



HAL
open science

Vers la conception d'une biopile enzymatique à glucose/oxygène efficace en milieu biologique

Marine Cadet

► **To cite this version:**

Marine Cadet. Vers la conception d'une biopile enzymatique à glucose/oxygène efficace en milieu biologique. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0260 . tel-01627565

HAL Id: tel-01627565

<https://theses.hal.science/tel-01627565>

Submitted on 2 Nov 2017

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ CHIMIE PHYSIQUE

Par Marine CADET

**Vers la conception d'une biopile enzymatique à
glucose/oxygène efficace en milieu biologique**

Sous la direction de : Nicolas MANO

Soutenue le Mardi 03 Novembre 2015

Membres du jury :

M. RICHETTI Philippe
M. LEGER Christophe
M. LOPEZ DE LACEY Antonio
M. KUHN Alexander
Mme LOJOU Elisabeth
M. MANO Nicolas
Mme ZAKRI Cécile

Directeur de recherche, CNRS
Directeur de recherche, CNRS
Directeur de Recherche, ICP Madrid
Professeur, Bordeaux INP
Directrice de recherche, CNRS
Directeur de recherche, CNRS
Professeur, Université de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examinatrice
Directeur de thèse
Invitée

Titre : Vers la conception d'une biopile enzymatique à glucose/oxygène efficace en milieu biologique

Résumé :

La première partie du travail présenté ici se concentre sur l'optimisation d'une cathode à oxygène. Tout d'abord, l'utilisation d'une nouvelle enzyme (la BOD de *Magnaporthe oryzae*) permet de multiplier le courant de réduction de l'oxygène en eau jusqu'à neuf fois. Ensuite la synthèse d'un polymère rédox adapté a permis d'améliorer le coefficient de diffusion des électrons dans l'hydrogel résultant en l'augmentation de la densité de courant générée. Enfin nous sommes passés d'une électrode de carbone en 2 dimensions à une fibre d'or poreuse tridimensionnelle. Après modification de cette fibre avec l'hydrogel rédox à base de BOD de *M. oryzae* nous avons évalué sa biocompatibilité : *in vitro* les tests ont montré l'absence totale de cytotoxicité et seule une très faible réponse inflammatoire ; *in vivo* aucune infection ne s'est déclarée pendant les 8 semaines d'implantation dans les souris et la formation d'une capsule fibrotique autour de l'électrode traduit sa bonne intégration dans les tissus de l'animal.

La seconde partie concerne la biopile dans son intégralité, construite à partir de la cathode optimisée et d'une anode adaptée à base de GDH. Elle permet de générer jusqu'à $240 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ dans du tampon Pipes/ CaCl_2 à 5mM de glucose. La biopile a ensuite été testée dans du sang humain total. Un maximum de $129 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ a été obtenu dans un échantillon avec une glycémie de 8,2 mM sous air. De plus nous avons constaté que la densité de puissance délivrée augmente proportionnellement avec la glycémie des différents échantillons de sang testés, faisant de la biopile à la fois une source d'électricité et un biocapteur à glucose ce qui n'avait jamais été démontré auparavant.

Mots clés : biopile, bilirubine oxydase, *Magnaporthe oryzae*, polymère rédox, fibres d'or poreuses, biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*, glucose déshydrogénase, sang humain total

Title : Towards the design of an enzymatic glucose/oxygen biofuel cell efficient in biological environment

Abstract :

The first part of the work presented here focuses on the optimization of an oxygen cathode. First, the use of a new enzyme (BOD from *Magnaporthe oryzae*) permit to increase the current of reduction of oxygen into water by a factor nine. Then the synthesis of a suitable redox polymer greatly improved the diffusion coefficient of electrons in the hydrogel, resulting in an increase of the current density. Finally we switched from a two-dimensional carbon electrode to a three-dimensional porous gold fiber. After modification of the fiber with the redox hydrogel based on BOD from *M. oryzae*, we assessed its biocompatibility: *in vitro* the tests showed the total absence of cytotoxicity and only a very low inflammatory response; *in vivo* no infection appeared during the 8 weeks of implantation in mice and the formation of a fibrotic capsule around the device reflects its successful integration into the animal tissues.

The second part concerns the full biofuel cell , elaborated from the optimized cathode and an adapted GDH-based anode. It could generate up to $240 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ at 5mM glucose in Pipes/ CaCl_2 buffer. The biofuel cell was then tested in whole human blood. A maximum of $129 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ was obtained in a sample with 8,2 mM glycaemia under air. In addition we observed that the delivered power density increased proportionally with the glycaemia of the different blood samples tested, making the biofuel cell both a power source and a glucose biosensor at the same time which had never been shown before.

Keywords : biofuel cell, bilirubin oxidase, *Magnaporthe oryzae*, redox polymer, porous gold fibers, *in vitro* and *in vivo* biocompatibility, glucose dehydrogenase, whole human blood

Unité de recherche

Centre de Recherche Paul Pascal, CRPP UPR-8641, CNRS Université de Bordeaux

115 avenue du Docteur Albert Schweitzer, 33600 PESSAC

« Le succès n'est pas la clé du bonheur. Le bonheur est la clé du succès. Si vous aimez ce que vous faites, vous réussirez. »

Albert SCHWEITZER



Remerciements

Voilà presque quatre années maintenant passées au CRPP (stage de master puis thèse) et je souhaite remercier l'ensemble des personnes qui ont permis que cette expérience contribue à mon épanouissement professionnel et personnel.

Tout d'abord je remercie M. Philippe RICHETTI, directeur du CRPP, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de Recherche ainsi que pour son rôle de Président de jury lors de ma soutenance de thèse. A cette occasion je remercie également Messieurs Christophe LEGER et Antonio LOPEZ DE LACEY venus respectivement de Marseille et Madrid de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs pour cette thèse et pour les discussions intéressantes et constructives que nous avons eues au sujet du travail que j'ai présenté. Je remercie aussi Mme Elisabeth LOJOU, examinatrice, pour sa bienveillance tant lors de ma soutenance de thèse que lors de nos diverses rencontres lors de conférences, ainsi que Mme Cécile ZAKRI, invitée, pour son intérêt quant à mes recherches. Enfin j'adresse un remerciement particulier à M. Alexander KUHN avec qui j'ai collaboré pendant mes trois années de thèse dans le cadre du labex AMADeUs et qui a accepté d'être examinateur pour ma soutenance de thèse.

D'une manière générale j'ai été très touchée que les membres du jury soulignent mon enthousiasme et mon honnêteté car je me suis efforcée pendant ces trois années de faire un travail complet et appliqué dans lequel je me suis beaucoup investie : comme je l'ai dit, cette thèse c'est un peu mon bébé.

Ensuite je dois remercier mon directeur de thèse, M. Nicolas MANO, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Après un stage de master très productif il m'a permis de poursuivre par une thèse dont j'ai pu choisir l'orientation. Il s'est montré très disponible, prodiguant régulièrement conseils et encouragements, ce qui a indéniablement contribué à la réussite de cette thèse. Il m'a également donné l'opportunité de participer à l'organisation du congrès Elecnano5 en mai 2013 à Bordeaux ce qui a été pour moi une expérience très intéressante conclue par l'incroyable dîner de gala au château Carbonieux. C'est aussi grâce à lui que j'ai pu participer à l'Ecole d'été Bioenergy à l'île d'Oléron en 2014 qui s'est avérée très formatrice. Je voudrais également le remercier pour m'avoir proposé la présidence du club jeune de la SCF section Aquitaine : bien que d'abord réticente à exercer cette fonction, j'ai pris beaucoup de plaisir à organiser et coordonner le concours « Images de chimistes » éditions 2013 et 2014 sur le campus bordelais et à le diffuser dans l'Actualité Chimique avec la collaboration de la rédactrice adjointe Mme Séverine BLENEAU.

Je remercie l'ensemble des personnes de l'équipe Biopiles et Biocapteurs avec qui j'ai pu interagir pendant mon doctorat. Concernant la partie enzymologie je remercie M. Sébastien GOUNEL pour la wonderful BOD de *Magnaporthe oryzae* qui constitue le point de départ de ma thèse, Mme Claire STINES-CHAUMEIL pour la GDH permettant de construire la biopile et M. Jad ROUHANA pour son aide sur les structures cristallines des enzymes et son soutien. Pour la partie électrochimie je remercie M. Jérôme ROCHE, post doctorant éclair, pour sa bonne humeur et M. Emmanuel SURANITI, post doctorant heureusement pas éclair, pour son soutien et ses réponses toujours bienveillantes, calmes et utiles.

I would like to thank especially Magdalena MURAWSKA, PhD student in the team, who shared my office (and more) for one year and a half. You have become a real friend to me and I had memorable moments with you during this period : summer school at île d'Oléron, fête de la science, singing 🎵🎵🎵 and watching stupid funny videos in the office,... I wish you all the best for the end of your PhD, trust yourself and you'll make it !

Je remercie Mme Lise EDEMBE, dont j'ai partagé le bureau pendant 2 ans mais qui est surtout devenue une vraie amie. Je te remercie pour ta confiance et ton soutien pendant tout ce temps. Tu as su rester forte malgré toutes les épreuves et je sais que maintenant le meilleur t'attend pour toi et ton seanapan. Je vous adore tous les deux !

Je remercie également Mme Karen BERTAUX, technicienne CNRS, avec qui j'ai beaucoup apprécié travailler et discuter et qui d'après moi manque beaucoup au CRPP.

Pour finir je remercie Mesdames Elodie ROUSSARIE et Sabrina BICHON qui sont arrivées très récemment dans l'équipe et qui été immédiatement très gentilles avec moi.

Je me dois de remercier Messieurs Xavier BRILLANT et Frédéric LOUERAT de la cellule Chimie du CRPP pour la mise au point du protocole de synthèse des polymères rédox cathodiques ainsi que leur bonne humeur permanente.

Je remercie également les membres des différents services du CRPP avec qui j'ai pu interagir que ce soit pour des questions techniques ou administratives : Brigitte DELORD, Will NERI, Isabelle LY (Images MEB), Béatrice HUYNH-TAN, Nathalie TOUZE (accueil), Lionel CHEVALIER, Philippe BARBOTEAU (atelier mécanique), Nadine LAFFARGUE (bibliothèque), Corinne AMENGUAL, Elodie MAHIEUX (direction), Mme Virginie PONSINET pour son travail de suivi des doctorants du CRPP, Philippe HORTOLLAND, Jean-Luc LABORDE, Sandrine MAILLET et Anne FACQ (informatique).

J'adresse un remerciement spécial à Béatrice DUPIN, Elisabeth HORTOLLAND et Josiane PARZYCH du service gestion du CRPP qui m'ont vu souvent dans leur bureau pendant ces trois années, avec tout type de questions et ont toujours répondu avec gentillesse, rapidité et efficacité.

Enfin, même si je ne saurais tous les citer je remercie l'ensemble des personnes qui ont assisté à ma soutenance de thèse et m'ont témoigné leur sympathie à l'occasion du pot organisé après.

Je souhaite à présent remercier les personnes extérieures au CRPP avec qui j'ai collaboré : Messieurs Alexander KUHN et Aleksandar KARAJIC du NSySA pour la conception des fibres d'or poreuses, M. Jean RIPOCHE et Mme Annabelle TANGA pour les études de biocompatibilité *in vitro* de la cathode, Messieurs Pierre COSTET (responsable d'animalerie) et Sébastien LEPREUX (anatomopathologiste au CHU Bordeaux Pellegrin) pour les expérimentations *in vivo*, Mme Corinne DUPUY pour son aide précieuse dans la demande d'agrément auprès du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour l'utilisation de produit sanguins, Mme Corinne HAMSANI de l'EFS pour la préparation des échantillons de sang et m'avoir montré l'ensemble du processus de conditionnement des produits sanguins,

I just come back to Aleksandar because we have been working together during these three years : it has been a real pleasure to chat and work with you. I know you will succeed in work and life but anyway I wish you all the best for your future.

Je remercie le CNRS pour le financement des conférences auxquelles j'ai participé pendant ces trois années. J'ai ainsi eu l'opportunité de présenter mes travaux devant un public international à Paris en 2013, à Visegrad (Hongrie) et à Lausanne (Suisse) en 2014 et à Malmö (Suède) en 2015. Je garde un excellent souvenir de ces missions car elles m'ont permis d'échanger avec ma communauté scientifique et d'enrichir mes connaissances tout en voyageant. J'ai également été très impressionnée de pouvoir rencontrer les rockstars de l'électrochimie dont les noms apparaissent sur plusieurs centaines d'articles scientifiques.

Je souhaite aussi remercier l'Université de Bordeaux qui m'a donné l'immense opportunité d'enseigner pendant mon doctorat, ainsi que l'ensemble des enseignants et techniciens avec lesquels j'ai collaboré. J'ai pris un immense plaisir à encadrer des TD et TP avec les étudiants de licence. Les TP de chimie ont été l'occasion de beaucoup de fous rires mais également un moment privilégié avec les étudiants permettant d'améliorer l'assimilation des notions théoriques. Les TD de chimie organique se sont finalement apparentés à des cours appliqués au sein desquels se fait réellement la transmission du savoir. J'ai beaucoup apprécié suivre le même groupe régulièrement sur tout le semestre car il se crée un lien, une relation de confiance. J'ai également participé à l'UE d'ouverture professionnelle avec les étudiants de L1 qui m'a permis d'avoir de vraies discussions avec eux sur leurs études, leurs attentes et leur avenir et est d'après très important afin d'adapter les méthodes d'enseignement actuelles.

Même si d'une manière générale je n'ai pas trop « souffert » pendant ma thèse, il n'en demeure pas moins que c'est un marathon de trois ans au cours duquel il y a eu des hauts mais aussi des bas. Je veux donc remercier ma famille pour avoir été présente malgré la distance pendant cette période. Je remercie donc mon père et mon frère mais tout particulièrement ma mère pour son soutien

morale et sa présence dans les moments difficiles. Tu resteras toujours ma maman chérie et c'est en partie grâce à toi que j'en suis arrivée là aujourd'hui, je t'aime, je vous aime tous les trois.

Je remercie aussi mes grands parents chez qui j'ai pu aller me ressourcer à la campagne régulièrement et qui m'ont fait le grand plaisir d'être présent à ma soutenance. Faire ma thèse à Bordeaux m'a aussi permis de vous voir plus souvent, ce que j'ai beaucoup apprécié.

Pour leur présence et leur soutien également je remercie tonton Christian et tatie Maïthé.

Enfin je remercie Igloo et Litchi qui m'ont aidé à rédiger ce manuscrit et surtout surtout à prendre des pauses quand il le fallait, ainsi que pour leur soutien indéfectible de jour comme de nuit !



Un immense merci donc au très grand nombre de personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ces trois années de thèse.

Symboles et abréviations

A	activité enzymatique en solution ou surface de l'électrode
AA	acrylamide
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
ADH	alcool déshydrogénase
AG	agent réticulant
AldDH	aldéhyde déshydrogénase
AQ2S	anthraquinone-2-sulfonate
BOD	bilirubine oxydase
BOD <i>Bp</i>	bilirubine oxydase de <i>Bacillus pumilus</i>
BOD <i>Mo</i>	bilirubine oxydase de <i>Magnaporthe oryzae</i>
C	protéine du complément
CDH	cellobiose déshydrogénase
CEP	polymère conducteur électroactif
CNT	nanotube de carbone
COx	cytochrome oxydase
Cyt <i>c</i>	cytochrome c
cps	coups par seconde
C_{RT}	concentration en complexes rédox
CV	voltammogramme cyclique
δ	distance entre complexes rédox voisins fixés sur le polymère
DAPI	diaminido phénylindol
D_{app}	coefficient de diffusion apparent des électrons
DET	transfert électronique direct
DI	diaphorase
ϵ	constante di-électrique
e⁻	électron
E	potentiel ou enzyme selon le contexte
E^o	potentiel standard d'un couple rédox
EPR	spectroscopie de résonance paramagnétique électronique

f	fraction molaire
F	constante de Faraday
FAD	flavine adénine dinucléotide
Fc	ferrocène
FDH	fructose déshydrogénase
FITC	fluorescéine isothiocyanate
ΔG	énergie libre d'activation de Gibbs
GC	carbone vitreux (glassy carbon)
GDH	glucose déshydrogénase
GOx	glucose oxydase
HRP	peroxydase de raifort (horseradish peroxidase)
I	courant électrique
ICP-MS	spectrométrie par torche plasma couplée à la détection par spectrométrie de masse
ICP-OES	spectrométrie par torche plasma couplée à la détection par spectrométrie d'émission optique
I_p	indice de polymolécularité
IR	spectroscopie infrarouge
k	constante de vitesse du transfert électronique
k_B	constante de Boltzmann
k_{cat}	constante catalytique
k_{ex}	constante de vitesse d'échange des électrons
K_I	constante d'inhibition
K_M	constante de Michaelis-Menten
λ	distance entre le polymère et le complexe rédox fixé dessus ou énergie de réorganisation selon le contexte
MCO	oxydase multi-cuivre (multi copper oxidase)
Mn	masse molaire en nombre
MTT	bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium

Mw	masse molaire en masse
MWNT	nanotube de carbone multi-parois
n	indice de réfraction
NaCl	chlorure de sodium
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
OCP	potentiel en circuit ouvert
Os	osmium
P	puissance ou produit selon le contexte
PAA	polyacrylamide
PABMSA	poly(3-aminobenzoic acid-co-2-methoxyaniline-5-sulfonic acid)
PANi	polyaniline
PB	tampon sodium phosphate
PBS	tampon sodium phosphate salin
PD	9,10-phénanthroline-5,6-dione
PDH	pyranose déshydrogénase
PEGDGE	poly éthylène glycol diglycidyl éther
PLL-NAD⁺	poly-L-lysine modifiée avec nicotinamide adénine dinucleotide
PPO	polyphénol oxydase
PPy	polypyrrole
PQQ	pyrroloquinoléine quinone
PVI	polyvinylimidazole
PVP	polyvinylpyridine
PyOx	pyranose oxydase
r	rapport de réactivité
R	constante des gaz parfaits
RBBR	rémozole R bleu brillant
rpm	unité de la vitesse de rotation = tours par minutes
S	substrat
SAM	monocouche auto-assemblée
SGZ	syringaldazine

SWNT	nanotube de carbone mono-paroi
T	température
TBAB	tétraabutylammonium bromide
TEMED	tétraméthyléthylènediamine
TEOS	orthosilicate de tétraéthyle
TOF-MS	spectrométrie de masse à temps de vol
TOx	tréhalose oxydase
UV	ultraviolet
v	vitesse de balayage
V	tension
VI	vinylimidazole
VK3	vitamine K3
V_{max}	vitesse maximale de la catalyse enzymatique

Sommaire

<u>Introduction générale</u>	1
---	---

Chapitre I : de la biopile à l'électrode

1. Introduction	9
2. Les piles à combustible	10
2.1. Principe.....	10
2.2. Caractérisation d'une pile à combustible.....	11
2.3. Avantages et limitations	16
2.4. Conclusion intermédiaire.....	17
3. Les biopiles	18
3.1. Généralités	18
3.2. Les biopiles microbiennes	19
3.2.1. Principe.....	19
3.2.2. Applications des biopiles microbiennes	22
3.2.3. Limitations des biopiles microbiennes	24
3.3. Les biopiles enzymatiques.....	25
3.3.1. Introduction	25
3.3.2. Caractéristiques des biopiles enzymatiques : avantages et limitations	25
3.3.3. Les principaux types de biopiles enzymatiques	26
3.3.4. Les différentes biopiles enzymatiques rapportées dans la littérature	27
3.3.5. La biopile enzymatique à glucose/oxygène	32
3.3.5.1. Historique	32
3.3.5.2. Description.....	32

3.3.6.	Utilisation des biopiles enzymatiques	34
3.3.6.1.	Les biopiles comme source d'alimentation de biocapteurs	34
3.3.6.2.	Les biopiles et le contrôle du diabète	36
3.4.	Utilisation des biopiles en milieu biologique : mesures <i>in vivo</i>	41
3.4.1.	Chez le végétal	42
3.4.2.	Chez l'animal	43
3.4.3.	Chez l'homme	45
3.5.	Conclusion intermédiaire.....	46
4.	Anodes et cathodes enzymatiques.....	46
4.1.	Les matériaux d'électrode	46
4.1.1.	Electrodes métalliques.....	47
4.1.1.1.	Généralités	47
4.1.1.2.	Electrodes d'or.....	48
4.1.1.3.	Electrodes de platine.....	49
4.1.2.	Electrodes carbonées	49
4.1.2.1.	Nanotubes de carbone.....	49
4.1.2.2.	Carbone poreux.....	51
4.1.2.3.	Matériaux composites à base de carbone	51
4.1.3.	Matériaux polymériques.....	52
4.1.3.1.	Les polymères conducteurs	52
4.1.3.2.	Les polymères fonctionnalisés.....	53
4.1.4.	Matériaux sol-gel.....	54
4.2.	Les enzymes rédox	55
4.2.1.	Généralités.....	55
4.2.2.	La cinétique enzymatique.....	56
4.2.3.	Avantages et limitations des enzymes.....	58
4.2.4.	Choix des enzymes pour les biopiles	58

4.2.5.	Enzymes cathodiques	59
4.2.5.1.	Généralités	59
4.2.5.2.	Les laccases	62
4.2.5.3.	Les bilirubine oxydases	62
4.2.5.4.	Autres enzymes cathodiques	63
4.2.6.	Enzymes anodiques	64
4.2.6.1.	Les glucose déshydrogénases	64
4.2.6.2.	Les glucose oxydases.....	66
4.2.6.3.	Les cellobiose déshydrogénases	68
4.2.6.4.	Les pyranose oxydases et déshydrogénases	69
4.2.6.5.	Autres enzymes anodiques	69
4.3.	Le transfert électronique	70
4.3.1.	Problématique.....	70
4.3.2.	Théorie de Marcus.....	71
4.3.3.	Comparaison des transferts électroniques direct et médié	72
4.3.4.	Les médiateurs rédox	74
4.3.4.1.	Généralités	74
4.3.4.2.	Les différents médiateurs rédox	74
4.3.4.3.	Médiateurs en solution ou immobilisés	75
4.4.	Les méthodes d'immobilisation des enzymes	76
4.4.1.	L'adsorption physique.....	77
4.4.2.	La reconstitution de l'apoenzyme	77
4.4.3.	L'encapsulation	78
4.4.4.	Le greffage covalent.....	79
4.4.5.	La réticulation	80
4.4.6.	L'hydrogel rédox.....	80
4.4.6.1.	Principe et intérêt de l'hydrogel rédox	81

4.4.6.2.	Les constituants de l'hydrogel rédox.....	82
4.4.6.3.	Le mécanisme du transfert électronique dans l'hydrogel rédox.....	83
4.5.	Conclusion intermédiaire.....	85
5.	Conclusion.....	86
6.	Références bibliographiques.....	87

Chapitre II : la cathode enzymatique

1.	Introduction.....	109
2.	La BOD de <i>Magnaporthe oryzae</i>	110
2.1.	Obtention de l'enzyme.....	110
2.1.1.	Identification.....	110
2.1.2.	Production et purification.....	110
2.1.3.	Caractérisation en solution.....	110
2.2.	Tests préliminaires en électrochimie.....	112
2.2.1.	Evolution de la densité de courant avec la constitution de l'hydrogel.....	114
2.2.2.	Effet des conditions de séchage de l'hydrogel sur la densité de courant.....	115
2.2.3.	Influence de la température de mesure sur la densité de courant.....	117
2.2.4.	Influence du pH de mesure sur la densité de courant.....	118
2.2.5.	Evolution de la densité de courant en fonction du taux de recouvrement d'hydrogel.....	119
2.2.6.	Effet du tampon de mesure.....	121
2.2.6.1.	Effet sur la densité de courant de réduction.....	121
2.2.6.2.	Effet sur la stabilité.....	123
2.2.7.	Comparaison avec les BODs de <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Trachyderma tsunodae</i> et <i>Myrothecium verrucaria</i>	125
2.3.	Travail sur l'activité enzymatique : les « nanofleurs » enzymatiques.....	126

2.3.1.	Principe.....	126
2.3.2.	Application à la BOD de <i>Bacillus pumilus</i>	128
2.3.2.1.	Influence de l'agitation pendant la formation des nanofleurs	128
2.3.2.1.1.	Protocole	128
2.3.2.1.2.	Microscopie électronique à balayage.....	129
2.3.2.1.3.	Calcul du taux d'encapsulation.....	130
2.3.2.2.	Variation du degré d'agitation et de la température d'incubation	131
2.3.2.2.2.	Microscopie électronique à balayage.....	132
2.3.2.2.3.	Calcul du taux d'encapsulation.....	135
2.3.2.3.	Influence du tampon d'incubation.....	136
2.3.2.3.1.	Microscopie électronique à balayage.....	136
2.3.2.3.2.	Mesure de l'activité en solution.....	137
2.3.3.	Conclusion sur la formation de nanofleurs à partir de BOD.....	138
2.4.	Conclusion intermédiaire.....	138
3.	Conception de nouveaux polymères rédox cathodiques	140
3.1.	Caractéristiques du polymère rédox cathodique d'origine	140
3.2.	Optimisation des conditions de synthèse du polymère rédox.....	141
3.2.1.	Protocole.....	141
3.2.2.	Caractérisation des polymères rédox.....	141
3.2.2.1.	Caractérisation du copolymère PAA-PVI par spectroscopie infrarouge.....	141
3.2.2.2.	Caractérisation du complexe d'osmium par spectrométrie de masse.....	142
3.2.2.3.	Suivi du couplage par électrochimie	143
3.2.2.4.	Electrochimie des polymères rédox avec une concentration en osmium variable	144
3.2.3.	Performances en électrochimie avec la BOD de <i>Magnaporthe oryzae</i>	144
3.2.4.	Calcul du coefficient de diffusion apparent des électrons.....	145
3.3.	Variation de la structure du squelette copolymérique du polymère rédox	147

3.3.1.	Protocole.....	147
3.3.2.	Caractérisation des copolymères	147
3.3.2.1.	Analyse de la structure des copolymères par spectroscopie infrarouge	147
3.3.2.2.	Détermination de la taille des copolymères par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion multi-angle de la lumière	148
3.3.2.3.	Electrochimie des polymères rédox ayant un squelette variable	150
3.3.4.	Mesure de la concentration en complexes d'osmium	154
3.3.5.	Performances en électrochimie	156
3.3.5.1.	Avec la BOD de <i>Magnaporthe oryzae</i>	156
3.3.5.2.	Avec la BOD de <i>Bacillus pumilus</i>	157
3.3.5.2.1.	Optimisation des conditions de séchage de la BOD de <i>Bacillus pumilus</i>	157
3.3.5.2.2.	Test des polymères rédox avec la BOD de <i>Bacillus pumilus</i> en fonction des conditions de séchage et du tampon de mesure.....	158
3.3.5.3.	Comparaison des hydrogels à base de BOD de <i>Magnaporthe oryzae</i> et de <i>Bacillus pumilus</i> en fonction du polymère rédox et du tampon de mesure.....	159
3.3.6.	Calcul du coefficient de diffusion apparent des électrons.....	161
3.4.	Conclusion intermédiaire.....	163
4.	La fibre d'or poreuse comme électrode.....	165
4.1.	Synthèse des fibres d'or poreuses.....	165
4.1.1.	Principe.....	165
4.1.2.	Préparation de la matrice de silice : technique Langmuir Blodgett	165
4.1.3.	Electrodéposition d'or	166
4.1.4.	Caractérisation de la structure des électrodes d'or poreuses	167
4.2.	Modification de la fibre d'or et optimisation dans le tampon	169
4.2.1.	Tests préliminaires	169
4.2.2.	Effet du traitement plasma	170
4.2.3.	Optimisation du temps d'imbibition de solution enzymatique dans les pores.	170
4.2.4.	Augmentation de la proportion d'agent réticulant dans l'hydrogel	171

4.2.5.	Fonctionnalisation des fibres d'or poreuses avec une SAM de cystéamine.....	173
4.2.6.	Effet de l'état d'oxydation/réduction de l'or sur la fixation de l'hydrogel	174
4.2.7.	Co-électrodéposition de l'hydrogel sur la fibre d'or poreuse.....	175
4.2.8.	Protection de la cathode par l'utilisation de sacs de dialyse	176
4.3.	Test de l'efficacité de la biocathode dans du sang humain	177
4.4.	Biocompatibilité de la fibre d'or poreuse modifiée <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	180
4.4.1.	La stérilisation de la fibre d'or modifiée	180
4.4.2.	Etude de la cytotoxicité <i>in vitro</i>	181
4.4.2.1.	Principe	181
4.4.2.2.	Résultats.....	183
4.4.3.	Etude de la réponse inflammatoire <i>in vitro</i>	185
4.4.3.1.	Activation du complément.....	185
4.4.3.1.1.	Principe	185
4.4.3.1.2.	Résultats.....	186
4.4.3.2.	Activation plaquettaire	187
4.4.3.2.1.	Principe	187
4.4.3.2.2.	Résultats.....	188
4.4.3.3.	La réaction inflammatoire à un corps étranger	189
4.4.3.3.1.	Principe	189
4.4.3.3.2.	Résultats.....	190
4.4.4.	Etude <i>in vivo</i> : implantation de la fibre modifiée dans des souris.....	191
4.4.4.1.	Protocole d'implantation	191
4.4.4.2.	Application du protocole d'implantation à notre cathode	192
4.4.4.3.	Sacrifice des souris	193
4.4.4.4.	Mesures électrochimiques après implantation.....	194
4.4.4.4.1.	Surface active et structure de la fibre d'or poreuse.....	194
4.4.4.4.2.	Activité catalytique	194

4.4.4.3.	Coupes histologiques de la zone d'implantation	195
4.5.	Conclusion intermédiaire.....	196
5.	Conclusion.....	197
6.	Références bibliographiques	199

Chapitre III : la biopile enzymatique à glucose/oxygène

1.	Introduction	207
2.	Mise au point de l'anode	208
2.1.	Anode à base de glucose déshydrogénase (GDH).....	208
2.1.1.	Caractérisation de la GDH en solution.....	208
2.1.2.	Mesures électrochimiques de la GDH.....	209
2.1.2.1.	Conditions de séchage	209
2.1.2.2.	Composition de l'hydrogel	210
2.2.	Anode à base de glucose oxydase (GOx)	211
2.3.	Calibration de la GOx et la GDH dans le glucose	212
2.3.1.	Géométrie de l'électrode et diffusion.....	212
2.3.2.	Effet de la géométrie de l'électrode sur la calibration dans le glucose pour les hydrogels à base de GDH et de GOx	213
2.4.	Conclusion intermédiaire.....	215
3.	Optimisation de biopiles dans le tampon	216
3.1.	Optimisation du taux de recouvrement sur fibres de carbone	216
3.2.	La biopile à base de GDH et BOD de <i>Magnaporthe oryzae</i>	217
3.2.1.	Effet du tampon de mesure.....	217
3.2.1.1.	Sur la catalyse	217
3.2.1.2.	Sur la puissance	218
3.2.1.3.	Sur la stabilité	219

3.2.2.	Calibration dans le glucose	220
3.2.3.	Utilisation de membranes protectrices	221
3.2.3.1.	Description des différents types de membranes	221
3.2.3.2.	Comparaison de l'effet des 3 types de membranes	222
3.2.4.	Augmentation de la réticulation	223
3.2.5.	Influence du polymère rédox.....	224
3.3.	Les autres biopiles	225
3.3.1.	Catalyse des différentes anodes et cathodes.....	225
3.3.2.	Puissance	226
3.3.3.	Stabilité.....	228
3.3.4.	Conclusion sur les différentes biopiles.....	228
3.3.5.	La question du H ₂ O ₂	229
3.4.	Conclusion intermédiaire.....	230
4.	La biopile dans le sang	231
4.1.	Caractérisation des échantillons de sang	231
4.1.1.	Les différentes cellules du sang.....	231
4.1.2.	Préparation des produits sanguins labiles.....	232
4.1.3.	Molécules particulières entrant dans la composition du sang	237
4.1.3.1.	Molécules d'intérêt	237
4.1.3.2.	Interférents notoires	237
4.1.4.	Paramètres physiologiques du sang.....	238
4.2.	Mesures préliminaires.....	238
4.2.1.	Protocole d'expérimentation dans le sang.....	238
4.2.2.	L'oxygénation du sang	239
4.2.3.	Catalyses et courbe de puissance typiques	240
4.3.	Utilisation de membranes protectrices	242

4.4.	La biopile GDH/BOD de <i>Magnaporthe oryzae</i> dans plusieurs échantillons de sang ...	243
4.4.1.	Mesures préliminaires dans le sang.....	244
4.4.2.	Optimisation de la cathode.....	244
4.4.3.	Mesures dans le sang : dosage de la glycémie	246
4.5.	Stabilité de la biopile dans le sang : effet de l'utilisation de sacs de dialyse	247
4.5.1.	Sur 6h de fonctionnement continu	247
4.5.2.	Sur les signaux des polymères rédox	248
4.5.3.	Sur le courant	249
4.5.4.	Sur la puissance.....	251
4.5.5.	Réflexion sur le caractère inhibiteur du sang.....	252
4.5.6.	Effet de la consommation en glucose et en oxygène de la biopile.....	254
4.6.	Comparaison des différentes biopiles dans le sang	255
4.7.	Conclusion intermédiaire.....	257
5.	Conclusion.....	259
6.	Références bibliographiques	261

<u>Conclusion générale</u>	265
---	-----

Matériels et méthodes

1.	Matériels.....	276
1.1.	Produits chimiques	276
1.2.	Les enzymes	276
1.3.	Les polymères rédox.....	277
2.	Méthodes expérimentales.....	277

2.1.	Tests d'activité en solution avec l'ABTS	277
2.2.	Mesures électrochimiques	278
2.3.	Modification des électrodes de carbone vitreux avec un hydrogel rédox	278
2.4.	Préparation et caractérisation des nanofleurs de BOD de <i>Bacillus pumilus</i>	279
2.4.1.	Protocole de préparation des nanofleurs	279
2.4.2.	Spectre d'absorbance.....	280
2.4.3.	La microscopie à balayage	280
2.4.4.	Calcul du taux d'encapsulation	280
2.4.5.	Mesure de l'activité en solution	280
2.5.	Synthèse et caractérisation des polymères rédox cathodiques	281
2.5.1.	Protocole de synthèse	281
2.5.1.1.	Synthèse des copolymères	281
2.5.1.2.	Synthèse des complexes Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine) ₂ Cl ₂	282
2.5.1.3.	Couplage du copolymère et des complexes d'osmium	282
2.5.2.	Caractérisation.....	283
2.5.2.1.	Spectroscopie infrarouge	283
2.5.2.2.	Spectrométrie de masse à temps de vol (TOF-MS).....	283
2.5.2.3.	Electrochimie pour vérifier le potentiel rédox du médiateur.....	283
2.5.2.4.	Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion multi-angle de la lumière	283
2.5.2.5.	Analyse élémentaire	284
2.5.2.6.	Spectroscopie UV-visible	284
2.6.	Préparation et modification des fibres d'or macroporeuses	284
2.7.	Tests de biocompatibilité des fibres d'or macroporeuses modifiées.....	285
2.7.1.	Stérilisation des fibre d'or poreuses	285
2.7.2.	Modification des fibres d'or poreuses en conditions stériles	285
2.7.3.	Mesures <i>in vitro</i>	286

2.7.4.	Mesures <i>in vivo</i>	286
2.8.	Préparation des fibres de carbone et des biopiles	286
2.9.	Utilisation de membranes protectrices	287
2.10.	Mesures dans le sang	287
2.10.1.	Les échantillons de sang	287
2.10.2.	Précautions d'utilisation	288
2.10.3.	Mesure de la glycémie	288
2.10.4.	Electrochimie dans le sang	288
3.	Références bibliographiques	289
	<u>Liste des publications et conférences</u>	291

INTRODUCTION GENERALE

Tout a commencé au 18^{ème} siècle avec la révolution industrielle : depuis la première extraction de charbon jusqu'à l'utilisation massive de pétrole de ces dernières décennies, les besoins en énergie des populations n'ont fait qu'augmenter. Au rythme de consommation actuel on estime que d'ici 200 ans l'humanité aura épuisé l'ensemble des réserves en combustible fossile accumulé en plusieurs centaines de millions d'années [1].

Face aux besoins futurs, il existe depuis quelques années une prise de conscience générale de l'épuisement inéluctable de ces ressources non renouvelables et des conséquences dramatiques de leur extraction sur l'environnement. Ceci a ouvert la voie à de nouvelles énergies, plus respectueuses de l'environnement et surtout renouvelables. Parmi les plus connues nous pourrions citer les énergies solaire (cellules photovoltaïques) et éolienne, l'hydroélectricité ou encore la géothermie (issue de la chaleur des sols) [2, 3].

Une autre solution possible réside dans l'utilisation de biocatalyseurs capables de produire de l'énergie électrique à partir de l'énergie chimique grâce à la biomasse, qui constitue d'ailleurs la deuxième source d'énergie renouvelable en France derrière l'énergie hydraulique. Ces biocatalyseurs peuvent être des enzymes ou bien des micro-organismes tels que les bactéries. En fonction du type de biocatalyseur utilisé on distingue donc deux grandes classes de cellules à biocarburant ou biopiles : les cellules microbiennes et les cellules enzymatiques [4-8], le travail présenté ici se concentrant sur ces dernières.

L'électrocatalyse assurée par les enzymes fixées sur des électrodes est décrite dans les publications depuis les années 70, tout d'abord de manière fondamentale sur le plan du transfert d'électron ou du mécanisme catalytique [9]. Ce n'est que récemment qu'est apparue la notion d'enzyme comme catalyseur dans des cellules à biocarburant. L'intérêt principal de ces biopiles réside dans leur miniaturisation. Le fait d'utiliser des enzymes comme catalyseur permet de descendre jusqu'à 0,1 mm² soit environ 100 fois plus petit que pour les traditionnelles piles à combustible à base de métaux [5, 10-12]. Cette caractéristique fait des biopiles les candidates idéales pour l'alimentation de petits appareils, notamment dans le domaine de la biomédecine [10, 13-16] . Les nombreuses avancées technologiques dans ce domaine ont conduit au développement d'une nouvelle génération de capteurs, destinés à être implantés chez les patients en vue d'un contrôle continu et autonome des paramètres physiologiques.

Nous nous intéresserons plus particulièrement au contrôle de la glycémie chez les patients diabétiques. Cette pathologie touche actuellement près de 370 millions de personnes dans le monde et vient d'ailleurs d'être classée au rang de pandémie mondiale [17, 18] . Il y a

donc un réel besoin pour améliorer son suivi afin d'en limiter les complications pouvant aller du simple malaise jusqu'à la mort du patient.

L'objectif désormais est de concevoir une biopile suffisamment puissante et stable pour alimenter un capteur à glucose miniature qui serait implanté directement en sous cutané chez le patient. En vue de cette application nous nous sommes focalisés sur les biopiles à glucose/oxygène, leur avantage majeur étant que ces 2 substrats sont présents naturellement dans le corps humain, ce qui permettrait un fonctionnement autonome de l'appareil. En outre, la disponibilité en glucose conditionnera la puissance de la biopile ce qui permettra d'utiliser cette biopile directement comme capteur de glycémie.

La première biopile à glucose/O₂ a été mise au point par Yahiro et son équipe [19] dans le but de créer une source d'énergie basée sur l'utilisation de composés présents dans la majorité des organes du corps humain pour alimenter un cœur artificiel. Cependant, la puissance générée était trop faible et le système n'était pas stable.

Dans les années 70, les systèmes ont été améliorés : leur puissance a augmenté mais leur faible stabilité ne permettait toujours pas leur utilisation. Ce n'est qu'en 2001 qu'Heller a montré qu'en optimisant les composants du système, on pourrait obtenir une biopile utilisable [20]. Dès lors, des biopiles de plus en plus efficaces ont vu le jour, fonctionnant avec toutes sortes de biocarburants, d'enzymes ou encore de matériaux.

Deux problématiques se sont alors imposées à nous : tout d'abord, malgré les constantes améliorations apportées, la cathode reste limitante dans la majorité des biopiles existantes. Ensuite, très peu d'études ont été menées en conditions réellement physiologiques (implantation dans l'animal ou tests dans des liquides biologiques humains tels que le sang) afin de valider l'efficacité de ces systèmes. Les recherches menées lors de cette thèse se sont donc articulées autour de ces 2 problématiques.

Le premier chapitre de ce manuscrit sera consacré à une présentation générale des biopiles à glucose/oxygène en partant du système complet puis en détaillant chacun des éléments qui le composent. Une attention particulière sera également portée sur l'hydrogel rédox et le transfert électronique qui y a lieu.

Dans le deuxième chapitre nous nous focaliserons sur la cathode enzymatique et les moyens qui ont été mis en œuvre afin d'en améliorer les performances. Nous aborderons notamment les optimisations apportées au niveau enzymatique ainsi qu'au niveau des médiateurs d'électrons qui ont constitué un important travail de synthèse et de caractérisation. Nous aborderons également la biocompatibilité de notre cathode grâce à des tests de

cytotoxicité et de réaction inflammatoire menés en culture cellulaire. Ceci nous conduira à tester l'efficacité de la cathode directement dans du sang humain.

Enfin, dans le dernier chapitre nous nous intéresserons à la biopile enzymatique dans son ensemble. Après avoir brièvement évoqué l'optimisation de l'anode nous passerons à l'étude de la biopile en termes d'efficacité et de stabilité. Après des premiers tests dans du tampon, les caractérisations seront effectuées dans du sang humain, donnant alors des performances jamais atteintes jusqu'à présent.

Références bibliographiques

1. Houtart, F., *Les crises énergétique et climatique*. <http://www.cetri.be>, 2008.
2. Observ'ER, *Les 5 familles énergies renouvelables*. <http://www.energies-renouvelables.org>, 2007.
3. Ministère-de-l'Ecologie-du-Développement-Durable-et-de-l'Energie, *Politique de développement des énergies renouvelables en France*. <http://www.developpement-durable.gouv.fr>, 2014.
4. Katz, E., A.N. Shipway, and I. Willner, *Biochemical fuel cells*. Handbook of Fuel Cells Fundamentals, Technology and Applications; Vielstich, W., Gasteiger, H. A., Lamm, A., Eds. John Wiley and Sons, Ltd.: London, 2003. **1**.
5. Shukla, A.K., et al., *Biological fuel cells and their applications*. Current science, 2004. **87**: p. 455-468.
6. Bullen, R.A., et al., *Biofuel cells and their development*. Biosensors & Bioelectronics, 2006. **21**: p. 2015-2045.
7. Davis, F. and S.P.J. Higson, *Biofuel cells - Recent advances and applications*. Biosensors & Bioelectronics, 2007. **22**(7): p. 1224-1235.
8. Tayhas, G., R. Palmore, and G.M. Whitesides, *Microbial and Enzymatic Biofuel Cells*. Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, American Chemical Society Symp. Ser., 1994. **566**(Chapter 14): p. 271-290.
9. Cracknell, J.A., K. Vincent, A. , and F.A. Armstrong, *Enzymes as Working or Inspirational Electrocatalysts for Fuel Cells and Electrolysis*. Chemical Reviews, 2008. **108**: p. 2439-2461.
10. Barton, S.C., J. Gallaway, and P. Atanassov, *Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices*. Chemical Reviews, 2004. **104**(10): p. 4867-4886.
11. Heller, A., *Miniature biofuel cells*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2004. **6**: p. 209-216.
12. Osman, M.H., A.A. Shah, and F.C. Walsh, *Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: enzymatic cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2011. **26**: p. 6.
13. Heller, A., *Integrated Medical Feedback Systems for Drug Delivery*. Bioengineering, Food and Natural Products, 2005. **51**(4): p. 1054-1066.
14. Wang, J., *Electrochemical Glucose Biosensors*. Chemical Reviews, 2008. **108**: p. 814-825.
15. Miyake, T., et al., *Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms*. Energy & Environmental Science, 2011. **4**(12): p. 5008-5012.
16. Falk, M., et al., *Biofuel Cells for Biomedical Applications: Colonizing the Animal Kingdom*. ChemPhysChem, 2013. **14**: p. 2045-2058.
17. WorldHealthOrganization, *Global status report on noncommunicable diseases* http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf?ua=1, 2014.
18. WorldHealthOrganization, *Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012*. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html, 2014.
19. Yahiro, A.T., S.M. Lee, and D.O. Kimble, *Bioelectrochemistry, I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies*. Biochimica et Biophysica Acta, 1964. **88**(2): p. 375-383.
20. Chen, T., et al., *A Miniature Biofuel Cell*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(35): p. 8630-8631.

CHAPITRE I :

DE LA BIOPILE A L'ELECTRODE

Sommaire

1. Introduction	9
2. Les piles à combustible	10
2.1. Principe	10
2.2. Caractérisation d'une pile à combustible	11
2.3. Avantages et limitations	16
2.4. Conclusion intermédiaire	17
3. Les biopiles	18
3.1. Généralités	18
3.2. Les biopiles microbiennes	19
3.2.1. Principe	19
3.2.2. Applications des biopiles microbiennes	22
3.2.3. Limitations des biopiles microbiennes	24
3.3. Les biopiles enzymatiques	25
3.3.1. Introduction	25
3.3.2. Caractéristiques des biopiles enzymatiques : avantages et limitations	25
3.3.3. Les principaux types de biopiles enzymatiques	26
3.3.4. Les différentes biopiles enzymatiques rapportées dans la littérature	27
3.3.5. La biopile enzymatique à glucose/oxygène	32
3.3.5.1. Historique	32
3.3.5.2. Description	32
3.3.6. Utilisation des biopiles enzymatiques	34
3.3.6.1. Les biopiles comme source d'alimentation de biocapteurs	34
3.3.6.2. Les biopiles et le contrôle du diabète	36
3.4. Utilisation des biopiles en milieu biologique : mesures <i>in vivo</i>	41
3.4.1. Chez le végétal	42

3.4.2.	Chez l'animal	43
3.4.3.	Chez l'homme	45
3.5.	Conclusion intermédiaire.....	46
4.	Anodes et cathodes enzymatiques.....	46
4.1.	Les matériaux d'électrode	46
4.1.1.	Electrodes métalliques.....	47
4.1.1.1.	Généralités	47
4.1.1.2.	Electrodes d'or.....	48
4.1.1.3.	Electrodes de platine.....	49
4.1.2.	Electrodes carbonées	49
4.1.2.1.	Nanotubes de carbone.....	49
4.1.2.2.	Carbone poreux.....	51
4.1.2.3.	Matériaux composites à base de carbone	51
4.1.3.	Matériaux polymériques.....	52
4.1.3.1.	Les polymères conducteurs	52
4.1.3.2.	Les polymères fonctionnalisés.....	53
4.1.4.	Matériaux sol-gel.....	54
4.2.	Les enzymes rédox	55
4.2.1.	Généralités.....	55
4.2.2.	La cinétique enzymatique.....	56
4.2.3.	Avantages et limitations des enzymes.....	58
4.2.4.	Choix des enzymes pour les biopiles	58
4.2.5.	Enzymes cathodiques	59
4.2.5.1.	Généralités	59
4.2.5.2.	Les laccases	62
4.2.5.3.	Les bilirubine oxydases	62
4.2.5.4.	Autres enzymes cathodiques	63
4.2.6.	Enzymes anodiques	64

4.2.6.1.	Les glucose déshydrogénases	64
4.2.6.2.	Les glucose oxydases.....	66
4.2.6.3.	Les cellobiose déshydrogénases	68
4.2.6.4.	Les pyranose oxydases et déshydrogénases	69
4.2.6.5.	Autres enzymes anodiques	69
4.3.	Le transfert électronique	70
4.3.1.	Problématique.....	70
4.3.2.	Théorie de Marcus.....	71
4.3.3.	Comparaison des transferts électroniques direct et médié	72
4.3.4.	Les médiateurs rédox	74
4.3.4.1.	Généralités	74
4.3.4.2.	Les différents médiateurs rédox	74
4.3.4.3.	Médiateurs en solution ou immobilisés	75
4.4.	Les méthodes d'immobilisation des enzymes	76
4.4.1.	L'adsorption physique.....	77
4.4.2.	La reconstitution de l'apoenzyme	77
4.4.3.	L'encapsulation	78
4.4.4.	Le greffage covalent.....	79
4.4.5.	La réticulation	80
4.4.6.	L'hydrogel rédox.....	80
4.4.6.1.	Principe et intérêt de l'hydrogel rédox	81
4.4.6.2.	Les constituants de l'hydrogel rédox.....	82
4.4.6.3.	Le mécanisme du transfert électronique dans l'hydrogel rédox.....	83
4.5.	Conclusion intermédiaire.....	85
5.	Conclusion.....	86
6.	Références bibliographiques	87

1. Introduction

Au regard de la crise énergétique actuelle, il est indispensable de se tourner vers de nouvelles sources d'énergie, renouvelables et non ou peu polluantes. Dans ce but, les scientifiques ont eu l'idée de recourir à des organismes vivants pour produire de l'électricité et ont donc créé les biopiles.

Le principe est le même que pour une pile à combustible traditionnelle excepté que les habituels catalyseurs à base de métaux nobles sont remplacés par des enzymes ou des microorganismes et que les carburants d'origine naturelle comme le glucose ou l'amidon remplacent le dihydrogène dont la production à base d'hydrocarbures est très polluante et énergivore. Ainsi, par l'utilisation de biocarburants et de biocatalyseurs la biopile devient un système complètement naturel, économique et reproductible en grande quantité.

Les champs d'applications potentiels des biopiles sont très variés :

- lorsque les catalyseurs sont des microorganismes, la biopile pourra être utilisée pour des applications de grande échelle comme l'assainissement de l'eau ;
- grâce aux catalyseurs enzymatiques, sélectifs et biocompatibles, la miniaturisation à l'échelle du millimètre devient possible, ouvrant de nombreuses opportunités pour l'alimentation de petits appareils implantables de faible puissance tels que les biocapteurs.

Dans ce chapitre et donc dans ce manuscrit nous nous intéresserons plus particulièrement à ce deuxième cas. L'idée est de mettre au point une biopile enzymatique stable, efficace et qui utilise les substances naturellement présentes dans les fluides biologiques humains comme substrats afin de fonctionner de façon continue et autonome. Ainsi nous concentrerons notre attention sur les biopiles à glucose/O₂ : largement décrites dans la littérature elles constituent les candidates idéales pour ce type d'applications, certaines ayant même fait l'objet de mesures *in vivo* aussi bien dans les plantes que dans les invertébrés et les mammifères.

Dans ce chapitre nous ferons tout d'abord un rappel sur les piles à combustible avant de décrire plus en détail les biopiles. Nous aborderons leur gamme d'applications possibles en insistant sur les exemples d'implantation qui ont été rapportés dans la littérature, puis nous présenterons l'ensemble des éléments qui les constituent, à savoir les matériaux des électrodes, les enzymes, les médiateurs rédox ainsi que les différentes techniques d'immobilisation de ces 2 derniers à la surface des électrodes.

2. Les piles à combustible

2.1. Principe

Les piles à combustible, ou cellules à carburant ont vu le jour en 1839 grâce aux travaux parallèles de Christian Schönbein [1] et William R. Grove [2], le premier ayant découvert l'électrolyse de l'eau et le second ayant conçu la première pile à hydrogène. Il faudra attendre près d'un siècle pour qu'elles se développent à grande échelle avec la mise en place d'un premier prototype industriel par Francis T. Bacon [3].

D'une manière générale, une pile à combustible est constituée de 2 compartiments séparés par un électrolyte. Au niveau de l'anode, le combustible réducteur va être oxydé et donc conduire à la production d'électrons. Ces électrons vont être transportés à la cathode vers un accepteur d'électrons ou oxydant de haut potentiel comme l'oxygène qui va être réduit : les réactions d'oxydation/réduction décrites vont donc générer un mouvement d'électrons de l'anode vers la cathode à travers un circuit électrique externe via une résistance. Ce flux d'électrons est compensé par un flux de cations, le plus souvent des protons (ce peut également être des cations de métaux alcalins tels que Li^+ ou Na^+). Ces ions positifs circulent à travers l'électrolyte qui fait également barrage aux électrons, les obligeant ainsi à passer par le circuit extérieur de la pile [4, 5]. La plus simple des piles à combustible est la pile à hydrogène qui produit de l'électricité et de la vapeur d'eau à partir de dihydrogène à l'anode et de dioxygène à la cathode (figure I.2.1). Ce processus entraîne également l'émission de chaleur.

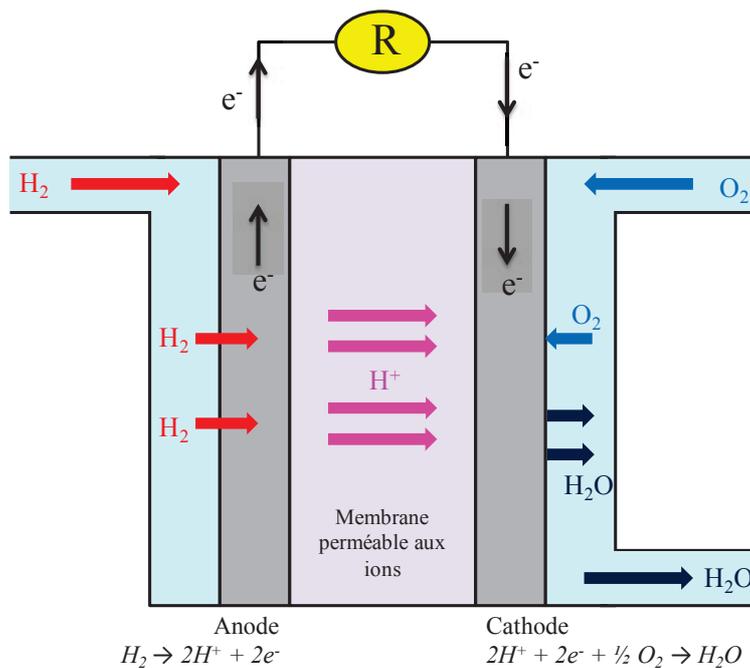


Figure I.2.1 : Schéma d'une pile à combustible H_2/O_2 .

Les piles à combustible se différencient principalement par la nature de leur électrolyte. Soit il est acide et va donc conduire les ions positifs (H^+) de l'anode à la cathode, soit il est basique et transportera alors les ions négatifs (OH^- , O^{2-} , CO_3^{2-}) dans le sens opposé.

Selon ce critère, il existe 5 types de piles à combustible : 2 avec un électrolyte acide et 3 avec un électrolyte basique, détaillées ci-après (tableau I.2.1). Les molécules en gras correspondent aux ions qui traversent sélectivement l'électrolyte [6-8].

Type	Electrolyte	Température	Réactions anode et cathode	Utilisation et puissance
PEMFC proton exchange membrane fuel cell	Membrane de polymère perfluoré solide	60 – 90°C	$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$ $\frac{1}{2} O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	Portable, transport, fixe 100mW – 1MW
PAFC phosphoric acid fuel cell	Matrice poreuse de carbure de silice renfermant de l'acide phosphorique liquide	150 – 220°C	$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$ $\frac{1}{2} O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	Fixe 200kW – 10MW
AFC alkaline fuel cell	Matrice poreuse saturée en hydroxyde de sodium (KOH) liquide	60 – 90°C	$H_2 + 2OH^- \rightarrow 2H_2O + 2e^-$ $\frac{1}{2} O_2 + H_2O + 2e^- \rightarrow 2OH^-$	Espace, transport 1 – 100kW
MCFC molten carbonate fuel cell	Carbonates de lithium et de potassium fondus (Li_2CO_3/K_2CO_3)	600 – 660°C	$H_2 + CO_3^{2-} \rightarrow H_2O + CO_2 + 2e^-$ $\frac{1}{2} O_2 + CO_2 + 2e^- \rightarrow CO_3^{2-}$	Fixe 500kW – 10MW cogénération*
SOFC solid oxide fuel cell	Électrolyte solide en zircon dopé aux terres rares (ZrO_2/Y_2O_3)	650 – 1000°C	$H_2 + O^{2-} \rightarrow H_2O + 2e^-$ $\frac{1}{2} O_2 + 2e^- \rightarrow O^{2-}$	Fixe, transport 1kW – 10MW cogénération*

* La cogénération consiste en la production simultanée de 2 formes d'énergies différentes au sein du même système et à partir des mêmes réactifs. Par exemple la chaleur produite par une pile à combustible en fonctionnement est utilisée pour elle-même produire de l'électricité.

Tableau I.2.1 : Caractéristiques des différents types de piles à combustible.

2.2. Caractérisation d'une pile à combustible

Les performances d'une pile à combustible peuvent être caractérisées par plusieurs techniques telles que la coulométrie, l'impédance ou encore la voltampérométrie. Cette dernière permet d'enregistrer le courant généré pour une gamme de potentiel définie, et ce à faible vitesse de balayage afin de se placer à l'état quasi-stationnaire. Nous utiliserons plus spécifiquement la technique de voltampérométrie cyclique qui consiste à cycler le potentiel d'une électrode dans une gamme définie et à en mesurer le courant résultant [9-11].

Dans ce but nous nous plaçons dans la configuration d'un montage à trois électrodes (figure I.2.2). Ce système est composé au centre d'une électrode de travail, au niveau de laquelle vont se produire les réactions d'oxydoréduction. A cela vont se rajouter une électrode de référence et une contre électrode ou électrode auxiliaire (respectivement à gauche et à droite de l'électrode de travail sur le schéma). L'électrode de référence possède un potentiel connu et constant ; il s'agit généralement d'une électrode au calomel saturée (Hg/Hg_2Cl) ou d'une électrode au chlorure d'argent saturée ($Ag/AgCl$). Elle a ainsi pour but de contrôler le

potentiel de l'électrode de travail. La contre électrode est le plus souvent en platine et permet d'assurer la mesure du courant électrique débité à l'électrode de travail.

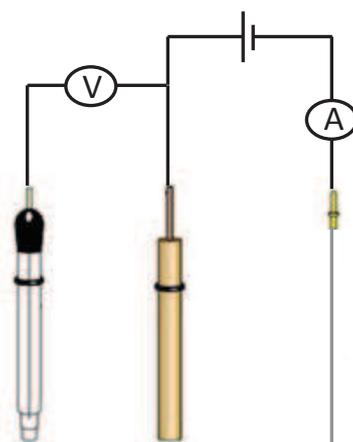


Figure I.2.2 : Montage à 3 électrodes.

L'ensemble du dispositif est plongé dans une solution électrolytique de manière à assurer le transport des espèces réactives et des ions. Il est de plus possible d'appliquer une rotation à l'électrode de travail ou une agitation dans la solution afin de permettre la bonne convection des différentes espèces jusqu'à sa surface, notamment au niveau de sa couche de diffusion.

Au cours d'une expérience de voltammétrie cyclique un potentiel (E) est appliqué à l'électrode de travail et varié au cours du temps dans une gamme délimitée par un potentiel de début E_1 et un potentiel de fin E_2 , définie par l'expérimentateur. Si le balayage est effectué dans le sens des potentiels croissants il s'agira d'une réaction d'oxydation, alors que dans le sens des potentiels décroissants ce sera une réduction. A titre d'exemple nous nous plaçons dans cette deuxième situation : une première mesure est effectuée de E_1 à E_2 puis une deuxième de E_2 à E_1 , décrivant un cycle. Ceci donne une courbe $E = f(t)$ à l'aspect de triangle comme nous pouvons l'observer sur la figure I.2.3.A. Il est possible de réaliser autant de cycles que voulu. Un voltamogramme cyclique est donc obtenu en mesurant le courant à l'électrode de travail pendant le balayage des potentiels, donnant une courbe $I = f(E)$ (figure I.2.3.B). L'allure de cette courbe est très dépendante de la vitesse de balayage, autrement dit du temps nécessaire pour effectuer le balayage des potentiels.

En partant du potentiel E_1 , un balayage est effectué jusqu'au potentiel E_2 donc dans le sens des potentiels décroissants, c'est-à-dire en réduction. Lorsque le potentiel est suffisant pour réduire l'espèce active présente nous obtenons un courant cathodique témoin de la réaction de réduction électrochimique au niveau de l'électrode. Ce courant croît rapidement

jusqu'à ce que la concentration en espèces oxydées à la surface de l'électrode et dans la solution diminue, ce qui se traduit par une diminution du courant cathodique. Un balayage inverse ou retour est ensuite effectué de E_2 vers E_1 , donc dans le sens de l'oxydation. On observe donc un courant anodique qui augmente dans un premier temps suite à l'oxydation des espèces réduites précédemment puis qui diminue en raison de l'appauvrissement de ces espèces dans la solution. Nous arrivons alors au point de départ, configuration dans laquelle toutes les espèces réactives sont sous forme oxydée et peuvent donc participer à un nouveau cycle d'oxydoréduction.

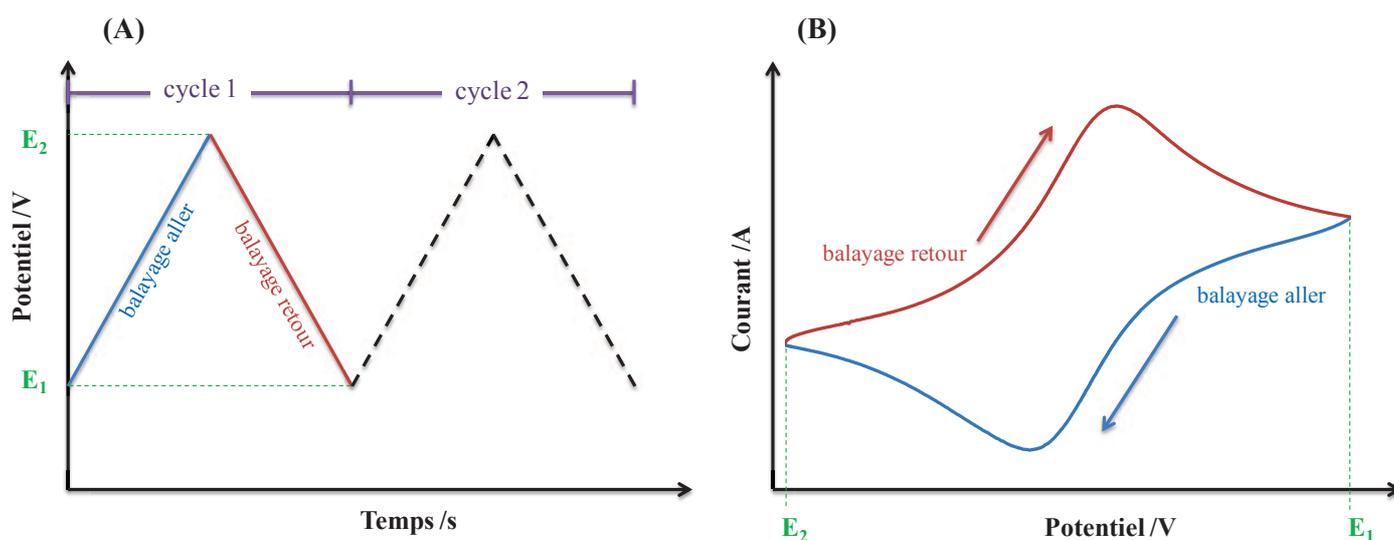


Figure I.2.3 : Courbes de voltammétrie cyclique (A) $E = f(t)$ et (B) $I = f(E)$.

Le courant obtenu et donc la vitesse de la réaction à l'électrode est proportionnelle au flux interfacial des espèces réactives et donc au transport de masse. L'application d'une convection au niveau de l'électrode permet de s'affranchir des limitations dues à une faible diffusion des espèces à la surface de l'électrode.

Lorsque la concentration en espèces oxydées est suffisante dans le milieu réactionnel le voltammogramme est alors caractérisé par un plateau au niveau du courant de réduction et non plus un pic (figure I.2.4.). Le large excès de substrat par rapport au catalyseur implique que l'ensemble des espèces oxydées présentes ne peuvent être réduites ; il n'y a donc pas de diminution du courant cathodique car la réaction est toujours alimentée. Ceci est uniquement visible si une convection suffisante est assurée dans la solution afin de permettre un apport maximal et constant de substrat au niveau de l'électrode. En l'absence de limitations dues à la diffusion des espèces ce plateau est directement lié à la cinétique du catalyseur utilisé, c'est-à-dire qu'il va être dépendant de la vitesse de réaction.

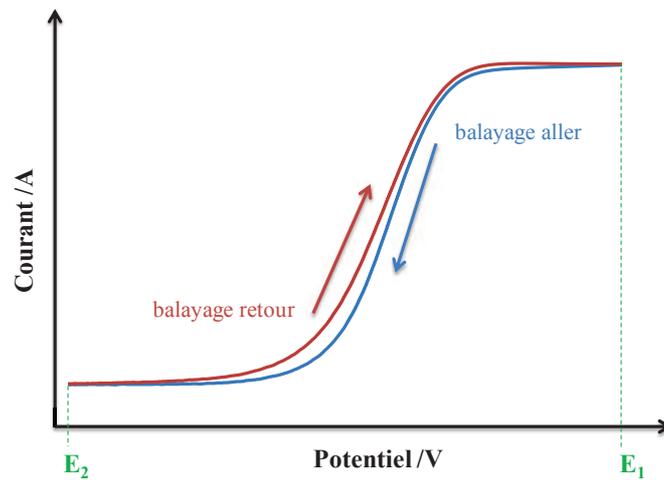


Figure I.2.4 : Courbe de voltammétrie cyclique $I = f(E)$ en présence de substrat.

Dans la configuration d'une pile une anode et une cathode sont couplées permettant la génération d'électricité (figure I.2.5). Le potentiel en circuit ouvert (OCP) correspond à la différence comprise entre les potentiels de début d'oxydation et de réduction. Il s'agit du potentiel de la pile lorsque celle-ci ne débite pas c'est-à-dire à courant nul, et c'est donc le potentiel maximal de la pile. Ce potentiel est généralement inférieur au potentiel maximal **théorique** (V_{th}) donné par la différence stricte des potentiels anodiques et cathodiques. La différence entre V_{th} et l'OCP est notamment expliquée par la présence possible de réactions parasites.

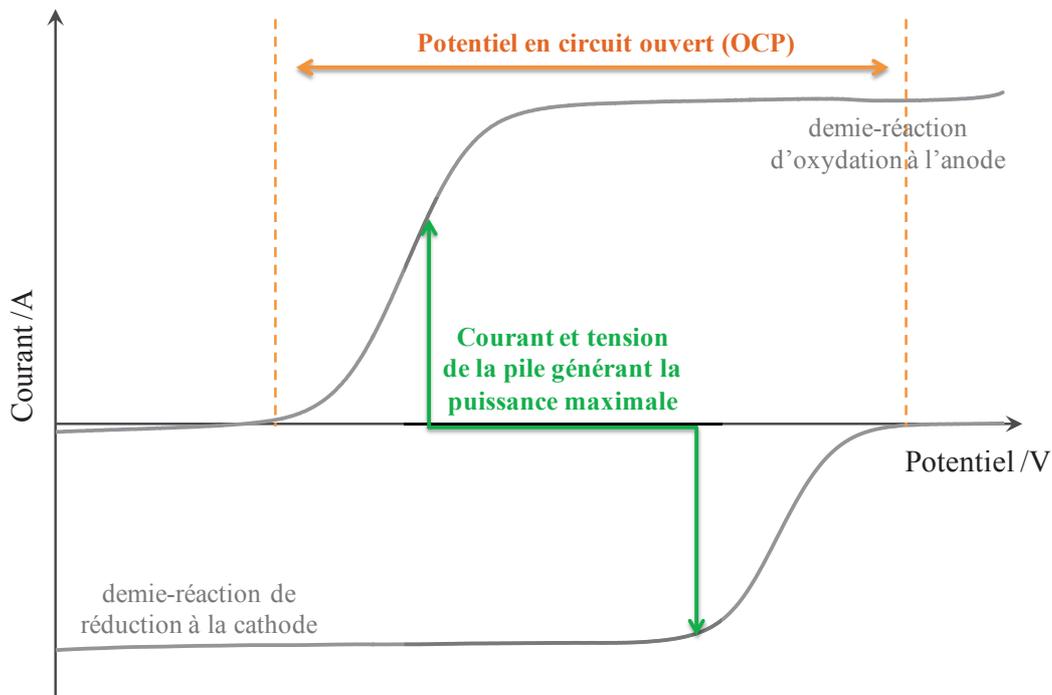


Figure I.2.5 : Courbes de polarisation typiques d'une anode et d'une cathode.

Les performances de la pile seront déterminées par l'électrode limitante, soit la cathode dans l'exemple ci-avant (figure I.2.5). La catalyse limitante donne un courant limitant et donc maximal qu'il faut reporter sur la seconde catalyse. A chacun de ces courants correspond un potentiel et c'est la différence entre ces 2 potentiels qui donne la tension maximale de fonctionnement de la pile [12-14].

Les performances d'une pile sont ainsi caractérisées grâce à ces 3 paramètres : la puissance extractible de la cellule (P), le voltage ou tension entre les deux électrodes (V) et le courant électrique dû au mouvement des électrons (I).

Ces trois grandeurs sont reliées de la manière suivante :

$$P = V * I \quad \text{(Equation I.2.1)}$$

La tension dépend de la différence de potentiel entre l'anode (E_a) et la cathode (E_c) et des pertes irréversibles de voltage (η) du fait des limitations cinétiques du transfert d'électrons, des résistances ohmiques et des gradients de concentration :

$$V = E_a - E_c - \eta \quad \text{(Equation I.2.2)}$$

Les pertes de voltage peuvent être de plusieurs natures (figure I.2.6). On distingue tout d'abord les pertes d'activation qui dominent à faible courant. Elles découlent de la barrière énergétique du transfert de charge entre le catalyseur et l'électrode et sont donc applicables aux deux électrodes. Elles peuvent être réduites en améliorant les réactions catalytiques, en augmentant la surface des électrodes et en optimisant les conditions opératoires telles que le pH et la température.

Viennent ensuite les pertes ohmiques : elles sont dues à la résistance opposée au transfert de charge au sein des différents composants de la pile. Pour limiter ces pertes, la membrane doit posséder une faible résistance, la connexion entre chacun des composants doit être maximale et l'espacement entre les électrodes doit être optimisé. On peut également jouer sur la conductivité de la solution d'électrolyte à condition que cela n'affecte pas le fonctionnement des catalyseurs.

Enfin, on trouve les pertes de concentration, qui sont causées par la résistance au transport de masse conduisant à la création de gradients de concentration, notamment au voisinage de la surface de l'électrode. Elles ont surtout lieu à fort courant et peuvent être diminuées en assurant une bonne circulation des substrats aux niveaux des électrodes.

Pour finir, à cela viennent s'ajouter les pertes dues aux réactions parasites comme par exemple l'adsorption, à la surface des électrodes, d'espèces présentes en solution.

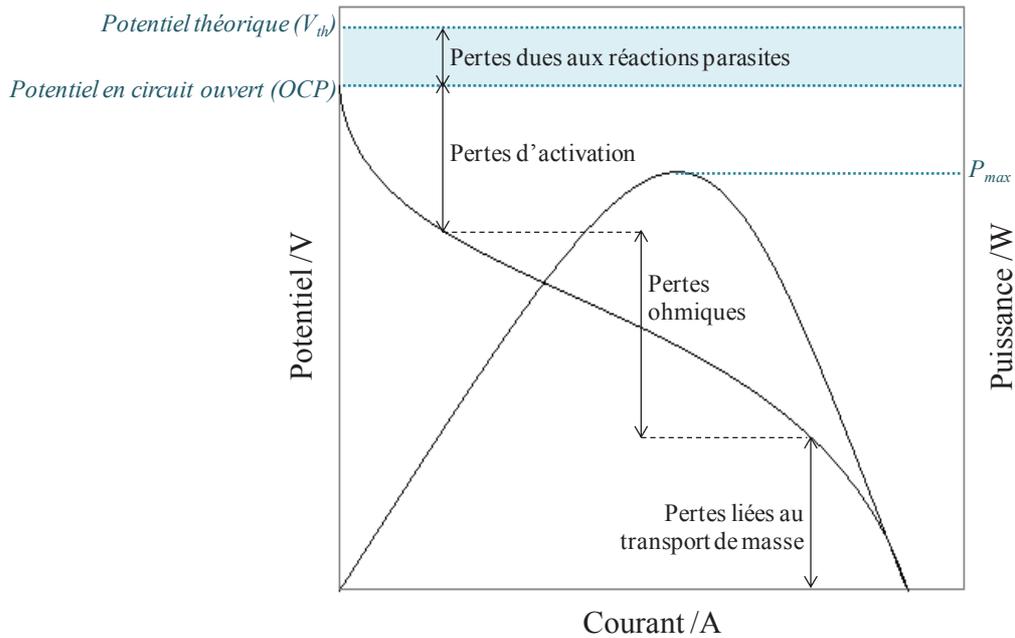


Figure 1.2.6 : Evolution caractéristique du potentiel et de la puissance d'une pile à combustible en fonction du courant.

Le courant de la cellule est contrôlé entre autres par l'activité enzymatique, l'efficacité du transfert électronique, la taille de l'électrode, la perméabilité ionique et les taux de transport à travers la membrane s'il y en a une [15]. Il est donc important d'optimiser tous ces paramètres pour améliorer les capacités de la pile à combustible en termes de courant et de tension.

Pour qu'une pile à combustible soit viable, il faut que son bilan d'énergie total (puissance à la sortie de la cellule moins puissance consommée pour le fonctionnement) soit positif. Le coût énergétique de fonctionnement doit être minimisé au maximum, ce qui est possible en favorisant la diffusion lors des différentes étapes de transfert électronique.

2.3. Avantages et limitations

Les piles à combustible peuvent être utilisées dans de nombreux domaines tels que les transports, les appareils portables ou la production d'électricité fixe par exemple et présentent certains avantages, surtout si nous les comparons avec les hydrocarbures.

Tout d'abord, elles rejettent assez peu de polluants, notamment les piles à hydrogène qui produisent exclusivement de la vapeur d'eau et de la chaleur. A contrario, l'utilisation d'hydrocarbures entraîne la production de composés toxiques dont le dioxyde de soufre (SO_2) à l'origine des pluies acides, les monoxyde et dioxyde de carbone (CO et CO_2) toxiques pour

l'homme et contribuant à l'effet de serre ou encore les oxydes d'azote (NOx) aussi responsables de l'effet de serre.

Ensuite, elles sont très efficaces : en plus d'une puissance très élevée, le rendement de conversion d'énergie électrique en énergie mécanique est 2 fois plus élevé qu'à partir d'énergie thermique ce qui en fait une très bonne alternative aux carburants actuels.

Elles sont également silencieuses car elles n'ont pas de pièces mobiles, contrairement aux moteurs à essence faisant intervenir tout un mécanisme de soupapes et pistons.

Néanmoins, la majorité de ces piles fonctionnent à partir de dihydrogène, qui n'est pas une molécule naturellement disponible à la surface de la terre. 95% de la production de dihydrogène est issue du reformatage d'hydrocarbures qui s'accompagne d'une émission massive de dioxyde de carbone. En plus d'être coûteuse, cette technique est polluante et énergivore ce qui constitue un frein au développement des piles à combustible.

De plus, elles fonctionnent à très haute température (entre 60 et 1000°C), ce qui complique leur utilisation à grande échelle.

Enfin, au-delà de toute considération environnementale, le coût actuel des piles à combustible est très élevé. Les catalyseurs utilisés sont le plus souvent des métaux nobles, rares, chers et toxiques à l'état de déchet. C'est notamment le cas du platine qui est très largement utilisé sur les électrodes pour accélérer les cinétiques d'oxydoréduction. Il faut rajouter à cela le coût non négligeable des électrolytes, comme pour les composants fluorés ou les métaux terre rare incorporés aux membranes [15, 16].

2.4. Conclusion intermédiaire

Les piles à combustible proposent une alternative très intéressante aux actuels combustibles fossiles comme source d'énergie. En plein développement elles font l'objet de constantes améliorations ce qui permet d'atteindre des puissances de l'ordre du mégawatt. Les techniques d'électrochimie utilisées pour leur fonctionnement et leur caractérisation sont maintenant bien décrites dans la littérature et faciles à mettre en oeuvre.

Cependant les enjeux environnementaux et économiques ralentissent l'essor des piles à combustibles présentées précédemment. En réponse à cela nous voyons actuellement se développer les biopiles : basées sur le même principe que les piles à combustible inorganiques, elles utilisent des catalyseurs et des combustibles issus du vivant. Elles sont donc peu coûteuses et écologiques, fonctionnent généralement à des températures moins extrêmes et pourront être largement miniaturisées.

3. Les biopiles

3.1. Généralités

Les piles à biocarburant ou biopiles sont une sous-classe des piles à carburant et qui utilisent soit des bio-carburants soit des bio-catalyseurs soit les deux. Concernant les bio-carburants, ce sont tous les substrats naturels issus du vivant. Les biocatalyseurs qui remplacent les catalyseurs métalliques inorganiques peuvent être des micro-organismes, il s'agit de biopiles microbiennes, ou des enzymes, on parle alors de biopiles enzymatiques [4]. Il existe également des biopiles dites « hybrides » qui combinent enzymes et cellules au sein du même système [17, 18], ainsi que des biopiles à organites qui utilisent des structures cytoplasmiques entières telles que les mitochondries comme catalyseur [19].

On distingue deux catégories principales de biopiles en fonction du mécanisme de catalyse :

- les biopiles primaires ou directes : les biocatalyseurs sont directement impliqués dans les réactions rédox conduisant à la production d'électricité. Il s'agit des systèmes que nous étudierons ci-après [20].
- les biopiles secondaires ou indirectes : le biocatalyseur permet la synthèse de carburants simples comme l'hydrogène ou le méthane à partir de substrats biochimiques plus compliqués tels que les sucres, puis ces carburants simples sont oxydés par des catalyseurs inorganiques à la surface des électrodes pour produire l'électricité. Le problème majeur de ce système réside dans le fait que les biocatalyseurs préfèrent une température ambiante alors que les catalyseurs métalliques opèrent à des températures élevées, les deux sont donc difficiles à coupler dans une même cellule [20].

Les biopiles présentent ainsi plusieurs avantages : leur coût de production est réduit par rapport aux autres types de piles à combustible, elles peuvent fonctionner à température ambiante et pH neutre et peuvent être largement miniaturisées [14-16, 21].

Ces spécificités font des biopiles les candidates de choix pour l'alimentation d'appareils miniatures tels que des capteurs médicaux implantables ou la génération d'électricité statique. La première application utilisera les biopiles enzymatiques alors que la deuxième aura recours aux biopiles microbiennes, comme nous détaillerons dans les paragraphes suivants.

De manière plus farfelue, certains chercheurs ont envisagé pour les biopiles un autre avenir, celui d'alimenter des robots autosuffisants [16]. Ces robots, qui ont vu le jour à la fin des années 90, sont appelés « gastrobots » ce qui signifie littéralement qu'ils possèdent un estomac

(c'est-à-dire la biopile) capable de transformer de la « nourriture » en énergie électrique [22]. Ils utilisent surtout les carbohydrates tels que le glucose ou l'amidon afin de produire l'énergie nécessaire pour fonctionner. De tels robots existent déjà comme SlugBot, le robot qui s'alimente grâce aux limaces qu'il chasse [23]. Ce sont donc des robots autonomes puisqu'ils se chargent eux-mêmes de trouver les substrats nécessaires à leur fonctionnement. Hormis l'aspect ludique du projet, il est envisageable d'utiliser ce type de système pour alimenter des drones, par exemple dans le cadre d'actions militaires ciblées.

Depuis les travaux préliminaires de Yahiro et al en 1964 avec la mise au point de la première biopile [24], il aura fallu attendre la fin des années 90 pour que les biopiles connaissent un regain d'intérêt, notamment grâce aux travaux de 2 équipes internationales : Adam Heller aux Etats-Unis [25-28] et Itamar Willner en Israël [25, 29, 30]. Les recherches dans le domaine des biopiles n'ont cessé de croître : cette tendance se caractérise par une augmentation exponentielle du nombre de publications qui y sont consacrées chaque année comme nous pouvons le voir sur la figure I.3.1. Près de 90% des 2043 articles parus au total ont été publiés ces 9 neuf dernières années.

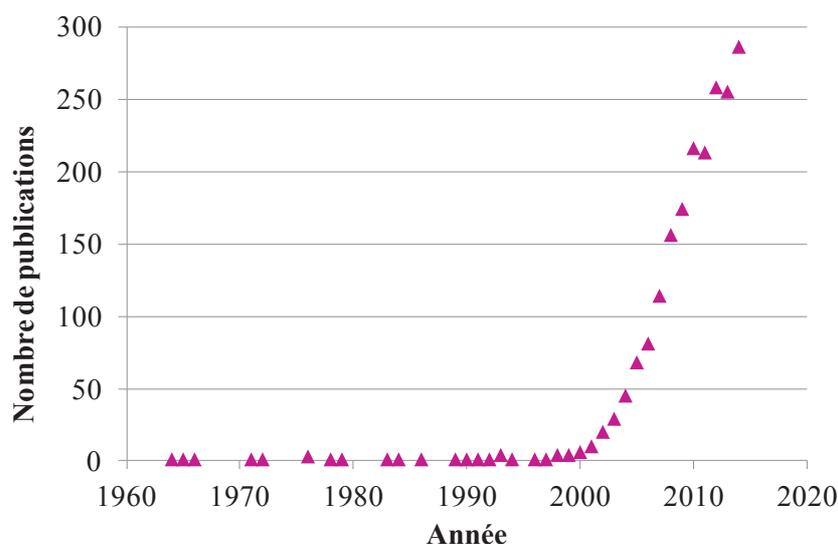


Figure I.3.1 : Nombre de publications par an sur le thème « biofuel cell » dans des revues à comité de lecture (source ISI Web of knowledge).

3.2. Les biopiles microbiennes

3.2.1. Principe

Ces biopiles utilisent des cellules vivantes complètes comme catalyseur biologique. D'une manière générale, en raison de la nature vivante des organismes employés, ces

systèmes ont une période transitoire de croissance bactérienne et d'adaptation au mécanisme de transport électronique au niveau des électrodes.

Le micro-organisme utilisé peut être une espèce spécifique isolée comme une bactérie ou une levure ou bien une culture cellulaire mixte. On peut le placer directement sur les électrodes, le mettre en suspension ou encore l'inoculer avec une culture cellulaire en présence d'une solution nutritive sous des conditions spéciales pour obtenir un biofilm à la surface de l'électrode. Un biofilm correspond à l'agrégation de cellules en milieu humide voire en solution sur une surface solide. A titre d'exemple, la plaque dentaire que se forme sur l'émail des dents est un biofilm bactérien.

La formation d'un biofilm est rapide et cyclique (figure I.3.2). Tout d'abord, des microorganismes libres en suspension rencontrent une surface immergée et s'y attachent en quelques minutes. Ils produisent ensuite une substance visqueuse, la matrice polymérique extracellulaire, qui maintient leur cohésion et commencent alors la colonisation. La stabilité apportée par la matrice extracellulaire permet la croissance d'un biofilm complexe en 3 dimensions. Le biofilm peut ensuite se propager par détachement d'une partie de sa structure. Les microorganismes relargués vont à leur tour pouvoir s'attacher plus loin et coloniser une nouvelle zone [31].

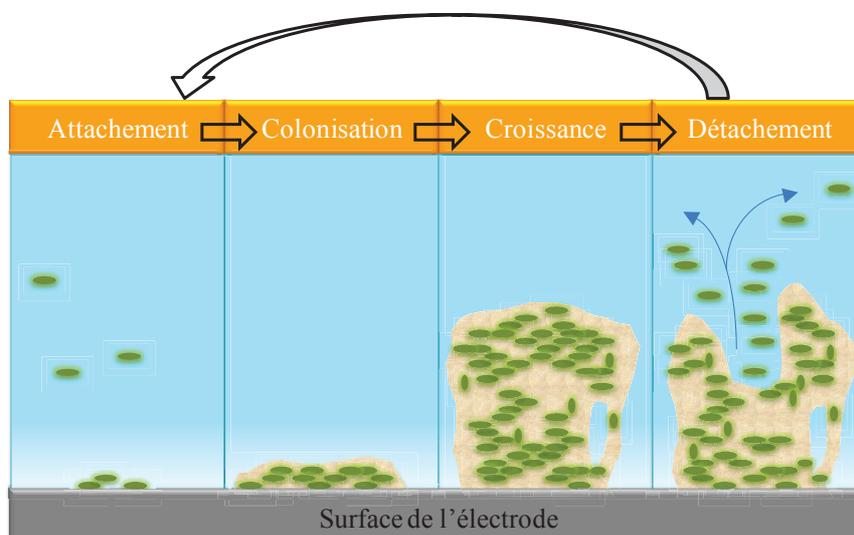


Figure I.3.2 : Formation en 4 étapes d'un biofilm à la surface d'une électrode.

Le biofilm va donc être utilisé à l'anode pour oxyder les matières organiques en CO_2 . Ce processus doit être réalisé en milieu anaérobie car sinon l'oxygène présent utiliserait directement les électrons pour se réduire, empêchant leur transfert jusqu'à la cathode. Pour la cathode, un métal noble tel que le platine catalysera la réduction de l'oxygène en eau, bien

que quelques exemples de cathodes microbiennes aient été rapportés [32-34]. Une membrane sélective permet de faire circuler les protons d'un compartiment à l'autre (figure I.3.3) [35].

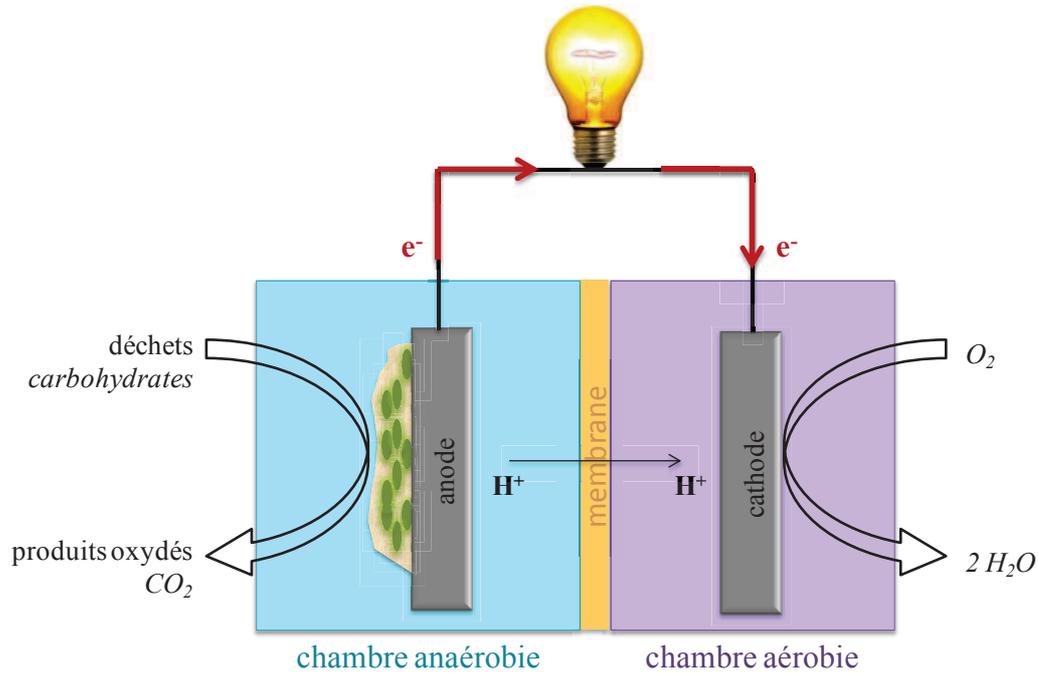


Figure I.3.3 : Schéma d'une biopile microbienne.

Le transfert des électrons entre le microorganisme et l'électrode peut se faire de 3 façons différentes (figure I.3.4) [36, 37] :

- directement via les protéines intramembranaires du microorganisme (1),
- avec l'aide d'un médiateur externe, libre en solution ou immobilisé (2),
- grâce aux nanopilis, sortes de cils protéiques, présents en surface des bactéries (3).

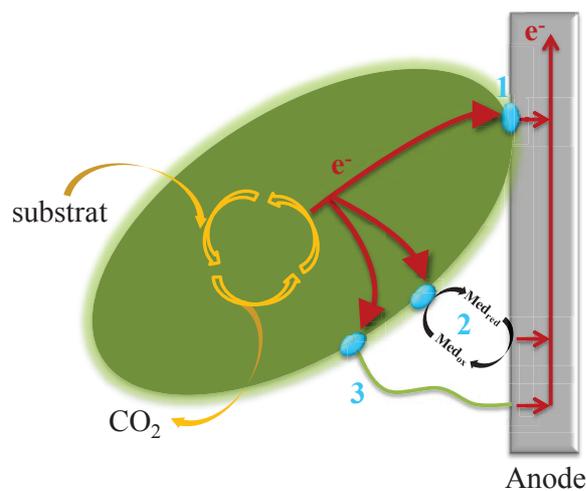
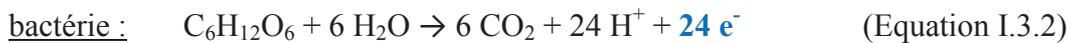


Figure I.3.4 : Mécanismes de transfert des électrons entre le microorganisme et l'anode : (1) transfert direct, (2) médiateurs externes et (3) nanopilis.

Ces systèmes sont généralement robustes car ils se renouvellent d'eux-mêmes, peuvent opérer avec des quantités variables de matières premières et sont résistants à l'empoisonnement inhérent aux systèmes vivants [15].

Leur principal avantage est qu'ils présentent une durée de vie relativement longue (jusqu'à 5 ans) car ces systèmes sont capables de régénérer les enzymes en tant que partie intégrante de leur fonctionnement naturel : en effet, l'utilisation de micro-organismes dans ce cas permet d'auto-régénérer les systèmes enzymatiques à partir de la croissance et de l'expression d'enzymes sur la surface de l'organisme [38]. De plus, ils sont capables d'oxyder en totalité les biocarburants, notamment les molécules complexes comme le glucose, car elles font intervenir des cascades enzymatiques aboutissant à l'oxydation totale des sucres [39, 40]. Ainsi, nous aurons à l'anode d'une biopile enzymatique la production de 2 électrons par l'oxydation du glucose en gluconolactone (équation I.3.1) alors qu'une anode de biopile microbienne produira 24 électrons en oxydant le glucose en dioxyde de carbone (équation I.3.2), soit un rendement multiplié par 12 [41-43]:



3.2.2. Applications des biopiles microbiennes

Une grande partie des biopiles microbiennes sont capables de générer de l'électricité par oxydation de composés organiques présents dans les eaux usées [44-47]. Cette capacité conduit à deux applications possibles : le traitement des eaux usées et la production d'électricité, qui peuvent être réalisées indépendamment ou de manière combinée. Dans ce dernier cas, les biopiles microbiennes sont alimentées par les nombreux carbohydrates facilement disponibles dans les déchets, comme la cellulose, l'amidon ou le glucose, et peuvent donc être la base de traitement de déchets combinés à la génération d'énergie à partir des matières organiques présentes dans les eaux usées. Les biopiles microbiennes devront en outre être complétées par des agents de digestion anaérobiques produisant du méthane ou de l'hydrogène. De plus, les bio-électrodes peuvent être utilisées pour l'oxydation/réduction de substrats cibles spécifiques tels que le nitrate le fer et le sulfate, toujours dans une optique de dépollution des eaux [14, 48].

D'après les calculs de B. E. Logan [49], les eaux usées d'une ville de 100 000 habitants représentent 16,4 millions de litres par an qui pourraient générer une puissance de 0,5 MW (et jusqu'à 2,3 MW si on considère un rendement de 100%). Si l'on considère qu'il faut 1,5 kW d'électricité par maison alors ces 0,5 MW produits pourraient permettre d'alimenter 330 maisons chaque année. Il est intéressant de mentionner que près de 80% de la demande biochimique en oxygène (ou DBO) des eaux usées peuvent être éliminés par l'utilisation d'une biopile microbienne. La DBO correspond à la quantité de dioxygène nécessaire aux microorganismes aérobies de l'eau pour oxyder les déchets organiques présents (dissouts ou en suspension). Elle est donc un témoin de la qualité de l'eau car plus il y aura de matières organiques, plus les microorganismes vont se développer et consommer de l'oxygène et donc plus le milieu va s'asphyxier.

Quand on sait que 2 millions de m³ d'eaux usées sont générées chaque jour dans le monde, soit 35 000 bouteilles d'eau de 1,5 L vidées par seconde, et que 90% de ces eaux ne sont actuellement pas dépolluées avant d'être rejetées en milieu naturel, on mesure alors tout le potentiel des biopiles microbiennes dans cette croisade écologique. Si l'ensemble des eaux usées (730 milliards de litres par an) étaient traitées et permettaient en même temps de produire de l'électricité, nous arriverions à alimenter en électricité 1,5 millions de foyers chaque année [50] !

Mais les biopiles microbiennes peuvent avoir encore d'autres applications comme la désalinisation de l'eau de mer pour la rendre consommable tout en produisant de l'électricité [51] ou encore la production de dihydrogène qui servira comme source d'énergie alternative, par exemple pour l'alimentation de véhicules [52].



Figure I.3.5 : Applications possibles pour les biopiles microbiennes [53-56].

3.2.3. Limitations des biopiles microbiennes

Les biopiles microbiennes sont limitées par une faible densité de puissance due au faible taux de transport de masse à travers la membrane des microorganismes [57] ; en effet les membranes des cellules sont majoritairement constituées de molécules peptidiques et lipidiques qui leur confèrent des propriétés isolantes. Les puissances générées sont ainsi nettement inférieures à celles des piles à combustible traditionnelles. L'efficacité des biopiles microbiennes dépend également de la conception du système lui-même. La plupart des biopiles microbiennes utilisent une membrane séparatrice échangeuse de protons. Cette membrane possède une résistance propre qui va s'ajouter aux pertes ohmiques du système et diminuer son efficacité [58].

Le coût de production des biopiles microbiennes n'est pas négligeable. La membrane échangeuse de proton est le plus souvent en Nafion (~500 \$/m²) [59] et la cathode utilise majoritairement le platine comme catalyseur. Néanmoins, de nombreuses recherches sont en cours afin de diminuer ces coûts de production. Par exemple, l'équipe du professeur Wen a récemment mis au point un catalyseur cathodique pour la réduction de l'oxygène qui pourrait remplacer le platine et qui coûte seulement 5% de son prix [60]. Il est également possible de ne pas utiliser de membrane séparatrice mais ces biopiles sont généralement plus compliquées à développer [45, 61, 62] et leur efficacité coulombique est nettement diminuée en raison de la diffusion libre de l'oxygène jusqu'à l'anode [45] et de résistances internes élevées [61].

Le rendement coulombique correspond à la différence entre le nombre d'électrons entrés dans la pile et ceux qui en sortent, c'est-à-dire la différence entre l'énergie reçue par la pile pendant la charge, et celle restituée à la décharge. Ce rendement doit être le plus proche de 100% : plus il diminue, plus il y a de réactions parasites à celle qui nous intéresse.

L'ensemble de ces limitations ralentissent le développement des biopiles microbiennes à grande échelle, ce qui est pourtant nécessaire dans le cadre de leur utilisation pour le traitement et la dépollution des eaux usées.

Enfin, ces biopiles utilisent des microorganismes vivants ce qui les rend inutilisables pour l'alimentation de minis capteurs implantables, bien que la puissance fournie soit bien adaptée à la puissance nécessaire au fonctionnement de ce type d'appareil.

Ce sont donc les biopiles enzymatiques qui vont être utilisées pour cette application : fonctionnant sans membrane grâce à la sélectivité des enzymes et n'utilisant pas de catalyseur métallique, elles peuvent être grandement miniaturisées à faible coût. Les enzymes n'étant pas capable de croître et se reproduire par elles-mêmes, il n'y aura donc aucun risque de prolifération dans l'organisme hôte.

3.3. Les biopiles enzymatiques

3.3.1. Introduction

Ces biopiles sont appelées ainsi car elles font appel à des enzymes pour catalyser les réactions d'oxydation et de réduction aux électrodes. Ce sont des enzymes de la famille des oxydoréductases. Les substrats typiques de ces enzymes sont les carbohydrates (sucres, amidon et cellulose) ou les dérivés d'alcool à l'anode et l'oxygène ou certains peroxydes (comme le H_2O_2) à la cathode [13-16, 21, 57].

Malgré une première description en 1964 par Yahiro et al, ce n'est que dans les années 2000 que la biopile dévoile enfin tout son potentiel avec les travaux de l'équipe d'Heller [28].

3.3.2. Caractéristiques des biopiles enzymatiques : avantages et limitations

Contrairement aux biopiles microbiennes, les biopiles enzymatiques produisent un courant électrique et une densité de puissance plus élevés, ce qui permet leur utilisation dans le cadre d'applications en électronique aux échelles micro et mini [63]. Elles permettent également l'utilisation d'importantes quantités de biocatalyseurs, mais elles ne peuvent oxyder que partiellement le biocarburant [15]. Ceci peut être réglé en combinant certaines enzymes ou en utilisant des cascades d'enzyme qui sont efficaces *in vivo* mais dont l'immobilisation sur des électrodes est encore problématique [57]. Elles ont aussi un temps de réponse plus rapide car les voies chimiques impliquées sont plus simples et il n'y a pas de période de croissance transitoire.

A l'inverse des piles à combustible traditionnelles, la possibilité d'immobiliser les enzymes et médiateurs (utile pour faciliter leur action répétée en tant que catalyseur et co-catalyseur) et la sélectivité des enzymes peut permettre de ne pas utiliser de membrane dans le cas des biopiles enzymatiques. Néanmoins ce n'est pas systématique et certaines biopiles enzymatiques restent équipées d'une membrane en raison de la complexité d'optimisation des électrodes [39, 64, 65].

Les biopiles sans membranes présentent moins de résistance interne et peuvent conduire à de plus grandes productions de courant électrique ce qui s'avère très intéressant, cela permet également de les miniaturiser davantage. Dans cette optique, la conception des biopiles doit se faire minutieusement pour éviter la diminution du rendement coulombique [14].

Les biopiles enzymatiques ont une durée de vie limitée (1 an au maximum) [57] en raison de la faible stabilité des enzymes utilisées et de leur incapacité à se renouveler comme

les microorganismes des biopiles microbiennes. Isolées du microorganisme auquel elles appartiennent, leur durée de vie est très réduite, même si elle peut être légèrement rallongée par une immobilisation de l'enzyme.

