 7,2). On observe que pour une même quantité d'enzymes déposées, les densités maximales de courant augmentent avec l'épaisseur du film de f-MWCNTs afin d'atteindre un maximum pour une épaisseur comprise entre 15 et 20 μm. Ces expériences montrent que le nombre d'enzymes participant à l'oxydation catalytique de H₂ augmente avec l'épaisseur du film de f-MWCNTs étant donné que la quantité d'enzymes déposées est gardée constante. A l'inverse, l'épaisseur des films de MWCNTs a beaucoup moins d'influence sur la quantité d'enzymes connectées (Figure 11A).

Les performances et la forme des voltammogrammes sont différentes pour les MWCNTs non-modifiés et pour les f-MWCNTs. Lorsque MbH1 est adsorbée sur les électrodes de MWCNTs,

l'oxydation de H₂ a bien lieu en transfert direct d'électron, et le voltammogramme présente la forme typique de l'oxydation de H₂ par des hydrogénases [NiFe] adsorbées sur des électrodes de graphite pyrolytique ou de SWCNTs oxydés. On observe en particulier le pic correspondant à l'inactivation à haut potentiel lors du balayage anodique (formation de l'état inactif Ni-B) et à la réactivation à potentiels réducteurs lors du balayage cathodique (Figure 10). Pour ces électrodes, une densité maximale de courant de 1,4 mA cm⁻² est mesurée, accompagnée du processus de désactivation aux potentiels supérieurs à -0,3 V (Figure 10).

La forme du signal obtenue avec MbH1 adsorbée sur des électrodes de f-MWCNTs est bien différente et est similaire à celle observée lorsque MbH1 est mélangée à des CNFs.²⁰ La pente initiale du signal est supérieure, et le courant maximal est atteint pour un potentiel inférieur. On observe aussi l'apparition d'un plateau avec une densité de courant de 2,7 (± 0,2) mA cm⁻², constante sur environ 300 mV, quel que soit l'épaisseur du film de f-MWCNTs. Ce plateau est une conséquence de la limitation par le transport de masse. Comme indiqué précédemment, les films de f-MWCNTs forment un réseau particulièrement dense et micro/mésoporeux. Associé au fait qu'un plus grand nombre d'enzymes participe à la catalyse sur les électrodes de f-MWCNTs que sur les électrodes de MWCNTs, la diffusion de H₂ devient limitante et la désactivation oxydante n'est plus observée. Récemment il a été montré que la désactivation réversible à haut potentiel peut aussi être minimisée par l'utilisation d'un polymère redox¹⁶ et d'électrodes respirantes.^{32,33}

Ces expériences démontrent l'excellente connexion de MbH1 sur les électrodes de f-MWCNTs comparées aux MWCNTs. Les f-MWCNTs sont un matériau intéressant pour la bioélectrochimie, grâce à leur solubilité dans l'eau, leur capacité d'adsorption d'enzymes, leur excellente conductivité électrique et leur grande surface développée. Les f-MWCNTs forment à l'électrode un réseau tridimensionnel conducteur, qui a permis de développer une bioanode très efficace pour l'oxydation de H₂ par MbH1. Après optimisation, des densités de 2,7 mA cm⁻² ont pu être obtenues. Le phénomène de limitation par le transport de masse du substrat au sein du matériau reste néanmoins à améliorer. La meilleure connexion en DET de MbH1 sur les films de f-MWCNTs plus hydrophiles et ayant des pores de diamètres plus faibles comparés aux films de MWCNTs ; suggère que sur nanotubes de carbone, l'hydrophilicité du matériau joue un rôle plus important que la taille des pores du film de nanotube pour la connexion de MbH1.

A l'instar des études du chapitre précédemment, les films de f-MWCNTs peuvent être améliorés par modification de leur porosité tout en gardant leur propriété favorable d'orientation des hydrogénases via les groupements naphthoate. Dans cette optique, la même approche que celle développée pour la BOD *Mv* peut être envisagée, c'est-à-dire l'incorporation d'une sous couche de MWCNTs à l'électrode afin de hiérarchiser la porosité de l'électrode de CNTs et d'assurer un maximum d'enzymes connectées et une bonne diffusion des substrats. Ce type d'approche est

étudié par l'utilisation de microfibrilles et nanofibrilles de carbone modifiées par des CNTs³⁴⁻³⁶ ou de lithographie à base de nanosphères de polystyrène.^{37,38}

III- Application de la bioanode à une biopile H₂/O₂ sans membrane

La possibilité d'élaborer une biopile enzymatique basée sur l'oxydation du dihydrogène par l'hydrogénase thermophile MbH1 et la réduction du dioxygène par la BOD thermostable *B. pumillus* a été envisagée. La bioanode f-MWCNTs/MbH1 a été couplée à la biocathode respirante MWCNTs/BOD *Bp* précédemment décrite (cf. Chapitre III). Nous avons exploré une stratégie qui n'avait jusque-là pas encore étudiée : la protection de l'hydrogénase de l'oxygène par l'utilisation d'une biocathode respirante.

III.1 Dispositif expérimentale

Dans ce système, la bioanode est connectée dans un système à deux électrodes en face de la biocathode respirante. L'oxygène de l'air est réduit à la cathode tandis que l'anode est dans une solution aqueuse saturée en dihydrogène. Le dispositif de cette nouvelle biopile sans membrane est exposé figure 12A. Ce système comporte d'importants avantages, il permet notamment aux hydrogénases sensibles au dioxygène de travailler en condition anaérobie.

De plus, la biopile fonctionne dans des conditions non explosives de mélange H₂/O₂ et empêche la réduction du dioxygène à la bioanode. C'est le premier exemple de biopile H₂/O₂ sans membrane où la solution tampon peut être saturée de H₂ pour un apport de substrat maximum à la bioanode tout en ayant un excellent apport de substrat à la biocathode grâce aux membranes à diffusion de gaz.

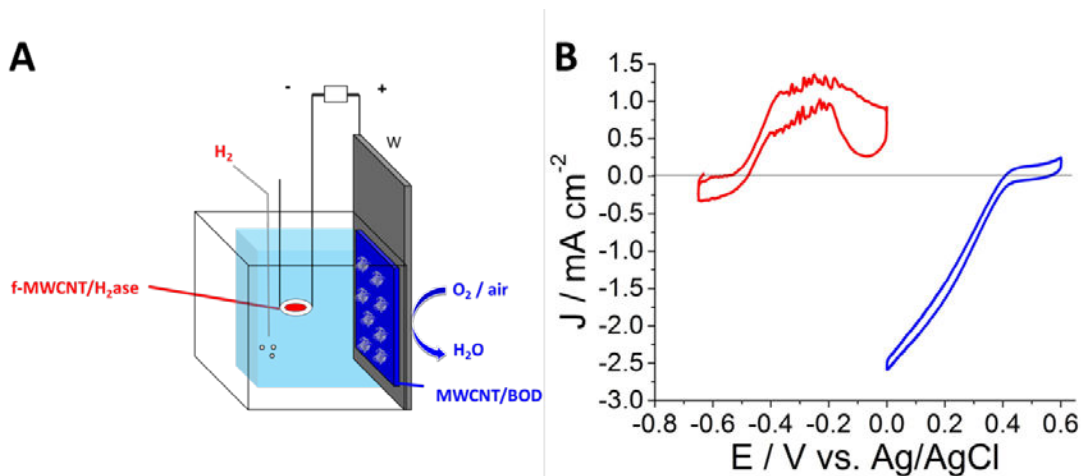


Figure 12 : A) Représentation schématique de la biopile respirante H₂/O₂ sans membrane ; B) CV de la bioanode f-MWCNTs/MbH1 (rouge, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$) et de la biocathode respirante MWCNTs/BOD *Bp* (Bleu, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$) dans les conditions d'étude de la pile (TP 0,2 M, pH 7,2, 45°C)

III.2 Performances de la biopile H₂/O₂ sans membrane

La figure 12B montre les CVs de la bioanode et de la biocathode au sein de ce montage. La biopile est réalisée à 45 °C pour des raisons techniques. L'hydrogénase est environ trois fois moins active à cette température qu'à 60 °C. La densité maximale de courant dans ces conditions est de 1,4 mA cm⁻². On observe aussi que dans ces conditions de température, la bioanode est moins limitée par la diffusion du dihydrogène, ce qui se traduit par l'observation de l'inactivation de l'enzyme aux hauts potentiels. Les courbes de polarisation ainsi que les courbes de puissance obtenues par des décharges potentiométriques successives durant 30 secondes sont exposées en figure 13A. Une biopile témoin utilisant la bioanode MWCNTs/MbH1 a aussi été réalisée.