De plus, bien que les puissances générées par les biopiles enzymatiques soient supérieures à celles produites par les biopiles microbiennes, elles restent nettement inférieures aux performances d'une pile à combustible traditionnelle.

3.3.3. Les principaux types de biopiles enzymatiques

Il existe plusieurs catégories de biopiles enzymatiques, principalement définies par les substrats qu'elles utilisent à l'anode et la cathode et qui sont listés ci-dessous (tableau I.3.1). Comme nous pouvons le voir, si les substrats pour la réduction sont limités (O_2 ou H_2O_2), ce n'est pas le cas de l'oxydation qui se satisfait d'un grand nombre de molécules dont certains sucres et alcools ainsi que le dihydrogène le plus souvent.

Substrat anodique	Substrat cathodique
Glucose	Oxygène
Fructose	
Lactate	Peroxyde d'hydrogène
Méthanol	
Ethanol	
Glycérol	
Dihydrogène	
Acétaldéhyde	
Formaldéhyde	
Formiate	

Tableau I.3.1 : Principaux substrats utilisés à l'anode et la cathode.

Les biopiles enzymatiques les plus répandues sont celles à glucose/ O_2 , notamment en raison de la biodisponibilité de ces substrats dans n'importe quel organisme. Nous reviendrons sur ces systèmes en détail dans la partie suivante car elles constituent le centre de nos travaux. De la même manière il existe des biopiles à alcool/ O_2 .

De nombreuses recherches sont également concentrées sur les biopiles enzymatiques à H_2/O_2 depuis la première conçue en 2002 par Tarasevich et al [66]. Ces biopiles sont actuellement très étudiées car les hydrogénases (enzymes catalysant l'oxydation du H_2) ont une très forte activité et une faible surtension même si leur stabilité reste à améliorer [13]. Elles ouvrent ainsi la voie à l'oxydation enzymatique du H_2 , permettant d'éviter l'utilisation de platine à l'inverse des piles à combustible traditionnelles [67, 68].

3.3.4. Les différentes biopiles enzymatiques rapportées dans la littérature

L'objectif ici est de répertorier dans le tableau ci-après les principaux systèmes de biopiles depuis 1998 à nos jours, en détaillant les éléments qui les composent et en donnant les valeurs des puissance (en mW/cm^2), tension de fonctionnement maximal (en Volts), OCP (en Volts) et stabilité en continu obtenus pour chacun d'entre eux [28-30, 39, 64, 69-94].

Une liste plus complète pourra être trouvée dans les revues [14, 15, 95, 96] mentionnées dans la bibliographie.

Les performances présentées dans ce tableau sont présentées en densité de puissance. Cependant, il est nécessaire de prendre du recul vis-à-vis de ces valeurs car la surface utilisée pour ces normalisations correspond soit à la surface réellement active soit à la surface géométrique, ce qui peut compliquer la comparaison entre les différents systèmes reportés dans la littérature. C'est notamment le cas pour les matériaux poreux tridimensionnels, à base de nanotubes de carbone et/ou de nanoparticules dont la surface réelle est souvent difficile à calculer [75, 76, 79, 80, 94].

Rappel des abréviations utiles pour la lecture du tableau :

Enzyme

ADH = alcool déshydrogénase
AldDH = aldéhyde déshydrogénase
BOD = bilirubine oxydase
CDH = cellobiose déshydrogénase
COx = cytochrome oxydase
Cyt *c* = cytochrome c
DI = diaphorase
FDH = fructose déshydrogénase
GDH = glucose déshydrogénase
GOx = glucose oxydase
HRP = horseradish peroxydase

Matériaux

CNTs = nanotubes de carbone
TBAB = tétrabutylammonium bromide

Médiateurs

AQ2S = anthraquinone-2-sulfonate
FAD = flavine adénine dinucléotide
Fc = ferrocène
NAD = nicotinamide adénine dinucléotide
PABMSA = poly(3-aminobenzoic acid-co-2-methoxyaniline-5-sulfonic acid)
PD = 9,10-phénantroline-5,6-dione
PQQ = pyrroloquinoléine quinone
VK₃ = vitamine K₃

Electrolyte

PB = tampon phosphate
PBS = tampon phosphate salin
(avec 140mM NaCl)

Référence	Carburant/ oxydant	Enzymes	Electrodes	Mé debateur	Electrolyte / Membrane	OCp (V)	Puissance (μ W/cm ²)	Tension (V)	Stabilité en continu
1998 Palmore et al	Méthanol O₂	FDH/AldDH /ADH + DI Pt	Graphite Gaze de platine	-	1M LiCl dans 100mM Tris pH 7,5 An : 100mM MeOH+1mM NAD ⁺ + 50mM BV ²⁺ , Ar sat Cath : O ₂ sat Membrane : Nafion®	0.8	0.68	0.49	nc
1998 Willner et al	Glucose H₂O₂	GOx Microperoxydase	Electrode d'or + monochouche de cystamine	-	100mM PB pH 7, Ar sat An : 5mM glucose Cath : 5mM H ₂ O ₂ Membrane : fritté de verre	0.32	10.73	0.31	- 50% après 3h
1999 Katz et al	Glucose O₂	GOx Cyt c/COx	Electrode d'or	PQQ -	Solution d'électrolytes, 1mM glucose, air Sans membrane	0.13	0.35	0.06	- 0% après 48h
2001 Chen et al	Glucose O₂	GOx Laccase	Fibre de carbone	Polymère d'osmium	200mM citrate pH 5, 15mM glucose, air Sans membrane	0.8	64	0.4	- 25% après 72h
2002 Mano et al	Glucose O₂	GOx BOD	Fibre de carbone	Polymère d'osmium	PBS pH 7,2 à 37°C 15mM glucose, air Sans membrane	0.83	4.3	0.52	- 6% par jour pendant 1 semaine
2003 Katz et al	Glucose O₂	GOx Cyt c/COx	Film de Cu ²⁺ - poly(acide acrylique) sur électrode d'or	PQQ FAD	100mM Tris pH 7, 80mM glucose, air Membrane : joint torique en caoutchouc 2mm	0.12	22.6	0.066	- 0% après 48h si réactivation toutes les 3h
2003 Kim et al	Glucose O₂	GOx BOD	Fibre de carbone	Polymère d'osmium	PBS pH 7,4 à 37,5°C 15mM glucose, air Sans membrane	0.68	50	0.5	- 40% après 2 jours
2003 Mano et al	Glucose O₂	GOx BOD	Fibre de carbone	Polymère d'osmium	PBS pH 7,2 à 37°C 15mM glucose, air Sans membrane	0.8	4.4	0.52	nc

Référence	Carburant/ oxydant	Enzymes	Electrodes	Médiateur	Electrolyte / Membrane	OCV (V)	Puissance (μ W/cm ²)	Tension (V)	Stabilité en continu
2005 Akers et al	Ethanol O₂	AldDH/ADH Pt	TBAB/Nafion® sur cloth de carbone Electrode ELAT + 20% Pt sur Vulcan XC-72	NAD ⁺ -	PB pH 7,15 à T ambiante <u>An</u> : 1mM EtOH + 1mM NAD ⁺ , Ar sat <u>Cath</u> : O ₂ sat Membrane : Nafion®	0.82	2040	0.68	- 6,1% après 7 jours
2006 Fishback et al	Glucose H₂O₂	GOx Pt	Nafion®,CNTs Cathode à air	Benzoquino ne -	<u>An</u> : 200mM glucose <u>Cath</u> : air	0.33	120	0.1	-0% après 16h
2007 Lim et al	Glucose O₂	GOx BOD	Electrode composite avec CNTs + silice nanostructurée sol-gel	FcMeOH à l'anode ABTS à la cathode	PBS à T ambiante <u>An</u> : 100mM glc, Ar sat <u>Cath</u> : O ₂ sat Membrane : Nafion®	0.52	120	0.24	nc
2008 Deng et al	Glucose O₂	GDH Laccase	Electrode d'or macroporeuse ordonnée	NADH ⁺	100mM PB pH 6 30mM glucose, air Sans membrane	0.32	178	0.226	nc
2009 Sakai et al	Glucose O₂	GDH/DI BOD	Feuille de fibres de carbone	NAD ⁺ /VK ₃ Fe(CN) ₆	100mM PB pH 7 400mM glucose, air Membrane : cellophane	0.8	1450	0.3	nc
2009 Wang et al	Glucose O₂	GOx Laccase	CNTs sur silicone poreux	-	PB pH 7 4mM glucose, air Sans membrane	0.5	1.38	0.099	- 78% après 2 jours
2009 Areche- derra et al	Glycérol O₂	AldDH/ADH + Oxalate oxydase Pt	TBAB-Nafion® sur CNTs Electrode ELAT + 20% Pt sur Vulcan XC-72	-	PB pH 7,15 avec 1M NaNO ₃ <u>An</u> : 100mM glycérol <u>Cath</u> : air Membrane Nafion®	nc	1320	0.59	nc

Référence	Carburant/ oxydant	Enzymes	Electrodes	Mé debateur	Electrolyte / Membrane	OCP (V)	Puissance (μ W/cm ²)	Tension (V)	Stabilité en continu
2010 Lee et al	Glucose O₂	GOx Laccase	CNTs enveloppés d'ADN sur électrode d'or	-	100mM PB pH 7 à 25°C glucose, air Sans membrane	1.5	442	0.46	-0% après 110h
2010 Coman et al	Glucose O₂	CDH BOD	Tiges de graphite spectrographique	-	PBS pH 7,4 5mM glucose, air Sans membrane	0.62	3	0.37	-38% après 6h
2010 Gao et al	Glucose O₂	GOx BOD	Fibres de CNTs	Polymère d'osmium	PBS pH 7,2 à 37°C 15mM glucose, air Sans membrane	0.83	740	0.57	-20% après 150h
2011 Zebda et al	Glucose O₂	Catalase/ GOx Laccase	CNTs comprimés	-	100mM PB pH 7 à 20°C 50mM glucose, air Sans membrane	0.95	1300	0.6	-4% après 1 mois
2012 Wang et al	Glucose O₂	CDH BOD	Nanoparticules d'or sur disque d'or	-	50mM PB pH 7,4 Sans membrane	0.68	3.3	0.52	-13% après 12h
2012 Falk et al	Glucose O₂	CDH BOD	Nanoparticules d'or sur fibre d'or	-	PBS pH 7,4 5mM glucose, air Sans membrane	0.66	3.2	nc	-13% après 12h
2013 Sales et al	Glucose O₂	GOx Pt	Microélectrode en fibre de carbone flexible	Rouge Neutre -	50mM PB pH 7,2 47mM glucose, air Sans membrane	0.4	200	0.25	nc
2013 Andoralov et al	Glucose O₂	CDH BOD	Nanoparticules d'or sur électrode d'or	-	50mM PBS pH 7,4 2,5mM glucose	0.56	4	0.4	-10% après 2h
2013 MacAodha et al	Glucose O₂	GOx Laccase	CNTs sur électrode de graphite	Polymère d'osmium	PBS pH 7,4 à 37°C 5mM glucose et 0,12mM O ₂ Sans membrane	0.55	145	0.26	nc

Référence	Carburant/ oxydant	Enzymes	Electrodes	Mé debateur	Electrolyte / Membrane	OCP (V)	Puissance (μ W/cm ²)	Tension (V)	Stabilité en continu
2014 Scherbahn et al	Glucose O₂	GDH BOD	CNTs alignés verticalement sur électrodes de silice	PABMSA PQQ	100mM citrate + 1mM CaCl ₂ pH 7, 10mM glucose, air Sans membrane	0.8	122	0.54	- 10% après 3 jours
2014 Fujita et al	Glucose H₂O₂	GDH + DI BOD	Carbone poreux hiérarchisé	NAD ⁺ + AQ2S Fe(CN) ₆	1M PB pH 7 800mM glucose	nc	1000	0.6	nc
2014 Poulpiquet et al	H₂ O₂	Hydrogénase BOD	Arêtes de nanofibres de carbone	-	100mM PB pH 6 à 60°C	1.1	1500	0.7	- 60% après 24h
2014 Choi et al	Glucose O₂	GOx BOD	Electrode de carbone ségraphiée	Polymère d'osmium	PBS pH 7,2 à 37°C 5mM glucose, air Sans membrane	0.75	19.5	0.41	nc
2014 Kwon et al	Glucose O₂	GOx BOD	CNTs filés et enroulés en « corde »	Polymère d'osmium	PBS à 37°C 60mM glucose, O ₂ Sans membrane	0.70	2180	0.4	- 16% après 48h
2015 Lalaoui et al	H₂ O₂	Hydrogénase BOD	CNTs sur tissu de carbone Cathode à air	-	PB pH 7,2 à 45°C H ₂ sat à l'anode Sans membrane	0.95	0.72	0.6	nc
2015 Ramana- vicius et al	Glucose H₂O₂	GOx HRP	Tige de graphite	PD	50mM acétate/phosphate de sodium + 100mM KCl 200mM glucose, 0,5mM H ₂ O ₂ Sans membrane	0.66	4.2	0.53	- 25% après 12 jours
2015 Chen et al	Fructose O₂	FDH Laccase	Disque de carbone vitreux	Polymère de Fc Polymère d'osmium	Tampon McIlvaine pH 5,5 à 25°C, 60mM fructose, air Sans membrane	0.55	29	0.152	nc

3.3.5. La biopile enzymatique à glucose/oxygène

3.3.5.1. Historique

La première biopile enzymatique à glucose/oxygène a été décrite par Yahiro et al en 1964 : il s'agissait d'une cellule à 2 compartiments séparés par une membrane anionique et utilisant des feuilles de platine comme matériau conducteur. A l'anode, l'oxydation du glucose était assurée par une glucose oxydase alors qu'à la cathode c'est le platine qui réduisait l'oxygène en eau. Les performances de cette biopile étaient relativement faibles puisque la densité de courant maximale générée était de 30 nA à 0,285 mV vs. Ag/AgCl soit une densité de puissance de 8,55 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ [24].

Depuis ces premiers travaux, les avancées technologiques ont permis d'aboutir à des systèmes complètement enzymatiques, sans membranes et nettement plus puissants. La biopile à glucose/oxygène la plus puissante à ce jour est celle développée par Kwon et al [94]. Construite à partir de fils de nanotubes de carbone enroulés en corde, cette biopile à glucose/O₂ délivre une puissance de 2,18 mW/cm² à 0,40 V en présence de 60 mM de glucose en conditions physiologiques et 1,18 mW/cm² à 0,40 V à seulement 7 mM de glucose.

3.3.5.2. Description

Cette biopile est actuellement au centre de nombreuses recherches. Son avantage principal est la disponibilité des 2 carburants en continu dans la circulation sanguine ; de plus les sous-produits formés étant non toxiques pour l'organisme cela en fait la candidate idéale pour l'implantation.

A l'anode le glucose va être oxydé en gluconolactone généralement par une glucose oxydase ou déshydrogénase. Les électrons générés vont être transférés à la surface de l'électrode via un médiateur rédox faisant office de navette d'électrons. Les électrons passent ensuite de l'anode à la cathode via un circuit électrique externe. A la cathode, après avoir été transportés par un second médiateur rédox, ils vont participer à la réduction de l'oxygène en eau catalysée par une oxydase multi-cuivre, s'agissant le plus souvent d'une laccase ou d'une bilirubine oxydase (figure I.3.6).

L'équation bilan de cette biopile est la suivante :



L'utilisation de médiateurs rédox n'est pas systématique : elle permet d'améliorer la connexion entre l'enzyme et l'électrode, améliorant ainsi le transfert électronique mais elle rajoute aussi 2 étapes de transfert électronique qui peuvent entraîner une baisse d'efficacité de la biopile. Le plus souvent les médiateurs rédox sont des polymères conducteurs ou à base d'osmium, sur lesquels nous reviendrons dans la partie 4 de ce chapitre.

Enfin, la haute sélectivité des enzymes utilisées et leur immobilisation sur les électrodes peut permettre, après optimisation, de supprimer la membrane dans cette biopile. Ceci offre de plus grandes perspectives de miniaturisation et diminue les coûts de production.

Pour faciliter le transfert électronique de l'oxydation du glucose jusqu'à la réduction de l'oxygène, les potentiels rédox des différentes espèces participant aux processus électrochimiques (substrats, enzymes, médiateurs) sont choisis de façon à établir un gradient de potentiel. Ce gradient va servir de force motrice pour la circulation des électrons de l'anode à la cathode.

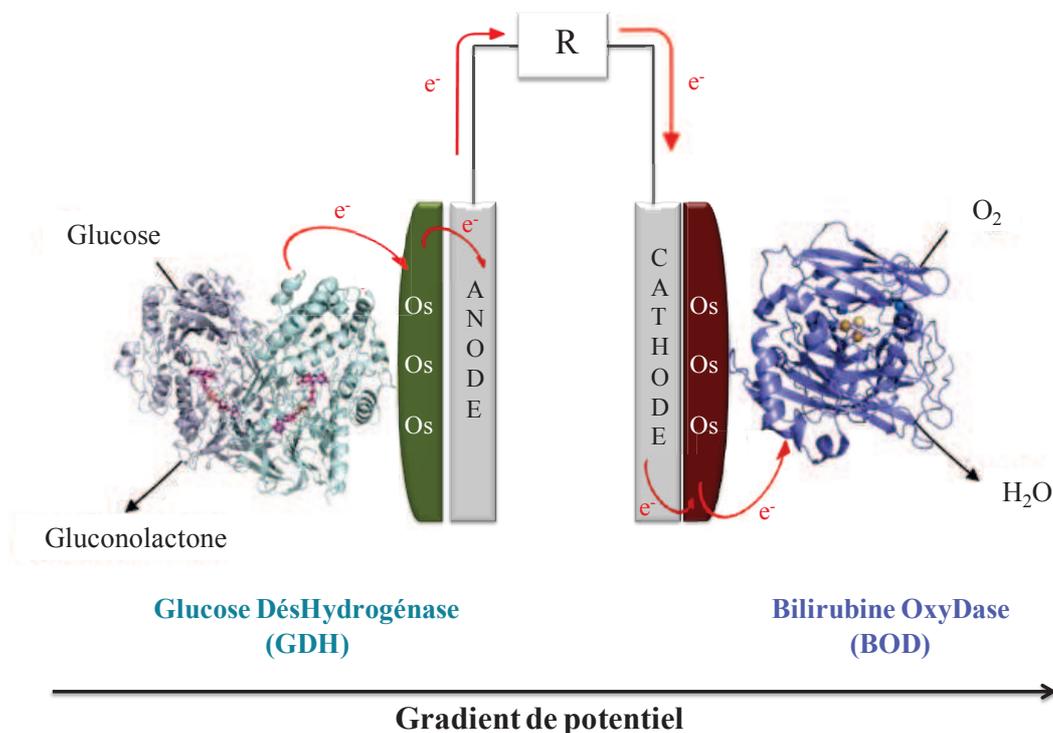


Figure I.3.6 : Principe de la biopile enzymatique à glucose/oxygène avec transfert électronique médié par des polymères d'osmium (Os) entre les enzymes et les électrodes.

Dans la majorité des systèmes mis au point, il a été constaté qu'à dimensions égales la cathode présentait une efficacité inférieure à l'anode que ce soit en terme de densité de courant ou de stabilité. La cathode étant limitante, nous tâcherons donc dans la suite de ce manuscrit de l'optimiser afin de concevoir une biopile la plus efficace possible.

3.3.6. Utilisation des biopiles enzymatiques

L'application la plus envisageable des biopiles concerne les applications *in vivo*, où le carburant utilisé est disponible sans limite à partir de la circulation sanguine et peut donc fournir un approvisionnement continu en énergie pour des appareils tels que les capteurs à glucose pour le contrôle de la glycémie dans le cas particulier qui nous intéresse.

Depuis de nombreuses années, les appareils de stimulation électrique comme les pacemakers ou les défibrillateurs se sont développés. Cependant ces appareils nécessitent une grande puissance d'alimentation et doivent être stables plusieurs années : d'après moi ils ne peuvent pas être alimentés avec les biopiles actuelles compte tenu des faibles puissance et stabilité des enzymes. De plus, il paraît inconcevable d'opérer un patient tous les mois pour changer la pile de son implant médical.

Nous nous sommes donc intéressés à des applications de moindre puissance pouvant être alimentées par des biopiles. Notre attention s'est portée sur les capteurs biomédicaux et notamment des biocapteurs miniatures destinés à l'implantation, ce que nous détaillerons ci-après.

Les biopiles peuvent également être utilisées pour alimenter toute sorte de petit appareil électronique de faible puissance. Il peut s'agir d'appareils électroniques communs tels que les téléphones mobiles, les lecteurs mp3 [97] et même des montres [98] ou bien de capteurs pour la détection de polluants environnementaux [99, 100]. En 2010, Katz et al ont même utilisé une biopile couplée à un système de verrouillage [101] : rentrer « le mot de passe » correct permet d'activer la biopile et de générer de l'électricité alors qu'un mot de passe incorrect maintient la biopile en position inactive.

3.3.6.1. Les biopiles comme source d'alimentation de biocapteurs

Les biopiles enzymatiques peuvent être utilisées pour l'alimentation de tout type de micro appareil biomédical. Elles pourraient par exemple servir à l'alimentation de petites valves pour le contrôle de la vessie [15, 102] ou de tout autre sphincter du corps humain. Néanmoins ce type d'utilisation requiert une certaine stabilité dans le temps ce qui n'est actuellement pas le cas des biopiles enzymatiques. De manière plus réaliste, les biopiles enzymatiques sont utilisées pour alimenter des biocapteurs miniatures dont le rôle est de contrôler en permanence les paramètres physiologiques des patients à risque.

Un capteur fonctionne sur un principe de reconnaissance spécifique entre un analyte (substance à détecter et doser) et un récepteur, avec un système de détection électrochimique (figure 1.3.7).

Le principe du biocapteur est le même que celui de chaque électrode de la biopile : une enzyme immobilisée (récepteur) reconnaît sélectivement son substrat (analyte) ce qui entraîne la production/consommation d'électrons (signal) par réaction d'oxydation/réduction. Le courant électrique généré par une biopile est donc directement corrélée à la quantité de substrat disponible à l'électrode. Ainsi une biopile enzymatique pourra à la fois générer de l'électricité et permettre une quantification du substrat.

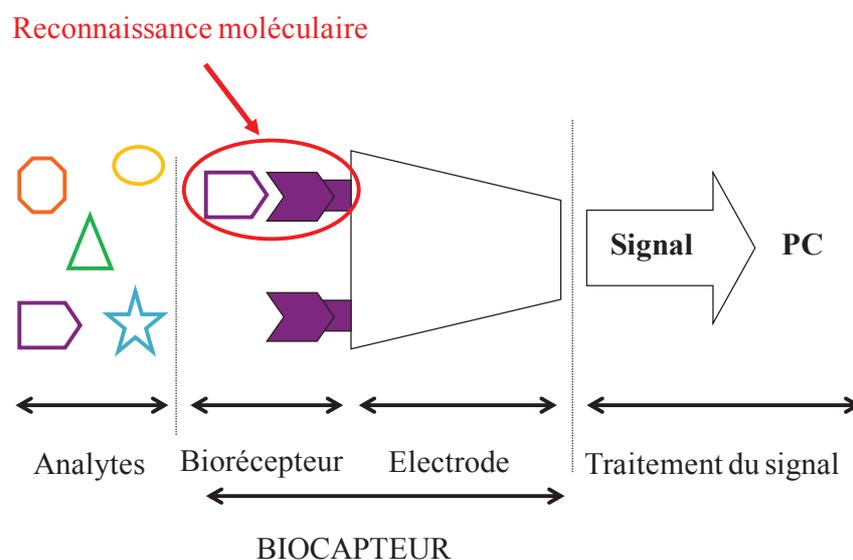


Figure 1.3.7 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur.

Il existe actuellement tous types de capteurs qui peuvent apporter de précieux renseignements sur l'état de santé des patients. Nous citerons entre autres :

- les capteurs à lactate : le lactate est produit par les muscles en situation d'hypoxie, c'est-à-dire en manque d'oxygène, notamment en situation d'effort [103] mais également chez les malades critiques en soins intensifs [104],
- les capteurs à créatinine : la créatinine apporte des indications sur les fonctions rénales, thyroïdiennes et musculaires des patients [105],
- les capteurs à bilirubine : largement décrits dans la littérature [106-112], ils permettent de détecter diverses maladies comme la jaunisse, l'hépatite ou la cirrhose en dosant la bilirubine qui est le produit de dégradation des globules rouges,
- les capteurs à glutamate [113] : le glutamate joue un rôle déterminant dans les fonctions cérébrales et est impliqué dans de nombreuses pathologies neurologiques,

- les capteurs à S-nitrosothiol [114] : cette molécule permet de réguler la dilatation des vaisseaux sanguins en fonction de la concentration en oxygène dans le sang.
- les capteurs à glucose : leur but est de contrôler la glycémie des patients diabétiques ; nous les détaillerons dans la partie suivante car ils constituent la principale application des biopiles enzymatiques.

3.3.6.2. Les biopiles et le contrôle du diabète

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, près de 177 millions de personnes ont été affectées par le diabète en 2000 soit 3% de la population mondiale ; ce chiffre est monté à 9% en 2014 [115, 116]. D'ici 2030, le diabète sera devenu la 7^{ème} cause de décès dans le monde [117], 80% des décès se produisant dans les pays à revenu faible ou intermédiaire [118]. De plus, les coûts médicaux engendrés par une personne diabétique sont 4 fois supérieurs à ceux pour une personne qui ne l'est pas. Avec la nette augmentation des problèmes de santé liés à la prise de poids, il devient impératif de trouver un moyen simple et abordable de contrôler et réguler la glycémie des malades [119].

En effet, le principal souci lié au diabète est une extrême hypoglycémie pouvant conduire au coma puis au décès de l'individu. Pour réduire ce risque, il faut maintenir la concentration de glucose sanguin plus haut que la normale. Cependant, la conservation d'un taux de glucose trop élevé peut entraîner des complications telles que des problèmes circulatoires provoquant la perte de membres, des dysfonctionnements rénaux,... L'idéal pour les personnes diabétiques serait donc de contrôler leur glycémie en continu. Ainsi, le premier appareil pour contrôler le glucose sanguin a été mis au point en 1996 et approuvé par la FDA en 2000. Il a immédiatement connu un vif succès en améliorant la vie de nombreux diabétiques, notamment grâce au fait qu'il soit assez petit pour être emporté partout et peu douloureux.

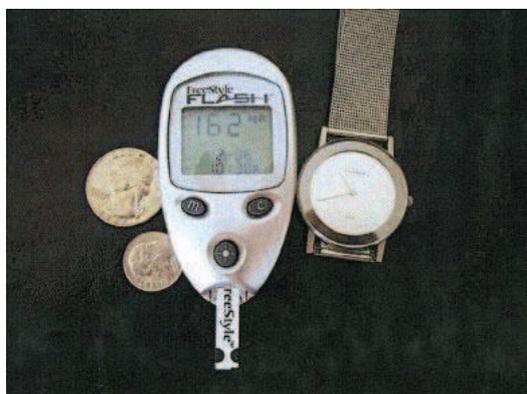


Figure I.3.8 : Premier appareil de poche pour le contrôle de la glycémie (2003) [119].

Après la piqûre quasi indolore par une petite aiguille, le sang est déposé sur une bandelette contenant une microcellule où le glucose sanguin est sélectivement électrooxydé [119]. Cette réaction est contrôlée par coulométrie qui permet de doser un composé à partir de la quantité d'électricité utile à son oxydation. Le test est :

- fiable car la coulométrie ne dépend pas de paramètres cinétiques comme la température, la viscosité ou l'activité de l'enzyme ;
- rapide car le sang est déposé à proximité du site où se fait la réaction d'électrooxydation ;
- et indolore car il ne prélève que 300 nL de sang par test.

Pour lors, ces capteurs à glucose sont alimentés par des batteries conventionnelles de type lithium/air et ne permettent pas de contrôler la glycémie en continu car la taille de la batterie est un facteur limitant pour l'implantation. L'objectif actuellement est donc de créer un capteur miniature, alimenté par une biopile elle aussi miniature, stable pour une durée raisonnable (environ 1 à 2 mois) et qui pourrait mesurer en permanence le taux de glucose sanguin de l'individu. La taille du système serait alors de quelques millimètres, pile incluse, ce qui permettrait son implantation sous cutanée (figure I.3.9).



Figure I.3.9 : Actuelle et future générations de capteurs à glucose [120, 121].

En parallèle de ce capteur, il faudrait également implanter une pompe à insuline, elle aussi alimentée par une biopile. Ces deux implants pourraient alors communiquer entre eux via des patchs appliqués à la surface de la peau faisant office d'émetteur/récepteur d'information. Lorsque le capteur détecte une glycémie insuffisante, il transmet un signal à la pompe à insuline qui délivre alors la dose d'insuline nécessaire pour rétablir un taux de glucose sanguin correct. Le capteur détecte alors cette amélioration de la glycémie et envoie un nouveau signal à la pompe pour lui signifier d'arrêter de délivrer de l'insuline : il s'agit d'un rétrocontrôle qui fonctionne en totale autonomie simplifiant ainsi le suivi et le traitement du diabète chez les patients (figure I.3.10) [119, 122].

Un des problèmes majeurs que pose ce type d'application est la durée de vie des enzymes utilisées : il faut donc créer une biopile stable, puissante et assez petite pour fonctionner au sein d'un petit système facilement implantable.

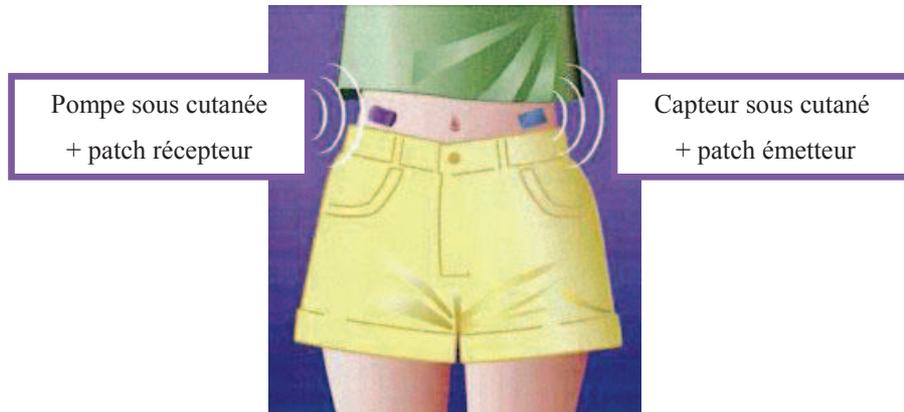


Figure I.3.10 : Système de patchs pour l'émission/réception d'informations sur la glycémie du porteur [119].

Enfin, on notera que de tels appareils doivent être bien calibrés au préalable en fonction des besoins du patient pour éviter tout problème de sur- ou sous-dosage. Le fait de pouvoir adapter la dose d'insuline délivrée selon le patient, à n'importe quel moment (dès que le capteur signale une variation de la glycémie) et de façon autonome (capteur et pompe communiquent en permanence sans l'intervention du patient) sont les points forts qui motivent la conception de tels systèmes.

La mesure de la concentration en glucose est également possible dans d'autres fluides biologiques tels que la salive, l'urine ou encore les larmes et même la sueur [123], pour des gammes de détection très variées (figure I.3.11), ce qui permet notamment des mesures non invasives car ces fluides sont naturellement excrétés par l'être humain.

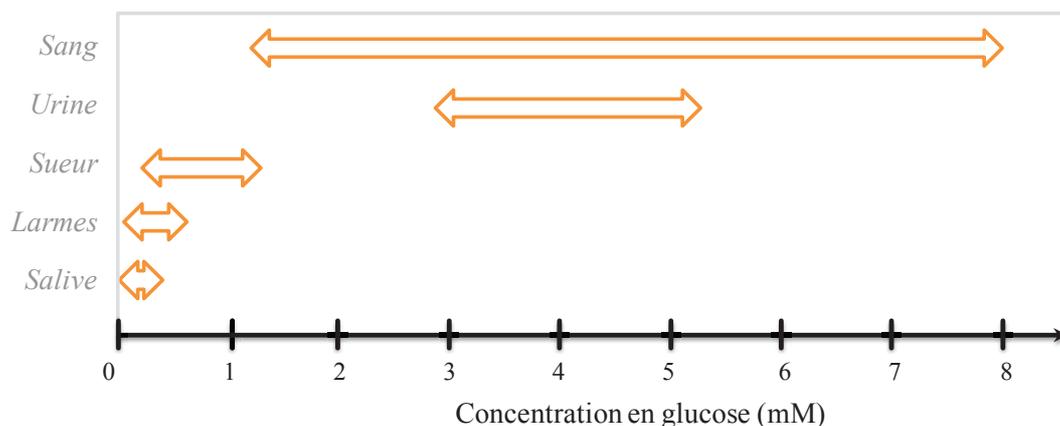


Figure I.3.11 : Gamme de concentration en glucose dans différents fluides biologiques.

Mesure du glucose dans l'urine

Pour un individu sain, la concentration en glucose dans les urines, ou glycosurie, est nulle. A partir de 2,78 mM la mesure est positive et indique la présence d'une pathologie sous-jacente. La mesure de la glycosurie est d'ailleurs un examen fréquent chez les patients diabétiques car elle permet de contrôler l'évolution de la maladie en complément des dosages sanguins. Le test repose sur le trio GOx/HRP/chromogène : la GOx oxyde le glucose en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. La HRP va ensuite catalyser l'oxydation d'un chromogène (type iodure de potassium) en co-réduisant le peroxyde d'hydrogène. Le degré d'oxydation du chromogène détermine la couleur qu'il faut ensuite comparer à une gamme étalon (figure I.3.12).

Plusieurs biocapteurs enzymatiques ont été rapportés dans la littérature, utilisant notamment la glucose oxydase pour électrooxyder sélectivement et donc doser le glucose contenu dans l'urine avec plus de précision que le test colorimétrique [124, 125].

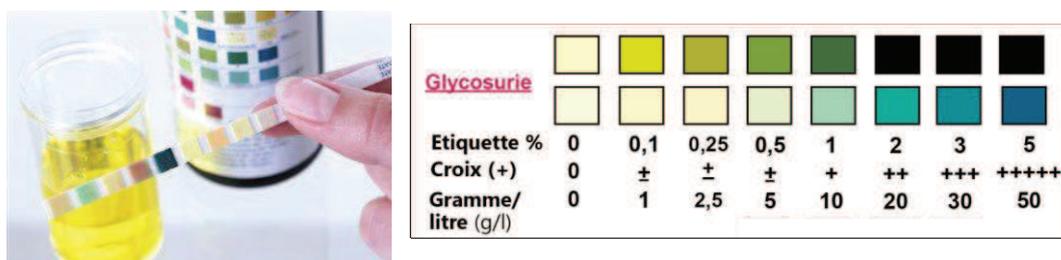


Figure I.3.12 : Test de glycosurie et exemple de grille de lecture colorimétrique [126, 127].

Mesure du glucose dans la sueur

La technique utilisée est appelée iontophérèse inverse : à but diagnostique, elle permet d'extraire certaines molécules à travers la peau par application d'un faible courant électrique entre une anode et une cathode positionnées à la surface de la peau (l'iontophérèse simple permet quant à elle d'injecter des substances à travers la peau dans un but thérapeutique) [128]. Il existe une proportionnalité directe entre le glucose contenu dans le sang et celui contenu dans la sueur, ce qui permet une mesure relativement précise [129].

Le principal exemple dans ce domaine est la GlucoWatch® : il s'agit d'un dispositif de détection iontophorétique du glucose contenu dans la sueur couplé à une « montre » qui indique la concentration en glucose mesurée. Son utilisation a été approuvée par la Food and Drug Administration dès 2001 malgré un certain nombre de désagréments. Le désavantage principal de cette technique est le temps de mesure car cela prend environ 20 minutes pour faire passer le glucose à travers la peau. Elle peut également entraîner des irritations de la peau au niveau de la zone d'échange avec les électrodes, comme ce fut le cas pour la

GlucoWatch®. De plus la stabilité limitée à quelques heures remet en cause la praticité de l'appareil. Enfin, aucune calibration par contrôle du glucose sanguin n'est proposée en complément [130].

Une alternative se trouve peut-être dans les tatouages temporaires couplés à des biocapteurs développés par l'équipe de Joseph Wang, pour la détection du lactate et du sodium présents dans la sueur [103, 131, 132].

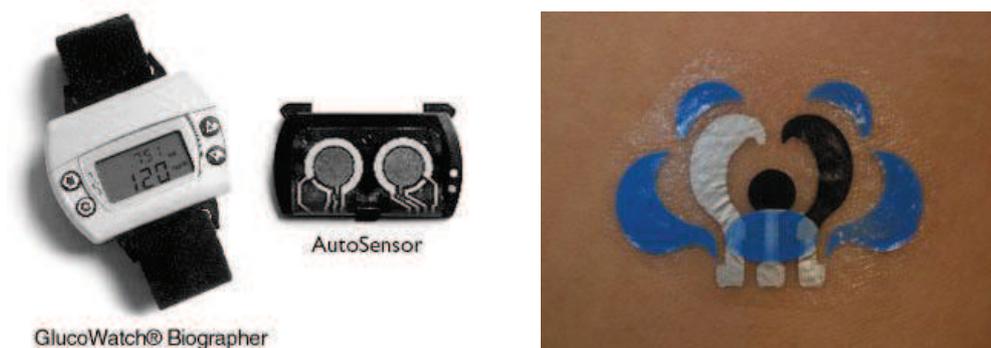


Figure 1.3.13 : (A) la GlucoWatch® et son biocapteur [133], (B) le biocapteur-tatouage temporaire de Wang et al [131].

Mesure du glucose dans les larmes

De nombreuses recherches se sont concentrées sur la détermination de la concentration en glucose dans les larmes car la concentration en glucose y est directement proportionnelle à celle dans le sang. De plus, les mesures dans les larmes peuvent être réalisées de façon non invasive et en continu car leur volume est stable autour de 4 μl avec un renouvellement de 0,5 à 2,2 $\mu\text{l}/\text{min}$ [134]. Le premier impératif est la faible limite de détection puisque la quantité de glucose est 50 à 100 fois plus faible dans les larmes que dans le sang.

De nombreuses techniques ont été utilisées comme la fluorescence, la chromatographie liquide ou l'électrochimie plus récemment [123]. En 1995 Mitsubayashi et al ont mis au point un biocapteur électrochimique flexible à base de glucose oxydase permettant la mesure du glucose dans les larmes, la sueur et la salive [135]. Actuellement plusieurs chercheurs se penchent sur le développement de lentilles de contact pour le contrôle de la concentration en glucose dans les larmes. Google a présenté son prototype en janvier 2014, basé sur les travaux de Yao et al [136, 137]. Ce concept est également développé par Shleev et al dont la lentille contient un capteur à glucose alimenté par une biopile à ascorbate/oxygène, l'ensemble des carburants étant disponibles dans les larmes [138].

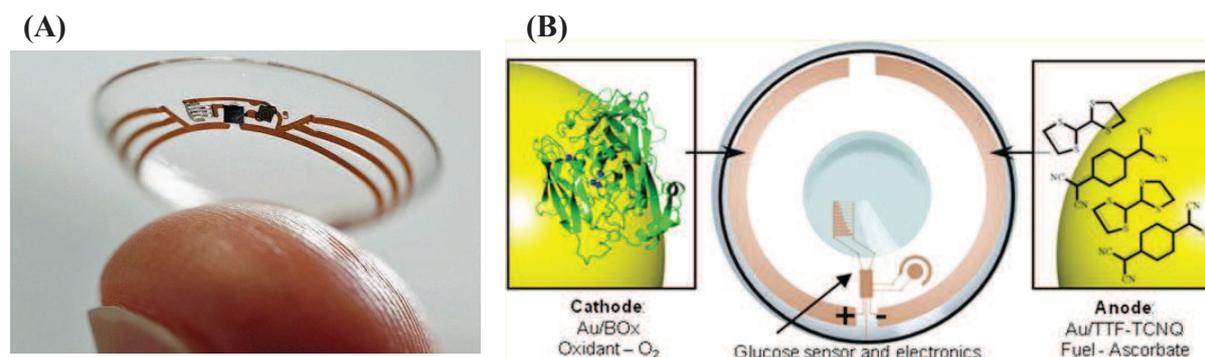


Figure 1.3.14 : Prototype de lentille de contact pour doser le glucose dans le liquide lacrymal développée par (A) Google [139], (B) Shleev et al [138].

Mesure du glucose dans la salive

De par sa petite taille, la molécule de glucose est capable de diffuser à travers la paroi des vaisseaux sanguins jusque dans le fluide gingival puis dans la salive où il va être présent en très faible quantité (0,008 à 0,21 mM) [140]. Même s'il a été clairement démontré qu'une hausse de glucose sanguin entraînait une hausse de glucose salivaire, il n'a pu être établi de formule permettant de les corrélérer directement et fonctionnant systématiquement. De plus, la majorité des biocapteurs développés sont non-enzymatiques, ce qui est certainement dû à la très faible limite de détection imposée.

Bien que la mesure du glucose sanguin soit la méthode la plus fiable et la plus précise (très large gamme de détection), elle est néanmoins désagréable pour le patient en raison des piqûres journalières. Par conséquent, le dosage du glucose dans les autres fluides biologiques s'est développé avec la promesse générale d'une mesure indolore et non-invasive. Actuellement l'ensemble des techniques mises au point pâtissent d'un manque de sensibilité et de sélectivité qui empêche leur utilisation à grande échelle.

L'ensemble des systèmes présentés étant destinés à fonctionner dans l'organisme, il est à présent nécessaire de s'intéresser aux exemples d'implantation de biopiles rapportés jusqu'à maintenant.

3.4.Utilisation des biopiles en milieu biologique : mesures *in vivo*

Au cours des dernières décennies, les chercheurs se sont concentrés sur l'optimisation des biopiles et de leurs différents composants dans des conditions pseudo-physiologiques. En parallèles des investigations *in vitro*, il est nécessaire d'évaluer l'efficacité des différents

systèmes *in vivo*. En effet, il existe de nombreux exemples de biopiles potentiellement implantables, mais très peu d'entre elles l'ont réellement été [141-143].

Nous allons répertorier ici les systèmes implantés dans différents organismes vivants, que ce soit dans les plantes, les animaux (mollusques, insectes, mammifères) ou l'homme.

3.4.1. Chez le végétal

La toute première implantation rapportée dans la littérature a été publiée par Mano et al en 2003 (figure I.3.15.A) [73]. La biopile, implantée dans un grain de raisin, était constituée de 2 fibres de carbone sur lesquelles étaient immobilisés des hydrogels à base d'enzyme (GOx/BOD) et de polymère d'osmium. La puissance générée dépendait alors nettement de la position des électrodes dans le fruit : à proximité de la peau la puissance maximale était de $240 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ à $0,52 \text{ V}$ alors qu'au centre elle diminuait à $47 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, toujours vers $0,52 \text{ V}$. Une perte de puissance de seulement 22% a été constatée après 24h de fonctionnement continu.

Un autre exemple d'implantation dans le raisin a été développé par Miyake et al en 2011 [144] (figure I.3.15.B), permettant d'obtenir $111 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ à $0,25 \text{ V}$ avec une cathode à diffusion gazeuse (BOD) et une anode en Ketjenblack sur fibre d'or (FDH).

MacVittie et al ont quant à eux implanté leur biopile dans une orange (figure I.3.15.C) en 2014 [145]. Leur biopile en buckypaper (feuille de nanotubes de carbone), avec une laccase à la cathode et un mélange GDH/FDH à l'anode, a produit $90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ à $0,37 \text{ V}$.

Enfin, en étant implantée dans un cactus (figure I.3.15.D), la biopile de Flexer et al a pu servir de capteur pour visualiser en temps réel le processus de photosynthèse de la plante modulé par la présence ou non de lumière [146]. Les électrodes implantées à base de GOx et BOD pouvaient en parallèle produire de l'électricité à partir du glucose et de l'oxygène issus de la photosynthèse même du cactus.

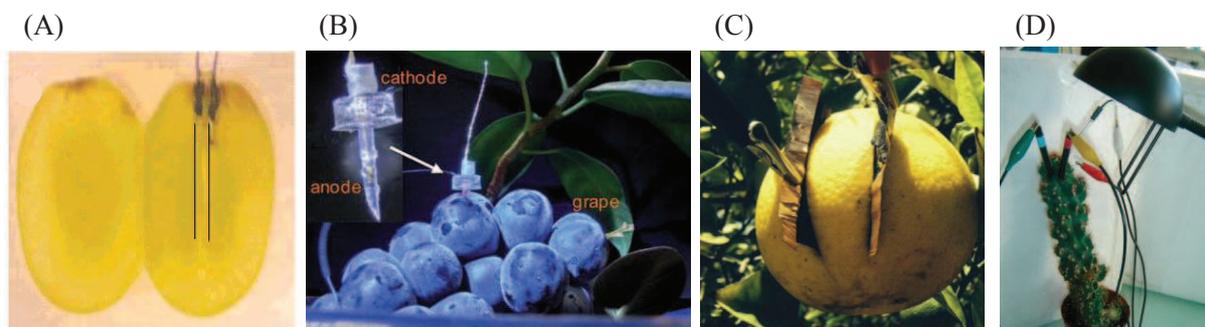


Figure I.3.15 : Exemples d'implantation de biopiles dans (A), (B) des grains de raisin [73, 144], (C) une orange [145] et (D) un cactus [146].

3.4.2. Chez l'animal

Les premiers exemples d'implantation de piles à combustible dans des organismes vivants datent des années 70 avec les travaux de Drake et al [147] et de Malachuk et al [148] qui ont respectivement utilisé comme modèle le chien et le mouton. Néanmoins les 2 systèmes implantés étaient abiotiques, c'est-à-dire non biologiques.

Il faudra attendre 2010 pour que soit implantée la première biopile enzymatique par l'équipe de Cline [102], ouvrant la voie à d'autres implantations chez les vertébrés comme les invertébrés (figure I.3.16). La totalité des systèmes implantés sont des biopiles à glucose/O₂ : l'omniprésence du sang (ou hémolymphe pour les invertébrés) rend ces deux substrats disponibles en permanence et en quantité suffisante pour le fonctionnement de la biopile.

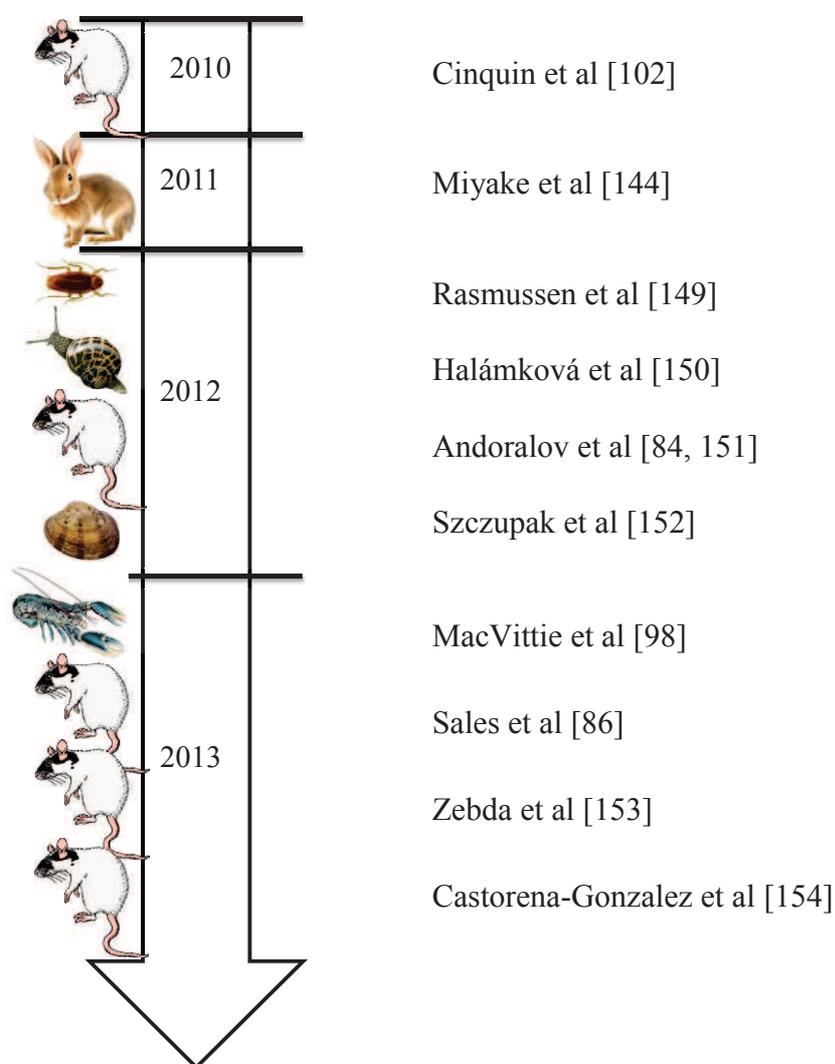


Figure I.3.16 : Chronologie des implantations de biopiles enzymatiques dans des animaux.

Le tableau ci-après présente un résumé des caractéristiques de l'ensemble des dispositifs implantés dans les animaux présentés ci-dessus.

Equipe	Organisme et localisation	Carburant/ oxydant	Enzymes	Electrodes	Médiateur	Membrane externe	Performances	Stabilité
2010 Cosnier S.	Rat – Espace rétropéritonéal	Glucose/O ₂	GOx/PPO	Disque de graphite compacté	Quinone/ubi- quinone	Sac de dialyse + PTFE épais	24,4 μW/cm ³ à 0,13 V	-25% après 2,5h
2011 Nishizawa M.	Lapin – Veine de l'oreille	Glucose/O ₂	GDH/BOD	An : Ketjenblack et PLL-NAD ⁺ sur or Cath : diffusion gazeuse	Vitamine K3	MPC (2-méth- acryloyloxy- ethyl phospho- rylcholine)	131 μW/cm ² à 0,56 V	nc
2012 Rasmussen M. Scherson D.	Cafard – Abdomen	Trehalose/O ₂	TOx- GOx/BOD	Tiges de carbone	Polymère d'osmium	Capillaire en verre	55 μW/cm ² à 0,20 V	-6,5% après 2h
2012 Katz E.	Escarrot – Hémolymphe	Glucose/O ₂	GDH/laccase	Buckypaper (CNTs compressés en feuille mince)	-	-	30 μW/cm ² à 0,39 V	-10% après 1h
2012 Shleev S.	Rat – Cerveau	Glucose/O ₂	CDH/BOD	Fibre d'or modifiée avec des nanoparticules d'or	-	nc	2 μW/cm ² à 0,40 V	-50% après 2 h
2012 Katz E.	Palourde – Hémolymphe	Glucose/O ₂	GDH/laccase	Buckypaper	-	-	40 μW/cm ² à 0,17 V	-50% après 48h puis 10% par jour
2013 Katz E.	Homard – Hémolymphe	Glucose/O ₂	GDH/laccase	Buckypaper	-	-	640 μW/cm ² à 0,28 V	nc
2013 Crespilho F.	Rat – Veine jugulaire	Glucose/O ₂	GOx/nano- particules de Pt	Fibres de carbone flexibles	Neutral red	Cathéter jugulaire en polyéthylène	95 μW/cm ² à 0,08 V	-47% après 5min puis stable pendant 24h
2013 Cosnier S.	Rat – Espace rétropéritonéal	Glucose/O ₂	GOx/laccase	CNTs	-	Sac de dialyse + silicone + Dacron®	193,5 μW/cm ²	nc
2013 Katz E.	Rat – Muscle crémaster	Glucose/O ₂	GDH/laccase	Buckypaper	-	-	70 μW/cm ² à 0,23 V	nc

3.4.3. Chez l'homme

Il n'y a jusqu'à ce jour aucun exemple d'implantation de biopiles chez l'être humain. Cependant plusieurs tests ont été réalisés *in vitro* dans des fluides biologiques humains tels que le sang ou le sérum.

Très peu de mesures dans le sang humain ont été rapportées à ce jour. Tout d'abord, en 2010, Nien et al [155] ont démontré l'efficacité de leur biopile GOx/laccase à membrane dans un unique échantillon de sang (prélevé sur un des membres du laboratoire) auquel 0,1 M de KCl a été rajouté pour servir d'électrolyte. La densité maximale de puissance à 25°C était de 25 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ dans le sang. La même année, Pan et al ont mis au point une biopile en nanofibres d'oxyde de zinc à base de GOx et laccase, sans médiateur ni membrane et produisant 5,56 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 0,07 V dans le sang humain [156]. En 2012, l'équipe de Shleev a développé une biopile qu'ils ont testée dans le sang, utilisant la CDH et la BOD immobilisées directement sur des électrodes d'or et de nanoparticules d'or. Dans 2 échantillons de sang, ils ont pu générer 2,8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ [83] et 2,61 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ [82] à un potentiel de 0,47 V.

Hormis les mesures dans le sang, il y a également des publications concernant le sérum humain. Il est plus facile à utiliser que le sang car débarrassé de toutes ses cellules et facteurs de coagulation. Nous citerons chronologiquement, les travaux de :

- Gao et al avec une puissance générée de 5 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 0,4 V avec ajout de 10 mM de NAD^+ et dilution du sérum dans du tampon sodium phosphate 100 mM [157] ;
- Li et al avec 35 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 0,39 V et ajout de 10 mM NAD^+ [158] ;
- Coman et al avec 3 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 0,37 V [79] ;
- Ammam et al en 2010 avec 160 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 0,21 V [159] puis en 2012 avec 69 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 0,151 V et ajout de 5 mM glucose [160] ;
- Castorena et al avec 70 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 0,23 V [154]
- Ó Conghaile et al avec 37 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 0,26 V [161] ;
- Holade et al avec 50 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 0,16 V et ajout de 5,4 mM glucose [162] ;
- Scherbahn et al avec 41 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 0,39 V [87] ;
- récemment Kwon et al qui sont parvenus à 1,02 mW/cm^2 à 0,40 V [94] et 1,1 mW/cm^2 à 0,50 V [163].

Enfin, certains chercheurs s'intéressent à des électrolytes imitant les conditions physiologiques, comme par exemple en se plaçant dans du sérum de veau [164, 165], dans du sang artificiel [166], ou encore en reproduisant le flux de la circulation sanguine [167].

3.5. Conclusion intermédiaire

Les biopiles s'imposent à présent comme une alternative intéressante aux piles à carburant traditionnelles, que ce soit pour des applications de grande échelle comme le traitement des eaux usées grâce aux biopiles microbiennes ou de très petite échelle telle que l'alimentation de mini capteurs biomédicaux avec les biopiles enzymatiques.

Les biocapteurs sont en plein développement, notamment dans le cadre du contrôle du diabète, et le but est de pouvoir les implanter chez les patients, pile incluse, ce qui est impossible avec les batteries traditionnelles. Les biopiles enzymatiques et notamment celle à glucose/oxygène se proposent de résoudre cette problématique : les catalyseurs d'origine naturelle sont, à priori, biocompatibles, la sélectivité des enzymes permet une importante miniaturisation et les carburants sont disponibles en permanence dans les divers fluides biologiques humains ce qui permet un fonctionnement en continu.

Il faut donc évaluer l'efficacité de la biopile non seulement en conditions pseudo-physiologiques mais aussi idéalement directement dans du sang humain ou même par implantation dans l'animal. C'est pourquoi dans le chapitre 2 de ce manuscrit, nous nous pencherons sur la biocompatibilité de la cathode que nous avons développée, par des tests en culture cellulaire ainsi que chez la souris. Dans le chapitre 3, après avoir optimisé notre biopile dans un tampon enrichi en glucose en oxygène, nous nous attacherons à tester cette même biopile dans différents échantillons de sang humain, de façon à calibrer la puissance générée en fonction de la glycémie de chaque donneur.

4. Anodes et cathodes enzymatiques

Dans cette partie, nous nous efforcerons de détailler l'ensemble des constituants des anodes et cathodes enzymatiques et des méthodes pouvant être utilisés pour la conception de biopiles enzymatiques : les matériaux d'électrode, les médiateurs et les catalyseurs, sans oublier de décrire les différentes voies d'immobilisation des enzymes et les mécanismes du transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode.

4.1. Les matériaux d'électrode

Tout d'abord, intéressons nous aux différents matériaux utilisés comme support aux réactions d'oxydoréduction.

L'électrode est un transducteur chimique miniature qui fonctionne en combinant un processus électrochimique et une activité d'immobilisation des enzymes. Le premier critère dans le choix du matériau est basé sur sa conductivité électrique et sur sa stabilité mécanique. D'une manière générale, les électrodes sont constituées de supports solides comme l'or, le platine ou le carbone qui serviront de base à l'élaboration d'un matériau plus complexe.

La conception d'électrodes en 3 dimensions permet de maximiser la densité de puissance. La multi-dimensionnalité donne des pores de petite taille pour favoriser la stabilisation de l'enzyme et faciliter le transfert électronique, et de grande taille pour permettre la bonne diffusion des substrats en phase liquide. La multi-directionnalité confère une plus grande surface d'échange avec la phase contenant le substrat et permet de réduire le volume de matrice inaccessible [57].

Plusieurs types de matériaux peuvent être utilisés pour synthétiser ces électrodes.

4.1.1. Electrodes métalliques

4.1.1.1. Généralités

Les électrodes métalliques et particulièrement celles ayant une surface nanostructurée ont largement été développées ces dernières années [168-201]. Hautement conducteurs, ces matériaux présentent une très grande surface active pouvant être de 2 à 1000 fois supérieure à celle d'une électrode plane équivalente. Leur structure peut être ordonnée, hiérarchisée ou aléatoire selon la méthode de fabrication et l'application envisagée. L'augmentation de la surface active permet ainsi de fixer une plus grande quantité de catalyseur conduisant à une détection plus sensible et plus efficace des substrats.

Si l'or et le platine sont les deux métaux les plus utilisés, des matériaux à base de cobalt, de palladium, de nickel, de cuivre ou encore d'argent ont également été rapportés [201-203]. Plusieurs méthodes de synthèse de ces matériaux peuvent être utilisées (figure I.4.1) :

- (A) électrode macroporeuse préparée à partir de billes de latex, silice ou polystyrène monodisperses. Taille des pores = 100 à 5000 nm [172, 179, 180, 191, 202, 204],
- (B) électrode hiérarchisée préparée à partir de billes de latex, silice ou polystyrène polydisperses. Taille des pores = 20 à 5000 nm [191],
- (C) électrode nanoporeuse préparée par désalliage sélectif au sein d'un alliage Au/Ag, Au/Ni ou Pt/Cu par exemple. Taille des pores = 5 à 50 nm [182, 192, 203, 205-207],
- (D) nanoparticules métalliques. Taille des particules = 5 à 50 nm [189, 190, 208, 209],

(E) électrode à base de bâtonnets métalliques ordonnés. Largeur des bâtonnets = 20 à 500 nm [185, 186, 210],

(F) électrode constituée d'un tapis de nanofibres métalliques. Largeur des fibres = 300 à 600 nm [187, 188, 211].

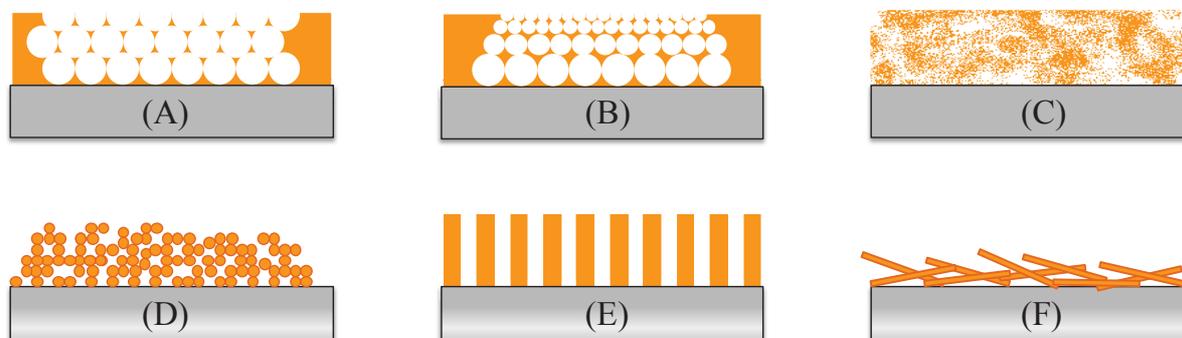


Figure 1.4.1 : Exemples de matériaux nanostructurés ; les parties métalliques des électrodes sont signalées en orange.

Qualifiées généralement de nanoporeuses, les électrodes métalliques peuvent être sous classées en électrodes microporeuses et mésoporeuses lorsque la taille des pores est respectivement de 0,2 à 2 nm et de 2 à 50 nm [212].

4.1.1.2. Electrodes d'or

Les électrodes d'or sont largement utilisées car elles présentent une bonne conductivité, elles sont chimiquement et mécaniquement stables, leur fabrication et leur fonctionnalisation sont bien maîtrisées et l'or est un matériau reconnu biocompatible [183].

L'ensemble des méthodes de fabrication citées ci-avant sont applicables à la conception d'électrodes d'or. Dans le chapitre 2, nous reviendrons plus en détail sur la première méthode mentionnée.

En plus de servir de matériau propre, les nanoparticules d'or sont très utilisées en complément d'autres matériaux servant de support. Petites, elles vont jouer le rôle de relais électrique entre la surface de l'électrode et le centre rédox de l'enzyme, facilitant ainsi le transfert électronique et conduisant à l'augmentation du courant et de la stabilité de l'électrode [208, 209, 213-219]. Ce sera également le cas pour de nombreuses autres nanoparticules à base de platine, de fer ou les nanoparticules d'oxydes de métaux (TiO_2 ou WO_3 par exemple).

4.1.1.3. Electrodes de platine

L'autre métal largement utilisé comme matériau d'électrode est le platine [169-176, 178, 182]. Il est particulièrement utilisé pour la détection du H₂O₂, la détection non enzymatique du glucose ainsi que la réduction de l'oxygène [173, 175, 176]. Il a récemment été montré que l'utilisation de platine poreux à l'anode permettait de réduire l'influence de l'oxygène sur le potentiel anodique [220, 221].

De même que pour les nanoparticules d'or, il est possible d'utiliser les nanoparticules de platine pour augmenter les performances du matériau support. L'équipe de Willner a ainsi utilisé des nanoparticules de platine pour augmenter plus de 10 fois le courant produit par un film polymérique de thioaniline encapsulant de la BOD [222].

4.1.2. Electrodes carbonées

4.1.2.1. Nanotubes de carbone

On utilise notamment des nanotubes de carbone en raison de leur comportement semi-conducteur et de leur importante porosité ; de plus ils sont adaptés pour la conception d'électrodes car mécaniquement stables. Ils sont catégorisés en nanotubes de carbone monofeuillets ou SWNTs (Single-Walled NanoTubes) et multifeuillets ou MWNTs (Multi-Walled NanoTubes). Les SWNTs sont constitués d'un feuillet de graphène enroulé sur lui-même et les MWNTs sont constitués de plusieurs feuillets de graphène enroulés en cylindres concentriques. Les premiers ont généralement un diamètre compris entre 0,5 et 1,5 nm pour une longueur allant jusqu'à 100 nm alors que les seconds ont un diamètre plus large, supérieur à 100 nm avec une longueur de 0,1 à 50 µm [223].

Même si la plupart du temps les nanotubes sont utilisés allongés, c'est-à-dire parallèles à l'électrode, ils peuvent aussi être orientés verticalement pour servir de nano-connecteur entre l'enzyme et l'électrode (figure I.4.2) [224-226].

Leur utilisation est désormais très répandue dans tous les domaines en science des matériaux et ils ont été largement décrits dans la littérature en tant que nanomatériaux pour la construction d'électrodes enzymatiques [227-232].

Les nanotubes peuvent exister sous plusieurs formes : libres en poudre ou en suspension, alignés = fibre de nanotubes de carbone ou compactés sous forme de feuille mince = buckypaper [233, 234]. Il est également possible d'assembler les fibres de carbone

entre elles par filage et même par tissage [235-237] afin d'obtenir un matériau avec une grande surface active et une grande robustesse mécanique. Par tissage de fils de fibres de nanotubes de carbone, Kwon et al ont obtenu un « tissu » : en l'utilisant comme matériau pour construire les biopile, ils ont pu générer 2,18 mW/cm² à 0,70 V [94], ce qui dépasse de loin les performances des autres biopiles décrites dans la littérature jusqu'à présent.

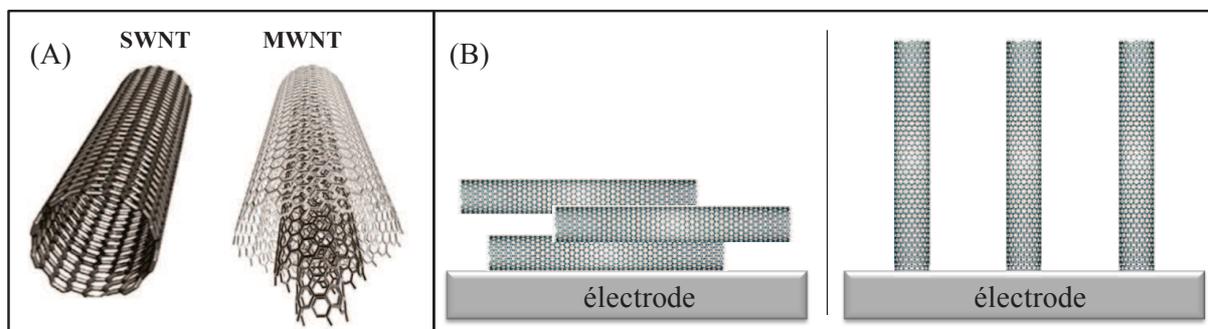


Figure 1.4.2 : (A) représentation des structures des SWNTs et MWNTs ; (B) schéma de nanotubes de carbone organisés horizontalement ou verticalement par rapport à la surface de l'électrode.

Les nanotubes de carbone sont utilisés comme médiateurs dans le transfert d'électron soit directement soit après fonctionnalisation par des molécules ayant une utilité précise.

Dans le premier cas, les enzymes sont directement fixées sur les parois des nanotubes, soit de manière covalente [238-240], soit par adsorption [241], soit par encapsulation [65].

Dans le second cas, les nanotubes de carbone peuvent être fonctionnalisés avec de nombreuses molécules ayant plusieurs objectifs :

- fixer l'enzyme quand cela n'est pas efficace de façon directe [87, 226],
- améliorer l'orientation de l'enzyme pour faciliter la réaction chimique et le transfert électronique [242-244],
- augmenter la stabilité et l'activité des enzymes, par exemple en utilisant des liquides ioniques [245, 246],
- améliorer la solubilité des nanotubes de carbones en milieu aqueux pour éviter leur agrégation à la surface de l'électrode grâce à des dérivés de la cellulose [247, 248].

Les nanotubes de carbones peuvent être utilisés combinés à d'autres matériaux afin d'augmenter leur efficacité. Par exemple, il est possible de les mélanger à un polymère afin d'obtenir un film de nanotubes de carbone, hautement stable et conducteur [249, 250] ou de les assembler avec des nanoparticules d'or [251], de platine [252] ou de Fe₃O₄ [253] pour n'en citer que quelques unes.

4.1.2.2. Carbone poreux

En plus des nanotubes de carbone, il existe des nanomatériaux carbonés poreux qui peuvent être synthétisés par procédé sol-gel (sur lequel nous reviendrons après) [230] ou par d'autres méthodes comme la chimie intégrative.

Flexer et al [254-256] ont élaboré des monolithes « charbonneux » micro/macroporeux à partir d'une mousse solide de silice macrocellulaire comme modèle et caractérisés par une grande surface active et une bonne modulabilité de la taille des pores (figure 1.4.3). En l'utilisant comme matériau pour une biopile GOx/BOD, ils ont obtenu $202 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 0,40 V.

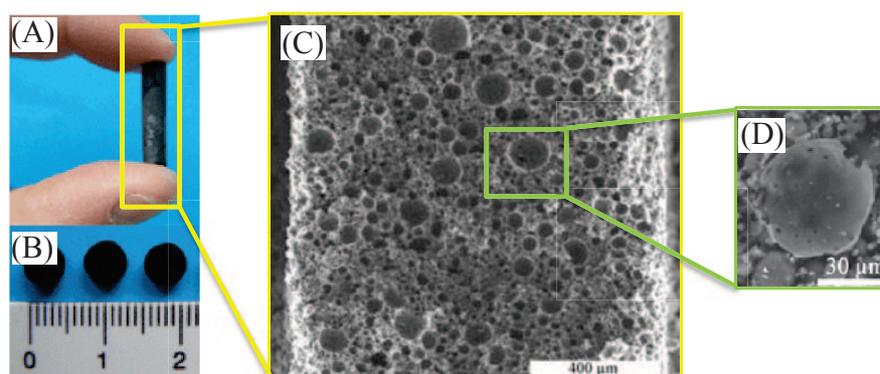


Figure 1.4.3 : Structure détaillée du matériau carboné de Flexer et al [254, 255].

Zhou et al ont mis au point des électrodes de carbone mésoporeux hautement ordonnés ayant une structure tridimensionnelle de pores interconnectés [257]. Bao et al ont quant à eux eu recours à l'irradiation par microondes pour synthétiser un carbone poreux et hydrophile présentant des pores de taille très régulière et une importante surface active [258].

4.1.2.3. Matériaux composites à base de carbone

Comme leur nom l'indique, ces matériaux sont la combinaison d'un conducteur électronique en poudre (en général il s'agit de poudre de carbone) et d'un agent de liaison (polymérique ou pâteux) qui assure la cohésion du matériau. Les agents de liaison pâteux incluant les hydrocarbures aliphatiques et les composés aromatiques doivent être inertes, purs, inactifs électriquement et caractérisés par de faibles volatilité et solubilité dans la solution d'analytes.

Nous pourrions par exemple citer dans cette catégorie les travaux de Tsujimura et al [259] qui ont utilisé de l'aérogel de carbone mélangé à du poly(vinylidène difluorure) afin d'obtenir une pâte de nanoparticules de carbone qu'ils ont ensuite déposés sur une électrode carbone vitreux ou du papier de carbone. Le même genre de matériau peut être réalisé à partir

de Ketjenblack (noir de carbone = petites particules de carbone pur) [260] ou de cryogel de carbone - préalablement réduit en poudre - [261] et mélangés à un liant polymérique. Les matériaux ainsi obtenus présentent une grande conductivité ainsi qu'une importante surface active très poreuse, idéale pour l'immobilisation d'enzymes.

Filip et al [262] ont quant à eux mis au point un matériau composé de Ketjenblack et de nanotubes de carbone, utilisant le chitosan comme liant permettant l'immobilisation électrostatique de la BOD. Leur électrode enzymatique se caractérisait par une faible résistance au transfert de charge, une grande conductivité des protons et une faible surtension pour la réduction de l'oxygène.

4.1.3. Matériaux polymériques

4.1.3.1. Les polymères conducteurs

Ce sont des polymères conducteurs, électroactifs et généralement biocompatibles d'où leur appellation CEPs (*conductive electroactive polymers*) [263]. Ils sont très utilisés car ils lient le site actif de l'enzyme et permettent un transfert d'électron approprié au niveau des électrodes. Néanmoins, leur potentiel rédox est fixe et ne peut donc pas être modulé comme c'est le cas pour les polymères à base de complexes métalliques (osmium, ruthénium,...).

Les plus connus et utilisés d'entre eux sont le polypyrrole (PPy), la polyaniline (PANi) et le poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDOT) [264, 265] en raison de leur stabilité, leur maniabilité et des propriétés rédox que leur confèrent leurs hétéroatomes (azote) [266, 267]. Comme nous pouvons le voir sur la figure I.4.4, la molécule de polyaniline possède plusieurs états rédox, ce qui en fait un composant de choix pour toute application électrochimique [268-272]. En faisant varier les conditions de préparation des films de PANi, il est possible d'obtenir différentes structures, avec une grande surface active et hautement conductrices.

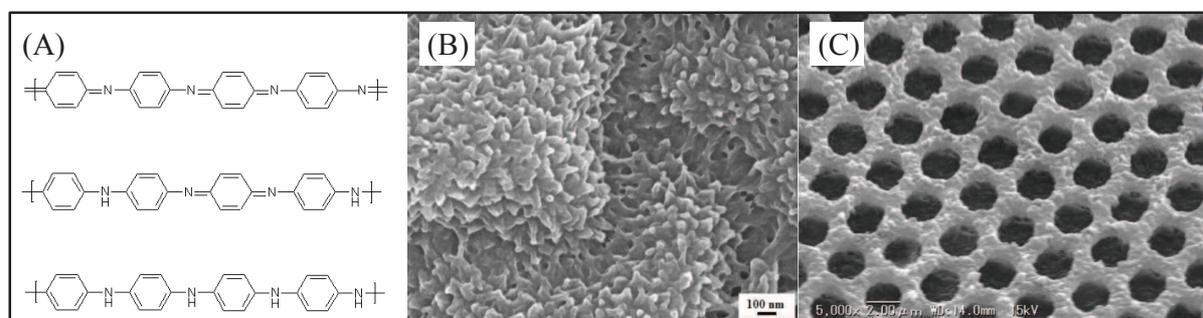


Figure I.4.4 : (A) Formules des 3 états d'oxydation possibles de la polyaniline et exemples de structures obtenues à la surface d'électrodes chez (B) Yu et al [273] ou (C) Karthaus et al [274].

Egalement très répandus, nous pouvons citer les polymères à empreinte moléculaire (ou MIP : *molecularly imprinted polymer*) qui sont définis comme des matériaux possédant des cavités spécifiques (en forme et taille) d'une molécule. Ils sont synthétisés à partir d'une molécule empreinte ou patron autour de laquelle est réalisé le « moulage » du polymère et possèdent donc au final des sites de reconnaissance spécifique de la molécule choisie et de ses analogues structuraux [267, 275, 276].

Ils permettent donc de concevoir des électrodes ayant une sensibilité décuplée pour une molécule donnée. Par exemple, Ulyanova et al ont pu détecter la théophylline, molécule utilisée dans le traitement de l'asthme et possiblement toxique, avec une sélectivité et une reproductibilité jamais atteintes jusqu'alors [277].

4.1.3.2. Les polymères fonctionnalisés

Il s'agit de polymères sur lesquels vont être greffées des molécules ayant une fonction précise, qui peut être d'attacher ou de stabiliser l'enzyme, d'améliorer les propriétés de la matrice de polymère (conductivité, biocompatibilité, hydrophilicité/phobicité,...) ou encore d'attacher le polymère à la surface de l'électrode pour assurer une meilleure stabilité mécanique. Par exemple, Nagel et al ont fonctionnalisé un polymère poly-N-isopropylacrylamide-ferrocène avec des groupes oxirane qui permettent son attachement par auto-assemblage sur une électrode d'or modifiée pour créer un film hydrophile fin et stable [278].

Le polymère fonctionnalisé typique est un polymère électro-déposé sur un support solide et fonctionnalisé par des groupes amino. Ils permettent le coulage de biomolécules via l'activation du groupe carboxylique de la protéine en utilisant la réticulation du carbodiimide. Le polymère sert alors à la fois de matrice d'immobilisation d'enzymes et de médiateur dans le transport d'électrons [279].

Il est également possible de modifier le Nafion® et le chitosan, polymères très utilisés pour concevoir des membranes mais qui peuvent aussi servir de matrice pour immobiliser des enzymes. En particulier, le fait de les rendre hydrophobes peut améliorer non seulement la fixation des enzymes mais aussi leur activité et leur stabilité [280-282].

4.1.4. Matériaux sol-gel

Le terme sol-gel correspond à l'abréviation de « solution-gélification ». A partir de précurseurs et en catalyse acide on réalise tout d'abord une réaction d'hydrolyse/polymérisation qui donne le « sol » puis une gélification donnant ainsi le « gel » [283]. En fonction du traitement appliqué ensuite, différents matériaux sont obtenus (figure I.4.5).

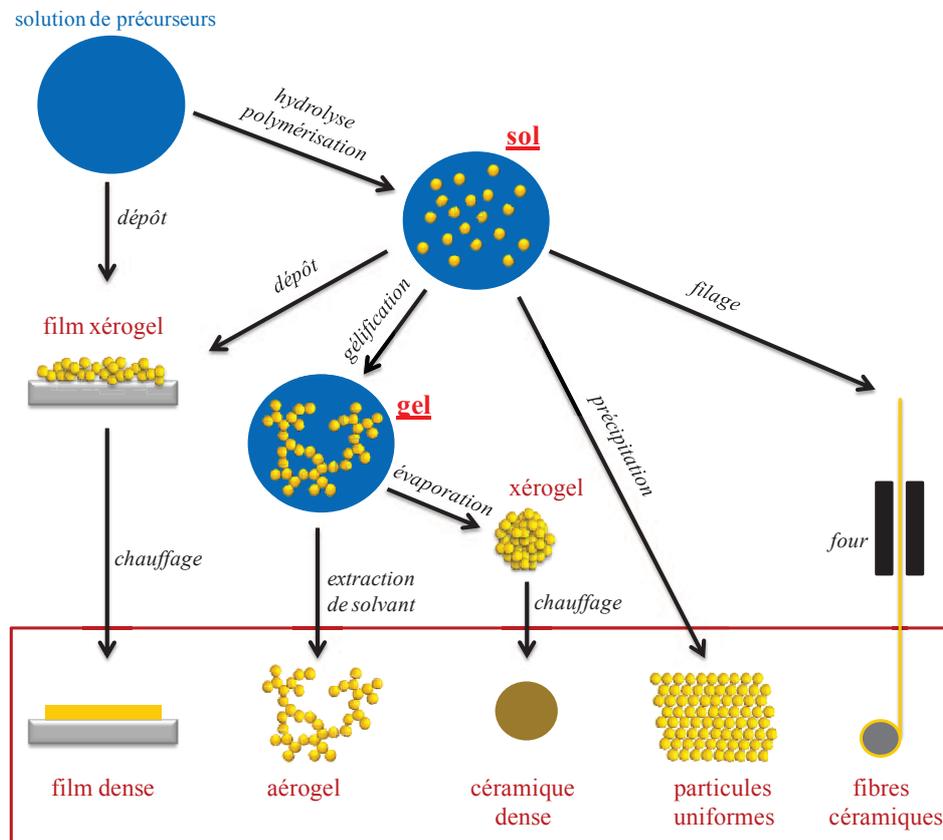


Figure I.4.5 : Les différentes étapes du procédé sol-gel.

Lorsque le gel est soumis à un séchage supercritique (extraction de solvants à hautes pression et température), on obtient un matériau caractérisé par une structure très ouverte avec une grande macroporosité = aérogel. Dans le cas d'un séchage lent (évaporation), les liquides résiduels génèrent de grandes forces de capillarité qui conduisent à la destruction de la macroporosité : il en résulte des structures vitreuses = xérogel. Il est également possible d'obtenir un cryogel par surgélation du gel à -80°C : par pyrolyse de ce matériau nous obtenons ensuite du cryogel de carbone, caractérisé par une importante macroporosité, comme l'aérogel [284-286].

Les matériaux sol-gel fournissent ainsi une autre voie pour la bio-immobilisation en raison de la présence de ponts inorganiques M-O-M ou M-OH-M qui forment un réseau continu comportant une phase liquide qui peut ensuite être séchée pour former une matrice polymérique solide et poreuse [230, 279].

Pour les applications en bioélectrochimie, l'élément biologique (enzyme) est généralement ajouté au mélange pendant la formation du sol ou du gel. L'encapsulation de la molécule se fait alors directement par croissance des chaînes polymériques autour d'elle [283]. Par exemple, Lim et al. ont rapporté la mise au point d'électrodes basées sur l'encapsulation d'enzymes dans une matrice sol-gel d'oxyde de silice. Ils ont également montré que l'incorporation de nanotubes de carbone dans la matrice permettait d'augmenter le transfert électronique [75].

Ce système rencontre plusieurs problèmes : la mauvaise conduction des électrons à travers les pores du réseau, la faible reproductibilité et la nécessité d'optimiser le contrôle de la taille des pores sont autant de facteurs qui limitent l'utilisation des matériaux sol-gel à grande échelle dans le domaine des biocapteurs [287].

4.2. Les enzymes rédox

4.2.1. Généralités

Les enzymes sont des biocatalyseurs : il s'agit de protéines capables d'accélérer une réaction chimique par abaissement de l'énergie d'activation nécessaire à sa réalisation. En tant que catalyseur, les enzymes ne sont pas modifiées au cours de la réaction et n'altèrent pas la thermodynamique de la réaction (figure I.4.6). La diminution de l'énergie d'activation permet également d'augmenter le nombre d'unités de substrat converties en produit par unité de temps et donc l'efficacité de la réaction.

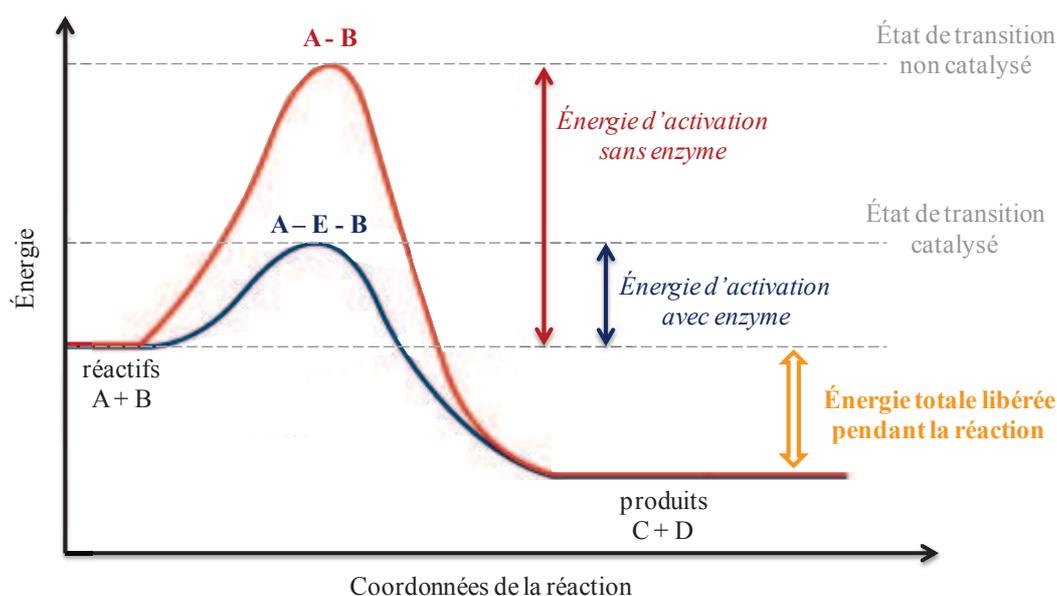


Figure 1.4.6 : Diagramme énergétique d'une réaction catalysée (bleu) ou non (rouge) par une enzyme.

La fonction de l'enzyme est de fournir de la sélectivité selon son affinité biologique pour un substrat ou une gamme de substrat donnée. En effet, chaque enzyme présente une structure unique avec un site actif bien particulier qui va lui permettre de réagir avec un substrat selon un modèle « clé-serrure » à partir de points de reconnaissance spécifiques (figure 1.4.7).

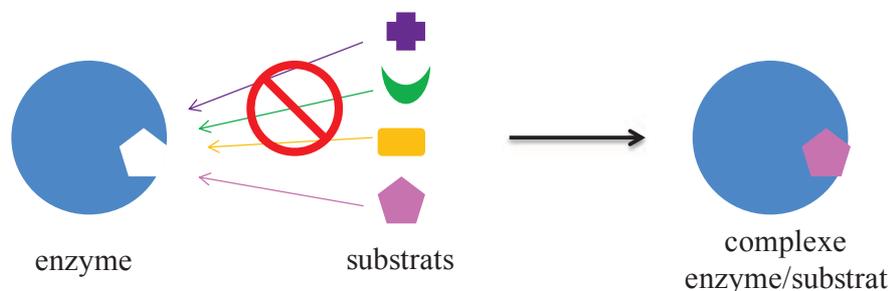


Figure 1.4.7 : Reconnaissance spécifique enzyme-substrat.

Certaines enzymes contiennent en plus de leur structure, une partie non protéique, appelée cofacteur, qui va être nécessaire à leur fonctionnement. Il est situé dans le site actif de l'enzyme où il peut être lié covalamment ou faiblement ou diffuser depuis le milieu extérieur.

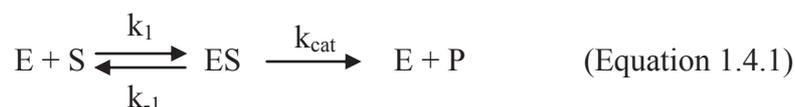
Les cofacteurs peuvent être soit des ions métalliques (cuivre, calcium, nickel, ...) soit de petites molécules organiques qui sont appelées coenzymes et peuvent avoir plusieurs rôles : structurer l'enzyme, relayer les électrons ou transporter le substrat/produit.

Les enzymes vont être classées selon la nature de la réaction qu'elles catalysent. Il existe ainsi 6 catégories d'enzymes définies par la Commission des Enzymes (E.C.) en 1961 :

- les *oxydoréductases* (E.C.1) qui catalysent les réactions d'oxydoréduction,
- les *transférases* (E.C.2) qui catalysent les transferts de groupements fonctionnels d'une molécule à l'autre,
- les *hydrolases* (E.C.3) qui catalysent les coupures de liaisons par hydrolyse,
- les *lyases* (E.C.4) qui catalysent l'élimination de groupements par rupture de liaisons,
- les *isomérases* (E.C.5) qui catalysent les changements de configuration de la molécule,
- les *ligases* (E.C.6) catalysant la condensation de 2 molécules par hydrolyse d'ATP.

4.2.2. La cinétique enzymatique

Une réaction enzymatique simple est décrite par le schéma réactionnel suivant :



avec E l'enzyme et S et P respectivement le substrat et le produit. La notation ES désigne le complexe enzyme-substrat transitoire formé au cours de la réaction.

On évalue l'efficacité de l'enzyme grâce à sa vitesse de réaction en condition initiales notée v_i . Cette vitesse est mesurée en faisant varier la concentration en substrat [S] à concentration d'enzyme [E] constante. La courbe $v = f([S])$ décrite sur la figure 1.4.8.A tend vers une vitesse maximale V_{max} de réaction à laquelle la concentration en substrat est saturante donc l'enzyme atteint le maximal de sa capacité catalytique.

La concentration en substrat et la vitesse de réaction enzymatique sont reliées par l'expression de Michaelis-Menten (figure 1.4.8.B) avec K_M la constante de Michaelis-Menten. En conditions initiales, on constate une première phase d'augmentation linéaire de la de la formation de produit en fonction du temps : l'ensemble du substrat disponible est consommé au fur et à mesure par l'enzyme et l'on considère donc que la quantité de produit formé est négligeable. Cette phase peut durer de quelques secondes jusqu'à plusieurs minutes en fonction des enzymes. La vitesse initiale v_i peut alors être calculée par l'équation de Michaelis-Menten qui est égale à la pente de la tangente à l'origine de la courbe $[P] = f(t)$.

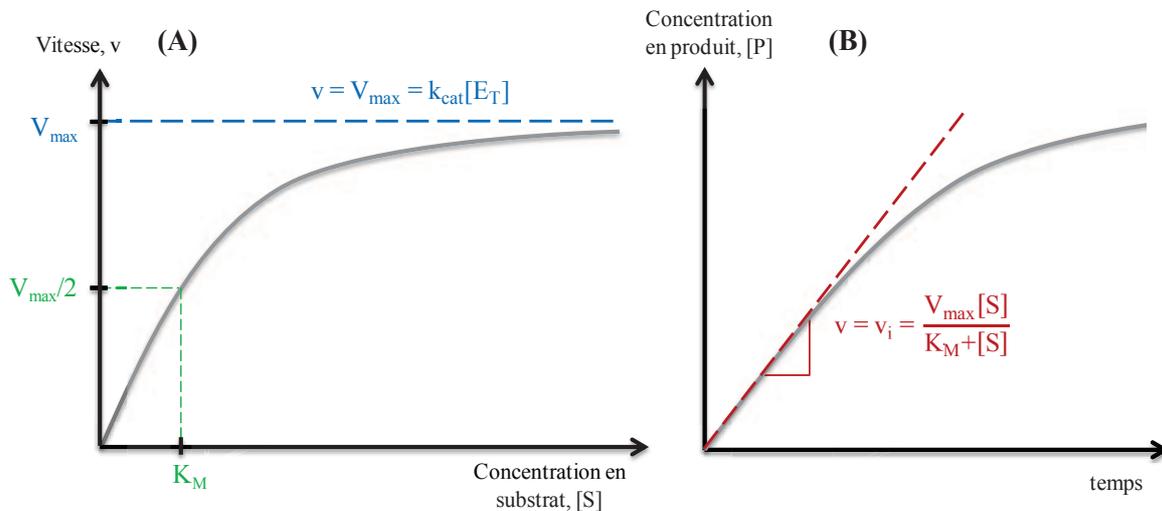


Figure 1.4.8 : Evolution (A) de la vitesse de réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat et (B) de la concentration en produit formé en fonction du temps.

La cinétique de la réaction enzymatique est contrôlée par le taux de formation du produit ou par la disparition du substrat aussi appelé *turn over number* (TON). Le TON maximal, c'est-à-dire à saturation de substrat, correspond à la constante catalytique k_{cat} de l'enzyme (en s^{-1}).

Elle dépend également de l'affinité de l'enzyme pour son substrat qui est inversement proportionnelle à la constante de Michaelis, K_M . Cette grandeur se définit comme la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale et s'exprime donc en mol.L^{-1} .

Le rapport de ces deux constantes k_{cat}/K_M traduit l'efficacité catalytique de l'enzyme : plus il va être grand, meilleure sera la cinétique enzymatique.

4.2.3. Avantages et limitations des enzymes

La structure singulière de chaque enzyme lui permet d'être sélective en terme de substrat. De plus, elles permettent d'accélérer les réactions jusqu'à un facteur d'accroissement de 10^{17} dans le cas de la phosphatase alcaline [288, 289].

Un des principaux problèmes soulevés par l'utilisation d'enzymes comme biocatalyseur est leur courte durée de vie de l'ordre de 8 heures à 2 jours. Cependant, l'immobilisation (par piégeage, liaison chimique ou réticulation) de ces mêmes enzymes à la surface de l'électrode a permis d'augmenter leur durée de vie à 7-20 jours. Récemment, cette durée de vie a été prolongée à 1 an grâce à l'encapsulation dans des polymères micellaires. Ces polymères confinent physiquement l'enzyme et la protègent de la dénaturation en lui fournissant un abri hydrophobe, biocompatible et tamponné [57].

D'un autre côté, l'immobilisation peut affecter la stabilité et l'activité de l'enzyme, entraîner des limitations supplémentaires de transfert électronique et impliquer des coûts supplémentaires. Le point clé est la stabilité et elle va dépendre de la nature et la force des liaisons avec le support, des conditions nécessaires pour l'immobilisation, du degré de confinement et des conditions dans lesquelles se font les réactions enzymatiques à la surface des électrodes. Donc la méthode d'immobilisation doit être choisie soigneusement pour éviter de dénaturer l'enzyme et de perdre la liberté structurale nécessaire à son activité [14].

Enfin, l'enzyme est sensible à de nombreux paramètres environnementaux qui peuvent moduler son activité et sa stabilité, tels que la température, le pH, la force ionique ou encore la concentration en substrat qui peut inhiber l'enzyme lorsqu'elle est trop forte.

4.2.4. Choix des enzymes pour les biopiles

En plus des oxydoréductases, il est possible d'utiliser des enzymes hydrolytiques comme les lipases ou les estérases : soit individuellement pour capter les substrats

lorsqu'aucune oxydoréductase adaptée n'est connue soit en les combinant pour augmenter la spécificité [279].

Les enzymes généralement utilisées à l'anode pour l'oxydation du glucose sont la GOx (très connue car elle intervient dans le métabolisme naturel des sucres) et la GDH. Mais il est également possible d'utiliser la cellobiose déshydrogénase ou les pyranoses oxydase et déshydrogénase. Pour l'oxydation des alcools et du H₂ ce sont respectivement les alcools déshydrogénases et les hydrogénases qui servent de catalyseur [13].

A la cathode, ce sont les laccases ou les BODs qui sont responsables de la réduction de l'oxygène. Ces dernières sont de plus en plus utilisées car, à l'inverse des laccases, elles présentent une bonne activité/stabilité en conditions pseudo-physiologiques, c'est-à-dire à pH neutre et en présence de chlore. La réduction de l'oxygène peut également être assurée par les PPOs (polyphénol oxydases) aussi appelées tyrosinases. Enfin lorsque le substrat O₂ est remplacé par du H₂O₂, les peroxydases pourront être utilisées [92]. Récemment Reuillard et al ont décrit la conception d'une cathode bi-enzymatique GOx/HRP pour la réduction de l'oxygène [290].

4.2.5. Enzymes cathodiques

4.2.5.1. Généralités

Les laccases et les BODs sont des enzymes de la famille des oxydases multicuivres ou MCOs (*multicopper oxidases*). Cette appellation vient du fait qu'elles possèdent 4 atomes de cuivre : un cuivre de type 1 au niveau duquel se déroule l'oxydation du substrat, les électrons générés sont alors transférés à un centre trinuécléaire (TNC) composé d'un cuivre de type 2 et 2 cuivres de type 3, où ils vont servir à la réduction de l'oxygène en eau (figure I.4.9.A).

Le mécanisme réactionnel envisagé est décrit sur la figure I.4.9.B. L'addition d'oxygène sur la forme réduite des MCOs entraîne la formation d'un intermédiaire peroxyde. Après une étape de transfert électronique intramoléculaire, nous obtenons l'intermédiaire natif à partir duquel deux voies réactionnelles sont possibles. Dans le premier cas il s'agit d'une étape rapide permettant de réduire directement l'enzyme. Dans le deuxième cas, le mécanisme se compose d'1 étape à 4 protons avec libération d'une molécule d'eau donnant la forme oxydée quiescente de l'enzyme suivie d'une étape lente pour la réduction de l'enzyme.

De nombreuses études structurales et spectroscopiques ont permis de proposer ce mécanisme réactionnel, mais d'autres recherches sont toujours en cours pour mieux le comprendre et le détailler [20, 291-293].

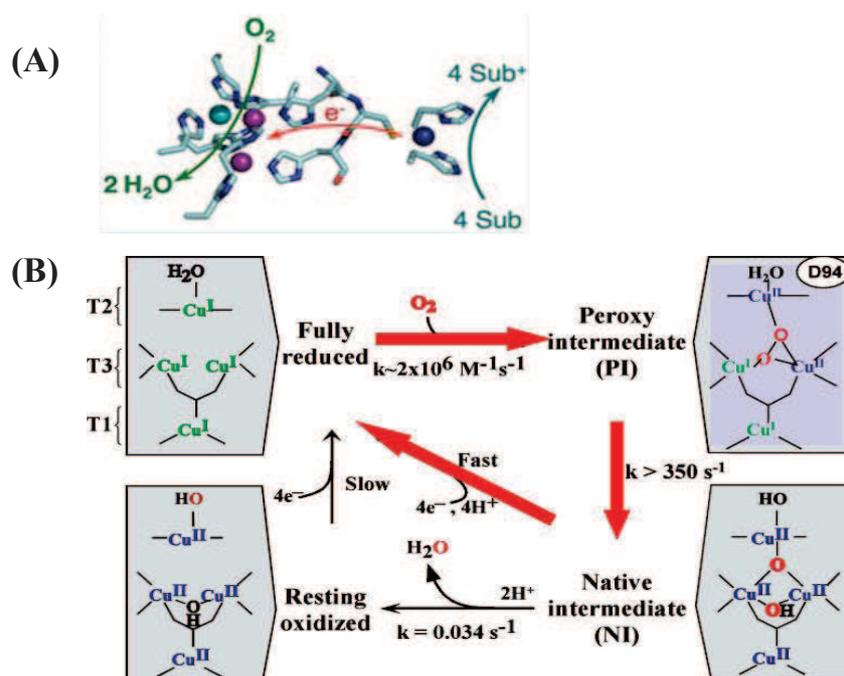


Figure I.4.9 : (A) Représentation du centre actif des MCOs, avec le cuivre T1 en bleu, le cuivre T2 en vert et la paire de cuivre T3 en violet [294]. (B) Mécanisme envisagé de la réduction de l'O₂ en eau par les MCOs [292].

La dénomination de chaque cuivre vient de leurs différentes coordination et propriétés optiques, magnétiques et de résonance, comme nous pouvons le voir dans le tableau I.4.1 :

Pour le Cu T1 on distingue 3 sous-classes en fonction de la nature du ligand axial qui peut être : soit une méthionine (classe 1), soit tout autre acide aminé que la méthionine (classe 2), soit une méthionine et une glycine dans les 2 positions axiales opposées dans le cas particulier des azurines (classe 3).

Cu	T1	T2	T3
Coordination	2 histidines et une cystéine en conformation trigonale plan + 1 ligand variable en position axiale	conformation plan carré par coordination avec les atomes N et O des ligands	3 histidines coordonnées à chaque cuivre de la paire
Spectroscopie UV-visible	Absorbance à 600 nm = transfert de charge entre le S de la cystéine et le cuivre	Aucune absorbance	Absorbance vers 330 nm = transfert de charge du OH ⁻ au Cu ²⁺
Spectroscopie EPR	Signal = espèce paramagnétique (possède 2 électrons non appariés)		Aucun signal car les 2 Cu T3 sont couplés de façon antiferromagnétique via un pont hydroxyle
Spectroscopie Raman	Bandes caractéristiques entre 350 et 500 cm ⁻¹	Aucun signal car forte fluorescence	

Tableau I.4.1 : Caractéristiques des divers cuivres du site actif des MCOs [4, 295-298].

Les MCOs regroupent d'autres enzymes que les laccases [299, 300] et les BODs [301, 302] : en font également partie les céruloplasmines [303-305] et les ascorbate oxydases [306-308]. Ces enzymes sont capables d'oxyder de nombreux substrats dont les phénols, la bilirubine ou l'ascorbate et surtout elles catalysent la réduction de l'oxygène en eau [4]. Cette large gamme de substrats en fait des catalyseurs de choix pour de nombreuses applications telles que la décoloration de colorants synthétiques, le blanchiment de la pâte à papier, la dépollution des sols et bien sûr les biopiles et biocapteurs [21, 309, 310].

Ci-dessous sont regroupées les principales enzymes à base cuivre ainsi que la réaction métabolique qui les caractérise. En plus des MCOs dont le site actif est composé de plusieurs types de cuivre, il existe des enzymes ne possédant que l'un ou l'autre des types de cuivre. C'est par exemple le cas de la tyrosinase (ou phénol oxydase) qui ne possède qu'une paire de Cu T3 (en rouge sur la figure I.4.10).

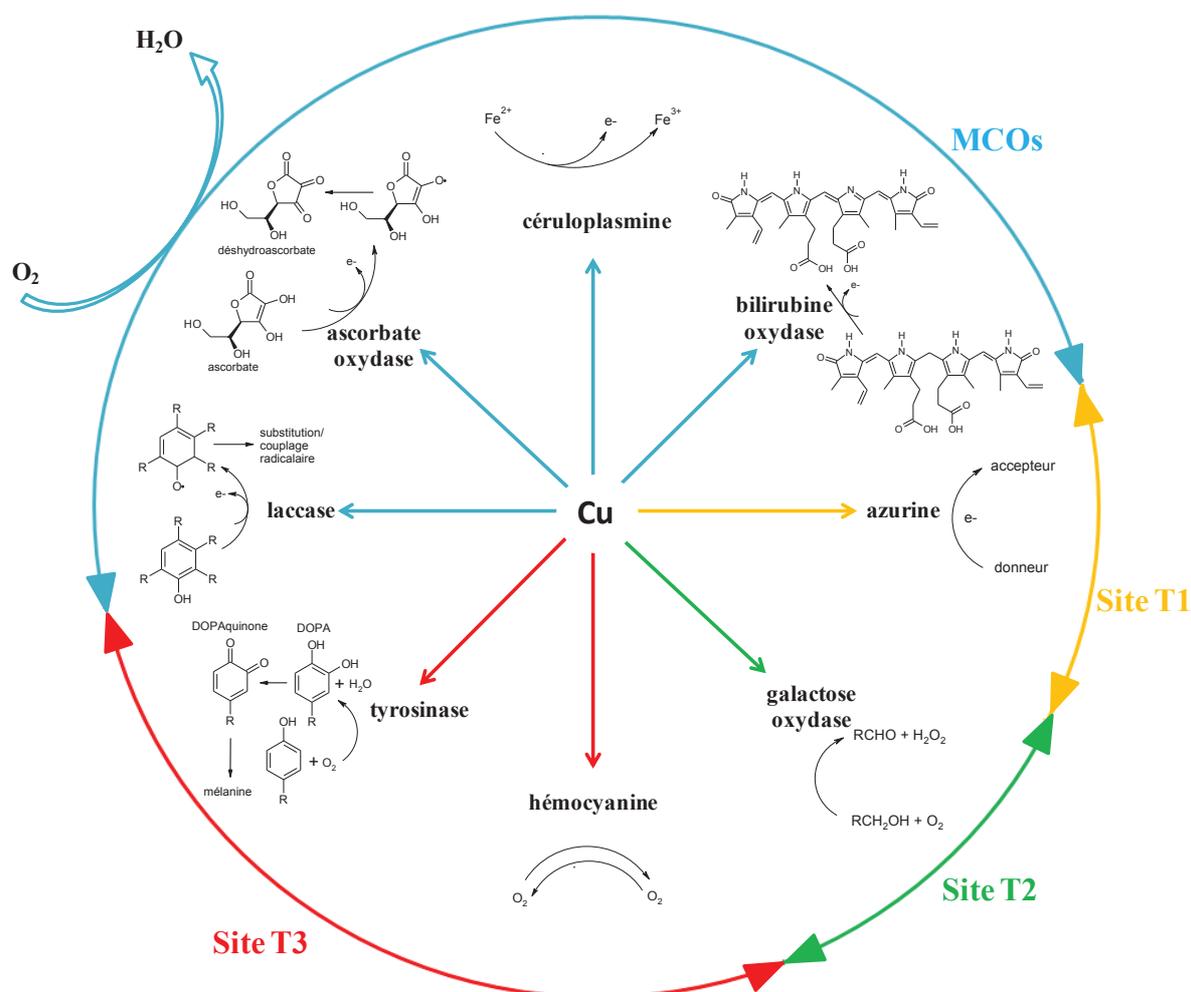


Figure I.4.10 : Classement des principales enzymes à cofacteur de cuivre en fonction de leur site actif, selon qu'elles possèdent un seul type de cuivre ou plusieurs (= MCOs). Pour chaque enzyme est donnée la réaction métabolique type qu'elle catalyse, l'ensemble des MCOs étant en plus capable de réduire l'oxygène en eau (d'après [291, 311, 312]).

4.2.5.2. Les laccases

Les laccases sont des MCOs et peuvent être classées en 2 catégories selon qu'elles sont d'origine végétale ou fongique. Ce sont généralement des monomères ou des homodimères (voire homotétramère pour la laccase de *Podospora anserina*) avec 10 à 45 % de glycosylation en fonction de l'enzyme. Leurs principales fonctions sont la dégradation de la lignine, la formation de pigments et la détoxification industrielle [4]. La réduction de l'oxygène par les laccases est connue depuis 1979 grâce aux travaux de Tarasevich et al [313]. Elle se fait avec une très faible surtension puisque le potentiel du Cu T1 où elle se produit se trouve autour de 0,6V vs. Ag/AgCl [314]. Les laccases sont ainsi largement utilisées dans le domaine des biopiles et biocapteurs [209, 315-317].

Néanmoins, les laccases ont un pH optimal de fonctionnement autour de 5 et sont rapidement inhibée en présence de chlore ce qui diminue leur intérêt pour la conception de biopiles à glucose/O₂ implantables [295]. Cela pourrait cependant changer grâce aux travaux de Mate et al qui, par ingénierie enzymatique sont parvenus à obtenir une laccase tolérante au chlore et opérant à pH 7,4 [166].

4.2.5.3. Les bilirubine oxydases

Comme nous l'avons dit précédemment, les BODs seront préférées aux laccases pour la conception des cathodes à oxygène car, bien que le potentiel de leur Cu T1 se situe autour de 0,40 V vs. Ag/AgCl, elles présentent une meilleure stabilité dans des conditions physiologiques d'utilisation [295, 318]. A noter que la distinction entre laccases et BODs est uniquement basée sur le fait que seules les BODs peuvent oxyder la bilirubine.

Depuis leur découverte en 1981 par Tanaka et Murao [319], de nombreuses BODs ont été identifiées dans des champignons et de bactéries [295]. Les plus connues sont les BODs de *Myrothecium verrucaria* [319-322] et *Trachyderma tsunodae* [302, 323] car ce sont les seules commerciales, bien que la deuxième ne le soit plus depuis quelques années.

Récemment, 2 nouvelles BODs ont été identifiées, produites et purifiées : la BOD bactérienne de *Bacillus pumilus* [324, 325] et la BOD fongique de *Magnaporthe oryzae* [326]. Elles sont nettement plus actives et plus stables que les deux autres BODs préexistantes, par conséquent ce sont celles que nous utiliserons pour l'ensemble des tests réalisés dans ce manuscrit. Une comparaison des 4 BODs sera faite en électrochimie montrant bien un courant de réduction de l'oxygène beaucoup plus élevé pour nos BODs de *B. pumilus* et *M. oryzae*.

Les caractéristiques principales des ces 2 nouvelles BODs ont été résumées ci-après :

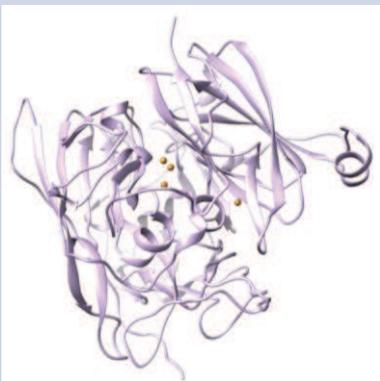
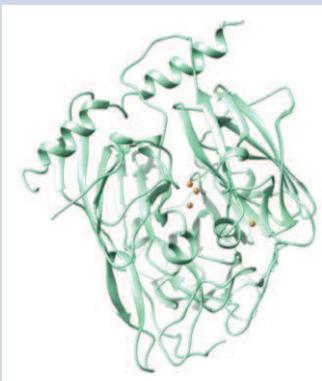
BOD	<i>B. pumilus</i>	<i>M. oryzae</i>
Organisme d'origine	Endospore CotA	Pyriculariose du riz
production	Bactérie <i>Escherichia coli</i>	Levure <i>Pichia pastoris</i>
Point isolélectrique	5,83	5,29
Poids moléculaire	59 kDa	63,7 kDa
Thermostabilité = Activité restante après 300 min d'incubation à 37°C	100 %	70 %
Résistance au chlore = Activité restante après ajout de 150 mM NaCl	100 %	40 %
Structure 3D	 <p>Modèle obtenu d'après la structure de CotA de <i>Bacillus subtilis</i> (1GSK)</p>	 <p>Structure obtenue récemment, soumise à la PDB</p>

Tableau 1.4.2 : Comparaisons des caractéristiques des BODs de *B. pumilus* et *M. oryzae*.
Dans les structures des 2 enzymes, les cuivres sont représentés par les sphères jaunes.

4.2.5.4. Autres enzymes cathodiques

Comme nous l'avons dit précédemment, il est également possible d'utiliser des tyrosinases pour réduire l'oxygène en eau [327]. Elles sont actives à pH neutre et ne sont pas inhibées par le chlore. Contrairement aux MCOs elles ne disposent que d'une paire de Cu T3 en leur site actif, ce qui permet néanmoins de les classer parmi les métalloenzymes à cuivre (figure I.4.10). C'est au niveau de ce complexe dinucléaire que vont se produire la réduction de l'oxygène et le transfert des électrons [328]. Les substrats naturels des tyrosinases sont les polyphénols qu'elles vont oxyder en dérivés quinoniques concomitamment à la réduction de l'oxygène en eau. Elles sont également très connues pour catalyser la production de mélanine chez l'homme.

Elles sont cependant peu utilisées pour la mise au point de biopiles à glucose/O₂ notamment pour 2 raisons : il n'est actuellement pas possible de réduire directement l'O₂ par la tyrosinase immobilisée à la surface d'électrodes et les médiateurs proposés ont un potentiel de réduction très bas.

Dans le cas où l'on s'intéresse à la réduction du H₂O₂, il est alors possible d'utiliser des enzymes de la famille des peroxydases comme la microperoxydase ou la HRP (peroxydase de raifort) [29, 92]. Leur rôle est la décomposition des peroxydes, molécules naturellement toxiques, et vont donc réduire le H₂O₂ en eau via un processus à 2 électrons et 2 protons. Ce sont des hémoprotéines car leur cofacteur est un hème (= atome de fer coordiné par une porphyrine), la HRP possédant en plus 2 atomes de calcium.

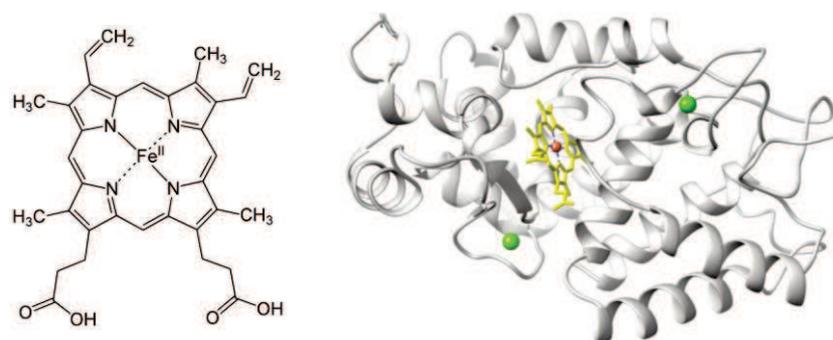


Figure 1.4.11 : Structure du hème et de la HRP (PDB : 1HCH), avec en jaune le hème et en vert les ions Ca²⁺.

4.2.6. Enzymes anodiques

Comme nous allons le voir, les principales enzymes anodiques utilisées sont soit des déshydrogénases soit des oxydases. Une déshydrogénase est une enzyme qui oxyde un substrat par transfert d'un ou plusieurs protons à un accepteur (en général son coenzyme). Une oxydase va catalyser une réaction d'oxydoréduction en impliquant une molécule d'O₂ comme accepteur d'électron et qui va être réduit en H₂O ou H₂O₂.

4.2.6.1. Les glucose déshydrogénases

Il existe plusieurs types de GDH en fonction du cofacteur qui peut être (figure 1.4.12) :

- la pyrroloquinoline quinone (PQQ/PQQH₂),
- la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺/NADH),
- la flavine adénine dinucléotide (FAD/FADH₂).

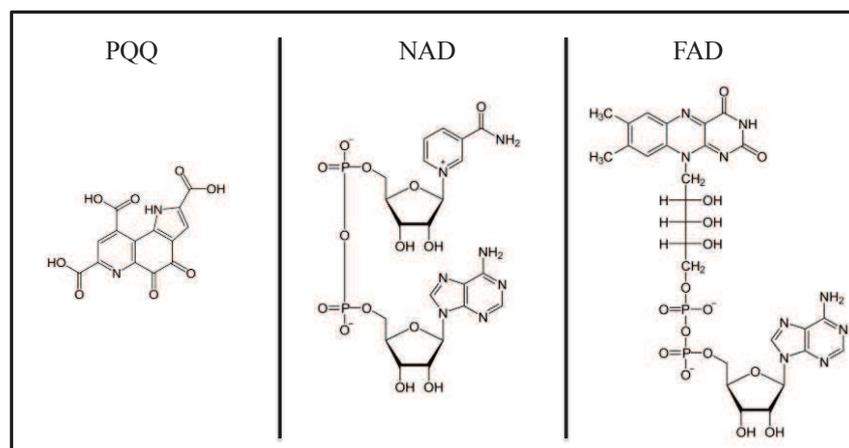


Figure 1.4.12 : Structures des différents coenzymes de la GDH.

La PQQ-GDH est actuellement la GDH la plus répandue : c'est cette enzyme qui est utilisée dans les bandelettes mono-usage des appareils de mesure de la glycémie [329]. Elle est extraite de la bactérie *d'Acinotobacter calcoaceticus* et son coenzyme a un potentiel standard E° de $-0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ une fois immobilisé dans le site actif [330].

Tout comme la GOx elle est dimérique mais elle est insensible à l'oxygène. Son activité catalytique est particulière puisqu'elle fait intervenir une coopérativité négative entre les sites actifs de ses 2 sous unités : lorsque le 1^{er} site actif a lié une molécule de glucose, il devient très difficile pour le deuxième d'en faire de même. Ce phénomène est clairement mis en évidence par les constantes cinétique de la GDH [331]. D'après le tableau I.4.3, on constate que le K_M est ~ 100 fois grand et donc l'affinité ~ 100 fois plus faible pour le deuxième site de fixation du glucose. De plus la PQQ-GDH présente une constante d'inhibition $K_I = 92 \text{ mM}$, ce qui signifie qu'à partir de 92 mM de glucose il y a une inhibition de l'enzyme par le substrat.

Constante	Site actif 1	Site actif 2
$k_{\text{cat}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	1550 ± 190	17200 ± 1600
$K_M \text{ (mM)}$	0.74 ± 0.18	69 ± 12
$k_{\text{cat}}/K_M \text{ (s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}\text{)}$	2095	249
$K_I \text{ (mM)}$	92 ± 13	

Tableau 1.4.3 : Paramètres cinétiques des 2 sites actifs de GDH avec « site 1 » qui correspond au premier site de fixation du glucose et « site 2 » au deuxième site [331].

Néanmoins, elle est peu stable [332] et n'est pas sélective du glucose puisqu'elle oxyde d'autres sucres comme le maltose, le xylose ou le galactose. Chez certains malades, ces sucres se trouvent en quantité anormalement élevée, ce qui rend l'utilisation de la PQQ-GDH

peu fiable pour la mesure du glucose car ces oxydations parasites vont s'ajouter à la glycémie réelle pour donner une valeur totale très largement surestimée [329, 333].

La NAD^+ -GDH est également insensible à l'oxygène. Elle présente une bonne sélectivité pour le glucose même si elle peut également oxyder le xylose et le maltose [329]. Contrairement aux autres cofacteurs, le NADH est faiblement lié au site actif de l'enzyme ce qui implique qu'il est capable de réagir indépendamment de l'enzyme [334].

La FAD-GDH a été découverte récemment : elle possède le même cofacteur que la GOx mais est cependant insensible à l'oxygène [335, 336]. Elle présente l'avantage d'être plus thermostable que la PQQ-GDH (mais toujours moins que la GOx). Elle est également plus sélective au maltose [337] mais reste très sensible au xylose [338].

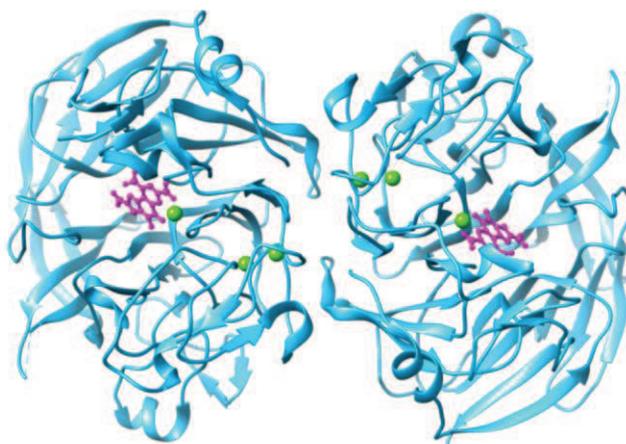


Figure 1.4.13 : Représentation de la structure de la GDH (PDB : 1CQ1), avec en rose la PQQ et en vert les ions Ca^{2+} .

4.2.6.2. Les glucose oxydases

Il s'agit de l'enzyme la plus utilisée pour catalyser l'oxydation du glucose. Le plus souvent elle est produite à partir du champignon *Aspergillus niger*.

Elle se présente sous forme d'un homodimère, c'est-à-dire constituée de 2 sous unités identiques, chacune d'entre elles possédant son propre site actif avec son cofacteur. Le cofacteur de la GOx qui va servir de relais d'électrons est la FAD (flavine adénine dinucléotide). Le couple FAD/FADH_2 a un potentiel d'environ $-0,32 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ à pH neutre une fois immobilisé dans l'enzyme.

Si elle est plus stable en température [332], en terme de cinétique elle est moins efficace que la GDH. En effet, les paramètres cinétiques de la GOx d'*Aspergillus niger* sont $k_{cat} = 822 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 51 \text{ mM}$ et $k_{cat}/K_M = 16 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [339].

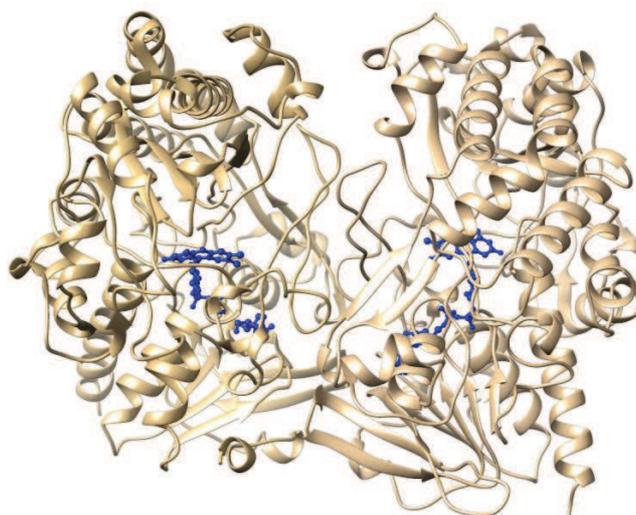


Figure 1.4.14 : Représentation de la structure de la GOx d'*Aspergillus niger* (PDB : 1GAL), avec en bleu le FAD.

Lorsque la GOx est utilisée comme catalyseur anodique, l'oxygène présent peut jouer le rôle d'accepteur d'électron produisant ainsi du H_2O_2 qui peut être nocif pour la cathode enzymatique ou la GOx elle-même [340-342]. En effet, l'oxydation du glucose entraîne la réduction parallèle du cofacteur en FADH_2 . L'accepteur d'électrons naturel de cette espèce réduite est le dioxygène ce qui va entraîner la réaction spontanée suivante :



Néanmoins, certaines méthodes d'immobilisation de la GOx permettent d'éviter les réactions parasites avec l'oxygène [30]. L'ingénierie enzymatique a par ailleurs permis de produire une GOx insensible à l'oxygène grâce au remplacement de son cofacteur naturel, le FAD, par un analogue chloré qui empêche la réduction de l' O_2 en H_2O_2 , le FADCl_2 [339].

Il est aussi possible de construire un système bienzymatique GOx/catalase, la catalase permettant de dismuter immédiatement le H_2O_2 en eau [81, 102, 341, 342].

Enfin il est envisageable d'insérer une membrane entre les 2 électrodes pour empêcher l'oxygène de diffuser à l'anode (comme pour les biopiles microbiennes où l'anode consiste en un compartiment anaérobie) mais cela réduirait les possibilités de miniaturisation de la biopile.

4.2.6.3. Les cellobiose déshydrogénases

Décrite à partir de 1974 par Westemark et al [343], les cellobiose déshydrogénases sont des enzymes extracellulaires produites par différents champignons de dégradation du bois. Elles sont capables d'oxyder efficacement les cellodextrines, mannodextrines et plusieurs types de résidus osidiques (disaccharides comme le lactose et la cellobiose et monosaccharides comme le glucose) en leur lactone respective via la réduction parallèle d'un accepteur d'électrons pouvant être une quinone, un phénoradical, les ions Fe^{3+} et Cu^{2+} ou un ion triiodide pour les plus utilisés [344].

Il s'agit de monomères constitués de 2 domaines distincts, chacun ayant son propre cofacteur : un domaine à FAD et un domaine à hème. Le premier domaine comporte une forte homologie de séquence avec celui de la GOx d'*Aspergillus niger* alors que le second n'a aucune homologie avec les autres enzymes à hème.

Mécanistiquement, nous distinguons 2 demi-réactions d'oxydation et de réduction. La première consiste en l'oxydation à 2 électrons du substrat en sa lactone correspondante qui s'hydrolyse spontanément. Les électrons sont récupérés par le FAD qui va les transmettre à l'hème afin de réduire l'accepteur d'électron (noté A) comme décrit sur la figure I.4.15 [344].

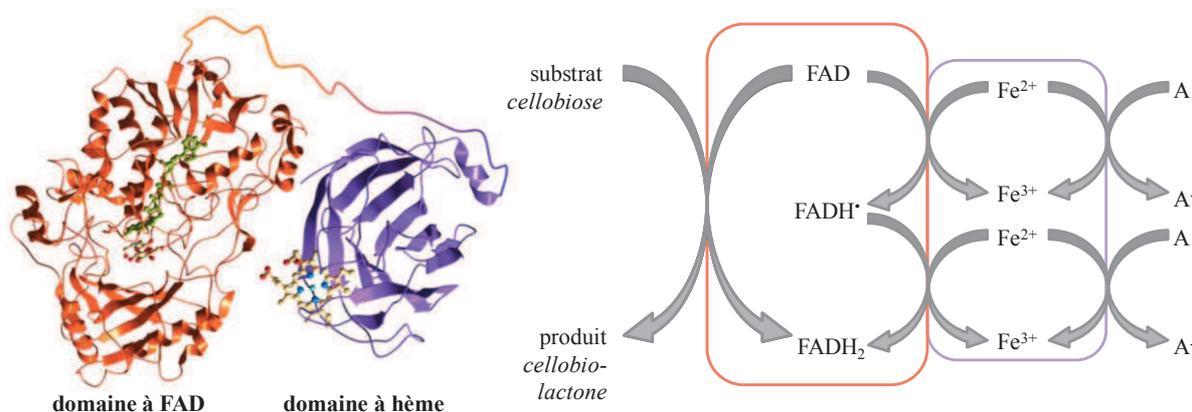


Figure I.4.15 : Structure de la CDH (PDB : 1NAA et 1D7B) et mécanisme réactionnel.

Leurs caractéristiques varient d'une espèce à l'autre mais généralement leur poids moléculaire se situe autour de 100 kDa et leur point isoélectrique vers 4. Elles fonctionnent idéalement entre 50 et 65°C et même si la plupart ont un pH optimal de 5, certaines thermophiles fonctionnent correctement jusqu'à pH 7 [344, 345].

Depuis plusieurs années, les CDH sont utilisées pour la conception d'anodes enzymatiques dans les biopiles, notamment pour l'oxydation du glucose [315, 345-350].

4.2.6.4. Les pyranose oxydases et déshydrogénases

La pyranose déshydrogénase (PDH) est une enzyme à FAD d'environ 67 kDa [351] capable d'oxyder un certain nombre de sucres tels que les aldoses et cétones sous forme pyranose ainsi que les glycosides, le sucrose et le lactose. Elle présente l'avantage d'oxyder indistinctement les 2 anomères du glucose (contrairement à la GOx qui n'oxyde que le β) [350, 352, 353] et est utilisée pour la mise au point d'anodes enzymatiques [350, 354, 355].

La pyranose oxydase (PyOx), également à FAD, est issue de la moisissure blanche de champignon *Trametes multicolor* et a un poids moléculaire de 300 kDa [356-358]. Elle va quant à elle catalyser une réaction plus spécifique : l'oxydation du glucose (α et β [359, 360]) en 2-déshydroglucose parallèlement à la réduction d'une molécule d' O_2 en H_2O_2 . Cependant, son accepteur électronique naturel est le dioxygène ce qui se révèle problématique pour son utilisation dans la conception de biopiles à glucose/ O_2 en particulier [361].

4.2.6.5. Autres enzymes anodiques

Dans le cas de l'oxydation d'alcools, les enzymes utilisées sont des alcools déshydrogénases. Elles vont oxyder les alcools primaires et secondaires en leurs aldéhydes et cétones correspondants. Ce sont des homodimères contenant chacun 2 ions Zn^{2+} dans leur site actif. Elles peuvent également, mais plus rarement, utiliser comme cofacteur des atomes de fer, des $NADP^+$ ou des PQQ, ce qui est d'ailleurs le cas de certaines méthanol déshydrogénases [13].

Concernant l'oxydation du H_2 , ce sont les hydrogénases qui sont employées pour remplacer le platine. Ce sont des métalloenzymes qui sont capables d'oxyder réversiblement le H_2 en H^+ . Leur classification dépend du type de métal contenu dans leur site actif. Les plus étudiées sont les hydrogénases [Ni-Fe] mais il y a également les hydrogénases [Fe-Fe] [67, 362]. Elles sont composées de 2 sous-unités : une grande où se situe le complexe métallique qui va catalyser l'oxydation du H_2 , et une petite qui contient une chaîne de complexes [Fe-S] servant de relais pour l'extraction des électrons (figure 1.4.16). Le H_2 transite dans l'enzyme via un canal hydrophobe [362-364]. L'hydrogénase [Ni-Fe] contient en plus un ion Mg^{2+} qui va stabiliser la zone où il se situe et participer au transport des protons dans l'enzyme [365].

Les hydrogénases sont cependant très sensibles à l'oxygène : plusieurs stratégies sont développées pour diminuer cette sensibilité allant de l'ingénierie enzymatique [366, 367] à l'encapsulation dans un hydrogel rédox [368]. Enfin, il existe également quelques hydrogénases déjà naturellement tolérantes à l'oxygène [369, 370].

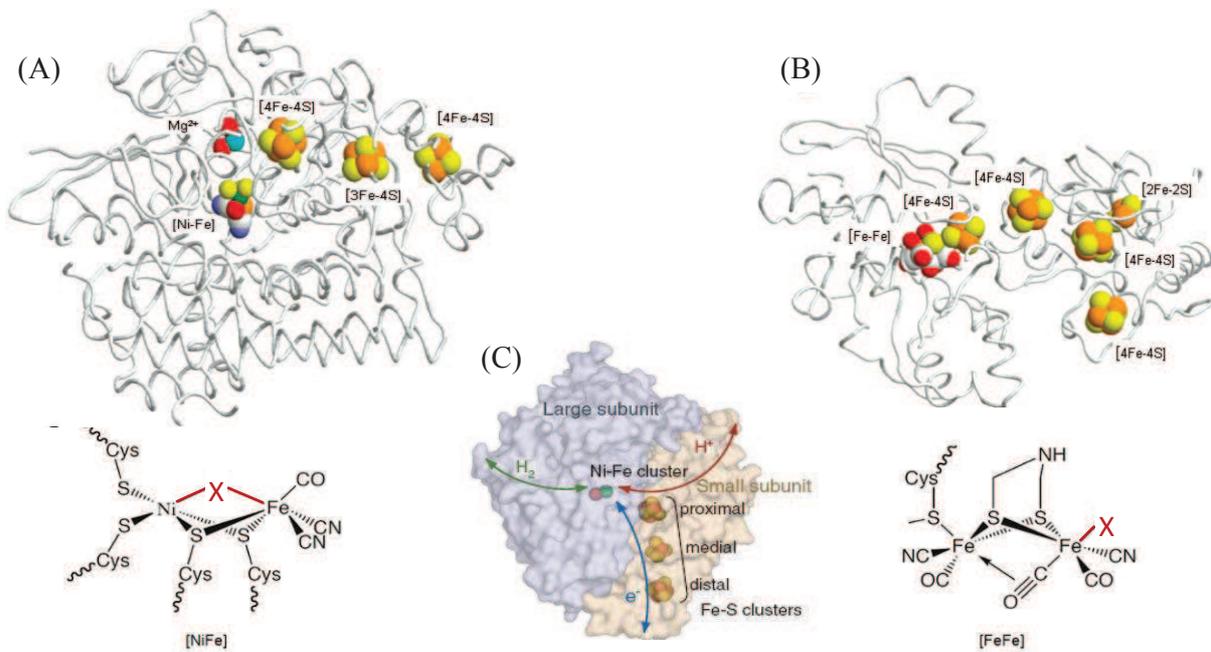


Figure 1.4.16 : Structure de l'enzyme et du site actif (A) de l'hydrogénase [Ni-Fe] et (B) de l'hydrogénase [Fe-Fe] avec le X rouge désignant le site de coordination du substrat [362]. (C) Schéma du mécanisme catalytique de l'hydrogénase [Ni-Fe] [371].

4.3. Le transfert électronique

4.3.1. Problématique

Le fait de chercher à obtenir une bonne connexion électrique entre l'électrode et le site actif de l'enzyme est appelé le « problème de couplage. Le transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode peut se faire de deux manières possibles : soit la connexion entre les 2 entités est possible, soit le transfert électronique direct entre l'enzyme et l'électrode est impossible, auquel cas il est nécessaire d'ajouter un médiateur intermédiaire. Ces processus sont respectivement appelés transfert d'électron direct (DET) et transfert d'électron médié (MET). Cependant, la plupart des enzymes rédox sont difficiles à connecter à la surface des électrodes et on utilise donc des médiateurs d'électrons pour assurer le contact électrique entre le catalyseur et l'électrode [21].

En effet, pour qu'une enzyme puisse catalyser des réactions d'oxydo-réduction il faut que le transfert d'électrons qui en découle au niveau de la surface des électrodes soit rapide et efficace. Un transfert électronique efficace se produit entre deux sites (enzyme et électrode) ayant de faibles énergies de réorganisation et séparés par une petite distance. Pour fournir un taux de transfert suffisant pour la catalyse enzymatique (dont la fréquence de *turnovers*, ou

l'efficacité catalytique, se situe généralement entre 10 et 100 s⁻¹) il faut que les sites redox soient séparés de 15 Å maximum [13].

4.3.2. Théorie de Marcus

La théorie de Marcus a pour objectif de rationaliser la vitesse des réactions de transfert électronique, c'est-à-dire la vitesse à laquelle les électrons vont être transférés entre 2 espèces rédox. Elle indique que le transfert électronique dépend de la distance entre le donneur et l'accepteur car cette distance influe sur l'énergie de réorganisation du système. Cette dernière correspond à l'énergie nécessaire aux réorganisations moléculaires internes des espèces rédox impliquées ainsi que du solvant lors du transfert d'électrons [372]. D'après l'équation de Marcus-Hush (équation I.4.3), la constante de vitesse du transfert électronique k dépend de l'énergie de réorganisation λ (en J.mol⁻¹) et de l'énergie libre d'activation de Gibbs ΔG (en J.mol⁻¹) :

$$k = A e^{-\frac{(\lambda + \Delta G)^2}{4\lambda k_B T}} \quad (\text{Equation I.4.3})$$

avec A le facteur préexponentiel (en s⁻¹), k_B la constante de Boltzmann ($= 1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$) et T la température (en K). Le facteur A dépend du couplage électronique entre les espèces rédox et donc de la distance les séparant. Notons que l'énergie libre d'activation de Gibbs est directement proportionnelle à la force électromotrice ΔE .

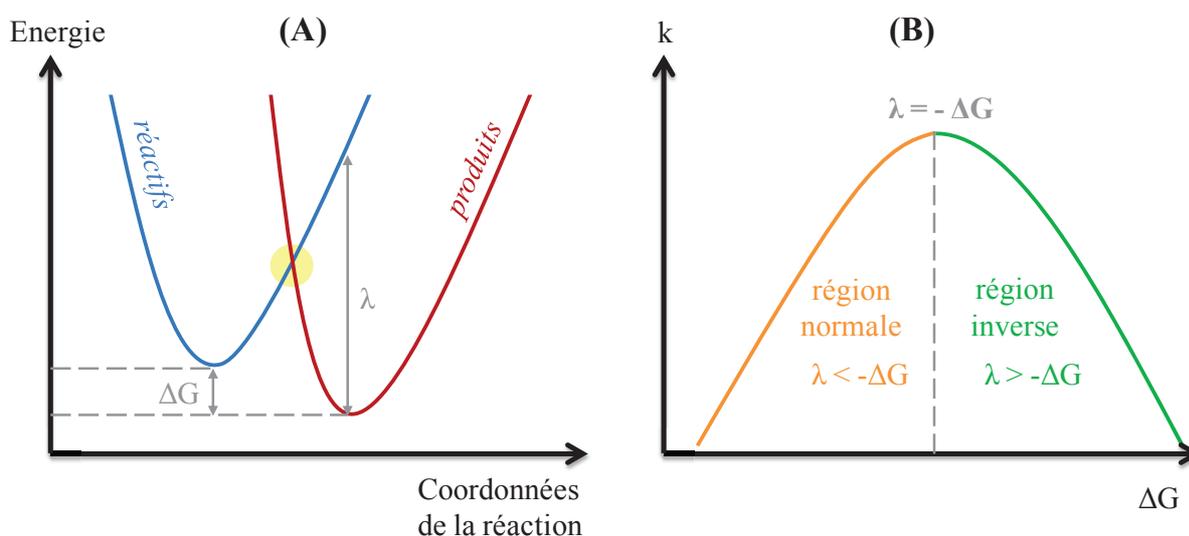


Figure I.4.17 : (A) Courbes d'énergie des réactifs et produits de la réaction avec en jaune l'intersection des courbes où se produit le transfert électronique. (B) Evolution de la vitesse de transfert électronique en fonction de l'énergie libre de Gibbs.

La vitesse de transfert électronique sera maximale pour $\lambda = -\Delta G$, et diminuera d'autant plus que λ s'éloignera de cette valeur :

- quand $\lambda < -\Delta G$, la cinétique suit les variations de ΔG . Une baisse de ΔG entraîne une augmentation de la vitesse de transfert électronique. Il s'agit de la région dite normale.
- quand $\lambda > -\Delta G$ une diminution de ΔG entraîne un ralentissement du transfert électronique. On parle alors de région inverse à la théorie de Marcus.

L'énergie de réorganisation λ est définie par la somme d'une contribution interne autour de chaque espèce (λ_{int}) et externe due au solvant (λ_{ext}) :

- λ_{int} correspond aux termes élastiques associés aux modifications de structure des réactifs (avec k_i la rigidité des liaisons métal-ligand, et Δx la modification géométrique du système lorsqu'on passe des réactifs aux produits) :

$$\lambda_{\text{int}} = \frac{1}{2} k_i (\Delta x)^2 \quad (\text{Equation I.4.4})$$

- λ_{ext} fait intervenir la repolarisation du nuage électronique des molécules de solvant et l'orientation des moments dipolaires liés aux déplacements nucléaires :

$$\lambda_{\text{ext}} = \frac{\Delta e^2}{4\pi\epsilon_0} \left[\frac{1}{2R_D} + \frac{1}{2R_A} - \frac{1}{R} \right] \cdot \left[\frac{1}{n^2} - \frac{1}{\epsilon_s} \right] \quad (\text{Equation I.4.5})$$

avec Δe la quantité de charge transférée, R_A, R_D et R les rayons du donneur, de l'accepteur et la distance entre les 2 espèces lors du transfert, n l'indice de réfraction et ϵ_s la constante diélectrique du solvant

Par conséquent, il existe une distance optimale, ni trop courte ni trop longue, pour un transfert électronique efficace entre 2 espèces données [13].

4.3.3. Comparaison des transferts électroniques direct et médié

Un certain nombre d'enzymes sont capables de procéder au transfert électronique direct comme le cytochrome c, la peroxydase, la ferrédoxine, la plastocyanine, la bilirubine oxydase, la laccase, la lactate déshydrogénase et beaucoup d'autres déshydrogénases [21]. Cependant d'après Leech et al elles ne représentent que 5% des enzymes connues [373].

Actuellement la combinaison de techniques électrochimiques et mathématiques permet de caractériser assez précisément la cinétique du transfert électronique direct entre l'enzyme et l'électrode contribuant à une meilleure compréhension des mécanismes catalytiques [374].

La connexion directe de l'enzyme à la surface de l'électrode lorsque c'est possible, est une méthode simple, qui permet d'éviter les surtensions (figure I.4.18.A). Le potentiel de la

biopile étant défini par les potentiels de ses composants, cette technique permet généralement d'augmenter le potentiel par rapport au transfert électronique médié [213].

Cependant, la connexion directe de l'enzyme n'est pas systématique et même si elle est possible, les multiples orientations de l'enzyme entraînent une large distribution des constantes de vitesse de transfert électronique résultant en une diminution globale du transfert électronique. De plus il n'est possible d'immobiliser qu'une monocouche d'enzymes dans cette configuration, ce qui limite les performances de l'électrode [212].

Dans le cas du transfert électronique médié, des molécules rédox appelées médiateurs sont ajoutées afin de connecter électriquement l'enzyme à l'électrode (figure I.4.18.B). Cette méthode est applicable à l'ensemble des enzymes et permet d'augmenter le taux de transfert électronique entre le site actif de l'enzyme et l'électrode en éliminant la nécessité pour l'enzyme d'interagir directement avec l'électrode.

Autre avantage non négligeable, elle permet d'immobiliser plusieurs couches d'enzymes connectées dans une conformation favorable améliorant ainsi performance et cinétique.

Cependant, l'ajout d'un médiateur entraîne une étape de transfert électronique supplémentaire, pouvant être à l'origine de pertes cinétiques et entraînant une diminution de la tension de la biopile [21].

La différence de potentiel rédox entre l'enzyme et le médiateur ainsi qu'entre le médiateur et l'électrode doit être non nulle pour permettre le transfert d'électron en créant une force motrice. Donc la gamme de médiateurs utilisables est limitée à ceux ayant un potentiel rédox idéalement proche de celui de l'enzyme.

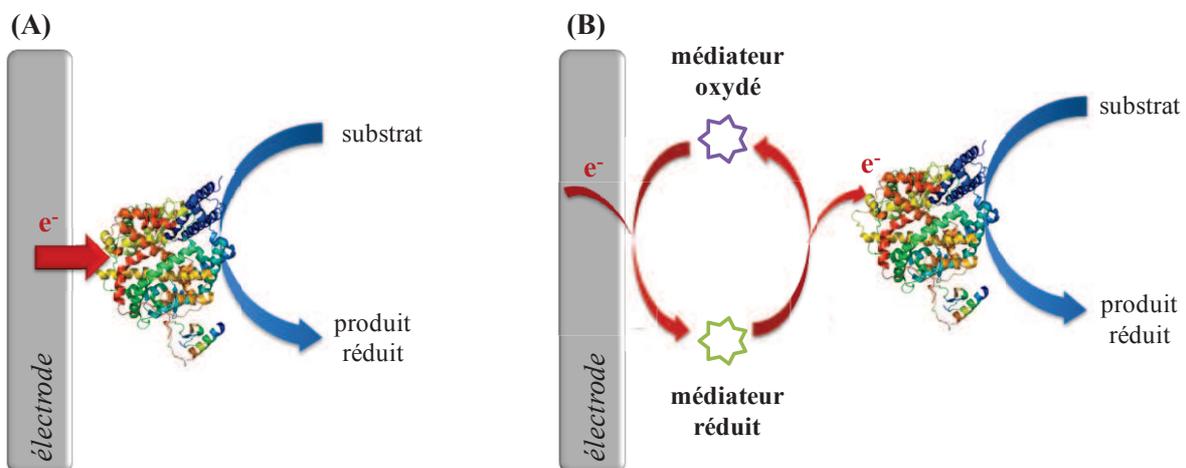


Figure I.4.18 : Transfert électronique (A) direct et (B) médié.

4.3.4. Les médiateurs rédox

4.3.4.1. Généralités

Les médiateurs sont de petites molécules organiques ou des complexes métalliques qui servent de navette d'électrons entre l'enzyme et la surface de l'électrode. Ils peuvent être solubles et libres en solution ou liés à un long espaceur ce qui leur permet une certaine liberté de mouvement tout en restant attachés à l'électrode [21].

Le médiateur doit pouvoir assurer le transfert d'électrons à un potentiel particulier, c'est-à-dire lorsqu'une force motrice est appliquée au système. Il doit également présenter certaines caractéristiques pour pouvoir être utilisé dans les biopiles et biocapteurs : il doit être biocompatible, stable quel que soit son état d'oxydation, réagir rapidement avec l'enzyme pour éviter la compétition de réactions parasites et idéalement il ne devrait pas être altéré pas des changements environnementaux comme le pH ou la température [375].

Les médiateurs sont essentiels si le site actif de l'enzyme est inaccessible et par conséquent incapable d'échanger directement les électrons avec l'électrode. Ils sont aussi nécessaires lorsque l'enzyme s'attache préférentiellement à l'électrode dans une orientation non électro-active [13].

De plus, le potentiel du médiateur est déterminant car il fixe le potentiel auquel les électrodes vont fonctionner et peut ainsi diminuer la tension nominale de la biopile.

4.3.4.2. Les différents médiateurs rédox

Parmi les plus utilisés nous citerons [21, 330, 375] :

- les complexes organométalliques comme le ferricyanure, l'hexaamine de ruthénium, le cytochrome c,
- les polymères rédox, à base de complexes d'osmium ou de ruthénium notamment,
- les dérivés des ferrocènes tels que le ferrocène méthanol,
- les dérivés des quinones comme l'antraquinone ou l'ubiquinone,
- les dérivés des vitamines comme le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide),
- les colorants industriels comme le RBBR (Remazol Brilliant Blue R),
- l'ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate).

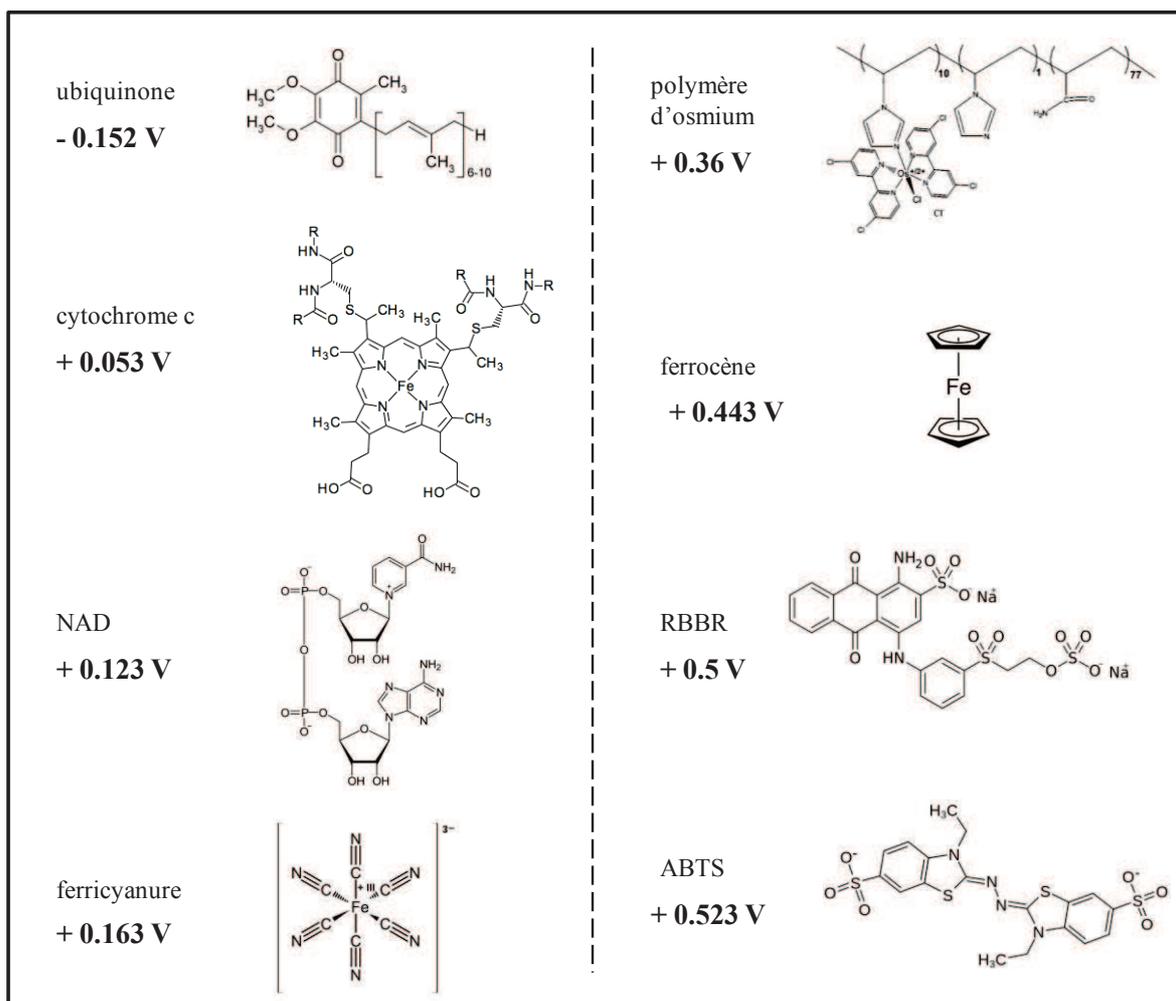


Figure I.4.19 : Structures et potentiels standards des principaux médiateurs utilisés (potentiels mesurés à 37°C, pH 7, vs. Ag/AgCl).

4.3.4.3. Médiateurs en solution ou immobilisés

Les médiateurs en solution doivent avant tout être capables d'une bonne diffusion dans le milieu afin d'assurer un transfert électronique efficace, ce sont donc généralement de petites molécules [213]. Néanmoins, cette mobilité peut également être problématique car cela signifie que les médiateurs rédox peuvent diffuser d'une électrode à l'autre. Il sera donc nécessaire d'utiliser des membranes pour compartimenter le système. Comme nous l'avons déjà évoqué, l'utilisation de membranes va empêcher la miniaturisation du système et va surtout limiter la diffusion des substrats et produits au niveau de l'électrode [21].

La solution réside donc dans l'immobilisation des médiateurs à la surface de l'électrode, par liaison covalente, au sein d'une matrice polymérique ou encore par co-adsorption avec le biocatalyseur par exemple [376, 377].

Dans le cas de médiateurs immobilisés, la biopile la plus efficace actuellement est basée sur des biocatalyseurs « cablés » et utilise des polymères rédox d'osmium [94, 163] comme nous le verrons plus loin en détail.

Les différentes méthodes d'immobilisation des enzymes détaillées ci-après sont également valables pour la co-immobilisation de médiateurs rédox.

4.4. Les méthodes d'immobilisation des enzymes

L'immobilisation des enzymes est une étape critique dans la mise au point d'une électrode enzymatique : elle peut notamment permettre d'améliorer leur sélectivité et leur stabilité [374, 378]. La méthode d'immobilisation doit être choisie soigneusement pour éviter de dénaturer l'enzyme et de perdre la liberté structurale nécessaire à son activité, tout en assurant une connexion électrique optimale [14]. Par conséquent, les enzymes peuvent présenter aussi bien une augmentation qu'une perte de leur activité catalytique après immobilisation [379]. De plus, l'isolation de l'enzyme de son organisme d'origine entraîne une diminution drastique de sa stabilité, qui peut être contrebalancée par une immobilisation adéquate [380, 381].

Quelle que soit la méthode utilisée, l'immobilisation des enzymes permet d'éviter la diffusion des biocatalyseurs entre l'anode et la cathode sans nécessité de membrane, ce qui permettra de réduire les dimensions de la biopile.

Cette immobilisation se fait soit physiquement soit chimiquement. Pour la première approche, l'enzyme est adsorbée sur l'électrode ; on peut aussi piéger les enzymes dans des matrices polymériques par encapsulation, ce qui est plus efficace, notamment pour prolonger leur durée de vie. Pour la seconde approche, il s'agit surtout d'immobiliser une enzyme par greffage covalent, réticulation ou encore dans un hydrogel rédox où elle va être co-immobilisée avec un médiateur. Enfin il est également possible d'immobiliser une enzyme par reconstitution avec son cofacteur préalablement fixé à la surface.

Notons que dans chaque technique d'immobilisation il est possible de co-immobiliser un médiateur rédox avec l'enzyme.

4.4.1. L'adsorption physique

L'adsorption physique est la plus simple et économique méthode d'immobilisation d'une enzyme [382-384]. La solution enzymatique est déposée à la surface du matériau conducteur servant d'électrode. Elle s'y attache par formation d'interactions faibles de type Van der Waals, hydrogène ou homophile (hydrophobes/hydrophiles), les enzymes non fixées sont ensuite éluées par lavage (figure I.4.20). Comme l'attachement se fait par simple contact, aucun réactif chimique n'est utilisé ce qui évite toute dénaturation de l'enzyme.

Cependant, ce type de fixation est réversible car les enzymes peuvent se détacher de la surface par simple modification des conditions opératoires de fonctionnement (pH, température, agitation,...) ce qui en fait une méthode peu fiable, notamment en terme de stabilité de l'électrode.

De plus, les systèmes basés sur l'adsorption physique d'enzymes montrent de faibles densités de courant en raison de la faible quantité de biocatalyseur fixé (monocouche), du transfert électronique direct difficile entre l'enzyme et l'électrode et de la désorption progressive de l'enzyme dans le temps [14]. Enfin la multi-orientation des enzymes entraîne une large variation du taux de transfert électronique à la surface de l'électrode [385].

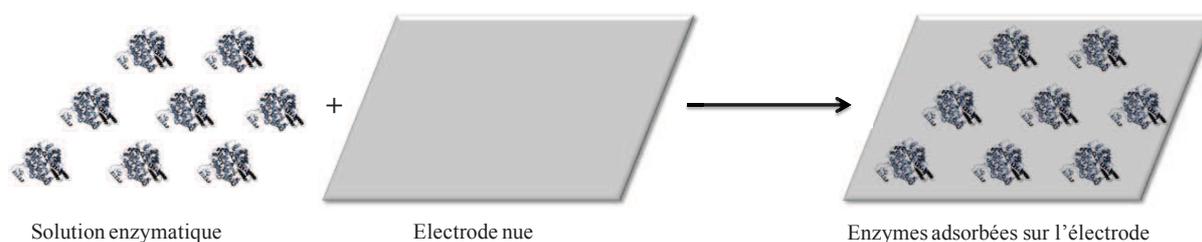


Figure I.4.20 : Schématisation de l'adsorption physique des enzymes.

4.4.2. La reconstitution de l'apoenzyme

L'objectif de cette technique est d'aboutir à une fixation covalente de l'enzyme sur l'électrode moyennant une étape de dénaturation/reconstitution de l'enzyme, dans le cas des enzymes à cofacteur.

L'enzyme est produite soit directement sous forme « apo » (sans son cofacteur), soit sous forme « holo » (avec son cofacteur) puis dénaturée pour extraire le cofacteur et finalement repliée donnant ainsi l'apoenzyme. Le cofacteur est fixé à l'électrode puis il y a attachement de l'enzyme par simple reconstitution (figure I.4.21).

Décrite pour la première fois en 1996, par Willner et al [386] dont les travaux consistaient à connecter électriquement la glucose oxydase par reconstitution avec le FAD

préalablement assemblé en monocouches sur des électrodes d'or. De nombreux autres exemples ont depuis été publiés utilisant ce procédé [214, 229, 387-393].

Malgré une grande stabilité grâce à la fixation de l'enzyme par reconstitution, ici aussi il n'est possible d'immobiliser qu'une monocouche de biocatalyseur.

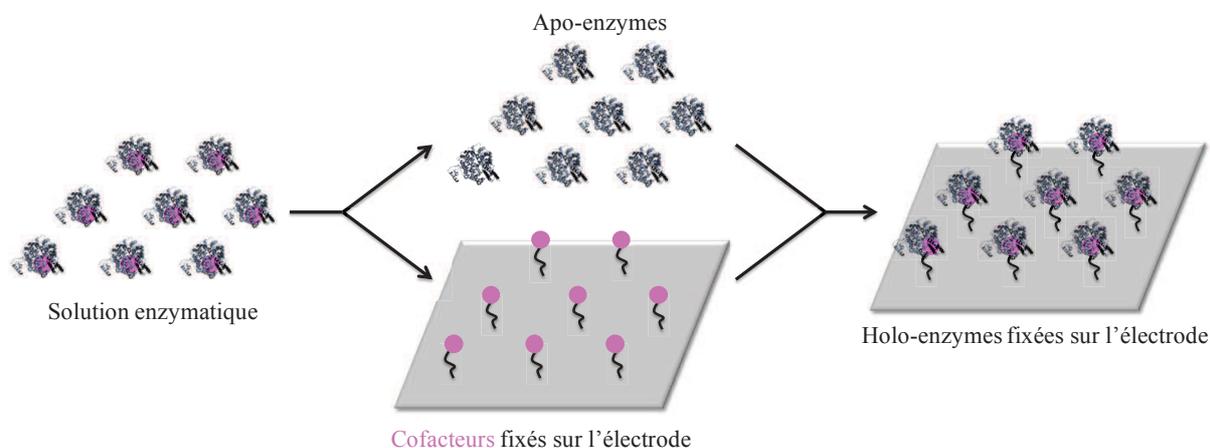


Figure I.4.21 : Schématisation de la reconstitution de l'apoenzyme pour son immobilisation.

4.4.3. L'encapsulation

L'immobilisation des enzymes par encapsulation dans une matrice est très utilisée car elle permet d'immobiliser physiquement les enzymes en conservant leur degré de liberté nécessaire à leur activité catalytique. La structure du réseau formé est ainsi suffisamment dense pour retenir les enzymes et suffisamment poreuse pour laisser diffuser les petites molécules de substrat. La fixation irréversible des enzymes entraîne une grande robustesse du film (figure I.4.22) [394, 395]

L'encapsulation peut se faire au sein d'une matrice à base de :

- polymères synthétiques : polyacrylamide ou polyuréthane [396],
- polymères organiques : chitosan, Nafion® ou alginate [64],
- composés inorganiques : gel de silice ou d'oxydes métalliques [397],
- matériaux composites comme la pâte de carbone [398].

La densité de la matrice est le point clé de cette technique : en effet, elle n'est utilisable que pour des substrats de petite taille et il est possible que l'enzyme parvienne à diffuser à travers le réseau. De plus des interactions entre la matrice et l'enzyme ne sont pas à exclure, ce qui peut entraîner une baisse d'activité catalytique.

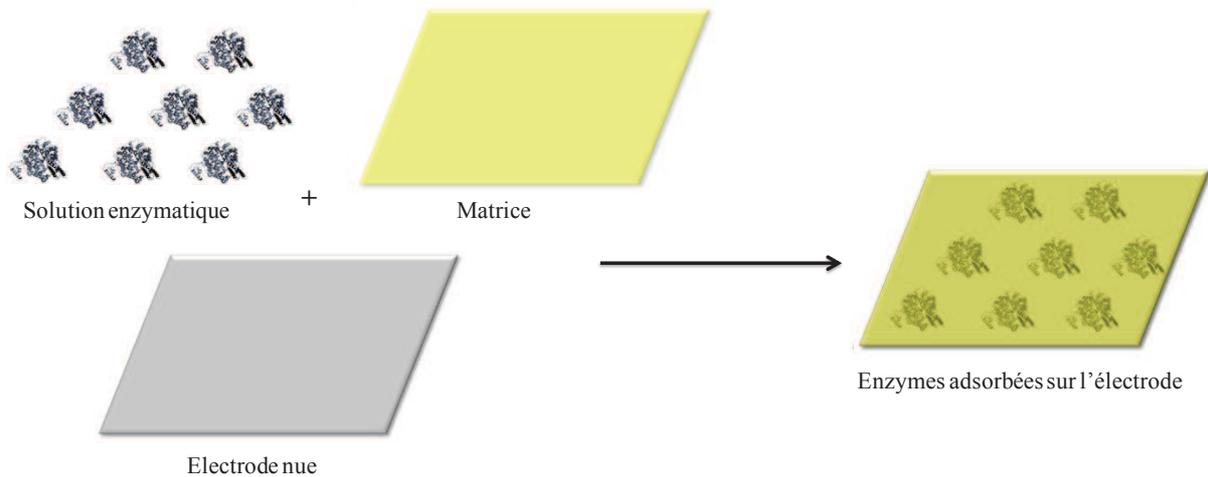


Figure I.4.22 : Schématisation de l'encapsulation des enzymes dans une matrice.

4.4.4. Le greffage covalent

Cette méthode consiste à créer une liaison forte par réaction chimique entre les groupements réactifs libres présents en périphérie de l'enzyme et sur le support [399]. Les fonctions chimiques de l'enzyme pouvant être impliquées sont les fonctions amine, carboxylique, ou alcool par exemple, lorsqu'elles ne sont pas impliquées dans les processus biochimiques intrinsèques de l'enzyme [400-402].

Ce processus comprend trois étapes : la fonctionnalisation du support par fixation et activation de groupements réactifs, l'attachement covalent de l'enzyme et le rinçage permettant d'éliminer les biomolécules simplement adsorbées sur la surface (figure I.4.23).

Les électrodes enzymatiques ainsi préparées sont très stables mécaniquement car la liaison covalente est irréversible et surpasse en énergie les autres types de liaison chimiques. Cependant, cette méthode ne permet d'immobiliser qu'une seule monocouche d'enzyme et la contrainte physique imposée à l'enzyme peut diminuer son activité catalytique.

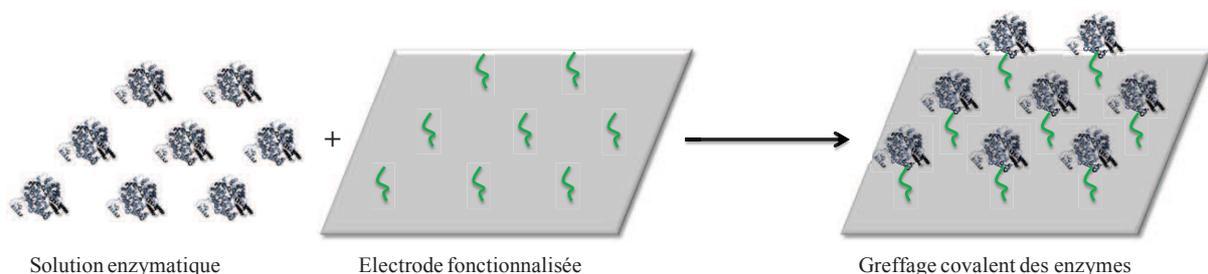


Figure I.4.23 : Schématisation du greffage covalent des enzymes.

4.4.5. La réticulation

La réticulation pour l'immobilisation d'enzyme correspond à la formation d'un réseau tridimensionnel par création de liaisons covalentes entre les unités enzymatiques [403, 404]. Les agents réticulants sont généralement des polymères dont les fonctions terminales vont s'hydrolyser pour réagir avec les groupements actifs de type COOH et NH₂ situés à la périphérie des enzymes, formant ainsi un film insoluble d'enzymes interconnectées (figure 1.4.24). Ce type d'agent réticulant est perméable aux différents substrats et confère au film électrocatalytique une très grande robustesse mécanique.

Cette méthode s'est développée depuis quelques dizaines d'années car elle améliore la connexion et la stabilité de films électroactifs à la surface des électrodes. Néanmoins elle demande un certain travail d'optimisation du degré de réticulation : elle doit être suffisante pour assurer la cohésion et la stabilité du film mais pas trop importante afin de ne pas diminuer le degré de liberté des enzymes. De plus, la biocompatibilité des agents réticulants est importante afin de ne pas altérer la structure et l'activité des enzymes.

A l'inverse de l'adsorption physique, la reconstitution de l'apoenzyme et le greffage covalent, plusieurs couches d'enzyme peuvent être fixées sur l'électrode.

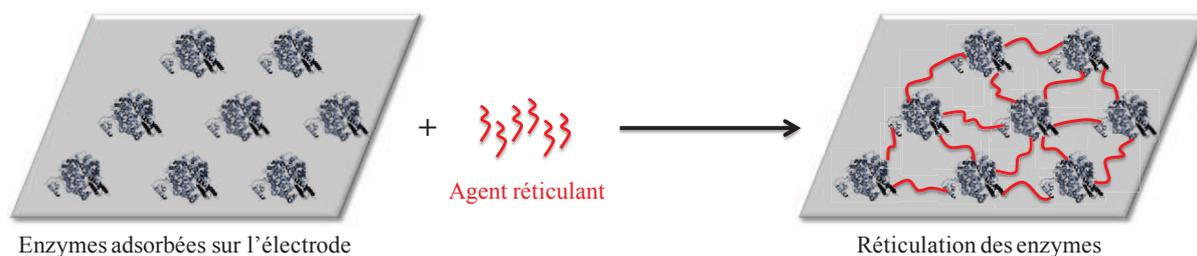


Figure 1.4.24 : Schématisation du processus de réticulation des enzymes.

4.4.6. L'hydrogel rédox

Dès les années 90, l'équipe d'Heller utilise un di-époxyde (de type poly(éthylène glycol) diglycidyl éther ou PEGDGE) pour réticuler enzymes et médiateurs en une matrice tridimensionnelle, conduisant à une haute stabilité mécanique du film [26, 27].

Le film ainsi formé par la co-immobilisation d'un biocatalyseur et d'un médiateur ayant des propriétés rédox est appelé hydrogel rédox. Il s'agit actuellement d'une méthode très largement utilisée dans la préparation d'électrodes enzymatiques [85, 405-412].

4.4.6.1. Principe et intérêt de l'hydrogel rédox

L'hydrogel rédox consiste en un réseau tridimensionnel de médiateur rédox et d'enzyme consolidé par un agent réticulant. Le médiateur rédox est constitué d'un squelette de polymère sur lequel sont greffés des complexes métalliques, notamment à base d'osmium.

Lors du mélange préalable des différents constituants de l'hydrogel, il va y avoir interaction électrostatique entre le polymère rédox cationique et l'enzyme globalement chargée négativement, formant un adduit électrostatique hydrosoluble, avec une répartition homogène de ses constituants (figure I.4.25). Ces interactions électrostatiques sont renforcées par un agent réticulant de type PEGDGE. Une fois réticulé le mélange enzyme/polymère rédox gonfle lorsqu'il est immergé dans une solution aqueuse, d'où son nom d' « hydrogel ».

L'hydrogel rédox présente une série d'avantages qui en fait une méthode de choix pour la préparation d'électrodes enzymatiques :

- il permet d'immobiliser une grande quantité de biocatalyseur donnant ainsi de fortes densités de courant au contraire des autres méthodes se limitant à des monocouches ;
- sa structure est d'une grande stabilité mécanique ;
- l'hydrogel étant majoritairement aqueux, la diffusion des espèces en solution y est naturelle ce qui facilite le transfert de masse et assure un temps de réponse rapide ;
- le polymère rédox sert à la fois à structurer le film et à médier le transfert des électrons entre l'enzyme et l'électrode, le rendant donc très efficace ;
- le gonflement de l'hydrogel en solution fournit à l'enzyme une grande liberté, lui permettant de fonctionner au maximum de ses capacités ;
- enfin, il a récemment été montré que la structure de l'hydrogel permettait de diminuer la sensibilité à l'oxygène d'enzymes telles que les hydrogénases [Ni-Fe] et donc d'augmenter leur stabilité [368].

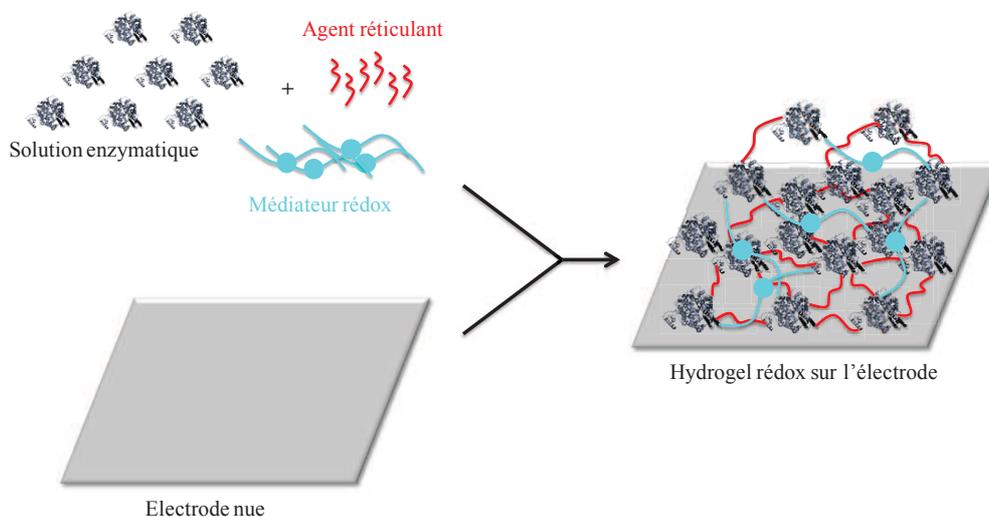


Figure I.4.25 : Schématisation de la préparation de l'hydrogel rédox.

4.4.6.2. Les constituants de l'hydrogel rédox

Le médiateur rédox

Il est la clé d'un hydrogel fonctionnel car c'est lui qui va à la fois lui donner sa structure et assurer la connexion électrique de l'enzyme à la surface de l'électrode.

Les polymères les plus utilisés pour constituer le squelette du médiateur sont le PVI (polyvinylimidazole), le PVP (polyvinylpyridine) ou encore le copolymère PAA-PVI (polyacrylamide-polyvinylimidazole), et plus rarement le PAA-PVP (figure I.4.26). Ils vont permettre de moduler le potentiel rédox des complexes métalliques qui y sont fixés.

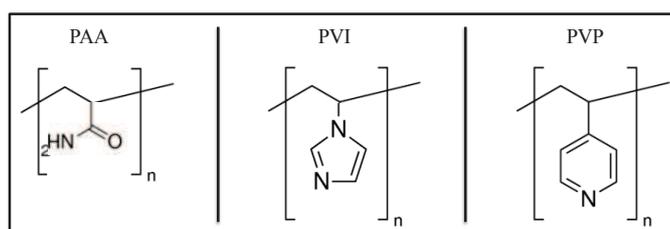


Figure I.4.26 : Structures des différents polymères.

Sur ces différents polymères sont ensuite greffés des complexes rédox à base de métaux tels que l'osmium, le ruthénium, le fer ou encore le chrome [413-415]. Les plus utilisés dans le cadre d'hydrogel enzymatique sont les 2 premiers en raison de la gamme de potentiel adaptée à celle des enzymes, le potentiel du complexe pouvant être modulé en partie grâce à ses ligands [409, 410, 416-418]. Le plus souvent, les ligands sont de type bi-pyridine ou bis-imidazole. Pour les expériences décrites dans ce manuscrit nous utiliserons un copolymère PAA-PVI sur lequel sont directement greffés des complexes d'osmium $[\text{Os}(4,4'\text{-dichloro-2,2'}\text{-bipyridine})_2\text{Cl}]^{2+/2+}$ pour la cathode [412, 419] et un PVP- $[\text{Os}(1,1'\text{-diméthyl-2,2'}\text{bisimidazole})_2\text{-2-(6-méthylpyridin-2yl)imidazole}]^{2+/3+}$ pour l'anode [407] (Figure I.4.27).

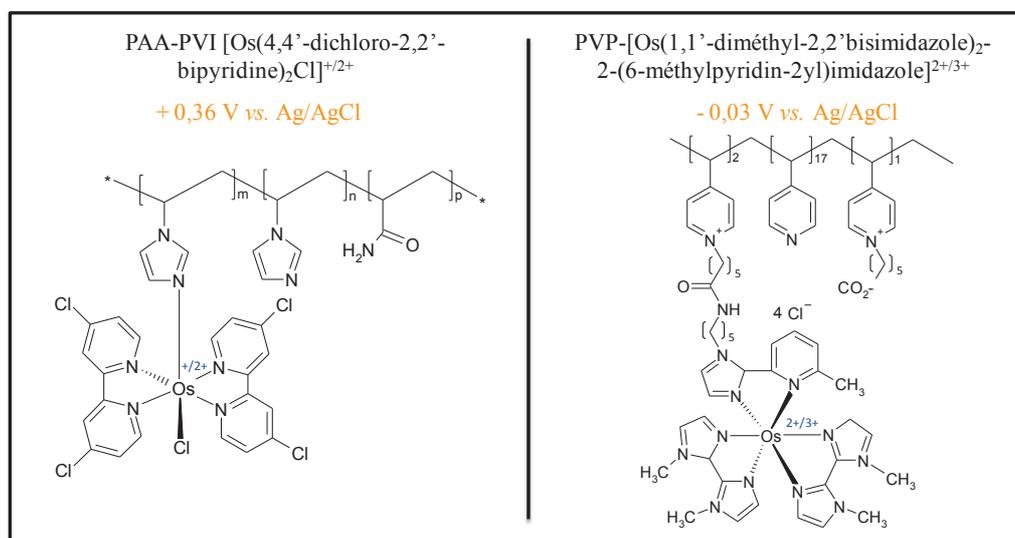


Figure I.4.27 : Structures des médiateurs rédox que nous utiliserons par la suite.

La liaison entre le centre métallique du complexe et le polymère est soit directe soit via un espaceur (chaîne aliphatique de 8 à 15 carbones) qui confère plus de flexibilité au complexe d'osmium afin de faciliter le transfert électronique.

Le biocatalyseur

N'importe quelle enzyme peut être utilisée du moment que le potentiel rédox du médiateur est adapté au sien de façon à assurer le transfert électronique entre les deux grâce à une force motrice optimale. De nombreuses enzymes ont été utilisées dans des hydrogels rédox dont celles que nous utiliserons dans la suite de ce manuscrit : la GOx et GDH pour l'anode, les BODs pour la cathode.

L'agent réticulant

Le plus fréquemment utilisé est le PEGDGE, dont les groupements époxy terminaux vont s'hydrolyser pour pouvoir réagir avec les fonctions amines situées en périphérie des enzymes et dans les hétérocycles du médiateur rédox.

Il est également possible d'utiliser des vapeurs de glutaraldéhyde pour assurer la réticulation comme cela a largement été décrit dans la littérature [85, 408, 420-423].

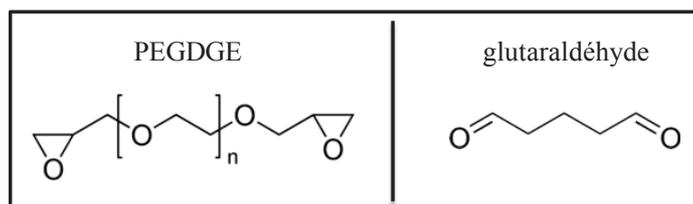


Figure I.4.28 : Structures du PEGDGE et du glutaraldéhyde.

4.4.6.3. Le mécanisme du transfert électronique dans l'hydrogel rédox

Au sein de l'hydrogel rédox le transfert électronique entre l'électrode et l'enzyme se fait par collision entre centres rédox voisins du médiateur qui sont successivement réduits et oxydés (figure I.4.29).

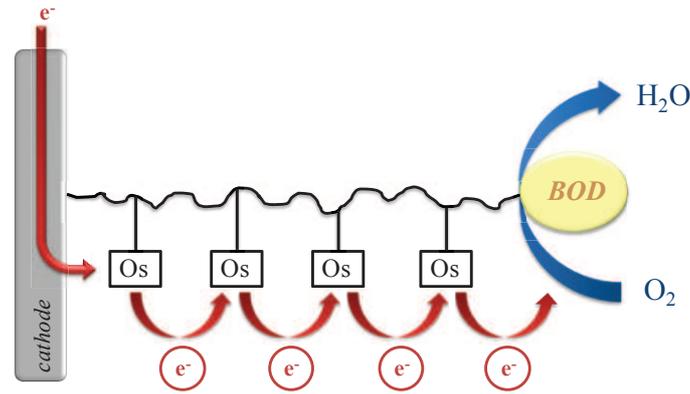


Figure I.4.29 : Le transfert des électrons au sein de l'hydrogel rédox.

L'efficacité du transfert électronique va en partie être gouvernée par les caractéristiques structurales du médiateur rédox, à savoir la distance δ entre complexes rédox voisins et la distance λ entre le polymère et le complexe rédox (longueur de la liaison ou de l'espaceur s'il y en a un) (figure I.4.30).

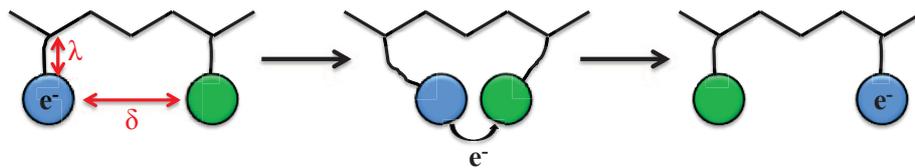


Figure I.4.30 : Détail du mécanisme de transfert électronique entre centres rédox voisins.

Ces 2 grandeurs, δ et λ , sont reliées au coefficient de diffusion apparent des électrons D_{app} dans l'équation suivante, où k_{ex} est constante de vitesse d'échange des électrons et C_{RT} la concentration en complexes rédox [424, 425]:

$$D_{app} = 1/6 k_{ex} (\delta^2 + 3\lambda^2) C_{RT} \quad \text{(Equation 1.4.6)}$$

D'après l'équation 1.4.6, l'augmentation de n'importe lequel de ces paramètres entraîne une augmentation du transfert électronique. Cependant, dans le cas où la distance entre centres rédox voisins est trop grande, leur collision de proche en proche et donc le transport des électrons devient plus difficile. De même, lorsque la concentration en centres rédox est trop élevée, il y a une diminution de leur liberté de mouvement, ce qui entraîne également une baisse de la diffusion électronique le long du polymère rédox.

Il y a donc pour chaque médiateur rédox un compromis idéal entre la quantité de complexes rédox fixés, la distance entre eux et leur mobilité mais le potentiel du médiateur est également très important car il doit être idéalement situé entre les potentiels de l'électrode et

du catalyseur. Cette problématique a fait l'objet de nombreuses publications dont le but était de concevoir le médiateur rédox le plus efficace pour une électrode enzymatique donnée [90, 406, 409-412, 419, 426].

4.5. Conclusion intermédiaire

La conception d'électrodes enzymatiques est un processus complexe car il fait intervenir plusieurs éléments qui interagissent. Ainsi il ne suffit pas de choisir une électrode, une enzyme et un médiateur au hasard pour que cela fonctionne. De nombreuses étapes d'optimisation et de compréhension mécanistique sont indispensables pour concevoir une électrode fonctionnelle et stable.

Nous venons ainsi de présenter dans cette partie, les différents matériaux d'électrodes, enzymes, médiateurs ainsi que les méthodes d'immobilisation possibles pour la mise au point d'électrodes enzymatiques.

Il en ressort que pour le développement de biopile à glucose/O₂ implantables, les électrodes doivent être stables mécaniquement et le plus efficaces possible. La méthode la plus appropriée nous semble donc être l'encapsulation de l'enzyme au sein d'un hydrogel rédox, et ce pour plusieurs raisons :

- elle permet d'immobiliser les enzymes à la surface de l'électrode. En plus d'augmenter la stabilité de l'électrode, cela facilite la miniaturisation de la biopile puisqu'il n'est pas nécessaire d'utiliser de membrane pour empêcher la libre diffusion des catalyseurs entre l'anode et la cathode ;
- l'hydrogel rédox permet d'immobiliser plusieurs couches d'enzymes en assurant une connexion électrique optimale grâce aux médiateurs rédox conduisant ainsi à de fortes densités de courant et donc de puissance.

5. Conclusion

Les biopiles qu'elles soient microbiennes ou enzymatiques proposent une alternative très intéressantes aux piles à combustibles traditionnelles actuelles comme nous pouvons le constater par comparaison de leurs caractéristiques respectives ci-dessous.

Type de biopile	Pile à combustible (PEMFC)	Biopile microbienne	Biopile enzymatique
Catalyseur	métaux nobles (platine)	microorganismes	enzymes
pH	acide (<1)	neutre	neutre
Température	60-90°C	10-70°C	25-40°C
Membrane	Nafion®	Nafion®	aucune
Miniaturisation	> 10 mm ²	> 10 mm ²	0,1 mm ²
Puissance maximale	~ 100 mW/cm ²	~ 100 µW/cm ²	~ 1 mW/cm ²
Taux de conversion	40-60%	90%	40%
Durée de fonctionnement	> 1 an	> 1 an	quelques mois
Prix unitaire moyen	> 100 \$	~ 5 \$	~ 0,01 \$

Les biopiles enzymatiques et notamment celles à glucose/O₂ sont particulièrement intéressantes au vue de leur utilisation dans le domaine biomédical. Elles ont suscité beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique depuis quelques décennies ce qui a entraîné leur développement et l'optimisation de chacun de leur constituants. Il est en effet possible de trouver une longue liste de matériaux, d'enzymes et de médiateurs mis au point et optimisés pour la conception d'électrodes enzymatiques.

Bien que les biopiles enzymatiques soient actuellement au centre de nombreuses recherches permettant d'en améliorer les performances, relativement peu d'exemples de mesures *in vivo* on été rapportés. Encore moins de travaux ont été réalisés dans du sang humain, ce qui constitue pourtant, en parallèle de l'implantation dans l'animal, une étape clé dans le processus de validation des biopiles pour l'alimentation de capteurs biomédicaux implantés.

L'objectif de la suite de ce travail est donc de concevoir une biopile à glucose/O₂ la plus efficace possible tout d'abord en conditions pseudo physiologiques puis de tester ses performances dans du sang humain. Une étude sera également menée en culture cellulaire et par implantation dans la souris pour évaluer la biocompatibilité de notre système.

6. Références bibliographiques

1. Schoenbein, C.F., *On the voltaic polarization of certain solid and fluid substances*. Philosophical Magazine (Serie 3), 1839 **14** (85): p. 43-45.
2. Grove, W., *On voltaic series and combination of Gases by platinum* London and Edeinburgh Philosophical Magazine and Journal of Science 1839. **14**(86): p. 127-130.
3. Williams, K.R., *Francis Thomas Bacon, 21 December 1904-24 May 1992*. Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society, 1994. **39**: p. 2-9.
4. Solomon, E.I., U.M. Sundaram, and M.T. E., *Multicopper Oxidases and Oxygenases*. Chemical Reviews, 1996. **96**(7): p. 2563-2605.
5. Tayhas, G., R. Palmore, and G.M. Whitesides, *Microbial and Enzymatic Biofuel Cells*. Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, American Chemical Society Symp. Ser., 1994. **566**(Chapter 14): p. 271-290.
6. CDE, *Pile à combustible : définition, fonctionnement, enjeux, histoire*. <http://www.connaissancedesenergies.org/fiche-pedagogique/pile-a-combustible>.
7. SCF, *Piles à combustible*. <http://www.societechimiquedefrance.fr/produit-du-jour/piles-a-combustible.html>.
8. Boudellal, M., *La pile à combustible*. Edition Dunod, Technique et ingénierie, 2007.
9. Bard, A.J. and L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley, New York, 1980.
10. Kissinger, P.T. and W.R. Heineman, *Cyclic Voltammetry*. 1983, 1983. **60**(9): p. 702-706.
11. Compton, D.K. and C.E. Banks, *Understanding Voltammetry (2nd edition)*. Imperial College Press, 2010.
12. Katz, E., A.N. Shipway, and I. Willner, *Biochemical fuel cells*. Handbook of Fuel Cells Fundamentals, Technology and Applications; Vielstich, W., Gasteiger, H. A., Lamm, A., Eds. John Wiley and Sons, Ltd.: London, 2003. **1**.
13. Cracknell, J.A., K. Vincent, A. , and F.A. Armstrong, *Enzymes as Working or Inspirational Electrocatalysts for Fuel Cells and Electrolysis*. Chemical Reviews, 2008. **108**: p. 2439-2461.
14. Osman, M.H., A.A. Shah, and F.C. Walsh, *Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: enzymatic cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2011. **26**: p. 6.
15. Bullen, R.A., et al., *Biofuel cells and their development*. Biosensors & Bioelectronics, 2006. **21**: p. 2015-2045.
16. Shukla, A.K., et al., *Biological fuel cells and their applications*. Current science, 2004. **87**: p. 455-468.
17. Szczupak, A., D. Kol-Kalman, and L. Alfonta, *A hybrid biocathode: surface display of O₂-reducing enzymes for microbial fuel cell applications*. Chemical Communications, 2012. **48**(1): p. 49-51.
18. Higgins, S.R., et al., *Hybrid Biofuel Cell: Microbial Fuel Cell with an Enzymatic Air-Breathing Cathode*. ACS Catalysis, 2011. **1**(9): p. 994-997.
19. Arechederra, R. and S.D. Minter, *Organelle-based biofuel cells: Immobilized mitochondria on carbon paper electrodes*. Electrochimica Acta, 2008. **53**(23): p. 6698-6703.
20. Kjaergaard, C.H., et al., *Spectroscopic and Crystallographic Characterization of "Alternative Resting" and "Resting Oxidized" Enzyme Forms of Bilirubine Oxidase: Implications for Activity and Electrochemical Behavior of Multicopper Oxidases*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(12): p. 5548-5551.
21. Barton, S.C., J. Gallaway, and P. Atanassov, *Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices*. Chemical Reviews, 2004. **104**(10): p. 4867-4886.
22. Wilkinson, S., *"Gastrobots" - Benefits and Challenges of Microbial Fuel Cells in Food Powered Robot Applications*. Autonomous Robots, 2000. **9**(2): p. 99-111.
23. Kelly, I., *The design of a robotic predator : The SlugBot*. Robotica, 2003. **21**(4): p. 399-406.
24. Yahiro, A.T., S.M. Lee, and D.O. Kimble, *Bioelectrochemistry, I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies*. Biochimica et Biophysica Acta, 1964. **88**(2): p. 375-383.
25. Bard, A.J., M. Stratmann, and G.S. Wilson, *Bioelectrochemistry, Volume 9*. Encyclopedia of Electrochemistry, Eds Wiley-VCH, 2002.

26. Gregg, B.A. and A. Heller, *Redox polymer films containing enzymes. 2. Glucose oxidase containing enzyme electrodes*. Journal of Physical Chemistry, 1991. **95**(15): p. 5970-5975.
27. Ohara, T.J., R. Rajagopalan, and A. Heller, *Glucose electrodes based on cross-linked bis(2,2'-bipyridine)chloroosmium⁺²⁺ complexed poly(1-vinylimidazole) films*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(23): p. 3512-3517.
28. Chen, T., et al., *A Miniature Biofuel Cell*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(35): p. 8630-8631.
29. Willner, I., et al., *Biofuel cell based on glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 1998(8): p. 1817-1822.
30. Katz, E., I. Willner, and A.B. Kotlyar, *A non-compartmentalized glucose / O₂ biofuel cell by bioengineered electrode surfaces*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1999. **479**(1): p. 64-68.
31. Montana State University, C.f.B.E., *Biofilm basics*. <https://www.biofilm.montana.edu/>.
32. González del Campo, A., et al., *Microbial fuel cell with an algae-assisted cathode: A preliminary assessment*. Journal of Power Sources, 2013. **242**: p. 638-645.
33. Jang, J.K., et al., *Electricity generation by microbial fuel cell using microorganisms as catalyst in cathode*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013. **23**(12): p. 1765-1773.
34. Zhang, T., et al., *Improved cathode materials for microbial electrosynthesis*. Energy & Environmental Science, 2013. **6**(1): p. 217-224.
35. Francks, A.E. and K.P. Nevin, *Microbial Fuel Cells, A Current Review*. Energies, 2010. **3**: p. 899-919.
36. Lovley, D.R., *Microbial fuel cells : novel microbial physiologies and engineering approaches*. Current Opinion in Biotechnology, 2006. **17**(3): p. 327-332.
37. Logan, B.E., et al., *Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology*. Environmental Science & Technology, 2006. **40**(17): p. 5181-5192.
38. Kim, B.H., et al., *Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell*. Biotechnology Letters, 2003. **25**(7): p. 541-545.
39. Arechederra, R.L. and S.D. Minteer, *Complete Oxidation of Glycerol in an Enzymatic Biofuel Cell*. Fuel cells, 2009. **1**: p. 63-69.
40. Addo, P., R. Arechederra, and S.D. Minteer, *Evaluating Enzyme Cascades for Methanol/Air Biofuel Cells Based on NAD-dependent Enzymes*. Electroanalysis, 2010. **22**: p. 807-812.
41. Sokic-Lazic, D., et al., *Oxidation of Biofuels: Fuel Diversity and Effectiveness of Fuel Oxidation through Multiple Enzyme Cascades*. Electroanalysis, 2010. **22**(7-8): p. 757-764.
42. Miyake, T., et al., *Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms*. Energy & Environmental Science, 2011. **4**(12): p. 5008-5012.
43. Xu, S. and S.D. Minteer, *Enzymatic Biofuel Cell for Oxidation of Glucose to CO₂*. ACS Catalysis, 2012. **2**(1): p. 91-94.
44. Gil, G.C., et al., *Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell*. Biosensors & Bioelectronics, 2003. **18**(4): p. 327-334.
45. Liu, H. and B.E. Logan, *Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane*. Environmental Science & Technology, 2004. **38**(14): p. 4040-4046.
46. Rabaey, K., et al., *Biofuel Cells Selected for Microbial Consortia That Self-Mediate Electron Transfer*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(9): p. 5373-5382.
47. Du, Z., H. Li, and T. Gu, *A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy*. Biotechnology Advances, 2007. **25** (5): p. 464-482.
48. Chang, T.Z., *Kinetics of Wastewater Treatment and Electricity production in a Novel Microbial Fuel Cell*. Journal of the U.S. SJWP, 2008. **3**: p. 16-31.
49. Logan, B.E., *Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation*. Water Science & Technology, 2005. **52**(1-2): p. 31-37.
50. Planetoscope, *Les eaux usées dans le monde*. <http://www.planetoscope.com/eau-oceans/1104-litres-d-eaux-usees-rejetees-dans-la-nature-dans-le-monde.html>.
51. Cao, X., et al., *A New Method for Water Desalination Using Microbial Desalination Cells*. Environmental Science & Technology, 2009. **43**(18): p. 7148-7152.

52. Logan, B.E., et al., *Microbial Electrolysis Cells for High Yield Hydrogen Gas Production from Organic Matter*. Environmental Science & Technology, 2008. **42**(23): p. 8630-8640.
53. Stoica, L., et al., *Membrane-Less Biofuel Cell Based on Cellobiose Dehydrogenase (Anode) / Laccase (Cathode) Wired via Specific Os-Redox Polymers*. Fuel Cells 2009. **9**: p. 53-62.
54. <http://tpebdmw.e-monsite.com/>.
55. <http://www.umt.edu/ethics/debating%20science%20program/odc/climatechange/-climatealternatives/windforgasoline.php>.
56. <http://thebreakthrough.org/tag/Renewables>.
57. Minteer, S.D., B.Y. Liaw, and M.J. Cooney, *Enzyme-based biofuel cells*. Current Opinion in Biotechnology, 2007. **18**(3): p. 228-234.
58. Rismani-Yazdi, H., et al., *Cathodic limitations in microbial fuel cells: An overview*. Journal of Power Sources, 2008. **180**(2): p. 683-694.
59. Tsuchiya, H. and O. Kobayashi, *Mass production cost of PEM fuel cell by learning curve*. International Journal of Hydrogen Energy, 2004. **29**(10): p. 985-990.
60. Wen, Z., et al., *Nitrogen-Enriched Core-Shell Structured Fe/Fe₃C-C Nanorods as Advances Electrocatalysts for Oxygen Reduction Reaction*. Advanced Materials, 2012. **24**(11): p. 1399-1404.
61. Jang, J., et al., *Construction and operation of a novel mediator- and membrane-less microbial fuel cell*. Process Biochemistry, 2004. **39**(8): p. 1007-1012.
62. Rabaey, K., et al., *Continuous microbial fuel cells convert carbohydrates to electricity*. Water Science & Technology, 2004. **52**(1): p. 515-523.
63. Lapinsonnière, L., M. Picot, and F. Barrière, *Enzymatic versus Microbial Bio-Catalyzed Electrodes in Bio-Electrochemical Systems*. ChemSusChem, 2012. **5**(6): p. 995-1005.
64. Akers, N.L., C.M. Moore, and S.D. Minteer, *Development of alcohol/O₂ biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes*. Electrochimica Acta, 2005. **50**: p. 2521-2525.
65. Lim, J., et al., *Direct electron transfer in nanostructured sol-gel electrodes containing bilirubin oxidase*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2007. **9**: p. 6.
66. Tarasevich, M., et al., *Composite Materials for Direct Bioelectrocatalysis of the Hydrogen and Oxygen Reactions in Biofuel Cells*. Russian Journal of Electrochemistry, 2002. **38**(3): p. 335-335.
67. Rüdiger, O., et al., *Enzymatic Anodes for Hydrogen Fuel Cells based on Covalent Attachment of Ni-Fe Hydrogenases and Direct Electron Transfer to SAM-Modified Gold Electrodes*. Electroanalysis, 2010. **22**(7-8): p. 776-783.
68. Baffert, C., et al., *L'électrochimie, un outil pour étudier les mécanismes enzymatiques*. L'actualité chimique, 2015. **392**: p. 9-15.
69. Palmore, G.T.R., et al., *A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD⁺-dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials* Journal of Electroanalytical Chemistry, 1998. **443**: p. 155-161.
70. Mano, N., F. Mao, and A. Heller, *A Miniature Biofuel Cell Operating in A Physiological Buffer*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(44): p. 12962-12963.
71. Katz, E. and I. Willner, *A Biofuel Cell with Electrochemically Switchable and Tunable Power Output*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(22): p. 6803-6813.
72. Kim, H.-H., et al., *A Miniature Membrane-less Biofuel Cell Operating under Physiological Conditions at 0.5 V*. Journal of the Electrochemical Society, 2003. **150**(2): p. A209-A213.
73. Mano, N., F. Mao, and A. Heller, *Characteristics of a Miniature Compartment-less Glucose-O₂ Biofuel Cell and Its Operation in a Living Plant*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(21): p. 6588-6594.
74. Fischback, M.B., et al., *Miniature Biofuel Cells with Improved Stability Under Continuous Operation*. Electroanalysis, 2006. **18**(19-20): p. 2016-2022.
75. Lim, J., et al., *Nanostructured Sol-Gel Electrodes for Biofuel Cells*. Journal of the Electrochemical Society, 2007. **154**(2): p. A140-A145.
76. Deng, L., et al., *A biofuel cell with enhanced performance by multilayer biocatalyst immobilized on highly ordered macroporous electrode*. Biosensors and Bioelectronics, 2008. **24**(2): p. 329-333.

77. Sakai, H., et al., *A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions*. Energy & Environmental Science, 2009. **2**(1): p. 133-138.
78. Wang, S.C., et al., *Membrane-less and mediator-free enzymatic biofuel cell using carbon nanotube/porous silicon electrodes*. Electrochemistry Communications, 2009. **11**(1): p. 34-37.
79. Coman, V., et al., *A Direct Electron Transfer-Based Glucose/Oxygen Biofuel Cell Operating in Human Serum*. Fuel Cells, 2010. **10**(1): p. 9-16.
80. Lee, J.Y., et al., *Use of bioelectrode containing DNA-wrapped single-walled carbon nanotubes for enzyme-based biofuel cell*. Journal of Power Sources, 2010. **195**(3): p. 750-755.
81. Zebda, A., et al., *Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes*. Nature Communications, 2011. **2**(370): p. 1-6.
82. Falk, M., Z. Blum, and S. Shleev, *Direct electron transfer based enzymatic fuel cells*. Electrochimica Acta, 2012. **82**: p. 191-202.
83. Wang, X., et al., *Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **31**(1): p. 219-225.
84. Andoralov, V., et al., *Biofuel Cell Based on Microscale Nanostructured Electrodes with Inductive Coupling to Rat Brain Neurons*. Scientific Reports, 2013. **3**(3270): p. 1-11.
85. MacAodha, D., et al., *Membraneless Glucose/Oxygen Enzymatic Fuel Cells Using Redox Hydrogel Films Containing Carbon Nanotubes*. ChemPhysChem, 2013. **14**(10): p. 2302-2307.
86. Sales, F.C.P.F., et al., *An intravenous implantable glucose/dioxygen biofuel cell with modified flexible carbon fiber electrodes*. Lab on a Chip, 2013. **13**: p. 468-474.
87. Scherbahn, V., et al., *Biofuel cells based on direct enzyme-electrode contacts using PQQ-dependent glucose dehydrogenase/bilirubin oxidase and modified carbon nanotube materials*. Biosensors & Bioelectronics, 2014. **61**: p. 631-638.
88. Fujita, S., et al., *A repeatedly refuelable mediated biofuel cell based on a hierarchical porous carbon electrode*. Scientific Reports, 2014. **4**(4937): p. 1-8.
89. De Poulpiquet, A., et al., *Design of a H₂/O₂ biofuel cell based on thermostable enzymes*. Electrochemistry Communications, 2014. **42**: p. 72-74.
90. Choi, Y.B., J.-M. Lee, and H.-H. Kim, *Synthesis of a New Cathode Redox Polymer for High Performance in Biofuel Cells*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2014. **35**(9): p. 2803-2808.
91. Lalaoui, N., et al., *A membraneless air-breathing hydrogen biofuel cell based on direct wiring of thermostable enzymes on carbon nanotube electrodes*. Chemical Communications, 2015. **51**(35): p. 7447-7450.
92. Ramanavicius, A., et al., *Biofuel cell based on glucose oxidase from *Penicillium funiculosum* 46.1 and horseradish peroxidase*. Chemical Engineering Journal, 2015. **264**: p. 165-173.
93. Chen, J., et al., *Development of Fructose Dehydrogenase-Ferrocene Redox Polymer Films for Biofuel Cell Anodes*. Journal of the Electrochemical Society, 2015. **162**(3): p. F258-F264.
94. Kwon, C.H., et al., *High-power biofuel cell textiles from woven bistructured carbon nanotube yarns*. Nature Communications, 2014. **5**(3928).
95. Yu, E.H. and K. Scott, *Enzymatic Biofuel Cells - Fabrication of Enzyme Electrodes*. Energies, 2010. **3**: p. 23-42.
96. Luz, R.A.S., et al., *Enzyme Biofuel Cells : Thermodynamics, Kinetics and Challenges in Applicability*. ChemElectroChem Reviews, 2014. **1**: p. 1751-1777.
97. Sony, *Sony Develops "Bio Battery" Generating Electricity from Sugar*. <http://www.sony.net/SonyInfo/News/Press/200708/07-074E/index.html>, 2007.
98. MacVittie, K., et al., *From "cyborg" lobsters to a pacemaker powered by implantable biofuel cells*. Energy & Environmental Science, 2013. **6**(1): p. 81-86.
99. Liu, G.D. and Y.H. Lin, *Biosensor Based on Self-Assembling Acetylcholinesterase on Carbon Nanotubes for Flow Injection/Amperometric Detection of Organophosphate Pesticides and Nerve Agents*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(3): p. 835-843.
100. Badihi-Mossberg, M., V. Buchner, and J. Rishpon, *Electrochemical Biosensors for Pollutants in the Environment*. Electroanalysis, 2007. **19**(19-20): p. 2015-2028.
101. Halamek, J., et al., *Self-powered biomolecular keypad lock security system based on a biofuel cell*. Chemical Communications, 2010. **46**(14): p. 2405-2407.
102. Cinquin, P., et al., *A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats*. PLoS ONE, 2010. **5**(5): p. e10476.