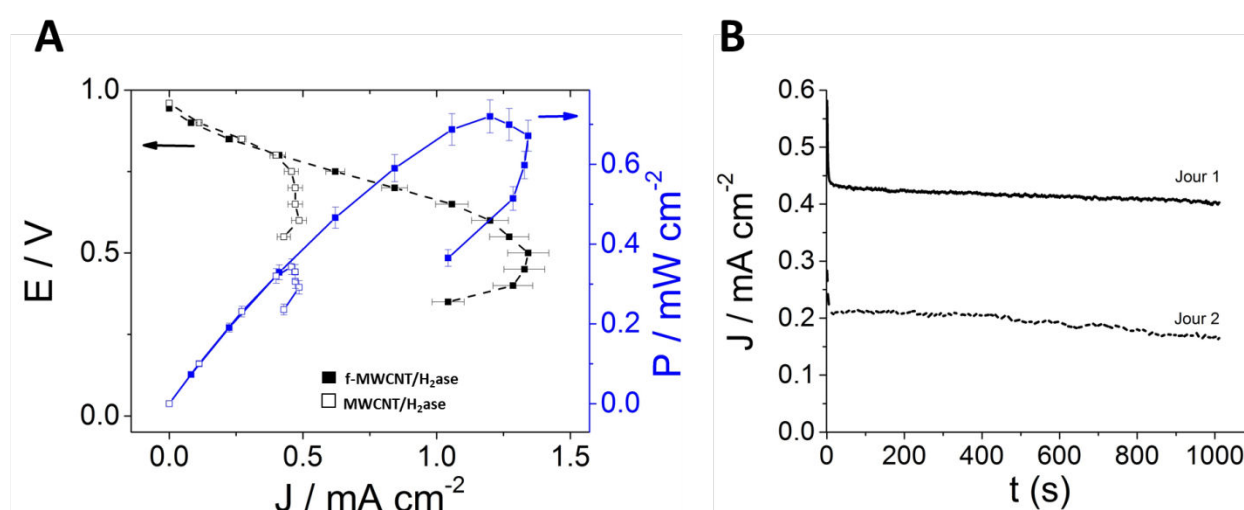


Figure 13 :A) Courbe de polarisation et de puissance des biopiles H₂/O₂ pour les bioanodes MWCNTs/MbH1 et f-MWCNTs/MbH1 (TP 0,2 M, pH 7,2 ; 45°C ; une erreur de 6% a été estimée pour les mesures de performances des deux biopiles) ; B) Evaluation de la stabilité de la biopile par une décharge potentiométrique à $E = 0,8 \text{ V}$ pour la biopile utilisant la bioanode f-MWCNTs/MbH1

La forme inhabituelle des courbes de polarisation à faible potentiel est due à la désactivation de l'hydrogénase. La formation de l'état Ni-B est déclenchée par des décharges à bas potentiels. Ce phénomène est observé car les performances de l'anode sont limitantes dans ce système (limitant également les performances de la biopile). En présence d'un flux continu de dihydrogène au sein du tampon d'analyse (TP pH 7,2 ; 45 °C), une densité maximale de puissance de 0,34 mW cm⁻² accompagnée d'un OCV de 0,95 V ont été mesurés pour la biopile à base de l'anode MWCNTs/MbH1. Les performances de la biopile utilisant la bioanode f-MWCNTs/MbH1 sont deux fois plus importantes, avec une densité maximale de puissance de 0,72 ($\pm 0,04$) mW cm⁻².

Les performances obtenues sont très proches des meilleures performances réalisées pour une biopile enzymatique H₂/O₂ que ce soit dans le cas du même type d'hydrogénases connectées

par des nanofibres de carbone dans un dispositif avec membrane échangeuse (1,6 mW cm⁻² à 60 °C)¹⁵ ou dans le cas de l'hydrogénases d'*E Coli* (1,5 mW cm⁻²).³⁰

III.3 Stabilité du système

La stabilité de cette biopile a été étudiée par des décharges de 15 minutes à 0,8 V le premier et le deuxième jour (Figure 13B). On observe que dès le deuxième jour la densité de puissance n'atteint plus que 50% de la densité de puissance initiale. Cette instabilité de la biopile s'explique par l'instabilité de la bioanode comme l'illustre la figure 14. Les CVs de chaque électrode ont été réalisées dans les conditions de la pile. La bioanode perd 50 % de son activité catalytique dès le deuxième jour, et délivre une densité maximale de courant de 0,7 mA cm⁻² (à -0,3 V vs. ECS). Au troisième jour d'analyse une faible densité maximum de courant est observée de 0,2 mA cm⁻² à -0,3 V vs. Ag/AgCl soit 14% de son activité initiale.

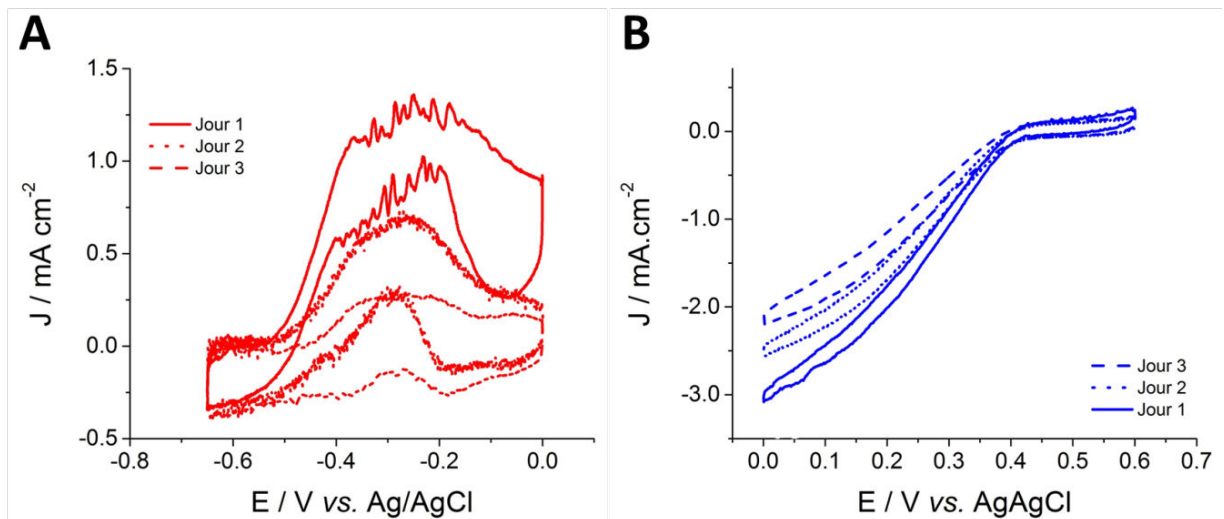


Figure 14 : Evaluation de la stabilité par voltammétrie cyclique dans du tampon TP pH 7,2 à 45 °C pour A) la bioanode f-MWCNTs/MbH1 ($v = 5 \text{ mV s}^{-1}$) et B) la biocathode MWCNTs/BOD Bp ($v = 10 \text{ mV s}^{-1}$).

La biocathode est plus stable comparée à la bioanode, et délivre 83% et 70 % de son activité initiale, respectivement aux deuxième et troisième jours d'analyse (Figure 14B). L'instabilité des bioélectrodes provient probablement de la stabilité de l'immobilisation de MBH1. Une immobilisation covalente ciblant spécifiquement les acides aminés proche du centre relié de la réponse électrochimique pourrait être une approche efficace pour immobiliser et orienter les enzymes à la surface de l'électrode.

IV- Conclusion de la partie B

Cette partie s'est focalisée sur l'élaboration de différentes architectures d'électrodes visant à utiliser l'hydrogénase MbH1 comme catalyseur de l'oxydation du dihydrogène.

La première partie a permis de décrire l'élaboration de surface poreuse et conductrice à base de CNTs pour l'immobilisation et la connexion de la protéine. Il a été montré que l'hydrophilicité de la surface de CNTs jouait un rôle important pour l'immobilisation et la connexion de MbH1 sur ce type de matériaux. En effet, la meilleure bioanode a été développée par déposition d'un film de f-MWCNTs. Cette bioanode délivre une densité maximale de courant de $2,7 \text{ mA cm}^{-2}$ sur 300 mV à 60 °C sous bullage de H_2 . Cette bioanode fait partie des meilleures bioanodes à base d'hydrogénase développée jusqu'à présent. La limitation par la diffusion du substrat ne permet pas d'observer la désactivation de l'hydrogénase à haut potentiel. L'amélioration de la porosité du matériau peut être envisagée suivant différentes stratégies de hiérarchisation de la porosité des électrodes, telle que l'incorporation d'une sous couche de MWCNTs comme il l'a été démontré dans le chapitre III pour la BOD *Mv*.

Dans la deuxième partie de ce chapitre un nouveau design de biopile H_2/O_2 sans membrane a été élaboré. Cette nouvelle bioanode efficace a été combinée à la biocathode respirante à base de la BOD *Bp* présentée dans le chapitre précédent. L'intégration d'une biocathode respirante permet d'une part de s'affranchir de la membrane classiquement utilisée pour ce type de dispositif et d'autre part de permettre à l'anode d'opérer en solution saturée en dihydrogène sans risque d'explosion. De plus, l'oxygène n'est plus en concentration limitante comme pour les mélanges H_2/O_2 développés précédemment puisqu'il provient directement de l'air. Enfin, cette biocathode protège aussi la désactivation de l'hydrogénase par le dioxygène de l'air puisque l'oxygène diffusant à travers la GDL est efficacement réduit en eau.