103. Jia, W., et al., *Epidermal Biofuel Cells: Energy Harvesting from Human Perspiration*. *Angewandte Chemie*, 2013. **52**(28): p. 7233-7236.
104. Bakker, J., M.W.N. Nijsten, and T.C. Jansen, *Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients*. *Annals of Intensive Care*, 2013. **3**(12): p. 1-8.
105. Pundir, C.S., S. Yadav, and A. Kumar, *Creatinine sensors*. *Trends in Analytical chemistry*, 2013. **50**: p. 42-52.
106. Batra, B., et al., *Construction of an amperometric bilirubin biosensor based on covalent immobilization of bilirubin oxidase onto zirconium coated silica nanoparticles/chitosan hybrid film*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013. **44**: p. 64-69.
107. Feng, Q., et al., *Synthesis of the multi-walled carbon nanotubes-COOH/graphene/goldnanoparticles nanocomposite for simple determination of Bilirubin in human blood serum*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013. **185**: p. 337-344.
108. Fortuney, A. and G. Guilbault, *Enzyme Electrode for the Determination of Bilirubin*. *Electroanalysis*, 1996. **8**(3): p. 229-232.
109. Klemm, J., M.I. Prodomidis, and M.I. Karayannis, *An Enzymic Method for the Determination of Bilirubin Using an Oxygen Electrode*. *Electroanalysis*, 2000. **12**(4): p. 292-295.
110. Shoham, B., et al., *A bilirubin biosensor based on a multilayer network enzyme electrode*. *Biosensors & Bioelectronics*, 1995. **10**: p. 341-352.
111. Kannan, P., et al., *Highly sensitive amperometric detection of bilirubin using enzyme and gold nanoparticles on sol-gel film modified electrode*. *Talanta*, 2011. **86**: p. 400-407.
112. Boopathi, M. and M. Subbaiyan, *Oxidation and estimation of bilirubin by using carbon microelectrode*. *Indian Journal of Chemistry*, 1999. **38A**: p. 1239-1244.
113. McMahon, C.P., et al., *Control of the Oxygen Dependence of an Implantable Polymer/Enzyme Composite Biosensor for Glutamate*. *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(7): p. 2352-2359.
114. Musameh, M., et al., *Glutathione Peroxidase-Based Amperometric Biosensor for the Detection of S-Nitrosothiols*. *Electroanalysis*, 2006. **18**(21): p. 2043-2048.
115. WorldHealthOrganization, *Global status report on noncommunicable diseases* http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf?ua=1, 2014.
116. WorldHealthOrganization, *Diabète, aide-mémoire N°312*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/>, 2015.
117. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden disease from 2002 to 2030*. *PLoS Medicine*, 2006. **3**(11): p. 442.
118. WorldHealthOrganization, *Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012*. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html, 2014.
119. Heller, A., *Integrated Medical Feedback Systems for Drug Delivery*. *Bioengineering, Food and Natural Products*, 2005. **51**(4): p. 1054-1066.
120. Guerci, B. and H. Hanaire, *La mesure continue du glucose : du nouveau dans la surveillance et le traitement du diabète*. <http://www.mced.fr/archives/mced/50/la-mesure-continue-du-glucose-du-nouveau-dans-la-surveillance-et-le-traitement-du-diabete.html>, 2011.
121. James, R., <http://rustyjames.canalblog.com/archives/2011/09/20/22098938.html>, 2011.
122. Falk, M., et al., *Self-Powered Wireless Carbohydrate/Oxygen Sensitive Biodevice Based on Radio Signal Transmission*. *PLoS ONE*, 2014. **9**(10): p. e109104.
123. Makaram, P., D. Owens, and J. Aceros, *Trends in Nanomaterial-Based Non-Invasive Diabetes Sensing Technologies*. *Diagnostics*, 2014. **4**: p. 27-46.
124. Miyashita, M., et al., *Development of urine glucose meter based on micro-planer amperometric biosensor and its clinical application for self-monitoring of urine glucose*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. **24**(5): p. 1336-1340.
125. Su, L., et al., *Colorimetric detection of urine glucose based ZnFe₂O₄ magnetic nanoparticles*. *Analytical Chemistry*, 2012. **84**: p. 5753-5758.
126. <http://ajd-diabete.fr/le-diabete/tout-savoir-sur-le-diabete/la-surveillance/>.
127. <http://www.docteurlic.com/symptome/problemes-d-urines.aspx>.
128. Klonoff, D.C., *Noninvasive blood glucose monitoring*. *Diabetes Care*, 1997. **20**(3): p. 433-437.
129. So, C-F., et al., *Recent advances in noninvasive glucose monitoring*. *Medical Devices: Evidence and Research*, 2012. **5**: p. 45-52.

130. Group, D.R.i.C.N.S., *Accuracy of the GlucoWatch G2 Biographer and the continuous glucose monitoring system during hypoglycemia: experience of the Diabetes Research in Children Network*. Diabetes Care, 2004. **27**: p. 722-726.
131. Windmiller, J.R., et al., *Electrochemical sensing based on printable temporary transfer tattoos*. Chemical Communications, 2012. **48**(54): p. 6794-6796.
132. Bhandodkar, A.J., et al., *Epidermal tattoo potentiometric sodium sensors with wireless signal transduction for continuous non-invasive sweat monitoring*. Biosensors & Bioelectronics, 2014. **54**: p. 603-609.
133. Mendosa, D., *The GlucoWatch Biographer*. <http://www.mendosa.com/glucowatch.htm>, 2007.
134. Peng, B., et al., *Evaluation of enzyme-based tear glucose electrochemical sensors over a wide range of blood glucose concentrations*. Biosensors & Bioelectronics, 2013. **49**: p. 204-209.
135. Mitsubayashi, K., et al., *A flexible biosensor for glucose*. Electroanalysis, 1995. **7**: p. 83-87.
136. Yao, H., et al., *A dual microscale glucose sensor on a contact lens, tested in conditions mimicking the eye*. In Proceedings of the 24th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Cancun, Mexico, 2011: p. 25-28.
137. Yao, H., et al., *A contact lens with embedded sensor for monitoring tear glucose level*. Biosensors & Bioelectronics, 2011. **26**(7): p. 3290-3296.
138. Falk, M., et al., *Miniature biofuel cell as a potential power source for glucose-sensing contact lenses*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(13): p. 6342-6348.
139. King, L., *Google Smart Contact Lens Focuses On Healthcare Billions*. <http://www.forbes.com/sites/leoking/2014/07/15/google-smart-contact-lens-focuses-on-healthcare-billions/>, 2014.
140. Yamaguchi, M., M. Mitsumori, and Y. Kano, *Noninvasively measuring blood glucose using saliva*. IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine, 1998. **17**: p. 59-63.
141. Falk, M., et al., *Biofuel Cells for Biomedical Applications: Colonizing the Animal Kingdom*. ChemPhysChem, 2013. **14**: p. 2045-2058.
142. Katz, E. and K. MacVittie, *Implanted biofuel cells operating in vivo – methods, applications and perspectives – feature article*. Energy & Environmental Science, 2013. **6**: p. 2791-2803.
143. Cosnier, S., A. Le Goff, and M. Holzinger, *Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review*. Electrochemistry Communications, 2014. **38**: p. 19-23.
144. Miyake, T., et al., *Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms*. Energy & Environmental Science, 2011. **4**: p. 5008-5012.
145. MacVittie, K., T. Conlon, and E. Katz, *A wireless transmission system powered by an enzyme biofuel cell implanted in an orange*. Bioelectrochemistry, 2014. **in press**: p. 1-6.
146. Flexer, V. and N. Mano, *From Dynamic Measurements of Photosynthesis in a Living Plant to Sunlight Transformation into Electricity*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(4): p. 1444-1449.
147. Drake, R.F., *A tissue implantable fuel cell power supply*. Transactions - American Society for Artificial Intenal Organs, 1970. **16**(1): p. 199-205.
148. Giner, J., G. Holleck, and P.A. Malachuk, *Eine implantierbare Brennstoffzelle zum Betrieb eines mechanischen Herzens*. Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie, 1973. **77**(10-11): p. 782.
149. Rasmussen, M., et al., *An Implantable Biofuel Cell for a Live Insect*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(3): p. 1458-1460.
150. Halamkova, L., et al., *Implanted Biofuel Cell Operating in a Living Snail*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(11): p. 5040-5043.
151. Andoralov, V., et al., *High-performance, size-optimised, nanobiostructure-based biofuel cell operating in rat brain*. 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Prague, 2012: p. 8.
152. Szczupak, A., et al., *Living battery _ biofuel cells operationg in vivo in clams*. Energy & Environmental Science, 2012. **5**: p. 8891-8895.
153. Zebda, A., et al., *Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices*. Scientific Reports, 2013. **3**(1516): p. 1-5.
154. Castorena-Gonzalez, J.A., et al., *Biofuel Cell Operating in Vivo in Rat*. Electroanalysis, 2013. **25**(7): p. 1579-1584.

155. Nien, P.C., et al., *Encapsulating benzoquinone and glucose oxidase with a PEDOT film: Application to oxygen-independent glucose sensors and glucose/O₂ biofuel cells*. *Bioresource Technology*, 2010. **101**(14): p. 5480-5486.
156. Pan, C., et al., *Generating Electricity from Biofluid with a Nanowire-Based Biofuel Cell for Self-Powered Nanodevices*. *Advanced Materials*, 2010. **22**(47): p. 5388-5392.
157. Gao, F., et al., *An enzymatic glucose/O₂ biofuel cell: Preparation, characterization and performance in serum*. *Electrochemistry Communications*, 2007. **9**: p. 989-996.
158. Li, X., et al., *A Miniature Glucose/O₂ Biofuel Cell With a High Tolerance Against Ascorbic Acid*. *Fuel Cells*, 2009. **9**(1): p. 85-91.
159. Ammam, M. and J. Fransaer, *Micro-biofuel cell powered by glucose/O₂ based on electro-deposition of enzyme, conducting polymer and redox mediators: Preparation, characterization and performance in human serum*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2010. **25**: p. 1474-1480.
160. Ammam, M. and J. Fransaer, *Glucose/O₂ biofuel cell based on enzymes, redox mediators, and Multiple-walled carbon nanotubes deposited by AC-electrophoresis then stabilized by electropolymerized polypyrrole*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012. **109**(7): p. 1601-1609.
161. Ó Conghaile, P., et al., *Tethering Osmium Complexes within Enzyme Films on Electrodes to Provide a Fully Enzymatic Membrane-Less Glucose/Oxygen Fuel Cell*. *Journal of the Electrochemical Society*, 2013. **160**(7): p. G3165-G3170.
162. Holade, Y., et al., *Pacemaker Activated by an Abiotic Biofuel Cell Operated in Human Serum Solution*. *Electroanalysis*, 2014. **26**: p. 2445-2457.
163. Kwon, C.H., et al., *Stability of carbon nanotube yarn biofuel cell in human body fluid*. *Journal of Power Sources*, 2015. **286**: p. 103-108.
164. Lee, J.Y., et al., *Application of an enzyme-based biofuel cell containing a bioelectrode modified with deoxyribonucleic acid-wrapped single-walled carbon nanotubes to serum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011. **48**: p. 80-84.
165. Kang, C., H. Shin, and A. Heller, *On the stability of the "wired" bilirubin oxidase oxygen cathode in serum*. *Bioelectrochemistry*, 2006. **68**: p. 22-26.
166. Mate, D.M., et al., *Blood tolerant laccase by directed evolution*. *Chem Biol*, 2013. **20**(2): p. 223-31.
167. Southcott, M., et al., *A pacemaker powered by an implantable biofuel cell operating under conditions mimicking the human blood circulatory system - battery not included*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013. **15**(17): p. 6278-6283.
168. Bartlett, P.N. and J.M. Cooper, *A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1993. **362**: p. 1-12.
169. Attard, G.S., et al., *Mesoporous Platinum Films from Lyotropic Liquid Crystalline Phases*. *Science*, 1997. **278**(5339): p. 838-840.
170. Elliott, J.M., et al., *Platinum Microelectrodes with Unique High Surface Areas*. *Langmuir*, 1999. **15**(22): p. 7411-7415.
171. Gollas, B., J.M. Elliot, and P.N. Bartlett, *Electrodeposition and properties of nanostructured platinum films studied by quartz crystal impedance measurements at 10 MHz*. *Electrochimica Acta*, 2000. **45**: p. 3711-3724.
172. Bartlett, P.N., et al., *Highly Ordered Macroporous Gold and Platinum Films Formed by Electrochemical Deposition through Templates Assembled from Submicron Diameter Monodisperse Polystyrene Spheres*. *Chemistry of Materials*, 2002. **14**: p. 2199-2208.
173. Evans, S.A.G., et al., *Detection of Hydrogen Peroxide at Mesoporous Platinum Microelectrodes*. *Analytical Chemistry*, 2002. **74**(6): p. 1322-1326.
174. Nie, M. and J.M. Elliot, *Electrochemical Fabrication and Electrocatalytic Properties of Nanostructured Mesoporous Platinum Microelectrodes*. *Journal of Materials Science & Technology*, 2005. **21**(6): p. 863-865.
175. Wang, J.W., et al., *Glucose oxidase entrapped in polypyrrole on high-surface-area Pt electrodes: a model platform for sensitive electroenzymatic biosensors*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2005. **575**: p. 139-146.

176. Seo, H.-K., D.-J. Park, and J.-Y. Park, *Fabrication and Characterization of Nano-Hole-Arrayed Pt Electrode on Silicon for CMOS Integrated Non-Disposable Biosensor Applications*. Journal of the Korean Physical Society, 2006. **49**: p. S812-S815.
177. Shulga, O.V., et al., *Preparation and Characterization of Porous Gold and its Application as a Platform for Immobilization of Acetylcholine Esterase*. Chemistry of materials : a publication of the American Chemical Society, 2007. **19**(16): p. 3902-3911.
178. Boretius, T., et al., *High-porous platinum electrodes for functional electrical stimulation*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2011. **2011**: p. 5404-7.
179. Reculosa, S., et al., *Design of Catalytically Active Cylindrical and Macroporous Gold Microelectrodes*. Advanced Functional Materials, 2011. **21**(4): p. 691-698.
180. Boland, S. and D. Leech, *A glucose/oxygen enzymatic fuel cell based on redox polymer and enzyme immobilisation at highly-ordered macroporous gold electrodes*. Analyst, 2012. **137**: p. 113-117.
181. Hakamada, M., M. Takahashi, and M. Mabuchi, *Enzyme electrodes stabilized by monolayer-modified nanoporous Au for biofuel cells*. Gold Bulletin, 2012. **45**(1): p. 9-15.
182. Kloke, A., et al., *Cyclic Electrodeposition of PtCu Alloy: Facile Fabrication of Highly Porous Platinum Electrodes* Advanced Materials, 2012. **24**(21): p. 2916-2921.
183. Scanlon, M.D., et al., *Characterization of Nanoporous Gold Electrodes for Bioelectrochemical Applications*. Langmuir, 2012. **28**(4): p. 2251-2261.
184. du Toit, H. and M. Di Lorenzo, *Glucose Oxidase Directly Immobilized onto Highly Porous Gold Electrodes for Sensing and Fuel Cell applications*. Electrochimica Acta, 2014. **138**: p. 86-92.
185. Schröper, F., et al., *Analyzing the electroactive surface of gold nanopillars by electrochemical methods for electrode miniaturization*. Electrochimica Acta, 2008. **53**(21): p. 6265-6272.
186. Shin, C., W. Shin, and H.G. Hong, *Electrochemical fabrication and electrocatalytic characteristics studies of gold nanopillar array electrode (AuNPE) for development of a novel electpchemical sensor*. Electrochimica Acta, 2007. **53**(2): p. 720-728.
187. Fathima, S.J.H., J. Paul, and S. Valiyaveetil, *Surface-structured gold-nanotube mats: fabrication, characterization, and application in surface-enhanced Raman scattering*. Small, 2010. **6**(21): p. 2443-2447.
188. Marx, S., et al., *Electrospun gold nanofiber electrodes for biosensors*. Biosensors & Bioelectronics, 2011. **26**(6): p. 2981-2986.
189. Kim, M., et al., *Fabrication of nanoporous superstructures through hierarchical selfassembly of nanoparticles*. Journal of Materials Chemistry, 2008. **18**(19): p. 2208-2212.
190. Murata, K., et al., *A simple fabrication method for three-dimensional gold nanoparticle electrodes and their application to the study of the direct electrochemistry of cytochrome C*. Electroanalysis, 2010. **22**(2): p. 185-190.
191. Zhao, B. and M.M. Collinson, *Hierarchical porous gold electrodes: preparation, characterization, and electrochemical behavior*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2012. **684**: p. 53-59.
192. Ding, Y., Y.J. Kim, and J. Erlebacher, *Nanoporous gold leaf: "ancient technology"/advanced material*. Advanced Materials, 2004. **16**(21): p. 1897-1900.
193. Arico, A.S., et al., *Nanostructured materials for advanced energy conversion and storage devices*. Nature Materials, 2005. **4**(5): p. 366-377.
194. Asefa, T., C.T. Duncan, and K.K. Sharma, *Recent advances in nanostructured chemosensors and biosensors*. Analyst, 2009. **134**(10): p. 1980-1990.
195. Dai, Z.H. and H.X. Ju, *Bioanalysis based on nanoporous materials*. Trends in Analytical Chemistry, 2012. **39**: p. 149-162.
196. Menzel, N., et al., *Electrocatalysis using porous nanostructured materials*. ChemPhysChem, 2012. **13**: p. 1385-1394.
197. Park, S., H.C. Kim, and T.D. Chung, *Electrochemical analysis based on nanoporous structures*. Analyst, 2012. **137**(17): p. 3891-3903.
198. Seker, E., M.L. Reed, and M.R. Begley, *Nanoporous gold: fabrication, characterization, and applications*. Materials, 2009. **2**(4): p. 2188-2099.
199. Walcarius, A. and A. Kuhn, *Ordered porous thin films in electrochemical analysis*. Trends in Analytical Chemistry, 2008. **27**(7): p. 593-603.

200. Wittstock, A., J. Biener, and M. Bäumer, *Nanoporous gold: a new material for catalytic and sensor applications*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(40): p. 12919-12930.
201. Yamauchi, Y. and K. Kuroda, *Rational design of mesoporous metals and related nanomaterials by a soft-template approach*. Chemistry - An Asian Journal, 2008. **3**(4): p. 664-676.
202. Bartlett, P.N., P.R. Birkin, and M.A. Ghanem, *Electrochemical deposition of macroporous platinum, palladium and cobalt films using polystyrene latex sphere templates*. Chemical Communications, 2000. **17**: p. 1671-1672.
203. Jia, F.L., et al., *Nanoporous metal (Cu, Ag, Au) films with high surface area: General fabrication and preliminary electrochemical performance*. Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(2): p. 8424-8431.
204. Wijnhoven, J., et al., *Electrochemical assembly of ordered macropores in gold*. Advanced Materials, 2000. **12**(12): p. 888-890.
205. Zhang, R. and H. Olin, *Porous Gold Films - A Short Review on Recent Progress*. Materials, 2014. **7**: p. 3834-3854.
206. Sieradzki, K., et al., *The dealloying critical potential*. Journal of the Electrochemical Society, 2002. **149**(8): p. B370-B377.
207. Wagner, K., et al., *Dealloying below critical potential*. Journal of the Electrochemical Society, 1997. **144**(10): p. 3545-3555.
208. Pita, M., et al., *Oxygen biosensor based on bilirubin oxidase immobilized on a nanostructured gold electrode*. Bioelectrochemistry, 2013. **94**: p. 69-74.
209. Gutierrez-Sanchez, C., et al., *Gold nanoparticles as electronic bridges for laccase-based biocathodes*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(41): p. 17212-20.
210. Volkert, C.A., et al., *Approaching the theoretical strength in nanoporous Au*. Applied Physics Letters, 2006. **89**(061920): p. 1-4.
211. Ji, C. and P.C. Searson, *Fabrication of nanoporous gold nanowires* Applied Physics Letters, 2002. **81**(23): p. 4437-4439.
212. Collinson, M.M., *Nanoporous Gold Electrodes and Their Applications in Analytical Chemistry*. Analytical Chemistry, 2013. **2013**: p. 21.
213. Wang, J., *Electrochemical Glucose Biosensors*. Chemical Reviews, 2008. **108**: p. 814-825.
214. Xiao, Y., et al., *"Plugging into Enzymes": Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle*. Science, 2003. **299**(5614): p. 1877-1881.
215. Willner, B., E. Katz, and I. Willner, *Electrical contacting of redox proteins by nanotechnological means*. Current Opinion in Biotechnology, 2006. **17**(6): p. 589-596.
216. Weigel, M.C., E. Tritzsch, and F. Lisdat, *Direct electrochemical conversion of bilirubin oxidase at carbon nanotube-modified glassy carbon electrodes*. Electrochemistry Communications, 2007. **9**(4): p. 689-693.
217. Tasca, F., et al., *Increasing amperometric biosensor sensitivity by length fractionated single-walled carbon nanotubes*. Biosensors & Bioelectronics, 2008. **24**(2): p. 272-278.
218. Nazaruk, E., et al., *Powerful connection of laccase and carbon nanotubes: Material for mediator-free electron transport on the enzymatic cathode of the biobattery*. Electrochemistry Communications, 2012. **14**(1): p. 67-70.
219. Scanlon, M.D., et al., *Characterization of Nanoporous Gold Electrodes for Bioelectrochemical Applications*. Langmuir, 2012. **28**: p. 2251-2261.
220. Kloke, A., et al., *A Single Layer Glucose Fuel Cell Intended as Power Supplying Coating for Medical Implants*. Fuel Cells, 2011. **11**(2): p. 316-326.
221. Kerzenmacher, S., et al., *A potentially implantable glucose fuel cell with Raney-platinum film electrodes for improved hydrolytic and oxidative stability*. Journal of Power Sources, 2011. **196**: p. 1264-1272.
222. Yan, Y.M., et al., *An ethanol/O₂ biofuel cell based on an electropolymerized bilirubine oxidase/Pt nanoparticle bioelectrocatalytic O₂ reduction cathode*. Advanced Materials, 2009. **21**(42): p. 4275-4279.
223. Ghoudhary, V. and A. Gupta, *Polymer/Carbon Nanotube Nanocomposites*. Carbon Nanotubes - Polymer Nanocomposites, Dr. Siva Yellampalli (Ed.), ISBN: 978-953-307-498-6, 2011. **chap. 4**: p. 65-91.

224. Patolsky, F., Y. Weizmann, and I. Willner, *Long-Range Electrical Contacting of Redox Enzymes by SWCNT Connectors*. *Angewandte Chemie*, 2004. **43**(16): p. 2113.
225. Liu, J., et al., *Achieving Direct Electrical Connection to Glucose Oxidase Using Aligned Single Walled Carbon Nanotube Arrays*. *Electroanalysis*, 2005. **17**(1): p. 38-46.
226. Gooding, J.J., et al., *Protein Electrochemistry Using Aligned Carbon Nanotube Arrays*. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. **125**(30): p. 9006-9007.
227. Lin, Y., J. Liu, and J. Wang, 225th ACS National Meeting, New Orleans, LA, United States, March 23-27, 2003.
228. Wang, J., *Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review*. *Electroanalysis*, 2005. **17**(1): p. 7-14.
229. Gooding, J.J., *Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing*. *Electrochimica Acta*, 2005. **50**: p. 3049-3060.
230. Opallo, M. and R. Bilewicz, *Recent Developments of Nanostructured Electrodes for Bioelectrocatalysis of Dioxygen Reduction*. *Advances in Physical Chemistry*, 2011. **2011**: p. 1-21.
231. Holzinger, M., A. Le Goff, and S. Cosnier, *Carbon nanotube / enzyme biofuel cells*. *Electrochimica Acta*, 2012. **82**: p. 179-190.
232. Geto, A., et al., *Electrochemical determination of berberine at a multi-walled carbon nanotubes-modified glassy carbon electrode*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2013. **183**: p. 96-101.
233. Hussein, L., G. Urban, and M. Krüger, *Fabrication and characterization of buckypaper-based nanostructured electrodes as a novel material for biofuel cell applications*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011. **13**: p. 5831-5839.
234. Pancratov, D.V., et al., *A Comparative Study of Biocathodes Based on Multiwall Carbon Nanotube Buckypapers Modified with Three Different Multicopper Oxidases*. *Electroanalysis*, 2013. **25**(5): p. 1143-1149.
235. Lee, J.A., et al., *Ultrafast charge and discharge bisrolled yarn supercapacitors for textiles and microdevices*. *Nature Communications*, 2013. **4**(1970).
236. Wang, K., et al., *High-Performance Two-Ply Yarn Supercapacitors Based on Carbon Nanotubes and Polyaniline Nanowire Arrays*. *Advanced Materials*, 2013. **25**(10): p. 1494-1498.
237. Haneda, K., et al., *Sheet-shaped biofuel cell constructed from enzyme-modified nanoengineered carbon fabric*. *Electrochimica Acta*, 2012. **82**: p. 175-178.
238. Weigel, M.C., E. Tritzsch, and F. Lisdat, *Direct electrochemical conversion of bilirubin oxidase at carbon nanotube-modified glassy carbon electrodes*. *Electrochemistry Communications*, 2007. **9**: p. 5.
239. Göbel, G., T. Dietz, and F. Lisdat, *Biosensor based on an oxygen reducing bilirubin oxidase electrode*. *Procedia Chemistry*, 2009. **1**: p. 4.
240. Schubert, K., G. Goebel, and F. Lisdat, *Bilirubin oxidase bound to multi-walled carbon nanotube-modified gold*. *Electrochimica Acta*, 2009. **54**: p. 6.
241. Yehezkeili, O., et al., *Integrated photosystem II-based photo-bioelectrochemical cells*. *Nature Communications*, 2012. **3**(742): p. 7.
242. Korania, A. and A. Salimia, *Fabrication of High performance bioanode based on fruitful association of dendrimer and carbon nanotube used for design O₂/glucose membrane-less biofuel cell with improved bilirubine oxidase biocathode*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. **50**: p. 186-193.
243. Lopez, R.J., et al., *Improved Interfacial Electron Transfer in Modified Bilirubin Oxidase Biocathodes*. *ChemElectroChem*, 2014. **1**: p. 241-248.
244. Ulyanova, Y., et al., *Effect of enzymatic orientation through the use of syringaldazine molecules on multiple multi-copper oxidase enzymes*. *Phys Chem Chem Phys*, 2014. **16**(26): p. 13367-75.
245. Liu, Y., X. Zou, and S. Dong, *Electrochemical characteristics of facile prepared carbon nanotubes-ionic liquid gel modified microelectrode and application in bioelectrochemistry*. *Electrochemistry Communications*, 2006. **8**(9): p. 1429-1434.
246. Zhang, L., et al., *Small-size biofuel cell on paper*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2012. **35**(1): p. 155-159.

247. Zheng, W., et al., *Direct Electrochemistry of Multi-Copper Oxidases at Carbon Nanotubes Noncovalently Functionalized with Cellulose Derivatives*. *Electroanalysis*, 2006. **18**(6): p. 587-594.
248. Wu, X., et al., *A one-compartment fructose/air biological fuel cell based on direct electron transfer*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009. **25**: p. 6.
249. Ye, J.S., et al., *Electrochemical Biosensing Platforms Using Phthalocyanine-Functionalized Carbon Nanotube Electrode*. *Electroanalysis*, 2005. **17**(1): p. 89-96.
250. Kandimalla, V.B. and H. Ju, *Binding of Acetylcholinesterase to Multiwall Carbon Nanotube-Cross-Linked Chitosan Composite for Flow-Injection Amperometric Detection of an Organophosphorous Insecticide*. *Chemistry - A European Journal*, 2006. **12**(4): p. 1074-1080.
251. Feng, H., et al., *Design of a Direct Electrochemical Immunosensor Based on Redox Electropolymerized Poly(Thionine) Film and Composite Nanomaterials*. *Chinese Journal of Sensors and Actuators*, 2007. **20**(8): p. 1683-1686.
252. Zhu, Y., T. Peng, and J. Li, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2004. **32**: p. 1299-1303.
253. Qu, S., et al., *Magnetic loading of carbon nanotube/nano-Fe₃O₄ composite for electrochemical sensing*. *Talanta*, 2007. **71**(3): p. 1096-1102.
254. Flexer, V., et al., *Porous mediator-free enzyme carbonaceous electrodes obtained through Integrative Chemistry for biofuel cells*. *Energy & Environmental Science*, 2011. **4**(6): p. 2097-2106.
255. Flexer, V., et al., *A novel three-dimensional macrocellular carbonaceous biofuel cell*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013. **15**: p. 6437-6445.
256. Flexer, V., et al., *Designing highly efficient enzyme-based carbonaceous foams electrodes for biofuel cells*. *Energy & Environmental Science*, 2010. **3**: p. 1302-1306.
257. Zhou, M.D., L., et al., *Highly ordered mesoporous carbone-based glucose/O₂ biofuel cells*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009. **24**(9): p. 2904-2908.
258. Bao, S.J., C.X. Guo, and C.M. Li, *Hydrophilic porous carbon with tailored nanostructure and its sensitive hydrogen peroxide biosensor*. *RSC Advances*, 2012. **2**: p. 1014-1020.
259. Tsujimura, S., Y. Kamitaka, and K. Kano, *Diffusion-Controlled Oxygen Reduction on Multi-Copper Oxidase-Adsorbed Carbon Aerogel Electrodes without Mediator*. *Fuel Cells*, 2007. **6**: p. 463-469.
260. Kamitaka, Y., et al., *Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis* *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2007. **9**: p. 1793-1801.
261. Flexer, V., et al., *Efficient Direct Electron Transfer of PQQ-glucose Dehydrogenase on Carbon Cryogel Electrodes at Neutral pH*. *Analytical Chemistry*, 2011. **83**(14): p. 5721-5727.
262. Filip, J., J.G. Sefcovicova, P., and J. Tkac, *Electrochemistry of bilirubin oxidase and its use in preparation of a low cost enzymatic biofuel cell based on a renewable composite binder chitosan*. *Electrochimica Acta*, 2013. **87**: p. 366-374.
263. Thomas, S., G.E. Zaikov, and S.V. Valsaraj, *Recent Advances in Polymer Nano-composites*. *Technology & Engineering*, 2009.
264. Li, Y., et al., *Immobilization of Laccase into Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene) Assisted Biocathode for Biofuel Cell Applications*. *International Journal of Electrochemical Science*, 2012. **7**: p. 11400-11413.
265. Nien, P.C., et al., *Encapsulating benzoquinone and glucose oxidase with a PEDOT film: application to oxygen-independent glucose sensors and glucose/O₂ biofuel cells*. *Bioresour Technol*, 2010. **101**(14): p. 5480-6.
266. Long, Y.-Z., et al., *Recent advances in synthesis, physical properties and applications of conducting polymer nanotubes and nanofibers*. *Progress in Polymer Science*, 2011. **36**: p. 1415-1442.
267. Lange, U., N.V. Roznyatovskaya, and V.M. Mirsky, *Conducting polymers in chemical sensors and arrays*. *Analytica Chimica Acta*, 2008. **614**(1): p. 1-26.
268. Tai, Q., et al., *In Situ Prepared Transparent Polyaniline Electrode and Its Application in Bifacial Dye-Sensitized Solar Cells*. *ACS Nano*, 2011. **5**(5): p. 3795-3799.
269. Tian, Y., B. Wu, and D. Mao, *Study on Activated Carbon/Polyaniline Electrode Materials for Supercapacitors*. *Advanced Materials Research*, 2010. **97-101**: p. 1582-1585.
270. Kim, H.J., et al., *Immobilization of glucose oxidase into polyaniline nanofiber matrix for biofuel cell applications*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011. **26**(9): p. 3908-3913.

271. Lee, S.M., B. Choi, and A. Tsutsumi, *Electrochemical properties of polyaniline/carboxydextran (PANI/carDEX) composite films for biofuel cells in neutral aqueous solutions*. Biotechnology Letters, 2009. **31**(6): p. 851-855.
272. Xu, S. and S.D. Minteer, *Pyrroloquinoline Quinone-Dependent Enzymatic Bioanode: Incorporation of the Substituted Polyaniline Conducting Polymer as a Mediator*. ACS Catalysis, 2014. **4**(7): p. 2241-2248.
273. Yu, X., et al., *A polyaniline nanofibre electrode and its application in a self-powered photoelectrochromic cell*. Nanotechnology, 2007. **18**(1): p. 1-8.
274. Karthaus, O., T. Okamoto, and A. Sato, *Polyaniline self-organizes into honeycomb films for solar cell applications*. Society of Photo-optical Instrumentation Engineers, 2012. **Solar & Alternative Energy**: p. 1-3.
275. Suriyanarayanan, S., et al., *Chemosensors Based on Molecularly Imprinted Polymers*. Topics in Current Chemistry, 2012. **325**: p. 165-266.
276. Spégel, P., L. Schweitz, and S. Nilsson, *Molecularly imprinted polymers*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002. **372**(1): p. 37-38.
277. Ulyanova, Y.V., A.E. Blackwell, and S.D. Minteer, *Poly(methylene green) employed as molecularly imprinted polymer matrix for electrochemical sensing*. Analyst, 2006. **131**(2): p. 257-261.
278. B., N., A. Warsinke, and M. Katterle, *Enzyme Activity Control by Responsive Redoxpolymers*. Langmuir, 2007. **23**(12): p. 6807-6811.
279. Sarma, A.K., et al., *Recent advances in material science for developing enzyme electrodes*. Biosensors & Bioelectronics, 2009. **24**(8): p. 2313-2322.
280. Tkac, J., J.W. Whittaker, and T. Ruzgas, *The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor*. Biosensors & Bioelectronics, 2007. **22**(8): p. 1820-1824.
281. Klotzbach, T., et al., *Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization*. Journal of Membrane Science, 2006. **282**(1-2): p. 276-283.
282. Watt, M. and S.D. Minteer, *Developing chemically modified electrodes for bioelectrocatalysis*. Abstracts of Papers, 233rd ACS National Meeting, Chicago, IL, United States, March 35-29, 2007.
283. Wang, J., *Sol-gel materials for Electrochemical biosensors*. Analytical Chimica Acta, 1999. **399**(1-2): p. 21-27.
284. Tsujimura, S., et al., *Electrochemical reaction of fructose dehydrogenase on carbon cryogel electrodes with controlled pore sizes*. Electrochemistry Communications, 2010. **12**(3): p. 446-449.
285. Tamon, H., et al., *Preparation of mesoporous carbon by freeze drying*. Carbon, 1999. **37**(12): p. 2049-2055.
286. Hamano, Y., et al., *Micro-cubic monolithic carbon cryogel electrode for direct electron transfer reaction of fructose dehydrogenase*. Bioelectrochemistry, 2012. **88**: p. 114-117.
287. Gorton, L., *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*. Comprehensive Analytical Chemistry Volume XLIV, Elsevier Science, 2005: p. 285-237.
288. Institut-de-Biochimie-de-Provence, *Introduction à la cinétique enzymatique*. cours de biochimie, 2013.
289. Horton, H.R., et al., *Principes de Biochimie*. Traduction de l'ouvrage américain, Edition DeBoeck-Wesmael, Bruxelles, 1994.
290. Reuillard, B., et al., *Non-covalent functionalization of carbon nanotubes with boronic acids for the wiring of glycosylated redox enzymes in oxygen-reducing biocathodes*. Journal of Materials Chemistry B, 2014. **2**(16): p. 2228-2232.
291. Solomon, E.I., et al., *Oxygen Binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins*. Angewandte Chemie, 2006. **40**: p. 4570-4590.
292. Solomon, E.I., A.J. Augustine, and Y. Jungjoo, *O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases*. Dalton Transactions, 2008: p. 3921-3932.
293. Kjaergaard, C.H., et al., *Two-Electron Reduction versus One-Electron Oxidation of the Type 3 Pair in the Multicopper Oxidases*. Journal of the American Chemical Society, 2015: p. A-L.

294. Xiao, Z. and A.G. Wedd, *Metallo-oxidase Enzymes: Design of their active sites*. Australian Journal of Chemistry, 2011. **64**(3): p. 231-238.
295. Mano, N., *Features and applications of bilirubin oxidases*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. **96**(2): p. 7.
296. Klinman, J.P., *Mechanisms Whereby Mononuclear Copper Proteins Functionalize Organic Substrates*. Chemical Reviews, 1996. **96**(7): p. 2541-2562.
297. Lewis, E.A. and M.B. Tolman, *Reactivity of Dioxygen-Copper Systems*. Chemical Reviews, 2004. **104**: p. 1047-1076.
298. Sakurai, T. and K. Kataoka, *Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase*. The Chemical Record, 2007. **7**: p. 10.
299. Han, M.J., H.T. Choi, and H.G. Song, *Purification and characterization of laccase from the white rot fungus Trametes versicolor*. 2005. **43**(6): p. 555-560.
300. Giardina, P., et al., *Laccases: a never-ending story*. Cellular and molecular life sciences, 2010. **67**(3): p. 369-385.
301. Kataoka, K., et al., *High-level expression of Myrothecium verrucaria bilirubin oxidase in Pichia pastoris, and its facile purification and characterization*. Protein Expression and Purification, 2005. **41**(1): p. 77-83.
302. Hiromi, K., et al., *Bilirubin oxidase from Trachyderma tsunodae K-2593, a multicopper enzyme*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1992. **56**: p. 1349-1350.
303. Zaitsev, V.N., et al., *An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma*. J Biol Inorg Chem, 1999. **4**(5): p. 579-587.
304. Zaitseva, I., et al., *The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: Nature of the copper centres*. J. Biol. Inorg. Chem. , 1996. **1**(1): p. 15-23.
305. Haberska, K., et al., *Direct electron transfer reactions between human ceruloplasmin and electrodes*. Bioelectrochemistry, 2009. **76**(1-2): p. 34-41.
306. Hirose, J., et al., *Characterization of ascorbate oxidase from Acremonium sp. HI-25*. Journal of Biochemistry, 1994. **115**(5): p. 811-813.
307. Kawahara, K., et al., *Characterization of cucumber ascorbate oxidase and its reaction with hexacyanoferrate (II)*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1985. **241**(1): p. 179-186.
308. Messerschmidt, A., et al., *X-ray crystal structure of the blue oxidase ascorbate oxidase from zucchini. Analysis of the polypeptide fold and a model of the copper sites and ligands*. Journal of Molecular Biology, 1989. **206**(3): p. 513-529.
309. Xu, F., et al., *A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability*. Biochimica BiophysicaActa, 1996. **1292**: p. 303-311.
310. Mayer, A. and R. Staples, *Laccase: new functions for an old enzyme*. Phytochemistry 2002. **60**(6): p. 551-565.
311. Shleev, S., et al., *Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes*. Biosensors & Bioelectronics, 2005. **20**: p. 2517-2554.
312. Kaim, W. and J. Rall, *Copper - a "modern" bioelement*. Angewandte Chemie, 1996. **35**: p. 43-60.
313. Tarasevich, M., et al., *Electrocatalysis of a cathodic oxygen reduction by laccase*. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1979. **104**: p. 393-403.
314. Ivnitski, D. and P. Atanassov, *Electrochemical Studies of Intramolecular Electron Transfer in Laccase from Trametes versicolor*. Electroanalysis, 2007. **19**(22): p. 2307-2313.
315. Coman, V., et al., *A membrane-, mediator-, cofactor-less glucose/oxygen biofuel cell*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2008. **10**: p. 6093-6096.
316. Gutierrez-Sanchez, C., et al., *Third-generation oxygen amperometric biosensor based on Trametes hirsuta laccase covalently bound to graphite electrode*. Chemical Papers, 2015. **69**(1): p. 237-240.
317. Gutierrez-Sanchez, C., et al., *Enhanced direct electron transfer between laccase and hierarchical carbon microfibers/carbon nanotubes composite electrodes. Comparison of three enzyme immobilization methods*. Electrochimica Acta, 2012. **82**: p. 218-223.
318. Mano, N. and L. Edembe, *Bilirubin oxidases in bioelectrochemistry: Features and recent findings*. Biosensors and Bioelectronics 2013. **50**: p. 478-485.

319. Murao, S. and N. Tanaka, *A new enzyme "bilirubin oxidase" produced by Myrothecium verrucaria MT-1*. Agricultural and Biological Chemistry, 1981. **45**(10): p. 2.
320. Guo, J., et al., *Purification and properties of bilirubin oxidase from Myrothecium verrucaria*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1991. **31**(2): p. 135-143.
321. Murao, S. and N. Tanaka, *Isolation and identification of a microorganism producing bilirubin oxidase*. Agricultural and Biological Chemistry, 1982. **46**(8): p. 4.
322. Tanaka, N. and S. Murao, *Reaction of bilirubin oxidase produced by Myrothecium verrucaria MT-1*. Agricultural and biological chemistry, 1985. **49**: p. 843-844.
323. Sakurai, T., et al., *Authentic and recombinant bilirubin oxidases are in different resting forms*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2003. **67**(5): p. 1157-1159.
324. Reiss, R., J. Ihssen, and L. Thöny-Meyer, *Bacillus pumilus laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum*. BMC Biotechnology, 2011. **11**(9).
325. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Bacillus pumilus: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 7.
326. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Magnaporthe oryzae: an attractive new enzyme for biotechnological applications*. Appl Microbiol Biotechnol, , 2012. **96**(6): p. 1489-1498.
327. Giroud, F., et al., *An enzymatic biofuel cell based on electrically wired polyphenol oxidase and glucose oxidase operating under physiological conditions*. Electrochimica Acta, 2012. **85**: p. 278-282.
328. Wait, A.F., et al., *Characteristics of Enzyme-Based Hydrogen Fuel Cells Using an Oxygen-Tolerant Hydrogenase as the Anodic Catalyst*. Journal of Physical Chemistry C, 2010. **114**(27): p. 12003-12009.
329. Feldman, B., *Electrochemical blood glucose test strips for people with diabetes*. <http://electrochem.cwru.edu/encycl/art-g01-glucose.htm>, 2009.
330. Kano, K., *Redox Potentials of Proteins and Other Coumpounds of Bioelectrochemical Interst in Aqueous Solutions*. Review of Polarography, 2002. **48**(1): p. 29-46.
331. Olsthoorn, A.J.J. and J.A. Duine, *On the Mechanism and Specificity of Soluble, Quinoprotein Glucose Dehydrogenase in the Oxidation of Aldose Sugars*. Biochemistry, 2008. **37**: p. 13854-13861.
332. Sato, F., et al., *Enzyme-based glucose fuel cell using vitamin K3-immobilized polymer as an electron mediator*. Electrochemistry Communications, 2005. **7**: p. 643-647.
333. Administration, U.S.F.a.D., *FDA Public Health Notification: Potentially Fatal Errors with GDH-PQQ Glucose Monitoring Technology*. <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/PublicHealthNotifications/ucml76993.htm>, 2009.
334. Matsushita, K., et al., *Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. **58**(1): p. 13-22.
335. Tsujimura, S., et al., *Potential-step coulometry of d-glucose using a novel FAD-dependent glucose dehydrogenase*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **386**(3): p. 645-651.
336. Tsujimura, S., et al., *Novel FAD-Dependent Glucose Dehydrogenase for a Dioxygen-Insensitive Glucose Biosensor*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006. **70**(3): p. 654-659.
337. Yamaoka, H., et al., *Site directed mutagenesis studies of FAD-dependent glucose dehydrogenase catalytic subunit of Burkholderia cepacia*. Biotechnology Letters, 2008. **30**(11): p. 1967-1972.
338. Bode, B., *The Accuracy and Interferences in Self-monitoring of Blood Glucose*. <http://www.touchbriefings.com/ebooks/A180yo/usendo2007iss2/resources/49.htm>, 2007.
339. Tremey, E., et al., *Switching an O₂ sensitive glucose oxidase bioelectrode into an almost insensitive one by cofactor redesign*. Chemical Communications, 2014. **50**(44): p. 5912-5914.
340. Milton, R.D., et al., *Hydrogen peroxide produced by glucose oxidase affects the performance of laccase cathodes in glucose/oxygen fuel cells: FAD-dependent glucose dehydrogenase as a replacement*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**: p. 19371-19379.
341. Milton, R.D., et al., *Glucose oxidase progressively lowers bilirubin oxidase bioelectrocatalytic cathode performance in single-compartment glucose/oxygen biological fuel cells*. Electrochimica Acta, 2014. **140**: p. 59-64.

342. Milton, R.D., et al., *Bilirubin oxidase bioelectrocatalytic cathodes: the impact of hydrogen peroxide*. Chemical Communications, 2014. **50**: p. 94-96.
343. Westermarck, U. and K.E. Eriksson, *Cellobiose:quinone oxidoreductase, a new Wood-degrading enzyme from White-rot fungi*. Acta Chemica Scandinavica, 1974. **B28**: p. 209-214.
344. Henriksson, G., G. Johansson, and G. Pettersson, *A critical review of cellobiose dehydrogenases*. Journal of Biotechnology, 2000. **78**(2): p. 93-113.
345. Tasca, F., et al., *Direct Electron Transfer at Cellobiose Dehydrogenase Modified Anodes for Biofuel Cells*. The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(26): p. 9956-9961.
346. Tasca, F., et al., *Cellobiose Dehydrogenase Aryl Diazonium Modified Single Walled Carbon Nanotubes: Enhanced Direct Electron Transfer through a Positively Charged Surface*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(8): p. 3042-3049.
347. Tasca, F., et al., *Highly Efficient and Versatile Anodes for Biofuel Cells Based on Cellobiose Dehydrogenase from Myriococcum thermophilum*. The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(35): p. 13668-13673.
348. Ludwig, R., et al., *Cellobiose Dehydrogenase: A Versatile Catalyst for Electrochemical Applications*. ChemPhysChem, 2010. **11**(13): p. 2674-2697.
349. Stoica, L., et al., *Membrane-Less Biofuel Cell Based on Cellobiose Dehydrogenase (Anode)/Laccase (Cathode) Wired via Specific Os-Redox Polymers*. Fuel Cells, 2009. **9**: p. 53-62.
350. Tasca, F., et al., *Increasing the coulombic efficiency of glucose biofuel cell anodes by combination of redox enzymes*. Biosensors and Bioelectronics, 2010. **25**(7): p. 1710-1716.
351. Sygmund, C., et al., *Characterization of pyranose dehydrogenase from Agaricus meleagris and its application in the C-2 specific conversion of D-galactose*. Journal of Biotechnology, 2007. **133**: p. 334-342.
352. Sedmara, P., et al., *A new enzyme catalysis: 3,4-dioxidation of some aryl β -D-glycopyranosides by fungal pyranose dehydrogenase*. Tetrahedron Letters, 2004: p. 8677-8680.
353. Volc, J., et al., *Double oxidation of D-xylose to D-glycero-pentos-2, 3-diulose (2, 3-diketo-D-xylose) by pyranose dehydrogenase from the mushroom Agaricus bisporus*. Carbohydrate Research, 2000. **329**: p. 219-225.
354. Zafar, M.N., et al., *Wiring of pyranose dehydrogenase with osmium polymers of different redox potentials*. Bioelectrochemistry, 2010. **80**(1): p. 38-42.
355. Tasca, F., et al., *Amperometric biosensors for detection of sugars based on the electrical wiring of different pyranose oxidases and pyranose dehydrogenases with osmium redox polymer on graphite electrodes*. Electroanalysis, 2007. **19**: p. 294-302.
356. Daniel, G., J. Volc, and E. Kubatova, *Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by Phanerochaete chrysosporium, Trametes versicolor, and Oudemansiella mucida*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**: p. 2524-2535.
357. Janssen, F.W. and H.W. Ruelius, *Pyranose oxidase from Polyporus obtusus*. Methods in Enzymology, 1975. **41**: p. 170-173.
358. Leitner, C., J. Volc, and D. Haltrich, *Purification and Characterization of Pyranose Oxidase from the White Rot Fungus Trametes multicolor*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(8): p. 3636-3644.
359. Costa-Ferreira, M. and A. Couto, *High ionic strength tolerance of pyranose oxidase from Trametes versicolor and its purification*. Process Biochemistry, 2003. **38**: p. 1019-1023.
360. Leitner, C., J. Volc, and D. Haltrich, *Purification and characterization of pyranose oxidase from the white rot fungus Trametes multicolor*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**: p. 3636-3644.
361. Timur, S., Y. Yigzaw, and L. Gorton, *Electrical wiring of pyranose oxidase with osmium redox polymers*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006. **113**(2): p. 684-691.
362. De Lacey, A.L., et al., *Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: Spectroelectrochemical studies*. Chemical Reviews, 2007. **107**(10): p. 4304-4330.
363. De Lacey, A.L., V.M. Fernandez, and M. Rousset, *Native and mutant nickel-iron hydrogenases: Unravelling structure and function*. Coordination Chemistry Reviews, 2005. **249**(15-16): p. 1596-1608.

364. Lojou, E., *Hydrogenases as catalysts for fuel cells: Strategies for efficient immobilization at electrode interfaces*. *Electrochimica Acta*, 2011. **56**(28): p. 10385-10397.
365. Ogata, H., W. Lubitz, and Y. Higuchi, *[NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism*. *Dalton Transactions*, 2009. **37**: p. 7577-7587.
366. Liebgott, P.-P., et al., *Original design of an oxygen-tolerant [NiFe] hydrogenase : Major effect of a valine-to-cysteine mutation near the active site*. *Journal of the American Chemical Society*, 2011. **133**: p. 986-997.
367. Liebgott, P.-P., et al., *Towards engineering O₂-tolerance in NiFe hydrogenases*. *Energy & Environmental Science*, 2011. **4**: p. 33-41.
368. Fourmond, V., et al., *The mechanism of protection of catalysts supported in redox hydrogel films*. *Journal of the American Chemical Society*, 2015. **137**: p. 5494-5505.
369. Fritsch, J., et al., *The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre*. *Nature*, 2011. **479**(7372): p. 249-252.
370. Lukey, M.J., et al., *Oxygen-Tolerant [NiFe]-Hydrogenases: The Individual and Collective Importance of Supernumerary Cysteines at the Proximal Fe-S Cluster*. *Journal of the American Chemical Society*, 2011. **133**(42): p. 16881-16892.
371. Shomura, Y. and Y. Higuchi, *Structural aspects of [NiFe]-hydrogenases*. *Reviews in Inorganic Chemistry*, 2013. **33**(4): p. 173-192.
372. Marcus, R.A. and N. Sutin, *Electron transfers in chemistry and biology*. *Biochim Biophys Acta*, 1985. **81**(1): p. 265-322.
373. Salaj-Kosla, U., et al., *Mediated electron transfer of cellobiose dehydrogenase and glucose oxidase at osmium polymer-modified nanoporous gold electrodes*. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2013. **405**: p. 3823-3830.
374. Léger, C. and P. Bertrand, *Direct Electrochemistry of Redox Enzymes as a Tool for Mechanistic Studies*. *Chemical Reviews*, 2008. **108**: p. 2379-2438.
375. Davis, J., D.H. Vaughan, and M.F. Cardosi, *Elements of biosensor construction* *Enzyme and Microbial Technology*, 1995. **17**(12): p. 1030-1035.
376. Chaubey, A. and B.D. Malhotra, *Mediated biosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002. **17**(6-7): p. 441-456.
377. Kano, K. and S. Ikeda, *Fundamentals and Practices of Mediated Bioelectrocatalysis*. *Analytical Sciences*, 2000. **16**(10): p. 1013-1021.
378. Cao, L., *Immobilized enzymes: science or art?* *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005. **9**(2): p. 217-226.
379. Klibanov, A.M., *Stabilization of enzymes against thermal inactivation*. *Advanced Applied Microbiology*, 1983. **29**: p. 1-28.
380. Cooney, M.J., et al., *Enzyme catalysed biofuel cells*. *Energy & Environmental Science*, 2008. **1**: p. 320-337.
381. Moehlenbrock, M.J. and S.D. Minter, *Extended life time biofuel cells*. *Chemical Society Reviews*, 2008. **37**: p. 1188-1196.
382. Spohn, U., et al., *A bienzymatique modified carbon paste electrode for the amperometric detection of L-lactate at low potentials*. *Analytical Chimica Acta*, 1996. **319**: p. 79-90.
383. Palleschi, G. and A.P.F. Turner, *Amperometric tetrathiafulvalene-mediated lactate electrode using lactate oxidase absorbed on carbon foil*. *Analytical Chimica Acta*, 1990. **234**: p. 459-463.
384. Boutelle, M.G., et al., *An amperometric enzyme electrode for monitoring brain glucose in the freely moving rat*. *Nanoscience Letters*, 1986. **72**: p. 283-288.
385. Léger, C., et al., *Effect of a Dispersion of Interfacial Electron Transfer Rates on Steady State Catalytic Electron Transport in [NiFe]-hydrogenase and Other Enzymes*. *Journal of Physical Chemistry*, 2002. **106**: p. 13058-13063.
386. Willner, I., et al., *Electrical Wiring of Glucose Oxidase by Reconstitution of FAD-Modified Monolayers Assembled onto Au-Electrodes*. *Journal of the American Chemical Society*, 1996. **118**(42): p. 10321-10322.
387. Katz, E., et al., *Glucose oxidase electrodes via reconstitution of the apo-enzyme: tailoring of novel glucose biosensors*. *Analytica Chimica Acta*, 1999. **385**(1-3): p. 45-58.
388. Zayats, M., E. Katz, and I. Willner, *Electrical contacting of flavoenzymes and NAD(P)⁺-dependent enzymes by reconstitution and affinity interactions on phenylboronic acid*

- monolayers associated with Au-electrodes*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(49): p. 14724-14735.
389. Zayats, M., et al., *Reconstitution of apo-glucose dehydrogenase on pyrroloquinoline quinone-functionalized au nanoparticles yields an electrically contacted biocatalyst*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(35): p. 12400-12406.
390. Zayats, M., B. Willner, and I. Willner, *Design of Amperometric Biosensors and Biofuel Cells by the Reconstitution of Electrically Contacted Enzyme Electrodes*. Electroanalysis, 2008. **20**(6): p. 583-601.
391. Posthuma-Trumpie, G.A., et al., *Reconstitution of apoglucose oxidase with FAD conjugates for biosensing of progesterone*. Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 2007. **1774**(7): p. 803-812.
392. Willner, I., R. Baron, and B. Willner, *Integrated nanoparticle-biomolecule systems for biosensing and bioelectronics*. Biosensors & Bioelectronics, 2007. **22**(9-10): p. 1841-1852.
393. Willner, I., B. Willner, and E. Katz, *Biomolecule-nanoparticle hybrid systems for bioelectronic applications*. Bioelectrochemistry, 2007. **70**(1): p. 2-11.
394. Mazur, M., et al., *Encapsulation of laccase in a conducting polymer matrix: A simple route towards polypyrrole microcontainers*. Synthetic Metals, 2009. **159**: p. 1731-1738.
395. Zhang, L., et al., *Biomimetic polymer-inorganic hybrid microcapsules for yeast alcohol dehydrogenase encapsulation*. Reactive and Functional Polymers, 2008. **68**: p. 1507-1515.
396. Poulsen, A.K., A.M. Scharff-Poulsen, and L.F. Olsen, *Horseradish peroxidase embedded in polyacrylamide nanoparticles enables optical detection of reactive oxygen species*. Analytical Biochemistry, 2007. **366**: p. 29-36.
397. Gill, I. and A. Ballesteros, *Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals*. Trends in Biotechnology, 2000. **18**: p. 282-296.
398. Rodriguez, M.C. and G.A. Rivas, *Highly Selective First Generation Glucose Biosensor Based on Carbon Paste Containing Copper and Glucose Oxidase*. Electroanalysis, 2001. **13**: p. 1179-1184.
399. Baffert, C., et al., *Covalent attachment of FeFe hydrogenases to carbon electrodes for direct electron transfer*. Analytical Chemistry, 2012. **84**: p. 7999-8005.
400. Pellissier, M., et al., *Improved stability of redox enzyme layers on glassy carbon electrodes via covalent grafting*. Electrochemistry Communications, 2008. **10**: p. 835-838.
401. Li, Z.F., et al., *Covalent immobilization of glucose oxidase on the surface of polyaniline films graft copolymerized with acrylic acid*. Biomaterials, 1998. **19**: p. 45-53.
402. Pita, M., et al., *High Redox Potential Cathode Based on Laccase Covalently Attached to Gold Electrode*. Journal of Physical Chemistry C, 2011. **115**(27): p. 13420-13428.
403. Albareda-Sirvent, M., A. Merkoçi, and S. Alegret, *Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2000. **69**: p. 153-163.
404. Li, Y.-G., et al., *Immobilization of enzyme on screen-printed electrode by exposure to glutaraldehyde vapour for the construction of amperometric acetylcholinesterase electrodes*. Analytica Chimica Acta, 1999. **382**: p. 277-282.
405. Chakraborty, D., et al., *Characterization of Enzyme-Redox Hydrogel Thin-Film Electrodes for Improved Utilization*. Journal of The Electrochemical Society, 2014. **161**(13): p. H3076-H3082.
406. Mao, F., N. Mano, and A. Heller, *Long tethers binding redox centers to polymer backbones enhance electron transport in enzyme "Wiring" hydrogels*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(16): p. 4951-4957.
407. Courjean, O., et al., *Effect of Degree of Glycosylation on Charge of Glucose Oxidase and Redox Hydrogel Catalytic Efficiency*. ChemPhysChem, 2010. **11**: p. 2795-2797.
408. Sirkar, K., A. Revzin, and M.V. Pishko, *Glucose and Lactate Biosensors Based on Redox Polymer/Oxidoreductase Nanocomposite Thin Films*. Analytical Chemistry, 2000. **72**: p. 2930-2936.
409. Gallaway, J. and S.C. Barton, *Kinetics of Redox Polymer-Mediated Enzyme Electrodes*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**: p. 8527-8536.

410. Gallaway, J. and S.C. Barton, *Effect of redox polymer synthesis on the performance of a mediated laccase oxygen cathode*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2009. **626**: p. 149-155.
411. Ó Conghaile, P., et al., *Mediated glucose enzyme electrodes by crosslinking films of osmium redox complexes and glucose oxidase*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(11): p. 3807-3812.
412. Mano, N., et al., *An Oxygen Cathode Operating in a Physiological Solution*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(22): p. 6480-6486.
413. Garcia, R. and D. Mecerreyes, *Polymers with redox properties: materials for batteries, biosensors and more*. Polymer Chemistry, 2013. **4**: p. 2206-2214.
414. Lever, A.B.P., *Electrochemical Parametrization of Metal Complex Redox Potentials, Using the Ruthenium(III)/Ruthenium(II) Couple To Generate a Ligand Electrochemical Series* Inorganic Chemistry, 1990. **29**(6): p. 1271-1285.
415. K., A. and U. Becker, *Computational Redox Potential Predictions: Applications to Inorganic and Organic Aqueous Complexes Adsorbed to Mineral Surfaces*. Minerals, 2014. **4**: p. 345-387.
416. Ohara, T.J., *Osmium Bipyridyl Redox Polymers Used in Enzyme Electrodes*. Platinum Metals Review, 1995. **39**(2): p. 54-62.
417. Kelly, D.M. and J.G. Vos, *Chapter 8: Osmium and Ruthenium Poly(pyridyl) Redox Polymers as Electrode Coatings*. Electroactive Polymer Electrochemistry. Part 2: Methods and Applications. Edited by M. Lyons, 1996: p. 173-232.
418. Zhu, S.S. and T.M. Swager, *Design of conducting redox polymers. A polythiophene-Ru(bipy)3n+ hybrid material*. Advanced Materials, 1996. **8**: p. 497-500.
419. Cadet, M., et al., *Design of a Highly Efficient O₂ Cathode Based on Bilirubin Oxidase from Magnaporthe oryzae*. ChemPhysChem, 2013. **14**(10): p. 2097-2100.
420. Migneault, I., et al., *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*. BioTechniques, 2004. **37**(5): p. 790-802.
421. MacAodha, D., et al., *Crosslinked redox polymer enzyme electrodes containing carbon nanotubes for high and stable glucose oxidation current* Physical Chemistry Chemical Physics, 2012. **14**: p. 14667-14672.
422. Nardecchia, S., et al., *Osteoconductive Performance of Carbon Nanotube Scaffolds Homogeneously Mineralized by Flow-Through Electrodeposition*. Advanced Functional Materials, 2012. **22**(21): p. 4411-4420.
423. MacAodha, D., et al., *Comparison of Glucose Oxidation by Crosslinked Redox Polymer Enzyme Electrodes Containing Carbon Nanotubes and a Range of Glucose Oxidising Enzymes*. Electroanalysis, 2013. **25**(1): p. 94-100.
424. Blauch, D.N. and J.-M. Saveant, *Dynamics of electron hopping in assemblies of redox centers. Percolation and diffusion*. J. Am. Chem. Soc. , 1992. **114**(3323-3332).
425. Blauch, D.N. and J.-M. Saveant, *Effects of long-range electron transfer on charge transport in static assemblies of redox centers*. Journal of Physical Chemistry, 1993. **97**: p. 6444-6448.
426. Ó Conghaile, P., et al., *Coupling osmium complexes to epoxy-functionalised polymers to provide mediated enzyme electrodes for glucose oxidation*. Biosensors & Bioelectronics, 2013. **43**: p. 30-37.

CHAPITRE II :
LA CATHODE ENZYMATIQUE

Sommaire

1. Introduction	109
2. La BOD de <i>Magnaporthe oryzae</i>	110
2.1. Obtention de l'enzyme.....	110
2.1.1. Identification	110
2.1.2. Production et purification.....	110
2.1.3. Caractérisation en solution	110
2.2. Tests préliminaires en électrochimie	112
2.2.1. Evolution de la densité de courant avec la constitution de l'hydrogel.....	114
2.2.2. Effet des conditions de séchage de l'hydrogel sur la densité de courant	115
2.2.3. Influence de la température de mesure sur la densité de courant.....	117
2.2.4. Influence du pH de mesure sur la densité de courant.....	118
2.2.5. Evolution de la densité de courant en fonction du taux de recouvrement d'hydrogel	119
2.2.6. Effet du tampon de mesure.....	121
2.2.6.1. Effet sur la densité de courant de réduction	121
2.2.6.2. Effet sur la stabilité.....	123
2.2.7. Comparaison avec les BODs de <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Trachyderma tsunodae</i> et <i>Myrothecium verrucaria</i>	125
2.3. Travail sur l'activité enzymatique : les « nanofleurs » enzymatiques.....	126
2.3.1. Principe.....	126
2.3.2. Application à la BOD de <i>Bacillus pumilus</i>	128
2.3.2.1. Influence de l'agitation pendant la formation des nanofleurs	128
2.3.2.1.1. Protocole	128
2.3.2.1.2. Microscopie électronique à balayage.....	129
2.3.2.1.3. Calcul du taux d'encapsulation.....	130
2.3.2.2. Variation du degré d'agitation et de la température d'incubation	131

2.3.2.2.2.	Microscopie électronique à balayage.....	132
2.3.2.2.3.	Calcul du taux d'encapsulation.....	135
2.3.2.3.	Influence du tampon d'incubation.....	136
2.3.2.3.1.	Microscopie électronique à balayage.....	136
2.3.2.3.2.	Mesure de l'activité en solution.....	137
2.3.3.	Conclusion sur la formation de nanofleurs à partir de BOD.....	138
2.4.	Conclusion intermédiaire.....	138
3.	Conception de nouveaux polymères rédox cathodiques.....	140
3.1.	Caractéristiques du polymère rédox cathodique d'origine.....	140
3.2.	Optimisation des conditions de synthèse du polymère rédox.....	141
3.2.1.	Protocole.....	141
3.2.2.	Caractérisation des polymères rédox.....	141
3.2.2.1.	Caractérisation du copolymère PAA-PVI par spectroscopie infrarouge.....	141
3.2.2.2.	Caractérisation du complexe d'osmium par spectrométrie de masse.....	142
3.2.2.3.	Suivi du couplage par électrochimie.....	143
3.2.2.4.	Electrochimie des polymères rédox avec une concentration en osmium variable.....	144
3.2.3.	Performances en électrochimie avec la BOD de <i>Magnaporthe oryzae</i>	144
3.2.4.	Calcul du coefficient de diffusion apparent des électrons.....	145
3.3.	Variation de la structure du squelette copolymérique du polymère rédox.....	147
3.3.1.	Protocole.....	147
3.3.2.	Caractérisation des copolymères.....	147
3.3.2.1.	Analyse de la structure des copolymères par spectroscopie infrarouge.....	147
3.3.2.2.	Détermination de la taille des copolymères par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion multi-angle de la lumière.....	148
3.3.2.3.	Electrochimie des polymères rédox ayant un squelette variable.....	150
3.3.4.	Mesure de la concentration en complexes d'osmium.....	154
3.3.5.	Performances en électrochimie.....	156

3.3.5.1.	Avec la BOD de <i>Magnaporthe oryzae</i>	156
3.3.5.2.	Avec la BOD de <i>Bacillus pumilus</i>	157
3.3.5.2.1.	Optimisation des conditions de séchage de la BOD de <i>Bacillus pumilus</i>	157
3.3.5.2.2.	Test des polymères rédox avec la BOD de <i>Bacillus pumilus</i> en fonction des conditions de séchage et du tampon de mesure.....	158
3.3.5.3.	Comparaison des hydrogels à base de BOD de <i>Magnaporthe oryzae</i> et de <i>Bacillus pumilus</i> en fonction du polymère rédox et du tampon de mesure.....	159
3.3.6.	Calcul du coefficient de diffusion apparent des électrons.....	161
3.4.	Conclusion intermédiaire.....	163
4.	La fibre d'or poreuse comme électrode.....	165
4.1.	Synthèse des fibres d'or poreuses.....	165
4.1.1.	Principe.....	165
4.1.2.	Préparation de la matrice de silice : technique Langmuir Blodgett	165
4.1.3.	Electrodéposition d'or	166
4.1.4.	Caractérisation de la structure des électrodes d'or poreuses.....	167
4.2.	Modification de la fibre d'or et optimisation dans le tampon	169
4.2.1.	Tests préliminaires	169
4.2.2.	Effet du traitement plasma	170
4.2.3.	Optimisation du temps d'imbibition de solution enzymatique dans les pores.	170
4.2.4.	Augmentation de la proportion d'agent réticulant dans l'hydrogel	171
4.2.5.	Fonctionnalisation des fibres d'or poreuses avec une SAM de cystéamine ...	173
4.2.6.	Effet de l'état d'oxydation/réduction de l'or sur la fixation de l'hydrogel	174
4.2.7.	Co-électrodéposition de l'hydrogel sur la fibre d'or poreuse	175
4.2.8.	Protection de la cathode par l'utilisation de sacs de dialyse	176
4.3.	Test de l'efficacité de la biocathode dans du sang humain	177
4.4.	Biocompatibilité de la fibre d'or poreuse modifiée <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	180
4.4.1.	La stérilisation de la fibre d'or modifiée.....	180
4.4.2.	Etude de la cytotoxicité <i>in vitro</i>	181

4.4.2.1.	Principe.....	181
4.4.2.2.	Résultats.....	183
4.4.3.	Etude de la réponse inflammatoire <i>in vitro</i>	185
4.4.3.1.	Activation du complément.....	185
4.4.3.1.1.	Principe	185
4.4.3.1.2.	Résultats.....	186
4.4.3.2.	Activation plaquettaire	187
4.4.3.2.1.	Principe	187
4.4.3.2.2.	Résultats.....	188
4.4.3.3.	La réaction inflammatoire à un corps étranger	189
4.4.3.3.1.	Principe	189
4.4.3.3.2.	Résultats.....	190
4.4.4.	Etude <i>in vivo</i> : implantation de la fibre modifiée dans des souris.....	191
4.4.4.1.	Protocole d'implantation	191
4.4.4.2.	Application du protocole d'implantation à notre cathode	192
4.4.4.3.	Sacrifice des souris	193
4.4.4.4.	Mesures électrochimiques après implantation.....	194
4.4.4.4.1.	Surface active et structure de la fibre d'or poreuse.....	194
4.4.4.4.2.	Activité catalytique	194
4.4.4.4.3.	Coupes histologiques de la zone d'implantation	195
4.5.	Conclusion intermédiaire.....	196
5.	Conclusion.....	197
6.	Références bibliographiques	199

1. Introduction

La cathode est au centre de nombreuses recherches dans le domaine des biopiles enzymatiques car elle est jusqu'à présent limitante dans les systèmes développés. Pour les cathodes à oxygène, les enzymes utilisées sont généralement les laccases ou les bilirubine oxydases (BODs). Ces dernières remplacent peu à peu les premières en raison de leur bonne activité catalytique en conditions pseudo-physiologiques (à pH neutre et en présence de chlore) ce qui est préférable pour un fonctionnement futur *in vivo* [1].

Les BODs les plus utilisées actuellement sont celles de *Myrothecium verrucaria* et de *Trachyderma tsunodae*, cette dernière n'étant récemment plus commercialisée. Le séquençage de très nombreuses enzymes a permis d'identifier il y a peu 2 nouvelles BODs issues de *Magnaporthe oryzae* et *Bacillus pumilus*. Produites au sein de notre laboratoire, ces enzymes ont montré de très intéressantes caractéristiques en solution en termes d'activité et de stabilité, très prometteuses par rapport aux autres BODs connues [2, 3].

Ainsi en électrochimie, après optimisation, la BOD de *B. pumilus* (BOD *Bp*) délivre non seulement un meilleur courant de réduction de l'oxygène que la BOD de *T. tsunodae* (+ 90%) mais est également plus résistante au chlore [4]. Concernant la BOD de *M. oryzae* (BOD *Mo*), aucune étude électrochimique n'a été réalisée jusqu'à présent.

Nous proposons donc dans ce chapitre une optimisation complète de la cathode en utilisant la BOD *Mo* pour la réduction de l'oxygène.

Tout d'abord nous nous intéresserons aux conditions optimales d'utilisation de la BOD *Mo* en électrochimie afin d'augmenter son activité que ce soit en faisant varier les conditions de mesure environnementales (pH, température, conductivité, ...) ou en concevant des nanostructures appelées nanofleurs à partir de cette enzyme.

Ensuite nous synthétiserons différents médiateurs rédox (polymères d'osmium) afin d'étudier l'influence de leur structure sur le transfert électronique au sein de l'hydrogel. Nous ferons varier la concentration en complexes d'osmium ainsi que la composition du copolymère sur lequel sont greffés ces complexes.

Enfin les électrodes en carbone vitreux utilisées jusqu'à présent laisseront place à des fibres d'or macroporeuses dont la géométrie et la structure sont plus adaptées à l'implantation. Après plusieurs optimisations de la modification de ces fibres avec l'hydrogel à base de BOD *Mo*, nous effectuerons les tests biologiques nécessaires pour caractériser la biocompatibilité de notre système.

2. La BOD de *Magnaporthe oryzae*

Bien que le travail rapporté dans ce chapitre soit centré sur la BOD de *Magnaporthe oryzae*, certaines expérimentations ont également été réalisées avec la BOD de *Bacillus pumilus* [3]. Cependant nous ne reviendrons pas en détail sur sa production au sein de notre laboratoire, ni sur l'optimisation de son utilisation en électrochimie [5-8].

2.1. Obtention de l'enzyme

2.1.1. Identification

A l'origine, la BOD de *Magnaporthe oryzae* est issue du champignon responsable de la pyriculariose du riz [9]. La BOD de *M. oryzae* a été identifiée par homologie de séquence à hauteur de 58% avec la séquence de la BOD déjà connue de *Myrothecium verrucaria*. L'oxydation de la bilirubine en biliverdine a permis de la classer définitivement dans la catégorie des bilirubine oxydases et non des laccases [2].

2.1.2. Production et purification

La BOD de *M. oryzae* est produite en levure *Pichia pastoris* sous forme d'une protéine monomérique de 63,7 kDa (571 acides aminés), glycosylée et avec un point isoélectrique de 5,78 (= pH auquel la charge globale de l'enzyme est nulle). Après production, l'enzyme est purifiée par chromatographie d'interactions hydrophobes afin d'éliminer tous les contaminants comme décrit par Durand et al en 2012 [2].

2.1.3. Caractérisation en solution

A l'issue de la purification il est nécessaire de caractériser l'enzyme [2] : son activité pour plusieurs substrats est ainsi étudiée en solution par spectrophotométrie UV-visible (tableau II.2.1).

Sa stabilité en température, en pH, ainsi qu'en présence d'urée et de chlore (inhibiteurs connus des enzymes multi-cuivres) est également étudiée :

- bien que son activité soit maximale à 60°C, elle est beaucoup plus stable à 37°C puisqu'elle ne perd que 30% de son activité initiale après 400 minutes contre 100% à 60°C ;

- concernant le pH, son activité et sa stabilité sont optimales pour des pH compris entre 4 et 7 (-15% d'activité après 8 jours), moins bonnes à pH 8 et 9 (-20%) et mauvaises à pH 3 (-80%) ;
- l'influence de l'urée sur la BOD *Mo* est substrat-dépendante : en présence d'ABTS l'activité de l'enzyme décroît avec l'augmentation de la concentration en urée alors qu'avec la bilirubine conjuguée elle augmente d'abord pour atteindre un maximum entre 0,5 et 1,5 mM d'urée avant de diminuer lentement ;
- la stabilité de l'enzyme en présence de chlore est également substrat-dépendante : après ajouts successifs de NaCl jusqu'à 150 mM, la BOD *Mo* perd 60% de son activité pour la syringaldazine (SGZ) et 90% pour la bilirubine conjuguée.

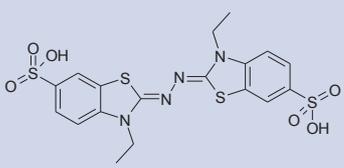
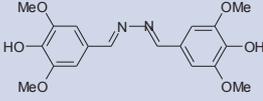
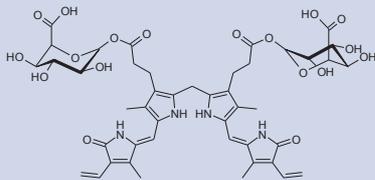
substrat	ABTS	SGZ	Bilirubine conjuguée
K_M (μM)	429	26	18
k_{cat} (s^{-1})	664	14	29
k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$)	1,5	0,5	1,6
pH	4	7	3,6
Structure			

Tableau II.2.1 : Constantes cinétiques mesurées pour la BOD *Mo* en solution pour différents substrats et à pH optimal pour chacun des substrats [2].

Depuis la publication de Durand et al [2], les conditions de production de la BOD *Mo* ont été améliorées. En effet, l'enzyme est à présent produite en bioréacteur ce qui permet un contrôle du pH du milieu à 6,8 et une induction de méthanol en continu. Le méthanol va à la fois servir de source de carbone pour la croissance des levures et d'inducteur de la production de BOD par activation du promoteur du gène codant pour cette enzyme. Nous avons décidé de mesurer les constantes cinétiques de la BOD *Mo* produite dans ces nouvelles conditions en utilisant l'ABTS comme substrat.

D'après la figure II.2.1.B, nous observons que si la constante catalytique k_{cat} est inchangée, le K_M a grandement diminué résultant en une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Le rapport k_{cat}/K_M , c'est-à-dire l'efficacité de l'enzyme, a ainsi été multiplié par 5. Nous pouvons imaginer que l'optimisation des conditions de production

de l'enzyme a permis d'améliorer son repliement entrainant une meilleure interaction avec l'ABTS.

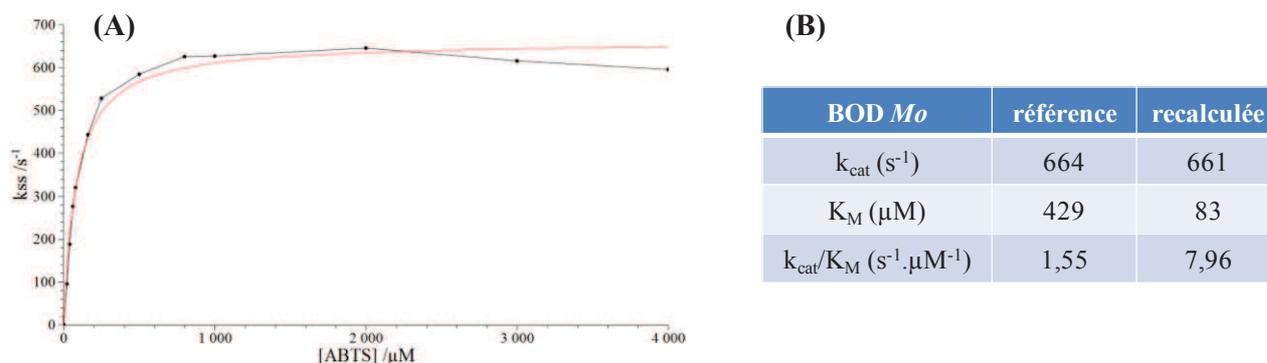


Figure II.2.1 : (A) Evolution de la constante de vitesse de l'état stationnaire (k_{ss}) en fonction de la concentration en substrat (ABTS) ; la courbe noire correspond aux points expérimentaux (cf Matériels et Méthodes 2.1.) et la courbe rouge correspond à l'ajustement automatique du logiciel Qtiplot selon l'équation de Michaelis-Menten. (B) Paramètres cinétiques de la BOD Mo mesurés avant et après optimisation de la production, toutes les conditions expérimentales sont identiques à la publication de référence [2]. Incertitudes $\pm 5\%$.

2.2. Tests préliminaires en électrochimie

S'agissant d'une nouvelle enzyme, la BOD de *Magnaporthe oryzae* doit être testée en électrochimie de manière à déterminer les conditions optimales d'utilisation à savoir : quelle proportion d'enzyme doit comprendre l'hydrogel, quelles sont les conditions de séchages idéales de l'hydrogel, quelle est l'influence du pH et de la température de mesure sur le courant,...

Pour l'ensemble des résultats présentés ci-après, le polymère rédox utilisé est le PAA-PVI-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺ à + 0,36 V vs. Ag/AgCl [10] et les hydrogels sont préparés comme indiqué dans la section Matériel et Méthodes 2.3. Différents tampons de mesure ont été utilisés : le tampon sodium phosphate (PB) dont la molarité variant entre 20 et 200 mM sera précisée, et le tampon sodium phosphate salin (PBS) = 20 mM PB + 140 mM NaCl, tous deux à pH 7,2. Les courants de réduction ont été systématiquement normalisés par la surface géométrique des électrodes de carbone vitreux (0,07065 ou 0,19625 cm²) ; les densités de courant pourront ainsi être comparées entre elles.

Sur la figure II.2.2 nous pouvons voir les voltammogrammes cycliques enregistrés pour un hydrogel à base de BOD Mo en l'absence (A) et en présence (B) de substrat.

Différentes informations peuvent être extraites de chacun de ces graphiques [11, 12] :

- sous bullage d'argon (figure II.2.2.A) le signal observé est caractéristique du polymère seul car il n'y a pas de catalyse possible. On a un pic d'oxydation (courant positif) et un pic de réduction (courant négatif) dont la moyenne des potentiels respectifs correspond au potentiel rédox des complexes d'osmium du polymère. A faible vitesse de balayage, l'aire sous le pic (d'oxydation ou de réduction) est proportionnelle à la concentration d'osmiums connectés. A grande vitesse de balayage, on s'intéressera à l'écart de potentiel entre les pics qui traduit le degré de réversibilité du système. De plus, la largeur à mi-hauteur du pic nous donne une indication sur l'interaction entre l'enzyme et le polymère rédox : meilleure est la connexion entre les 2 espèces, plus petite sera la largeur du pic à mi-hauteur et donc plus le pic tendra vers une allure gaussienne [11].
- sous bullage d'oxygène (figure II.2.2.B), on se place alors à faible vitesse de balayage et la présence du substrat permet de mesurer le courant de réduction généré par l'enzyme. La catalyse se produit à partir d'un potentiel donné qui est celui fixé par le cuivre T1 de l'enzyme (en violet). La densité de courant augmente jusqu'à atteindre un maximum (en rose). Ce plateau est généralement observé lorsqu'une convection est appliquée à l'électrode pour assurer la diffusion des substrats et que le transfert électronique est médié. En effet, dans le cadre du transfert électronique direct la multi-orientation des enzymes à la surface de l'électrode entraîne une large distribution des constantes de vitesse de transfert électronique ce qui ralentit la catalyse [13].

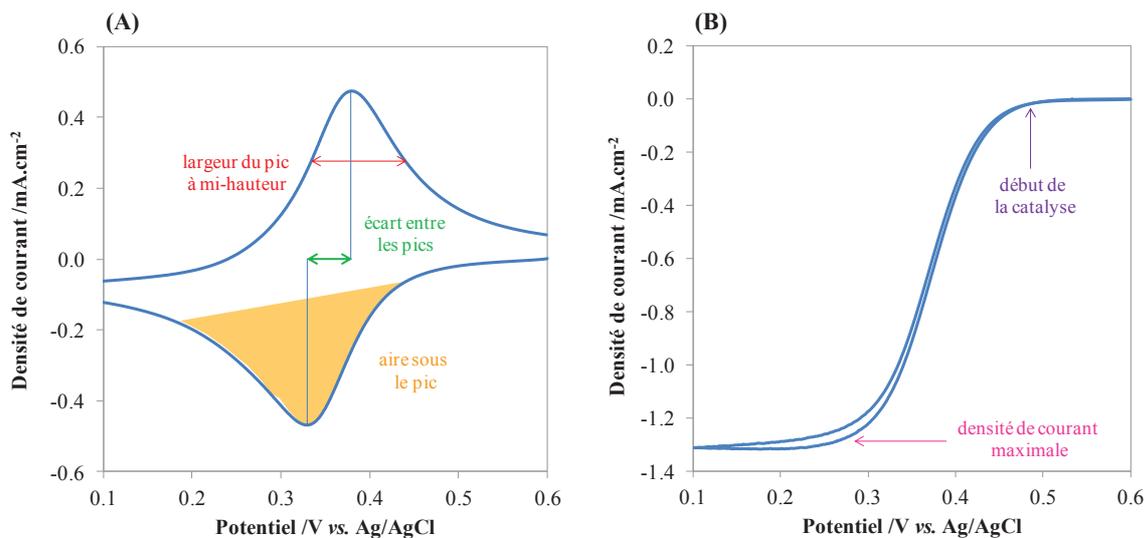


Figure II.2.2 : Densité de courant en fonction du potentiel pour un hydrogel à base de polymère rédox et de BOD Mo sur électrode de carbone vitreux, taux de recouvrement de 108 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; séchage 18h à 4°C et mesure dans du tampon PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C et 500 rpm (A) à 100 mV/s sous Ar et (B) à 5 mV/s sous O₂.

2.2.1. Evolution de la densité de courant avec la constitution de l'hydrogel

Tout d'abord nous avons étudié l'influence du pourcentage massique de BOD Mo dans l'hydrogel afin de déterminer la composition idéale de ce dernier.

La densité de courant obtenue est intimement liée au choix du ratio enzyme/polymère/agent réticulant et pour chaque enzyme il existe un compromis spécifique entre ces 3 composants comme cela a déjà été montré pour d'autres BODs [10, 14]. En effet, si l'enzyme sert de catalyseur et permet de générer les électrons, le polymère rédox sert de conducteur pour ces mêmes électrons et il faut donc trouver les proportions pour lesquelles la synergie d'action de ces composants est maximale.

Nous avons testé des pourcentages de BOD Mo compris entre 10 et 50% en masse du taux de recouvrement total (le pourcentage massique d'agent réticulant reste constant à 7,4%).

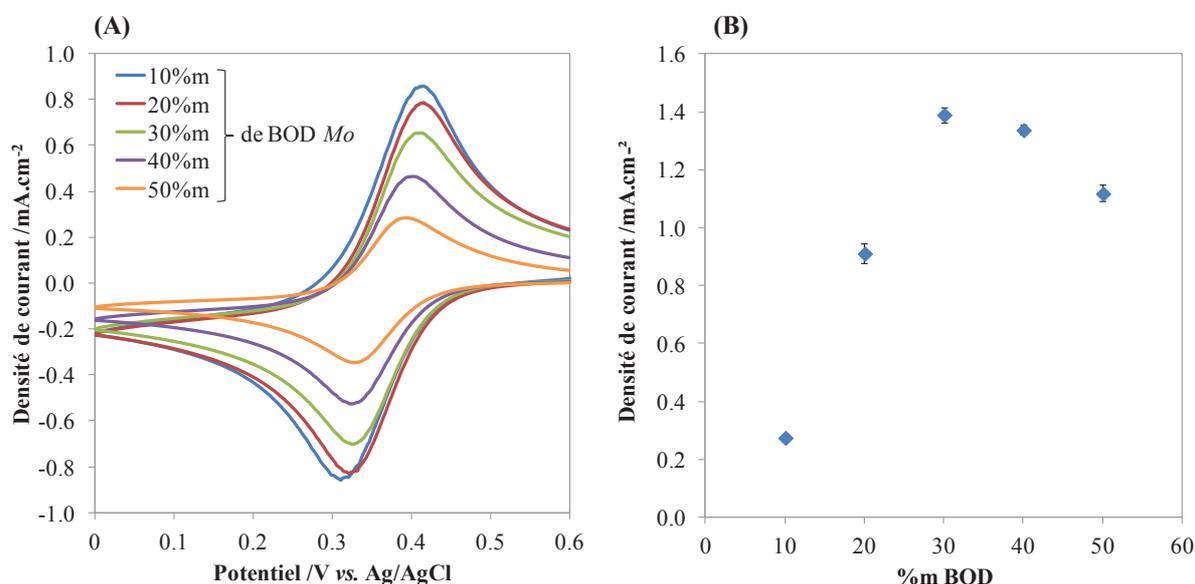


Figure II.2.3 : Densité de courant en fonction du % massique de BOD Mo dans l'hydrogel. Taux de recouvrement de $108 \mu\text{g.cm}^{-2}$; séchage 18h à 4°C ; tampon PB 100 mM pH 7,2 à $37,5^\circ\text{C}$; rotation 500 rpm ; (A) sous Ar à 100 mV/s et (B) sous O₂ à 5 mV/s, potentiel à + 0,1 V vs. Ag/AgCl.

La figure II.2.3.A nous montre le signal du polymère rédox pour des hydrogels de composition variable. Le potentiel standard du polymère rédox est bien de + 0,36 V vs. Ag/AgCl. De plus, l'évolution de l'amplitude du signal du médiateur et donc de l'aire sous le pic de réduction est logique puisque plus la quantité de BOD Mo augmente, plus la proportion de polymère rédox correspondante diminue. Notons qu'ici le balayage a été fixé à 100 mV/s car les voltammogrammes cycliques sont mieux définis mais les mêmes résultats ont été obtenus à 50 et 5 mV/s.

D'après les résultats présentés sur la figure II.2.3.B, la variation de la densité de courant en fonction du pourcentage massique d'enzyme semble suivre une évolution parabolique avec un maximum pour 30% m d'enzyme. Le résultat obtenu peut être expliqué de la façon suivante : en dessous de 30%, il n'y a pas suffisamment d'enzyme donc l'activité catalytique reste faible bien que la proportion importante de polymère assure un bon transfert des électrons. Au-delà de 30%, il y a assez d'enzyme pour procéder à la réduction de l'oxygène, cependant la faible quantité de polymère limite le transfert des électrons conduisant ainsi à une baisse de la densité de courant.

La même évolution de la densité de courant en fonction du % massique d'enzyme a été observée à pH 6, permettant ainsi de généraliser le fait que la proportion optimale d'enzyme soit de 30% massique. Toutefois, à pH 7,2 le courant de réduction est environ deux fois plus faible qu'à pH 6 pour une même expérience, ce qui sera confirmé plus loin dans l'étude de l'influence du pH sur le courant de réduction.

Pour la suite des expérimentations réalisées nous utiliserons donc un hydrogel composé de 30% m de BOD *Mo*, 62,6% m de polymère rédox et 7,4% m d'agent réticulant.

2.2.2. Effet des conditions de séchage de l'hydrogel sur la densité de courant

D'après les études qui ont déjà été menées sur la bilirubine oxydase de *Bacillus pumilus* [15], nous avons constaté que les conditions opératoires de séchage de l'hydrogel (température et durée) avaient une forte influence sur la densité de courant finale.

Une fois établie la composition idéale de l'hydrogel, les conditions de séchage ont été optimisées, le taux de recouvrement étant toujours fixé à $108\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Après modification des électrodes, celles-ci sont placées à 25°C ou à 4°C et à chacune de ces températures on laisse sécher l'hydrogel pendant 4, 9, 18 ou 24h.

Préalablement nous avons enregistré le courant sous bullage d'argon en fonction de ces différentes conditions de séchage : le signal réversible obtenu est caractéristique du polymère rédox au sein de l'hydrogel. Ainsi l'aire sous le pic de réduction est proportionnelle à la concentration en centres rédox connectés dans l'hydrogel à faible vitesse de balayage. La figure II.2.4 résume la charge en osmium pour chaque condition de séchage. Comme l'ensemble des électrodes testées contiennent le même hydrogel avec strictement la même

quantité de polymère rédox, nous pouvons donc en déduire que l'augmentation de la charge en osmium traduit une meilleure connexion au sein de l'hydrogel.

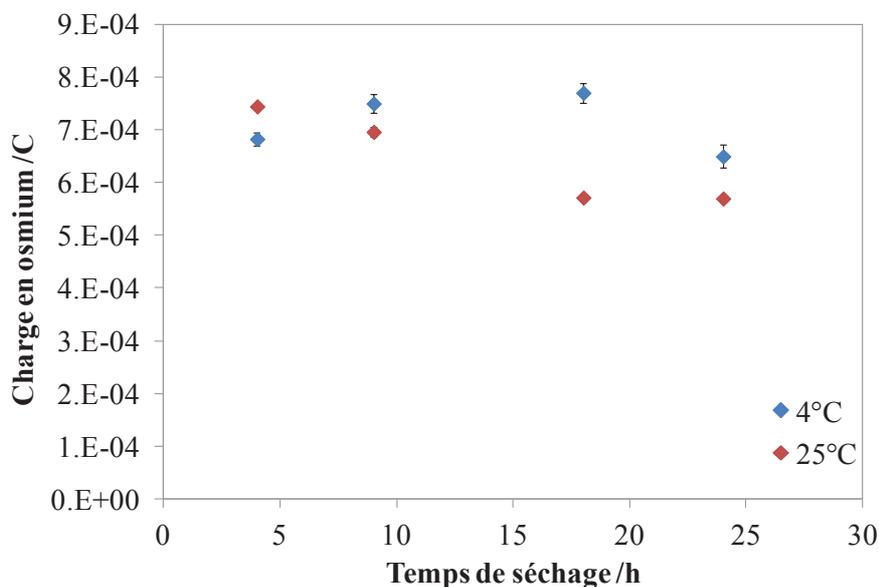


Figure II.2.4 : Charge en centres rédox en fonction du temps de séchage à 4°C (bleu) et 25°C (rouge). Taux de recouvrement de $108 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; 30%*m* BOD *Mo*, 62,6%*m* polymère rédox, 7,4%*m* PEGDGE ; mesure dans PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C et 500 rpm ; balayage à 5 mV/s sous Ar.

Après cela nous mesurons le courant de réduction sous O_2 à faible vitesse de balayage dans du tampon sodium phosphate 100 mM à pH 7,2 et 37,5°C : les résultats sont résumés ci-après sur la figure II.2.5. Nous constatons que la densité de courant est maximale pour un séchage à 4°C pendant 18h. Ceci est directement corrélé au fait que la formation de l'hydrogel soit optimale dans ces mêmes conditions car la charge en osmium y est maximale.

L'évolution de la densité de courant en fonction du temps est différente pour les deux températures et est très similaire à ce qui a été observé pour la BOD *Bp* [6]. En effet, à 25°C, la formation de l'hydrogel est plus rapide et donc optimale pour une durée très courte (4h) alors qu'à 4°C, il faut plus temps pour que l'eau s'évapore et que l'hydrogel se structure d'où un optimal à 18h de séchage. Nous pouvons supposer qu'au-delà de 4h et 18h pour des séchages respectifs à 25°C et 4°C la baisse de courant est due à la baisse de l'activité enzymatique. De plus, nous constatons que le courant maximal obtenu à 4°C est supérieur à celui obtenu à 25°C. Il est probable que la température influence l'activité enzymatique même sur une courte durée. Ainsi, une meilleure densité de courant aurait peut être été obtenue pour un séchage de seulement 2h à 25°C.

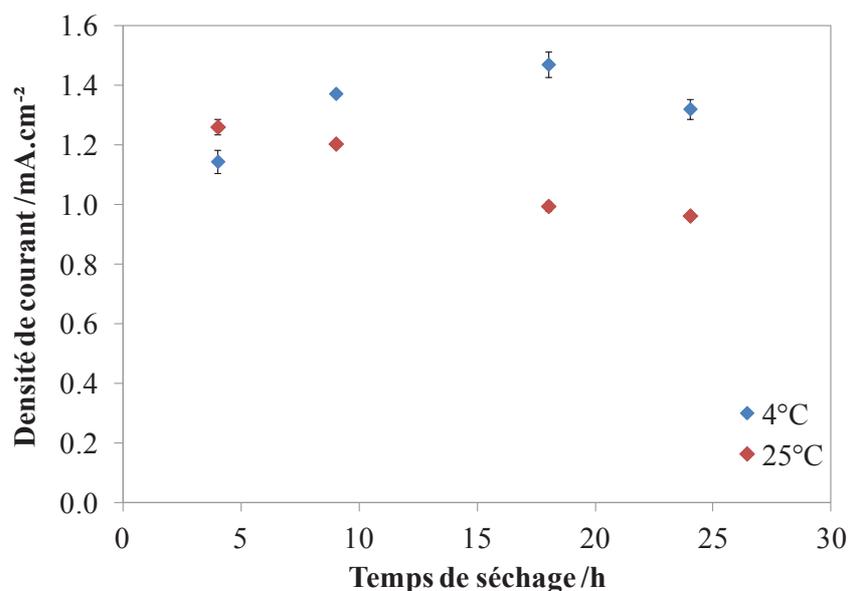


Figure II.2.5 : Densité de courant en fonction du temps de séchage à 4°C (bleu) et 25°C (rouge). Taux de recouvrement de 108 $\mu\text{g.cm}^{-2}$; 30%*m* BOD *Mo*, 62,6%*m* polymère rédox, 7,4%*m* PEGDGE ; tampon PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C ; rotation 500 rpm ; balayage à 5 mV/s sous O_2 ; potentiel à + 0,1 V vs. Ag/AgCl.

Pour la suite des travaux présentés nous appliquerons donc un séchage optimal de 18h à 4°C pour les hydrogels à base de BOD *Mo*.

2.2.3. Influence de la température de mesure sur la densité de courant

La densité de courant est aussi dépendante des conditions expérimentales de mesure : en effet, l'enzyme étant très sensible au milieu dans lequel elle se trouve, une variation de température du tampon peut modifier son comportement et donc son activité catalytique. Cela a été montré par des tests électrochimiques sur les BODs de *T. tsunodae* [14] et de *M. verrucaria* [10] ainsi que par des mesures d'activités sur la BOD de *Mo* en solution à différentes températures [2].

L'expérience consiste donc à faire varier la température du tampon de mesure (PB 100 mM pH 7,2) entre 25°C et 70°C. Les mêmes électrodes sont utilisées pour explorer toutes les températures voulues. Les densités de courant obtenues sont résumées ci-après sur la figure II.2.6.

Nous constatons une influence évidente de la température du tampon de mesure sur l'activité catalytique de l'enzyme, avec un maximum atteint à 40°C. Après la mesure à 70°C, le bain est ramené à 37°C, puis on enregistre les CVs sous argon et sous oxygène à 5 mV/s :

ils se superposent parfaitement, indiquant que l'enzyme a été dénaturée irréversiblement à haute température.

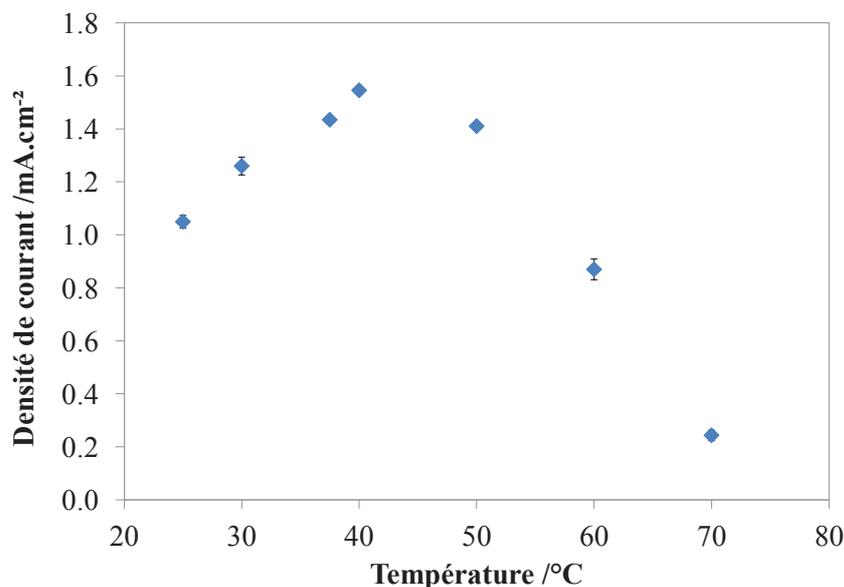


Figure II.2.6 : Evolution de la densité de courant en fonction de la température. Taux de recouvrement de 108 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; 30%*m* BOD Mo, 62,6%*m* polymère rédox, 7,4%*m* PEGDGE ; séchage 18h à 4°C ; tampon PB 100 mM pH 7,2 de 25 à 70°C ; rotation 500 rpm ; balayage à 5 mV/s sous O₂ ; potentiel à + 0,1 V vs. Ag/AgCl.

Pour nos expériences nous nous plaçons systématiquement à 37,5°C, température moyenne du corps humain, afin de se rapprocher des conditions physiologiques.

2.2.4. Influence du pH de mesure sur la densité de courant

Nous nous intéressons à présent à l'effet du pH du tampon de mesure sur la densité de courant puisqu'il influence également le courant de réduction comme cela a été montré pour les BOD de *T. tsunodae* [14] et de *M. verrucaria* [10].

Les électrodes sont préparées dans les conditions optimales déterminées précédemment. Pour les mesures on utilise un tampon de pH différent pour chacune : il s'agit de tampons sodium phosphate 100 mM de pH 5, 6, 7,2 et 8 à 37,5°C. La figure II.2.7 récapitule les densités de courant obtenues pour chaque pH : plus le pH diminue, plus la densité de courant générée est forte, donc l'activité enzymatique augmente à faible pH. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec les mesures réalisées en solution [2].

Néanmoins, ce comportement de l'enzyme au sein d'un hydrogel est surprenant. En effet le point isoélectrique de l'enzyme est de 5,78 [2] : ceci signifie que lorsque le pH du

milieu diminue jusqu'à 5,78 la charge de l'enzyme va passer de négative à neutre puis en dessous de 5,78 la BOD va se charger positivement. Or ce sont les charges négatives de l'enzyme qui vont former l'adduit électrostatique avec les charges positives du polymère rédox pour structurer l'hydrogel. Ainsi à faible pH on s'attend à ce que l'interaction enzyme/polymère soit diminuée et entraîne une baisse de courant ; c'est d'ailleurs ce qu'ont montré Mano et al avec un hydrogel à base de glucose oxydase [16]. Ce n'est pas le cas ici : il est possible que le gain d'activité de l'enzyme à faible pH supplante les difficultés de connexion avec le polymère résultant en une augmentation de la catalyse.