Cette nouvelle biopile délivre une densité de puissance maximum de $0,75 \text{ } \mu\text{W cm}^{-2}$ à 45 °C accompagnée d'un OCV à 0,95 V. Elle fait partie des meilleurs biopiles H_2/O_2 développées jusqu'à présent, et permet d'envisager l'utilisation d'hydrogénases dites sensibles à l'oxygène comme catalyseurs anodiques. Cependant, le design du système reste à améliorer pour étendre la gamme de température d'étude. Il est également important de noter que nous avons également cherché à développer des membranes à diffusion de gaz pour l'anode, de manière similaire aux travaux de Kano et al.^{32,33} Cependant, la présence de traces d'oxygène dans notre système de flux des gaz n'ont pas encore permis d'observer des courants bioélectrocatalytiques d'oxydation de H_2 satisfaisants.

Néanmoins, l'un des problèmes majeurs reste l'instabilité de l'enzyme immobilisée à la surface des électrodes. Au bout du deuxième jour, 50 % de l'activité bioélectrocatalytique de MbH1 est perdue. Une stratégie qui pourrait s'avérer efficace pour améliorer ces limites serait l'immobilisation covalente des enzymes sur un matériau extrêmement poreux. Par exemple, la création de mutants portant à proximité des centres relais responsables de la réponse électrochimie (le T1 pour la BOD et le cluster [FeS] distal de l'hydrogénase) des entités azotures par exemple, pour être immobilisées de manière covalente et orientée à la surface de

nanotubes de carbone fonctionnalisés par des fonctions alcynes suivant une réaction de chimie click. L'association de matériaux à porosité contrôlée à une orientation et une connexion efficace de l'enzyme et à des membranes à diffusion de gaz peut permettre d'augmenter significativement les courants catalytiques aux électrodes et la puissance de ces piles.

- (1) Reuillard, B.; Goff, A. L.; Cosnier, S. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (79), 11731–11734.
- (2) Armaroli, N.; Balzani, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46 (1-2), 52–66.
- (3) Jones, A. K.; Sillery, E.; Albracht, S. P. J.; Armstrong, F. A. *Chem. Commun.* **2002**, No. 8, 866–867.
- (4) De Lacey, A. L.; Fernández, V. M.; Rousset, M.; Cammack, R. *Chem. Rev.* **2007**, 107 (10), 4304–4330.
- (5) Pandelia, M.-E.; Fourmond, V.; Tron-Infossi, P.; Lojou, E.; Bertrand, P.; Léger, C.; Giudici-Ortoni, M.-T.; Lubitz, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (20), 6991–7004.
- (6) Parkin, A.; Goldet, G.; Cavazza, C.; Fontecilla-Camps, J. C.; Armstrong, F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (40), 13410–13416.
- (7) Liebgott, P.-P.; Leroux, F.; Burlat, B.; Dementin, S.; Baffert, C.; Lautier, T.; Fourmond, V.; Ceccaldi, P.; Cavazza, C.; Meynial-Salles, I.; Soucaille, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Guigliarelli, B.; Bertrand, P.; Rousset, M.; Léger, C. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6 (1), 63–70.
- (8) Liebgott, P.-P.; de Lacey, A. L.; Burlat, B.; Cournac, L.; Richaud, P.; Brugna, M.; Fernandez, V. M.; Guigliarelli, B.; Rousset, M.; Léger, C.; Dementin, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (4), 986–997.
- (9) Brugna-Guiral, M.; Tron, P.; Nitschke, W.; Stetter, K.-O.; Burlat, B.; Guigliarelli, B.; Bruschi, M.; Giudici-Ortoni, M. T. *Extremophiles* **2003**, 7 (2), 145–157.
- (10) Luo, X.; Brugna, M.; Tron-Infossi, P.; Giudici-Ortoni, M. T.; Lojou, É. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, 14 (8), 1275–1288.
- (11) Lojou, E. *Electrochimica Acta* **2011**, 56 (28), 10385–10397.
- (12) Lubitz, W.; Ogata, H.; Rüdiger, O.; Reijerse, E. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (8), 4081–4148.
- (13) Fritsch, J.; Lenz, O.; Friedrich, B. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, 11 (2), 106–114.
- (14) Shafaat, H. S.; Rüdiger, O.; Ogata, H.; Lubitz, W. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2013**, 1827 (8–9), 986–1002.
- (15) de Poulpiquet, A.; Ciaccafava, A.; Gadiou, R.; Gounel, S.; Giudici-Ortoni, M. T.; Mano, N.; Lojou, E. *Electrochem. Commun.* **2014**, 42, 72–74.
- (16) Plumeré, N.; Rüdiger, O.; Oughli, A. A.; Williams, R.; Vivekananthan, J.; Pöller, S.; Schuhmann, W.; Lubitz, W. *Nat. Chem.* **2014**, 6 (9), 822–827.
- (17) Ciaccafava, A.; Infossi, P.; Ilbert, M.; Guiral, M.; Lecomte, S.; Giudici-Ortoni, M. T.; Lojou, E. *Angew. Chem.* **2012**, 124 (4), 977–980.
- (18) Oteri, F.; Ciaccafava, A.; Poulpiquet, A. de; Baaden, M.; Lojou, E.; Sacquin-Mora, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16 (23), 11318.
- (19) Szot, K.; de Poulpiquet, A.; Ciaccafava, A.; Marques, H.; Jönsson-Niedziolka, M.; Niedziolka-Jönsson, J.; Marken, F.; Lojou, E.; Opallo, M. *Electrochimica Acta* **2013**, 111, 434–440.
- (20) Poulpiquet, A. de; Marques-Knopf, H.; Wernert, V.; Giudici-Ortoni, M. T.; Gadiou, R.; Lojou, E. *Phys Chem Chem Phys* **2014**, 16 (4), 1366–1378.
- (21) De Poulpiquet, A.; Ciaccafava, A.; Szot, K.; Pillain, B.; Infossi, P.; Guiral, M.; Opallo, M.; Giudici-Ortoni, M.-T.; Lojou, E. *Electroanalysis* **2013**, 25 (3), 685–695.
- (22) Monsalve, K.; Roger, M.; Gutierrez-Sanchez, C.; Ilbert, M.; Nitsche, S.; Byrne-Kodjabachian, D.; Marchi, V.; Lojou, E. *Bioelectrochemistry* **2015**, 106, Part A, 47–55.
- (23) Berezin, I. ; Varfolomeev, S. D.; Yaropolov, A. I.; Bogdanovskaya, V. .; Tarasevich, M. R. *Dokl. Akad. Nauk Sssr* **1975**, No. 225, 105–108.

- (24) Tarasevich, M. R.; Bogdanovskaya, V. A.; Zagudaeva, N. M.; Kapustin, A. V. *Russ. J. Electrochem.* **2002**, *38* (3), 335–335.
- (25) Vincent, K. A.; Cracknell, J. A.; Lenz, O.; Zebger, I.; Friedrich, B.; Armstrong, F. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (47), 16951–16954.
- (26) Vincent, K. A.; Cracknell, J. A.; Clark, J. R.; Ludwig, M.; Lenz, O.; Friedrich, B.; Armstrong, F. A. *Chem. Commun.* **2006**, No. 48, 5033.
- (27) Wait, A. F.; Parkin, A.; Morley, G. M.; dos Santos, L.; Armstrong, F. A. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (27), 12003–12009.
- (28) Krishnan, S.; Armstrong, F. A. *Chem. Sci.* **2012**, *3* (4), 1015.
- (29) Ciaccafava, A.; De Poulpiquet, A.; Techer, V.; Giudici-Orticoni, M. T.; Tingry, S.; Innocent, C.; Lojou, E. *Electrochem. Commun.* **2012**, *23*, 25–28.
- (30) Xu, L.; Armstrong, F. A. *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6* (7), 2166.
- (31) Singh, K.; McArdle, T.; Sullivan, P. R.; Blanford, C. F. *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6* (8), 2460.
- (32) So, K.; Kitazumi, Y.; Shirai, O.; Kurita, K.; Nishihara, H.; Higuchi, Y.; Kano, K. *Chem. Lett.* **2014**, *43* (10), 1575–1577.
- (33) So, K.; Kitazumi, Y.; Shirai, O.; Kurita, K.; Nishihara, H.; Higuchi, Y.; Kano, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2014**, *87* (11), 1177–1185.
- (34) Sosna, M.; Stoica, L.; Wright, E.; Kilburn, J. D.; Schuhmann, W.; Bartlett, P. N. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14* (34), 11882.
- (35) Flexer, V.; Brun, N.; Courjean, O.; Backov, R.; Mano, N. *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4* (6), 2097–2106.
- (36) Flexer, V.; Brun, N.; Destribats, M.; Backov, R.; Mano, N. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (17), 6437.
- (37) Fritea, L.; Haddache, F.; Reuillard, B.; Le Goff, A.; Gorgy, K.; Gondran, C.; Holzinger, M.; Săndulescu, R.; Cosnier, S. *Electrochem. Commun.* **2014**, *46*, 75–78.
- (38) Wen, H.; Bambhania, H. M.; Calabrese Barton, S. *J. Appl. Electrochem.* **2012**, *42* (3), 145–151.

Conclusion générale et perspectives

De par leur spécificité et leur habilité à catalyser toutes sortes de réactions dans des milieux complexes, les enzymes sont envisagées à l'heure actuelle comme biocatalyseurs pour le développement de biopiles. Les avancées technologiques dans le domaine de la conception de matériaux d'électrode, dans la compréhension des facteurs limitant la connexion des protéines redox ainsi que leur stabilité temporelle ont permis l'amélioration incontestable des performances de ces biopiles. Bien que ces dernières soient encore loin de rivaliser avec les performances des PACs, des applications pour l'alimentation de petits dispositifs moins énergivores tels que des capteurs environnementaux, à glucose ou encore des dispositifs biomédicaux implantés se laissent entrevoir.

L'objectif de ce travail de doctorat était d'optimiser la connexion électrique en DET d'enzymes redox actives sur des plateformes fonctionnalisées de nanotubes de carbone en vue d'élaborer des biopiles glucose/O₂ et H₂/O₂ performantes. Plus particulièrement, la réduction du dioxygène (la réaction ayant classiquement lieu au niveau des cathodes enzymatiques, microbiennes ou abiotiques) a été intensément étudiée. De plus, les performances des biopiles enzymatiques glucose/O₂ sont généralement limitées par la biocathode. Dans ce but, nous avons entrepris l'immobilisation sur divers matériaux conducteurs de plusieurs MCOs pour la réduction d'O₂. Partant du postulat que la connexion en DET devait être privilégiée pour obtenir des puissances élevées, l'optimisation du DET a pu être réalisée par le développement de larges surfaces spécifiques grâce aux CNTs ainsi que par l'orientation contrôlée des enzymes.

Suite à une étude bibliographique minutieuse, la deuxième partie de ce manuscrit a permis de décrire le développement de surfaces poreuses à base de MWCNTs et de leurs fonctionnalisations non covalentes par différentes molécules hydrophobes pour orienter favorablement la laccase *Tv* et favoriser un DET. Plusieurs stratégies de fonctionnalisation ont été mises en œuvre : l'électropolymérisation d'un dérivé du pyrrole possédant des groupements pyrènes, ainsi que l'immobilisation par « π -stacking » de dérivés pyrènes possédant des groupements anthraquinones et adamantanes. La modification de graphène par ces mêmes dérivés hydrophobes a également été étudiée. Pour toutes ces bioélectrodes, une importante vague de catalyse débutant à 0,6 V vs. ECS accompagnée d'une densité maximum de courant d'au moins -1 mA cm⁻² a été observée, soulignant une amélioration de l'orientation de l'enzyme comparée aux électrodes de MWCNTs non fonctionnalisés pour lesquelles une faible vague de catalyse est observée. Les performances de ces différentes biocathodes ont pu être rationalisées grâce à la modélisation moléculaire et électrochimique. Grâce à cette étude, des hypothèses sur la taille ou le type d'interaction de la molécule d'ancrage avec la paroi des CNTs ont été formulées et ont permis de vérifier les facteurs limitant le taux de recouvrement et l'orientation de l'enzyme à la surface des électrodes. D'autre part, la présence d'un matériau peu conducteur tel qu'un polymère de polypyrrole ou des feuillets d'oxyde de graphène réduit entre l'électrode et le site actif de l'enzyme peut également inhiber les transferts d'électrons et

entraîner une dispersion apparente des transferts électroniques. La fonctionnalisation non covalente des MWCNTs par le dérivé pyrène portant des groupements adamantanes s'est avérée être une stratégie très efficace pour immobiliser et orienter la laccase. Cette biocathode délivre une densité maximale de courant de $-2,5 \text{ mA cm}^{-2}$ et conserve 70 % de son activité catalytique après 22 jours de décharges discontinues. L'homogénéisation des constantes de transfert d'électrons accompagnée de l'augmentation du taux de recouvrement de l'enzyme ont permis le développement de biocathodes très performantes pour la réduction de O_2 , où toutes les enzymes immobilisées sont connectées en DET.

La fonctionnalisation supramoléculaire de MWCNTs par les laccases de *Trametes sp C30*, modifiées à des endroits spécifiques par des pyrènes, a également été envisagée pour améliorer le DET. Les résultats obtenus semblent indiquer que la « pyrénisation » ciblée n'a qu'un effet négligeable sur les constantes de transfert d'électron dans le cas de cette enzyme. L'avantage principal est un rapprochement entre l'enzyme et les CNTs. Malgré cela, ces pyrènes permettent l'immobilisation des enzymes sur des électrodes nanostructurées à base de CNTs et d'AuNPs. Les CNTs augmentent la surface développée des électrodes tandis que les AuNPs augmentent le nombre d'enzymes connectées et les vitesses de transfert d'électrons. La combinaison de ces deux matériaux a permis le développement de biocathodes délivrant une densité maximale de courant de $-3,5 \text{ mA cm}^{-2}$. Des études de modélisation moléculaires sont en cours afin de mieux comprendre le chemin du transfert d'électron dans le cas de ces enzymes.

La troisième partie de ce manuscrit s'est portée sur l'élaboration de biocathodes à base de bilirubine oxydase. Dans un premier temps, l'influence de matériaux hybrides CNTs/porphyrines sur l'orientation et la connexion en DET a été questionnée. Les résultats obtenus ont démontré que la quasi-totalité des enzymes immobilisées à la surface des plateformes MWCNTs/PP ou MWCNTs/PPFe^{III} étaient immobilisées dans une orientation favorable à un DET. En effet, la modélisation électrochimique a montré que ces électrodes sont uniquement limitées par l'efficacité de la catalyse réalisée par l'enzyme ainsi que par son taux de recouvrement. Ces biocathodes performantes délivrent une densité de courant maximum de $-4,7 \text{ mA cm}^{-2}$ à pH 7, accompagnée d'un potentiel de départ de 0,43 V vs. ECS ; proche du potentiel du centre T1. Ensuite, l'influence de la charge présente à la surface des CNTs sur l'orientation de la BOD a pu être étudiée. La fonctionnalisation covalente de MWCNTs par voie chimique par l'acide naphthoïque a permis d'introduire des charges négatives ; tandis que l'électroréduction du 4-(2-aminoéthyl) benzène diazonium tétrafluoroborate permet l'introduction de charges positives. Cette étude a clairement mis en évidence l'effet défavorable sur l'orientation de la BOD des charges positives ; tandis que les charges négatives, elles, favorisent une orientation adaptée à un DET de l'enzyme. De plus, la fonctionnalisation covalente des CNTs par voie chimique a permis l'élaboration d'un nouveau matériau ; f-MWCNTs-COO⁻ ; beaucoup plus facile à manipuler du fait de sa solubilité dans divers solvants organiques et dans l'eau qui permet l'obtention de film fin de manière hautement

reproductible. Néanmoins, ces films fins ont le désavantage d'avoir une surface développée plus faible et des pores plus petits que les films de MWCNTs limitant ainsi le taux de recouvrement de l'enzyme et la diffusion du substrat. Ces limites ont été contournées par l'incorporation d'une sous-couche poreuse tel qu'un film de MWCNTs ou une GDL. La biocathode basée sur l'immobilisation de la BOD sur MWCNTs/f-MWCNTs-COO⁻ délivre une importante densité de courant de -7 mA cm⁻² associée à une OCP de 0,43 V vs. ECS. La figure 1 résume les CVs des meilleures bioélectrodes obtenues pour chaque enzyme à pH 5. On observe que la biocathode la plus performante est celle élaborée avec la BOD *Mv*, néanmoins son potentiel de départ est d'environ 60 mV plus faible comparé à celui de la laccase *Tv*.

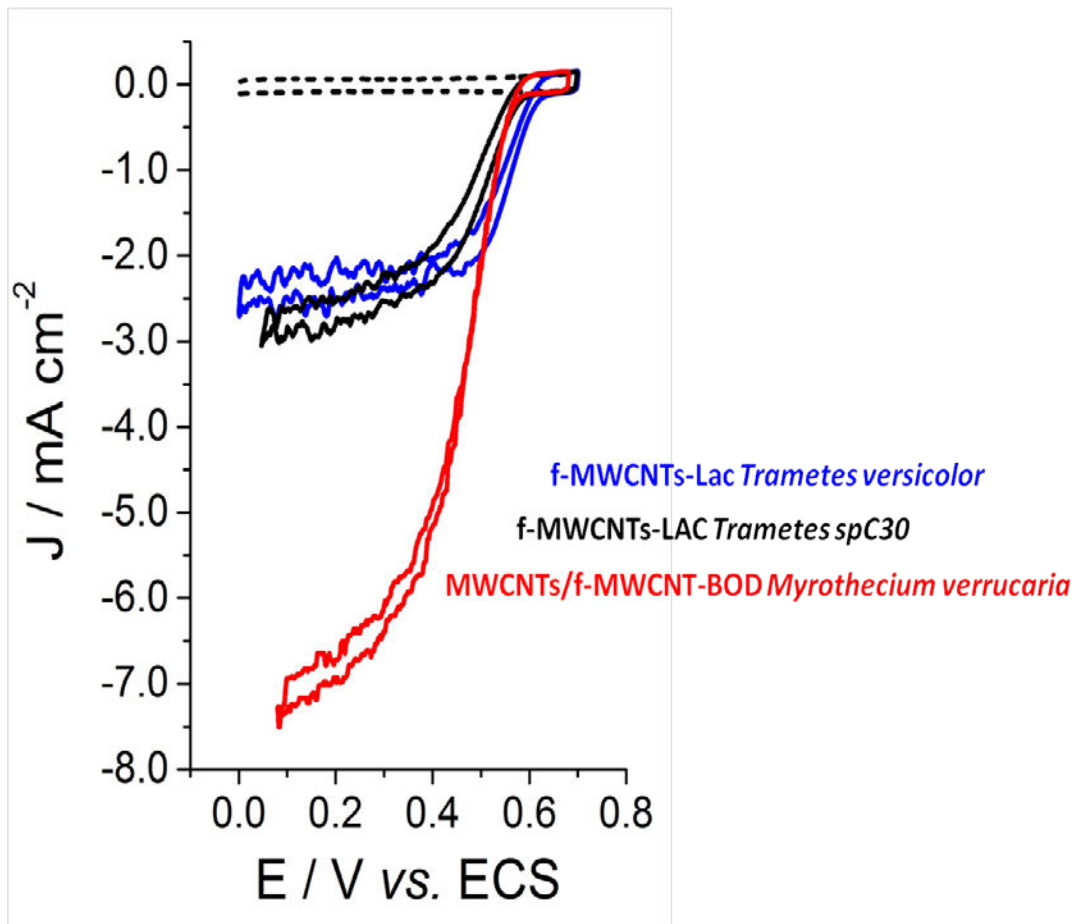


Figure 1: CVs des bioélectrodes dans du tampon McIlvaine pH5 sous O₂: MWCNTs/Pyr-Ada/Lac (bleu), MWCNTs/AuNPs/LAC3 (noir) et MWCNTs/f-MWCNTs-COO⁻/BOD (rouge), $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$