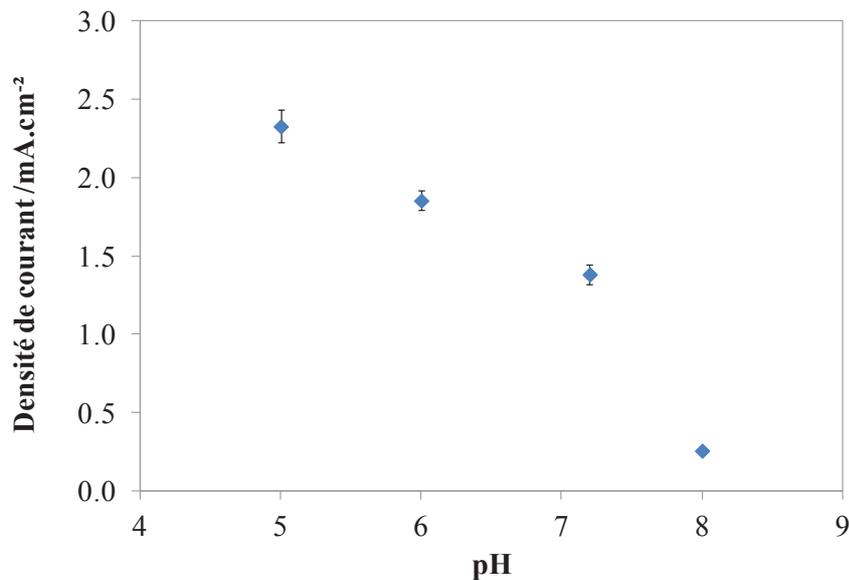


Figure II.2.7 : Evolution de la densité de courant en fonction du pH du tampon. Taux de recouvrement de $108 \mu\text{g.cm}^{-2}$; 30%*m* BOD *Mo*, 62,6%*m* polymère rédox, 7,4%*m* PEGDGE ; séchage 18h à 4°C ; tampon PB 100 mM pH 5 à 8, à 37,5°C ; rotation 500 rpm ; balayage à 5 mV/s sous O₂ ; potentiel à + 0,1 V vs. Ag/AgCl.

2.2.5. Evolution de la densité de courant en fonction du taux de recouvrement d'hydrogel

On étudie ensuite l'influence du taux de recouvrement sur la densité de courant produite par l'hydrogel. Pour cette expérience on se place dans les conditions opératoires optimales (hydrogel avec 30%*m* de BOD *Mo* et séchage 18h à 4°C) et les mesures sont réalisées dans un tampon PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C. On prépare des électrodes ayant des taux de recouvrement allant de 60 à 500 $\mu\text{g.cm}^{-2}$.

Au niveau de la charge en polymère rédox (figure II.2.8.A) nous constatons une augmentation du signal avec le taux de recouvrement. Ceci est cohérent car plus l'épaisseur

de l'hydrogel augmente, plus la quantité de polymère déposé est importante, et par conséquent plus le signal électrochimique est grand.

Au regard de la figure II.2.8.B, la densité de courant augmente avec le taux de recouvrement jusqu'à environ $200 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. En effet, en augmentant le volume du dépôt, on augmente la quantité d'enzyme et de polymère, et par conséquent le courant catalytique. Cependant à partir de $200 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, l'épaisseur de l'hydrogel entraîne des difficultés dans la diffusion du substrat et/ou limite la cinétique enzymatique, ce qui explique que la densité de courant n'augmente plus et même qu'elle diminue pour l'hydrogel de $500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

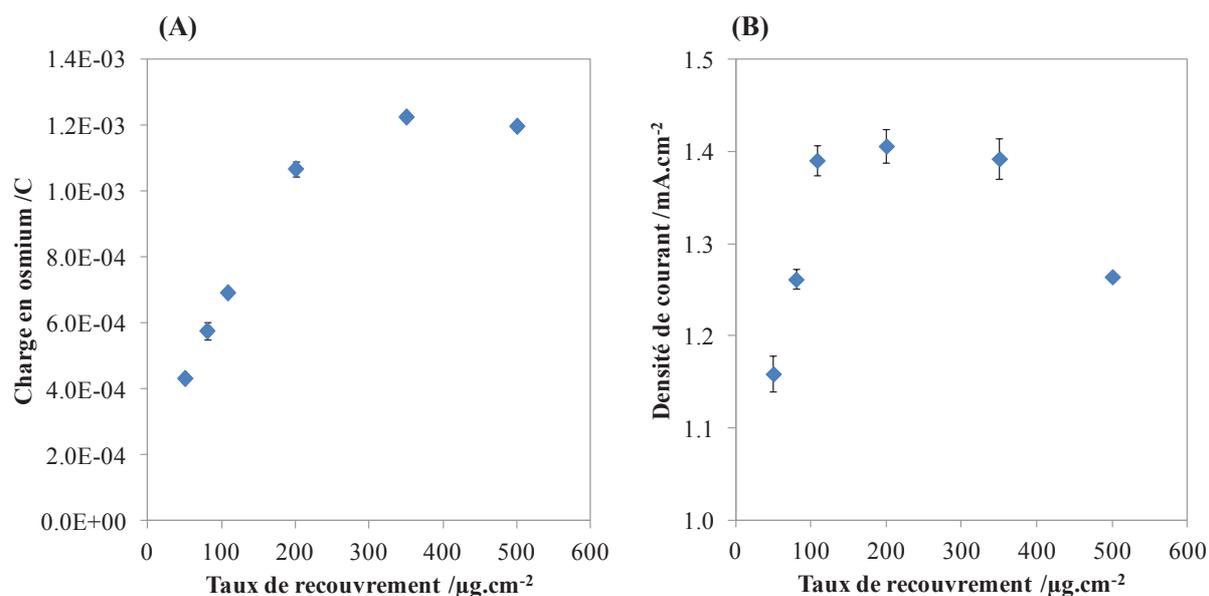


Figure II.2.8 : Evolution (A) de la charge en osmium sous Ar et (B) de la densité de courant sous O_2 à +0,1 V vs. Ag/AgCl en fonction du taux de recouvrement, 30%*m* BOD Mo, 62,6%*m* polymère rédox, 7,4%*m* PEGDGE ; séchage 18h à 4°C ; tampon PB 100 mM pH 7,2 à $37,5^\circ\text{C}$; rotation 500 rpm ; balayage à 5 mV/s.

En faisant varier la vitesse de rotation (figure II.2.9.A) pour les différents taux de recouvrement, nous constatons qu'à 500 rpm la densité de courant est déjà presque maximale. Ainsi la baisse de courant observée à $500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ n'est pas due à la limitation de la diffusion mais plutôt de la cinétique enzymatique. De plus, après être monté jusqu'à 4000 rpm de rotation, nous avons à nouveau enregistré le signal du polymère rédox à 5 mV/s sous argon. La perte en signal et donc en hydrogel fixé augmente avec le taux de recouvrement (figure II.2.9.B) : il est possible qu'une contrainte de cisaillement (« shear stress ») soit à l'origine de la baisse de densité de courant observée à fort taux de recouvrement [17].

Enfin, pour $500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, un test supplémentaire a été réalisé : nous avons émis l'hypothèse qu'en augmentant le taux de recouvrement il faudrait également augmenter la

durée de séchage. Quatre électrodes ont été préparées avec un dépôt de $500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$: deux ont séché 18h à 4°C et les deux autres ont séché 36h à 4°C . Il en est ressorti qu'après un temps de séchage doublé, nous n'avons pas constaté d'augmentation de la densité de courant, ce qui implique que les conditions de séchage optimales de 18h à 4°C sont indépendantes du taux de recouvrement. En effet, au bout de 18h la formation de l'hydrogel est sûrement incomplète mais l'activité enzymatique est maximale alors qu'après 36h, le séchage est terminé mais l'enzyme commence à perdre son activité. Dans les deux cas, le compromis entre séchage et activité enzymatique fait que l'on arrive à la même densité de courant.

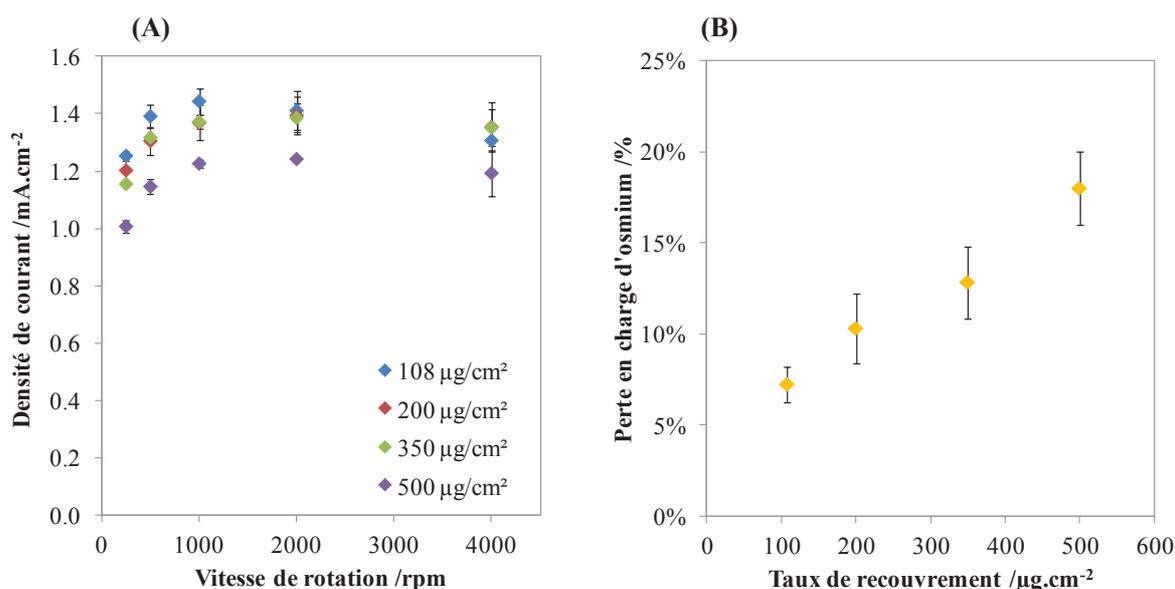


Figure II.2.9 : (A) Evolution de la densité de courant en fonction de la vitesse de rotation pour différents taux de recouvrement, 30%*m* BOD Mo, 62,6%*m* polymère rédox, 7,4%*m* PEGDGE ; séchage 18h à 4°C ; tampon PB 100 mM pH 7,2 à $37,5^\circ\text{C}$; balayage à 5 mV/s sous O_2 ; potentiel à + 0,1 V vs. Ag/AgCl. (B) Perte en charge d'osmium en fonction du taux de recouvrement après variation de la vitesse de rotation des électrodes jusqu'à 4000 rpm, mesure à 500 rpm.

2.2.6. Effet du tampon de mesure

2.2.6.1. Effet sur la densité de courant de réduction

Ici nous avons fait varier la concentration en phosphate du tampon de mesure afin d'évaluer l'influence de la force ionique sur le courant produit par la BOD Mo.

La figure II.2.10 présente les résultats pour les tampons contenant 20, 50, 100 et 200 mM de phosphate et pour du tampon PBS (20 mM PB + 140 mM NaCl). Les données numériques extraites de la figure II.2.10 sont résumées dans le tableau II.2.2.

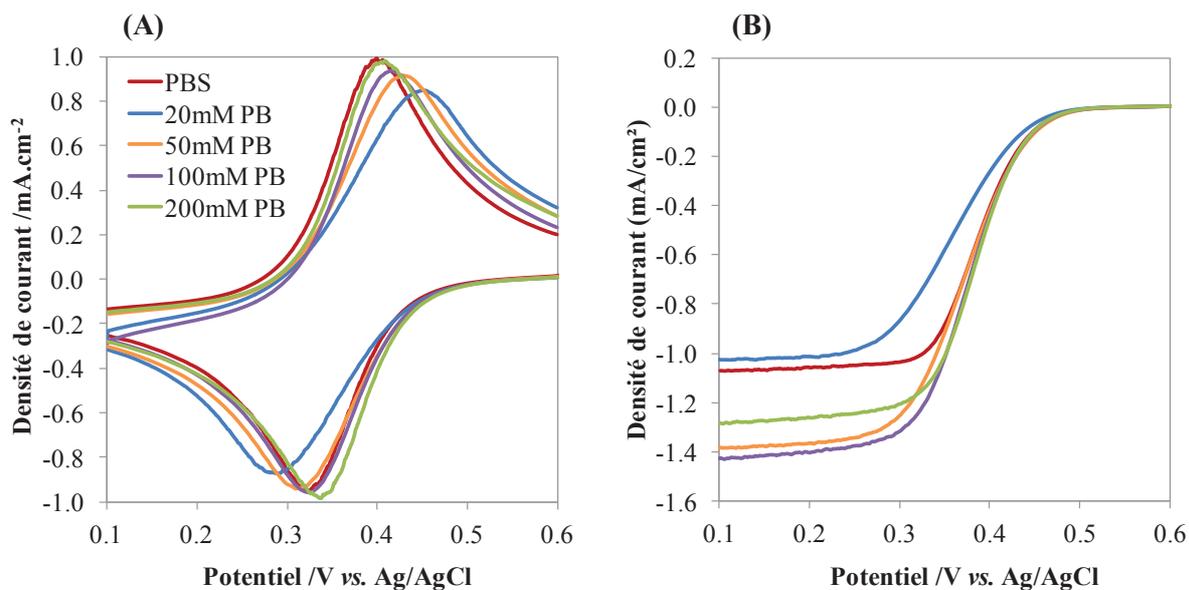


Figure II.2.10 : Densité de courant en fonction de la force ionique du tampon de mesure. Taux de recouvrement de $108 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; 30% BOD Mo, 62,6% polymère rédox, 7,4% PEGDGE ; séchage 18h à 4°C ; tampon PB 20 à 200 mM ou PBS pH 7,2 à $37,5^\circ\text{C}$; rotation 500 rpm (A) à 100 mV/s sous Ar et (B) à 5 mV/s sous O_2 .

Nous constatons que l'augmentation de la force ionique entraîne un décalage des pics d'oxydation et de réduction du polymère suggérant que le signal électrochimique tend à être de plus en plus réversible. L'écart de pic ΔE passe ainsi de 165 à 62 mV lorsque la conductivité augmente de 2,51 à $23,89 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ (tableau II.2.2) ; le potentiel standard du polymère rédox restant quant à lui constant. Concernant le PBS (courbe rouge), l'écart de pic est également faible en raison de sa grande conductivité. Néanmoins un très léger décalage du potentiel standard de l'ordre de 6 mV est observé, sûrement dû à l'interaction entre les Cl^- du tampon et les complexes d'osmium.

En effet, il a été montré qu'une concentration croissante en chlorure dans le milieu influençait le potentiel du polymère rédox présent dans l'hydrogel en le rendant plus réducteur. Lors de l'oxydation du complexe métallique, les anions (dont le Cl^-) vont être intégrés dans la sphère de coordination externe du complexe entraînant la variation du potentiel rédox du médiateur [16, 18, 19].

Tampon	20 mM PB	50 mM PB	100 mM PB	200 mM PB	PBS
Conductivité ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$)	2,51	6,05	13,32	23,89	16,44
ΔE (mV)	165	113	85	62	73
E° (V)	0.369	0.369	0.369	0.369	0.363

Tableau II.2.2 : Résumé des conductivités des différents tampons ainsi que des écarts de pic et potentiels standards des polymères rédox dans chaque tampon.

Si l'on s'intéresse à présent aux courants de réduction dans les différents tampons, nous observons une augmentation de la cinétique avec la force ionique, le maximum étant atteint à 100 mM de phosphate (courbe violette). A 200 mM la catalyse diminue, suggérant qu'une conductivité trop importante peut gêner le transfert électronique dans l'hydrogel.

De plus, nous ne pouvons pas exclure un possible effet inhibiteur des ions phosphate (lorsqu'ils sont très concentrés) sur l'enzyme. Nous avons déjà observé ce type de phénomène par les ions acétate sur la laccase.

Nous voyons que la forte conductivité du PBS (courbe rouge) permet d'obtenir une bonne cinétique. La présence de Cl^- , qui interagissent avec les osmiums du polymère et sont aussi des inhibiteurs avérés des métalloenzymes [20], explique la limitation de la catalyse que nous pouvons observer sur la figure II.2.10.B.

2.2.6.2. Effet sur la stabilité

Nous avons ensuite étudié la stabilité de l'enzyme dans chacun de ces tampons, pendant 2h en chronoampérométrie à + 0,1 V vs. Ag/AgCl. Pour les tampons phosphate nous avons rajouté 140 mM de NaCl pour voir directement l'effet des Cl^- (figure II.2.11). Les chronoampérométries sans ajout de NaCl ne sont pas montrées mais sont traitées dans la figure II.2.12.

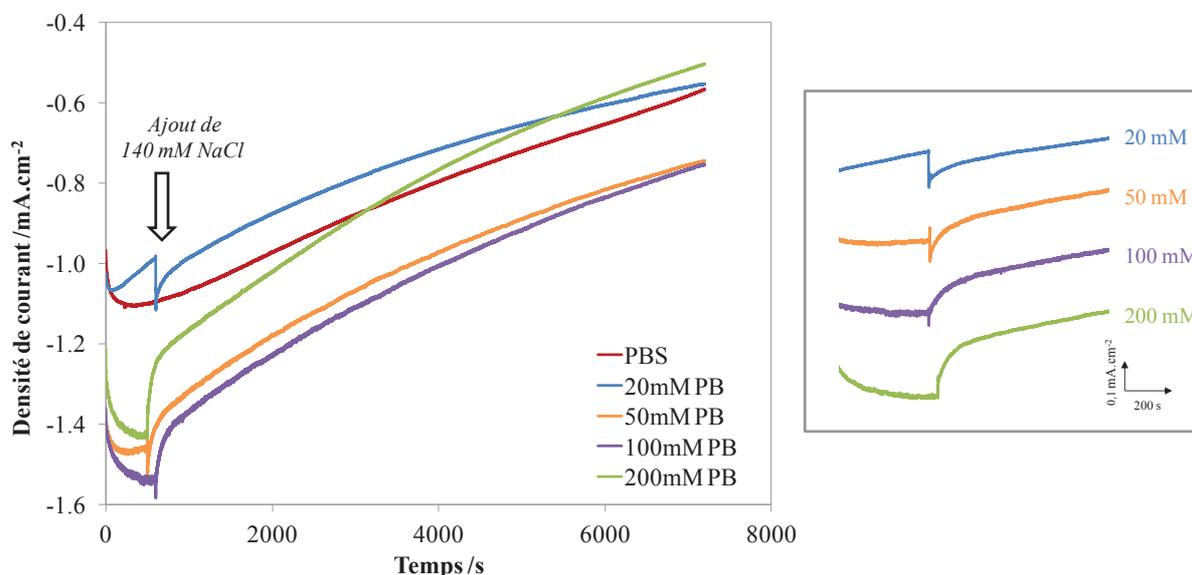


Figure II.2.11 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps pour différents tampons, 30%*m* BOD Mo, 62,6%*m* polymère rédox, 7,4%*m* PEGDGE, taux de recouvrement 108 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; séchage 18h à 4°C; mesure à 37,5°C, rotation 500 rpm et balayage à 5 mV/s sous O_2 ; potentiel à + 0,1 V vs. Ag/AgCl. L'encart à droite correspond à un agrandissement au niveau de l'ajout de NaCl.

Comme le montre l'encart de la figure II.2.11, l'effet inhibiteur des Cl^- et donc la perte immédiate de courant augmente avec la conductivité du tampon. Cela est certainement dû au fait qu'une plus grande force ionique entraîne une meilleure mobilité des ions en solution et donc les Cl^- parviennent plus facilement au niveau de l'hydrogel.

Les différentes pertes en courant et polymère après 2h de chronoampérométrie ont été résumées sur la figure II.2.12. La perte dite enzymatique correspond à la différence entre la perte de courant catalytique et la perte de polymère. Les pertes en courant catalytique ont été calculées à partir des catalyses sous oxygène réalisées avant et après la chronoampérométrie. Les pertes en polymère ont été calculées grâce à la variation de l'aire du pic de réduction du médiateur enregistré à 5 mV/s sous argon avant et après la chronoampérométrie.

Que ce soit avec ou sans NaCl, la perte de courant diminue jusqu'à 100 mM où elle est minimale puis augmente à 200 mM. Nous constatons que la perte minimale de courant est enregistrée dans le tampon 100 mM sans chlore : il s'agit donc du tampon optimal car en plus de préserver au mieux l'hydrogel de BOD *Mo*, il permet d'obtenir la meilleure densité de courant comme nous l'avons vu sur la figure II.2.10.

En présence chlore, la perte de courant augmente et comme nous pouvons le voir elle est très majoritairement due à l'inhibition de l'enzyme alors qu'en l'absence de chlore les pertes dues au polymère et à l'enzyme sont à peu près équivalentes.

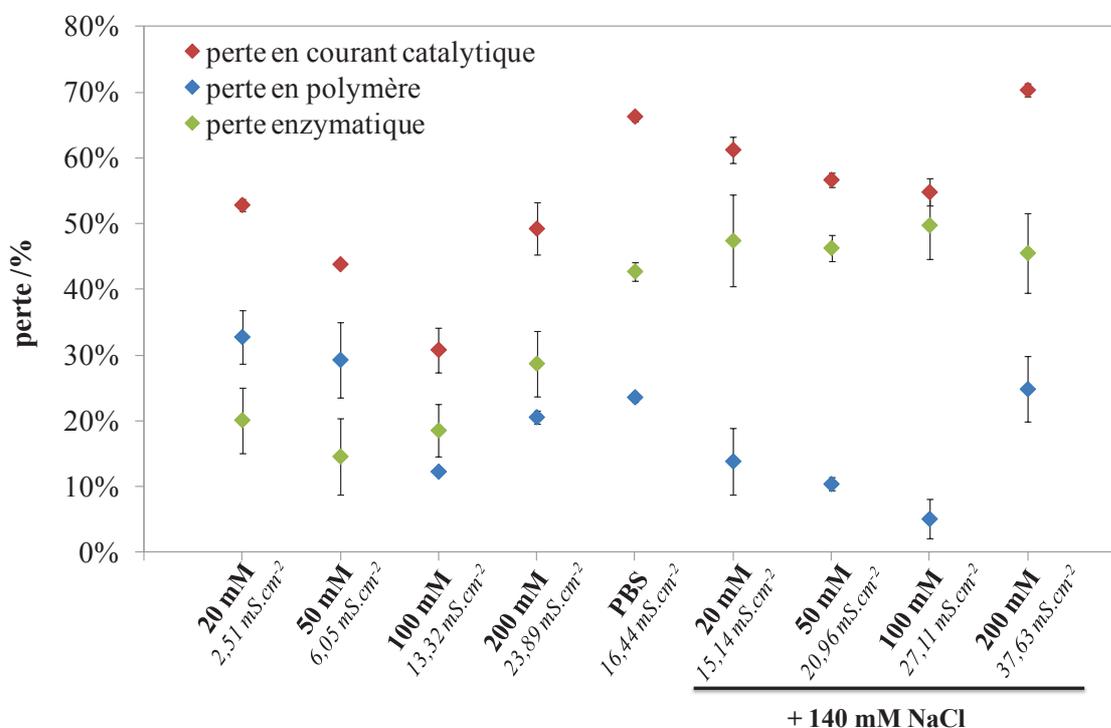


Figure II.2.12 : Résumé des pertes en courant catalytique, polymère et enzyme dans chaque tampon calculées après 2h de chronoampérométrie sous O_2 à +0.1V vs. Ag/AgCl. Les conductivités de chaque tampon sont indiquées en italique sur l'axe des abscisses.

2.2.7. Comparaison avec les BODs de *Bacillus pumilus*, *Trachyderma tsunodae* et *Myrothecium verrucaria*

Des hydrogels à base de chacune des BODs connues ont été préparés dans leurs conditions optimales respectives (cf Matériels et Méthodes 2.3). Les compositions de chaque hydrogel et les durées/températures de séchage sont données dans le tableau II.2.3.

BOD	<i>M. verrucaria</i>	<i>T. tsunodae</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>M. oryzae</i>
Activité en solution (U/mg)	388	527	622	621
Ratio %m polymère/enzyme/agent réticulant	48,5 / 44,6 / 6,9	77,3 / 15,2 / 7,5	62,1 / 30,5 / 7,4	62,6 / 30 / 7,4
Durée et température de séchage	18h à 25°C	2h à 25°C	4h à 25°C	18h à 4°C
Acide aminé en position axiale	méthionine	phénylalanine	méthionine	méthionine

Tableau II.2.3 : Résumé des caractéristiques de chaque BOD. Les activités en solution ont été mesurées en utilisant l'ABTS comme substrat comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes 2.1 avec une incertitude moyenne de ± 30 U/mg.

Les signaux des polymères ainsi que les catalyses pour chaque hydrogel sont résumés sur la figure II.2.13.

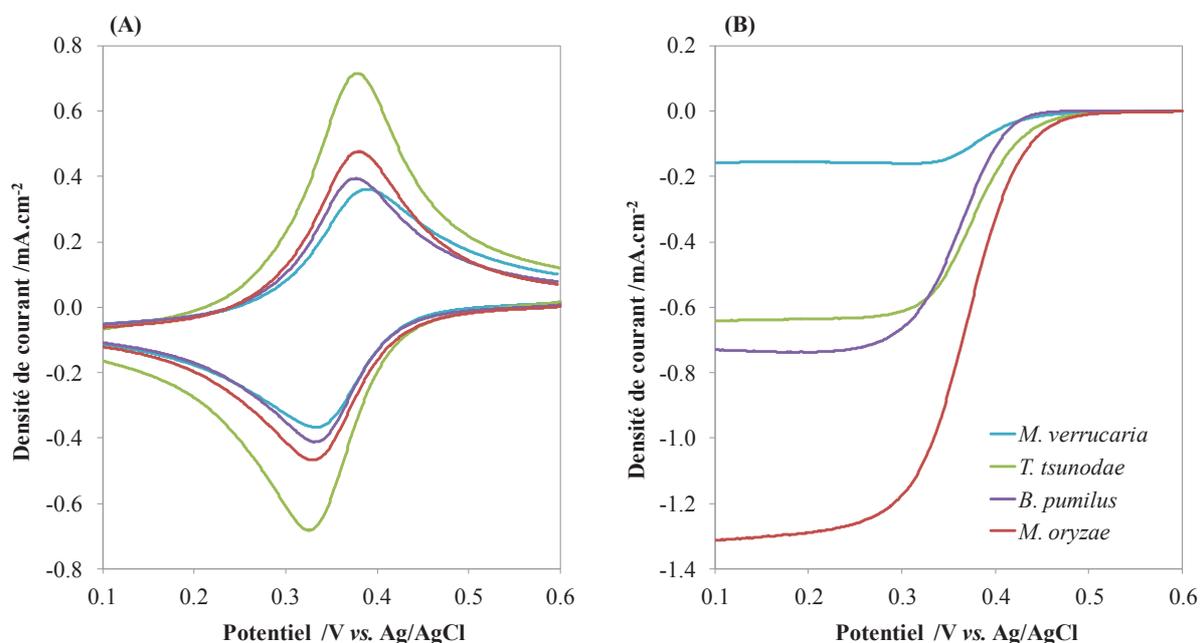


Figure II.2.13 : Densités de courant pour des hydrogels à base de différentes BODs, ratios et séchage cf tableau II.2.3 ; taux de recouvrement de $108 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; tampon PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C, rotation 500 rpm, (A) à 100 mV/s sous Ar et (B) à 5 mV/s sous O_2 .

Tout d'abord nous observons que le signal du polymère, à savoir l'aire du pic de réduction, est bien proportionnel à la teneur en polymère rédox de chaque hydrogel. Ensuite il apparaît clairement que la BOD de *M. oryzae* est la plus électroactive des 4. Bien qu'ayant la même activité en solution que la BOD de *B. pumilus*, elle a un courant de réduction de l'oxygène deux fois plus élevé ; et elle surpasse nettement les BODs de *M. verrucaria* et *T. tsunodae*.

Néanmoins, au regard des courants de réduction, il apparaît que la catalyse de la BOD de *B. pumilus* commence à un potentiel plus réducteur que les autres d'environ 50 mV. Ce résultat est inattendu car le ligand axial de cette enzyme est le même que pour les BODs de *M. verrucaria* et *M. oryzae*. Comme ce ligand contrôle le potentiel du cuivre T1 [1] nous pensions que la catalyse débiterait au même potentiel pour ces 3 enzymes. De même la catalyse de *T. tsunodae* commence au même potentiel que pour *M. verrucaria* et *M. oryzae* alors que son ligand axial est différent et devrait en théorie diminuer son potentiel. Des études sont en cours pour essayer de comprendre et d'expliquer cette variation du potentiel rédox.

Ceci met en évidence l'importance de l'interaction polymère/enzyme au sein de l'hydrogel ainsi que le fait qu'une enzyme immobilisée n'a pas les mêmes propriétés qu'une enzyme libre en solution.

Dans la partie suivante nous nous sommes intéressés à l'enzyme elle-même : le but est d'augmenter ses performances par la formation de structures hybrides organiques/inorganiques sensées augmenter la catalyse enzymatique. Ceci constituerait une alternative à l'ingénierie enzymatique qui reste une méthode difficile à mettre en œuvre.

2.3. Travail sur l'activité enzymatique : les « nanofleurs » enzymatiques

2.3.1. Principe

Les travaux de Ge et al en 2012 ont mis en évidence la croissance de complexes de phosphate de cuivre $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ autour d'enzymes aboutissant à la formation de superstructures appelées nanofleurs. Les enzymes vont se lier avec les ions de cuivre introduits dans le milieu et ces complexes vont ensuite servir de points de nucléation pour la fixation et la croissance de cristaux inorganiques de $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$. Les assemblages formés vont ensuite se regrouper en structures ressemblant à des fleurs comme nous pouvons le voir sur la figure II.2.14 [21].

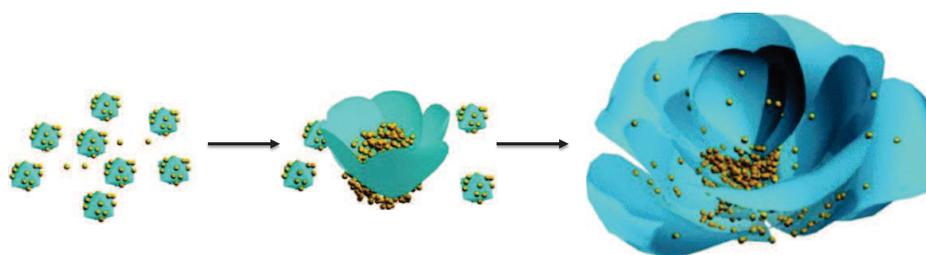


Figure II.2.14 : Mécanisme de formation des nanofleurs. Nucléation et formation de cristaux primaires puis croissance de ces cristaux et enfin formation de la nanofleur [21].

Ils ont démontré la faisabilité de leur processus sur 4 enzymes (figure II.2.15) : l' α -lactalbumine, la laccase de *Trametes versicolor*, l'anhydrase carbonique et la lipase de *Candida antarctica*, obtenant pour chacune d'entre elles des structures similaires de nanofleurs. En diminuant la concentration d'enzymes ils ont constaté que les agrégats formés étaient moins denses et présentaient ainsi une meilleure accessibilité au milieu extérieur.

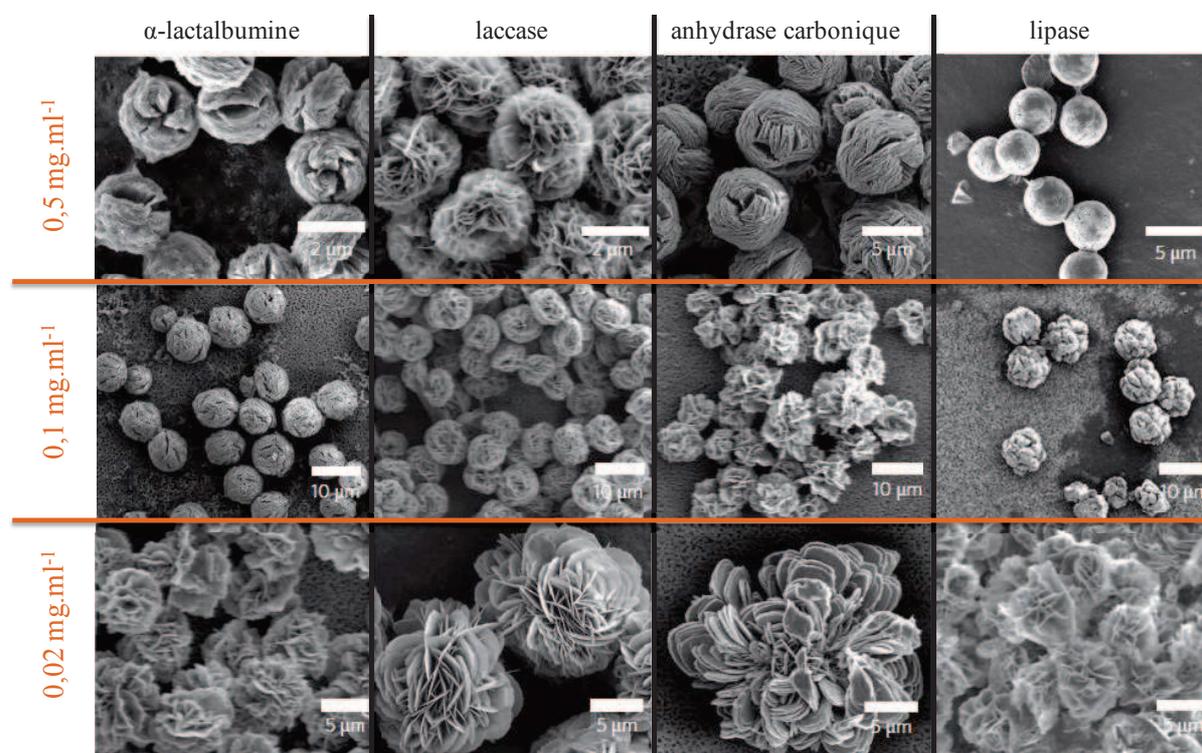


Figure II.2.15 : Exemples de « nanofleurs » obtenues à partir de différentes enzymes et à différentes concentrations [21].

Les performances catalytiques des nanofleurs ont été mesurées par spectrophotométrie UV-visible et par fluorescence : il a été observé pour les nanofleurs une augmentation de l'activité jusqu'à 6,5 fois par rapport à l'enzyme libre dans le cas de la laccase.

En 2013, Wang et al se sont basés sur ces travaux pour élaborer différents types de structures à base d' α -amylase et de CaHPO_4 [22]. En modulant les proportions des différents substrats ils sont parvenus à synthétiser différentes structures dont des nanofleurs. Après calcification, l'enzyme conservait près de 90% de son activité initiale après 25 jours d'incubation dans du PBS contre seulement 33% pour l'enzyme libre.

Ce type de procédé, rapporté à partir de 2004, avait déjà été utilisé pour former des cristaux entièrement inorganiques utilisant des métaux nobles à la place des enzymes. Les nanofleurs alors formées avaient une efficacité démontrée en catalyse et en chimie analytique [23-29].

2.3.2. Application à la BOD de *Bacillus pumilus*

En raison de la proximité structurale des laccases et bilirubine oxydases nous avons voulu essayer ce procédé sur nos enzymes afin d'en améliorer les performances. Pour réaliser cette expérience, nous avons utilisé la BOD de *B. pumilus* (BOD *Bp*) plutôt que celle de *M. oryzae* en raison de sa meilleure stabilité, espérant qu'elle supporterait ainsi mieux les manipulations effectuées.

Les protocoles détaillés de préparation et de caractérisation des nanofleurs sont décrits dans la partie Matériels et Méthodes 2.4.

2.3.2.1. Influence de l'agitation pendant la formation des nanofleurs

2.3.2.1.1. Protocole

Pour réaliser des nanofleurs à base de BOD *Bp*, nous avons incubé du sulfate de cuivre et de l'enzyme dans du tampon PBS 1X (3 mM PB + 155 mM NaCl) pendant 3 jours à 25°C comme indiqué dans l'article de référence [21]. N'ayant d'autre indication nous avons préparé deux échantillons : le premier a été agité 1 fois par jour tous les jours alors que le second non.

A l'issue des 3 jours, un précipité très légèrement bleu est observé au fond des 2 échantillons. Ces dépôts sont filtrés sous vide sur membrane de polycarbonate. Les membranes sont ensuite étudiées en microscopie électronique à balayage afin de voir les structures des nanofleurs formées et les filtrats sont analysés en spectrophotométrie UV-visible afin d'évaluer la quantité d'enzyme non encapsulée dans les nanofleurs.

2.3.2.1.2. Microscopie électronique à balayage

Au regard des clichés de MEB, nous constatons que les nanofleurs formées avec agitation (échantillon 1) sont environ 10 fois plus petites ($\sim 1,5 \mu\text{m}$) que celles sans agitation (échantillon 2) ($\sim 15 \mu\text{m}$). De plus, dans ce deuxième cas certaines structures semblent être en train de « bourgeonner » suggérant que le processus est inachevé (figure II.2.16).

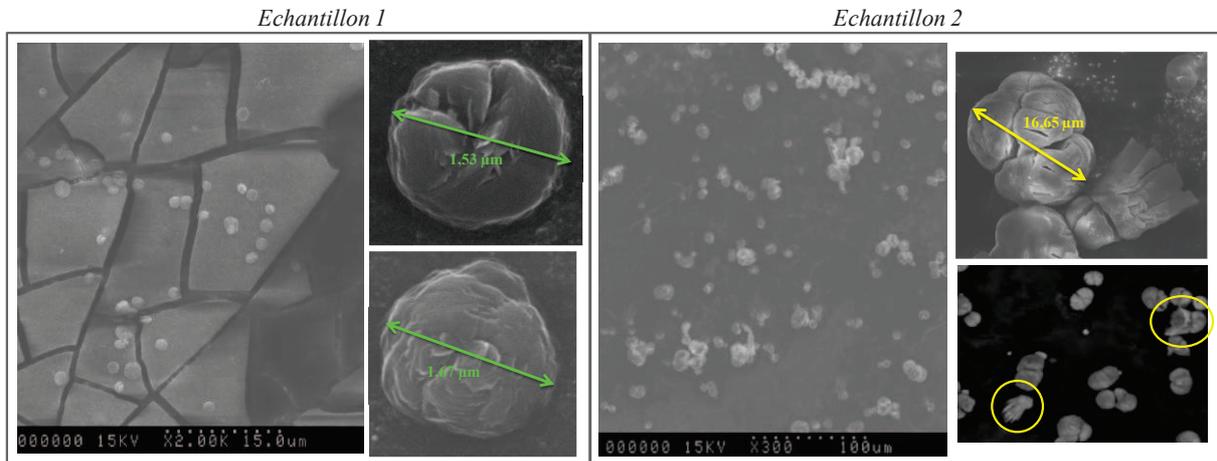


Figure II.2.16 : Clichés MEB des nanofleurs obtenues pour les échantillons 1 (avec agitation) et 2 (sans agitation).

En parallèle de l'incubation de nanofleurs nous avons réalisé l'incubation de sulfate de cuivre et de phosphate dans les mêmes conditions. En l'absence d'enzyme (figure II.2.17.A), les « pétales » formés par la co-précipitation naturelle du cuivre et du phosphate sont beaucoup moins structurés et ressemblent davantage à des cristaux désorganisés qu'à des nanofleurs (figure II.2.17.B). Ceci renforce l'idée que les enzymes servent de centre de nucléation à la croissance des cristaux comme indiqué sur le schéma mécanistique (figure II.2.14).

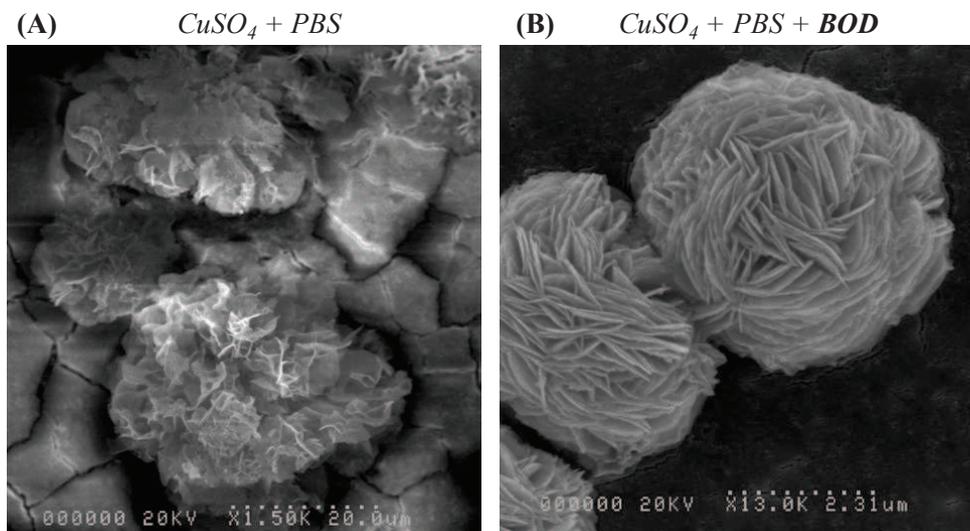


Figure II.2.17 : Incubation 3 jours à 25°C de $\text{CuSO}_4 + \text{PBS}$ (A) sans ou (B) avec BOD.

De plus, une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) a été réalisée sur les nanofleurs, ce qui nous a permis de vérifier la présence d'enzymes puisque la bande principale observée correspond au poids moléculaire de la BOD *Bp*.

2.3.2.1.3. Calcul du taux d'encapsulation

Concernant l'analyse des filtrats, les spectres d'absorbance enregistrés (figure II.2.18) nous ont permis par comparaison avec la BOD *Bp* libre de calculer les quantités d'enzyme présentes dans chacun (cf Matériels et Méthodes 2.4.4). Ceci nous a permis de remonter au taux d'encapsulation d'enzymes dans les nanofleurs qui sont de 93% pour l'échantillon 1 et 74% pour l'échantillon 2.

L'agitation pendant l'incubation permet donc d'améliorer le processus de formation des nanofleurs résultant en un meilleur taux d'encapsulation de l'enzyme et l'obtention d'objets finis.

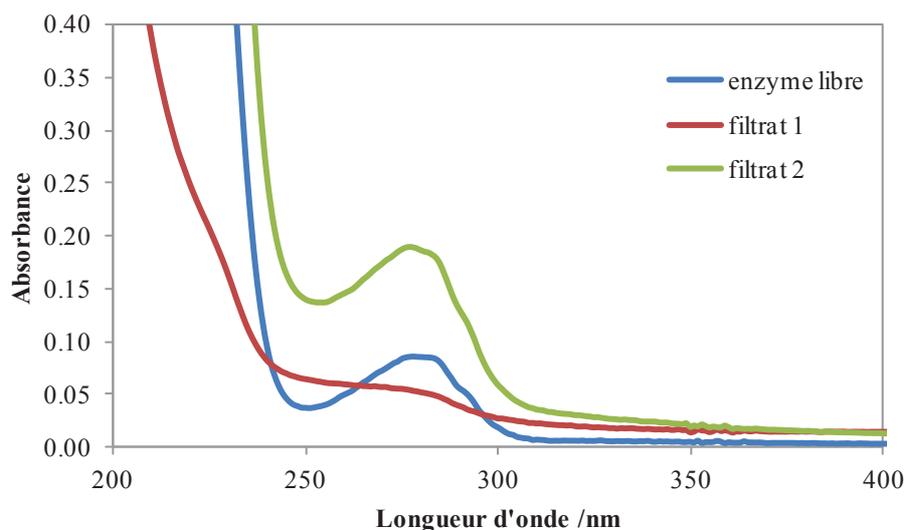


Figure II.2.18 : Spectre d'absorbance des filtrats des échantillons 1 et 2 ainsi que de l'enzyme libre à 0,1 mg.ml⁻¹. Mesures à 37°C dans du tampon PB 50 mM pH 7,6.

2.3.2.1.4. Tests en électrochimie

Que ce soit en transfert électronique direct ou médié avec un polymère à base d'osmium, les nanofleurs n'ont produit aucun courant de réduction de l'oxygène à la surface d'électrodes de carbone vitreux.

Cependant lorsqu'elles ont été testées en solution un courant de réduction a été observé vers + 0,2 V vs. Ag/AgCl (figure II.2.19). Chronologiquement nous avons d'abord

enregistré le signal de l'électrode seule (courbe rouge) puis rajouté 500 μl de précipité de nanofleurs (courbe bleu) et enfin 500 μl de surnageant des solutions d'incubation des nanofleurs (courbe verte).

Le courant observé est dû au surnageant dans le cas d'échantillon 1 et au culot dans le cas de l'échantillon 2. Ce résultat peut certainement être expliqué par la taille des objets mesurée en MEB. En effet, l'échantillon 1 produit de petites structures dont les plus actives seraient en suspension et donc dans le surnageant. A l'inverse, l'échantillon 2 donne de grosses structures qui sédimentent facilement et sont donc présentes dans le précipité.

Bien que nous ne sachions pas précisément à quoi correspond le potentiel de réduction de l'oxygène à + 0,2 V, il est probable que la coordination entre l'enzyme et les complexes de cuivre-phosphate entraîne une modulation du potentiel de son cuivre T1. Ou bien cela pourrait correspondre à l'un des cuivres de son centre trinuéculaire qui, pour une raison donnée, serait capable de s'affranchir du T1 pour la réduction de l'oxygène.

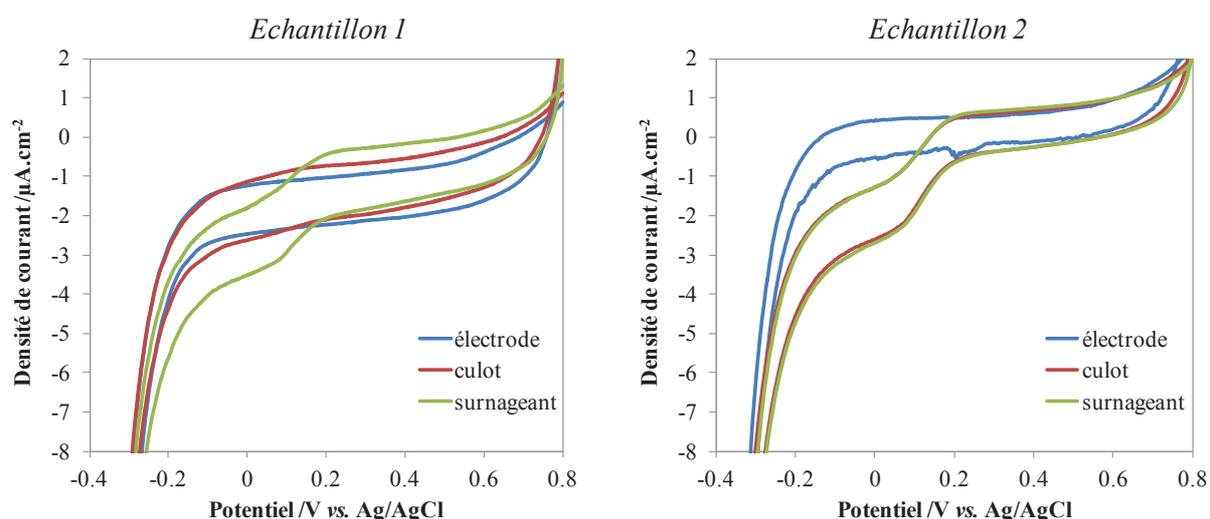


Figure II.2.19. : Voltammogrammes cycliques obtenus pour l'électrode de carbone vitreux seule, l'ajout de précipité puis de surnageant des échantillons 1 et 2 de nanofleurs en solution. Mesures réalisées dans du PBS 1X à 37,5°C, 500 rpm et 5 mV/s sous O_2 .

2.3.2.2. Variation du degré d'agitation et de la température d'incubation

2.3.2.2.1. Protocole

Dans le but d'optimiser la synthèse des nanofleurs, nous avons fait varier la température ainsi que la fréquence d'agitation pendant l'incubation.

La température d'incubation a été montée à 30°C ou maintenue à 25°C. Pour chaque température, l'échantillon a été agité 3 fois, 1 fois ou pas du tout chaque jour pendant les 3

jours d'incubation (Figure II.2.20). Après trois jours, chacun des 6 échantillons subi 2 traitements :

- la première moitié est directement filtrée sur membrane de polycarbonate puis analysée en MEB ;
- la deuxième moitié est filtrée puis le dépôt obtenu sur les membranes est récupéré par grattage, rincé et à nouveau filtré avant d'être analysés au MEB. Ceci permettra de voir si cette méthode est adaptée pour récupérer les nanofleurs après filtration

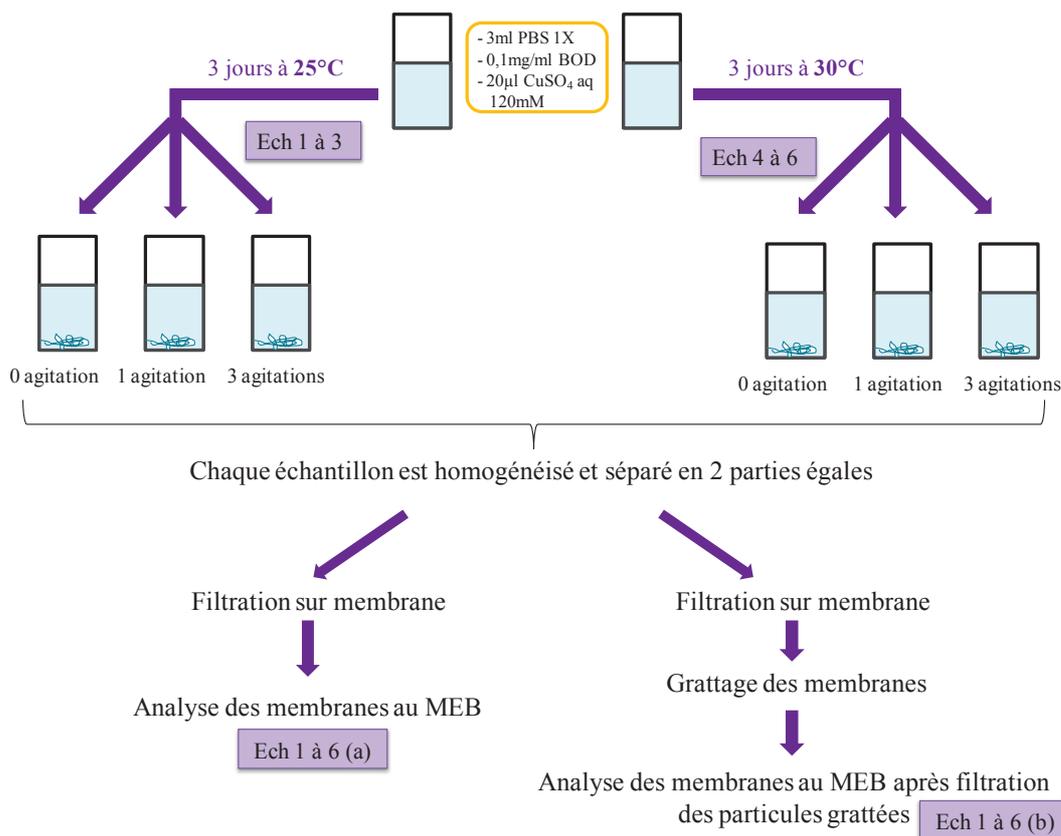


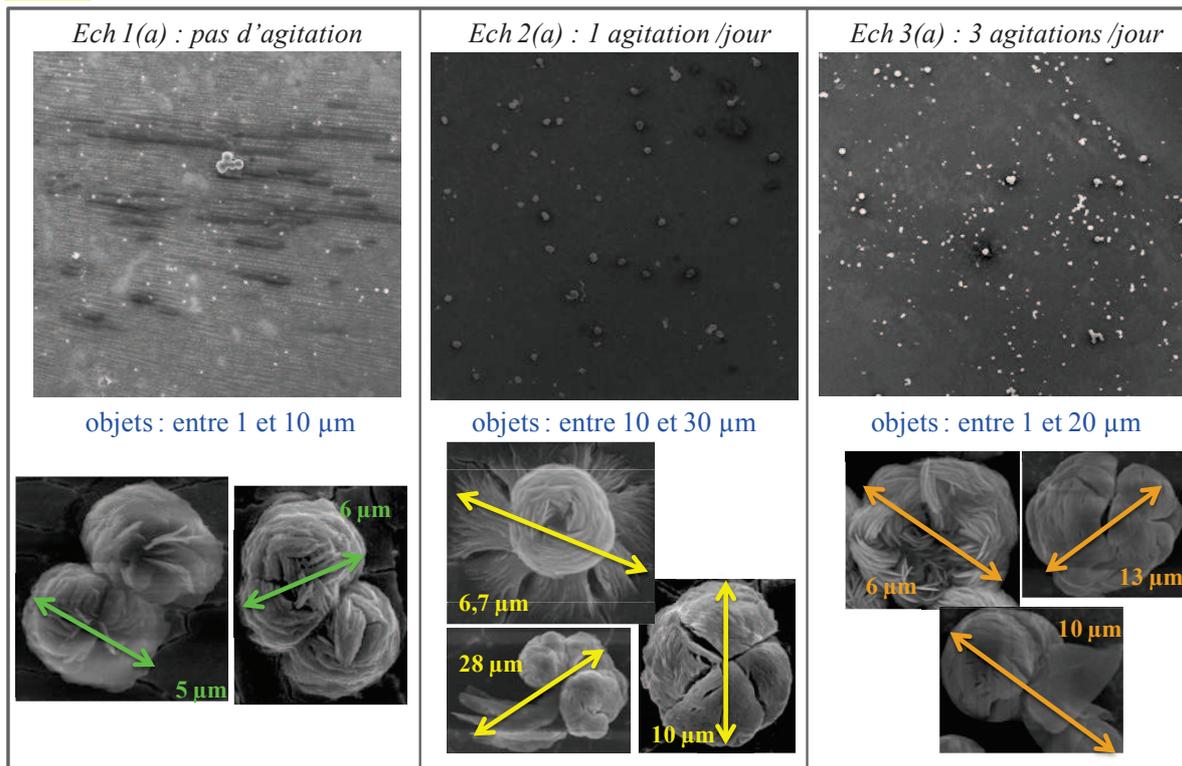
Figure II.2.20 : Protocole de préparation des nanofleurs en fonction de l'agitation et la température d'incubation.

2.3.2.2.2. Microscopie électronique à balayage

Les structures des nanofleurs ont été imagées en MEB pour chacune des conditions d'incubation décrites précédemment et en fonction du traitement effectué après incubation.

Tout d'abord, dans le cas de la filtration simple (figure II.2.21), nous constatons qu'à 25°C les structures formées sont davantage monodisperses, régulières et semblent avoir une structure plus « ouverte » donc accessible. A 30°C les nanofleurs ont tendance à s'agréger en objets plus gros. Ensuite, la variation de l'agitation n'a pas donné de grand changement sur les structures.

25°C



30°C

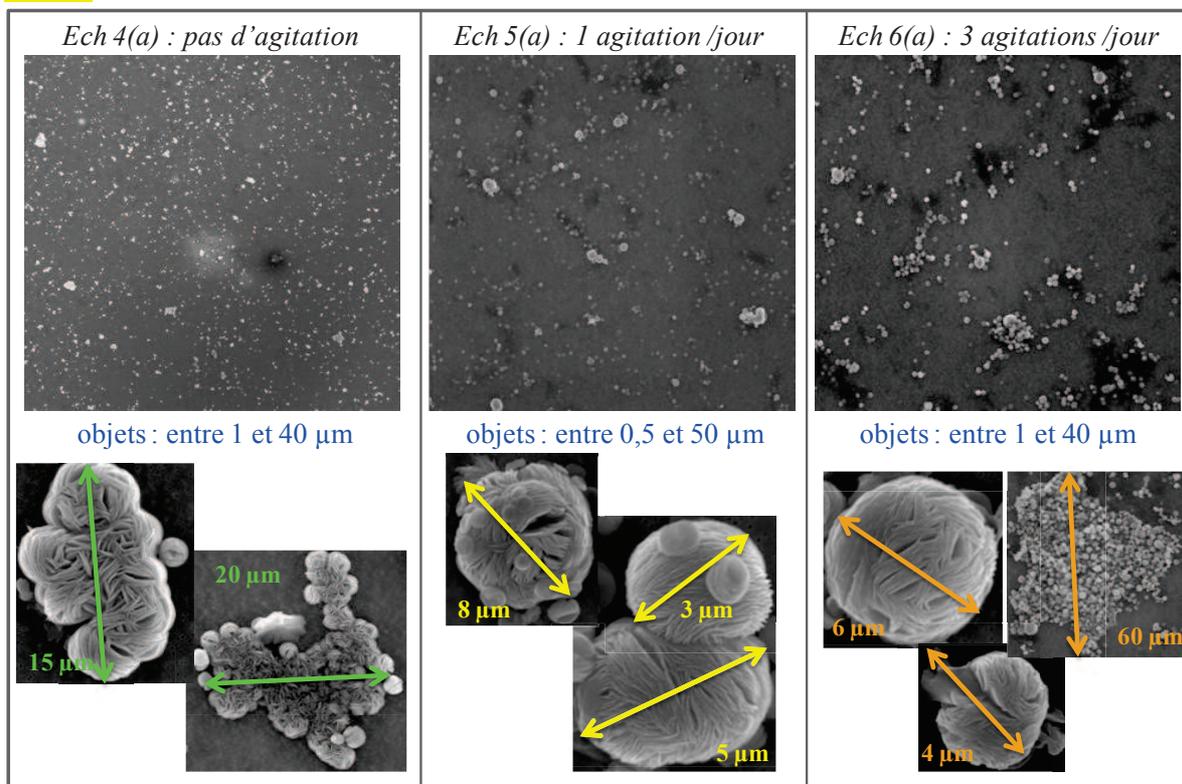
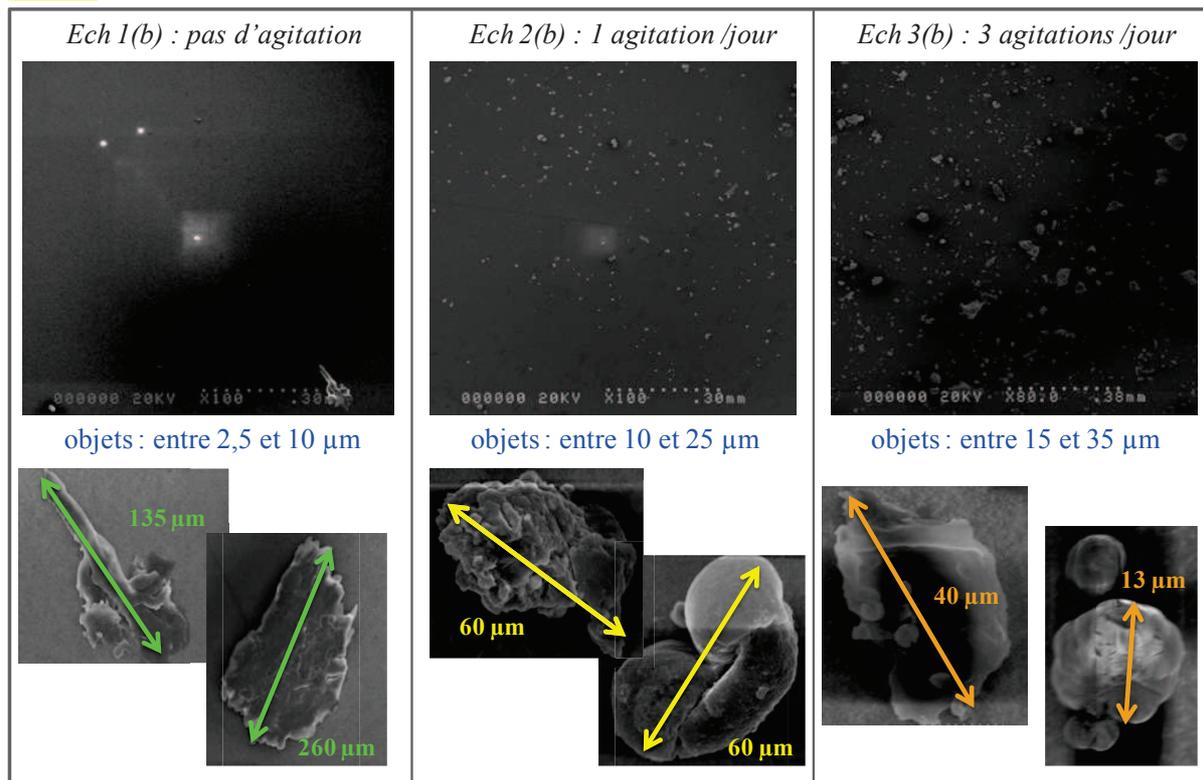


Figure II.2.21 : Clichés MEB des nanofleurs obtenues avec différentes agitations à 25 et 30°C.

25°C



30°C

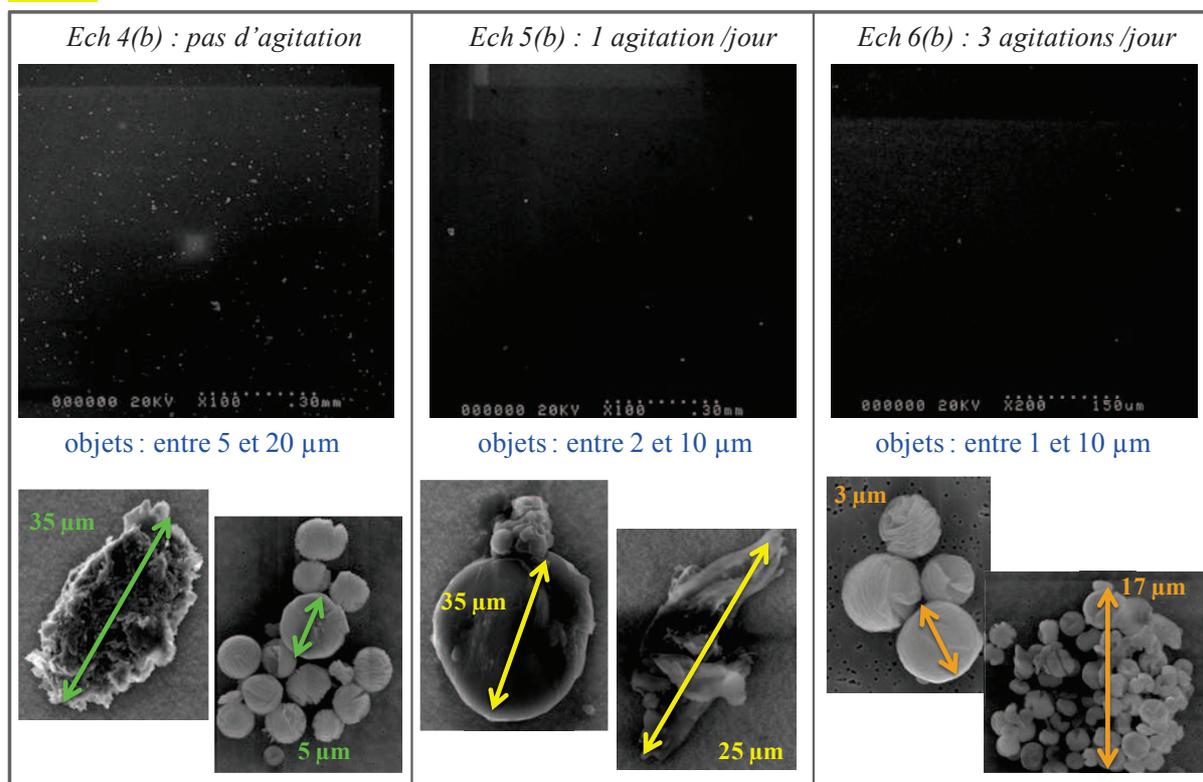


Figure II.2.22 : Clichés MEB des nanofleurs obtenues avec différentes agitations à 25 et 30°C après récupération par grattage.

Concernant les structures des nanofleurs qui ont été récupérées par grattage des membranes, nous constatons qu'elles ont été en partie endommagées par le processus (figure II.2.22). Cette tendance est plus marquée pour l'incubation à 25°C ce qui suggère que les nanofleurs formées sont alors plus fragiles. Ainsi, après incubation à 30°C, les nanofleurs sont certes plus grosses et plus denses mais également plus résistantes même si leur structure n'est pas entièrement conservée.

2.3.2.2.3. Calcul du taux d'encapsulation

Le taux d'encapsulation pour chacun des échantillons a été calculé en dosant l'enzyme libre résiduelle dans chaque filtrat. D'après le tableau II.2.4, nous voyons que l'encapsulation augmente avec l'agitation mais pas avec la température.

échantillon	1	2	3	4	5	6
température	25°C			30°C		
agitation/jour	0	1	3	0	1	3
encapsulation	92%	96%	99%	91%	93%	94%

Tableau II.2.4 : Taux d'encapsulation d'enzyme selon l'agitation et la température.

2.3.2.2.4. Mesure de l'activité en solution

L'activité en solution a été mesurée pour les nanofleurs après 3 jours d'incubation à 25°C et comparée à l'activité initiale de la BOD *Bp* libre (cf Matériels et Méthodes 2.4.5). Pour ce test, la solution de nanofleurs a été préalablement homogénéisée.

D'après le tableau II.2.5, nous observons qu'après 3 jours d'incubation, l'enzyme sous forme de nanofleurs perd 74% de son activité initiale. De plus, les mêmes mesures d'activité réalisées pour les autres échantillons de nanofleurs ont donné le même ordre de grandeur, quelles que soient les conditions d'incubation. Ce résultat semble indiquer que les conditions opératoires ne sont pas encore optimales.

Enzyme	Activité (U/mg)
BOD <i>Bp</i> initiale	709
BOD <i>Bp</i> incubée	650
nanofleurs	195

Tableau II.2.5 : Activité en solution des nanofleurs après incubation 3 jours à 25°C comparée à celle de l'enzyme libre avant et après incubation. Incertitudes ± 30 U/mg.

2.3.2.3. Influence du tampon d'incubation

Nous avons fait varier la molarité en NaP ainsi qu'en NaCl en fixant un pH de 5 ou 7,2 comme indiqué dans le tableau II.2.6. Dans l'article de référence il est indiqué que la présence de Cl⁻ est indispensable à la formation de nanofleurs et nous souhaitons voir si cela est également vrai lorsque l'enzyme utilisée est une BOD. En effet, aucune explication n'est fournie sur l'implication du chlore dans la formation des nanofleurs.

tampon	1	2	3	4	5	6	7	8
[NaP]	3mM				50mM			
pH	7,2		5		7,2		5	
[Cl ⁻]	155mM	0	155mM	0	155mM	0	155mM	0

Tableau II.2.6 : Composition des différents tampons d'incubation des nanofleurs.

Le taux d'encapsulation de l'enzyme dans les nanofleurs calculé pour chacun des tampons ci-dessus avoisine les 100%.

2.3.2.3.1. Microscopie électronique à balayage

Seuls les résultats pour les tampons 1 à 4 sont présentés ici (figure II.2.23), la même chose ayant été obtenue pour les tampons 5 à 8.

Nous constatons qu'en l'absence de chlore (tampons 2 et 4) il n'y a effectivement pas de nanofleurs formées mais plutôt de gros feuilletts compacts comme mentionné dans la publication de référence.

Ensuite, à pH 5 (tampon 3) la structure obtenue est hautement dense, les « pétales » étant tellement rapprochés qu'on ne peut plus les distinguer. Les objets formés sont peu nombreux mais gros (30 à 50µm de diamètre) et parfaitement sphériques contrairement aux nanofleurs obtenues à pH 7,2 (5 à 10µm de diamètre). L'enzyme étant chargée positivement à pH 5, il est possible que l'interaction avec les anions phosphate soit plus forte et plus rapide qu'à pH 7,2 et concurrence les interactions avec les cations de cuivre donnant ainsi de grosses structures.

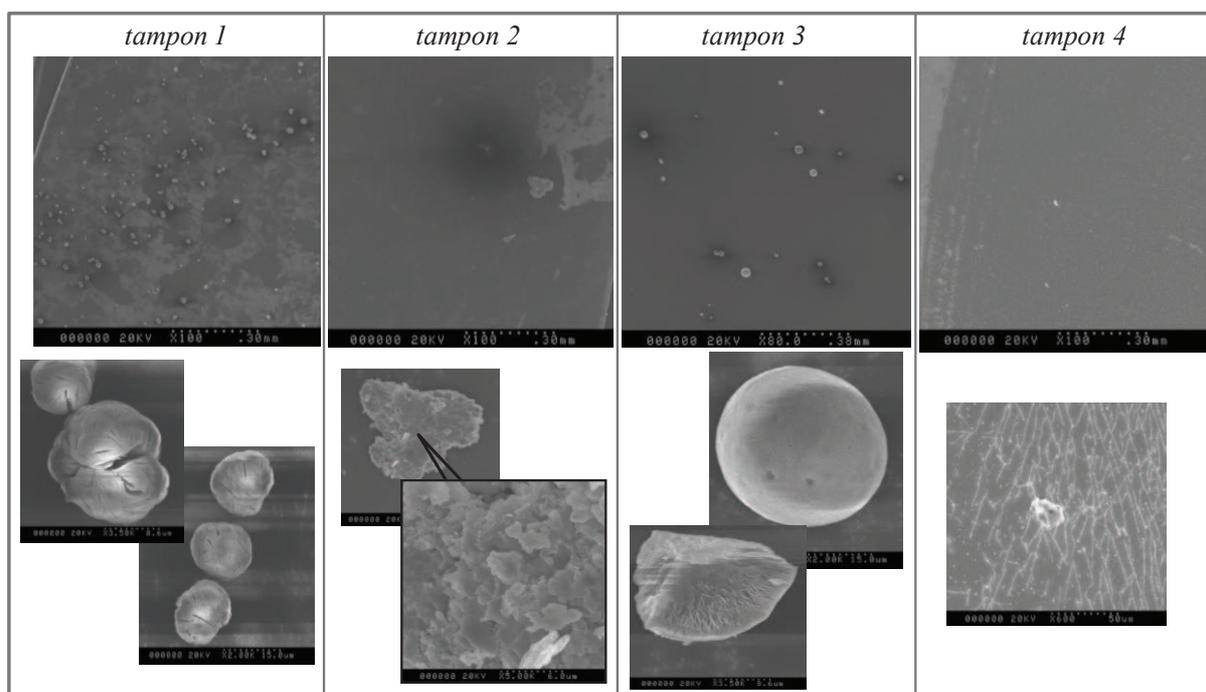


Figure II.2.23 : Clichés MEB des nanofleurs obtenues en fonction du tampon d'incubation.

2.3.2.3.2. Mesure de l'activité en solution

Nous avons mesuré l'activité en solution pour les nanofleurs obtenues à partir de chacun des tampons en prenant comme référence l'activité initiale de l'enzyme (cf Matériels et Méthodes 2.4.5.).

Il ressort du tableau II.2.7 que l'activité des nanofleurs est améliorée par incubation dans un tampon à pH neutre et en l'absence de chlore. Ainsi les tampons 2 et 6 donnent le meilleur résultat avec une activité similaire à celle de référence. Puisqu'en l'absence de chlore il n'y a pas de structure de nanofleurs, il est possible que les agrégats observés correspondent uniquement à la co-précipitation du cuivre et du phosphate, l'enzyme restant en solution, d'où une activité proche de celle de l'enzyme libre.

tampon	1	2	3	4	5	6	7	8	BOD témoin
[NaP]	3mM				50mM				-
pH	7,2		5		7,2		5		-
[Cl ⁻]	155mM	0	155mM	0	155mM	0	155mM	0	-
A (U/mg)	300	625	13	357	529	627	13	392	650

Tableau II.2.7 : Activité en solution des nanofleurs en fonction du tampon et comparaison à l'activité de l'enzyme libre, incubation 3 jours à 25°C. Incertitudes ± 30 U/mg.

En présence de chlore, une nette diminution de l'activité est observée lorsqu'on passe de pH 7,2 à pH 5. Ceci est à corrélérer avec le type de structures obtenue qui sont très denses, presque fermées, et vont très probablement entraver la diffusion du substrat jusqu'aux enzymes.

Enfin, pour un tampon à pH 7,2 et possédant 155 mM de chlore il y a une hausse de l'activité d'environ 40% lorsque la concentration en phosphate augmente de 3 à 50 mM. Nous pouvons envisager qu'une plus grande conductivité du milieu améliore la structure des nanofleurs, par exemple en accélérant la mobilité ionique.

2.3.3. Conclusion sur la formation de nanofleurs à partir de BOD

Bien que nous ayons pu obtenir des nanofleurs de structure similaire à celles de Ge et al [21], aucun test n'a permis de déterminer de manière sûre que de telles structures permettaient d'augmenter l'activité enzymatique par rapport à l'enzyme libre. Un tel résultat aurait pu être attendu compte tenu de la proximité de séquence entre les BODs et les laccases ; les nanofleurs de laccases de Ge et al ayant une activité augmentée de 500% par rapport à l'enzyme libre.

La seule piste est qu'en utilisant un tampon sans chlore nous observons une oxydation accrue de l'ABTS alors que les agrégats formés ne semblent pas structurés en nanofleurs. Il serait sans doute utile de réaliser un gel d'électrophorèse sur ces structures afin de déterminer si elles contiennent réellement de l'enzyme ou si cette dernière est restée en solution.

En conclusion, malgré les diverses optimisations réalisées pour améliorer la synthèse des nanofleurs, nous ne sommes pas parvenus à augmenter la réduction de l'oxygène par rapport à l'enzyme libre.

2.4. Conclusion intermédiaire

La nouvelle BOD de *Magnaporthe oryzae* semble très prometteuse à la vue des résultats obtenus, notamment en terme de densité de courant. Les expériences réalisées au cours de cette étude permettent d'avoir une première idée de son comportement et des conditions dans lesquelles elle doit être utilisée en électrochimie.

Nous avons déterminé les conditions optimales de préparation de l'hydrogel à base de BOD *Mo*, et nous avons étudié l'influence de divers facteurs environnementaux (pH, température, conductivité) sur ses performances.

Nous avons également comparé la BOD *Mo* à d'autres BODs : il s'avère qu'elle donne un courant de réduction neuf fois supérieur à celui généré par la BOD de *M. verrucaria* qui est la seule BOD commercialisée actuellement et qui surpasse de deux fois ceux des BODs de *T. tsunodae* et de *B. pumilus*.

Cependant, des études structurales et dynamiques de la BOD *Mo* permettraient de mieux expliquer et prévoir son comportement. En effet, il serait intéressant d'étudier la structure de l'enzyme pour établir des points de comparaison avec d'autres BODs afin de tenter d'en déduire quels acides aminés particuliers ou quelle conformation locale est responsable des gains et pertes d'activité observés d'une enzyme à l'autre.

En effet, l'un des points clés de l'optimisation des biopiles réside dans l'ingénierie enzymatique. Il a d'ailleurs été montré que la mutation d'un seul acide aminé pouvait entraîner une hausse d'activité spectaculaire [30].

Afin d'accroître l'activité enzymatique nous avons procédé à la fabrication de nanofleurs à partir de la BOD *Bp* par analogie avec les travaux de Ge et al. La structuration de cristaux cuivre/phosphate autour de l'enzyme peut permettre de la rendre plus active : en effet il a déjà été montré que la présence de cuivre à proximité de laccases permettait d'améliorer leur activité [31]. Néanmoins malgré plusieurs tentatives d'optimisation, nous ne sommes pas parvenus à obtenir les mêmes résultats qu'avec la laccase [21].

Il serait certainement utile de reprendre ces expériences avec une laccase afin de reproduire les résultats publiés de manière à valider les conditions opératoires utilisées avant de poursuivre les travaux sur la BOD. De plus, il est tout simplement possible que la formation de nanofleurs de BOD n'ait pas d'effet sur l'activité enzymatique à l'inverse des travaux de Ge et al sur la laccase.

Afin d'augmenter les performances de notre cathode il est également possible de travailler sur le médiateur rédox qui compose l'hydrogel rédox avec la BOD et qui assure le transfert des électrons entre l'enzyme et l'électrode. Par conséquent, la partie suivante de ce chapitre propose une étude réalisée sur la synthèse de différents médiateurs rédox et leur caractérisation.

3. Conception de nouveaux polymères rédox cathodiques

3.1. Caractéristiques du polymère rédox cathodique d'origine

Le polymère que nous utilisons à la cathode est constitué d'un squelette de polyacrylamide et de polyvinylimidazole (PAA-PVI) sur lequel sont greffés des complexes à base d'osmium et de bipyridine chlorée. Le potentiel standard de ce polymère rédox est de + 0,36 V vs. Ag/AgCl et sa synthèse est décrite dans la littérature [10].

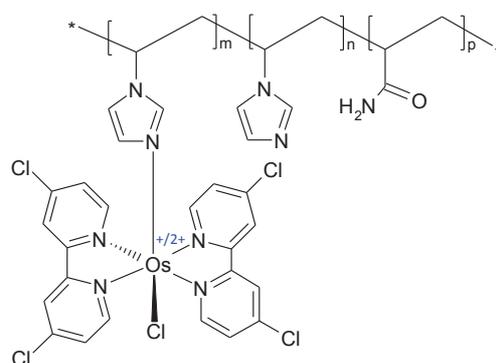


Figure II.3.1 : Structure du polyacrylamide-poly{N-vinylimidazole [Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺}.

Les électrons diffusent par collision entre osmiums voisins le long du polymère rédox [18] et sont donc caractérisés par un coefficient de diffusion apparent D_{app} . Blanch et Savéant ont développé un modèle pour évaluer ce coefficient dans le cas d'un déplacement rapide et étendu des électrons [32, 33]. Leur modèle suggère que la valeur de D_{app} au sein de l'hydrogel varie avec la concentration en osmium du polymère en faisant l'hypothèse que la distance entre chaque osmium reste constante. Il a précédemment été montré pour une anode à base de GOx et une cathode à oxygène que la concentration en osmium affecte à la fois le transfert de charge et la cinétique de médiation [34, 35].

Notons ici que le coefficient de diffusion apparent des électrons dépend également de la structure du polymère rédox comme nous l'avons vu dans le Chapitre I (page 84). En effet, il varie avec la distance entre complexes d'osmium voisins ainsi qu'avec la distance entre le copolymère et les complexes.

Ainsi nous nous proposons d'optimiser la concentration en osmium du polymère rédox en faisant varier ses conditions de synthèse, l'objectif étant de maximiser la diffusion électronique dans notre hydrogel à base de BOD.

Tout d'abord nous avons testé différentes conditions opératoires pour le couplage du PAA-PVI et des complexes d'osmium. Ensuite, nous avons modifié les proportions en acrylamide et vinylimidazole afin de faire varier la composition du copolymère préalablement

au couplage. Les synthèses des médiateurs présentés ici ont été réalisées en collaboration avec Xavier Brilland, technicien en chimie des polymères. Les protocoles de synthèse et de caractérisation de ces polymères sont décrits dans la partie Matériels et Méthodes 2.5.

3.2. Optimisation des conditions de synthèse du polymère rédox

3.2.1. Protocole

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés au protocole de synthèse du polymère afin de l'optimiser : nous avons tout d'abord fait varier les conditions opératoires du couplage du squelette de PAA-PVI et des complexes d'osmium (en utilisant le même copolymère et les mêmes complexes d'osmium à chaque fois). Les protocoles de la synthèse du copolymère et du couplage sont détaillés dans la partie Matériels et Méthodes 2.5.1. Trois polymères rédox ont ainsi été synthétisés avec des concentrations en osmium (C_{RT}) mesurées par ICP-MS variables :

- le polymère rédox A avec un couplage 4h à 160°C : $C_{RT} = 25$ mM,
- le polymère rédox B avec un couplage 1h à 180°C : $C_{RT} = 35$ mM,
- le polymère rédox C avec un couplage 2h à 180°C : $C_{RT} = 58$ mM.

3.2.2. Caractérisation des polymères rédox

3.2.2.1. Caractérisation du copolymère par spectroscopie infrarouge

Le spectre infrarouge du copolymère PAA-PVI final a été réalisé afin de vérifier que la copolymérisation a bien eu lieu (figure II.3.2).

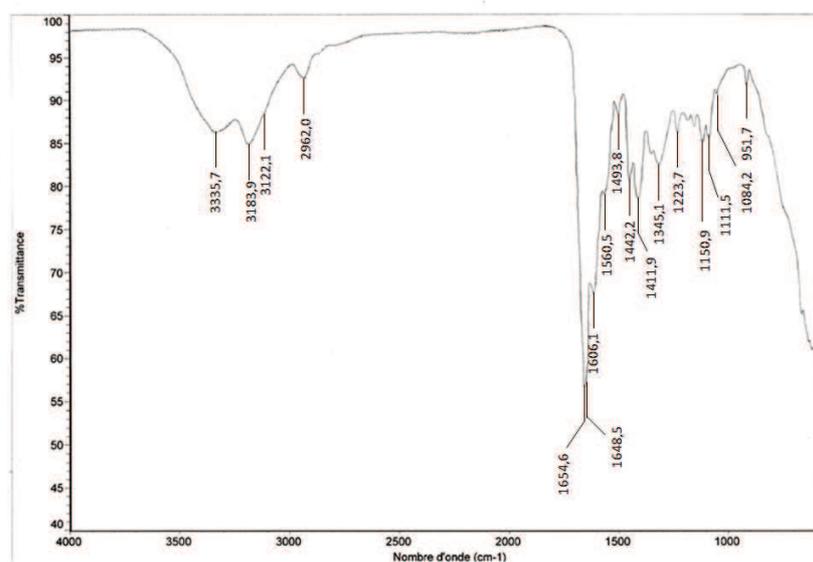


Figure II.3.2 : Spectre infrarouge du PAA-PVI à 10 mg/ml dissout dans l'eau.

Les bandes caractéristiques sont répertoriées et attribuées dans le tableau II.3.1 : nous distinguons les bandes caractéristiques de l'amide ainsi que celles spécifiques de l'imidazole, et l'on retrouve en plus des bandes indiquant la présence de carbones aliphatiques. Il s'agit de la chaîne carbonée polymérisée sur laquelle sont fixés les amides et les imidazoles, montrant ainsi que la copolymérisation s'est bien déroulée.

Longueur d'onde en cm^{-1}	Amide du PAA	Imidazole du PVI	Chaîne carbonée PAA-PVI
3335,7	élongation asymétrique NH_2	-	-
3183,9	élongation symétrique NH_2	-	-
3122,1	-	élongation C-H sp^2	-
2962,0	-	-	élongation C-H sp^3
1654,6	élongation C=O	-	-
1648,5	-	élongation C=C	-
1606,1	-	-	élongation C-C
1560,5	-	déformation N-H	-
1493,8	-	élongation C=C aromatique	-
1442,2	élongation C-N	-	-
1411,9	-	élongation C-N	-
1345,1	cisaillement NH_2	-	-
1223,7	-	élongation C-N hétérocycle	-
1150,9	-	-	cisaillement C-C
1111,5	-	élongation CH	-
1084,2	-	élongation CH	-
951,7	-	-	déformation CH sp^2

Tableau II.3.1 : Analyse du spectre infrarouge du PAA-PVI.

3.2.2.2. Caractérisation du complexe d'osmium par spectrométrie de masse

La structure du complexe d'osmium a été vérifiée par analyse en spectrométrie de masse à temps de vol (TOF-MS). D'après la figure II.3.3 nous voyons que la valeur trouvée de 711,9 g/mol est très proche de la valeur calculée à 711,27 g/mol ce qui confirme la bonne synthèse du complexe rédox.

Les pics annexes trouvés sur le graphe sont dus aux différents isotopes du chlore et de l'osmium. En effet, il existe 3 isotopes naturels du chlore (^{35}Cl , ^{36}Cl et ^{37}Cl) et 7 de l'osmium (^{184}Os , ^{186}Os , ^{187}Os , ^{188}Os , ^{189}Os , ^{190}Os et ^{192}Os) ce qui explique que l'on a plusieurs pics et non un seul.

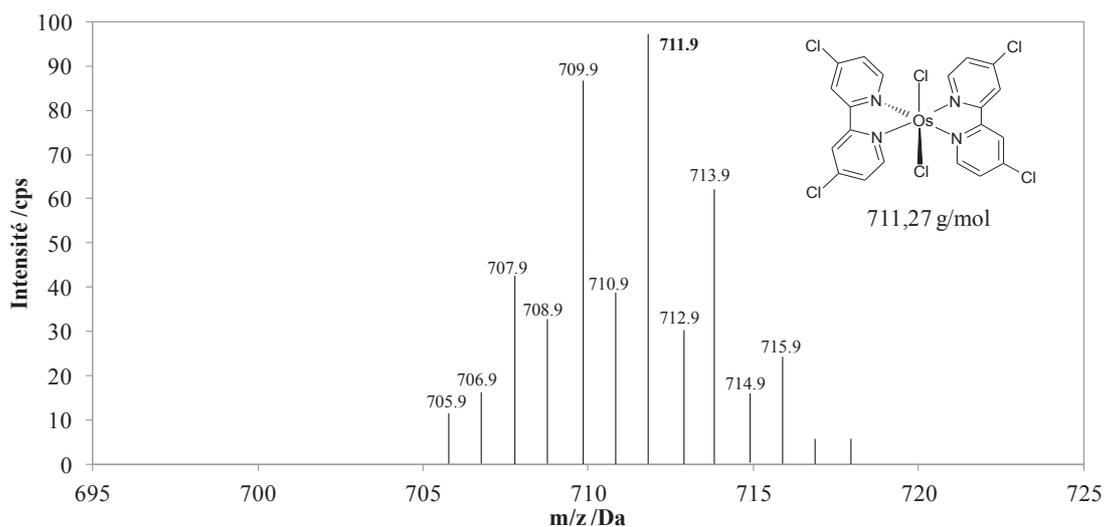


Figure II.3.3 : Spectre du complexe d'osmium obtenu par TOF-MS.

3.2.2.3. Suivi du couplage par électrochimie

Le bon déroulement du couplage entre le copolymère PAA-PVI et les complexes d'osmium est contrôlé dans le temps par électrochimie (mesure faite en solution).

Sur la figure II.3.4 nous pouvons voir l'évolution du signal des complexes d'osmium en fonction du temps de couplage dans l'exemple du médiateur A. Nous observons que le signal maximal est obtenu après 4h de couplage puis il se dégrade, ce qui explique que nous ayons opté pour un couplage de 4h à 160°C. Concernant le couplage réalisé à 180°C (polymères B et C) les signaux obtenus après 1h et 2h étant proches, nous avons décidé de garder les 2.

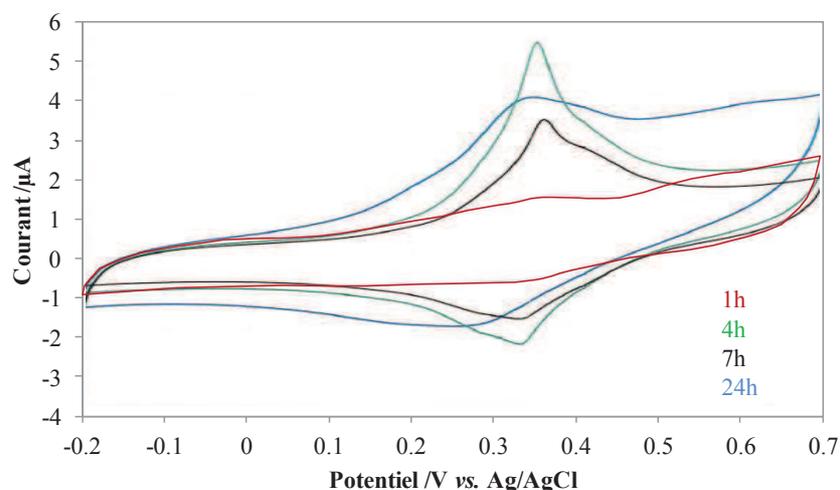


Figure II.3.4 : Voltammogramme cyclique du polymère rédox A après 1h, 4h, 7h ou 24h de couplage à 160°C. Mesure à 50 mV/s, sous air et température ambiante dans du PBS.

3.2.2.4. Electrochimie des polymères rédox avec une concentration en osmium variable

Enfin nous caractérisons le polymère rédox par électrochimie en le déposant sur une électrode de carbone vitreux. Les voltammogrammes cycliques obtenus ont été normalisés par la concentration de chaque médiateur afin de pouvoir les comparer.

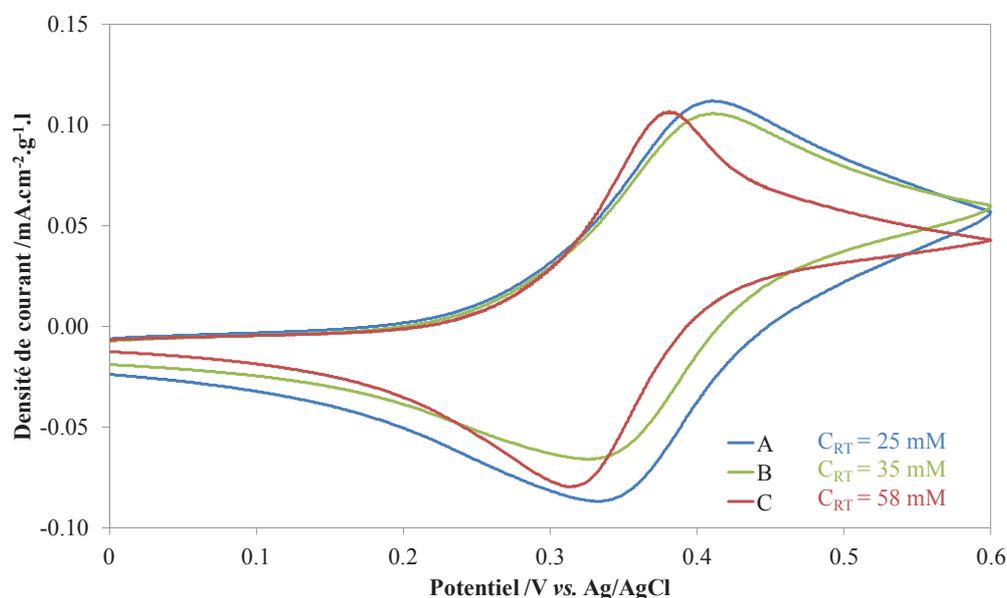


Figure II.3.5 : Voltammogrammes cycliques des polymères seuls sur électrode de carbone vitreux. 2 μ l de polymère rédox déposé puis on laisse sécher 2h à température ambiante. Mesures dans du PBS pH 7,2 à 37,5°C, sans rotation et à 100 mV/s sous Ar.

D'après la figure II.3.5 nous observons que le polymère C nous donne un signal plus réversible et mieux défini. Concernant la concentration en osmium de chacun, les aires sous les pics de réduction sont similaires laissant penser que la teneur en complexes rédox est la même pour les 3 polymères rédox (il s'agit d'une approximation car la vitesse de balayage est assez élevée). Une mesure précise effectuée plus loin dans ce chapitre nous montrera que ce n'est pas le cas.

3.2.3. Performances en électrochimie avec la BOD de *Magnaporthe oryzae*

Ces trois polymères ont été testés en électrochimie au sein d'un hydrogel avec la BOD *Mo*. D'après la figure II.3.6 nous constatons que la formation de l'hydrogel est bien plus efficace avec le polymère rédox C qu'avec le A et le B : soit la connexion entre l'enzyme et le polymère est meilleure, soit la concentration en centres rédox dans le polymère est plus

élevée. Ceci ce traduit par une nette amélioration de la densité de courant qui est multipliée environ par 3 par rapport aux 2 autres polymères.

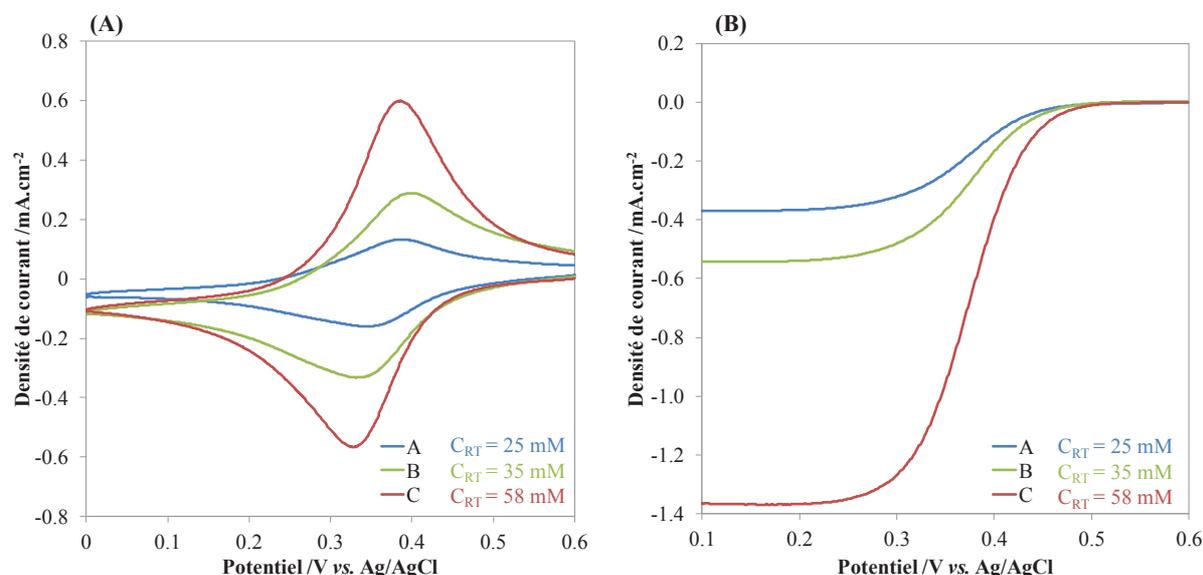


Figure II.3.6 : Voltammogrammes cycliques des hydrogels à base de BOD Mo et de polymère rédox A, B ou C, mesurés dans PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C et 500 rpm (A) à 100 mV/s sous Ar et (B) à 5 mV/s sous O₂.

3.2.4. Calcul du coefficient de diffusion apparent des électrons

Pour expliquer les différences de performances de ces 3 polymères nous avons déterminé leur coefficient de diffusion apparent des électrons D_{app} respectif en utilisant l'équation de Randles Sevcik (équation II.3.1). Nous constatons que le courant de pic i_p varie linéairement avec la racine carrée de la vitesse de balayage v , et la pente de cette droite est proportionnelle au produit $D_{app}^{1/2}C_{RT}$ avec D_{app} (en cm².s⁻¹) et C_{RT} la concentration en centres rédox (en M) :

$$i_p = \frac{0.443nF^{3/2}AD_{app}^{1/2}C_{RT}v^{1/2}}{RT^{1/2}} \quad (\text{Equation II.3.1})$$

avec n le nombre d'électrons transférés, F la constante de Faraday (96485 C.mol⁻¹), A l'aire de l'électrode (en cm²), R la constante de gaz parfait (8,31 J.mol⁻¹.K⁻¹) et T la température (en K).

Les droites obtenues pour chaque polymère rédox sont présentées sur la figure II.3.7. Les concentrations en osmium mesurées par ICP-MS nous ont ensuite permis de calculer les coefficients de diffusion apparents des électrons pour les polymères A, B et C comme nous pouvons le voir dans le tableau II.3.2.

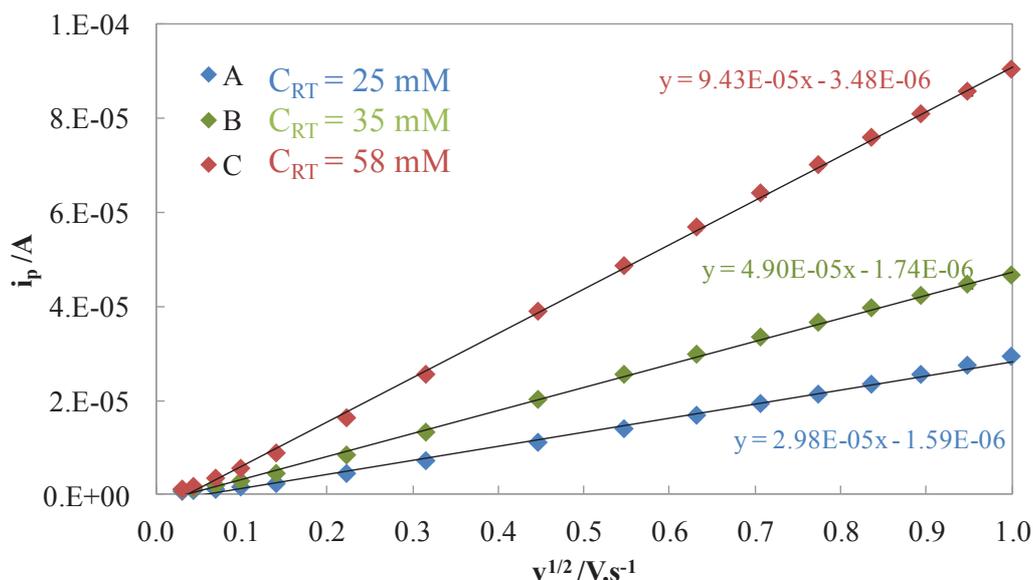


Figure II.3.7 : Evolution du courant en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage pour des hydrogels à base de BOD Mo et de polymère rédox A, B et C. Mesures dans PB 100 mM pH 7,2 et 37,5°C, rotation 500 rpm, sous Ar. Les incertitudes n'apparaissent pas car elles sont trop faibles.

Polymère	C_{RT} (mM)	$C_{RT}D_{app}^{1/2} \times 10^9$ (mol.cm ⁻² .s ^{-1/2})	$D_{app} \times 10^9$ (cm ² .s ⁻¹)
A	25 ± 2	1,60 ± 0,15	4,10 ± 0,10
B	35 ± 2	2,63 ± 0,30	5,65 ± 0,62
C	58 ± 6	5,07 ± 0,80	7,64 ± 0,77

Tableau II.3.2 : Concentration en osmium et coefficient de diffusion apparent des électrons des polymères A, B et C [36].

Tout d'abord nous constatons que l'optimisation des conditions de couplage du copolymère et des complexes rédox nous a permis d'augmenter jusqu'à 2,3 fois la quantité d'osmium greffé. Ceci peut être corrélé avec les voltammogrammes cycliques des hydrogels sous argon (figure II.3.6) : l'augmentation du signal pour les polymères B et C était donc due à la plus grande concentration en osmium que pour le A. A cela s'ajoute la contribution d'une meilleure interaction enzyme/médiateur : en effet, la largeur du pic de réduction à mi-hauteur sous argon est 20% plus faible dans le cas du polymère rédox C par rapport au A et au B.

Il apparait ensuite que le coefficient de diffusion apparent des électrons augmente avec la concentration en complexes d'osmium, expliquant ainsi l'augmentation de la densité de courant observée sur la figure II.3.6.

3.3. Variation de la structure du squelette copolymérique du polymère rédox

3.3.1. Protocole

Dans un second temps, nous avons modifié les proportions de PAA et PVI au sein du copolymère en modifiant les proportions de chacun des monomères lors de la synthèse. Ainsi en augmentant la proportion de PAA, il y a une diminution de la proportion de PVI, c'est-à-dire du nombre de sites de fixation potentiels pour les complexes d'osmium. Le détail du protocole de synthèse est fourni dans la partie Matériels et Méthodes 2.5.1.

Le tableau II.3.2 présente les quantités molaires de chaque monomère introduites initialement pour synthétiser les 4 copolymères et la figure II.3.8 détaille les structures théoriques attendues pour chacun des polymères après greffage des complexes rédox.

Copolymère	n vinylimidazole (mol)	n acrylamide (mol)
1:2	1	2
1:4	1	4,37
1:7	1	7
1:9	1	9

Tableau II.3.3 : Proportions utilisées en monomères pour synthétiser chaque copolymère.

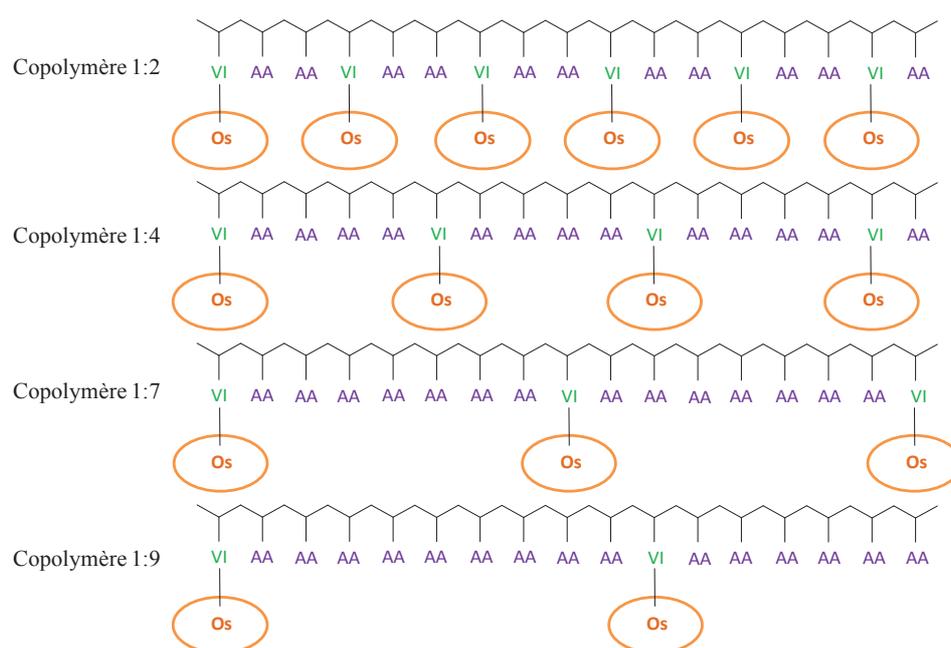


Figure II.3.8 : Structures théoriques des polymères rédox obtenus après greffage des complexes d'osmium sur les différents copolymères.

3.3.2. Caractérisation des copolymères

3.3.2.1. Analyse de la structure des copolymères par spectroscopie infrarouge

La structure des copolymères 1:2 à 1:9 a été étudiée en spectroscopie infrarouge. Nous observons les mêmes bandes caractéristiques que pour le PAA-PVI ayant servi à la synthèse des polymères A, B et C (figure II.3.2).

Cependant les rapports d'intensité entre les différentes bandes ne sont pas suffisamment significatifs pour déterminer avec précision la composition de chaque copolymère. Nous reviendrons dans la partie 3.3.3 sur le calcul précis des proportions de vinylimidazole et d'acrylamide dans chacun des copolymères.

3.3.2.2. Détermination de la taille des copolymères par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion multi-angle de la lumière

Pour cette analyse, chaque copolymère passe dans une colonne de chromatographie d'exclusion stérique : ils vont donc être élués en fonction de leur poids moléculaire. Les plus gros objets sont élués rapidement alors que les plus petits sont retenus dans la colonne.

En sortie de colonne, un détecteur à diffusion multi-angle de la lumière permet de déterminer la taille des molécules éluées car la lumière diffusée par les molécules est directement proportionnelle au produit de leur masse moléculaire moyenne et de leur concentration. La figure II.3.9 présente les signaux de réfraction des 4 copolymères en fonction du temps. Ainsi plus le pic apparaît rapidement, plus les molécules correspondants sont grosses, et inversement. La largeur du pic va quant à elle donner une information sur la répartition des masses : plus le pic est large, plus la distribution des masses est grande.

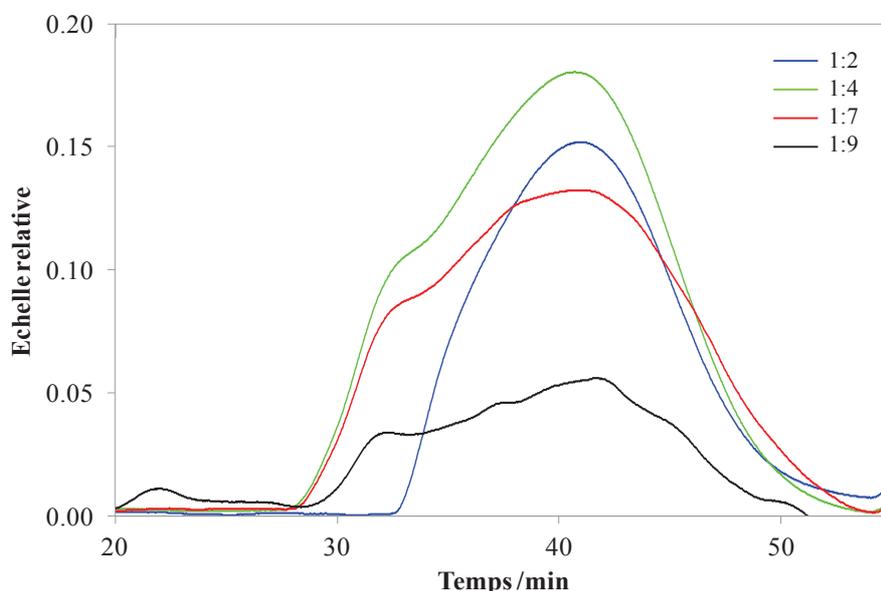


Figure II.3.9 : Chromatogrammes du signal réfractométrique des copolymères 1:2 à 1:9.

Les échantillons 1:4 à 1:9 sont clairement bimodaux, c'est-à-dire qu'ils présentent 2 populations de molécules de tailles différentes contrairement au copolymère 1:2 qui est homogène. Les copolymères étant synthétisés par polymérisation radicalaire, il est

envisageable que cette bimodalité soit liée aux 2 modes de terminaison des chaînes polymériques (recombinaison ou dismutation).

Pour le copolymère 1:9 l'obtention d'un signal très faible s'explique par la perte de matière lors de l'analyse, une partie du copolymère s'étant bloquée dans le filtre avant injection dans la colonne de chromatographie. Ceci signifie que ce copolymère contient soit de très grandes chaînes soit des agrégats.

D'après la figure II.3.9, plusieurs paramètres peuvent être calculés :

- n/dc = incrément de l'indice de réfraction avec la concentration (permet de régler les paramètres de diffusion de la lumière pour un échantillon donné)
- M_n = masse molaire moyenne en nombre de molécules. Elle correspond à la somme des masses molaires pondérées par le nombre de chaînes de chaque longueur.
- M_w = masse molaire moyenne en masse de molécules. Elle est égale à la somme des masses molaires pondérées par la masse de chaînes de chaque longueur.

Ainsi M_n est la moyenne des longueurs des chaînes de polymères alors que M_w exprime qu'une longue chaîne contient davantage de la masse de polymère qu'une chaîne plus petite.

- I_p = indice polymolécularité (ou de dispersion) des masses molaires = M_w/M_n ; un indice situé entre 2 et 4 est caractéristique d'une polymérisation radicalaire, ce qui est le cas ici. Et plus il sera proche de 1 plus la composition du polymère sera homogène.

Au regard des indices de dispersion (Tableau II.3.4) nous constatons des différences dans l'homogénéité en masse et en nombre des médiateurs. Si les copolymères 1:2 et 1:9 sont relativement homogènes avec un indice de dispersion proche de 2, ce n'est pas le cas des copolymères 1:4 et 1:7 qui sont constitués de chaînes de tailles plus variées et plus élevées.

Copolymère	n/dc (ml.g ⁻¹)	M_n (g.mol ⁻¹)	M_w (g.mol ⁻¹)	I_p
1:2	0,165	113 500	222 000	1,96
1:4	0,160	166 000	498 000	3,4
1:7	0,155	126 000	514 000	4,1
1:9	0,154	136 000	330 000	2,4

Tableau II.3.4 : Résumé des paramètres mesurés par diffraction multi-angle de la lumière pour chacun des copolymères.

3.3.2.3. Electrochimie des polymères rédox ayant un squelette variable

Nous avons caractérisé les polymères rédox (seuls) par électrochimie (figure II.3.10). Nous voyons tout d'abord un décalage de potentiel pour les polymères 1:2 et 1:9 par rapport aux polymères 1:4 et 1:9. Ensuite, nous constatons que la concentration en osmium (aire sous le pic de réduction sous argon) ne semble pas suivre l'objectif fixé lors du protocole de synthèse. En effet, en augmentant la proportion d'acrylamide, nous diminuons la proportion de vinylimidazole et donc de sites de fixation de l'osmium. Nous nous attendions donc à avoir une concentration en osmium diminuant du polymère 1:2 au 1:9, ce qui n'est pas le cas.

Il semblerait ainsi que les polymères rédox 1:4 et 1:7 aient une concentration en osmium similaire et supérieure à celle des polymères rédox 1:2 et 1:9. Ces observations seront confirmées plus loin avec la mesure exacte des concentrations en osmium dans chaque polymère.

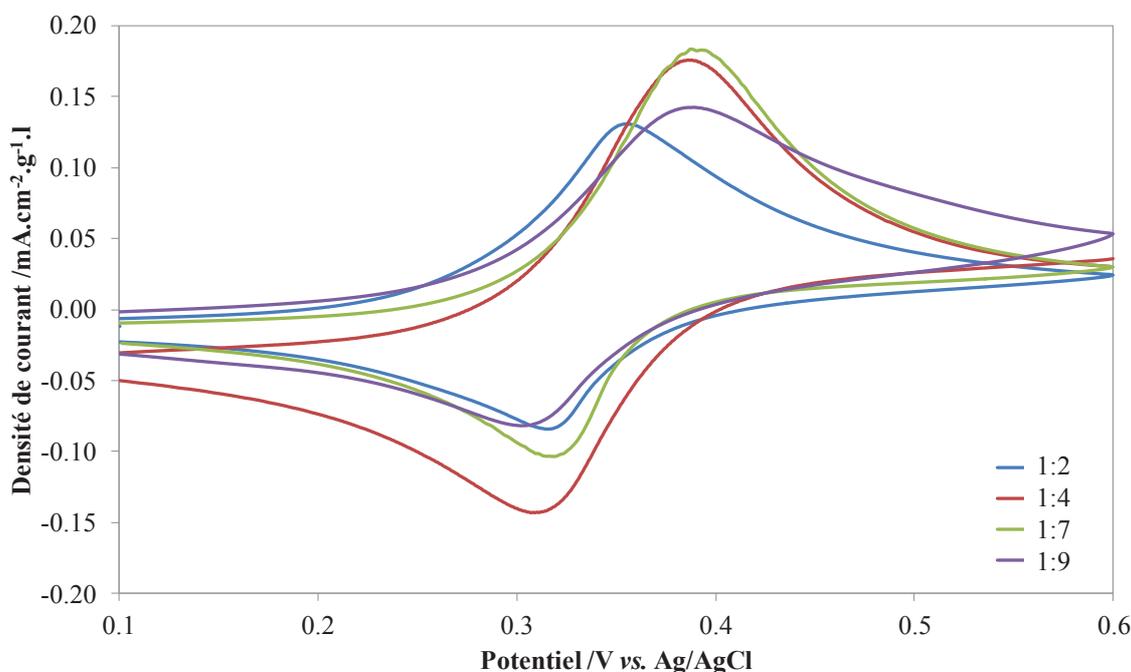


Figure II.3.10 : Voltammogrammes cycliques des polymères rédox seuls sur électrode de carbone vitreux, mesurés dans PBS pH 7,2 à 37,5°C, sans rotation à 100 mV/s sous Ar.

3.3.3. Détermination de la composition des copolymères par l'équation de Mayo-Lewis

3.3.3.1. Principe

La copolymérisation peut se faire de différentes façons selon l'enchaînement des monomères (notés A et B) : à chaque addition d'un nouveau monomère, il y a quatre possibilités d'assemblage comme indiqué sur la figure II.3.11.

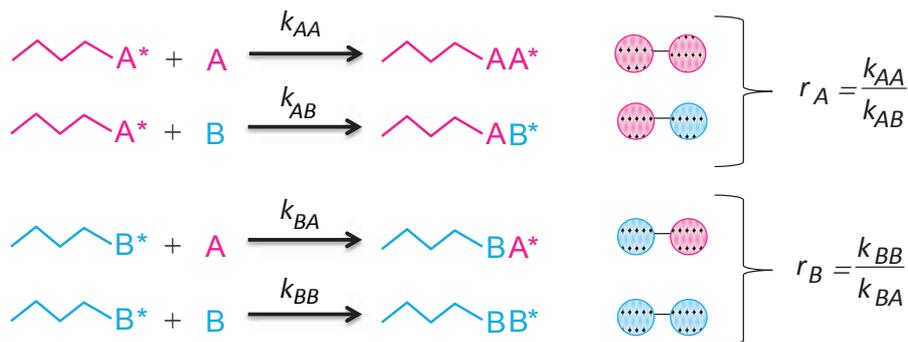


Figure II.3.11 : Les quatre possibilités d'une copolymérisation en chaîne, k désignant la constante de vitesse de chaque réaction et r_A et r_B étant les rapports de réactivité pour chaque monomère vis-à-vis de l'autre et de lui-même.

La composition d'un copolymère peut être prédite par l'équation de Mayo-Lewis [37, 38] à partir des fractions molaires initiales (f_A et f_B) et finales (F_A et F_B) de chacun des monomères ainsi que de leur rapport de réactivité (r_A et r_B) :

$$\frac{F_A}{F_B} = \frac{f_A(r_A f_A + f_B)}{f_B(r_B f_B + f_A)} \quad (\text{Equation II.3.2})$$

chacun des termes étant détaillés ci-après :

$$f_A = 1 - f_B = \frac{[A]}{[A] + [B]} \quad F_A = 1 - F_B = \frac{d[A]}{d[A] + d[B]}$$

avec $[A]$ et $[B]$ les concentrations molaires des monomères A et B introduits au début de la polymérisation et $d[A]$ et $d[B]$ les concentrations molaires en monomères consommés pendant la réaction, c'est-à-dire les concentrations finales en monomères A et B au sein du copolymère.

Les valeurs des rapports de réactivité r_A et r_B sont cruciales car elles nous donnent une indication sur la composition du copolymère :

- r_A et $r_B \ll 1$ Chaque monomère réagit préférentiellement sur l'autre
Copolymère alterné
- r_A et $r_B \sim 1$ Chaque monomère réagit indistinctement sur l'un ou l'autre
Copolymère statistique
- $r_A > 1, r_B < 1$ Les 2 monomères réagissent sur le monomère A
Copolymère « majoritaire »
- r_A et $r_B > 1$ Chaque monomère réagit sur lui-même
2 polymères distincts

Pour la détermination de r_A et r_B , deux méthodes sont possibles :

- en exploitant l'équation de Mayo-Lewis, on aboutit à l'équation suivante :

$$r_B = \left[\left(\frac{f_A}{f_B} \right)^2 \frac{F_B}{F_A} \right] r_A + \frac{f_A}{f_B} \left(\frac{F_B}{F_A} - 1 \right) \quad (\text{Equation II.3.3})$$

On trace pour chaque copolymère une droite de pente $\left[\left(\frac{f_A}{f_B} \right)^2 \frac{F_B}{F_A} \right]$ et d'ordonnée à l'origine $\frac{f_A}{f_B} \left(\frac{F_B}{F_A} - 1 \right)$. Normalement, toutes les droites doivent être concourantes en un seul point de coordonnées (r_A, r_B) , ce qui n'est généralement pas ou peu observé. Le plus souvent les droites s'entrecroisent dans une zone qui détermine l'intervalle dans lequel se situent r_A et r_B .

- il est également possible d'utiliser la méthode de Fineman Ross, plus précise que la précédente. En notant $x = \frac{f_A}{f_B}$ et $y = \frac{F_A}{F_B}$ alors l'équation de Mayo-Lewis devient :

$$x - \frac{x}{y} = r_A \frac{x^2}{y} - r_B \quad (\text{Equation II.3.4})$$

Cette équation est celle d'une droite dont la pente est égale à r_A et l'ordonnée à l'origine est égale à r_B .

3.3.3.2. Application

La teneur en acrylamide et vinylimidazole de chaque copolymère synthétisé a été évaluée par analyse élémentaire des atomes d'oxygène et d'azote. Cependant les échantillons étant fortement hydratés même après séchage, nous avons obtenu des valeurs incohérentes. En effet le % d'oxygène était bien supérieur au pourcentage d'azote, signe de la présence de molécules d'eau en quantité indéterminée. De même, les spectres IR présentés ci-avant ne permettent pas de déterminer les proportions de chaque motif dans le copolymère.

Des analyses ont finalement été faites en spectroscopie UV-visible, donnant cette fois des résultats exploitables, le spectre de l'imidazole servant de référence au dosage du PVI dans les copolymères. Nous voyons que l'imidazole a une absorbance maximale à 206 nm, cependant au niveau des copolymères à cette longueur d'onde nous avons la contribution de l'absorbance de l'amide du PAA qui est maximale à 195 nm [39]. Nous nous sommes donc placés à 210 nm pour comparer les absorbances des copolymères à l'imidazole réalisés dans les mêmes conditions opératoires (figure II.3.12).

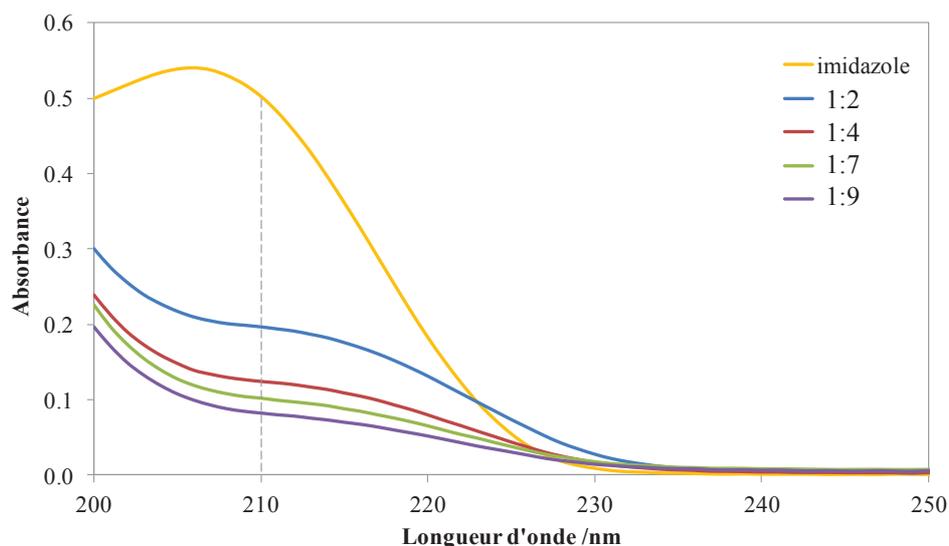


Figure II.3.12 : Spectres d'absorbance UV de l'imidazole et des copolymères 1:2 à 1:9 à 17 ng/ml dans de l'eau.

Le rapport d'absorbance entre les copolymères et l'imidazole nous a permis de calculer les proportions de polyvinylimidazole dans chacun. Nous avons ainsi pu déterminer les fractions molaires réelles en vinylimidazole et acrylamide dans chaque copolymère comme présenté dans le tableau II.3.5.

Copolymère	f_{AA}	f_{VI}	F_{AA}	F_{VI}
1:2	0,67	0,33	0,66	0,34
1:4	0,81	0,19	0,82	0,18
1:7	0,88	0,13	0,85	0,15
1:9	0,90	0,10	0,88	0,12

Tableau II.3.5 : Fractions molaires initiales (f) et finales (F) en acrylamide et vinylimidazole dans les copolymères 1:2, 1:4, 1:7 et 1:9.

Les valeurs de r_{AA} et r_{VI} ont ensuite été obtenues par résolution graphique (figure II.3.13). La méthode de Mayo-Lewis nous donne un intervalle allant de 0,5 à 1,2 pour r_{AA} et de -1,8 à 2 pour r_{VI} . Ces résultats ont été affinés grâce à la méthode de Fineman Ross qui nous a donc permis de déterminer : $r_{AA} = 0,7112$ et $r_{VI} = 0,1335$.

Les valeurs de r_{AA} et r_{VI} étant inférieures à 1, nous en concluons que les copolymères formés ainsi ont une structure alternée. Ils présentent donc une répartition homogène des unités d'acrylamide et de vinylimidazole ce qui assurera, après couplage, une bonne distribution des complexes d'osmium nécessaire à une diffusion électronique efficace.

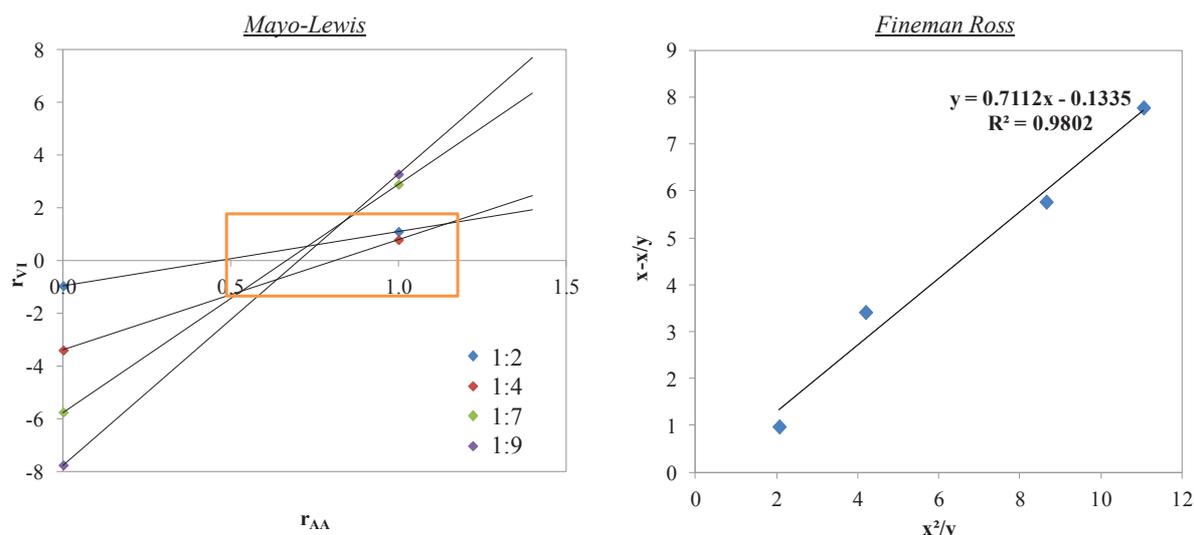


Figure II.3.13 : Détermination graphique de r_{AA} et r_{VI} par les méthodes de Mayo-Lewis et Fineman Ross. Le rectangle orange désigne la zone de délimitation des valeurs de r_{AA} et r_{VI} déterminée par l'entrecroisement des différentes droites.

Les recherches bibliographiques sur la structure des copolymères PAA-PVI ne nous ont pas permis de trouver les rapports de réactivité correspondants que nous aurions pu comparer aux nôtres. Seul un livre mentionne que les rapports de réactivité caractéristiques des PAA-PVI sont inférieurs à 1 donnant des copolymères alternés [40].

De plus, nous avons trouvé une seule publication résumant les fractions molaires de monomères initiales et finales dans le copolymère PAA-PVI [41]. Bien que les conditions opératoires ne soient pas strictement identiques, il s'agit comme pour nous d'une copolymérisation radicalaire en milieu organique entre l'acrylamide et le vinylimidazole. Nous avons calculé les rapports de réactivité avec les données fournies dans cet article et nous avons trouvé :

- par la méthode Mayo-Lewis : $0 < r_{AA} < 2,5$ et $0,03 < r_{VI} < 0,5$
- par la méthode Fineman-Ross : $r_{AA} = 0,8896$ et $r_{VI} = 0,1593$

Ces résultats sont proches de ceux que nous avons trouvés pour nos copolymères et confirment que la copolymérisation radicalaire de l'acrylamide et du vinylimidazole permet de synthétiser des copolymères alternés.

3.3.4. Mesure de la concentration en complexes d'osmium

Les concentrations en complexes d'osmium fixés sur les différents copolymères ont été mesurées par ICP-OES ainsi que par ICP-MS (tableau II.3.6), l'analyse se faisant soit par spectrométrie d'émission optique (OES) soit par spectrométrie de masse (SM).

Nous constatons que les concentrations en complexes d'osmium sont plus faibles d'un ordre de grandeur par rapport à celles qui ont été mesurées pour les polymères A, B et C. (notons que les premières mesures ont été réalisées aux Etats-Unis et les suivantes en France).

Polymère rédox	C_{RT} (mM) mesurée par :	
	ICP-OES	ICP-MS
1:2	2,34 ± 0,09	1,79
1:4	4,84 ± 0,14	4,42
1:7	4,70 ± 0,04	4,42
1:9	2,66 ± 0,04	2,47

Tableau II.3.6 : Concentrations en complexes d'osmium pour les polymères rédox 1:2 à 1:9 mesurées par ICP-OES et ICP-MS.

En redosant les complexes d'osmium dans le polymère B avec les techniques ayant servi pour les polymères 1:2 à 1:9, nous trouvons cette fois une concentration de 2,21 mM au lieu de 35 mM : le D_{app} alors calculé est aberrant car il est du même ordre de grandeur que la diffusion des ions libres en solution ($>10^{-6} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

Nous avons donc choisi d'évaluer la concentration en osmium de chaque polymère rédox à partir de l'aire sous le pic de réduction sous argon à 5 mV/s et nous trouvons cette fois des valeurs plus cohérentes et comparables au premier dosage (tableau III.3.7).

Polymère rédox	C_{RT} (mM)
1:2	66 ± 4
1:4	146 ± 6
1:7	115 ± 6
1:9	54 ± 5

Tableau II.3.7 : Concentrations en complexes d'osmium pour les polymères rédox 1:2 à 1:9 mesurées à partir de l'aire sous le pic de réduction sous argon à 5 mV/s.

La valeur trouvée pour le polymère rédox 1:2 ne suit pas la logique voulue lors de la synthèse : ce médiateur contient la plus grande proportion de vinylimidazole et devrait donc présenter la plus grande concentration en complexes d'osmium. Cependant la grande quantité de motifs imidazole dans le copolymère entraîne un fort encombrement stérique, certainement défavorable à la fixation des osmiums lors du couplage.

3.3.5. Performances en électrochimie

3.3.5.1. Avec la BOD de *Magnaporthe oryzae*

Les 4 polymères rédox ont été testés avec la BOD *Mo* par préparation d'hydrogels dont le détail est fourni dans la partie Matériels et Méthodes 2.5.2.3.

D'après la figure II.3.14.A, nous constatons une nette différence dans les signaux des polymères mesurés sous argon à 100 mV/s (la même chose est obtenue à 5 mV/s) ce qui est en accord avec les concentrations en osmium déterminées ci-avant (tableau II.3.7).

Concernant la catalyse, le polymère rédox 1:2 donne une densité de courant très faible ($-0,28 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$). Les polymères 1:4 et 1:7 ont à peu près la même efficacité ($\sim 1,5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$) et le polymère 1:9, bien qu'ayant apparemment une faible teneur en complexes d'osmium, permet d'atteindre $1,8 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$. Ceci peut en partie être expliqué par la meilleure interaction enzyme/polymère : en effet, la largeur à mi hauteur du pic de réduction sous argon diminue progressivement du polymère 1:2 au 1:9 (de 0,15 à 0,10 V).

Enfin, nous observons un faible décalage du potentiel d'environ 30 mV (également visible sous argon) : comme la structure du copolymère et la concentration en complexes d'osmium sont modifiées, il doit probablement se former une interaction particulière entre l'enzyme et le polymère rédox à l'origine de ce décalage de potentiel.

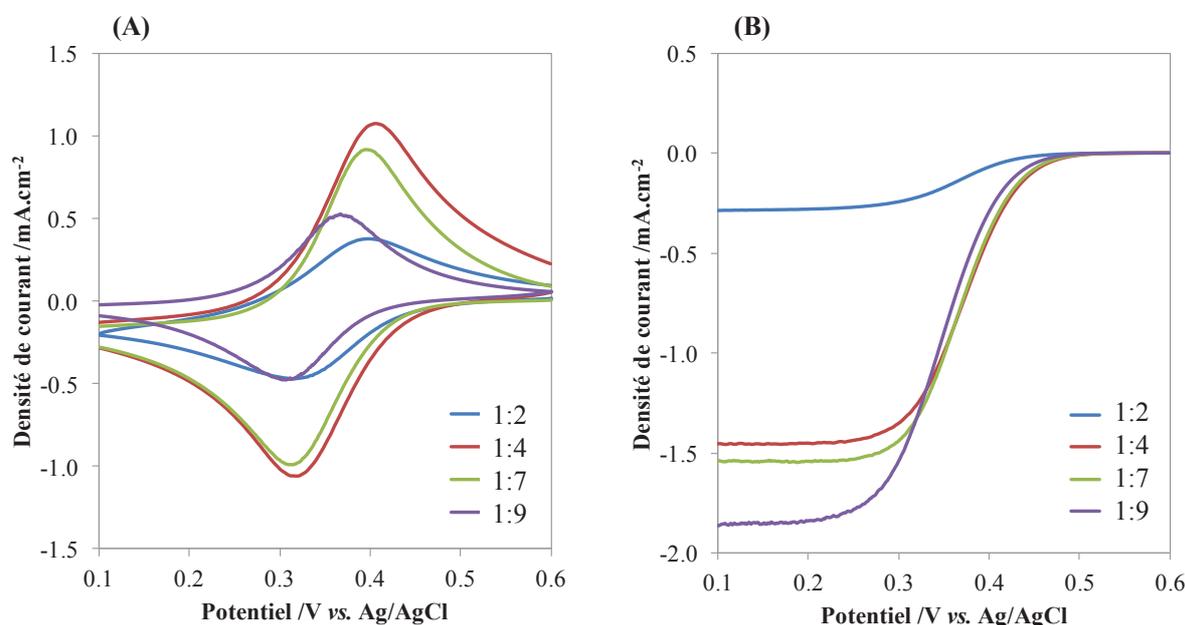


Figure II.3.14 : Voltammogrammes cycliques des hydrogels à base de BOD *Mo* et de polymère rédox 1:2, 1:4, 1:7 ou 1:9, mesurés dans PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C et 500 rpm, (A) à 100 mV/s sous Ar et (B) à 5 mV/s sous O₂.

L'interaction avec l'enzyme étant déterminante dans l'efficacité du médiateur, nous avons ensuite réalisée la même expérience que ci-dessus mais avec la BOD *Bp*.

3.3.5.2. Avec la BOD de *Bacillus pumilus*

3.3.5.2.1. Optimisation des conditions de séchage de la BOD de *Bacillus pumilus*

Les conditions de production de la BOD *Bp* ont été nettement améliorées depuis la publication de Durand et al en 2012 [3]. A la place des bactéries BL21, ce sont les bactéries Origami DE3 qui sont utilisées pour produire la BOD. Elles vont favoriser la formation de ponts disulfure au sein de l'enzyme car leur milieu cytoplasmique est plus réducteur. De plus des protéines chaperonnes sont également utilisées pour améliorer le repliement des enzymes et augmenter la quantité produite. Ainsi, la production est passée d'environ 3-4mg d'enzyme avec une activité de 300 U/mg à 20mg d'enzyme à 700 U/mg [42].

Afin d'être sûrs que les conditions utilisées sont optimales nous avons étudié à nouveau l'influence du séchage de l'hydrogel sur son activité, par comparaison avec les résultats de Suraniti et al [15]. Nous avons ainsi fait sécher l'hydrogel à base de BOD *Bp* et de polymère rédox 1:2 soit 18h à 4°C soit 4h à 25°C (figure II.3.15).

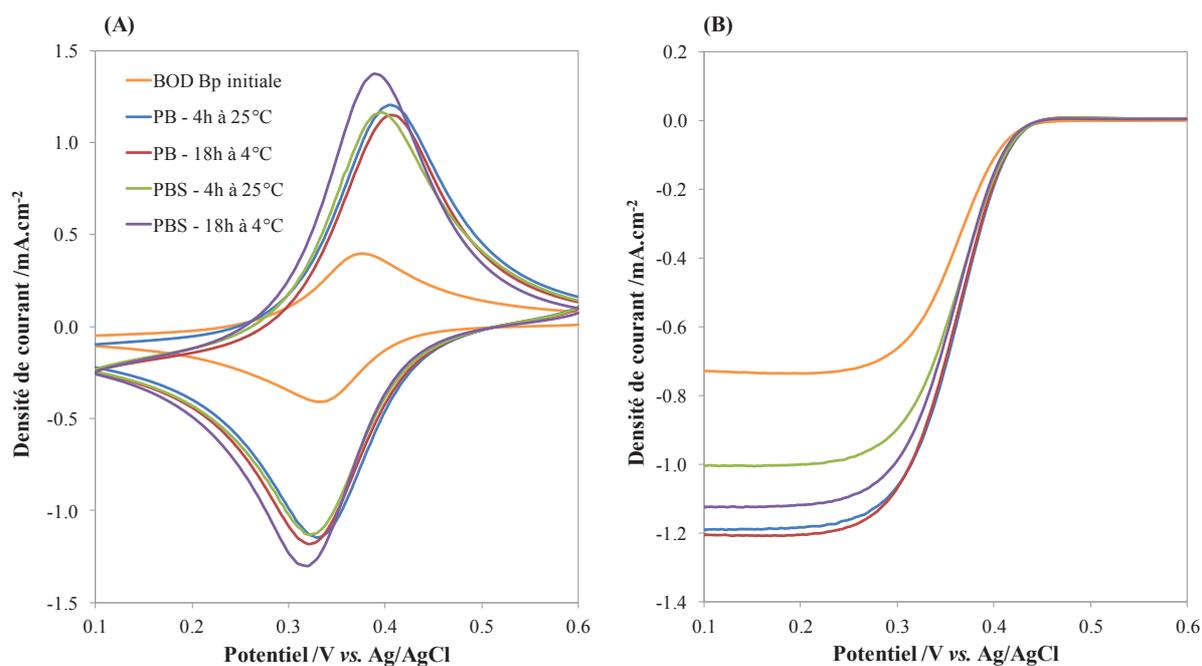


Figure II.3.15 : Densité de courant en fonction des conditions de séchage (18h à 4°C et 4h à 25°C) et du tampon (PB 100 mM vs PBS, pH 7,2). Taux de recouvrement de 108 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; 30% BOD *Bp*, 62,6% polymère rédox 1:2, 7,4% PEGDGE. Mesures à 37,5°C et 500 rpm (A) à 100 mV/s sous Ar et (B) à 5 mV/s sous O_2 .

Comme le montre la figure II.3.15, le comportement de l'hydrogel en fonction du séchage a changé, la densité de courant maximale étant maintenant obtenue pour un séchage de 18h à 4°C (courbe rouge), quel que soit le tampon de mesure.

De plus le courant de réduction est meilleur dans le PB que dans le PBS alors que dans le cas de la BOD *Bp* produite selon l'ancien protocole nous avons environ 15% de densité de courant en moins dans le PB. Il semblerait que l'enzyme soit certes plus active mais également plus sensible au chlore. Des études complémentaires sont actuellement en cours pour expliquer cette variation dans le comportement de l'enzyme.

Enfin, si l'on compare les densités de courant sous argon dans les mêmes conditions (séchage 4h à 25°C et mesure dans le PBS) pour la nouvelle BOD *Bp* (courbe verte) et l'ancienne BOD *Bp* (courbe orange), nous constatons une amélioration de la formation de l'hydrogel : l'aire sous le pic de réduction est nettement plus grande donc plus de complexes d'osmium sont connectés, ce qui peut signifier une meilleure interaction avec l'enzyme. En effet, la largeur à mi-hauteur du pic de réduction est plus faible avec la nouvelle BOD *Bp* (0,11 V) qu'avec l'ancienne (0,13 V).

Concernant la densité de courant sous oxygène, la catalyse est également meilleure avec la nouvelle BOD, augmentant de presque 30%.

3.3.5.2.2. Test des polymères rédox avec la BOD de *Bacillus pumilus* en fonction des conditions de séchage et du tampon de mesure

Nous avons ensuite réalisé la même expérience mais avec l'ensemble des nouveaux polymères rédox (1:2, 1:4, 1:7 et 1:9). D'après la figure II.3.16 nous voyons que l'efficacité de l'hydrogel est dépendante du polymère et que l'influence des conditions de séchage et du tampon de mesure varie en fonction de ce polymère. Par exemple, dans le cas du polymère rédox 1:9, la meilleure densité de courant est obtenue pour un séchage 18h à 4°C et une mesure dans le PB 100 mM, alors que dans les mêmes conditions l'hydrogel à base de polymère rédox 1:2 donne la plus mauvaise densité de courant.

La haute influence des paramètres internes (polymère rédox) et externes (séchage, tampon) à l'hydrogel sur ses performances nous montre que les électrodes enzymatiques sont le siège de nombreuses interactions qui modulent la dynamique et l'activité de l'enzyme. Il est donc nécessaire de considérer chaque système dans son ensemble afin de l'exploiter au mieux.

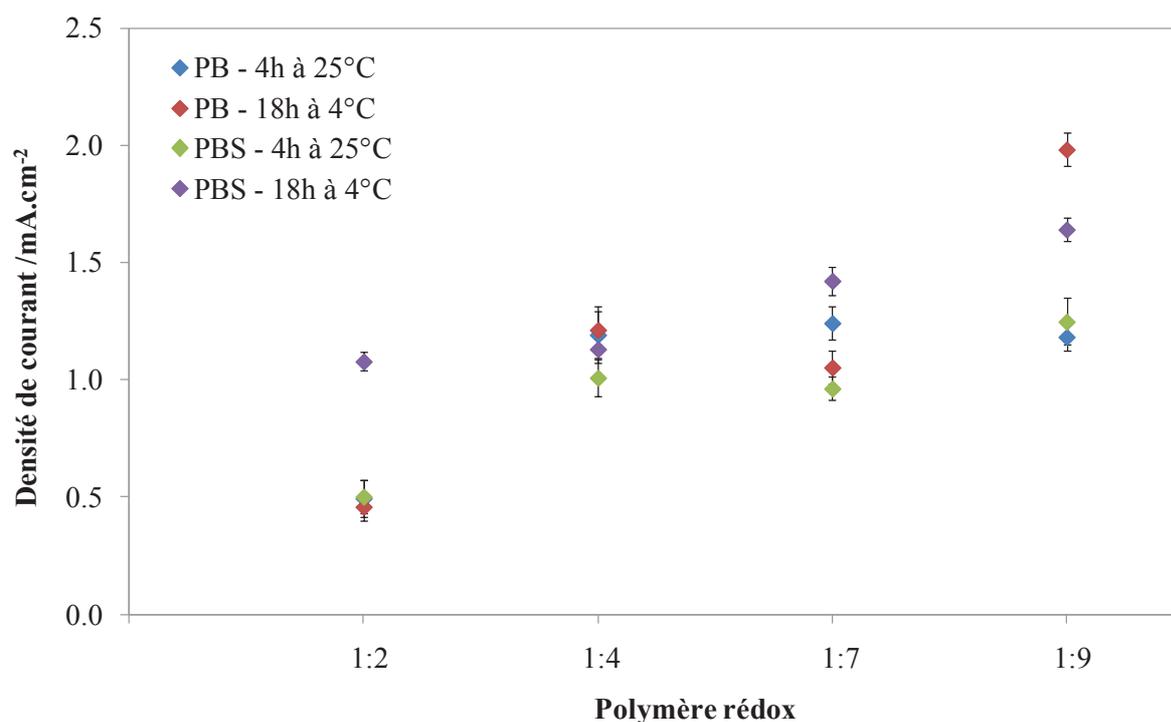


Figure II.3.16 : Densité de courant en fonction du polymère rédox pour différentes conditions de séchage (18h à 4°C et 4h à 25°C) et de mesure (PB 100 mM vs PBS, pH 7,2). Taux de recouvrement de 108 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; 30%*m* BOD *Bp*, 62,6%*m* polymère rédox, 7,4%*m* PEGDGE. Mesures à 5 mV/s sous O_2 à +0,1 V vs. Ag/AgCl, 37°C et 500 rpm.

3.3.5.3. Comparaison des hydrogels à base de BOD de *Magnaporthe oryzae* et de *Bacillus pumilus* en fonction du polymère rédox et du tampon de mesure

Nous nous sommes placés dans les conditions de séchage optimales pour les 2 BODs, c'est-à-dire 18h à 4°C, et nous avons enregistré les densités de courant obtenues avec chaque polymère rédox dans le PB 100 mM.

La tendance observée est globalement la même pour les 2 BODs : la densité de courant est la plus élevée pour le polymère 1:9 et la moins élevée pour le 1:2, les ordres de grandeurs étant similaires. Pour les polymères 1:4 et 1:7, les résultats sont meilleurs avec la BOD *Mo* que la BOD *Bp* : + 20% et + 50% de densité de courant respectivement. Seules les interactions enzyme/polymère particulières dues à la structure spécifique de chaque enzyme permettent d'expliquer les différences observées, toutes les autres conditions étant identiques.

Une hypothèse peut être avancée pour justifier les faibles densités de courant obtenues avec le polymère rédox 1:2 qui est celui contenant la plus grande proportion de vinylimidazole. En effet, nous avons déjà observé que les motifs imidazole et pyridine

pouvaient complexer les cuivres des laccases entraînant une baisse de leur activité catalytique. Il est envisageable que le même phénomène se produise entre la BOD et les imidazoles du polymère rédox 1:2 d'où une faible densité de courant.

Au regard des signaux sous argon, nous observons un décalage de potentiel vers les potentiels réducteurs pour le polymère 1:9. En présence d'oxygène ce décalage n'est visible qu'avec la BOD *Mo*. Peut être que le potentiel de la BOD *Bp* étant plus faible que celui de la BOD *Mo* ce décalage n'est pas observable au niveau de la catalyse.

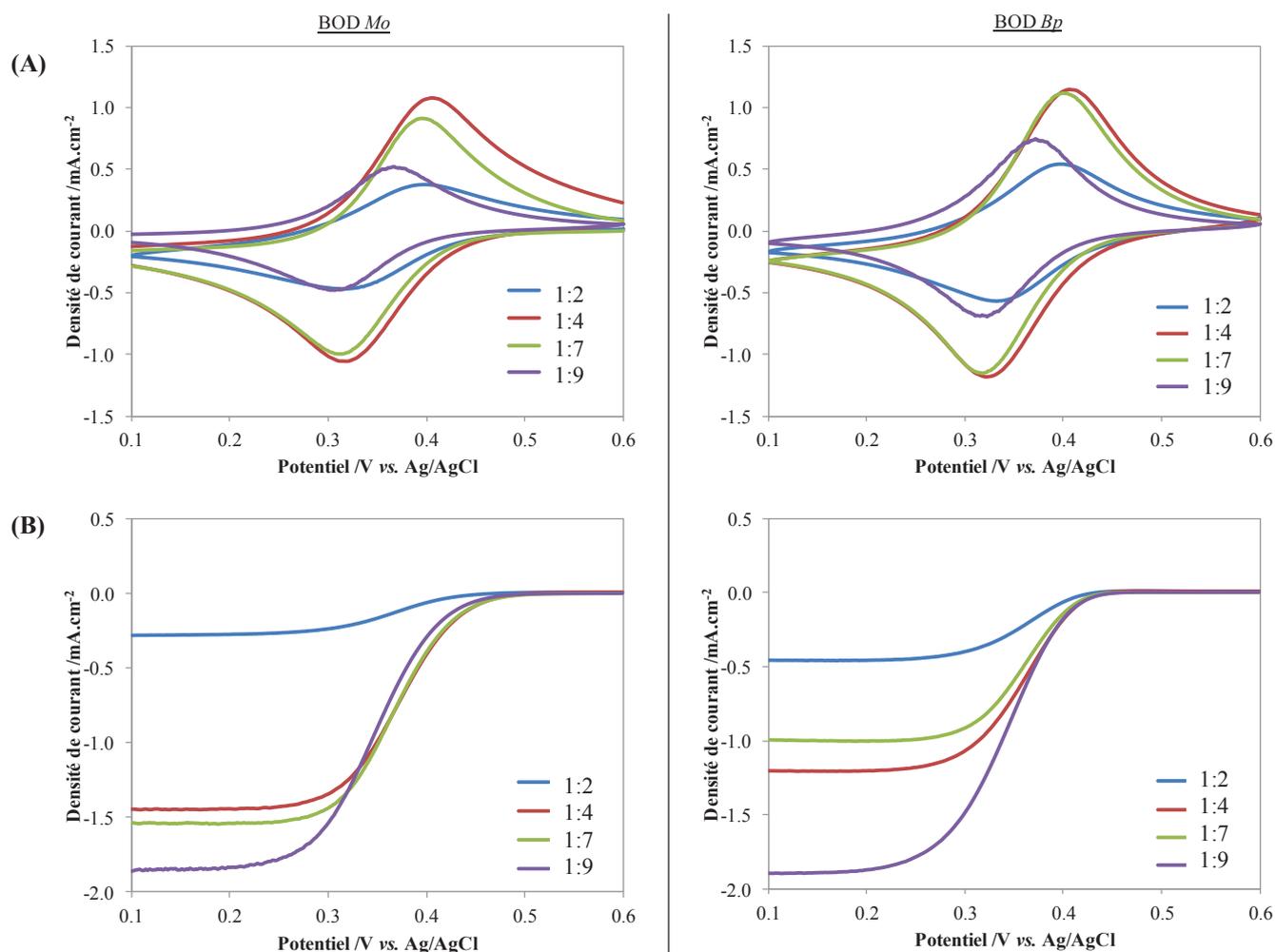


Figure II.3.17 : Densité de courant en fonction du polymère rédox. Taux de recouvrement de $108\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 30%*m* de BOD *Mo* ou *Bp*, 62,6%*m* polymère rédox, 7,4%*m* PEGDGE, séchage 18h à 4°C . Mesures dans PB 100 mM pH 7,2 à $37,5^\circ\text{C}$, 500 rpm, (A) à 100 mV/s sous Ar et (B) à 5 mV/s sous O_2 .

3.3.6. Calcul du coefficient de diffusion apparent des électrons

De même que pour les polymères rédox A, B et C, nous avons mesuré les coefficients de diffusion apparents des électrons pour des hydrogels à base de polymère 1:2, 1:4, 1:7 et 1:9 en utilisant l'équation de Randles-Sevcik. Les mesures des coefficients de diffusion apparents des électrons pour les BODs *Mo* et *Bp* sont présentées sur la figure II.3.18 et dans le tableau II.3.7 ci-après.

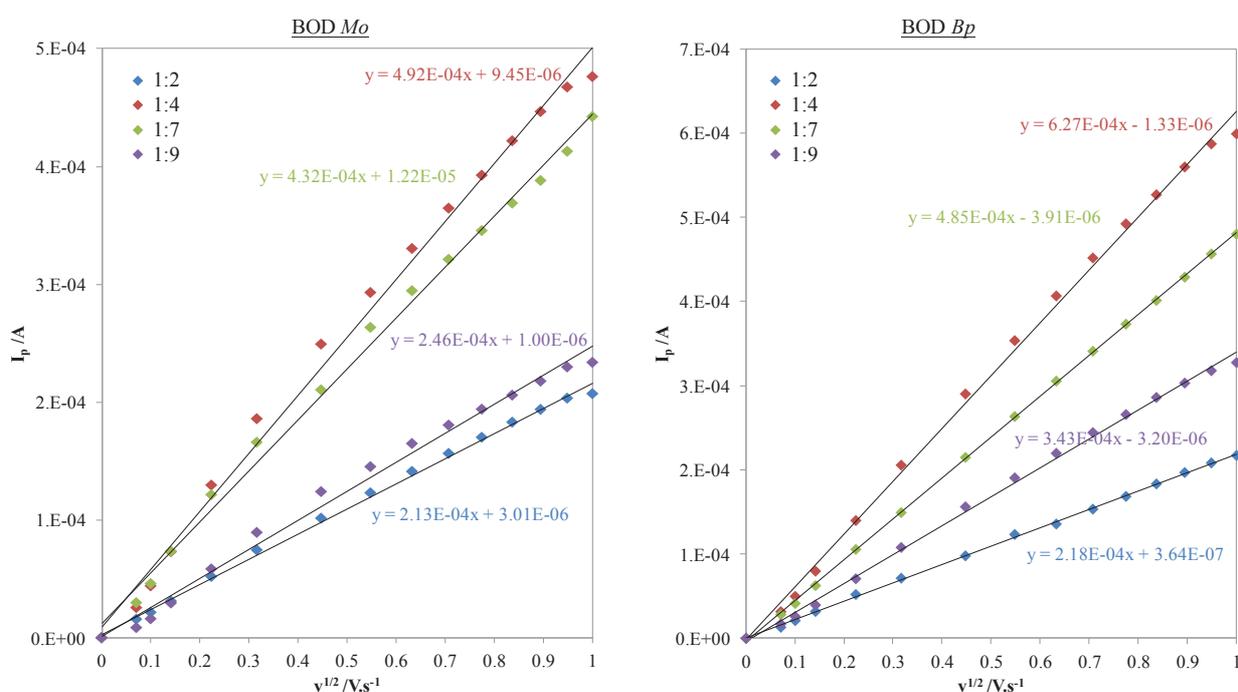


Figure II.3.18 : Evolution du courant en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage pour des hydrogels à base de polymère rédox 1:2, 1:4, 1:7 et 1:9 et de BOD. Conditions comme pour la figure II.3.16. Mesures dans PB 100 mM pH 7,2 et 37,5°C, rotation 500 rpm, sous Ar.

Polymère rédox	C_{RT} (mM)	$C_{RT}D_{app}^{1/2} \times 10^9$ (mol.cm ⁻² .s ^{-1/2})		$D_{app} \times 10^9$ (cm ² .s ⁻¹)	
		BOD <i>Mo</i>	BOD <i>Bp</i>	BOD <i>Mo</i>	BOD <i>Bp</i>
1:2	66 ± 4	4,12 ± 0,12	4,22 ± 0,21	3,90 ± 0,23	4,08 ± 0,08
1:4	146 ± 6	9,52 ± 0,22	12,13 ± 0,16	4,25 ± 0,15	6,90 ± 0,37
1:7	115 ± 6	8,35 ± 0,15	9,38 ± 0,18	5,28 ± 0,34	6,65 ± 0,41
1:9	54 ± 5	4,76 ± 0,18	6,63 ± 0,27	7,76 ± 0,76	15,09 ± 1,40

Tableau II.3.7 : Concentration en osmium et coefficient de diffusion apparent des électrons des polymères rédox 1:2, 1:4, 1:7 et 1:9 avec les BODs *Mo* et *Bp*.

Pour les 2 enzymes, l'évolution du D_{app} semble suivre les densités de courant de la figure II.3.17 : à savoir que plus le coefficient de diffusion apparent des électrons augmente, plus la catalyse est importante. Il n'y a cependant pas de proportionnalité directe entre ces 2 paramètres.

De plus, notons ici que le D_{app} n'est pas strictement proportionnel à la concentration en complexes d'osmium : en effet, dans le cas de la BOD *Bp* avec le polymère 1:9 le D_{app} est multiplié par 2 alors que C_{RT} est divisée par 2 par rapport au polymère 1:7. Ce polymère contenant moins de motifs imidazole, il est possible que la collision entre osmium voisins soit facilitée ce qui améliore donc la diffusion des électrons le long du polymère. Cette amélioration est particulièrement visible avec la BOD *Bp* puisque le coefficient de diffusion apparent des électrons atteint $15,09 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, soit le double de la valeur obtenue avec la BOD *Mo*. Il semblerait donc que la structure de la BOD *Bp* permette une connexion optimale avec le polymère 1:9 entraînant une multiplication du D_{app} et de la densité de courant par 2 par rapport aux polymères 1:4 et 1:7 (alors que le gain n'est que de 30% avec la BOD *Mo*).

Les mêmes mesures ont ensuite été réalisées dans du tampon PBS pour les 2 BODs et l'ensemble des polymères rédox (figure II.3.19) car nous avons vu que cela pouvait avoir une grande influence sur les interactions enzyme/polymère.

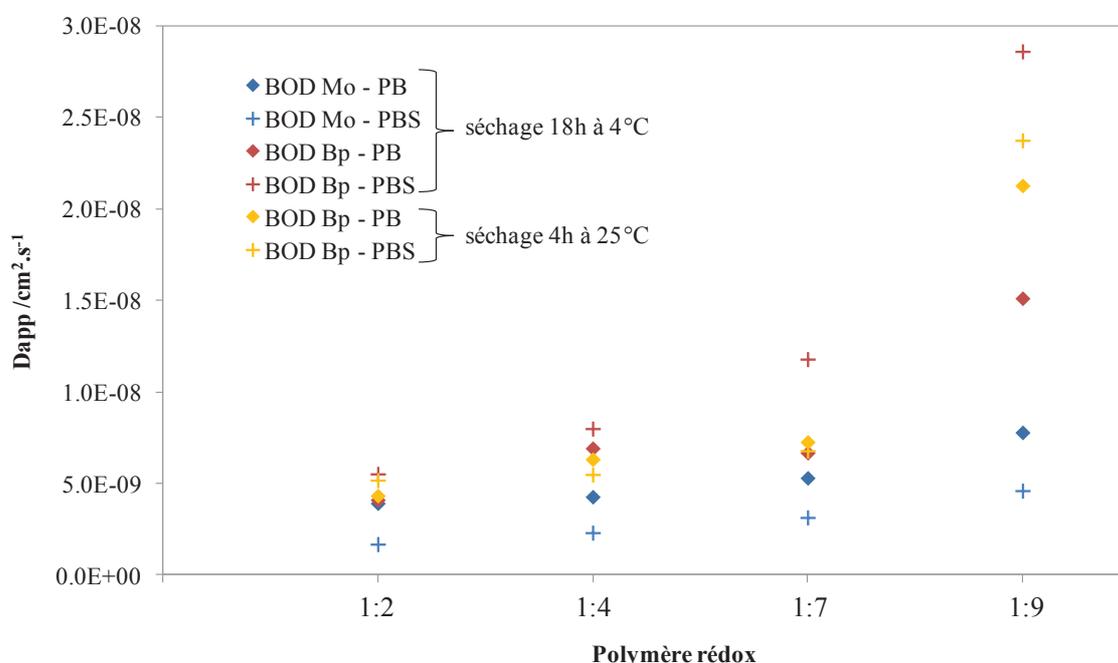


Figure II.3.19 : Résumé des D_{app} pour les BODs Mo et Bp en fonction du tampon de mesure (PB 100 mM ou PBS) et des conditions de séchage (18h à 4°C vs 4h à 25°C).

D'après la figure II.3.19, l'évolution du D_{app} en fonction du polymère est similaire à ce qui a été trouvé dans le PB 100 mM mais avec en moyenne une baisse de 30 à 40% pour la BOD *Mo* et l'ensemble des polymères. Pour la BOD *Bp* nous constatons une nette augmentation du D_{app} pour chaque polymère rédox lorsqu'on se trouve dans le PBS. Comme nous l'avons suggéré plus tôt, il est possible que la présence de chlore, ainsi qu'une conductivité plus élevée améliorent l'interaction entre l'enzyme (BOD *Bp*) et le polymère rédox, facilitant ainsi le transfert électronique de l'un à l'autre. Cependant ce n'est pas le cas avec la BOD *Mo* : il est possible que la présence de chlore dénature l'enzyme ce qui interfère dans son interaction avec les polymères causant une diminution du D_{app} .

Enfin pour la BOD *Bp*, nous constatons encore une fois que les conditions de séchage sont très importantes. Avec un séchage de 4h à 25°C nous observons le même D_{app} dans les 2 tampons (croix et losanges jaunes) alors que pour un séchage de 18h à 4°C une nette augmentation est observée dans le PBS (croix rouges) par rapport au PB (losanges rouges). Il est possible qu'à 25°C la structure de l'enzyme s'altère, ce qui modifie son interaction avec le polymère rédox même si toutes les autres conditions sont optimales (polymère le plus efficace et tampon PBS au lieu de PB).

3.4. Conclusion intermédiaire

Nous avons montré que l'optimisation du polymère rédox est cruciale pour la conception d'une cathode enzymatique efficace en transfert électronique médié. En effet, la catalyse dépend non seulement de la concentration en complexes rédox dans le polymère mais également de sa structure, c'est-à-dire de la proportion de chacun des monomères le constituant dans le cas d'un copolymère.

Pour les polymères A, B et C utilisant le même squelette polymérique, en augmentant la concentration en osmium nous avons pu améliorer le coefficient de diffusion apparent des électrons résultant en un meilleur courant de réduction de l'oxygène.

Concernant les polymères 1:2 à 1:9, nous avons tout d'abord vérifié leur structure : la loi de Mayo-Lewis a confirmé que les copolymères formés étaient de type alterné avec une composition finale très proche de la composition initiale en monomères du milieu réactionnel (f_{AA} et f_{VI} sont respectivement très proches de F_{AA} et F_{VI}). Cependant, l'augmentation de la proportion de vinylimidazole dans le copolymère ne permet pas strictement d'augmenter la concentration en osmium fixés en raison de l'encombrement stérique généré par le grand

nombre de motifs imidazole dans le cas du polymère 1:9. Malgré tout, ce polymère montre un important D_{app} , qui se traduit par une importante augmentation de la densité de courant avec la BOD Bp dans les conditions de séchage et de mesure optimales.

Enfin, nous avons à nouveau démontré que l'efficacité d'une cathode enzymatique réside dans l'optimisation simultanée de différents facteurs internes et externes à l'hydrogel comme notamment les conditions de séchage ou le tampon de mesure.

Pour finir avec l'optimisation de la biocathode nous nous intéresserons dans la partie suivante au matériau même de l'électrode. Du carbone vitreux, nous sommes passés à des fibres d'or poreuses. Dans un premier temps la forme de l'électrode offre une plus grande surface d'échange avec le milieu extérieur. Dans un second temps, la structure macroporeuse permet d'augmenter la surface active de l'électrode et d'immobiliser davantage de biocatalyseur.

Après différentes optimisations, la biocathode a pu être testée en électrochimie dans du tampon ainsi que dans du sang humain, montrant dans les 2 cas une bonne efficacité. De plus, après de nombreux tests démontrant la non-toxicité de notre système, nous avons pu l'implanter dans des souris, confirmant la bonne biocompatibilité de ces électrodes.

4. La fibre d'or poreuse comme électrode

4.1. Synthèse des fibres d'or poreuses

4.1.1. Principe

La préparation des fibres d'or poreuses a été réalisée par Aleksandar Karajic [43], doctorant à l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux, grâce au protocole établi par les travaux de thèse de Samia Ben Ali [44], Rafael Szamocki [45] et Matthias Heim [46].

Dans notre cas, une fibre d'or de 250 μm de diamètre et 2 cm de long est utilisée comme support pour le dépôt de billes de silice de 585 nm de diamètre. Les billes sont déposées de façon organisée en utilisant la technique de Langmuir Blodgett sur laquelle nous reviendrons juste après. Cela permet d'obtenir une matrice de billes de silice dont les espaces vides vont être remplis d'or (ou de tout autre métal) par électrodéposition. Enfin, la dissolution de la matrice par immersion dans l'acide fluorhydrique permet d'obtenir une électrode d'or dont les pores sont interconnectés et ainsi dotée d'une très grande surface active (figure II.4.1).

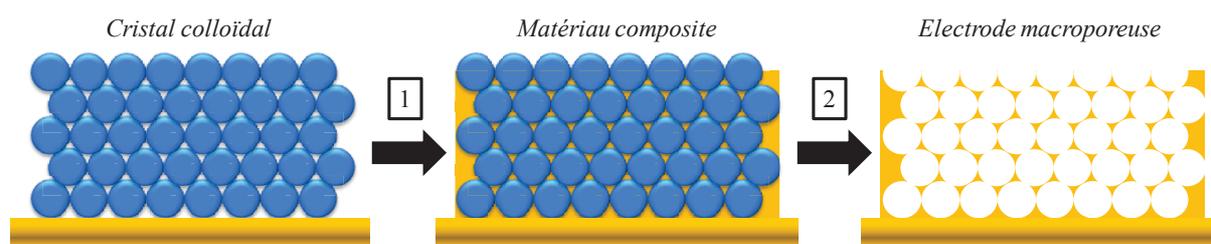


Figure II.4.1 : Etapes de fabrication d'une électrode poreuse à partir du cristal colloïdal obtenu par technique Langmuir-Blodgett. (1) Infiltration d'or par électrodéposition dans les espaces vides du cristal colloïdal puis (2) élimination de la matrice pour obtenir une électrode d'or constituée de macropores interconnectés.

4.1.2. Préparation de la matrice de silice : technique Langmuir Blodgett

Les particules de silice monodisperses sont synthétisées par la méthode Stöber [47]. De l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS) est ajouté à un excès d'eau contenant de l'ammoniac ainsi qu'un alcool de faible poids moléculaire comme l'éthanol. Après agitation, il se forme des particules de silice ayant des diamètres compris entre 50 et 2000 nm. La taille des billes peut être modulée et contrôlée en faisant varier les concentrations en TEOS et ammoniac, le type d'alcool ou encore les proportions de chacun des réactifs [48].

Dans le cadre des travaux présentés ici nous utiliserons des billes ayant un diamètre de 585 nm. Il est également nécessaire de les fonctionnaliser avec des groupements aminopropyltriéthoxysilane (symbolisés par des NH_2 sur la figure II.4.2) pour les stabiliser

lors de la formation du film Langmuir décrite ci-dessous. La diminution du caractère hydrophile des billes permet de les maintenir à la surface de l'eau formant ainsi un film uniforme qui sera appelé film Langmuir-Blodgett.

La technique dite Langmuir-Blodgett est née de la collaboration entre Irving Langmuir et Katherine Burr Blodgett dont les travaux respectifs concernaient l'étude de l'assemblage de molécules amphiphiles à l'interface air-eau et le transfert de ces films monomoléculaires sur des substrats solides. Ce processus est schématisé sur la figure II.4.2 :

- la solution monodisperse de billes de silice fonctionnalisées (en suspension dans un mélange éthanol/chloroforme) est déposée à la surface de l'eau ; cette étape est appelée épendage ;
- pour obtenir un film homogène, les billes sont ensuite compressées très lentement à une vitesse de $20 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ et une pression de $10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$;
- enfin, un substrat solide (fibre d'or dans notre cas) est introduit perpendiculairement au film afin que celui-ci s'y dépose. Il faudra réaliser autant d'aller-retours avec le substrat que l'on désire de couche de billes.

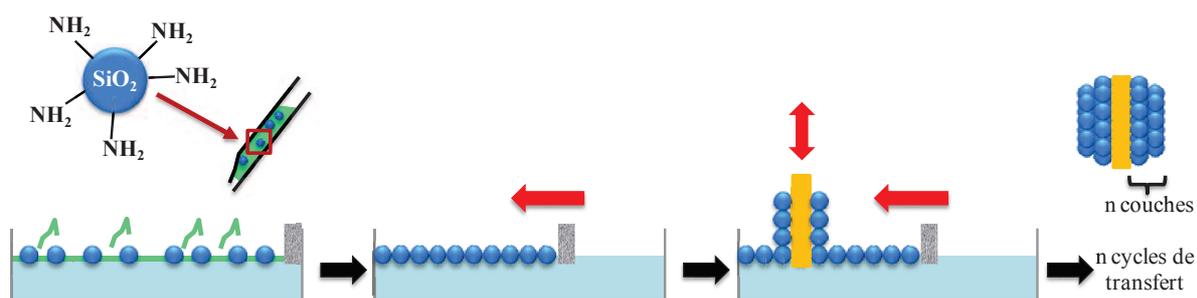


Figure II.4.2 : Schéma en trois étapes de la technique Langmuir-Blodgett utilisée pour la préparation de matrices poreuses.

4.1.3. Electrodeposition d'or

Après obtention de la matrice de silice ordonnée à la surface de la fibre d'or, il faut procéder à l'infiltration d'or dans les espaces disponibles entre les billes par électrodeposition. Ceci peut être effectué de la même manière avec d'autres métaux comme le nickel, le platine ou l'argent le plus souvent, des polymères conducteurs ou même des matériaux semi-conducteurs.

L'électrodeposition est réalisée grâce à un système à 3 électrodes classique utilisant l'électrode d'or avec la matrice colloïdale comme l'électrode de travail et une solution de placage d'or comme électrolyte. En appliquant un potentiel de $-660 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ à l'électrode de travail il est possible de réduire les ions AuSO_3^{2-} en or métallique à sa surface.

Ce processus est suivi par électrochimie en enregistrant les variations de courant en fonction du temps. La présence d'une matrice colloïdale tridimensionnelle entraîne une variation périodique de la surface disponible pour l'électrodéposition ce qui se traduit par les oscillations observées sur la figure II.4.3.A. La valeur absolue du courant atteint un minimum lors du remplissage d'une demi-couche de billes car la surface libre diminue jusqu'au point d'interconnexion des futurs pores et un maximum lorsque l'infiltration d'or atteint une couche pleine car la surface ré-augmente, comme nous pouvons le voir sur la figure II.4.3.B.

Pour l'ensemble des résultats présentés ci-après nous avons opté pour un total de 15 demi-couches d'or, compromis idéal permettant une grande augmentation de surface active tout en garantissant une bonne stabilité de l'électrode. En effet, à partir d'un trop grand nombre de couches de billes, les défauts dans l'organisation des billes se multiplient rendant difficile l'électrodéposition d'or et aboutissant à une structure partiellement non accessible.

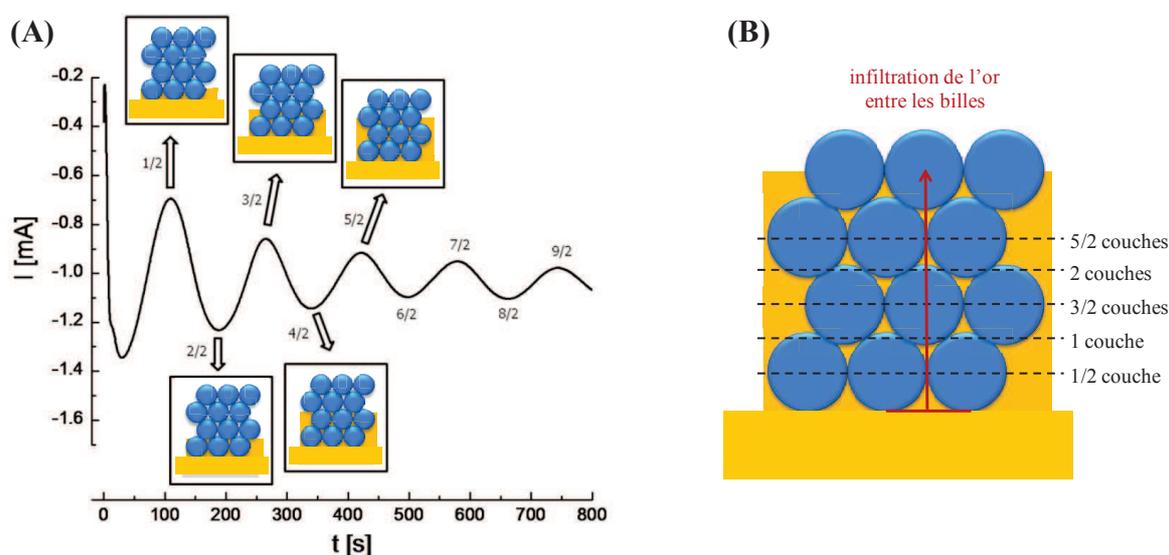


Figure II.4.3 : (A) Oscillations de courant observées lors de l'électrodéposition d'or à $E = -660 \text{ mV}$ dans la matrice de cristal colloïdal. Chaque minimum de valeur absolue de courant correspond à l'infiltration d'une demi-couche d'or dans la matrice alors que les maximums correspondent à des couches pleines. (B) Détail de l'électrodéposition d'or entre les billes de silice.

4.1.4. Caractérisation de la structure des électrodes d'or poreuses

La microscopie électronique à balayage est idéale pour caractériser les différentes étapes de préparation des électrodes d'or poreuses et permet également d'en contrôler la qualité.

Sur la figure II.4.4.A, nous pouvons voir la structure de l'électrode lors des 3 étapes de préparation : tout d'abord l'élaboration de la matrice colloïdale, puis l'infiltration d'or entre de billes de silice et enfin l'électrode poreuses après dissolution de la matrice. La figure II.4.4.B montre la surface d'une fibre d'or poreuse. A fort grossissement il est possible d'observer l'interconnexion entre les pores.

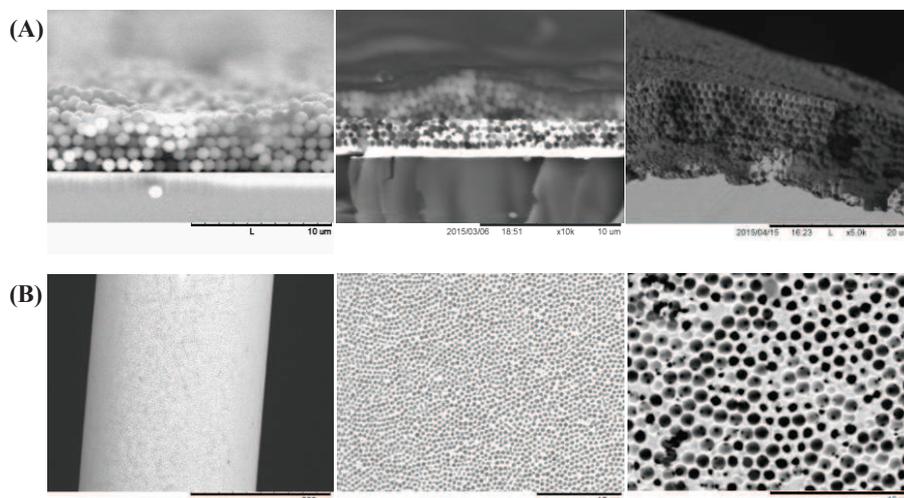


Figure II.4.4 : Clichés de MEB (A) des 3 étapes de préparation des électrodes et (B) de la surface d'une fibre d'or poreuse plusieurs grossissements.

La surface active des électrodes poreuses peut être déterminée par électrochimie. Dans l'acide sulfurique le pic d'oxydation de l'or vers + 0,9 V vs. Ag/AgCl a une aire proportionnelle à la surface d'or électroactive (Matériels et Méthodes 2.9). Sur la figure II.4.5 nous voyons donc la forte augmentation de la surface d'or active due à la présence de pores.

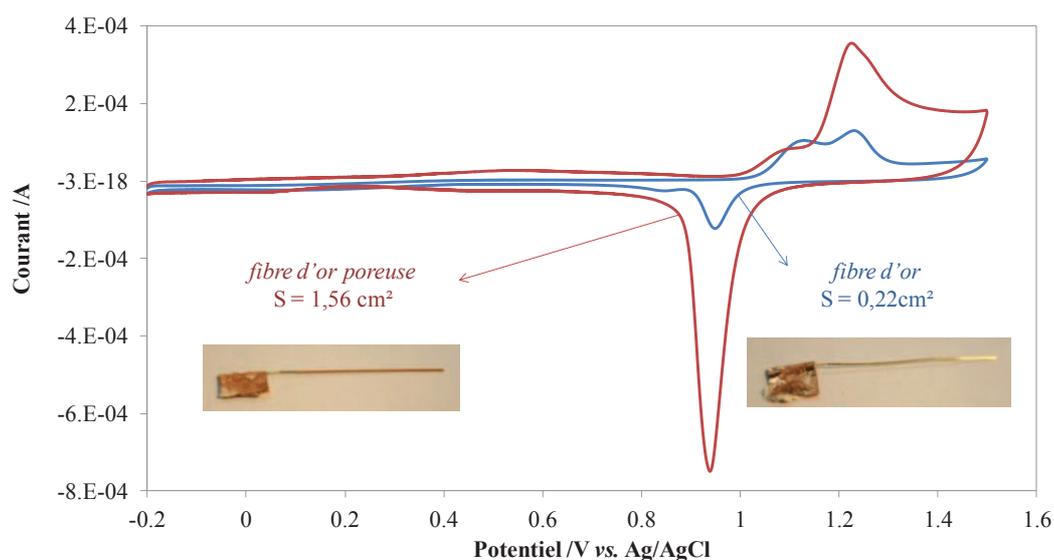


Figure II.4.5 : Voltammogrammes cycliques pour une fibre d'or simple et une poreuse (15/2 couches, diamètre des pores = 585 nm), dans H₂SO₄ 100 mM à 100 mV/s.

4.2. Modification de la fibre d'or et optimisation dans le tampon

4.2.1. Tests préliminaires

Nous avons tout d'abord voulu évaluer les performances de la BOD *Mo* sur ces fibres d'or poreuses en transfert électronique médié et direct. Nous avons donc modifié des fibres d'or poreuses soit avec de l'hydrogel, soit avec de la BOD *Mo* et de l'agent réticulant. Dans ce deuxième cas, l'enzyme et l'agent réticulant (AG) ont été ajoutés simultanément ou bien successivement afin de former une sorte de couche réticulée permettant de maintenir l'enzyme dans les macropores [49]. La préparation de l'hydrogel et des solutions enzymatiques ainsi que la modification des fibres est détaillée dans la partie Matériels et Méthodes 2.6.

D'après la figure II.4.6, nous constatons qu'une meilleure densité de courant est obtenue avec l'hydrogel, certainement due à 2 effets : l'hydrogel permet d'immobiliser plus d'enzymes et de faciliter la connexion entre l'enzyme et l'électrode via le polymère rédox. Pour les fibres modifiées avec l'enzyme et l'agent réticulant, le même résultat est obtenu quel que soit le processus de modification.

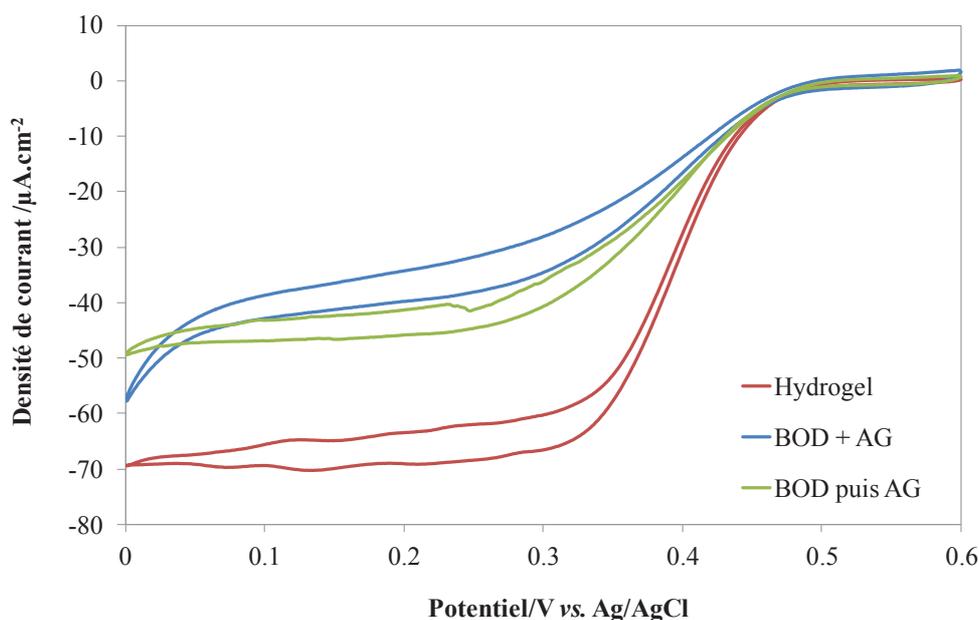


Figure II.4.6 : Voltammogrammes cycliques de fibres d'or poreuses (15/2 couches, diamètre des pores = 585 nm) modifiées avec de l'hydrogel (62,2% polymère rédox + 30% BOD *Mo* + 7,4% PEGDGE ; incubation 1h à 4°C et séchage 18h à 4°C) ou de l'enzyme et de l'agent réticulant (noté AG) en simultané (80% BOD *Mo* + 20% PEGDGE, incubation 1h à 4°C et séchage 2h à 4°C) ou en différé (incubation 1h à 4°C dans une solution de BOD *Mo* à 5 mg/ml dans l'eau et séchage 2h à 4°C puis incubation 3 min à 4°C dans une solution de PEGDGE à 2 mg/ml dans l'eau et séchage 2h à 4°C). Mesures dans du PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C sous O_2 à 5 mV/s.

4.2.2. Effet du traitement plasma

La fibre d'or poreuse a subi un traitement de surface par plasma afin de la rendre hydrophile et faciliter la fixation de l'hydrogel. Ceci est démontré sur la figure II.4.7. où l'on voit que le traitement de surface permet une augmentation de la densité de courant d'environ 30%. Ainsi pour l'ensemble des résultats présentés ci-après, les fibres seront traitées par plasma avant toute modification.

Cependant, nous remarquons que les densités de courant obtenues sont relativement faibles par rapport au graphe précédent. Ceci est dû au fait que les fibres n'ont pas été nettoyées dans l'acide sulfurique juste avant modification. Bien qu'elles soient passées dans l'acide sulfurique à l'issue de la dissolution des billes de silice, il apparaît nécessaire de réitérer cette étape juste avant d'utiliser la fibre afin d'augmenter l'hydrophilicité de l'or et donc l'incorporation et la connexion de l'hydrogel.

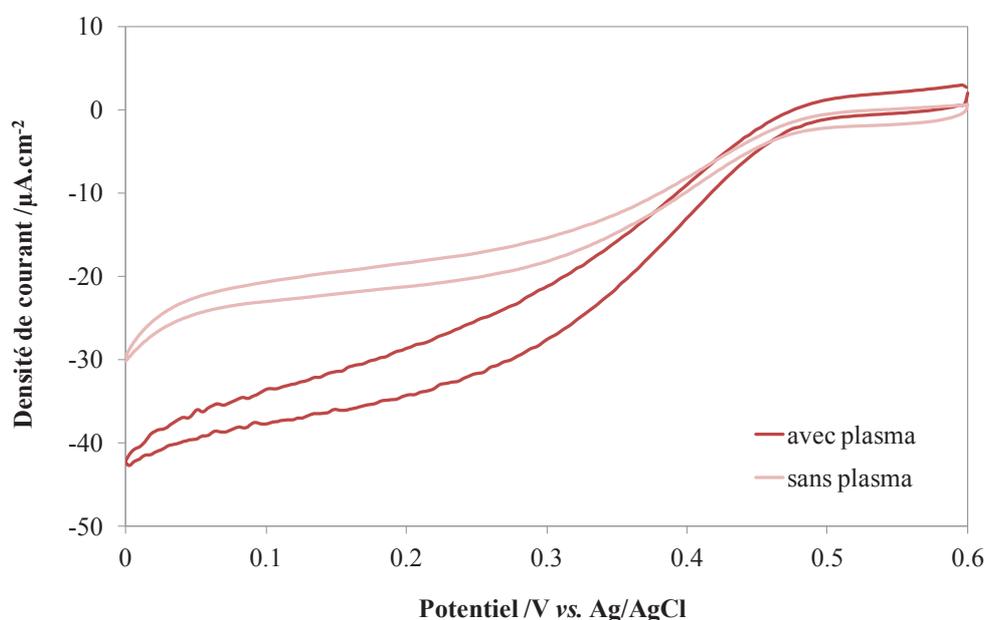


Figure II.4.7 : Voltammogrammes cycliques de fibres d'or poreuses (15/2 couches, diamètre des pores = 585 nm) préalablement ou non traitées au plasma, puis modifiées avec de l'hydrogel (62,2% polymère rédox + 30% BOD Mo + 7,4% PEGDGE), incubation 1h à 4°C et séchage 18h à 4°C. Mesures dans du tampon PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C sous O₂ à 5 mV/s.

4.2.3. Optimisation du temps d'imbibition de solution enzymatique dans les pores

Nous avons à présent fait varier le temps d'incubation des fibres dans les différentes solutions enzymatiques (hydrogel ou BOD + AG) pour déterminer si une durée plus longue pouvait permettre d'augmenter la diffusion de catalyseur dans la structure poreuse.

Comme nous pouvons le voir sur la figure II.4.8, quel que soit le type de modification, la densité de courant augmente largement avec le temps d'imbibition de la fibre dans la solution de catalyseur, ce qui permet bien une meilleure incorporation du catalyseur dans les pores.

Nous avons également fait varier la température d'incubation : pour une même durée, la densité de courant est plus faible à 25°C (courbe verte) qu'à 4°C (courbe bleue). A 4°C l'activité enzymatique est mieux préservée qu'à 25°C ; c'est déjà ce que nous avons constaté lors de l'optimisation des conditions opératoires de la BOD *Mo* (figure II.2.4).

La durée de modification des fibres est donc à partir de maintenant fixée à 24h à 4°C puisque cela permet de doubler la densité de courant par rapport à l'incubation initiale qui était de 1h à 4°C.

De même que précédemment, les faibles densités de courant sont dues au fait que les fibres n'aient pas été re-nettoyées dans l'acide sulfurique. Pour la suite des expérimentations réalisées un nettoyage dans l'acide sulfurique préalable au traitement de surface par plasma sera systématiquement effectué sur les fibres avant modification.

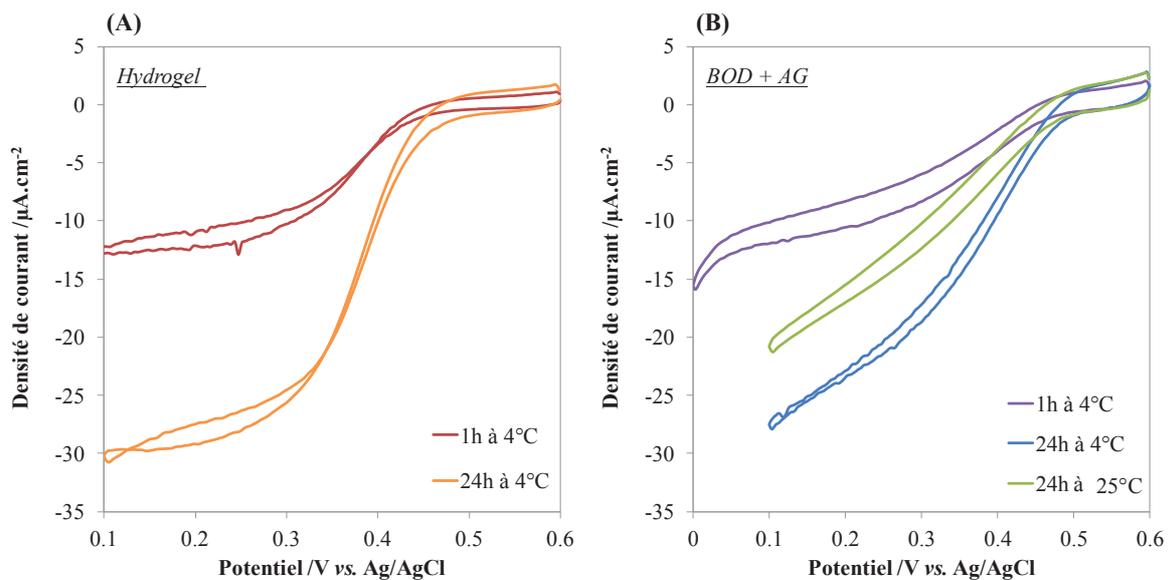


Figure II.4.8 : Voltammogrammes cycliques de fibres d'or poreuses (15/2 couches, diamètre des pores = 585 nm) modifiées avec (A) de l'hydrogel ou (B) de l'enzyme et de l'agent réticulant (AG) en fonction du temps et de la température d'incubation. Mesures dans du tampon PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C sous O_2 à 5 mV/s.

4.2.4. Augmentation de la proportion d'agent réticulant dans l'hydrogel

Nous avons ensuite augmenté la proportion d'agent réticulant dans l'hydrogel afin d'améliorer la stabilité de celui-ci (figure II.4.9). En effet, Gregg et al ont montré qu'il existe

au sein de l'hydrogel une proportion idéale d'agent réticulant permettant d'augmenter la stabilité tout en conservant une catalyse efficace [50].

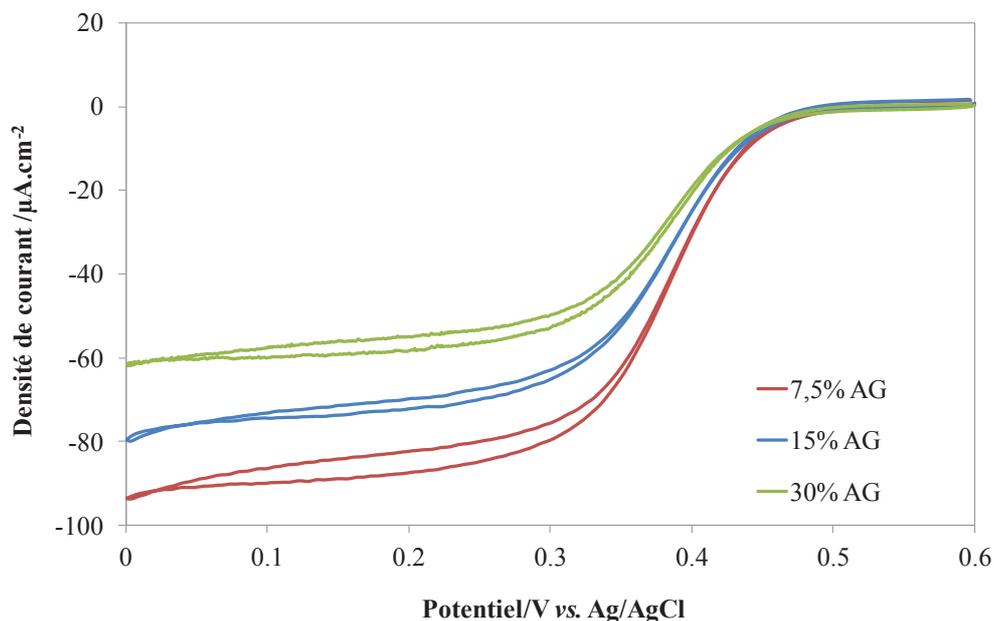


Figure II.4.9 : Voltammogrammes cycliques de fibres d'or poreuses (15/2 couches, diamètre des pores = 585 nm) modifiées avec de l'hydrogel contenant une proportion variable d'agent réticulant allant de 7,5 à 30%, incubation 24h à 4°C et séchage 18h à 4°C. Mesures dans du tampon PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C sous O_2 à 5 mV/s.

Tout d'abord nous constatons une diminution de la densité de courant avec l'augmentation de la quantité d'agent réticulant, ce qui peut s'expliquer de 2 façons :

- l'augmentation de la quantité d'agent réticulant entraîne une diminution des proportions des autres constituants (BOD et polymère), donc de la quantité de catalyseur ;
- elle entraîne également une importante rigidification de l'hydrogel ce qui en diminue les performances par limitation de la mobilité électronique [50].

Concernant la stabilité, aucune amélioration n'a pu être observée quelle que soit la concentration en agent réticulant :

- après 10 cycles successifs la perte en courant catalytique observée est identique ;
- après 3 jours d'incubation à 37°C, aucun courant résiduel n'est observé pour les fibres avec 15 et 30% d'agent réticulant et seuls 2 à 3% de courant sont conservés avec 7,5% d'agent réticulant ; ce qui n'est pas nécessairement significatif.

4.2.5. Fonctionnalisation des fibres d'or poreuses avec une SAM de cystéamine

Toujours dans le but d'améliorer la stabilité de la biocathode, nous avons modifié la surface des fibres avec une monocouche auto-assemblée (SAM) de cystéamine. Cette molécule va permettre d'attacher covalamment les unités enzymatiques à la surface de l'or et de les orienter afin de faciliter le transfert électronique [51].

La formation de la SAM a été réalisée par trempage de la fibre dans une solution de cystéamine à 10 mM dans l'éthanol pendant 1h ou 24h à température ambiante, puis la modification de la fibre est effectuée comme précisé dans la partie du Matériels et Méthodes 2.6. Pour la SAM formée en 24h nous constatons que la fixation d'enzyme est plus efficace qu'après 1h, la densité de courant étant presque multipliée par 2. Cependant, la densité de courant sans la SAM est très faible ($15 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) comparée aux résultats en transfert électronique direct des figures II.4.6 ($50 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) et II.4.8 ($30 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Il semblerait que l'absence d'hydrophilisation de la fibre (par traitement plasma + réduction dans l'acide sulfurique) empêche la bonne fixation de l'enzyme. Néanmoins nous aurions pu imaginer que l'utilisation d'une SAM de cystéamine concurrencerait ces traitements de surface en améliorant la connexion de l'enzyme sur la fibre. Il est également possible que l'orientation des enzymes imposée par la SAM rende le transfert électronique plus difficile.

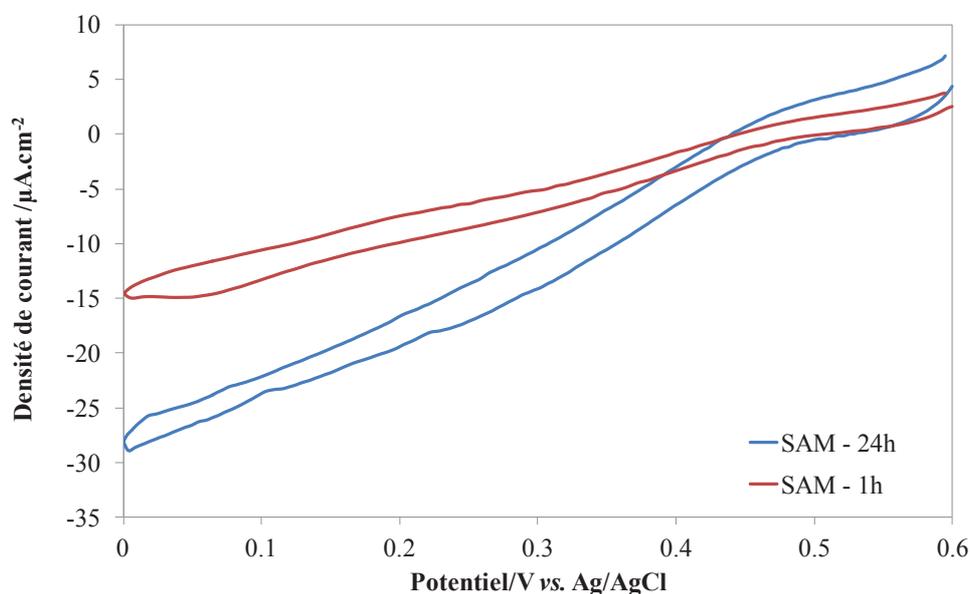


Figure II.4.10 : Voltammogrammes cycliques de fibres d'or poreuses (15/2 couches, diamètre des pores = 585 nm) préalablement fonctionnalisées par une SAM de cystéamine (immersion de la fibre dans une solution de cystéamine 1h ou 24h) puis modifiées avec de l'enzyme (incubation 1h à 4°C dans une solution d'enzyme à 5 mg.ml⁻¹), séchage 2h à 4°C. Mesures dans du PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C sous O₂ à 5 mV/s.

Les densités de courant sont néanmoins relativement faibles car seule une monocouche d'enzyme peut être immobilisée. Par le calcul nous avons déterminé qu'une monocouche idéalement connectée de BOD *Mo* devrait générer une densité de courant de $465 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ (calculée à partir du k_{cat} de la BOD *Mo* = 661 s^{-1} , et sachant qu'une monocouche d'enzyme contient $2,2 \times 10^{12}$ molécules par cm^2 sur une surface plane). Or cette valeur est largement supérieure aux ordres de grandeur que nous trouvons sur les fibres d'or en transfert électronique direct avec ou sans SAM de cystéamine. Malgré différentes optimisations nous ne sommes pas parvenus à immobiliser/connecter efficacement l'enzyme sur les fibres d'or poreuses. Même si les densités de courant obtenues avec un hydrogel sont meilleures, elles n'atteignent pas les $465 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ pourtant calculés pour une seule monocouche d'enzyme.

Il paraît donc essentiel de poursuivre ce travail d'optimisation de la modification des fibres d'or afin d'améliorer la fixation de l'enzyme/hydrogel et donc le courant catalytique.

Pour finir, concernant la stabilité aucune amélioration n'a été apportée par l'utilisation de cette SAM puisque la totalité du courant est perdue après 3 jours d'incubation à 37°C .

4.2.6. Effet de l'état d'oxydation/réduction de l'or sur la fixation de l'hydrogel

Nous avons aussi modifié l'état de surface de l'électrode soit en oxydant soit en réduisant l'or au préalable dans une solution d'acide sulfurique à 100 mM. Jusqu'à présent les fibres étaient systématiquement réduites dans l'acide sulfurique mais nous avons pensé qu'une surface oxydée pourrait faciliter la fixation de l'hydrogel.

Sur la figure II.4.11 sont présentées les densités de courant obtenues pour 2 fibres d'or réduites (rouge) et 2 fibres d'or oxydées (bleu) puis traitées au plasma et modifiées.

Les densités de courant obtenues sont similaires dans les deux cas. Cependant, la réduction préalable de la surface permet d'améliorer la stabilité de la biocathode puisqu'après 3 jours d'incubation à 37°C , nous avons pu conserver environ 5% de la densité de courant initiale, bien que se pose la question de la significativité de ces 5%. L'oxydation de la surface a conduit à une perte totale de la catalyse après 3 jours d'incubation.

Même si la différence entre 100% et 95% de perte de courant catalytique n'est pas forcément significative, il conviendra par précaution de réduire plutôt que d'oxyder la surface de l'or avant modification.

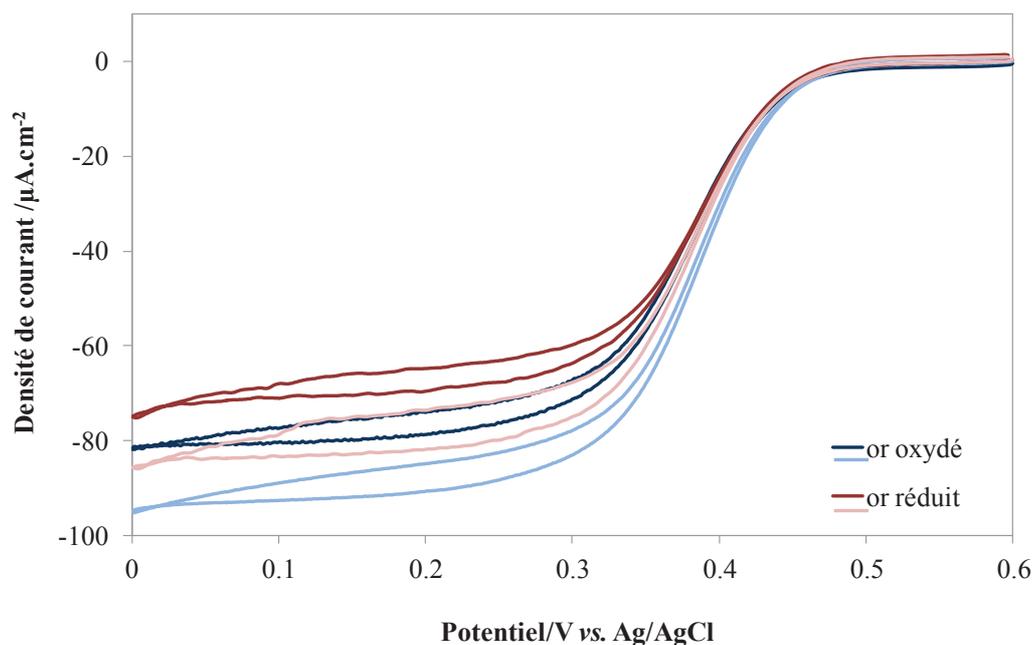


Figure II.4.11 : Voltammogrammes cycliques de fibres d'or poreuses (15/2 couches, diamètre des pores = 585 nm) réduites ou oxydées puis modifiées avec de l'hydrogel (62,2% polymère rédox + 30% BOD Mo + 7,4% PEGDGE), incubation 24h à 4°C et séchage 18h à 4°C. Mesures dans du tampon PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C sous O_2 à 5 mV/s.

4.2.7. Co-électrodéposition de l'hydrogel sur la fibre d'or poreuse

Nous avons ensuite utilisé la co-électrodéposition pour améliorer l'infiltration de l'hydrogel dans la structure poreuse comme cela a déjà été montré dans la littérature [52, 53]. Lors de l'électroréduction, le chlore labile présent sur les complexes d'osmium va être échangé et se fixer sur les motifs imidazole libres du polymère rédox ; les fonctions azotées (amines, hétérocycles) des enzymes vont ensuite pouvoir se coordonner aux osmiums disponibles résultant en une réticulation irréversible de l'enzyme et du polymère rédox.

Pour ce faire, la fibre d'or est immergée dans une solution de polymère rédox et d'enzyme puis on réalise 20 ou 50 cycles de + 0,6 à - 0,2 V pour forcer la formation de l'hydrogel et sa fixation sur l'or. Comme le montre la figure II.4.12.A, l'augmentation du nombre de cycles de co-électrodéposition va permettre d'accroître la quantité d'hydrogel formé à la surface de l'électrode.