Les deux stratégies d'immobilisation et de connexion de la BOD ont pu être utilisées pour le développement de biocathodes respirantes. La biocathode respirante f-MWCNTs-COO⁻/BOD délivre une densité de courant de -4 mA cm⁻² et de -5,5 mA cm⁻² respectivement sous air et sous O₂. La porosité des électrodes associée au caractère hydrophile et chargé des f-MWCNTs est l'une des meilleures stratégies développées pour les biocathodes respirantes. L'association MWCNTs/porphyrines a également pu être adaptée avec succès aux biocathodes respirantes. Des densités de courant de -2 mA cm⁻² et de -4,5 mA cm⁻² ont été obtenues respectivement

sous air et sous O₂. Néanmoins, cette stratégie est limitée par la diffusion du dioxygène à travers le film hydrophobe de MWCNTs et par la pénétration des enzymes au sein de ce film.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre s'est focalisée sur l'immobilisation et la connexion de la BOD *Bp*. A l'inverse de la BOD *Mv*, la présence de charges négatives à la surface des électrodes défavorisent l'orientation de l'enzyme. Les électrodes à base de MWCNTs se sont avérées être les meilleures plateformes pour la connexion de cette enzyme. Une densité maximum de courant de -3 mA cm⁻² a été obtenue sous air et sous O₂ à pH 7,2 et 45°C. Cette biocathode est la première électrode à air développée pour cette enzyme et fait partie des plus performantes déjà publiées. Néanmoins, cette enzyme présente un OCP plus faible de 0,15 V comparé à la BOD *Mv*, mais elle est particulièrement stable en présence d'urate, et à hautes températures ce qui en fait une enzyme de choix pour les biopiles glucose/O₂ implantables.

Le quatrième et dernier chapitre a eu pour objectif de tester nos meilleurs biocathodes au sein de biopiles enzymatiques. Tout d'abord, les biocathodes MWCNTs/Pyr-Ada/Lac et MWCNTs/f-MWCNTs-COO⁻/BOD ont été associées à une bioanode oxydant le glucose. Ces expériences ont montré que la laccase est l'enzyme de choix à la biocathode du fait de son potentiel plus élevé. La biopile utilisant la BOD à la cathode s'est montrée parfaitement opérationnelle en condition physiologique et a conduit à l'obtention de densités de puissances de l'ordre de 235 μW cm⁻² et de 772 μW cm⁻² en condition non limitante en substrat. Enfin, les f-MWCNTs-COO⁻ ont montré une amélioration de la connexion en DET de l'hydrogénase MbH1 *Aa*. Une densité maximale de courant de 2,7 mA cm⁻² sur 300 mV à 60 °C sous bullage d'H₂ a été obtenue. Cette bioanode fait partie des meilleures bioanodes à base d'hydrogénase développées jusqu'à présent. La limitation par la diffusion du substrat ne permet pas d'observer la désactivation de l'hydrogénase à haut potentiel. L'amélioration de la porosité du matériau peut être envisagée suivant différentes stratégies de hiérarchisation de la porosité des électrodes, tel que l'incorporation d'une sous couche de MWCNTs comme il a été démontré pour la BOD *Mv*. Un nouveau design de biopile H₂/O₂ sans membrane a été élaboré par la combinaison de cette bioanode à la biocathode respirante à base de la BOD *Bp*. L'intégration d'une biocathode respirante permet d'une part de s'affranchir de la membrane classiquement utilisée pour ce type de dispositif. L'anode peut alors opérer en solution saturée en dihydrogène sans risque d'explosion. De plus, l'oxygène n'est plus en concentration limitante comme pour les mélanges H₂/O₂ développés précédemment puisqu'il provient directement de l'air. Enfin, cette biocathode protège aussi la désactivation de l'hydrogénase par le dioxygène de l'air puisque l'oxygène diffusant à travers la GDL est efficacement réduit en eau. Cette nouvelle biopile délivre une densité de puissance maximum de 750 μW cm⁻² à 45 °C accompagné d'une OCP à 0,95 V. Elle fait partie des meilleures biopiles H₂/O₂ développées jusqu'à présent, et permet d'envisager l'utilisation d'hydrogénases dites sensibles à l'oxygène comme catalyseurs anodique. Néanmoins, l'un des problèmes majeurs reste l'instabilité de l'enzyme immobilisée à

la surface des électrodes. Au bout du deuxième jour, 50 % de l'activité bioélectrocatalytique de MbH1 est perdue.

En résumé, ce travail démontre l'incroyable potentiel des CNTs comme matériaux pour la conception de bioélectrodes. Ils permettent la fabrication de plateformes hautement fonctionnalisables couplées à de grande surface spécifique et d'une grande tenue mécanique. L'immobilisation fonctionnelle d'enzymes à leur surface a permis d'augmenter fortement les transferts électroniques. Ces travaux mettent aussi en évidence les aspects à améliorer pour que le concept de biopile enzymatique soit un jour viable. Les perspectives s'articulent autour de plusieurs axes : tout d'abord le développement de larges surfaces spécifiques ainsi que l'amélioration de la stabilité du signal électrocatalytique.

Pour améliorer ce premier point, la compréhension des mécanismes de transport dans les matériaux poreux est nécessaire. Le transport de protéine dans le réseau 3D est une compétition entre le mécanisme d'adsorption et de transport (diffusion). La taille des pores doit donc être adaptée pour ne pas observer l'obstruction des pores et permettre une bonne diffusion du substrat. Une première approche s'articule autour de l'utilisation d'une sous couche de MWCNTs. Ces films ont l'avantage de présenter des pores de tailles assez importantes ainsi que de grandes surfaces actives. D'autre part, les électrodes respirantes permettent d'améliorer le transport des substrats gazeux vers les enzymes enfouies dans le milieu poreux.

L'amélioration de la stabilité des électrodes nécessite de comprendre les phénomènes à l'origine de cette dernière. A savoir si la diminution des courants catalytiques est attribuable à l'instabilité intrinsèque de l'enzyme ou à l'instabilité de son immobilisation. Dans les cas d'une instabilité liée à son immobilisation, le greffage covalent des enzymes sur un matériau présentant des pores de tailles supérieures à ces dernières pourrait être une alternative prometteuse. La création de mutants portant à proximité des centres relais responsables de la réponse électrochimie (le T1 pour la BOD et le cluster [FeS] distal de l'hydrogénase) des entités azotures par exemple, pourraient être immobilisés de manière covalente et orientés à la surface de nanotubes de carbone fonctionnalisés par des fonctions alcynes suivant une réaction de chimie click. L'association de matériaux à porosité contrôlée à une orientation et une connexion efficace de l'enzyme et à des membranes à diffusion de gaz peut permettre d'augmenter significativement les courants catalytiques aux électrodes et la puissance de ces piles. Enfin, la recherche d'enzymes d'autres organismes ou d'enzymes artificielles, la modification chimique de la surface des enzymes ou la mutagenèse dirigée doit permettre de cibler des propriétés limitantes des enzymes, que ce soit leur stabilité opérationnelle, leur orientation favorable à la surface ou leur mécanisme intrinsèque de transfert d'électrons et de protons.

Materials and Methods

I- Solvents, reagents and apparatus

I.1 Solvents

All organic solvents were reagent grade quality and were used as received from Sigma-Aldrich. Acetonitrile used for electrochemical experiments was purchased from Rathburn (HPLC grade S), and all aqueous solutions were prepared using deionized water from purelab UHQ system (ELGA).

I.2 Reagents

All the reagents: sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, citric acid, tetrabutyl ammonium perchlorate (TBAP), sodium chloride, nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (NAD^+), α -D-glucose, 2-aminoanthraquinone, isopentyl nitrite, 6-amino-2-naphthoic acid, 1-pyrenebutyric acid N-hydroxysuccinimide ester (Pyr-NHS), hemin, mesoporphyrin IX dimethyl ester, protoporphyrin IV, octaethylporphine, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 4-aminophenethylamine, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), tetrafluoroboric acid solution 48 wt. % in H_2O , sodium nitrite, 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP), 1-pyrenemethylamine hydrochloride, 2-bromomethyl-anthraquinone were purchased from Sigma-Aldrich and used as received.