Cette méthode est comparée à la méthode imbibition utilisée jusqu'à présent (figure II.4.12) et nous constatons qu'elle est nettement plus efficace : après 20 et 50 cycles de co-électrodéposition nous obtenons respectivement + 37 % et + 63 % de densité de courant par

rapport à la méthode d'imbibition. Malgré tout il n'a pas été observé d'amélioration particulière de la stabilité après co-électrodéposition.

Au vu de ces premiers résultats très prometteurs, d'autres optimisations sur cette technique seront effectuées par Magdalena Murawska dans le cadre de sa thèse orientée spécifiquement sur la conception et la modification de fibres d'or poreuses.

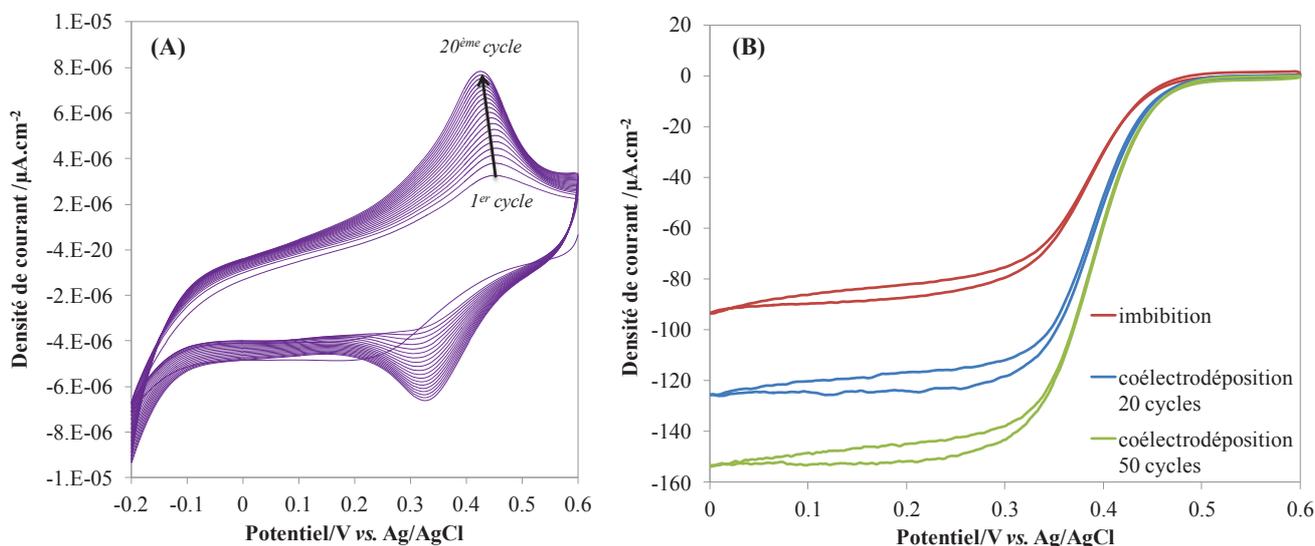


Figure II.4.12 : (A) Co-électrodéposition d'hydrogel sur la fibre d'or poreuse (15/2 couches, diamètre des pores = 585 nm) à 50 mV/s, (B) Catalyses de fibres d'or modifiées avec de l'hydrogel (62,2% polymère rédox + 30% BOD Mo + 7,4% PEGDGE), soit par incubation 24h à 4°C et séchage 18h à 4°C, soit par co-électrodéposition de 20 ou 50 cycles. Mesures dans du tampon PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C sous O_2 à 5 mV/s.

4.2.8. Protection de la cathode par l'utilisation de sacs de dialyse

Une dernière expérience a été effectuée pour essayer d'améliorer la stabilité de la cathode : l'utilisation de membranes de dialyse a été rapportée dans la littérature pour la protection de biopiles lors d'implantations dans l'animal [54].

Nous avons donc testé l'influence de membranes de dialyse de différentes tailles sur la densité de courant et la stabilité de notre biocathode. D'une manière générale, l'utilisation de membranes de dialyse n'a qu'un très faible effet sur la diffusion de l'oxygène puisque la densité de courant est sensiblement la même.

En termes de stabilité, seule les membranes de dialyse de 3,5 kDa ont permis de conserver une petite partie du courant initial (5%).

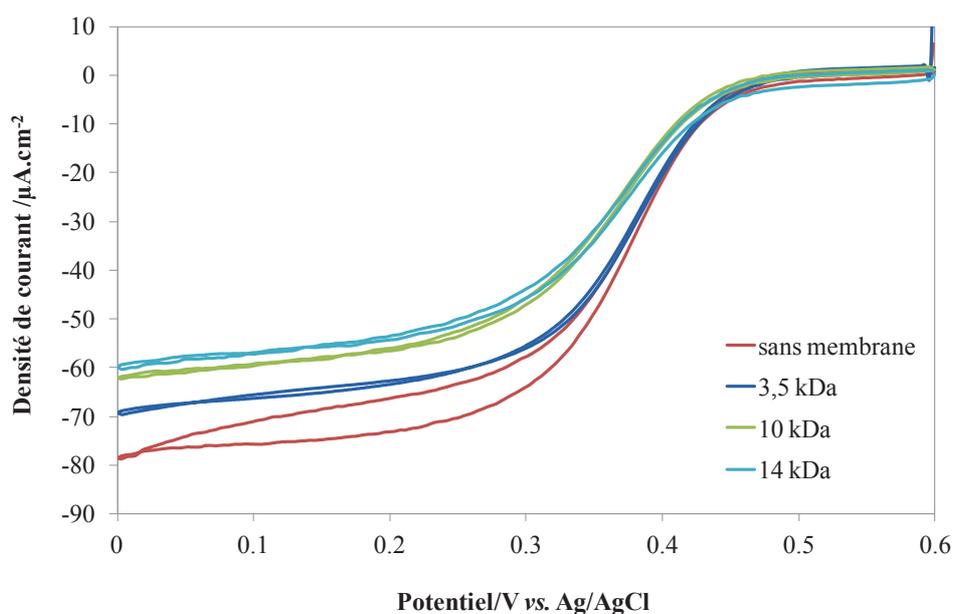


Figure II.4.13 : CVs de fibres d'or (15/2 couches, diamètre des pores = 585 nm) modifiées avec de l'hydrogel (62,2% polymère rédox + 30% BOD Mo + 7,4% PEGDGE), incubation 24h à 4°C et séchage 18h à 4°C ; sans ou avec une membrane de dialyse de taille variable. Mesures dans du tampon PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C sous O₂ à 5 mV/s.

4.3. Test de l'efficacité de la biocathode dans du sang humain

Enfin nous avons testé l'efficacité de la biocathode dans du sang humain. La préparation des échantillons de sang humain est détaillée dans le Chapitre III de ce manuscrit ainsi que dans la partie Matériels et Méthodes 2.10.

Pour ce test nous avons simplement préparé des fibres d'or poreuses en les modifiant avec de l'hydrogel après nettoyage dans 100 mM d'acide sulfurique et traitement plasma. Après un trempage de 24h à 4°C et un séchage de 18h à 4°C nous avons d'abord enregistré leurs performances dans du sang total puis dans du sang dilué par 2 dans du PB 100 mM pH 7,2 comme présenté sur la figure II.4.14.

Nous constatons un très net courant de réduction de l'oxygène auquel se rajoute un courant d'oxydation. Ce dernier est dû à la présence d'une espèce particulière dans le sang puisqu'en diluant le sang 2 nous obtenons une diminution du courant d'oxydation par 2.

En faisant varier la vitesse de balayage, nous mesurons l'évolution du courant d'oxydation (figure II.4.15). Ce courant varie linéairement avec la vitesse de balayage ce qui indique que l'espèce oxydée est adsorbée sur l'électrode. Si la variation linéaire avait été observée en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage, l'espèce aurait été diffusive.

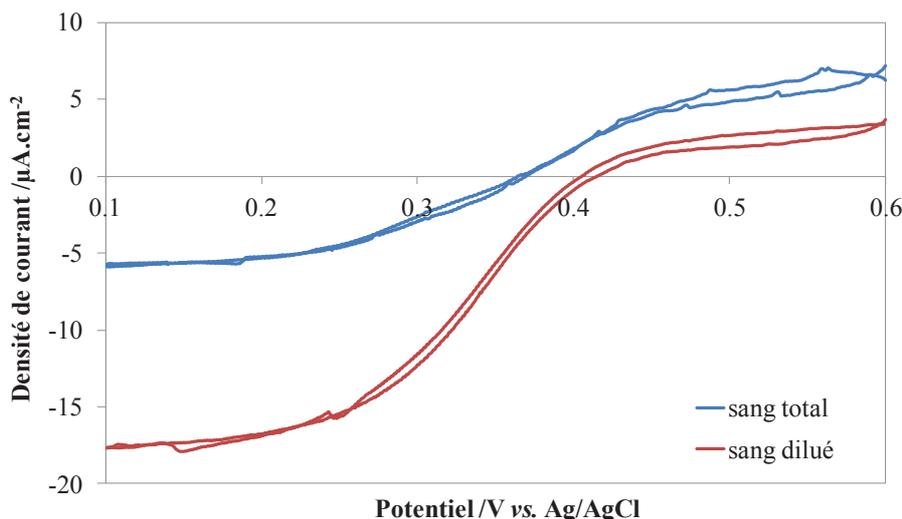


Figure II.4.14 : Voltammogrammes cycliques des fibres d'or poreuses (15/2 couches, diamètre des pores = 585 nm) modifiées avec de l'hydrogel et mesurées dans du sang total ou dilué par 2 avec du PB 100 mM pH 7,2 ; à 37,5°C sous O_2 à 5 mV/s.

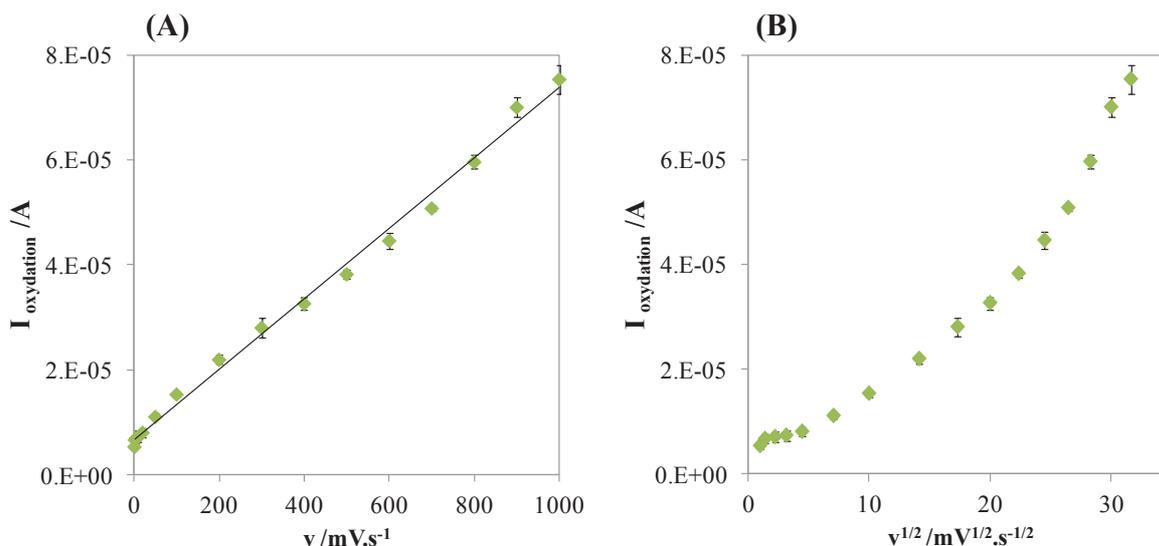


Figure II.4.15 : Variation du courant d'oxydation parasite en fonction (A) de la vitesse de balayage ou (B) de sa racine carrée ; mesure dans du sang total, à + 0,55 V vs. Ag/AgCl.

La molécule qui va s'adsorber et s'oxyder sur l'or est très probablement l'un des nombreux interférents présents dans le sang comme par exemple l'acide ascorbique, l'acide urique, l'acétaminophène, ... [55-58]. Araminaité et al ont montré l'oxydation de l'ascorbate vers + 0,2 V vs. Ag/AgCl sur des électrodes de carbone vitreux modifiées avec du bleu de Prusse [59]. Raj et al ont mis en évidence l'oxydation de l'acide ascorbique sur des électrodes d'or à partir de + 0,5 V et à partir de 0 V lorsqu'elles ont été fonctionnalisées avec une monocouche de complexes de nickel II [60]. Il est possible que l'ascorbate s'adsorbe et

s'oxyde l'or à un potentiel intermédiaire : les courbes obtenues sur la figure II.4.14 correspondraient donc à la résultante de la réduction de l'oxygène par l'hydrogel et l'oxydation de l'acide ascorbique par l'or.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons enregistré le voltammogramme cyclique pour une fibre d'or non poreuse et non modifiée, avant et après ajout de 100 μM d'acide ascorbique (concentration physiologique moyenne [55-58]). Nous pouvons voir sur la figure II.4.16 qu'il y a un important courant d'oxydation dans ce deuxième cas ce qui tend à valider notre hypothèse. De plus nous avons constaté qu'il n'y a pas d'oxydation de l'acide ascorbique sur les fibres de carbone (courbe verte) ce qui semble indiquer que cette oxydation est spécifique de l'or.

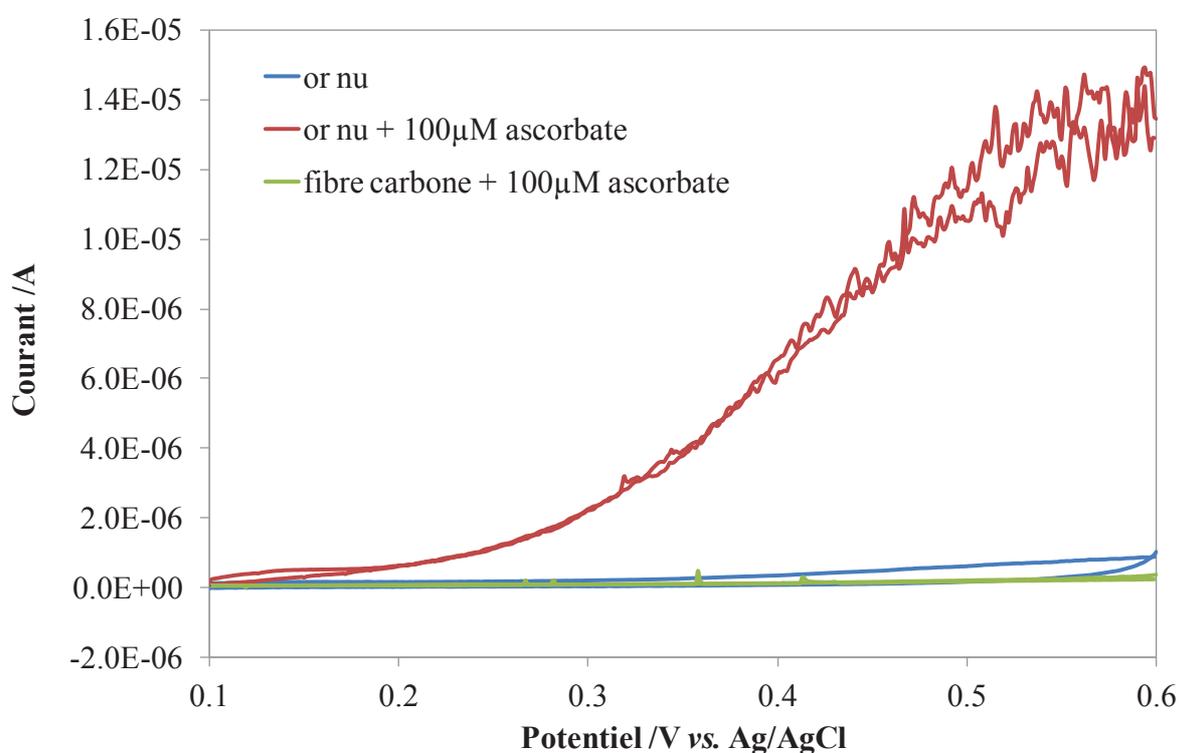


Figure II.4.16 : Voltammogrammes cycliques enregistrés dans du PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C et 5 mV/s sous air pour une fibre d'or non poreuse avant et après ajout de 100 μM d'acide ascorbique. Contrôle avec une fibre de carbone (courbe verte).

Enfin, après 2h d'opération dans le sang, la perte moyenne de courant enregistrée se situe autour de 30%. Seulement 5% de cette baisse est due à l'enzyme car il y a une diminution d'environ 25% du signal du polymère. Ainsi la stabilité de la cathode dépend majoritairement de la stabilité du polymère dans le sang, l'activité enzymatique étant assez peu affectée.

4.4. Biocompatibilité de la fibre d'or poreuse modifiée *in vitro* et *in vivo*

Les travaux présentés ici ont été réalisés avec la collaboration d'Annabelle Tanga, post-doctorante sous la direction du Professeur Jean Ripoche dans l'équipe BioTis de l'Université Bordeaux Segalen.

4.4.1. La stérilisation de la fibre d'or modifiée

En vue d'étudier la biocompatibilité de notre cathode, nous nous sommes intéressés à la stérilisation de celle-ci afin qu'une éventuelle réaction inflammatoire ne soit pas due à la simple présence de bactéries à la surface des électrodes ou dans l'hydrogel.

Nous avons choisi de stériliser chacun des composants de la cathode indépendamment et de les assembler ensuite sous hotte à flux laminaire stérile. En effet la stérilisation du matériau ne peut se faire que par traitement thermique à haute température (entre 100 et 180°C) ou par traitement dit « basse température » tels que l'irradiation aux rayons ultraviolets ou gamma, ce qui dans les deux cas ne convient pas à l'organisme vivant qu'est l'enzyme.

Les hautes températures ne conviennent pas à la BOD *Mo* puisqu'à 80°C en solution elle conserve moins de 10% de son activité maximale [2]. De même lorsqu'elle se trouve au sein d'un hydrogel, nous observons une nette diminution de son activité à partir de 40°C et aboutissant à une dénaturation irréversible à 70°C (figure II.2.6).

Nous avons néanmoins tenté la stérilisation de l'enzyme par irradiation UV en utilisant comme source UV la lampe présente dans les hottes à flux laminaire utilisées dans les laboratoires de type L2. Cette lampe est utilisée en fin de manipulation pour stériliser le plan de travail de la hotte. Et nous avons également réalisé une irradiation UV en utilisant un four à UV (254 nm) spécialement conçu pour la stérilisation de matériaux (figure II.4.17).

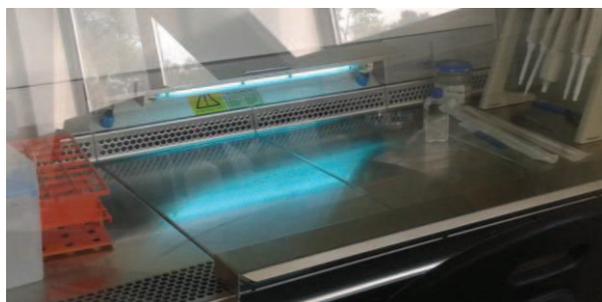


Figure II.4.17 : lampe et four utilisés pour la stérilisation par irradiation aux rayons UV des enzymes. Les détails techniques des appareils sont fournis dans la partie Matériels et Méthodes 2.7.1).

Après un temps variable d'exposition aux rayons UV, l'activité résiduelle de l'enzyme a été mesurée par spectroscopie UV. Cette expérience a également été réalisée pour la BOD *Bp*. Les résultats présentés dans le tableau II.4.1 ci-dessous permettent de valider l'exclusion des rayons UV pour la stérilisation de l'enzyme, quelle qu'elle soit.

Source d'UV	Four UV	Lampe UV	
Durée d'irradiation	1 x 15 min	1 x 15 min	2 x 15 min
Perte d'activité pour la BOD <i>Mo</i>	67%	75%	91%
Perte d'activité pour la BOD <i>Bp</i>	82%	77%	100%

Tableau II.4.1 : Perte d'activité des BODs *Mo* et *Bp* après irradiation aux UV.

Au final, le protocole choisit consiste en la stérilisation indépendante des composants de la cathode :

- les fibres d'or poreuses servant d'électrode ont été traitées 15 minutes aux rayons UV.
- l'enzyme, le polymère et l'agent réticulant ont quant à eux été filtrés avec un filtre stérile de 0,22 μm , taille suffisante pour éliminer toute bactérie, avant d'être mélangés.

La préparation de l'hydrogel et la modification de la fibre ont ensuite été réalisées sous hotte stérile pour garantir la stérilité de la cathode, selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes (2.7.2).

4.4.2. Etude de la cytotoxicité *in vitro*

L'ensemble des tests visant à évaluer la cytotoxicité de la cathode ont été effectués conformément à la norme ISO 10993-5:2009. Elle regroupe un certain nombre de standards permettant de caractériser la biocompatibilité d'un appareillage médical préalablement aux études cliniques [61].

4.4.2.1. Principe

La cytotoxicité est la capacité d'un élément de nature chimique ou biologique à être toxique pour les cellules, allant jusqu'à les détruire [62]. Elle peut être mesurée de manière directe ou indirecte (figure II.4.18). Dans le premier cas, l'élément à tester est déposé directement dans la culture cellulaire qui a d'abord subi une phase d'équilibre afin d'en stabiliser la population. L'élément est retiré du milieu après un temps donné puis on procède aux mesures de cytotoxicité sur les cellules. Dans le deuxième cas, l'élément est d'abord

préincubé dans le milieu puis retiré et alors les cellules sont rajoutées au milieu. Cela permet de déterminer si une substance toxique est relarguée par l'élément testé.

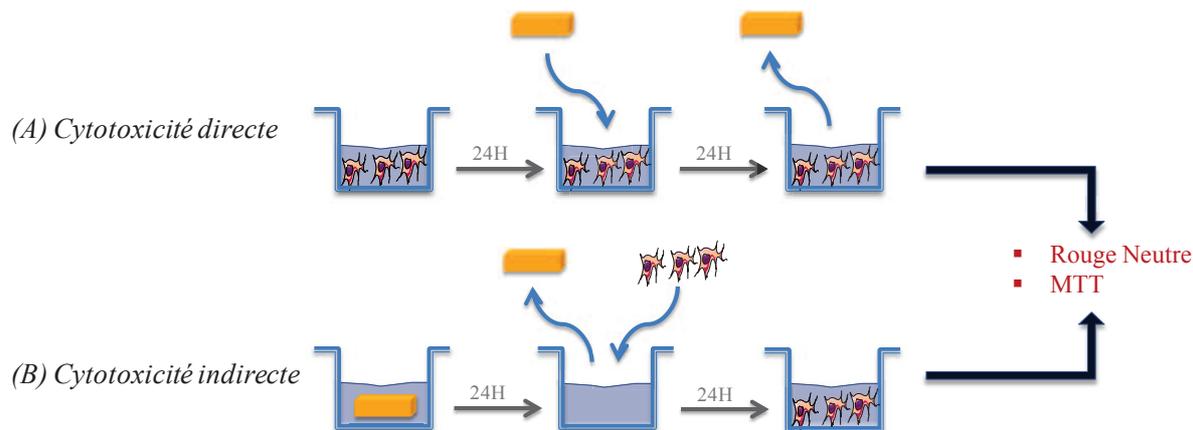


Figure II.4.18 : Schémas des tests de cytotoxicité directe et indirecte.

A l'issue de l'incubation des éléments à tester, on procède à la quantification de la viabilité cellulaire. La viabilité cellulaire correspond aux nombres de cellules vivantes dans une population cellulaire. D'une manière générale on suit des biomarqueurs métaboliques tels que l'ATP ou l'activité d'enzymes comme les déshydrogénases.

Les tests de viabilité cellulaire sont plus souvent appelés tests d'inclusion de colorants par les cellules vivantes car ils reposent sur la métabolisation de substrats colorés ou bien l'accumulation de colorants vitaux [62]. La viabilité peut donc être mesurée par comparaison de la densité optique des cellules avant et après incubation avec le corps étranger.

Concernant les travaux présentés ici la mesure de la viabilité a été faite en utilisant comme réactif :

- le Rouge Neutre (3-amino-7-diméthylamino-2-méthylephénazine hydrochloride) = test d'accumulation qui permet de déterminer si les cellules sont vivantes ou non. Le rouge neutre est un colorant dit vital capable de diffuser à travers les membranes pour s'accumuler dans les lysosomes (organites cellulaires) des cellules vivantes. La rétention colorant dans la cellule est d'autant plus difficile qu'elle est proche de la mort [63, 64].
- le MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) = test de métabolisation qui indique si le métabolisme cellulaire est fonctionnel ou non. Le colorant va être réduit par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes fonctionnelle pour donner du formazan, précipité de couleur violette. Si aucune couleur n'apparaît, cela signifie que le métabolisme cellulaire ne fonctionne pas correctement [63, 64].

Les cellules utilisées pour ces tests peuvent être de plusieurs natures comme indiqué sur la figure II.4.19. Dans le respect de la norme ISO 10993-5 :2009, nous avons utilisé des fibroblastes d'origine murine puis humaine ainsi que des cellules endothéliales humaines.

Les fibroblastes sont les cellules du tissu conjonctif qui constitue notamment la peau alors que les cellules endothéliales composent la couche la plus interne des vaisseaux sanguins en contact avec le sang. Ces 2 types cellulaires sont donc particulièrement intéressants si l'on souhaite à terme implanter notre fibre en sous cutané à proximité de la circulation sanguine.

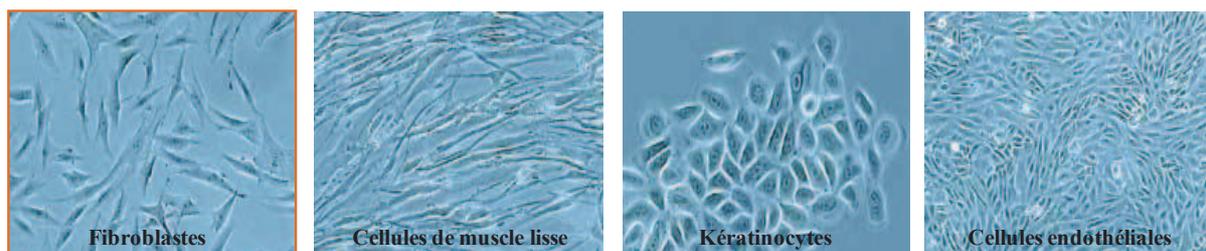


Figure II.4.19 : Différents types cellulaires utilisés pour les tests de cytotoxicité.

4.4.2.2. Résultats

Ci-après sont présentés les résultats des tests de cytotoxicité/viabilité effectués sur les différents constituants de la biocathode, avec des fibroblastes d'origine murine et humaine et réalisés avec du Rouge Neutre ou du MTT (figures II.4.20.A et B).

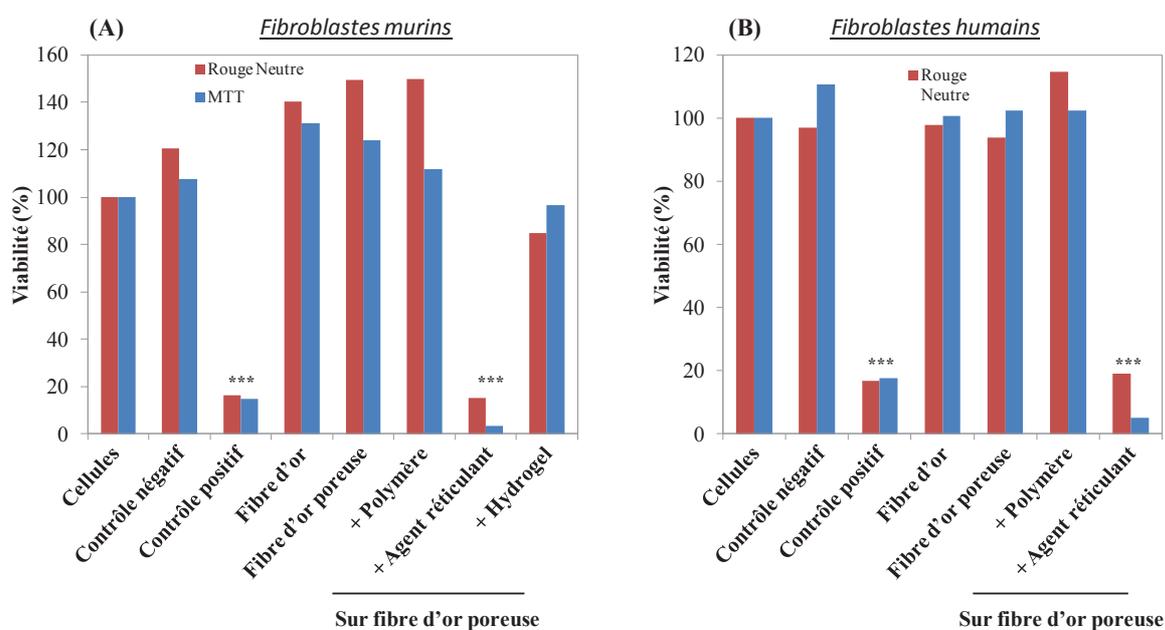


Figure II.4.20 : Résultats des tests de cytotoxicité effectués sur des fibroblastes murins (A) et humains (B). Contrôle négatif = polyéthylène, contrôle positif = latex. Les éléments cytotoxiques sont désignés par ***.

Quel que soit le réactif utilisé et l'origine des fibroblastes, nous constatons que l'agent réticulant seul est cytotoxique. En revanche, une fois réticulé au sein de l'hydrogel il n'y a plus d'effet sur les cellules. De plus les électrodes d'or, poreuses ou non, ne présentent aucune cytotoxicité, qu'elles soient ou non modifiées avec l'hydrogel.

Enfin, le point très positif à faire ressortir de ces données est la non toxicité totale du polymère à base d'osmium dont l'utilisation en vue d'implantation était jusque là controversée.

Les mêmes tests ont été réalisés avec des cellules endothéliales humaines (Huevcs) aboutissant à des résultats identiques (figure II.4.21).

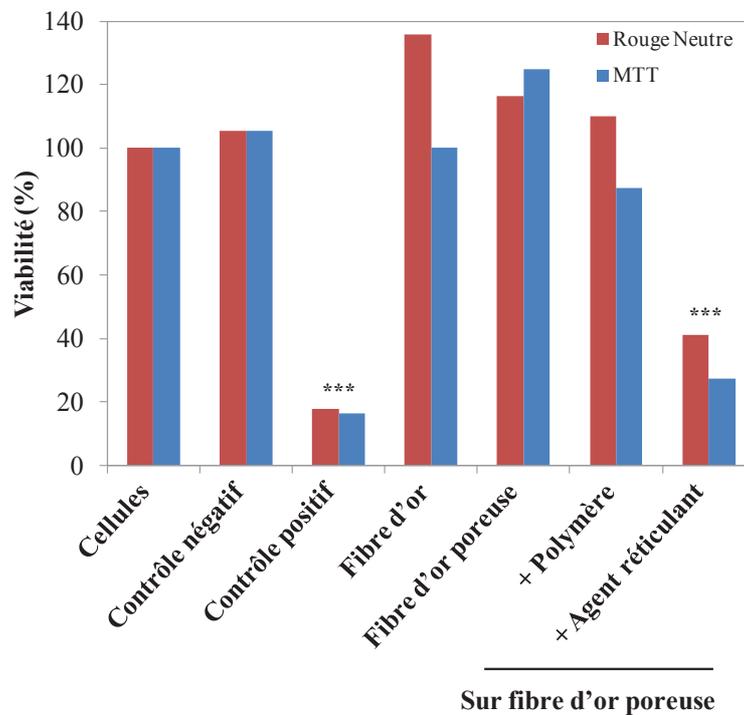


Figure II.4.21 : Résultats des tests de cytotoxicité effectués sur des cellules endothéliales humaines. Contrôle négatif = polyéthylène, contrôle positif = latex. Les éléments cytotoxiques sont désignés par ***.

En conclusion, les fibres d'or poreuses modifiées avec l'hydrogel ne présentent aucune cytotoxicité, ce qui permet de passer à l'étape suivante des tests de biocompatibilité : l'étude de la réponse inflammatoire.

4.4.3. Etude de la réponse inflammatoire *in vitro*

4.4.3.1. Activation du complément

4.4.3.1.1. Principe

Le système du complément regroupe 35 protéines du sérum sanguin et participant à l'immunité innée : 12 d'entre elles interviennent directement dans les processus d'élimination des pathogènes, les autres servant à réguler leur activité. Elles sont soit libres soit membranaires et sont sécrétées par le foie. Elles sont thermolabiles (elles perdent leur activité à partir de 56°C) et vont venir compléter l'action des immunoglobulines sériques dans les mécanismes de défense immunitaire [65, 66].

Les principales protéines du complément sont notées de C1 à C9 et vont s'activer progressivement au cours de cascades d'activation (3 voies possibles) dont le pivot est la C3 (figure II.4.22).

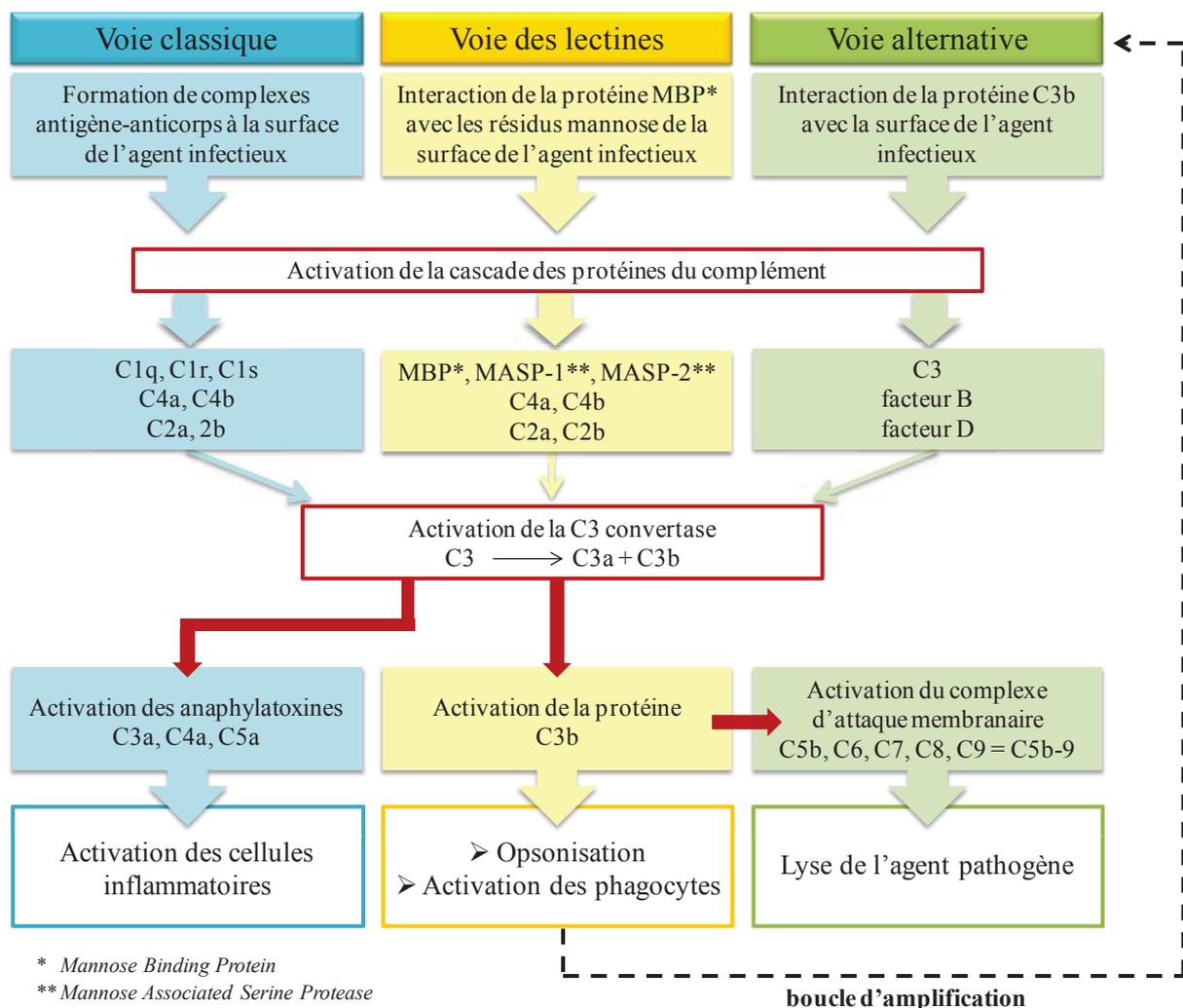


Figure II.4.22 : Les trois voies d'activation du complément.

En fonction des protéines activées, différentes réponses sont observées :

- l'activation des cellules inflammatoires par les anaphylatoxines qui vont stimuler la sécrétion de marqueurs de l'inflammation. Les cellules inflammatoires incluent les lymphocytes, les phagocytes, les mastocytes et polynucléaires basophiles et les fibroblastes ; elles vont prendre en charge l'encapsulation et/ou la digestion de l'agent pathogène.
- l'opsonisation = recouvrement de la surface de l'agent pathogène afin de faciliter sa digestion par les phagocytes.
- la lyse = perforation de la membrane de l'agent pathogène causant son éclatement par choc osmotique.

Pour réaliser le test d'activation du complément, il suffit d'incuber l'agent pathogène dans du sérum humain. On dose ensuite les protéines caractéristiques des différentes voies d'activation des réactions inflammatoires (figure II.4.23) [65, 66] :

- les protéines C3a et C5a sont activées par la voie classique ;
- la protéine C3c correspond à la forme inactivée de la C3b qui est générée lors de l'auto-régulation de la voie des lectines ;
- le complexe d'attaque membranaire noté C5b-9 est constitué de l'association des protéines C5, C6, C7, C8 et C9 issues de la voie alternative.

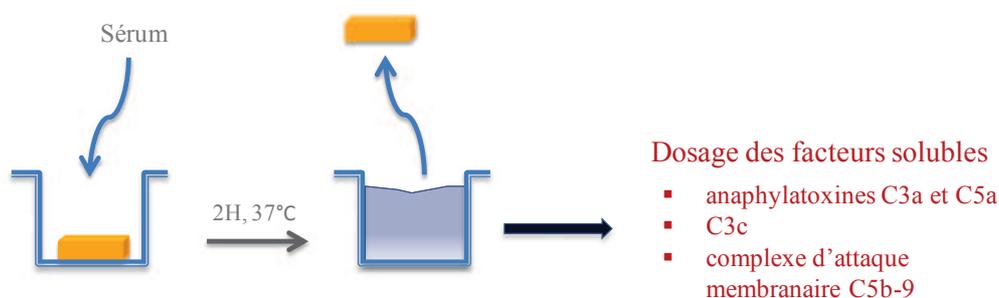


Figure II.4.23 : Principe du test d'activation du complément.

4.4.3.1.2. Résultats

Afin de tester le potentiel inflammatoire de notre biocathode nous avons incubée une fibre d'or seule ou modifiée (polymère ou agent réticulant ou hydrogel) dans du sérum pendant 2h à 37°C. Nous avons ensuite dosé les protéines du complément C5a, C5b-9 et C3c pour évaluer l'impact de notre système sur l'activation des processus inflammatoires.

Par comparaison avec le sérum seul (figure II.4.24), nous ne constatons aucune activation du complément due à la présence de la biocathode quel que soit le marqueur étudié.

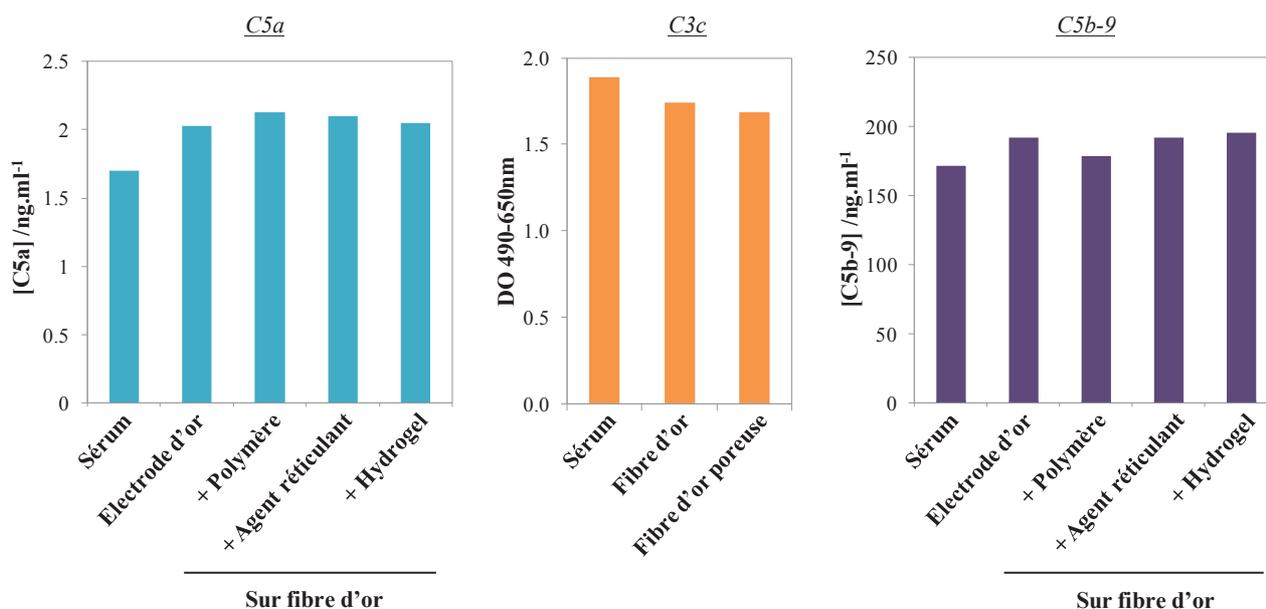


Figure II.4.24 : Test d'activation du complément par la biocathode, modifiée ou non.

4.4.3.2. Activation plaquettaire

4.4.3.2.1. Principe

Un autre moyen de détecter l'occurrence d'une réaction inflammatoire consiste à évaluer l'activation plaquettaire induite par un corps étranger. Les plaquettes sont des cellules sanguines impliquées entre autres dans les réactions inflammatoires et les processus de défense immunitaire [67]. Lors de l'intrusion d'un corps étranger dans la circulation sanguine les plaquettes vont non seulement l'isoler en s'agréant autour de lui mais elles vont également être activées pour initier la réaction immunitaire.

Plusieurs biomarqueurs solubles permettent de quantifier l'agrégation et l'activation plaquettaires :

- la β -thromboglobuline est relarguée dans le flux sanguin lors du processus d'agrégation des plaquettes ;
- le thromboxane est produit par les plaquettes activées et va stimuler leur agrégation ;
- la CD154 (aussi appelée CD40L) et la P-sélectine sont des protéines exprimées en surface des plaquettes activées et qui vont initier de nombreuses réponses immunitaires.

Pour réaliser le test d'activation des plaquettes, celles-ci sont extraites du sang puis incubées avec le corps étranger à tester. Le dosage des biomarqueurs est ensuite effectué dans le surnageant du milieu d'incubation (figure II.4.25). En complément, il est également

possible de quantifier le phénomène d'agrégation plaquettaire par simple imagerie de la surface du corps étranger.

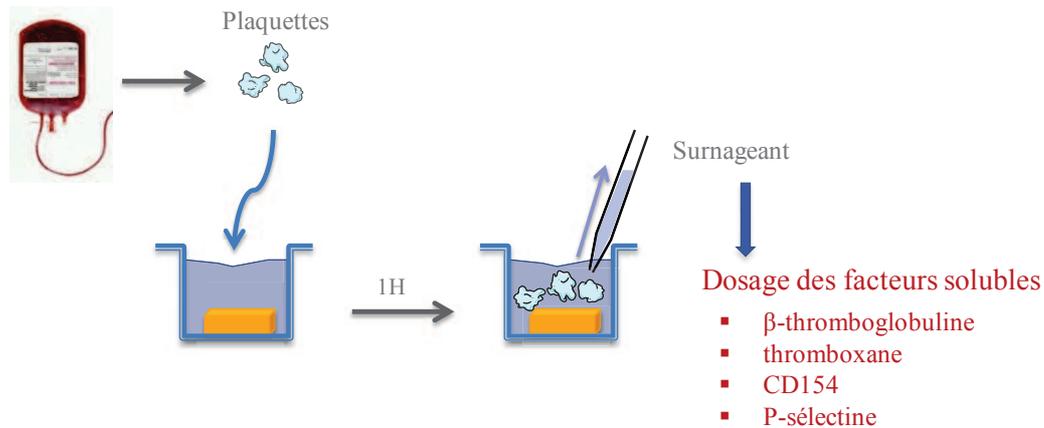


Figure II.4.25 : Principe du test d'activation des plaquettes.

4.4.3.2.2. Résultats

Pour l'évaluation de l'activation plaquettaire, le ligand CD154 a été dosé après la mise en contact de plaquettes et d'une fibre d'or, poreuse ou non. A titre de contrôle positif des plaquettes ont été activées par ajout de thrombine : d'après la figure II.4.25, nous voyons que cela suscite une très grande libération de CD154 dans le milieu. Concernant les fibres d'or, nous observons peu voire aucune activation plaquettaire.

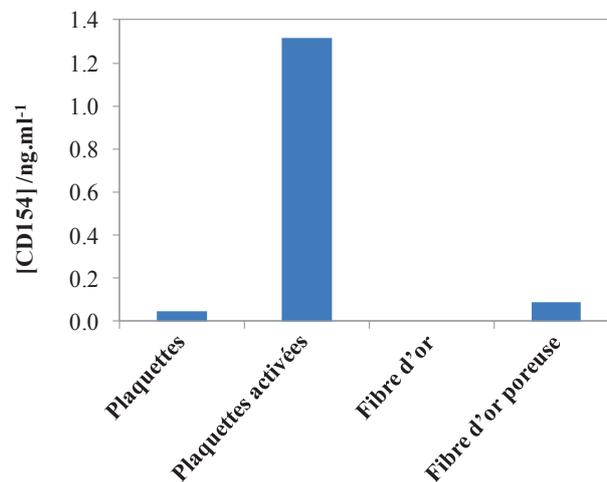


Figure II.4.26 : Test d'activation plaquettaire par des fibres d'or.

En complément du dosage du CD154, des clichés de microscopie électronique à balayage de la surface des fibres d'or ont été réalisés (figure II.4.27). Pour les fibres d'or non modifiées, très peu de plaquettes sont attachées au matériau, ce qui corrobore les résultats de la figure II.4.26. Néanmoins, après modification de la fibre d'or poreuse avec l'hydrogel, nous

constatons une légère augmentation de l'agrégation plaquettaire (les plaquettes correspondent aux amas noirs visibles sur le troisième cliché).

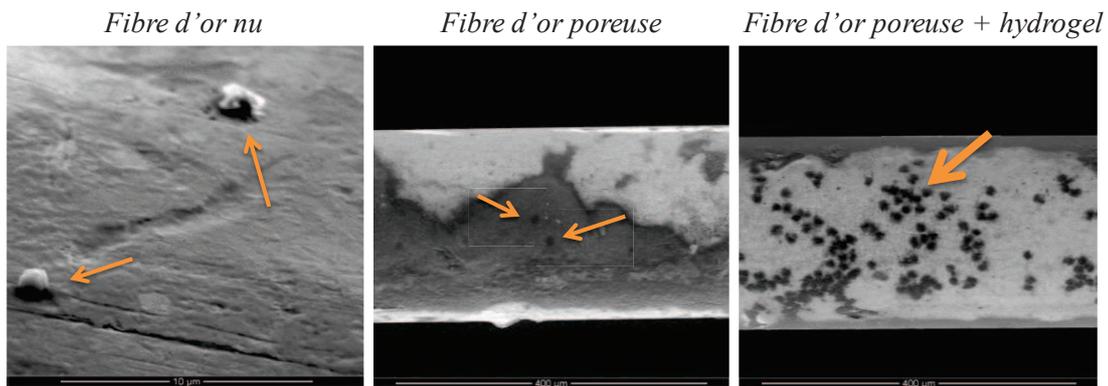


Figure II.4.27 : Clichés MEB de fibres d'or « nue », poreuse et poreuse modifiée avec l'hydrogel, après incubation avec des plaquettes. Les plaquettes attachées sont indiquées par les flèches orange.

4.4.3.3. La réaction inflammatoire à un corps étranger

4.4.3.3.1. Principe

La réaction inflammatoire à un corps étranger ou FBR en anglais (foreign body reaction) constitue la dernière étape de la réaction inflammatoire. Elle fait intervenir des macrophages qui vont fusionner en cellules géantes au niveau des sites d'inflammation [68]. Ces cellules géantes vont alors s'agréger autour du corps étranger en formant une capsule fibrotique afin de l'isoler (figure II.4.28).

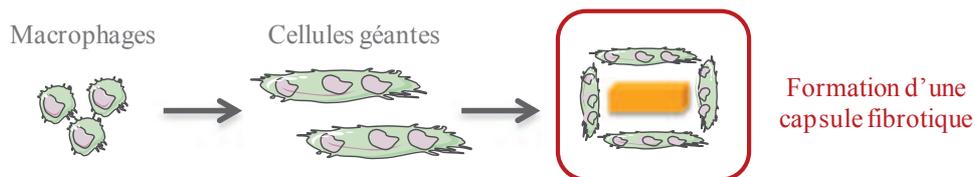


Figure II.4.28 : Formation de la capsule fibrotique.

Le dosage de la réaction inflammatoire est effectué en incubant des macrophages et le corps étranger pendant 24h. A l'issue de cette durée, l'adhésion des macrophages à la surface du matériau est quantifiée par microscopie de fluorescence (figure II.4.29). Pour l'imagerie en microscopie de fluorescence, deux fluorophores sont utilisés :

- le DAPI (Di Aminido Phenyl Indol) qui colore sélectivement les noyaux cellulaires en bleu car il est spécifique de l'ADN ;
- le FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) qui teinte le cytoplasme des cellules en vert par formation d'un complexe avec les protéines cytoplasmiques.

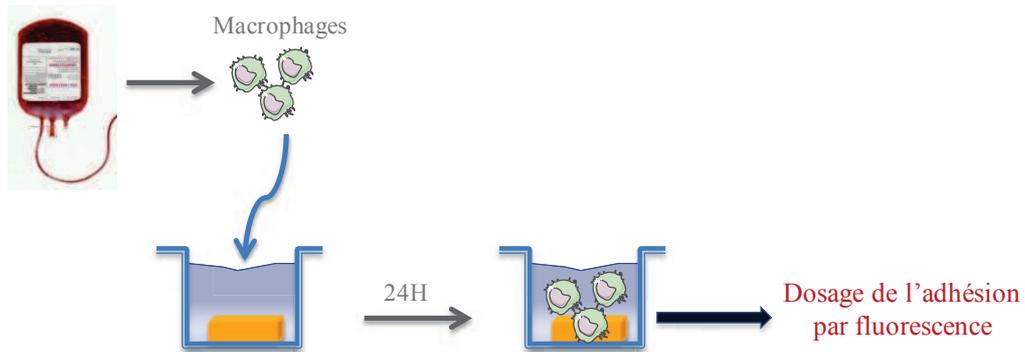


Figure II.4.29 : Principe du test de réaction à un corps étranger réalisé en présence de macrophages.

4.4.3.3.2. Résultats

La figure II.4.30 met en évidence les macrophages adhérant à la surface de différents matériaux. Concernant notre fibre d'or, nous constatons une forte adhésion, similaire à celle observée pour le contrôle positif. De plus, l'agrandissement d'une cellule montre distinctement qu'elle contient plusieurs noyaux indiquant la fusion de macrophages en cellules géantes, signe de l'initiation de la fibrose autour de la l'électrode d'or.

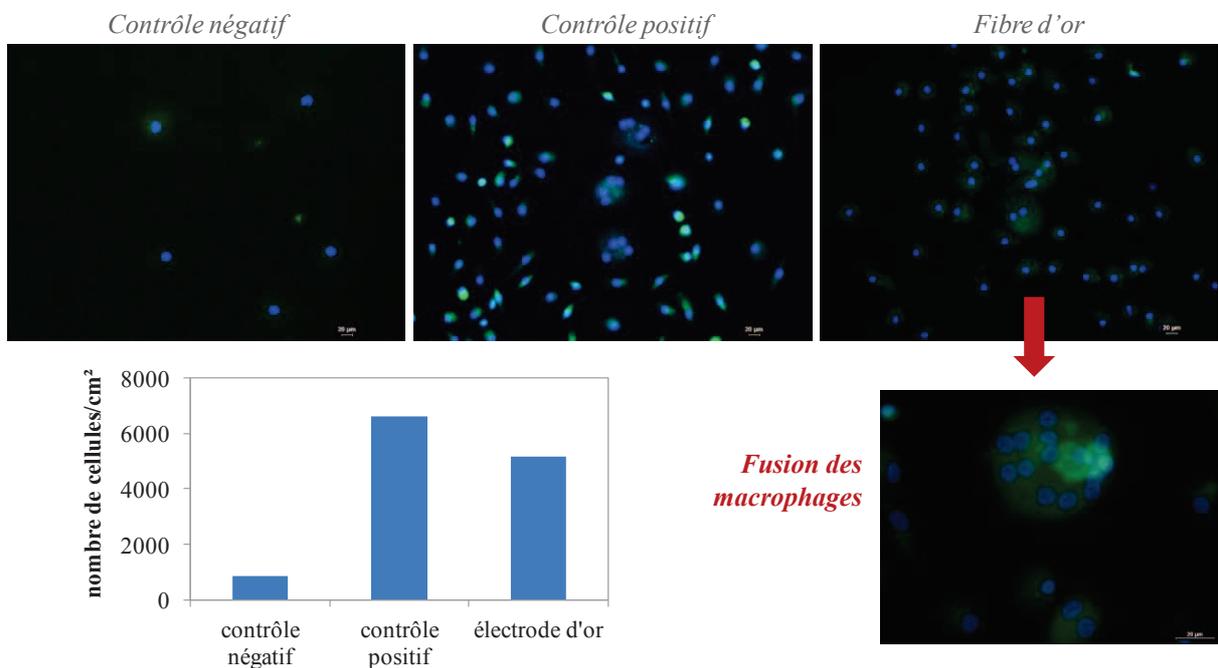


Figure II.4.30 : Clichés de microscopie de fluorescence de l'adhésion des macrophages sur une fibre d'or comparée à un contrôle positif et négatif, et graphique du nombre de macrophages adhérent à chaque type de surface par cm².

Le développement d'une fibrose peut être interprété de 2 manières. D'un côté, l'isolation de l'appareil du milieu extérieur peut gêner la diffusion des substrats et donc entraîner une baisse des performances. D'un autre côté, la mise en place d'un tel phénomène est le signe de la bonne intégration de l'appareil par les cellules, ce qui est positif car il ne devrait pas y avoir de « rejet » par l'organisme après implantation.

4.4.4. Etude *in vivo* : implantation de la fibre modifiée dans des souris

4.4.4.1. Protocole d'implantation

L'implantation des fibres d'or préalablement modifiées est réalisée selon un protocole préexistant développé par le chirurgien anatomopathologiste Sébastien Lepreux en 2013 au CHU de Bordeaux afin d'étudier les phénomènes de biorésorption autour de fils de suture, c'est-à-dire la réaction à un corps étranger. Il consiste en l'implantation de faisceaux de fils de suture (constitués de 10 fils de suture pourpres résorbables Vicryl 0 = polyglactine 910 qui est un copolymère poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) synthétique) dans des souris.

Les faisceaux sont implantés dans le tissu sous cutané du bas du dos de chaque souris. Pour suivre le site d'implantation, un fil de suture non résorbable de polyamide (Monosoft 0) a été ajouté au faisceau (en noir sur la figure II.4.31).

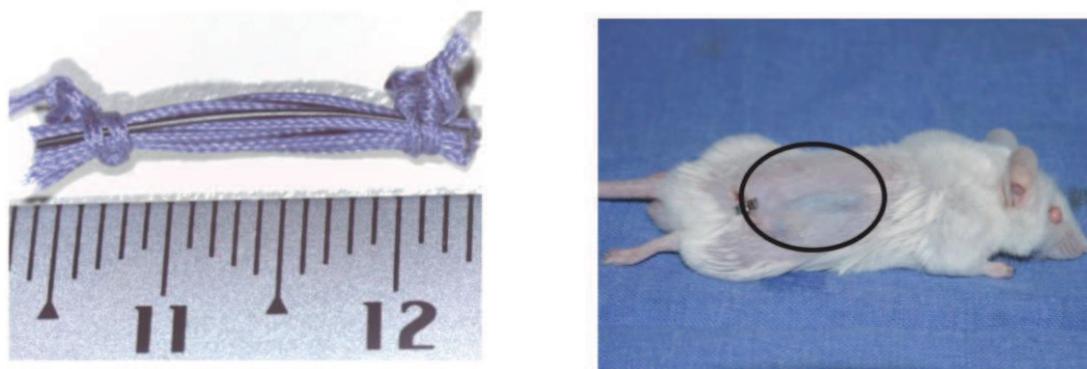


Figure II.4.31 : Implantation d'un faisceau de fils de suture dans une souris. Les fils violets sont résorbables contrairement au fil noir.

Une souris est sacrifiée chaque semaine pendant 10 semaines afin de mesurer l'aire du faisceau de fils et donc d'évaluer sa cinétique de résorption. Comme nous pouvons le voir sur la figure II.4.32, au bout de 10 semaines il ne reste plus que le fil non résorbable servant de témoin, et aucune réponse inflammatoire n'a eu lieu consécutivement à l'implantation.

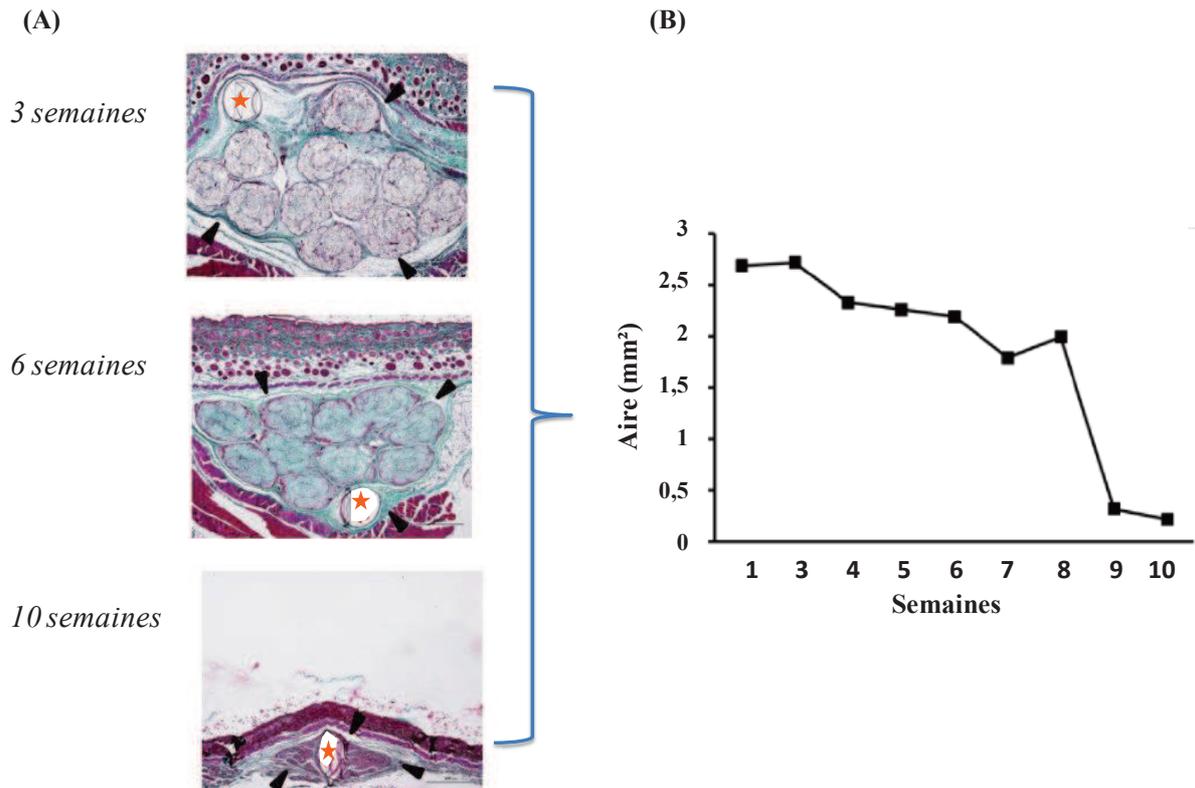


Figure II.4.32 : (A) Coupes histologiques après 3, 6 et 10 semaines d'implantation du faisceau de fils résorbables. Les flèches noires désignent le contour du faisceau dont il est possible de distinguer les 10 fils résorbables ainsi que le fil non résorbable désigné par l'étoile orange ; (B) Evolution de la surface des fils résorbables en fonction du temps d'implantation.

4.4.4.2. Application du protocole d'implantation à notre cathode

Après anesthésie, les fibres d'or poreuses ont été implantées dans les souris comme détaillé sur la figure II.4.33. Les fibres ont préalablement été modifiées ou non avec un hydrogel à base de BOD Mo dans les conditions décrites précédemment (réduction de l'or dans l'acide sulfurique + traitement plasma de surface puis incubation 24h à 4°C dans la solution d'hydrogel et séchage 18h à 4°C). Les électrodes non modifiées seront utilisées pour évaluer la variation de la surface active. Les électrodes modifiées permettront d'une part de déterminer si l'hydrogel est toujours fonctionnel après plusieurs jours d'implantation et d'autre part d'effectuer des coupes histologiques pour évaluer l'intégration du système dans les tissus.

La fibre implantée est bien visible par transparence (image II.4.33.C). L'incision est ensuite fermée par un point de suture puis consolidée par une agrafe. La procédure a été effectuée sur plusieurs souris afin de voir l'effet de la fibre sur l'organisme dans le temps.



Figure II.4.33 : (A) Incision de la peau de la souris puis (B) décollement de la peau et (C) insertion de la fibre d'or modifiée ou non sous la partie de peau préalablement décollée puis suture. (D) Ensemble de souris ayant une fibre implantée.

4.4.4.3. Sacrifice des souris

Pour retirer les fibres, les souris sont d'abord sacrifiées, de manière rapide et indolore par dislocation cervicale, puis dépecées afin de ne pas abimer la fibre qui a été complètement intégrée dans les tissus du derme (figure III.4.34).

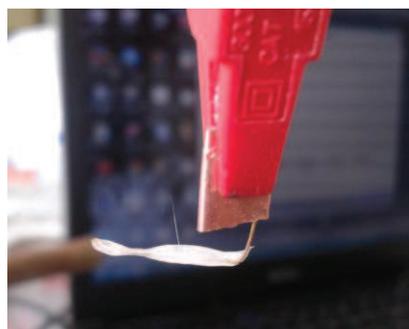


Figure II.4.34 : Fibre retirée après implantation.

4.4.4.4. Mesures électrochimiques après implantation

4.4.4.4.1. Surface active et structure de la fibre d'or poreuse

Après une semaine d'implantation d'une fibre poreuse non modifiée, une perte de surface active de seulement 2,63% est enregistrée, preuve de la bonne préservation de la structure poreuse et que nous pouvons également constater sur la figure II.4.35.

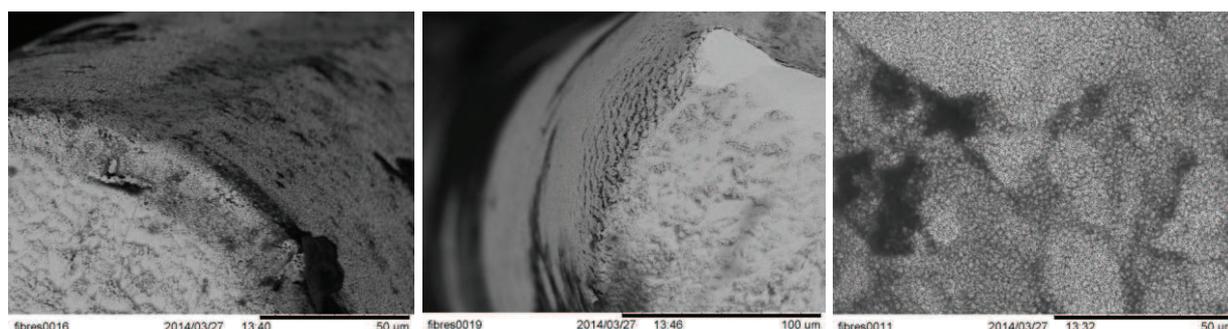


Figure II.4.35 : Clichés MEB (section et surface) d'une fibre poreuse non modifiée après 1 semaine d'implantation.

4.4.4.4.2. Activité catalytique

Concernant les fibres d'or modifiées avec l'hydrogel, nous avons enregistré le courant catalytique résiduel après incubation ou implantation. Par comparaison avec le courant initial (figure II.4.36.A), nous voyons qu'il reste 17% de l'activité catalytique après 3 jours d'incubation *in vitro* dans du tampon PB 100 mM à 37,5°C (figure II.4.36.B) ; aucune catalyse n'est observée après 7 jours d'incubation. Après implantation, que ce soit 3 ou 7 jours, aucune catalyse n'a pu être récupérée (figure II.4.36.C). Ces résultats sont à pondérer en raison du fait qu'aucune membrane n'est utilisée pour protéger l'hydrogel du milieu extérieur et améliorer sa durée de vie. Ainsi de nouvelles expériences pourront être réalisées en utilisant par exemple une membrane de dialyse pour augmenter la stabilité de la cathode.

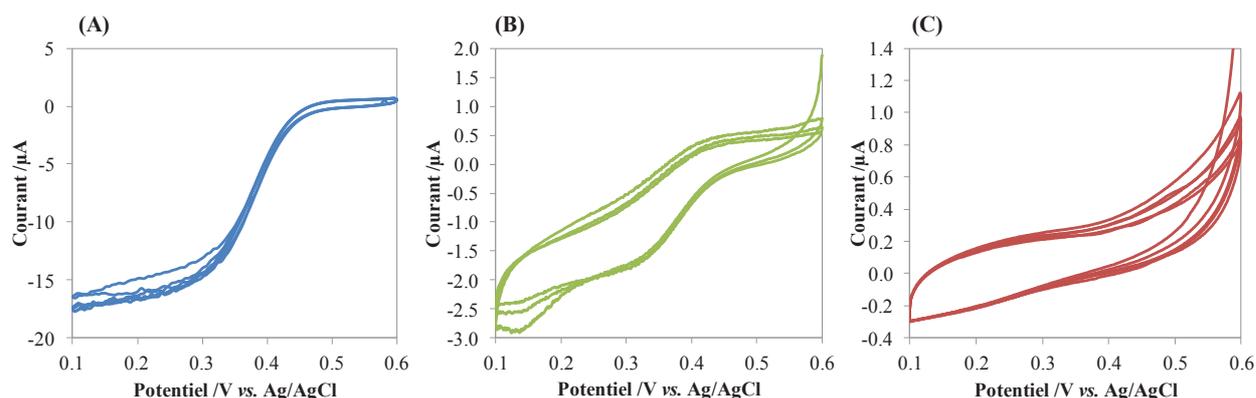


Figure II.4.36 : Voltammogrammes cycliques d'une fibre poreuse d'or modifiée (15/2 couches, diamètre des pores = 585 nm), mesurés dans du tampon PB 100 mM pH 7,2 à 37,5°C sous O_2 et à 5 mV/s (A) directement après séchage, (B) après 3 jours d'incubation *in vitro* dans PB 100 mM à 37°C, (C) après 3 jours d'implantation dans une souris.

Néanmoins, un test complémentaire a été réalisé sur les fibres implantées : après plusieurs minutes d'incubation dans une solution d'ABTS (identique à celle utilisée pour les mesures d'activité en solution de la BOD), un léger changement de couleur (vert) a été observé à la périphérie de la fibre indiquant qu'une petite quantité d'enzyme a tout de même conservé une partie de son activité après 3 jours d'implantation. Ceci n'a pas été observé après 7 jours.

4.4.4.4.3. Coupes histologiques de la zone d'implantation

Les fibres intégrées dans le tissu sous cutané ont été fixées afin de réaliser des coupes histologiques (figure II.4.37). Après 8 semaines d'implantation, aucun signe d'inflammation n'a été observé sur les souris qui étaient en parfaite santé (pas d'utilisation d'antibiotiques) et la structure poreuse n'est pas altérée comme nous pouvons le voir sur la figure II.4.37.A.

Nous constatons la formation d'une capsule fibrotique autour de la fibre, notamment visible par la présence de cellules géantes sur les figures II.4.37.C et D. Même si la biocompatibilité de la fibre modifiée est avérée, sa présence dans l'organisme des souris a néanmoins activé les macrophages qui l'ont isolée. Afin de retarder ce processus, des tests ont été réalisés *in vitro* avec la MSH (melanocyte stimulating hormone) connue pour son action anti-inflammatoire [69-72] : nous avons constaté que sa présence à la surface de la fibre permet de retarder l'activation des macrophages et donc la formation de la capsule fibrotique. Cette fonctionnalisation pourra être effectuée lors de futures implantations pour améliorer la durée de vie des bioélectrodes.

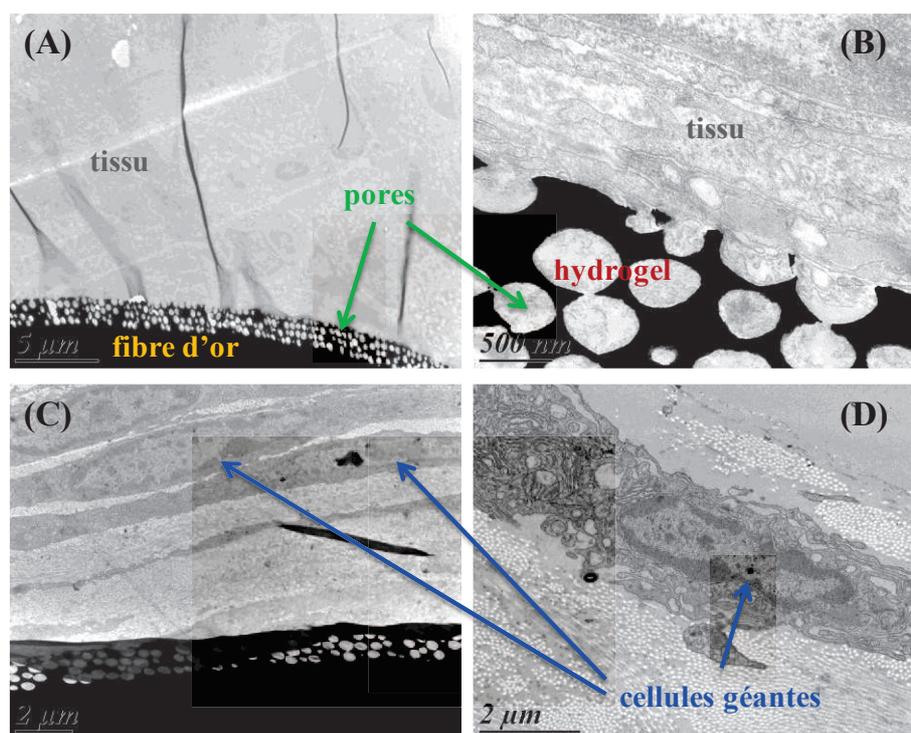


Figure II.4.37 : Coupes histologiques réalisées après 8 semaines d'implantation des fibres d'or poreuses modifiées à différents grossissements.

4.5. Conclusion intermédiaire

Après optimisation nous avons montré l'efficacité des fibres d'or poreuses comme matériau d'électrode. Bien que la stabilité reste encore à améliorer, un important courant de réduction de l'oxygène a pu être obtenu dans du sang humain.

Parmi toutes les techniques utilisées, la co-électrodéposition semble une voie très prometteuse pour l'amélioration des performances de la biocathode tant au niveau de la catalyse que de la stabilité.

L'ensemble des tests biologiques effectués *in vitro* démontrent la bonne biocompatibilité de la biocathode. Aucune cytotoxicité n'a pu être attribuée à l'électrode ou à l'hydrogel. Concernant les mécanismes inflammatoires, la formation d'une capsule fibrotique ainsi que l'activation des plaquettes ont été observées, réduisant la durée de fonctionnement de l'électrode mais confirmant l'innocuité du système.

L'implantation de l'électrode dans des souris a confirmé la formation de la fibrose bien qu'aucun signe apparent d'inflammation ne soit observé sur les animaux, toujours en bonne santé après 8 semaines. Une alternative résiderait dans l'utilisation d'une monocouche de MSH, efficace pour retarder l'activation des plaquettes et des macrophages, et ainsi augmenter la durée de vie de l'électrode dans l'organisme.

5. Conclusion

La BOD *Mo* s'est révélée être très efficace pour la réduction de l'oxygène en eau. En effet, après optimisation elle a permis de produire un courant de réduction 9 fois plus élevé que pour la BOD de *Myrothecium verrucaria* qui est la seule BOD actuellement commercialisée. Les différentes optimisations réalisées ont permis de définir les conditions optimales d'utilisation de cette enzyme en électrochimie comme cela avait été fait pour les 3 autres BODs. Tout d'abord la composition optimale de l'hydrogel a été déterminée puis nous nous sommes intéressés à l'influence du taux de recouvrement ainsi que des conditions de séchage de l'hydrogel. Pour finir nous avons étudié les conditions expérimentales, c'est-à-dire le pH, la température et la conductivité du tampon de mesure. Dans ce dernier cas nous avons pu mettre en évidence que la conductivité du tampon a une influence sur l'effet du chlore au niveau de l'hydrogel. Il semblerait que l'inhibition de l'enzyme par le chlore augmente avec la conductivité du milieu.

Par la suite nous avons essayé d'augmenter l'activité catalytique de l'enzyme par la création de nanofleurs issues de la co-précipitation d'enzyme, de cuivre et de phosphate. Malgré l'obtention de microstructures conformes à nos attentes, nous n'avons pas obtenu de résultat prouvant une quelconque amélioration de l'activité ou de la stabilité des nanofleurs par rapport à l'enzyme libre.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur la synthèse de différents polymères rédox.

Dans un premier temps nous avons fait varier la concentration en complexes d'osmiums fixés sur le même copolymère. Il est apparu qu'une optimisation des conditions de couplage a permis d'augmenter la concentration en osmiums greffés résultant en une hausse du coefficient de diffusion des électrons au sein de l'hydrogel. Cela s'est traduit par le triplement du courant de réduction de l'oxygène produit par une électrode à base de BOD *Mo*.

Dans un second temps nous avons fait varier la composition du copolymère en modulant les proportions de chacun des monomères introduits lors de la polymérisation. Grâce à la résolution de l'équation de Mayo-Lewis, nous avons pu confirmer que les copolymères obtenus étaient de type alterné avec une composition finale très proche de celle souhaitée. Néanmoins, la mesure des concentrations en osmiums greffés sur chacun a montré une divergence par rapport à la théorie : une augmentation du nombre de sites de greffage potentiels de l'osmium n'a pas entraîné une augmentation du nombre d'osmium réellement fixés. Ceci peut être expliqué par la trop grande présence de groupements stériquement

encombrants (imidazole) gênant le couplage des osmiums. En calculant les coefficients de diffusion apparents des électrons pour chaque polymère rédox, nous avons constaté que les meilleures valeurs étaient obtenues pour celui ayant le moins d'imidazole et donc peu d'osmium ; au contraire les moins bonnes valeurs correspondent au polymère rédox contenant le plus d'imidazole. Le fait qu'il y ait moins de groupements encombrants doit favoriser l'interaction avec l'enzyme et le mouvement des complexes d'osmium donnant ainsi un transfert électronique très efficace. De plus, nous avons déjà observé que les Cu des laccases pouvaient être complexés par les motifs pyridine et imidazole des polymères, réduisant les performances catalytiques de l'enzyme. Il est possible que le même phénomène se produise entre la BOD et les imidazoles du PAA-PVI lorsque ces derniers sont présents en grande quantité comme dans le polymère rédox 1:2.

Pour finir nous avons pu tester notre système sur une fibre d'or poreuse. Après plusieurs optimisations, une densité de courant de $155 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ a été obtenue par co-électrodeposition. Malgré différents essais, nous ne sommes pas parvenus à augmenter la stabilité de la biocathode mais il est presque certain que l'optimisation de la technique d'électrodeposition de l'hydrogel permettrait de résoudre ce problème.

Les mesures effectuées dans du sang humain montrent certes la réduction de l'oxygène mais également l'oxydation d'une substance non identifiée adsorbée sur l'or. Après 2h de chronoampérométrie seulement 15% des 30% de perte de courant sont dus à la dégradation de l'enzyme, les 85 % restants étant attribués à la perte en polymère rédox.

Nous avons eu l'opportunité de réaliser des tests de cytotoxicité et d'activation de la réaction inflammatoire sur la cathode. Aucune cytotoxicité n'a été observée pour l'hydrogel ni pour l'électrode. De même, nous n'avons pas constaté d'activation du système du complément mais il y a eu une légère activation des plaquettes et des macrophages. Cela s'est notamment traduit par la formation d'une capsule fibrotique autour de la cathode après 8 semaines d'implantation dans des souris. Pour de futures implantations il faudra envisager l'utilisation de fonctions biocompatibles sur la fibre permettant de retarder la fibrose.

La cathode conçue à base de BOD *Mo* étant hautement efficace, le chapitre suivant se concentre sur l'élaboration et l'optimisation d'une biopile utilisant cette cathode. L'originalité du travail qui sera présenté réside dans le fait que les mesures aient été en partie réalisées dans du sang humain. Ainsi avec l'implantation dans des souris, ces tests constituent un nouveau pas concret vers l'implantation de la biopile enzymatique à glucose/oxygène.

6. Références bibliographiques

1. Mano, N., *Features and applications of bilirubin oxidases*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. **96**(2): p. 7.
2. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Magnaporthe oryzae: an attractive new enzyme for biotechnological applications*. Appl Microbiol Biotechnol, , 2012. **96**(6): p. 1489-1498.
3. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Bacillus pumilus: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 7.
4. Edembe, L., et al., *A highly efficient O₂ cathode based on bilirubin oxidase from Bacillus pumilus operating in serum*. Electrochemistry Communications, 2013. **23**: p. 80-82.
5. Edembe, L., et al., *A highly efficient O₂ cathode based on bilirubin oxidase from Bacillus pumilus operating in serum*. Electrochemistry Communications, 2012. **23**: p. 3.
6. Suraniti, E., et al., *Heat and drying time modulate the O₂ reduction current of modified glassy carbon electrodes with bilirubin oxidases*. Bioelectrochemistry, 2012. **88**: p. 5.
7. Suraniti, E., et al., *Thermophilic biocathode with bilirubin oxidase from Bacillus pumilus*. Electrochemistry Communications, 2013. **26**: p. 4.
8. Tsujimura, S., et al., *Oxygen reduction reactions of the thermostable bilirubin oxidase from Bacillus pumilus on mesoporous carbon-cryogel electrodes*. Electrochimica Acta, 2014. **117**: p. 263-267.
9. Talbot, N.J., *On the trail of a cereal killer : Exploring the biology of Magnaporthe grisea*. Annual Review of Microbiology, 2003. **57**(117-202).
10. Mano, N., et al., *An Oxygen Cathode Operating in a Physiological Solution*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(22): p. 6480-6486.
11. Bard, A.J. and L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley, New York, 1980.
12. Bard, A.J., M. Stratmann, and G.S. Wilson, *Bioelectrochemistry, Volume 9*. Encyclopedia of Electrochemistry, Eds Wiley-VCH, 2002.
13. Léger, C. and P. Bertrand, *Direct Electrochemistry of Redox Enzymes as a Tool for Mechanistic Studies*. Chemical Reviews, 2008. **108**: p. 2379-2438.
14. Mano, N., H.-H. Kim, and A. Heller, *On the Relationship between the Characteristics of Bilirubin Oxidases and O₂ Cathodes Based on Their "Wiring"*. Journal of Physical Chemistry, 2002. **106**: p. 8842-8848.
15. Suraniti, E., et al., *Heat and drying time modulate the O₂ reduction current of modified glassy carbon electrodes with bilirubin oxidases*. Bioelectrochemistry, 2012. **88**: p. 65-69.
16. Mano, N., F. Mao, and A. Heller, *On the parameters affecting the characteristics of the "wired" glucose oxidase anode*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2005. **574**(2): p. 347-357.
17. Binyamin, G. and A. Heller, *Stabilization of Wired Glucose Oxidase Anodes Rotating at 1000 rpm at 37°C*. Journal of the Electrochemical Society, 1999. **146**(8): p. 2965-2967.
18. Heller, A., *Electron-conducting redox hydrogels: design, characteristics and synthesis*. Current Opinion in Biotechnology, 2006. **10**(6): p. 664-672.

19. Ju, H., Y. Gong, and H. Zhu, *Electrolyte Effects on Electrochemical Properties of Osmium Complex Polymer Modified Electrodes*. Analytical sciences, 2001. **17**: p. 59-63.
20. Lewenstam, A. and L. Gorton, *Electrochemical Processes in Biological Systems*. John Wiley & Sons, 2015.
21. Ge, J., J. Lei, and R.N. Zare, *Protein-inorganic hybrid nanoflowers*. Nature Nanotechnology, 2012. **7**: p. 428-432.
22. Wang, L.-B., et al., *A New Nanobiocatalytic System Based on Allosteric Effect with Dramatically Enhanced Enzymatic Performance*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**: p. 1272-1275.
23. Song, Y., et al., *Controlled synthesis of 2-D and 3-D dendritic platinum nanostructures*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**: p. 635-645.
24. Narayanaswamy, A., et al., *Formation of nearly monodisperse In₂O₃ nanodots and oriented-attached nanoflowers: hydrolysis and alcoholysis vs pyrolysis*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**: p. 10310-10319.
25. Sun, Z., et al., *Rational design of 3D dendritic TiO₂ nanostructures with favorable architectures*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**: p. 19314-19317.
26. Lim, B., et al., *Pd-Pt bimetallic nanodendrites with high activity for oxygen reduction*. Science, 2009. **324**: p. 1302-1305.
27. Mohanty, A., N. Garg, and R. Jin, *A universal approach to the synthesis of noble metal nanodendrites and their catalytic properties*. Angewandte Chemie, 2010. **49**: p. 4962-4966.
28. Xie, J., et al., *The synthesis of SERS-active gold nanoflower tags for in vivo applications*. ACS Nano, 2008. **2**: p. 2473-2480.
29. Jia, W., L. Su, and Y. Lei, *Pt nanoflower/polyaniline composite nanofibers based urea biosensor*. Biosensors & Bioelectronics, 2011. **30**: p. 158-164.
30. Suraniti, E., et al., *Uncovering and redesigning a key amino acid of glucose oxidase*. Electroanalysis, 2013. **25**(3): p. 606-611.
31. Murugesan, K., et al., *Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from Ganoderma lucidum*. Journal of Hazardous Materials, 2009. **168**(1): p. 523-529.
32. Blauch, D.N. and J.-M. Saveant, *Dynamics of electron hopping in assemblies of redox centers. Percolation and diffusion*. J. Am. Chem. Soc. , 1992. **114**(3323-3332).
33. Blauch, D.N. and J.-M. Saveant, *Effects of long-range electron transfer on charge transport in static assemblies of redox centers*. Journal of Physical Chemistry, 1993. **97**: p. 6444-6448.
34. Gallaway, J. and S.C. Barton, *Effect of redox polymer synthesis on the performance of a mediated laccase oxygen cathode*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2009. **626**: p. 149-155.
35. Mano, N., F. Mao, and A. Heller, *Electro-oxidation of glucose at an increased current density at a reducing potential*. Chemical Communications, 2004: p. 2116-2117.
36. Cadet, M., et al., *Design of a Highly Efficient O₂ Cathode Based on Bilirubin Oxidase from Magnaporthe oryzae*. ChemPhysChem, 2013. **14**(10): p. 2097-2100.
37. Mercier, J.-P. and E. Maréchal, *Chimie des polymères: synthèses, réactions, dégradations*. Presses polytechniques et universitaires romandes, 1996.
38. Ponomarenko, V., *The Mayo-Lewis Copolymerization Model*. CSRC Colloquium Series, Department of Mathematics and Statistics of San Diego State University, 2007.
39. Liu, P., L. Zhang, and L. Liu, *Determination of acrylamide in potato chips by high-performance liquid chromatography coupled to diode array detection*. <http://www.chemistrymag.org/cji/2008/102009pe.htm>, 2008. **10**(2): p. 9.
40. Bekturov, E.A. and S.E. Kudaibergenov, *Catalysis by polymers*. Wiley-VCH, 1st edition, 1998.

41. Yamashita, N., et al., *Conformational and neighboring effects in graft polymerization of acrolein on 4(5)-vinylimidazole-acrylamide copolymer*. Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition, 1983. **21**(1): p. 191-196.
42. Gounel, S., et al., *Increasing the specific activity of bilirubin oxidase from Bacillus pumilus by improving the production*. soumis, 2015.
43. Karajic, A., et al., *Bottom-up Generation of Miniaturized Coaxial Double Electrodes with Tunable Porosity*. Advanced Materials Interfaces, 2015. **2**: p. 1-5.
44. Ben-Ali, S., et al., *Electrocatalysis with monolayer modified highly organized macroporous electrodes*. Electrochemistry Communications, 2003. **5**(9): p. 747-751.
45. Szamocki, R., et al., *Macroporous ultramicroelectrodes for improved electroanalytical measurements*. Analytical Chemistry, 2006. **79**(2): p. 533-539.
46. Heim, M., et al., *Engineering of Complex Macroporous Materials Through Controlled Electrodeposition in Colloidal Superstructures*. Advanced Functional Materials, 2012. **22**(3): p. 538-545.
47. Stöber, W., A. Fink, and E. Bohn, *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*. Journal of Colloid and Interface Science, 1968. **26**(1): p. 62-69.
48. Bogush, G.H., M.A. Tracy, and C.F. Zukoski IV, *Preparation of monodisperse silica particles: Control of size and mass fraction*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1988. **104**(1): p. 95-106.
49. Salaj-Kosla, U., et al., *Direct electron transfer of bilirubin oxidase (Myrothecium verrucaria) at an unmodified nanoporous gold biocathode*. Electrochemistry Communications, 2012. **16**: p. 92-96.
50. Gregg, B.A. and A. Heller, *Redox polymer films containing enzymes. 2. Glucose oxidase containing enzyme electrodes*. Journal of Physical Chemistry, 1991. **95**(15): p. 5970-5975.
51. Schuhmann, W., *Amperometric enzyme biosensors based on optimised electron-transfer pathways and non-manual immobilisation procedures*. Reviews in Molecular Biotechnology, 2002. **82**: p. 425-441.
52. Gao, Z., et al., *Electrodeposition of Redox Polymers and Co-electrodeposition of Enzymes by Coordinative Crosslinking*. Angewandte Chemie, 2002. **41**(5): p. 810-813.
53. Ammam, M., *Electrochemical and electrophoretic deposition of enzymes: Principles, differences and application in miniaturized biosensor and biofuel cell electrodes*. Biosensors & Bioelectronics, 2014. **58**: p. 121-131.
54. Zebda, A., et al., *Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices*. Scientific Reports, 2013. **3**(1516): p. 1-5.
55. Bindra, D.S., Y. Zhang, and G.S. Wilson, *Design and in Vitro Studies of a Needle-Type Glucose Sensor for Subcutaneous Monitoring*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(17): p. 1692-1696.
56. Doumas, B.T., *Standards for Total Serum Protein Assays - A Collaborative Study*. Clinical Chemistry, 1975. **21**(8): p. 1159-1166.
57. Falch, J.A., M. Mowé, and T. Bohmer, *Low levels of serum ascorbic acid acid in elderly patients with hip fracture*. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, 1998. **58**(3): p. 225-228.
58. Moussy, F., et al., *Performance of subcutaneously implanted needle-type glucose sensors employing a novel trilayer coating*. Anal Chem, 1993. **65**(15): p. 2072-7.
59. R., A., R. Garjonyté, and A. Malinauskas, *Rotating disk electrode study of electrocatalytic oxidation of ascorbate at Prussian blue modified electrode*. Central European Journal of Chemistry, 2009. **7**(4): p. 739-744.

60. Raj, R.C. and T. Ohsaka, *Electroanalysis of ascorbate and dopamine at a gold electrode modified with a positively charged self-assembled monolayer*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2001. **496**: p. 44-49.
61. FDA, *Use of International Standard ISO-10993, 'Biological Evaluation of Medical Devices* 2014.
62. Barlovatz-Meimon, G. and X. Ronot, *Partie II : Techniques et méthodes - Chapitre 10 : Viabilité, cytotoxicité, génotoxicité*. Culture de cellules animales, 3ème édition, ISBN 978-2-7430-1989-1, 2014.
63. Ishiyama, M., et al., *A Combined Assay of Cell Viability and in Vitro Cytotoxicity with a High Water-Soluble Tetrazolium Salt, Neutral Red and Crystal Violet*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1996. **19**(11): p. 1518-1520.
64. Borenfreund, E., H. Babich, and N. Martin-Alguacil, *Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests*. Toxicology In Vitro, 1988. **2**(1): p. 1-6.
65. Dragon-Durey, M.-A., et al., *Le système du Complément*. Association des collèges des enseignants d'immunologie des universités de langue française, 2013.
66. Mayer, G. and D. Hudrisier, *Immunologie - Chapitre 2 : le complément*. <http://www.microbiologybook.org/French-immuno/immchapter2.htm>, 2012.
67. Gachet, C., *Les mécanismes moléculaires de l'activation plaquettaire*. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 2013. **197**(2): p. 361-373.
68. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang, *Foreign body reaction to biomaterials*. Seminars in immunology, 2008. **20**(2): p. 86-100.
69. Luger, T.A. and T. Brzoska, *alpha-MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs*. Ann Rheum Dis, 2007. **66 Suppl 3**: p. iii52-5.
70. Colombo, G., et al., *Anti-inflammatory effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone in celiac intestinal mucosa*. Neuroimmunomodulation, 2002. **10**(4): p. 208-16.
71. Singh, M. and K. Mukhopadhyay, *Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone: An Emerging Anti-Inflammatory Antimicrobial Peptide*. BioMed Research International, 2014. **2014**(ID874610): p. 10.
72. Rajora, N., et al., *α-MSH Modulates Local and Circulating Tumor Necrosis Factor-α in Experimental Brain Inflammation*. The Journal of Neuroscience, 1997. **17**(6): p. 2181-2186.

CHAPITRE III :
LA BIOPILE ENZYMATIQUE A
GLUCOSE/OXYGENE

Sommaire

1. Introduction	207
2. Mise au point de l'anode	208
2.1. Anode à base de glucose déshydrogénase (GDH)	208
2.1.1. Caractérisation de la GDH en solution	208
2.1.2. Mesures électrochimiques de la GDH	209
2.1.2.1. Conditions de séchage	209
2.1.2.2. Composition de l'hydrogel	210
2.2. Anode à base de glucose oxydase (GOx)	211
2.3. Calibration de la GOx et la GDH dans le glucose	212
2.3.1. Géométrie de l'électrode et diffusion	212
2.3.2. Effet de la géométrie de l'électrode sur la calibration dans le glucose pour les hydrogels à base de GDH et de GOx	213
2.4. Conclusion intermédiaire	215
3. Optimisation de biopiles dans le tampon	216
3.1. Optimisation du taux de recouvrement sur fibres de carbone	216
3.2. La biopile à base de GDH et BOD de <i>Magnaporthe oryzae</i>	217
3.2.1. Effet du tampon de mesure	217
3.2.1.1. Sur la catalyse	217
3.2.1.2. Sur la puissance	218
3.2.1.3. Sur la stabilité	219
3.2.2. Calibration dans le glucose	220
3.2.3. Utilisation de membranes protectrices	221
3.2.3.1. Description des différents types de membranes	221
3.2.3.2. Comparaison de l'effet des 3 types de membranes	222
3.2.4. Augmentation de la réticulation	223
3.2.5. Influence du polymère rédox	224
3.3. Les autres biopiles	225
	203

3.3.1.	Catalyse des différentes anodes et cathodes.....	225
3.3.2.	Puissance	226
3.3.3.	Stabilité.....	228
3.3.4.	Conclusion sur les différentes biopiles.....	228
3.3.5.	La question du H ₂ O ₂	229
3.4.	Conclusion intermédiaire.....	230
4.	La biopile dans le sang	231
4.1.	Caractérisation des échantillons de sang	231
4.1.1.	Les différentes cellules du sang	231
4.1.2.	Préparation des produits sanguins labiles.....	232
4.1.3.	Molécules particulières entrant dans la composition du sang	237
4.1.3.1.	Molécules d'intérêt	237
4.1.3.2.	Interférents notoires	237
4.1.4.	Paramètres physiologiques du sang.....	238
4.2.	Mesures préliminaires.....	238
4.2.1.	Protocole d'expérimentation dans le sang.....	238
4.2.2.	L'oxygénation du sang	239
4.2.3.	Catalyses et courbe de puissance typiques	240
4.3.	Utilisation de membranes protectrices	242
4.4.	La biopile GDH/BOD de <i>Magnaporthe oryzae</i> dans plusieurs échantillons de sang	243
4.4.1.	Mesures préliminaires dans le sang.....	244
4.4.2.	Optimisation de la cathode	244
4.4.3.	Mesures dans le sang : dosage de la glycémie	246
4.5.	Stabilité de la biopile dans le sang : effet de l'utilisation de sacs de dialyse	247
4.5.1.	Sur 6h de fonctionnement continu	247
4.5.2.	Sur les signaux des polymères rédox	248
4.5.3.	Sur le courant	249

4.5.4.	Sur la puissance	251
4.5.5.	Réflexion sur le caractère inhibiteur du sang	252
4.5.6.	Effet de la consommation en glucose et en oxygène de la biopile.....	254
4.6.	Comparaison des différentes biopiles dans le sang	255
4.7.	Conclusion intermédiaire.....	257
5.	Conclusion.....	259
6.	Références bibliographiques	261

1. Introduction

De nombreux articles sont publiés chaque année sur les biopiles enzymatiques à glucose/O₂. Les enzymes utilisées sont très variées (cf Chapitre I pp 58-70) mais le plus fréquemment ce seront la laccase ou la BOD pour la cathode et la GOx ou la GDH pour l'anode. De même, les électrodes sont constituées de tous types de matériaux souvent poreux, à base de nanotubes de carbone ou de nanoparticules métalliques, pour augmenter la surface spécifique. Les différents systèmes conçus sont généralement testés dans des conditions de type physiologique, c'est-à-dire dans un électrolyte salin à pH neutre et température proche de 37°C.

Néanmoins, le but commun de ces biopiles est l'implantation dans l'organisme pour alimenter des capteurs biomédicaux de petite échelle. Il paraît donc essentiel de franchir le cap du « tampon physiologique » pour passer aux mesures dans de vrais fluides biologiques. Une dizaine d'exemples de biopiles fonctionnant dans du sérum humain ont été rapportés [1-11] mais seulement 3 articles font état de biopiles opérant dans du sang humain [12-14], avec des performances relativement faibles (entre 2,8 et 25 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$). C'est pourquoi nous nous proposons ici de réaliser l'optimisation de biopiles enzymatiques dans du sang humain. En outre, notre biopile utilisera à la cathode la BOD de *Magnaporthe oryzae* dont les performances décrites dans le chapitre II sont très prometteuses. Cette enzyme ayant été identifiée très récemment [15] il n'a pour l'instant pas été rapporté de biopile qui l'utilise comme enzyme cathodique.

Ce chapitre se composera donc de trois parties principales.

Tout d'abord nous mettrons au point une anode à combiner avec la cathode développée dans le chapitre précédent. Bien que notre choix principal se fasse sur la GDH car très active, nous étudierons également la GOx qui est plus thermostable.

Ensuite nous réaliserons l'optimisation de la biopile en milieu pseudo physiologique. Après des tests dans différents tampons, nous essaierons d'augmenter sa stabilité par diverses techniques, la plus intéressante étant l'utilisation de membranes protectrices.

Enfin, des mesures seront effectuées dans plusieurs échantillons de sang humain afin d'étudier la réponse de la biopile en fonction de la glycémie. En effet, nous souhaitons voir si, en plus de la simple production d'électricité, notre biopile est capable de jouer le rôle d'un biocapteur en dosant elle-même le glucose sanguin ; l'hypothèse étant que le courant anodique et donc la puissance de la biopile soit proportionnelle à la concentration en glucose.

2. Mise au point de l'anode

2.1. Anode à base de glucose déshydrogénase (GDH)

2.1.1. Caractérisation de la GDH en solution

La glucose déshydrogénase (GDH) d'*Acinotobacter calcoaceticus* est utilisée pour l'oxydation du glucose en gluconolactone en utilisant le PQQ comme cofacteur ; elle est produite et purifiée directement au sein de notre laboratoire de biologie [16].

Pour l'ensemble des expériences réalisées et présentées ci-après, le même lot de GDH a été utilisé, avec les caractéristiques suivantes :

- Activité spécifique = 8330 ± 700 U/mg
- $k_{cat} = 7016 \pm 580$ s⁻¹
- $\frac{DO_{338}}{DO_{280}} = 0,46$

Ce dernier ratio correspond au rapport des absorbances à 280 et 338 nm : à 280 nm se trouve le signal des protéines et à 338 nm celui du PQQ réduit (PQQH₂) en présence de glucose. En effet, l'enzyme est produite sous sa forme apo, sans PQQ (courbe bleue), puis elle est reconstituée dans un second temps. Le PQQ incorporé est sous forme oxydée et n'absorbe pas, comme nous pouvons le voir sur la figure III.2.1 (courbe rouge). L'ajout de glucose entraîne la réduction du PQQ (courbe verte) qui va rester bloqué dans cet état car la GDH ne va pas pouvoir être régénérée en l'absence d'autre espèce rédox. Le ratio $\frac{DO_{338}}{DO_{280}}$ nous donne donc une idée du taux de reconstitution de la GDH.

La PQQ-GDH contient aussi des ions Ca²⁺ dans son site actif qui sont indispensables à son bon fonctionnement. Avec cette enzyme nous travaillerons donc dans du tampon 20 mM Pipes + 3 mM CaCl₂ qui permet d'obtenir les meilleures performances catalytiques.