Commercial grade MWCNTs (9.5nm diameter, purity > 95%) and DWCNTs were obtained from Nanocyl. SWCNTs (produced by HIPCO®, purified) and chemically reduced graphene oxide (RGO) were obtained from Unidym Inc. and Nanoinnova Technologies (Spain) respectively. Carbon nanomaterials were used as received without any purification step. Carbon cloth electrodes were purchased from PAXITECH (France).

I.3 Apparatus

I.3.1 Surface characterization and product analysis

The morphology of the electrodes was investigated by SEM using an ULTRA55 FESEM based on the GEMINI FESEM column with beam booster (Nanotechnology Systems Division, Carl Zeiss NTS GmbH, Germany) and tungsten gun. 3D and profile images were taken using a Keyence VK-X200 laser microscope. Raman spectra were recorded using a Renishaw inVia spectrometer. NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 operating at 400 MHz for ^1H . ESI mass spectra were recorded with a Bruker APEX-Qe ESI FT-ICR mass spectrometer.

I.3.2 Electrochemical measurement

The electrochemical experiments were performed in a three-electrode electrochemical cell using a VMP3 Multi Potentiostat (Biologic, France) or an Autolab PGSTAT100 Potentiostat

(Metrohm, The Netherlands) for experiments performed in aqueous media or organic media respectively. A Pt wire was used as counter electrode. Potentials given in organic media are referred to the Ag/AgNO₃ (10 mM) electrode while in aqueous media they are referred to saturated calomel electrode (SCE) or Ag/AgCl_(KCl saturated) electrode. Glassy carbon or carbon cloth electrodes were used as working electrodes. The surface of GC electrodes were polished with a 2 μm diamond paste purchased from Presi (France) and rinsed successively with water, acetone, and ethanol. All currents are normalized with the geometric surface of the electrodes.

- Characterization of the glucose/O₂ biofuel cell

Bioanode and biocathode were connected and investigated in McIlvaine buffer solution (pH 5.0 and pH 7.0) in presence of 10 mM NAD⁺ without adding any supplementary membrane. The anode was set as working electrode while the cathode was plugged as counter-reference electrode. Power curves were plotted from successive discharges (t = 1 min) at constant voltages. Measurements were performed under air or oxygen flow at 25 °C in presence of 5 or 100 mM of glucose.

- Characterization of the H₂/O₂ biofuel cell

The air-breathing biocathodes were sealed in a cylindrical plastic chamber with a gasket joint allowing the electrodes to be in contact with both the electrolyte and air with an active surface of 0.07 cm². Both the hydrophobicity of carbon cloth and MWCNT film prevent from any electrolyte leakage.

Bioanode and biocathode were connected and investigated in phosphate buffer solution (pH 7.2) without adding any supplementary membrane. The anode was set as working electrode while the cathode was plugged as counter-reference electrode. Power curves were plotted from successive discharges (t = 30 s) at constant voltages. Measurements were performed under high purity hydrogen flow at 45 °C.

II- Enzymes

Laccase (E.C. 1.10.3.2 from *Trametes versicolor*, 13.6 U mg⁻¹ solid), bilirubin Oxidase (E.C. 1.3.3.5 from *Myrothecium verrucaria*, 10.8 U mg⁻¹ solid), and glucose dehydrogenase (E.C. 1.1.1.47 from *Pseudomas sp.*, 235 U mg⁻¹) were used as received from Sigma Aldrich. BOD from *Bacillus pumilus* was expressed in *Escherichia coli* and purified at the CRPP,¹ Laccase *sp.30* was expressed in *Aspergillus niger* and purified at is2m,^{2,3} and Hydrogenase from *Aquifex aeolicus* (MbH1) was extracted from *Aquifex aeolicus* bacteria and purified at the BIP⁴ according earlier described procedure.

III- Synthesis

4-pyren-1-yl-butyric acid 10-pyrrol-1-yl-decyl ester (pyrrole-pyrene),⁵ N-hydroxysuccinimido-11-(pyrrol-1-yl)undecanoate (pyrrole-NHS),⁵ N-(adamantan-1-yl)-4-(pyren-1-yl)butanamide (Pyrene-Adamantane),⁶ β -cyclodextrin-modified gold nanoparticles (β -CD-AuNPs),⁷ and [(1,10-phenathroline-5,6-dione)₂((4,4'-bis(4-pyrenyl-1-yl)butyloxy)-2,2'-bipyridine)Ru(II)](PF₆)₂ (RuQ-pyrene)⁸ were prepared as previously described.

- 1-pyrenemethylamine (Pyr-NH₂)

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 pyrene-methylamine (205 mg, 0.9 mmol).

- 1-(2-anthraquinonylaminomethyl)pyrene (pyr-AQ₁)

2-bromomethylantraquinone (100 mg, 0.33 mmol), potassium carbonate (230 mg, 1.66 mmol) and 1-pyrenemethylamine (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, 300MHz): δ (ppm) 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 (s, 2H); ESI-MS: m/z = 452 [M+H]⁺.

- 1-[bis(2-anthraquinonyl)aminomethyl]pyrene (pyr-AQ₂)

2-bromomethylantraquinone (150 mg, 0.50 mmol), potassium carbonate (152 mg, 1.10 mmol) and 1-pyrenemethylamine (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, 300MHz): δ (ppm) 8.36 (s, 1H), 8.28–8.25 (m, 2H), 8.23–8.21 (m, 4H), 8.17–8.02 (m, 7H), 7.97–7.87 (m, 3H), 7.79–7.74 (d, 6H), 4.37 (s, 2H), 3.87 (s, 4H); ESI-MS: m/z=672 [M+H]⁺, 694[M+Na]⁺, 709.9 [M+K]⁺.

- f-RGO

Preparation: 50 mg (4 mmol of carbon) of reduced graphene were dispersed in dimethylformamide DMF (50 mL) and sonicated for 30 min. The solution was stirred under argon and heated to 100 °C. Then 2-aminoanthraquinone (326 mg, 1.46 mmol) and isopentyl nitrite (0.15 ml, 1.10 mmol) were added to the reaction medium which is left under argon and heated to 80 °C overnight. The reaction mixture was filtered through 0.45 µm PTFE membrane filters (OMNIPORE membrane filters) and the obtained black material was washed extensively with hot DMF, after vigorous sonication, next with acetone and finally dried under reduced pressure. 48.6 mg of a black powder of f-RGO was obtained.

Solubility measurements: 3 mg of RGO and f-RGO was dispersed in 3 mL of NMP using an ultrasonic bath for 5 min, followed by centrifugation for 15 min at 3200 rpm. 2 mL aliquot of each supernatant was taken and precipitated in acetone and filtered, and the filter cake was washed with acetone and dried, and weighed. The solubility of RGO is taken as near zero, while the solubility of f-RGO is 0.22 mg mL⁻¹.

- f-SWCNTs-COO⁻ and f-MWCNTs-COO⁻

Preparation: 50 mg (4 mmol of carbon) of CNTs were sonicated in DMF (150 mL) during 30 min. The mixture was stirred under argon and heated to 80 °C. Then 6-amino-2-naphtic acid (1.5 g, 8 mmol) and isopentyl nitrite (1.1 ml, 8 mmol) were added to the reaction medium which is left under argon and heated to 80 °C overnight. The reaction mixture was filtered through 0.45 µm PTFE membrane filters (OMNIPORE membrane filters) and the obtained f-MWCNTs and f-SWCNTs were extensively washed with hot DMF, after vigorous sonication, next with acetone and finally dried under reduced pressure.

Solubility measurements: 3 mg of f-SWCNT and f-MWCNT were dispersed in 3 mL of water using an ultrasonic bath for 5 min, followed by centrifugation for 15 min at 3200 rpm. 2 mL aliquot of each supernatant was taken and precipitated in acetone and filtered, and the filter cake was washed with acetone, dried, and weighed. The solubility of pristine MWCNT and SWCNT is taken as near zero, while the solubility of f-SWCNT and f-MWCNT is 12 and 37 µg mL⁻¹ respectively.

- (4-aminoethyl)benzenediazonium tetrafluoroborate salt (AEBD)

The synthesis of (4-aminoethyl)benzenediazonium tetrafluoroborate salt was prepared according to the method described by Kornblum et al.⁹ Briefly, 4 mmol of the amine was dissolved in HBF₄ acid solution; the solution was allowed to cool to 0°C for 15 min. Then, sodium nitrite (4.3 mmol dissolved in water) was added drop wise to the acidic amine solution under agitation. The mixture was allowed to react for 40 min. A precipitate appeared in the solution which was then filtered and rinsed with glacial ether. The salt was dried and kept at -20°C.

¹HNMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm) 3.23 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz); 3.33 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz); 7.81 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz); 8.46 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz).

IV- Electrode preparation

IV.1 Laccase based biocathodes

- Preparation of MWCNTs films

Dispersions of CNTs in N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) were prepared by 30 min sonication of 5 mg of CNTs in 1 mL of NMP until a homogenous black suspension was obtained. Then, 20 mL of the MWCNTs solution was drop-cast on a GC electrode and NMP was removed under vacuum, leaving a thick MWCNT film on the GC electrode.

- Functionalization of MWCNTs electrodes by poly(pyrrole-pyrene) or poly(pyrrole-NHS)

All solutions were deaerated for 20 min with argon before any electrochemical measurements. Poly(pyrrole-pyrene) and poly(pyrrole-NHS) films were generated on MWCNTs electrodes by repeated potential scanning of monomers (1 mM) from 0 V to 0.7 V vs. Ag/AgNO₃ in 0.1 M TBAP in CH₃CN for various scan number. After transfer of the resulting electrode into a monomer free solution of 0.1 M TBAP in CH₃CN for its characterization, all the modified electrodes were thoroughly washed with CH₃CN and deionized water.

- Functionalization of MWCNTs electrode by Pyr-AQ₁ and Pyr-AQ₂

The MWCNT electrodes were functionalized with Pyr-AQ₁ and Pyr-AQ₂ by drop cast 20 μL of a solutions containing Pyr-AQ₁ (1 mg mL⁻¹ in DMF) and Pyr-AQ₂ (1 mg mL⁻¹ in CH₂Cl₂), respectively. The solvents were removed under vacuum and the electrodes were washed with distilled water.

- Functionalization of GC and MWCNTs electrode by f-RGO

MWCNTs and GC electrodes surface were covered with f-RGO by drop-casting 20 μL of f-RGO solution in NMP (0.22 mg mL⁻¹), and NMP was removed under vacuum.

- Functionalization of MWCNTs electrode by Pyr-Ada and β-CD-AuNPs

MWCNTs electrodes were incubated for 1 h in DMF solution containing 10 mM of Pyr-Ada and then thoroughly washed with DMF and distilled water.

For the supramolecular binding of β-CD-AuNPs, the functionalized electrodes were then incubated in an aqueous solution of β-CD-AuNPs (0.5 mg mL⁻¹ in distilled water) followed by a washing step in water.

- Immobilization of Laccase from *Trametes versicolor*

MWCNTs, MWCNTs/P-Pyr, MWCNTs/Pyr-AQ₁, MWCNTs/Pyr-AQ₂, MWCNTs/Pyr-Ada, f-RGO and MWCNTs/f-RGO electrodes were then incubated overnight in 20 μL of a 5 mg mL⁻¹ solution of laccase (0.2M phosphate buffer, pH 5.0) at 4 °C. The same procedure was used for MWCNTs/P-NHS electrodes but using phosphate buffer pH 7.0 to allowed the formation

of the covalent bonding. The electrodes were finally washed with buffer and kept in buffer when not used.

- **Immobilization of Laccase *sp.* 30 UNIK₁₆₁ and LAC3**

The same procedure was used for native enzyme and pyrene modified enzyme. MWCNTs and MWCNTs/Pyr-Ada/AuNPs electrodes were incubated overnight at 4 °C in 20 µL of an enzyme solution (70 µM in 50 mM acetate buffer, pH 5.0). The electrodes were finally washed with buffer and kept in buffer when not used.

IV.2 BOD based biocathodes

- **Preparation of CNTs (SWCNTs, DWCNTs or MWCNTs) and f-MWCNTs-COO⁻ films**

2.5 mg mL⁻¹ CNTs (MWCNTs, DWCNTs or SWCNTs) dispersion was prepared by 30 min sonication of CNTs in 1 mL of NMP until homogenous black suspension was obtained. Then 20 µL of the CNTs solution was drop-casted onto a glassy carbon or carbon cloth electrodes and NMP was removed under vacuum, leaving a thick CNTs film.

f-MWCNTs-COO⁻ films were performed by the deposition of 20 µL of a 171 µg mL⁻¹ CNTs solution in NMP on GC, MWCNTs or carbon cloth electrodes, followed by the evaporation under vacuum of NMP.

- **Functionnalization of MWCNTs electrodes by porphyrin derivatives**

For the supramolecular binding of porphyrin derivatives, MWCNTs-modified electrodes were incubated for 1 h in DMF solution containing 3 mM of porphyrin and thoroughly washed with DMF and distilled water.

- **Functionnalization of MWCNTs electrodes by (4-aminoethyl)benzenediazonium tetrafluoroborate salt**

All solutions were deaerated for 20 min with argon before any electrochemical measurements. The electrochemical grafting of the diazoniums salts was performed on GC and MWCNTs electrodes by repeated potential scans of AEBD salts (2 mM) from 0 V to -1.3 V vs. Ag/AgNO₃ in 0.1 M TBAP in CH₃CN for 5 scans.

- **Immobilization of BOD**

The functionalized electrodes were then incubated with 20 µL of a BOD *Mv* solution (2.5 mg mL⁻¹ in Mc Ilvaine buffer, pH 7.0) overnight at 4 °C. The electrodes were finally washed with buffer and kept in buffer when not used.

BOD *Bp* based electrodes were made by drop-coating 10 µL of the enzyme solution (10 µM BOD in 50 mM phosphate buffer, pH 7.5) on the pre-modified electrodes followed by drying at room temperature. The resulting electrodes were then washed with phosphate buffer solution before the electrochemical characterization to remove the non-adsorbed enzymes.

IV.3 GDH based bioanodes

Electrodes were prepared according earlier described procedure.⁸ The MWCNTs/RuQ-pyrene/GDH electrodes were prepared by incubation of MWCNTs electrodes in 1:1 ratio at 5 mM of RuQ-pyrene/Pyr-NHS in DMF during 1h. The bi-functionalized electrodes were then incubated for overnight in 40 μL of a 2 mg mL^{-1} solution of GDH in phosphate buffer pH 7.0 at 4 °C. After each incubation step, the electrodes were rinsed several times with deionized water.

IV.4 Hydrogenase MBH1 A α based bioanodes

The deposition of f-MWCNT films was carried out by drop-coating of 20 μL of CNTs dispersion in water (37 $\mu\text{g mL}^{-1}$) on glassy carbon electrodes followed by drying of the solvent under vacuum. To test the influence of the amount of the carbon nanotubes on the performance of the bioanodes, several layers of f-MWCNTs were deposited by successive coatings, each followed by a drying step under vacuum. The modified electrodes were then incubated in 20 μL of MbH1 A α (5 μM in 0.2 M phosphate buffer, pH 7.2) for 4 h at 4 °C. The resulting electrodes were then washed with phosphate buffer solution.

REFERENCES

- (1) Durand, F.; Kjaergaard, C. H.; Suraniti, E.; Gounel, S.; Hadt, R. G.; Solomon, E. I.; Mano, N. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *35* (1), 140.
- (2) Klonowska, A.; Gaudin, C.; Asso, M.; Fournel, A.; Réglie, M.; Tron, T. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *36* (1), 34.
- (3) Mekmouche, Y.; Zhou, S.; Cusano, A. M.; Record, E.; Lomascolo, A.; Robert, V.; Simaan, A. J.; Rousselot-Pailley, P.; Ullah, S.; Chaspoul, F.; Tron, T. *J. Biosci. Bioeng.* **2014**, *117* (1), 25.
- (4) Luo, X.; Brugna, M.; Tron-Infossi, P.; Giudici-Ortoni, M. T.; Lojou, É. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14* (8), 1275.
- (5) Cosnier, S.; Holzinger, M. *Electrochimica Acta* **2008**, *53* (11), 3948.
- (6) Haddad, R.; Holzinger, M.; Villalonga, R.; Neumann, A.; Roots, J.; Maaref, A.; Cosnier, S. *Carbon* **2011**, *49* (7), 2571.
- (7) Villalonga, R.; Cao, R.; Fragoso, A.; Damiao, A. E.; Ortiz, P. D.; Caballero, J. J. *Mol. Catal. B Enzym.* **2005**, *35* (4-6), 79.
- (8) Reuillard, B.; Goff, A. L.; Cosnier, S. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (79), 11731.
- (9) Kornblum, N.; Iffland, D. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71* (6), 2137.

Liste des abréviations utilisées

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
AQ	Antraquinone
AuNPs	Nanoparticules d'or
BFC	Biopile
BOD	Bilirubine Oxydase
BOD <i>Bp</i>	Bilirubine de <i>Bacillus pumillus</i>
BOD <i>Mv</i>	Bilirubine oxydase de <i>Myrothecium verrucaria</i>
CA	Chronoampéométrie
CD	Cyclodextrine
CDH	Cellobiose déshydrogénase
CNT	Nanotube de carbone
CV	Voltampérométrie cyclique
CVD	(Chemical Vapor Deposition) Dépôt chimique en phase vapeur
Cyt C Ox	Oxydase à cytochrome c
DET	Transfert direct d'électron
DWCNT	Nanotube de carbone double parois
ECS	Électrode au calomel saturé
ET	Transfert d'électron
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
GC	Électrode de carbone vitreux
GDH	Glucose déshydrogénase
GOx	Glucose Oxydase
H ₂ ase	Hydrogénase
IR	Infrarouge
Lac	Laccase
Lac <i>Tv</i>	Laccase de <i>Trametes versicolor</i>
LAC3	Laccase de <i>Trametes sp. C 30</i>
MbH1 <i>Aa</i>	Hydrogénase I d' <i>Aquifex aeolicus</i>
MCBL	Microscopie confocal à balayage laser
MCO	Oxydase multi-cuivre
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Transfert médié d'électron
MWCNT	Nanotube de carbone multi parois
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NMP	1-méthyl-2-pyrrolidinone
OCP	Potentiel en circuit ouvert
OCV	Voltage en circuit ouvert
OEP	octaethylporphine
PAC	Pile à combustible
PCET	Transfert couplé électron-proton
P-NHS	N-hydroxysuccinimido-11-(pyrrol-1-yl)undecanoate (pyrrole-NHS)
PP	Protoporphyrin IV

PPDE	Mesoporphyrin IX dimethyl ester
PPFe ^{III}	Hemin
PPO	Polyphénol oxydase
P-Pyr	4-pyren-1-yl-butyric acid 10-pyrrol-1-yl-decyl ester (pyrrole-pyrene)
PQQ	Pyroloquinoléine Quinone
PVA	Polyvinyl acrilamide
PVI	Polyvinyl imidazole
PVP	Polyvinyl pyridine
Pyr	Pyrène
Pyr-Ada	N-(adamantan-1-yl)-4-(pyren-1-yl)butanamide
Pyr-AQ ₁	1-(2-anthraquinonylaminométhyl)pyrene
Pyr-AQ ₂	1-[bis(2-anthraquinonyl)aminométhyl]pyrene
Pyr-NHS	1-pyrenebutyric acid N-hydrosuccinimide ester
Q	Charge
RGO	Oxyde de graphène réduit
RuQpyrène	[(1,10-phenanthroline-5,6-dione) ₂ ((4,4'-bis(4-pyrenyl-1-ylbutyloxy)-2,2'-bipyridine)Ru(II))](PF ₆) ₂
SAM	Monocouche auto-assemblée
SWCNT	Nanotube de carbone mono paroi
TNC	Cluster T2/T3
TPAP	Tétrabutylammonium perchlorate
UNIK ₁₆₁	Mutant de la laccase <i>Trametes sp. C30</i>
UV-vis	Spectroscopie UV-vis
v	Vitesse de balayage en potentiel

Publications

Supramolecular Immobilization of Laccase on Carbon Nanotube Electrodes Functionalized with (Methylpyrenylaminomethyl)anthraquinone for Direct Electron Reduction of Oxygen, M. Bourourou, K. Elouarzaki, N. Lalaoui, C. Agnes, A. Le Goff, M. Holzinger, A. Maaref, S. Cosnier, , *Chem. Eur. J.*, **2013**, 19, 9371.

Efficient direct oxygen reduction by laccases attached and oriented on pyrene-functionalized polypyrrole/carbon nanotube electrodes, N. Lalaoui, K. Elouarzaki, A. Le Goff, M. Holzinger, S. Cosnier, , *Chem. Commun.* **2013**, 49, 9281.

Wiring Laccase on Covalently Modified Graphene: Carbon Nanotube Assemblies for the Direct Bioelectrocatalytic Reduction of Oxygen, N.Lalaoui, A. Le Goff, M. Holzinger, S. Cosnier, , *Chem. Eur. J.*, **2014**, 21, 3503.

A membraneless air-breathing hydrogen biofuel cell based on direct wiring of thermostable enzymes on carbon nanotube electrodes, N. Lalaoui, A. de Poulpique, R. Haddad, A. Le Goff, M. Holzinger, S. Gounel, M. Mermoux, N. Mano, E. Lojou, S. Cosnier, , *Chem Commun*, **2015**, 61, 7447.

One-year stability for a glucose/oxygen biofuel cell combined with pH reactivation of the laccase/carbon nanotube biocathode, B. Reuillard, C. Abreu, N. Lalaoui, A. Le Goff, M. Holzinger, O. Ondel, F. Buret, S. Cosnier, *Bioelectrochemistry*, **2015**, 106, 73.

Fully-oriented bilirubin oxidase on porphyrin-functionalized carbon nanotube electrodes for electrocatalytic oxygen reduction, N.Lalaoui, A. Le Goff, M. Holzinger, S. Cosnier, , *Chem. Eur. J.*, **2015**, accepted

A H₂/O₂ enzymatic fuel cell as a sustainable power for a wireless device, K. Monsalves, I. Mazurenko, N. Lalaoui, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Infossi, S. Nitsche, J.Y. Lojou, M.T. Giudici-Ortoni, S. Cosnier and E. Lojou *Electrochemistry Communication*, **2015**, accepted.

Direct electron transfer between a site-specific pyrene-modified laccase and carbon nanotube/gold nanoparticle supramolecular assemblies, N. Lalaoui, P. Rousselot-Pailley, R. Villalonga, M. Holzinger, S. Cosnier, T. Tron and A. Le Goff, , *ACS catalysis*, **2016**, just accepted.

Réduction bioélectrocatalytique du dioxygène par des enzymes à cuivre connectées sur des électrodes nanostructurées et fonctionnalisées : Intégration aux biopiles enzymatiques

Dans la nature, la réduction du dioxygène est catalysée par des enzymes de la famille des oxydoréductases. A l'heure actuelle, ces protéines spécifiques et efficaces sont envisagées comme biocatalyseurs au sein de biopiles enzymatiques. Dans ce contexte, l'optimisation de l'orientation et de la connexion d'oxydases multi-cuivre (MCOs) pour la réduction d'O₂ sur des matrices de nanotubes carbone (CNTs) fonctionnalisées a été étudiée. Dans un premier temps, le transfert électronique direct de la laccase est optimisé par la fonctionnalisation non covalente de CNTs par divers dérivés hydrophobes. La dynamique moléculaire ainsi que la modélisation électrochimique ont permis la rationalisation des performances des différentes biocathodes développées. Dans une seconde approche, la modification spécifique par des groupements pyrènes de la surface de laccases modifiées par mutagénèse a également été envisagée. La fonctionnalisation supramoléculaire de CNTs par des feuillets de graphène fonctionnalisés d'une part, et par des nanoparticules d'or d'autre part, a également permis de favoriser la connexion de laccases. La seconde partie présente l'élaboration d'autres types de biocathodes basées sur la connexion directe de bilirubines oxydases. Plusieurs stratégies de fonctionnalisation covalente et non covalente de CNTs ont été envisagées. Les différentes biocathodes élaborées par l'assemblage supramoléculaire de MCOs et des matériaux nanostructurés délivrent des densités de courant de réduction du dioxygène de plusieurs mA cm⁻². Ces nouvelles bioélectrodes combinées à une bioanode qui catalyse l'oxydation du glucose ont permis le développement de biopiles enzymatiques glucose/O₂ délivrant des densités maximales de puissances allant de 250 μW cm⁻² à 750 μW cm⁻² selon les conditions expérimentales. Enfin une bioanode à base d'une hydrogénase hyperthermophile a été développée et associée à une biocathode à base de bilirubine oxydase pour former un nouveau design de biopile H₂/O₂. Au sein de ce dispositif, la biocathode à diffusion de gaz réduit directement l'oxygène provenant de l'air, ce qui permet de s'affranchir de l'utilisation d'une membrane séparatrice tout en protégeant l'hydrogénase de sa désactivation en présence d'oxygène. Cette nouvelle biopile délivre une densité maximale de puissance de 750 μW cm⁻².

Mots clefs : Bioélectrocatalyse, Laccase, Bilirubine Oxydase, Hydrogénase, Réduction du dioxygène, Fonctionnalisation de nanotubes de carbone, Biopiles enzymatiques.

Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen by multi-copper oxidases oriented and connected on functionalized nanostructured electrodes: Application to enzymatic biofuel cells

The oxygen reduction is realized in nature by oxidoreductase enzymes. Currently, these highly specific and efficient catalysts are considered as biocatalysts for the development of biofuel cells. In this context, optimizing the orientation and the connection of multicopper oxidase (MCOs) for the reduction of O₂ on functionalized carbon nanotubes was studied. In the first part of this manuscript, direct electron transfer of laccase is assessed and optimized by the non-covalent functionalization of CNTs by various hydrophobic derivatives. Electrochemical modeling and molecular dynamics enabled the rationalization of the developed biocathodes efficiency. In a second approach, the specific modification by pyrene moieties of laccases surface modified by protein engineered has also been considered. Additionally, supramolecular functionalization of CNTs by modified graphene sheets and gold nanoparticles also helped to promote laccase connection. The second part presents the development of other types of biocathodes based on the direct connection of bilirubin oxidase. Several strategies of covalent and non-covalent CNTs functionalization have been considered. The different biocathodes developed by the supramolecular assembly of nanostructured materials and MCOs delivered current density of several mA cm⁻² for oxygen reduction. These new bioelectrodes combined with a bioanode which catalyzes the glucose oxidation have enabled the development of glucose/O₂ enzymatic biofuel cells; delivering maximum power densities from 250 μW cm⁻² to 750 μW cm⁻² depending on the experimental conditions. Finally a hyperthermophilic hydrogenase based bioanode was developed and associated with a bilirubin oxidase-based biocathode to form a new design of H₂/O₂ biofuel cell. Within this device, the gas diffusion biocathode directly reduces oxygen from the air, which eliminates the use of a separation membrane while protecting the hydrogenase from its deactivation in the presence oxygen. This new biofuel cell delivers a maximum power density of 750 μW cm⁻².

Key words: Bioelectrocatalysis, Laccase, Bilirubin Oxidase, Hydrogenase, Oxygen reduction, Carbon nanotube functionalization, Enzymatic biofuel cells.