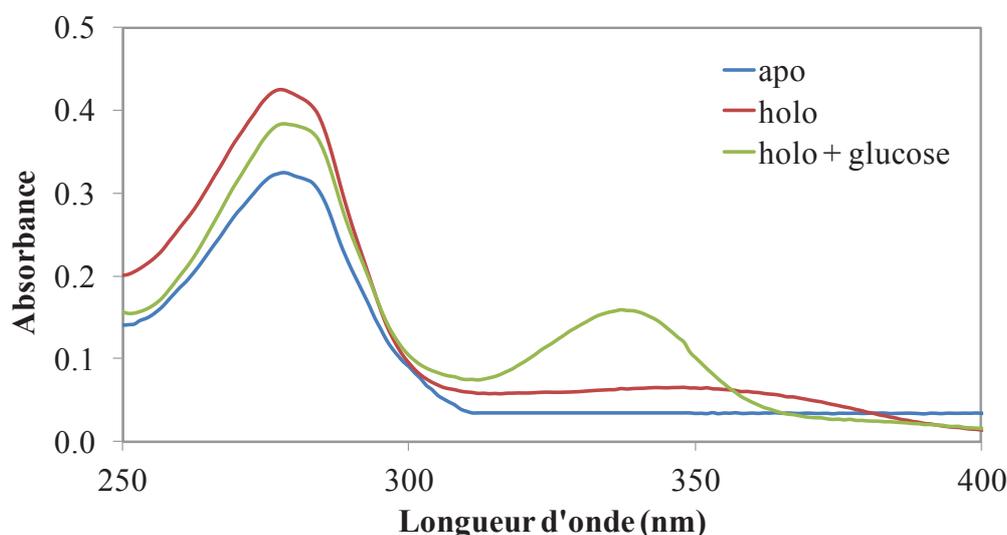


Figure III.2.1 : Spectres d'absorbance de la GDH apo, holo et holo en présence de glucose.

2.1.2. Mesures électrochimiques de la GDH

Pour l'ensemble des tests en électrochimie sur la GDH (idem pour la GOx) les hydrogels ont été préparés comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes 2.3 pour les électrodes de carbone vitreux et 2.8. pour les fibres de carbone. Le polymère rédox utilisé est le PVP-[Os(1,1'-diméthyl-2,2'-bisimidazole)₂-2-(6-méthylpyridin-2-yl)imidazole]^{2+/3+} avec un potentiel de + 0,03 V vs. Ag/AgCl.

2.1.2.1. Conditions de séchage

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, les conditions de séchage de l'hydrogel ont une grande influence sur ses performances. Nous avons donc testé un séchage de 18h à 4°C ou 4h à 25°C pour l'hydrogel à base GDH (figure III.2.2).

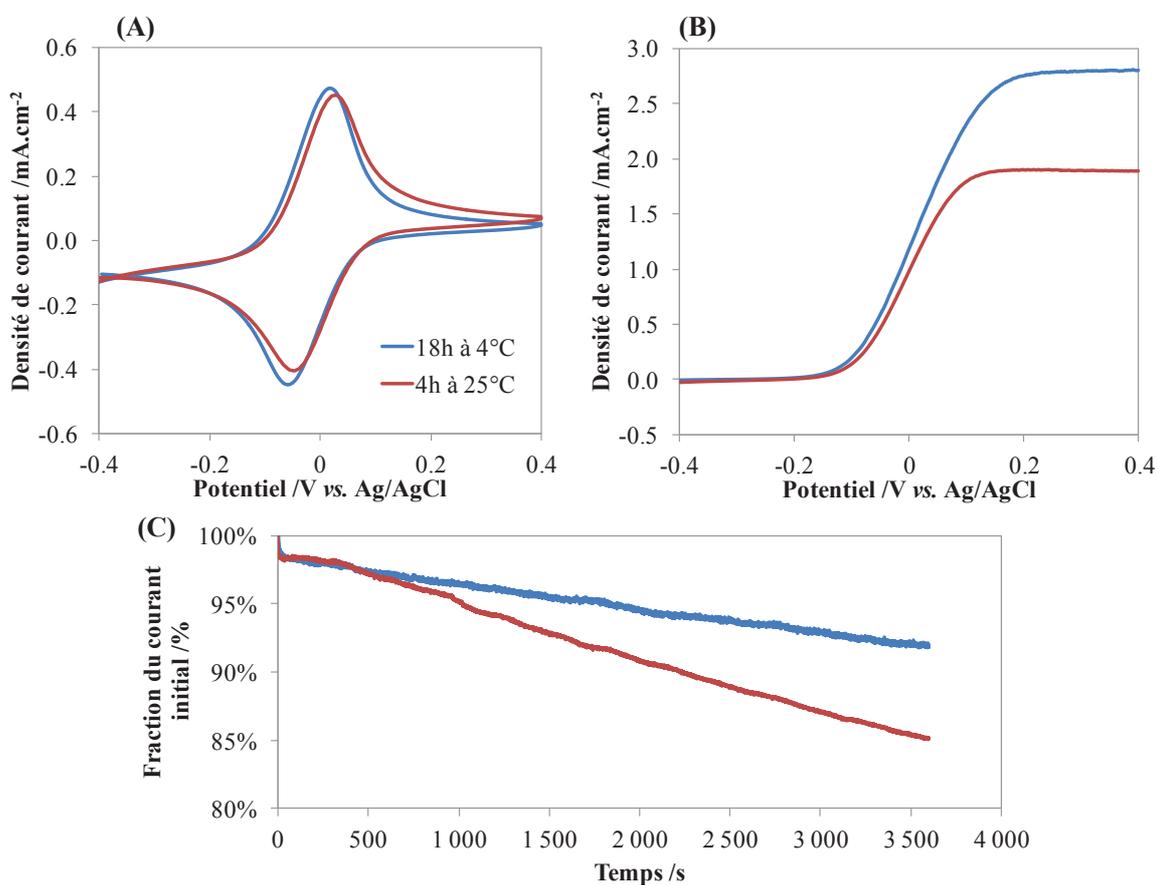


Figure III.2.2 : Densité de courant en fonction du potentiel pour un hydrogel avec 72% polymère rédox, 22% GDH et 6% PEGDGE, sur électrode de carbone vitreux, taux de recouvrement de 108 μg.cm⁻². Séchage 18h à 4°C (bleu) ou 4h à 25°C (rouge), mesure dans Pipes 20 mM + CaCl₂ 3 mM pH 7,2 (A) à 100 mV/s sous Ar, (B) à 5 mV/s sous Ar + 50mM glucose, (C) chronoampérométrie 1h sous Ar + 50 mM glucose à +0,3V vs. Ag/AgCl ; rotation à 500 rpm.

D'après les figures III.2.2.A et B nous voyons qu'à 4°C, la formation de l'hydrogel semble meilleure puisque le signal du polymère est plus grand. La largeur à mi-hauteur du pic d'oxydation est identique pour les deux conditions de séchage donc l'interaction enzyme/polymère n'est pas affectée. Cependant, l'augmentation de l'aire sous le pic implique qu'une plus grande quantité de complexes d'osmium est connectée après un séchage de 18h à 4°C. Cette hausse de centres rédox connectés est néanmoins trop faible pour expliquer l'augmentation du courant d'oxydation du glucose de presque 30%. Tout comme pour la BOD *Mo*, il semble qu'un séchage à 4°C permette de mieux conserver l'activité enzymatique qu'à 25°C.

La figure III.2.2.C nous montre qu'il y a également un gain au niveau de la stabilité de l'hydrogel car après 1h de chronoampérométrie la perte de courant est doublée pour un séchage de 4h à 25°C.

Pour la suite des expérimentations utilisant la GDH, le temps de séchage de l'hydrogel est donc fixé à 18h à 4°C.

2.1.2.2. Composition de l'hydrogel

Nous nous sommes ensuite intéressés à la composition de l'hydrogel. Nous avons fait varier le pourcentage massique d'enzyme de 15 à 40%*m*, en adaptant la proportion de médiateur et en gardant constante celle d'agent réticulant à 6%*m*.

Nous constatons sur la figure III.2.3.A que nous avons bien une augmentation du signal avec la proportion du médiateur, et donc lorsqu'on diminue le pourcentage de GDH.

Concernant l'évolution de la densité de courant avec le pourcentage massique d'enzyme (figure III.2.3.B) nous obtenons une courbe en cloche (parabolique) comme c'était le cas pour la BOD *Mo*. Le maximum est atteint pour 22%*m* d'enzyme : en dessous la proportion d'enzyme est insuffisante malgré un bon transfert électronique assuré par la grande quantité de polymère rédox alors qu'au dessus la proportion d'enzyme est trop grande par rapport au polymère rédox qui ne peut pas prendre en charge la totalité des électrons générés.

La composition de l'hydrogel à base de GDH pour le reste des expérimentations présentées dans ce chapitre est donc fixée à 72%*m* de polymère rédox, 22%*m* de GDH et 6%*m* d'agent réticulant.

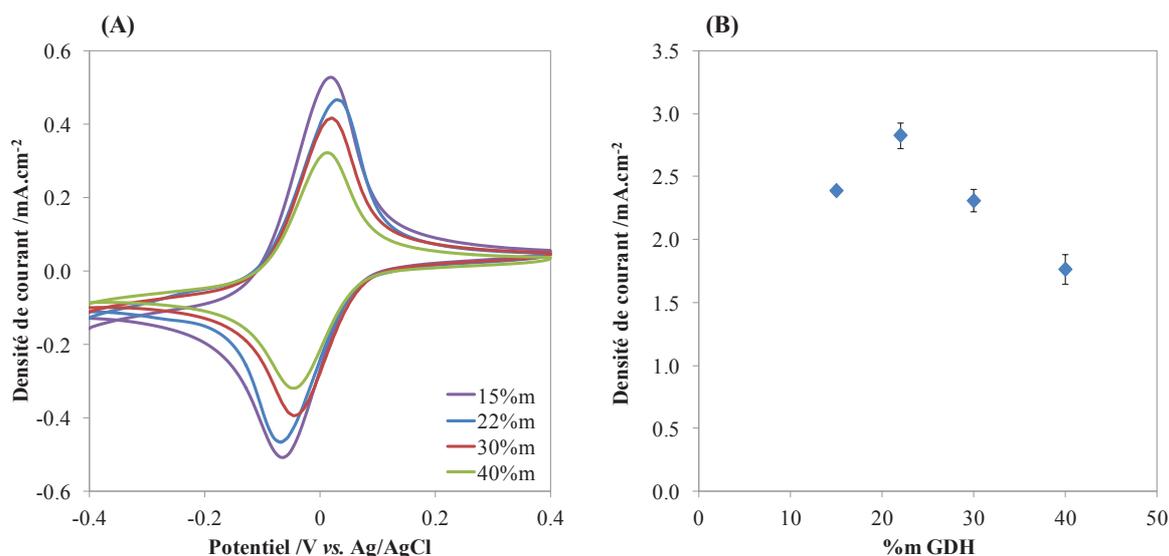


Figure III.2.3 : Densité de courant en fonction du % massique de GDH dans l'hydrogel, taux de recouvrement de 108 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. Séchage 18h à 4°C puis mesure dans Pipes 20 mM + CaCl₂ 3 mM pH 7,2 (A) à 100 mV/s sous Ar, (B) à 5 mV/s sous Ar + 50 mM glucose ; rotation à 500 rpm.

2.2. Anode à base de glucose oxydase (GOx)

La glucose oxydase (GOx) utilisée est celle d'*Aspergillus niger*. Produite par Sigma Aldrich, elle est ensuite purifiée et caractérisée sur place au sein de notre laboratoire [17].

L'optimisation de ses conditions d'utilisation en électrochimie ayant déjà été réalisée nous nous sommes donc basés sur ces résultats [18]. Ainsi, l'hydrogel est composé de 55%_m de polymère rédox, 35%_m de GOx et 10% d'agent réticulant, le polymère utilisé étant le même que pour la GDH. Le séchage de l'hydrogel est fixé à 18h à 4°C et le tampon de mesure est le PBS pH 7,2. En effet, il semble que la présence de chlore améliore l'activité catalytique de la GOx ou l'interaction enzyme/polymère comme nous l'avons déjà observé pour la BOD *Bp*.

La figure III.2.4.A nous montre que le signal du polymère est plus faible, ce qui est logique car la proportion de polymère rédox est plus faible (55%_m contre 72%_m). De plus, la GOx est moins active que la GDH car elle présente une activité spécifique autour de 500 U/mg, ce qui rejoint la comparaison des constantes catalytiques que nous avons faite dans le chapitre I. Nous pouvons d'ailleurs voir sur la figure III.2.4.B que le courant d'oxydation du glucose est divisé par 2.

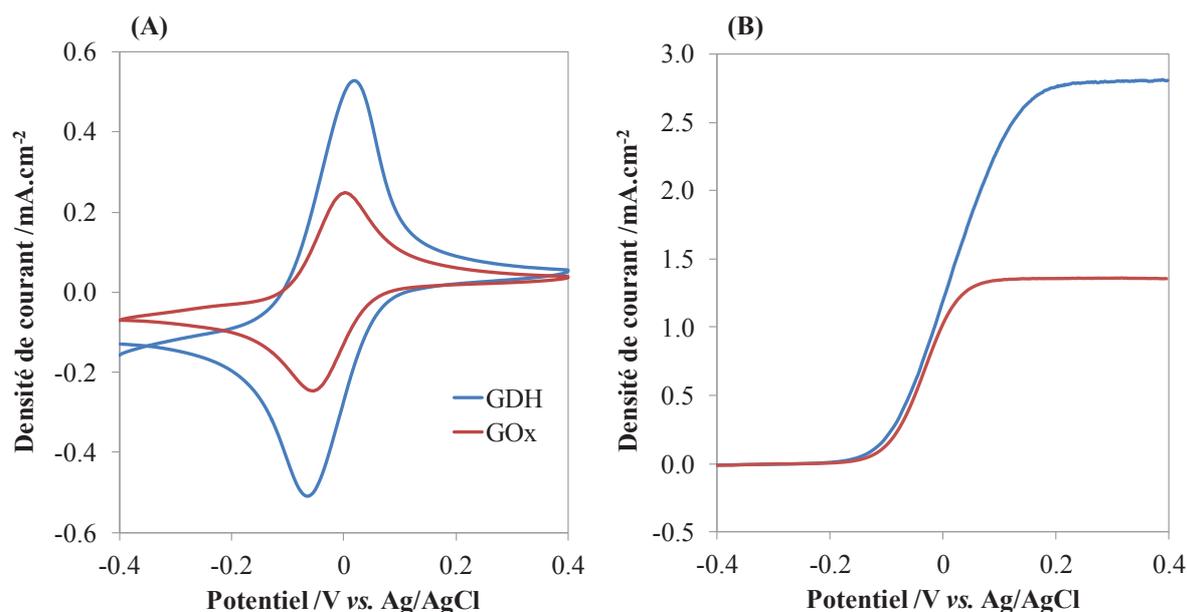


Figure III.2.4 : Comparaison des densités de courant en fonction du potentiel pour des hydrogels à base de GDH (22%) et GOx (35%) sur électrode de carbone vitreux, taux de recouvrement de $108 \mu\text{g.cm}^{-2}$. Séchage 18h à 4°C et mesure dans Pipes 20 mM + CaCl_2 3 mM pour GDH et PBS pour GOx, pH 7,2 à $37,5^\circ\text{C}$ et 500 rpm, (A) à 100 mV/s sous Ar et (B) à 5 mV/s sous Ar + 50 mM glucose.

2.3. Calibration de la GOx et la GDH dans le glucose

Afin de tester leur efficacité, les 2 enzymes anodiques ont été testées en électrochimie pour différentes concentrations en glucose, un intérêt particulier étant porté sur les faibles concentrations afin de repérer leur limite de détection. Cette expérience a été réalisée sur carbone vitreux et sur fibre de carbone car la biopile finale sera conçue sur fibres de carbone.

2.3.1. Géométrie de l'électrode et diffusion

En théorie, nous devrions constater une variation en fonction de la géométrie du matériau d'électrode car les régimes de diffusion sont différents comme illustré sur la figure III.2.5 et peuvent décrits comme suit [19-21] :

- Dans le cas du carbone vitreux, il s'agit d'une macroélectrode : les espèces réactives sont très petites par rapport à la surface de l'électrode (5 cm de diamètre).
 - en l'absence de rotation (figure III.2.5.A) le carbone vitreux s'apparente à une électrode planaire semi-infinie avec une diffusion des espèces unisens et très lente.

La couche de diffusion de l'électrode est très épaisse résultant en une concentration locale des espèces très faible.

- lorsqu'on applique une rotation à cette macroélectrode (figure III.2.5.B), la diffusion est accélérée par le phénomène de convection. La couche de diffusion diminue d'autant plus que la rotation est importante et donc la concentration des espèces à la surface de l'électrode augmente, ce qui améliore la catalyse.
- Concernant la fibre de carbone, elle est considérée comme une microélectrode car ses dimensions, de l'ordre du micromètre (diamètre de 7 μm), sont relativement proches de la taille des espèces réactives. La diffusion est radiale et s'applique dans toutes les dimensions (figure III.2.5.C). Ce flux de diffusion sphérique permet un fort accroissement du transfert de matière et donc une meilleure sensibilité de l'électrode.

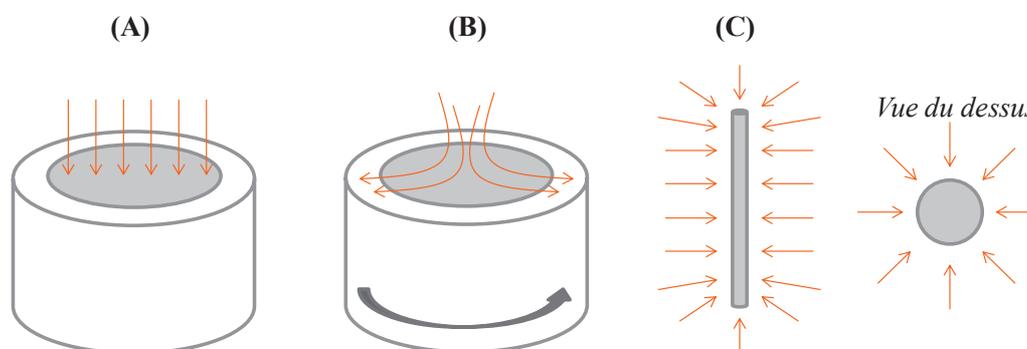


Figure III.2.5 : Illustration des différents régimes de diffusion observés pour (A) une macroélectrode, (B) une macroélectrode tournante et (C) une microélectrode type fibre.

2.3.2. Effet de la géométrie de l'électrode sur la calibration dans le glucose pour les hydrogels à base de GDH et de GOx

Nous avons étudié l'évolution de la densité de courant en fonction de la concentration en glucose pour des hydrogels à base de GDH et de GOx préparés soit sur des macroélectrodes = carbone vitreux (figure III.2.6.A), soit sur des microélectrodes = fibres de carbone (figure III.2.6.B).

Pour la GDH, le maximum de courant obtenu est environ le même ($\sim 3 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$), cependant l'inhibition par excès de substrat est plus marquée pour la microélectrode. La diffusion étant plus facile, cela augmente l'effet de l'inhibition.

Concernant la GOx, le profil est le même dans les 2 cas mais il y a une augmentation générale de la densité de courant de l'ordre de 40%. La sensibilité de la GOx est donc grandement améliorée sur les microélectrodes.

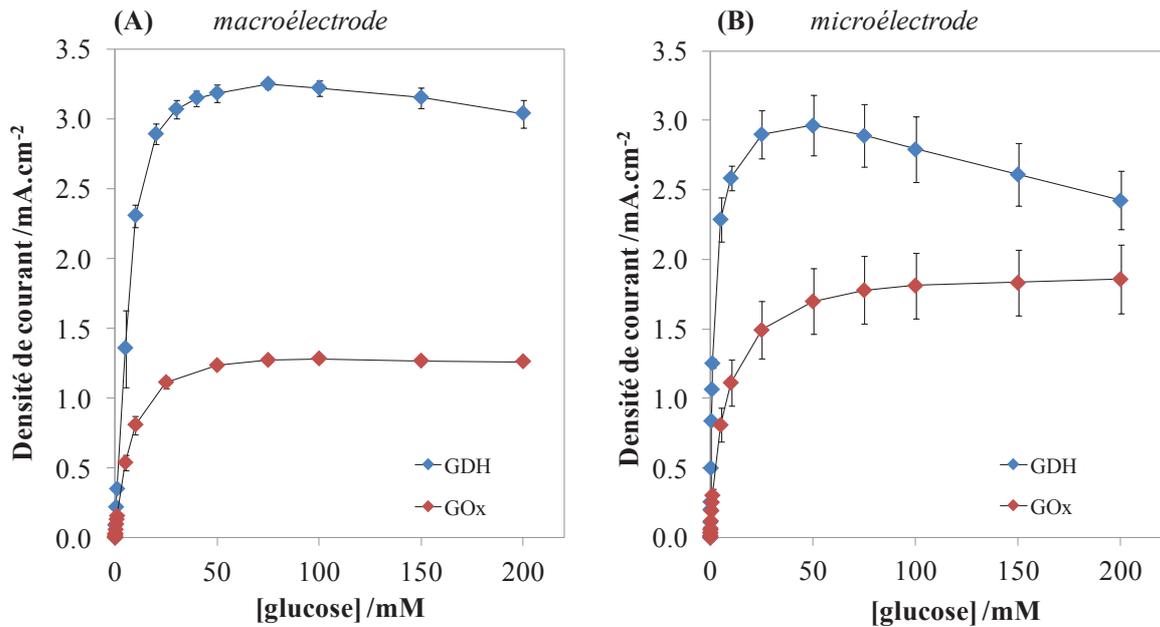


Figure III.2.6 : Evolution de la densité de courant en fonction de la concentration en glucose pour des hydrogels à base de GDH (bleu) ou de GOx (rouge) sur des électrodes (A) de carbone vitreux ou (B) en fibre de carbone. Autres conditions cf figure III.2.4.

A faible concentration de glucose également les profils sont différents (figure III.2.7). Nous constatons une augmentation du courant sur les microélectrodes pour les 2 enzymes permettant de détecter jusqu'à 10 μ M de glucose. Cette amélioration de la sensibilité est particulièrement flagrante pour la GDH puisqu'à 1 mM de glucose, la densité de courant est multipliée par 4.

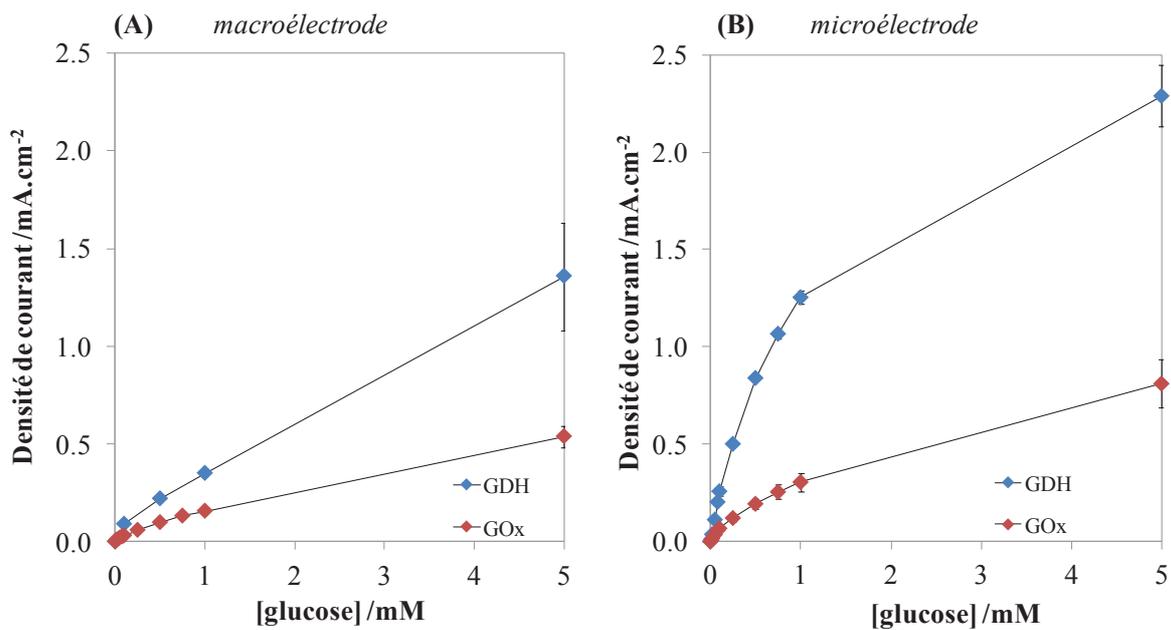


Figure III.2.7 : Zooms respectifs des figures III.2.5.(A) et (B) entre 0 et 5mM de glucose.

2.4. Conclusion intermédiaire

Après optimisation nous sommes parvenus à concevoir une anode efficace à base de GDH : l'étude de ses conditions de séchage ainsi que de la composition de l'hydrogel ont permis d'améliorer la catalyse et la stabilité de l'électrode. Cette anode nous donne une densité de courant 2 fois plus élevée qu'avec la GOx, qui est actuellement l'enzyme la plus utilisée pour l'oxydation du glucose dans les biopiles enzymatiques.

Nous nous sommes également intéressés à l'influence de la géométrie de l'électrode sur les régimes de diffusion. En passant d'une macroélectrode à une microélectrode, nous avons pu améliorer la sensibilité de notre anode. Ainsi à faible concentration de glucose (1mM) la densité de courant est multipliée par 2 avec l'électrode à base de GOx et par 4 avec celle à base de GDH lorsqu'on passe du carbone vitreux aux fibres de carbone. Ce résultat est particulièrement intéressant car les biopiles sur lesquelles nous travaillerons par la suite sont constituées d'électrodes en fibres de carbone.

La suite de ce chapitre se concentre l'optimisation et la caractérisation de biopiles principalement à base BOD *Mo* et de GDH, mais également de BOD *Bp* et de GOx, dans différents tampons de mesure afin d'obtenir la meilleure puissance possible. La stabilité sera également étudiée, que ce soit pour la biopile ou chaque électrode indépendamment.

3. Optimisation de biopiles dans le tampon

3.1. Optimisation du taux de recouvrement sur fibres de carbone

Dans la plupart des biopiles à base de fibres de carbone, les quantités d'hydrogel déposées sont très importantes puisqu'elles avoisinent les $20000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, ce qui correspond à un volume de plusieurs dizaines de microlitres pour une surface de $0,0022 \text{ cm}^2$ [22-24].

Aussi il nous a paru pertinent d'étudier l'évolution du courant en fonction du taux de recouvrement afin de déterminer à partir de quel volume la saturation en espèces connectées est atteinte. Les résultats sont présentés sur la figure III.2.8. La préparation des hydrogels et le dépôt sur fibre de carbone sont détaillés dans la partie Matériels et Méthodes 2.8.

Comme nous pouvons le voir, quelle que soit l'enzyme une saturation est observée à partir de $2000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de taux de recouvrement. Pour la GDH la densité de courant semble augmenter au-delà mais nous constatons une très grande variabilité d'environ 30% certainement due aux contraintes de cisaillement apparaissant pour des films épais.

Par conséquent, le taux de recouvrement est fixé à $2000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour la suite des travaux présentés et pour l'ensemble des enzymes utilisées, permettant d'obtenir une densité de courant et une reproductibilité optimales.

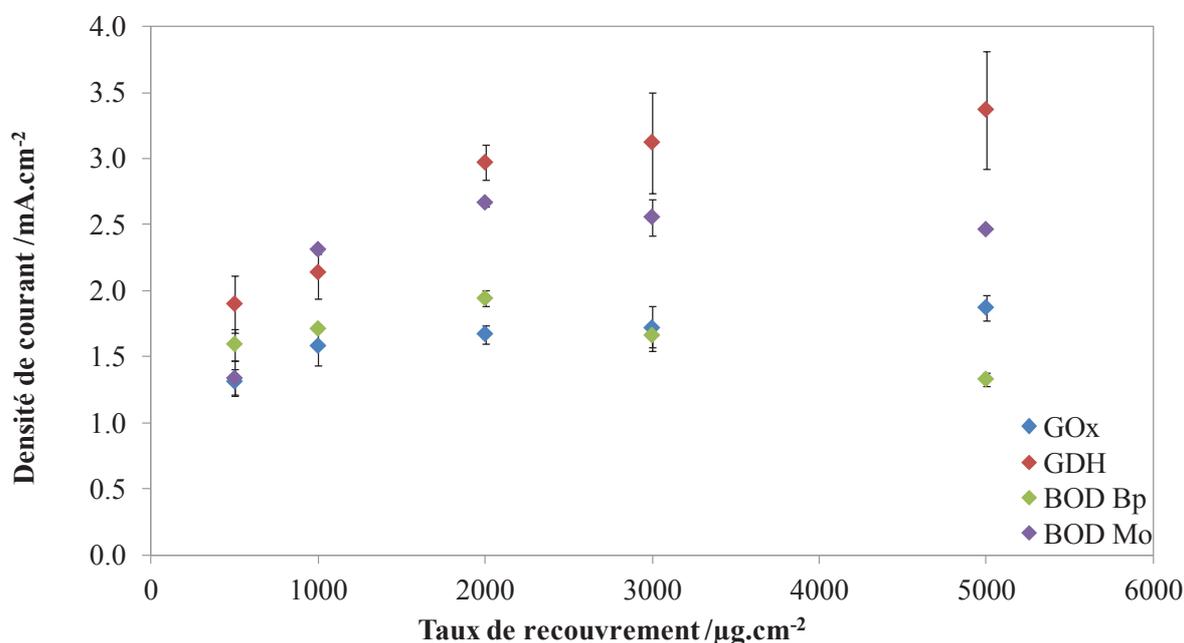


Figure III.2.8 : Evolution de la densité de courant avec le taux de recouvrement pour des hydrogels à base BOD Mo, BOD Bp, GDH et GOx préparés dans leurs conditions optimales respectives et déposés sur fibres de carbone (Matériels et Méthodes 2.8). Séchage 18h à 4°C . Mesure à 5 mV/s dans PB 100 mM pour la BOD Mo, PBS pour la BOD Bp et la GOx et PIPES 20 mM + CaCl_2 3 mM pour la GDH, pH 7,2 à $37,5^{\circ}\text{C}$ sous Ar pour les anodes et O_2 pour les cathodes.

3.2. La biopile à base de GDH et BOD de *Magnaporthe oryzae*

3.2.1. Effet du tampon de mesure

La biopile à base de GDH et de BOD *Mo* (cf Matériels et Méthodes 2.8) a été testée dans du PB 100 mM, du tampon Pipes 20 mM + CaCl₂ 3 mM ainsi que dans du PBS car les premiers sont les tampons permettant un fonctionnement maximal de la BOD *Mo* et la GDH respectivement alors que le dernier mime les conditions physiologiques (140 mM de NaCl).

3.2.1.1. Sur la catalyse

Concernant la densité de courant, une très forte diminution est observée dans le PBS pour l'anode et la cathode (- 30 à 40%) : les ions phosphates vont se complexer aux Ca²⁺ de la GDH et les chlorures vont inhiber la BOD, résultant dans les 2 cas en une baisse d'activité. Pour les 2 autres tampons, il n'y a pas de différence pour la BOD au niveau de la catalyse bien que le signal du polymère augmente nettement dans le Pipes/CaCl₂. Il est possible que la faible quantité de chlore présent dans ce tampon améliore l'interaction enzyme/polymère d'où l'augmentation du signal sous argon. Mais l'enzyme étant déjà au maximum de ses performances, nous n'observons pas d'augmentation de la densité de courant.

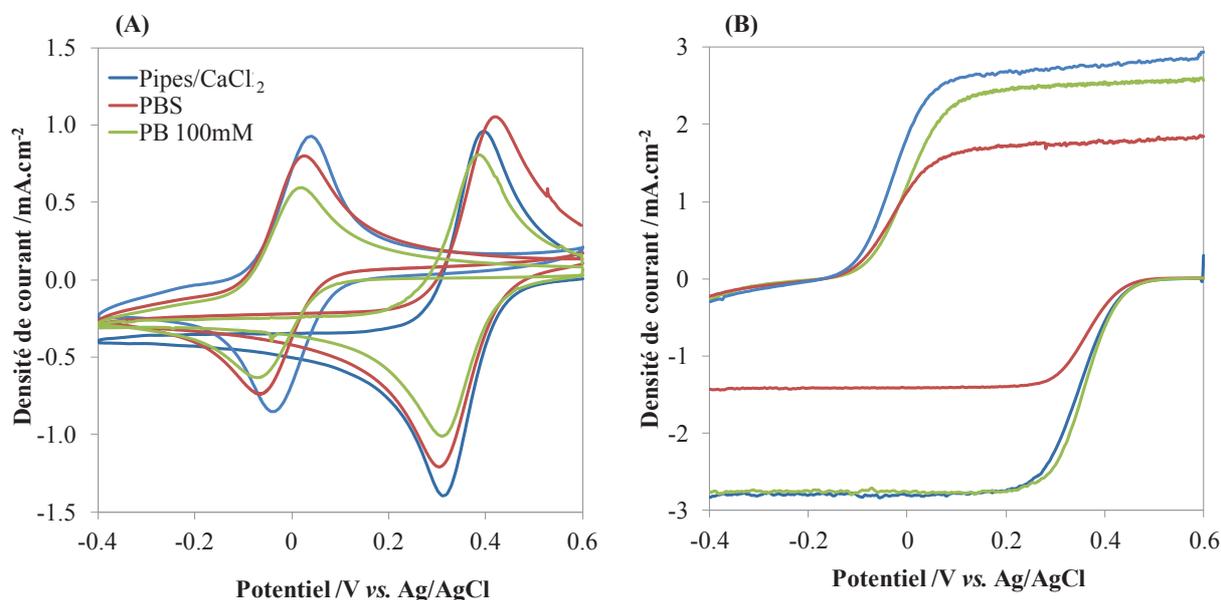


Figure III.3.1 : Evolution de la densité de courant en fonction du tampon de mesure (Pipes 20 mM + CaCl₂ 3 mM ou PBS ou PB 100 mM, pH 7,2) pour des fibres de carbone modifiées avec des hydrogels à base de BOD *Mo* et de GDH, taux de recouvrement de 2000 µg.cm⁻² et séchage 18h à 4°C. (A) à 100 mV/s sous Ar et (B) à 5 mV/s sous O₂ + 5 mM de glucose.

Pour la GDH une légère amélioration est constatée dans le tampon Pipes/CaCl₂, la présence du calcium aidant à stabiliser l'enzyme et améliorer la catalyse. Dans le PB 100 mM nous n'observons pas le même effet que dans le PBS, ce qui était pourtant attendu compte tenu de la présence de phosphate. Nous pouvons supposer que les Cl⁻ présents dans le PBS vont interagir avec le polymère causant un dépliement de l'hydrogel ce qui facilite l'accès des phosphates aux Ca²⁺ de la GDH. En l'absence de Cl⁻ seule une légère diminution du courant catalytique est observée (- 10%) suggérant que l'intégration de la GDH au sein d'un hydrogel permet de la protéger partiellement du phosphate et de maintenir son activité catalytique. On remarquera également un décalage du début de la catalyse à un potentiel plus oxydant, très certainement dû à l'interaction des phosphates avec l'enzyme, même minime.

3.2.1.2. Sur la puissance

Les électrodes à base de GDH et de BOD *Mo* sont ensuite connectées entre elles afin d'enregistrer les courbes de puissance des biopiles dans les différents tampons. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I nous obtenons une courbe caractérisée par une puissance maximale au potentiel à partir duquel le courant généré est maximal. De plus, nous constatons que dans le Pipes/CaCl₂ le potentiel en circuit ouvert se situe autour de 0,7 V ce qui correspond bien à l'écart entre les potentiels de début de réduction et d'oxydation observés sur la figure III.3.1. Cette valeur est identique à la valeur du potentiel maximal théorique donné par la différence stricte des potentiels anodique (- 0,2 V pour le PQQ de la GDH) et cathodique (+ 0,5 V pour le CuT1 de la BOD *Mo*) ce qui démontre la bonne connexion des enzymes sur les fibres de carbone ainsi que des électrodes entre elles. Dans les 2 autres tampons nous remarquons que le potentiel en circuit ouvert diminue légèrement : en effet nous voyons sur la figure III.3.1.A que le courant anodique commence à un potentiel plus oxydant, en raison de la présence du phosphate.

Nous obtenons sensiblement la même densité de puissance dans le Pipes/CaCl₂ et le PB 100 mM, ce qui est logique compte tenu des catalyses observées sur la figure III.3.1 : un maximum d'environ 240 μW.cm⁻² est atteint vers 0,3 V. En comparaison de ce qui a déjà été reporté dans la littérature (tableau récapitulatif du chapitre I), ce résultat est relativement bon, d'autant que l'on travaille sur un matériau non poreux. Dans le PBS, la densité de puissance maximale diminue à 150 μW.cm⁻² à 0,33V, ce qui est dû comme nous l'avons vu précédemment à l'inhibition de la BOD par le chlore et la complexation des Ca²⁺ de la GDH par le phosphate.

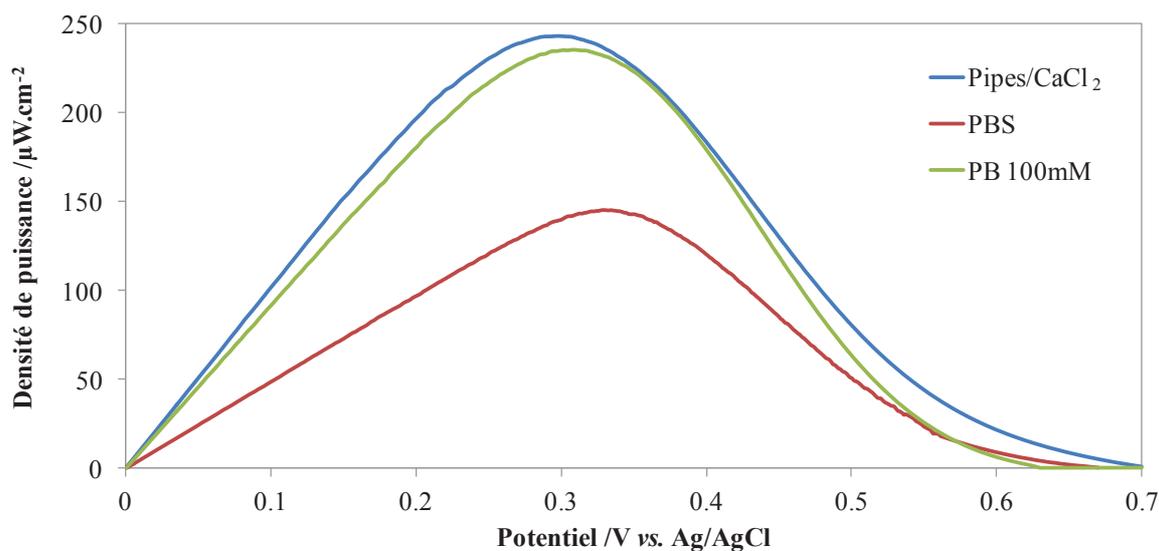


Figure III.3.2 : Courbes de puissance en fonction du potentiel pour les électrodes de la figure III.3.1 en fonction du tampon de mesure, enregistrées à 5 mV/s sous O₂ + 5 mM de glucose.

3.2.1.3. Sur la stabilité

Enfin nous avons étudié l'effet du tampon de mesure sur la stabilité de la biopile ainsi que sur chaque électrode indépendamment. Au regard des chronoampérométries des 2 électrodes (figures III.3.3.A et B), nous constatons que les pertes sont maximales dans le PBS, intermédiaires dans le PB 100 mM et minimales dans le Pipes/CaCl₂.

Nous avons tout d'abord constaté que la GDH et la BOD *Mo* étaient partiellement inhibées respectivement en présence de phosphate et de chlore et il ressort de la figure III.3.3 que leur stabilité en est également affectée : la perte observée pour la biopile dans le PBS est nettement plus forte que dans le Pipes/CaCl₂ puisqu'après 7h30 il reste 25% de la puissance initiale dans ce dernier contre 3% seulement dans le PBS (la perte de courant de chaque électrode dans le PB 100mM étant intermédiaire, nous n'avons pas réalisé de chronoampérométrie pour la biopile dans ce tampon). Si nous calculons la demie vie de la biopile dans chaque tampon nous trouvons environ 35 min dans le PBS et 2h30 dans le Pipes/CaCl₂, la GDH étant l'électrode limitante dans les 2 cas.

Pour finir, nous remarquons que l'électrode à base de GDH est très peu stable dans les tampons contenant du phosphate et que cette perte d'activité catalytique est augmentée par la présence de Cl⁻. Les ions phosphate ont donc un effet sur l'activité et la stabilité de la GDH.

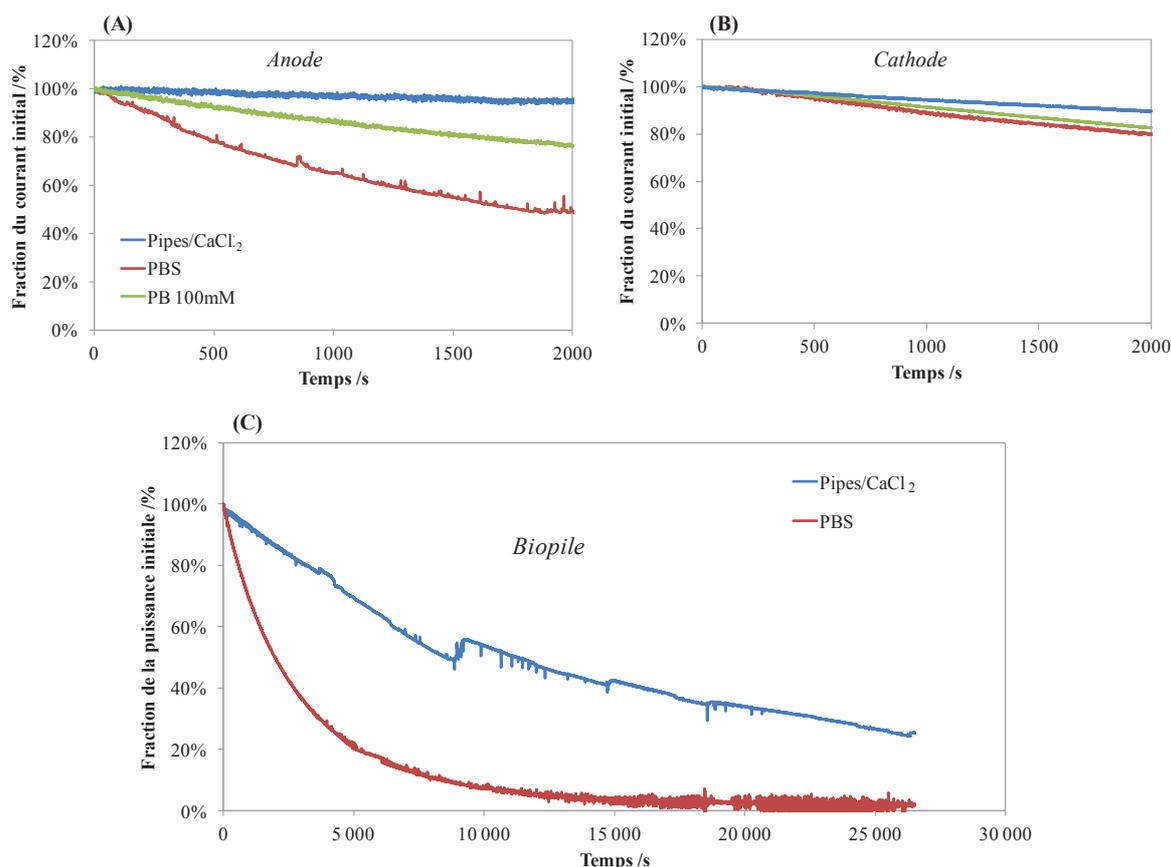


Figure III.3.3 : Chronoampérométrie pour (A) l'anode à base de GDH sous Ar + 5 mM glucose à + 0.3 V vs. Ag/AgCl et (B) la cathode à base de BOD Mo sous O₂ à + 0,1 V vs. Ag/AgCl et (C) la biopile BOD Mo-GDH sous O₂ + 5 mM glucose à + 0,3 V vs. Ag/AgCl ; en fonction du tampon de mesure. Autres conditions cf figure III.2.8.

3.2.2. Calibration dans le glucose

Nous avons mesuré l'évolution de la puissance de la biopile en fonction de la concentration en glucose et sous saturation d'oxygène, soit dans le PBS (tampon physiologique) soit dans le Pipes/CaCl₂ (tampon optimal).

D'après la figure III.3.4.A nous remarquons tout d'abord que les densités de puissance ont le même profil dans les 2 tampons de mesure avec environ 50% d'augmentation systématique dans le Pipes/CaCl₂.

En agrandissant entre 0 et 5 mM de glucose (figure III.3.4.B), nous constatons que la limite de fonctionnement de la biopile est très basse puisqu'une densité de puissance significative peut être obtenue à partir de 10 μM de glucose.

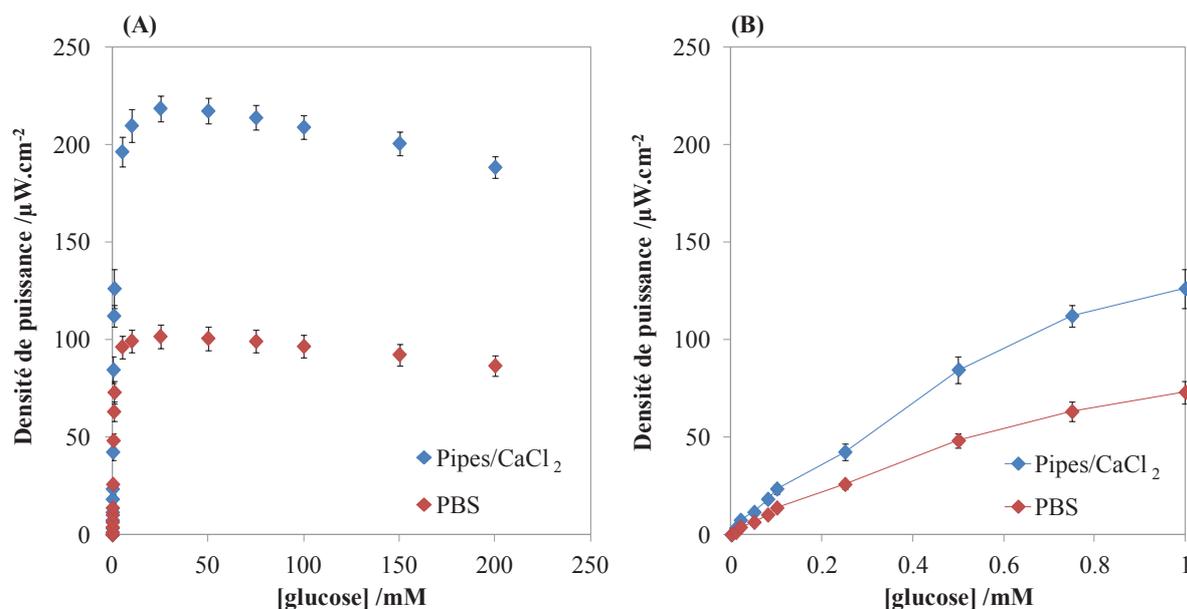


Figure III.3.4 : Evolution de la densité de courant en fonction de la concentration en glucose (A) 0 à 200 mM et (B) zoom entre 0 et 5 mM, pour des biopiles à base de GDH et de BOD Mo, sur fibres de carbone, séchage 18h à 4°C et mesures dans du Pipes 20 mM + CaCl₂ 3 mM (bleu) ou du PBS (rouge) pH 7,2 à 37,5°C sous O₂ + glucose à 5 mV/s. Densité de puissance à + 0,3 V vs. Ag/AgCl.

3.2.3. Utilisation de membranes protectrices

En vue d'améliorer la stabilité de notre biopile, nous nous sommes penchés sur l'utilisation de membranes protectrices dont nous détaillerons ci-après les structures et les effets sur les performances de la biopile.

3.2.3.1. Description des différents types de membranes

Après des recherches bibliographiques, plusieurs types de membranes ont été identifiés afin de protéger la biopile du milieu extérieur :

- le sac à dialyse : il s'agit d'un tube constitué en cellulose et dont la taille des pores peut varier généralement entre 0,5 et 1000 kDa [25] ;
- le revêtement en Nafion® sur une couche préalable de PAA-PVI [26] ;
- le revêtement en PEGDGE + PAA-PVI [27].

L'avantage principal de ces différentes membranes est qu'elles sont biocompatibles, ce qui est indispensable pour une utilisation future dans du sang humain. Leur préparation est décrite dans la partie Matériels et Méthodes 2.9.

3.2.3.2. Comparaison de l'effet des 3 types de membranes

Comme nous pouvons le voir sur la figure III.3.5, l'utilisation d'un sac de dialyse (pores de 10 kDa) ne modifie presque pas les performances de la biopile et ne gêne ainsi pas la diffusion des espèces entre le milieu extérieur et la biopile.

Pour les 2 autres types de membrane, la densité de puissance est divisée par 2 : soit les couches formées sont trop épaisses ce qui empêche une bonne diffusion, soit le dépôt de ces revêtements à la surface des biopiles a endommagé les hydrogels (durée de séchage des biopiles augmentée, présence de solvant dans les solutions de Nafion® et PEGDGE, ...)

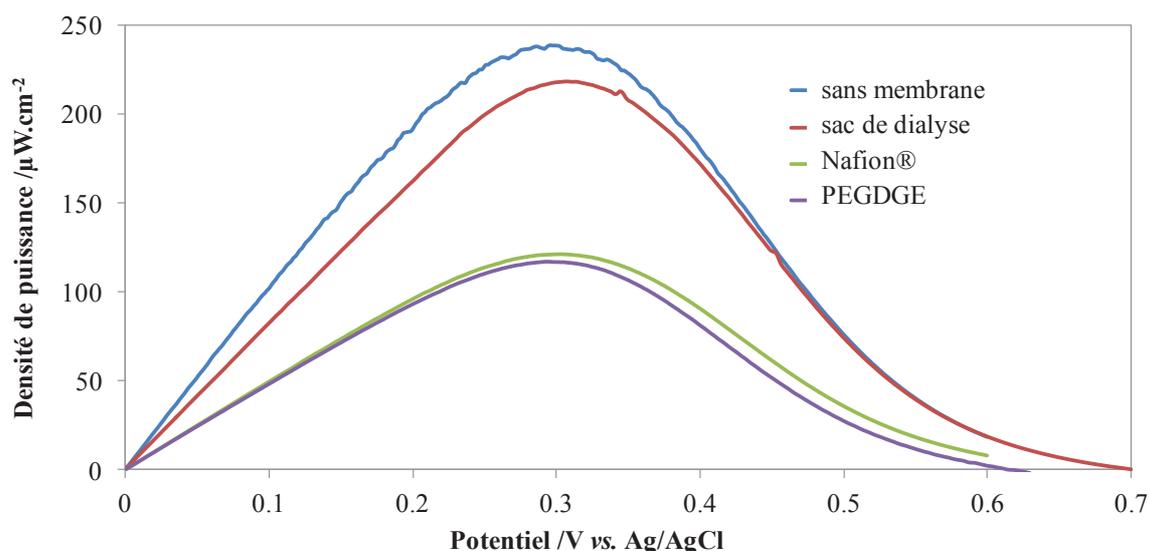


Figure III.3.5 : Densités de puissance en fonction du potentiel pour des biopiles à base de BOD Mo et de GDH sans ou avec une membrane de protection. Mesures dans du Pipes 20 mM + CaCl₂ 3 mM pH 7,2 à 37,5°C sous O₂ + 5 mM glucose à 5 mV/s.

Au regard de la figure III.3.6.A, nous constatons que les signaux des médiateurs sont affectés par le dépôt de membranes en Nafion®/PAA-PVI et PEGDGE/PAA-PVI et ce, particulièrement à la cathode. En effet il y a une nette diminution du signal : elle peut être due à l'interaction du revêtement avec l'hydrogel causant sa dégradation ou sa déconnexion partielle. Par contre, il y a peu d'impact du sac de dialyse sur la structure de l'hydrogel ce qui semble logique étant donné que la biopile est simplement insérée dans le sac de dialyse constitué de cellulose inerte.

L'effet sur la densité de courant est identique : le sac dialyse a un impact limité sur la diffusion des substrats puisqu'il entraîne une diminution de la densité de courant de 20% à l'anode et de 15% à la cathode. Concernant les membranes de Nafion® et de PEGDGE, les pertes enregistrées sont respectivement de 66% et 45% à la cathode et de 52 % et 57% à

l'anode. En résumé la perte moyenne de densité de courant est d'environ 50%, ce qui correspond à la perte observée pour les biopiles sur la figure III.3.5.

L'ensemble de ces membranes seront par la suite utilisées dans le sang en vue d'améliorer la stabilité de la biopile.

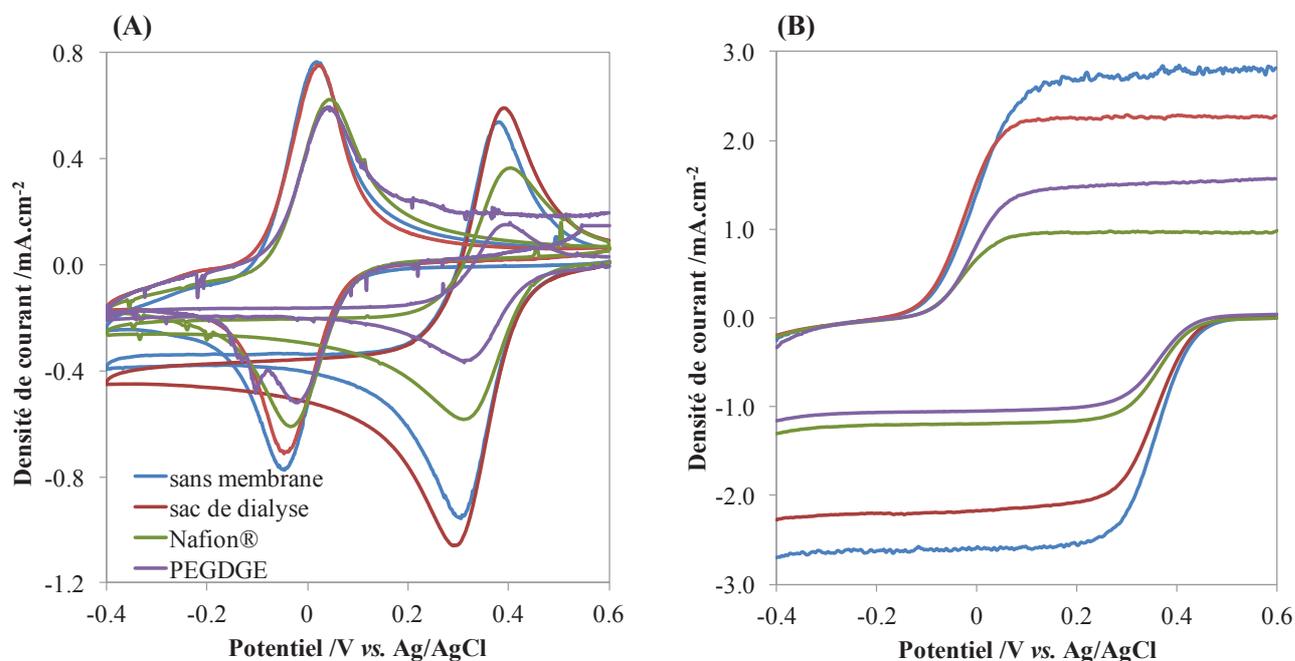


Figure III.3.6 : Densités de courant en fonction du potentiel pour des biopiles à base de BOD Mo et de GDH sans ou avec une membrane de protection. Mesures dans du Pipes 20 mM + CaCl₂ 3 mM pH 7,2 à 37,5°C (A) à 100 mV/s sous Ar et (B) à 5 mV/s sous O₂ + 5 mM glucose.

3.2.4. Augmentation de la réticulation

Afin d'augmenter la stabilité, notamment de la cathode nous avons augmenté le pourcentage massique d'agent réticulant (AG) dans l'hydrogel. Cela doit permettre d'augmenter la réticulation et donc en théorie la rigidité de l'adduit formé entre l'enzyme et le polymère [28]. Nous avons donc doublé la teneur en PEGDGE, passant de 7,4 à 15% en masse dans l'hydrogel, les proportions relatives de polymère et de BOD étant conservées.

D'après la figure III.3.7, nous distinguons qu'il y a bien une diminution du signal du médiateurs lorsqu'on passe de 7,4%_m (courbe rouge) à 15%_m (courbe bleue) d'agent réticulant dans l'hydrogel. Au niveau de la réduction de l'oxygène, il y a environ 20% de densité de courant en moins, ce qui peut s'expliquer comme nous l'avons dit dans le chapitre II par le fait qu'il y ait moins d'enzyme et de médiateur et/ou le fait qu'une plus grande

proportion d'agent réticulant entraîne une trop grande rigidité de l'hydrogel gênant ainsi le transfert électronique et la diffusion.

Après 1 h de chronoampérométrie, aucune amélioration de la stabilité n'a été constatée par l'augmentation de la quantité d'agent réticulant. Ainsi, cette stratégie ne sera pas retenue pour accroître la durée de vie de la cathode dans les futurs échantillons de sang.

Cette expérience n'a pas été réalisée sur l'anode car il est inutile d'améliorer sa stabilité si celle de la cathode devient à son tour limitante.

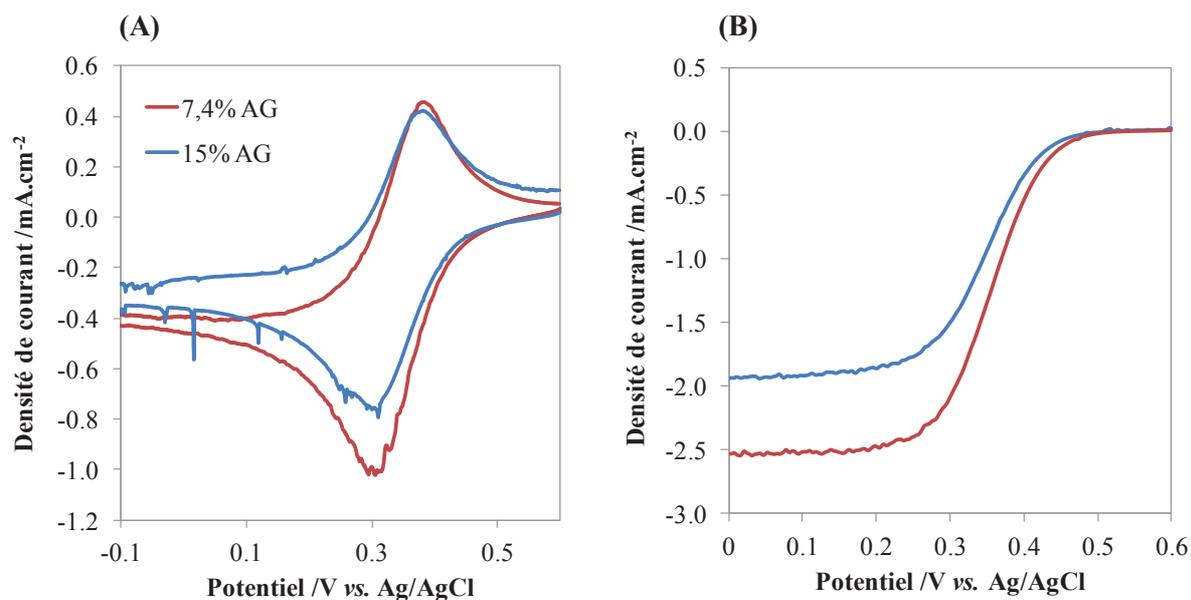


Figure III.3.7 : Densité de courant en fonction du % d'agent réticulant (AG) pour une cathode à base de BOD Mo ; hydrogel séché 18h à 4°C puis mesures dans du Pipes 20 mM + CaCl₂ 3 mM pH 7,2 à 37,5°C, (A) à 100 mV/s sous Ar et (B) à 5 mV/s sous O₂.

3.2.5. Influence du polymère rédox

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, nous avons synthétisé de nouveaux polymères cathodiques en faisant varier la composition du copolymère PAA-PVI et donc la concentration en complexes d'osmium greffés. Le polymère rédox IV qui contient la plus faible proportion d'imidazole ($n_{\text{PVI}}/n_{\text{PAA}} = 1/9$, $C_{\text{RT}} = 54$ mM et $D_{\text{app}} = 7,76 \cdot 10^{-9}$ cm².s⁻¹) permettait notamment d'augmenter largement le courant obtenu avec la BOD Mo par rapport au polymère rédox II ($n_{\text{PVI}}/n_{\text{PAA}} = 1/4,37$, $C_{\text{RT}} = 146$ mM et $D_{\text{app}} = 4,25 \cdot 10^{-9}$ cm².s⁻¹). Un test a donc été réalisé pour voir si le même comportement était observé sur fibre de carbone afin d'augmenter les performances de notre cathode.

D'après la figure III.3.8, nous constatons une nette diminution de la densité de courant avec le médiateur IV par rapport au II. Cette baisse de 40% se traduit par la même baisse de

densité de puissance au niveau de la biopile. Ainsi, l'efficacité observée sur carbone vitreux avec le médiateur IV n'a pas été observée sur fibres de carbone. Il est possible que les régimes de diffusion différents dus à la géométrie de l'électrode empêchent un bon transfert électronique dans ce cas.

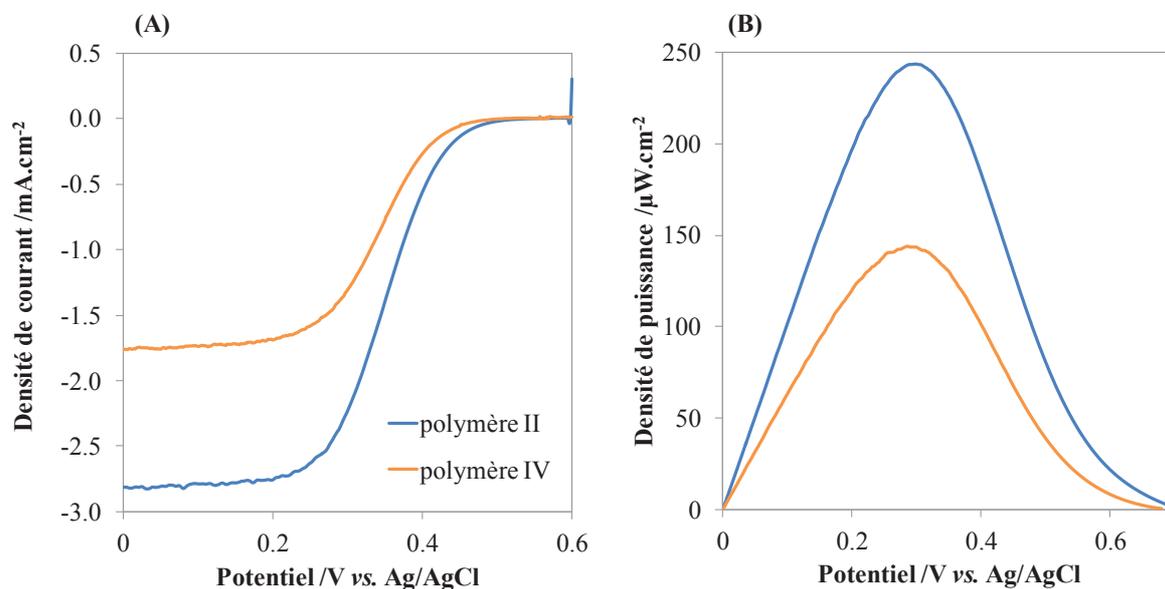


Figure III.3.8 : (A) Densité de courant en fonction du polymère rédox pour une cathode à base de BOD Mo et (B) courbe de puissance pour une biopile à base de BOD Mo et de GDH avec le polymère II ou IV à la cathode ; dans Pipes 20 mM + CaCl₂ 3 mM pH 7,2 à 37,5°C sous O₂ + 5 mM glucose et 5 mV/s.

3.3. Les autres biopiles

Bien que nous ayons principalement travaillé sur la biopile à base de BOD Mo et de GDH, nous avons également étudié l'efficacité de biopiles utilisant la BOD Bp et /ou la GOx.

3.3.1. Catalyse des différentes anodes et cathodes

Les catalyses des différentes électrodes enregistrées dans le PBS et sous oxygène sont présentées sur la figure III.3.9. Nous nous plaçons dans ce tampon car il simule les conditions physiologiques et que de plus la GOx est vraiment peu active et peu stable dans les autres tampons testés.

A la cathode, le courant de réduction de l'oxygène est plus faible pour la BOD Mo que pour la BOD Bp, cette dernière étant très peu sensible au chlore [29]. A l'anode, bien que la GDH soit peu tolérante au chlore comme nous l'avons déjà montré, elle génère malgré tout une densité de courant supérieure à celle produite par la GOx. Ceci est en partie dû au fait que

l'oxygène soit le substrat naturel de la GOx : ainsi, dans le tampon de mesure saturé en oxygène il y aura compétition entre le glucose et l'oxygène au niveau de l'anode à base de GOx. Nous voyons donc ici tout l'intérêt que représente les travaux d'ingénierie enzymatique permettant de concevoir des GOx non sensibles à l'oxygène [30].

Enfin, nous constatons que la catalyse de la BOD *Bp* commence à un potentiel plus réducteur d'environ 50 mV comme nous avons déjà pu le constater sur électrode de carbone vitreux dans le Chapitre II.

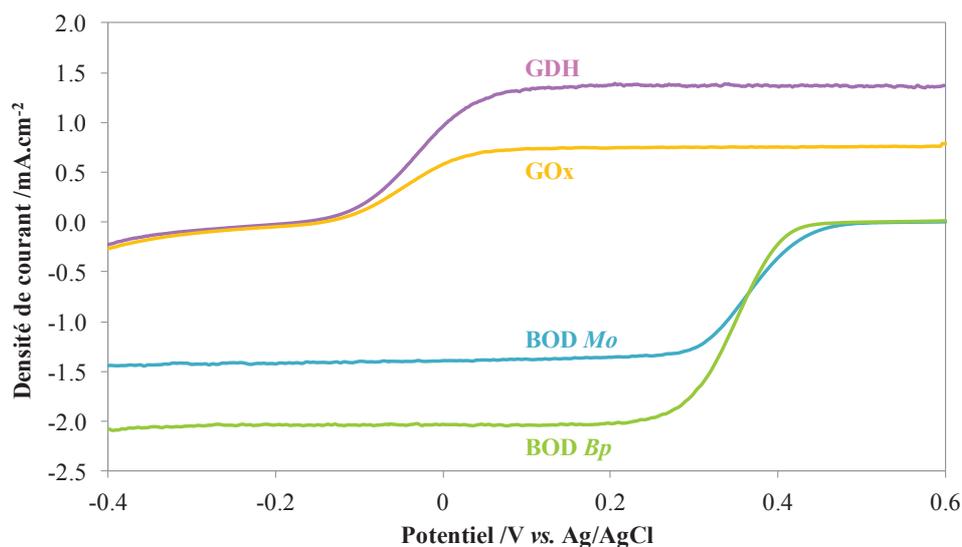


Figure III.3.9 : Densité de courant en fonction du potentiel pour des électrodes de fibres de carbone modifiées avec des hydrogels à base de BOD *Mo*, BOD *Bp*, GDH et GOx et mesurées dans du PBS pH 7,2 à 37,5°C sous O₂ + 5 mM glucose et 5 mV/s.

3.3.2. Puissance

Les courbes de puissance des différentes biopiles ont ensuite été enregistrées dans les mêmes conditions (figure III.3.10). L'ensemble des paramètres caractéristiques des courbes de puissance (densité de puissance maximale, potentiel à cette densité de puissance maximale et potentiel en circuit ouvert) sont résumés dans le tableau III.3.1.

D'après la figure III.3.10 et le tableau III.3.1, nous constatons que le potentiel en circuit ouvert est le même pour les 2 biopiles à base de BOD *Mo* (environ 0,67 V) et pour celles à base de BOD *Bp* (environ 0,62 V) avec une différence de 50 mV qui correspond à l'écart entre les potentiels de début de catalyse des BOD *Mo* et *Bp* comme observé sur la figure III.3.9.

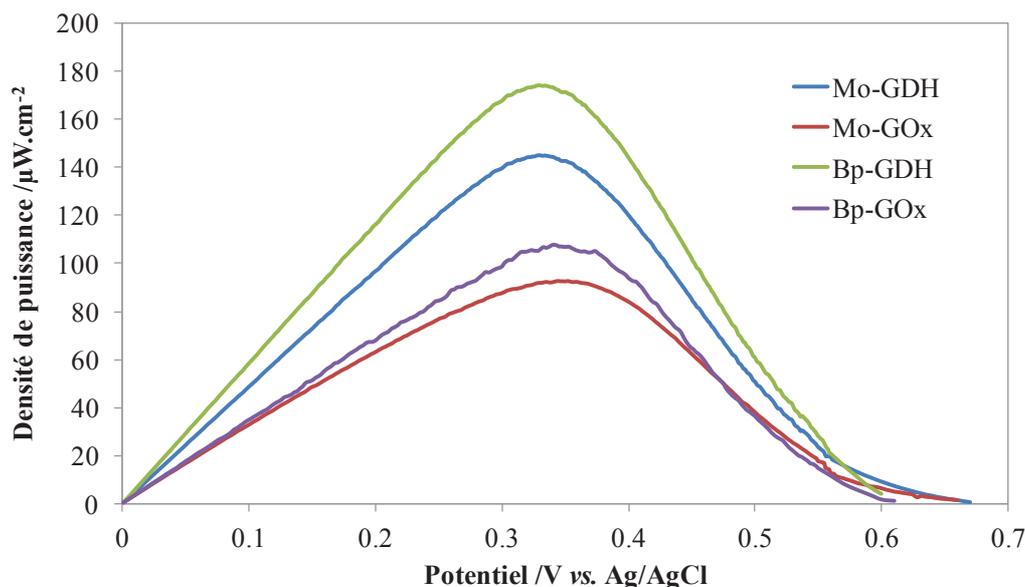


Figure III.3.10 : Courbes de puissance en fonction du potentiel des différentes biopiles, dans le tampon PBS pH 7,2 à 37,5°C sous O_2 + 5 mM glucose à 5 mV/s.

biopile	P_{\max} ($\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$)	potentiel à P_{\max} (V)	OCP (V)
BOD <i>Mo</i> -GDH	145,2	0,328	~ 0,67
BOD <i>Mo</i> -GOx	99,8	0,343	
BOD <i>Bp</i> -GDH	174,1	0,331	~ 0,62
BOD <i>Bp</i> -GOx	115,5	0,343	

Tableau III.3.1 : Résumé des valeurs de densité de puissance maximale, potentiel à cette densité de puissance maximale et potentiel en circuit ouvert des courbes de puissance de la figure III.3.10.

Concernant les densités de puissance maximales, elles suivent la logique déterminée par les catalyses observées sur la figure II.3.9 : en effet la meilleure biopile est celle de BOD *Bp*-GDH et la plus mauvaise celle de BOD *Mo*-GOx, les 2 autres donnant des puissances intermédiaires. De plus, le potentiel à la densité de puissance maximale varie légèrement en fonction des biopile. La même valeur est obtenue pour les biopiles BOD *Mo*-GOx et BOD *Bp*-GOx car la densité de courant produite par GOx est limitante ($0,7 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$) par rapport aux 2 cathodes et à $-0,7 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ le potentiel des catalyses des BOD *Mo* et *Bp* est identique (0,364 V), d'où une très grande similitude entre les 2 biopiles. Les biopiles à base de GDH ont une densité de puissance plus élevée mais à un potentiel plus faible que celle à base de

GOx car bien que la densité de courant anodique soit plus élevée, le maximum est atteint à un potentiel plus oxydant par rapport à la GOx.

3.3.3. Stabilité

Pour finir, la stabilité des 4 biopiles a été étudiée par chronoampérométrie (figure III.3.11). Au bout d'une heure, la perte maximale est enregistrée pour la biopile de BOD *Mo* et de GDH ce qui était attendu car la BOD *Mo* et la GDH sont respectivement très sensibles au chlore et au phosphate (cf figure III.3.3). Ainsi la plus stable est la biopile de BOD *Bp* et de GOx.

La GDH étant beaucoup moins stable que la BOD *Mo* dans le PBS (figure III.3.3) il en résulte que la biopile de BOD *Bp* et de GDH est moins stable que celle de BOD *Mo* et de GOx.

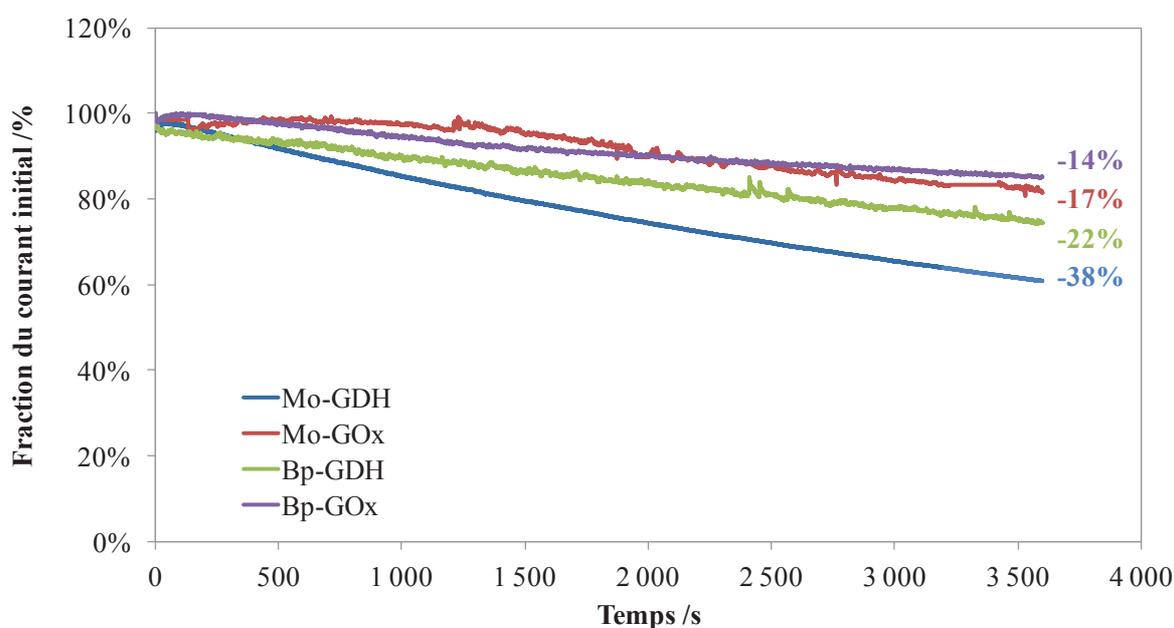


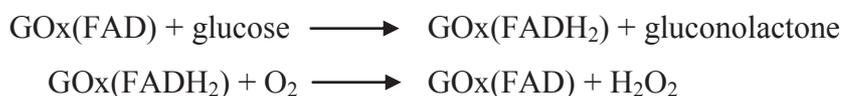
Figure III.3.11 : Chronoampérométries des différentes biopiles, dans le PBS pH 7,2 à 37,5°C sous O_2 + 5 mM glucose à + 0,3 V vs. Ag/AgCl.

3.3.4. Conclusion sur les différentes biopiles

Compte tenu de l'efficacité des biopiles à base de GOx et de BOD *Bp*, nous réaliserons également quelques mesures dans le sang. Nous devrions a priori obtenir une densité de puissance plus faible mais également plus stable qu'avec la biopile de BOD *Mo* et de GDH.

3.3.5. La question du H₂O₂

L'utilisation de la GOx au sein d'une biopile utilisant une BOD à la cathode est controversée. En effet, la GOx est capable de produire du peroxyde d'hydrogène en présence d'oxygène (qui est son substrat naturel) selon le mécanisme suivant :



Il a été montré que 20 mM d'H₂O₂ entraînait la dénaturation immédiate et surtout irréversible des BODs contrairement aux laccases qui recouvrent leur activité catalytique après ajout de catalase dans le milieu [31-33]. Cependant, cette concentration nous semblait réellement élevée en comparaison des dimensions de notre anode, nous avons voulu calculer le temps nécessaire à la GOx présente dans notre biopile pour produire 20 mM de H₂O₂.

Pour une fibre de carbone avec un taux de recouvrement de 2000 µg.cm⁻² d'un hydrogel composé de 35% de GOx, 55% de polymère rédox et 10% d'agent réticulant :

- il y a 5,49*10¹² molécules de GOx connectées à la surface de la fibre ;
- 5,49*10¹² molécules de H₂O₂ sont donc produites par cycle catalytique puisque chaque enzyme va catalyser la formation d'une molécule de H₂O₂ ;
- 1,80*10⁻¹⁰ mol.L⁻¹ de H₂O₂ sont produits par cycle catalytique dans 50 mL de tampon (volume dans lequel nous travaillons habituellement) ;
- k_{ss} = 20 s⁻¹ pour la GOx envers l'oxygène à 5 mM de glucose ;
- 3,6*10⁻⁹ mol.L⁻¹ de H₂O₂ sont produits chaque seconde par l'ensemble des enzymes connectées à l'anode de la biopile.

Il faudrait donc **2,1 mois pour générer 20 mM d'H₂O₂** avec notre anode à base de GOx dans une solution saturée en oxygène, ce qui est largement au-delà de la durée de vie même de la GOx immobilisée sur fibre de carbone.

De plus, nous pouvons facilement imaginer que cette durée serait rallongée en cas d'expérimentation *in vivo* ou *in vitro* dans du sang : d'une part la circulation sanguine permet l'entraînement des espèces formées ce qui implique que le H₂O₂ formé ne devrait pas s'accumuler au niveau des électrodes ; d'autre part la concentration et la diffusion en oxygène dans le sang est plus faible que dans une solution aqueuse comme le tampon d'où une diminution de la quantité de H₂O₂ produite.

3.4. Conclusion intermédiaire

L'optimisation respective des anode et cathode nous a permis de concevoir une biopile à base de BOD *Mo* et de GDH performante générant environ $250 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0,3 V vs. Ag/AgCl dans du tampon Pipes/CaCl₂. Sa limite de détection est très basse puisqu'à $10 \mu\text{M}$ de glucose elle produit 3,4 et $1,3 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ respectivement dans le Pipes/CaCl₂ et le PBS.

Concernant sa stabilité, au bout de 7h30 d'opération continue, la biopile perd quasiment la totalité de sa puissance dans le PBS et 75% dans le Pipes/CaCl₂. La forte perte enregistrée dans le PBS en raison de 2 phénomènes :

- le courant catalytique de la BOD *Mo* est diminué par la présence de Cl⁻, ces derniers étant connus pour inhiber les métalloenzymes ;
- les ions phosphate du tampon vont se complexer aux Ca²⁺ de la GDH entraînant une diminution de son activité catalytique ; cet effet est accru par les Cl⁻ qui en interagissant avec le polymère rédox vont partiellement déplier l'hydrogel et donc faciliter la diffusion des phosphates jusqu'aux enzymes.

Pour tenter d'améliorer la stabilité de la biopile plusieurs stratégies ont été envisagées : si l'augmentation de la réticulation s'est montrée inefficace, l'utilisation de sacs de dialyse comme membranes protectrices semble prometteuse. En effet l'impact sur la diffusion des substrats et les performances de la biopile est très faible.

Enfin nous avons constaté que les biopiles à base de BOD *Bp* à la cathode et/ou de GOx à l'anode sont plus stable que celle de BOD *Mo*-GDH en raison des stabilités respectives de ces 2 enzymes.

Dans la prochaine partie de ce chapitre nous nous intéresserons aux performances et à la stabilité de la biopile BOD *Mo*-GDH dans du sang humain. Plusieurs optimisations seront réalisées de manière à obtenir le meilleur de la biopile. Nous testerons par exemple l'effet de l'utilisation de sacs de dialyse dans le sang.

4. La biopile dans le sang

4.1. Caractérisation des échantillons de sang

4.1.1. Les différentes cellules du sang

Le sang est constitué à 45% de cellules et à 55% de plasma. Ce dernier véhicule, en plus des cellules, de nombreuses molécules d'intérêt biologique dont le glucose, des ions, des lipides et protéines, des vitamines et des hormones. On distingue 3 types de cellules composant le sang : les globules rouges (ou érythrocytes), les globules blancs (ou leucocytes) et les plaquettes (ou thrombocytes) (figure III.4.1) [34-36].

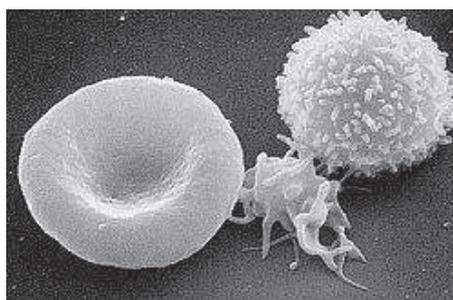


Figure III.4.1 : Cliché de microscopie électronique à balayage des cellules du sang. De gauche à droite : globule rouge, plaquette et globule blanc [37].

Le sang total n'est jamais transfusé au patient, on ne lui injectera que le composant nécessaire réduisant ainsi les effets indésirables apportés par les autres produits.

Les globules rouges sont très utilisés pour soigner les maladies du sang (hématologie) et les cancers afin de remplacer les cellules de la moelle osseuse détruites par la chimiothérapie (des plaquettes sont également transfusées dans ce cas). Ils sont également transfusés en cas d'hémorragie importante [34, 38-40].

Les plaquettes sont utiles aux malades dits en aplasie, c'est-à-dire lorsque la maladie ou les traitements lourds – radiothérapie ou chimiothérapie par exemple – empêchent la moelle osseuse de fabriquer des cellules sanguines [34, 38-40].

Le plasma peut être soit transfusé au patient soit administré sous forme de médicaments après fractionnement par le Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB). Le fractionnement consiste à purifier les protéines à intérêt thérapeutique du plasma pour compenser les déficits chez les polytraumatisés, les patients souffrant d'hémophilie, troubles de la coagulation ou déficit immunitaire grave [34, 38-40].

L'ensemble des échantillons prélevés sont déleucocytés (c'est-à-dire débarrassés des globules blancs) afin de garantir la sécurité des malades en évitant l'inefficacité transfusionnelle plaquettaire et en prévenant le risque de transmission de virus intra-leucocytaires et de bactéries [41].

4.1.2. Préparation des produits sanguins labiles

L'appellation « produits sanguins labiles » ou PSL désigne l'ensemble des produits à usage thérapeutique issus de dons de sang. Il en existe trois grands types : le concentré de globules rouges (CGR), le concentré de plaquettes (CP) et le plasma frais congelé (PFC). Il est également possible de préparer des concentrés de granulocytes [42, 43]. Les granulocytes sont une sous-catégorie des leucocytes : ce sont des globules blancs non spécifiques, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas dirigés contre un antigène donné ; ce sont les cellules de l'immunité innée. A l'inverse, les lymphocytes constituant la seconde sous-catégorie des leucocytes, sont les cellules de l'immunité adaptative. Ils vont se développer pour combattre une molécule étrangère en particulier et vont contribuer à la mise en place de la mémoire immunitaire. La transfusion de granulocytes est à présent très rare en raison du très faible rapport bénéfice/risque pour le patient receveur [44].

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de visiter le laboratoire de préparation des produits sanguins de l'Etablissement Français du Sang Aquitaine Limousin (EFSAL) localisé sur le site du CHU de Bordeaux : ceci m'a permis de comprendre ce qu'il se passe entre le prélèvement de sang total sur un donneur et l'inoculation du ou des sous-produits de ce sang à un receveur et de connaître précisément le contenu des échantillons qui me seront fournis par la suite.

Le processus commence par un don anonyme soit de sang total, soit en aphérèse. Ce deuxième est moins connu ; il permet de prélever directement un seul composant sanguin (plasma, plaquettes ou globules rouges) au moyen d'un séparateur de cellules, les autres étant restitués au donneur au cours du don. On peut également prélever deux composants en simultané, il s'agit alors d'un don combiné. Ici, nous nous concentrerons sur le traitement du sang total et l'isolation de chacun de ses constituants.

A l'issue du don, une poche de sang total d'environ 500 mL est récupérée. Dès le don il lui est attribué un numéro unique qui la suivra durant tout le processus de traitement afin de garantir une traçabilité parfaite. La poche est ensuite connectée à deux DMU (dispositif médical à usage unique), chacun composé de 2 poches. Le premier DMU connecté en haut de la poche sang va permettre de récupérer le plasma alors que le deuxième, connecté en bas, permettra d'extraire les globules rouges ; dans la poche de sang initiale resteront les plaquettes à l'issue du procédé d'extraction (figure III.4.2).

L'ensemble du dispositif est tout d'abord centrifugé pendant 10 minutes à 3200 tours ce qui permet de concentrer les globules rouges au fond, d'avoir un surnageant constitué de

plasma (jaune translucide) et d'obtenir à l'interphase une fine couche blanchâtre de leucocytes et de plaquettes appelé la couche leuco-plaquettaire ou CLP (figure III.4.2).

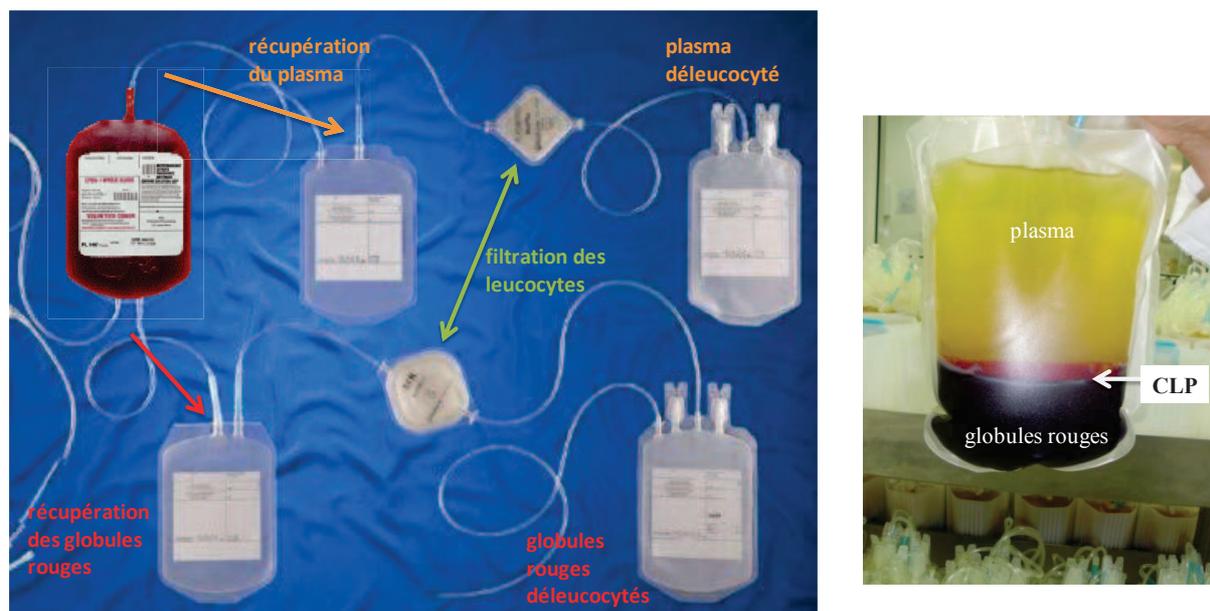


Figure III.4.2 : A gauche, poche de sang total reliée au DMU permettant la séparation des différents composants. A droite, poche de sang après centrifugation avec les trois composants bien distincts et visibles (plasma, CLP et globules rouges).

Cette poche est ensuite installée sur une presse qui va permettre de séparer les différentes phases. Les pressions effectuées tout le long de la poche vont permettre d'éjecter le plasma par la tubulure du haut et les globules rouges par la tubulure du bas, laissant dans la poche la CLP avec les globules rouges et le plasma restants. Des capteurs photométriques permettent de réguler automatiquement les pressions effectuées afin de maintenir la CLP dans la poche et non de l'éjecter par l'une ou l'autre des tubulures.

Les quantités de plasma et globules rouges résiduels sont calculées de manière à avoir une hémocrite de 45% dans l'échantillon final d'une cinquantaine de mL. L'hémocrite correspond au volume de globules rouges par rapport au volume sanguin total et est généralement comprise entre 35% et 50% chez la femme et entre 40 et 55% chez l'homme, 45% correspondant donc à la valeur moyenne pour un individu sain.

C'est à l'issue de ce processus que je récupère la CLP (figure III.4.3 droite) qui correspond donc à du sang dont la concentration en leucocytes et plaquettes a été multipliée par dix, tous les autres paramètres étant ceux du sang non traité. Bien que la CLP soit enrichie en leucocytes et plaquettes, elle présente l'avantage d'être disponible en gros volume (50 ml par échantillon).



Figure III.4.3 : A gauche, machine de séparation des produits sanguins. A droite, poche de sang après extraction des globules rouges et du plasma.

Les globules rouges et le plasma sont récupérés séparément dans les deux parties du DMU situées de part et d'autre de la poche initiale (figure III.4.2) et sont ensuite déleucocytés. Les poches contenant chaque produit sont alors suspendues et par gravité le plasma et les globules rouges vont traverser le filtre de déleucocytation pour arriver dans la dernière poche qui correspond au produit fini (figure III.4.4).



Figure III.4.4 : Déleucocytation du plasma à gauche et des globules rouges à droite.

La durée de conservation du plasma est de 1 an à -30°C après une surgélation initiale à -70°C. Pour les globules rouges, elle est de 42 jours à +4°C. Les plaquettes qui vont ensuite être extraites de la CLP se conservent à température ambiante (18 à 24°C) pendant 5 jours.

La CLP obtenue précédemment n'est pas transfusable en l'état : en effet, les 3 composants du sang sont toujours mélangés et elle contient encore des leucocytes. Elle va donc subir une nouvelle étape de traitement avant laquelle il est nécessaire de tester son groupe sanguin. Le test utilisé est celui de Beth-Vincent qui utilise la reconnaissance spécifique antigène-anticorps. Les globules rouges possèdent à leur surface des antigènes caractéristiques de leur groupe (A, B, A et B ou O). En présence de l'anticorps correspondant on va avoir une réaction d'agglutination (sorte de précipitation) ; à l'inverse, si l'anticorps n'est pas le bon, il ne se passe rien. C'est d'ailleurs le cas dans l'exemple ci-après (figure III.4.5.) : une goutte de chaque solution d'anticorps (bleu pour l'anti-A et jaune pour l'anti-B) est déposée sur une plaque puis on y ajoute une goutte de sang. Après mélange, nous n'observons aucun changement : l'échantillon est donc de groupe O.

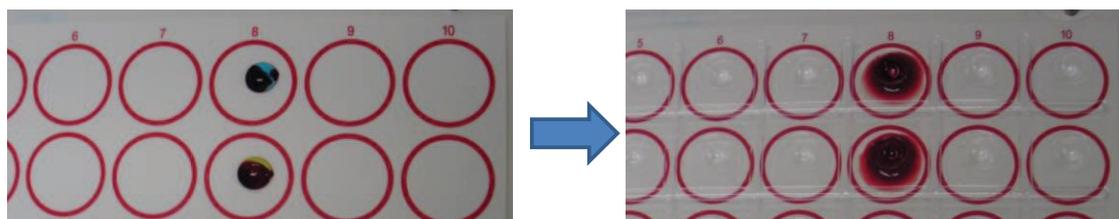


Figure III.4.5 : Epreuve de Beth-Vincent sur un échantillon de CLP.

Les CLP sont rassemblées en lots de 5 par homologie de groupe sanguin et sont reliées à une nouvelle poche de recueil à laquelle est également raccordée une poche de solution de conservation des plaquettes qui permet de limiter le développement d'agents pathogènes lors de la conservation. L'ensemble des 5 échantillons de CLP et la solution de conservation vont donc être mélangés. Ce mélange est centrifugé une dernière fois afin de séparer les globules rouges résiduels (qui seront détruits) d'une part et les plaquettes et le plasma d'autre part. On obtient donc au final un concentré plaquettaire qui est très proche du concentré plaquettaire par aphérèse puisqu'il contient en moyenne $4,4 \cdot 10^{11}$ plaquettes contre $5 \cdot 10^{11}$ plaquettes dans l'autre cas.

En parallèle de la préparation des produits sanguins, des échantillons de chaque don sont envoyés à la plateforme d'Angers pour la Qualification Biologique du Don (QBD). Cela permettra de déterminer le statut immuno-hématologique du donneur afin de garantir la compatibilité avec le receveur et également de vérifier la présence d'agents infectieux

transmissibles par transfusion. Les contrôles biologiques obligatoires réalisés sur chaque don sont :

- le phénotypage complet, c'est-à-dire la détermination du groupe sanguin complet, par recherche d'antigènes spécifiques à la surface des globules rouges
- le dépistage de la syphilis, des hépatites B et C, du VIH, du HTLV (rétrovirus oncogène) et du CMV (cytomégalovirus)
- la recherche d'anticorps anti-paludéens pour les donneurs ayant séjourné dans des pays à risque.

Toute anomalie détectée entraîne automatiquement l'interdiction d'utilisation de tous les produits issus du don, ce qui est notifié par un étiquetage spécifique (figure III.4.6), ainsi que l'information du donneur quant à la pathologie détectée. Compte tenu des enjeux tant pour le receveur que pour le donneur, il est nécessaire de respecter une très grande rigueur dans la traçabilité des produits sanguins.



Figure III.4.6 : Sang présentant une anomalie à gauche, sang propre à l'utilisation à droite. Toute anomalie est signifiée par la mention XX à la place du groupe sanguin.

Pour les mesures dans le sang présentées ci-après, les conditions d'obtention des échantillons ainsi que les précautions d'utilisation sont décrites dans la partie Matériels et Méthodes 2.10.

La manipulation des produits sanguins au sein du laboratoire est autorisée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche sous le numéro d'agrément AC 2013-2025 et par l'Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin sous le numéro de convention DC 2014-2203.

4.1.3. Molécules particulières entrant dans la composition du sang

4.1.3.1. Molécules d'intérêt

Comme nous l'avons dit précédemment, le sang est constitué principalement de plaquettes, globules rouges et blancs et de plasma contenant de nombreuses molécules d'intérêt biologique (glucose, ions, hormones,...) qu'il va faire transiter dans tout l'organisme. La couleur rouge caractéristique du sang vient de la présence d'hémoglobine dans les globules rouges. L'oxygène va se fixer par complexation à l'atome de fer entraînant un changement de couleur du complexe métallique du rouge sombre vers le rouge clair [36].

4.1.3.2. Interférents notoires

De nombreux interférents connus pour inhiber les électrodes enzymatiques sont présents dans le sang et ont été répertoriés dans la littérature. Le tableau III.4.1 ci-dessous présente un résumé des principales molécules interférentes connues et leur gamme de concentration physiologique respective [45-48].

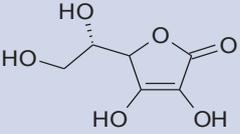
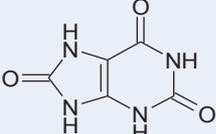
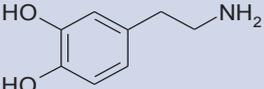
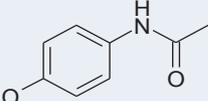
Molécule	Concentration sanguine (mM)
acide ascorbique 	0,028-0,1
acide urique 	0,178-0,416
dopamine 	<0,001
acétaminophène 	0,13-0,15
NaCl	~150
MgSO ₄	~0,3
NaHCO ₃	~20
ZnSO ₄	~1
Ca(OH) ₂	~1

Tableau III.4.1 : Les principaux interférents présents dans le sang et leur concentration physiologique moyenne.

4.1.4. Paramètres physiologiques du sang

Le volume total de sang pour un être humain de corpulence moyenne avoisine les 5L. D'une manière générale, il représente 7 à 8% de la masse corporelle de chaque individu.

Le sang est légèrement plus dense que l'eau car sa densité est comprise entre 1,055 et 1,065 et son pH est généralement compris entre 7,35 et 7,45 [36].

Concernant le transport de l'oxygène, il se fait majoritairement sous forme combinée lié à l'hémoglobine (97%) mais une faible quantité est également libre dissoute dans le plasma et le cytoplasme des globules rouges (3%). La consommation en oxygène au repos est d'environ 3,5 ml par kg et par minute, ce qui donne $250 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pour un individu de taille et de poids moyens. La concentration totale en oxygène dans le sang est d'environ 205 ml par litre de sang, ce qui est largement suffisant pour assurer la demande métabolique en oxygène au repos et en activité.

Le débit sanguin va quant à lui varier en fonction des besoins métaboliques et des fonctions des différents organes : par exemple, il est de $1200 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ au niveau des muscles striés et de seulement $500 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pour la peau. Au total, près de 5800 ml de sang qui circulent dans le corps humain chaque minute [35].

L'ensemble de ces paramètres va dépendre de facteurs extérieurs comme la température ou la pression partielle en oxygène dans l'atmosphère mais également de la viscosité même du sang. La viscosité est fonction de l'hématocrite ainsi que de la concentration des différentes molécules précitées dont particulièrement les lipides, les protéines et le glucose. Ce dernier est très important car il constitue la base de nombreuses chaînes métaboliques indispensables au fonctionnement du corps humain. La glycémie d'un individu sain varie généralement entre $0,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (3,9 mM) à jeun et $1,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (7 mM) après un repas.

4.2. Mesures préliminaires

4.2.1. Protocole d'expérimentation dans le sang

Pour l'ensemble des mesures réalisées et présentées dans la suite de ce manuscrit les échantillons de sang ont été utilisés tels que fournis par l'EFS, sans dilution ni addition de quelque produit que ce soit. Pendant les tests, le sang est maintenu à $37,5^\circ\text{C}$, température du corps humain, et sous agitation magnétique pour éviter la sédimentation des globules rouges.

4.2.2. L'oxygénation du sang

Les premières mesures réalisées dans du sang ne se sont pas montrées très concluantes comme nous pouvons le voir sur la figure III.4.7.A. En effet, même si l'anode oxyde efficacement le glucose, la réduction de l'oxygène à la cathode s'avère difficile. Le fait que l'on observe le signal du polymère montre qu'il n'y a pas assez d'oxygène dans le milieu.

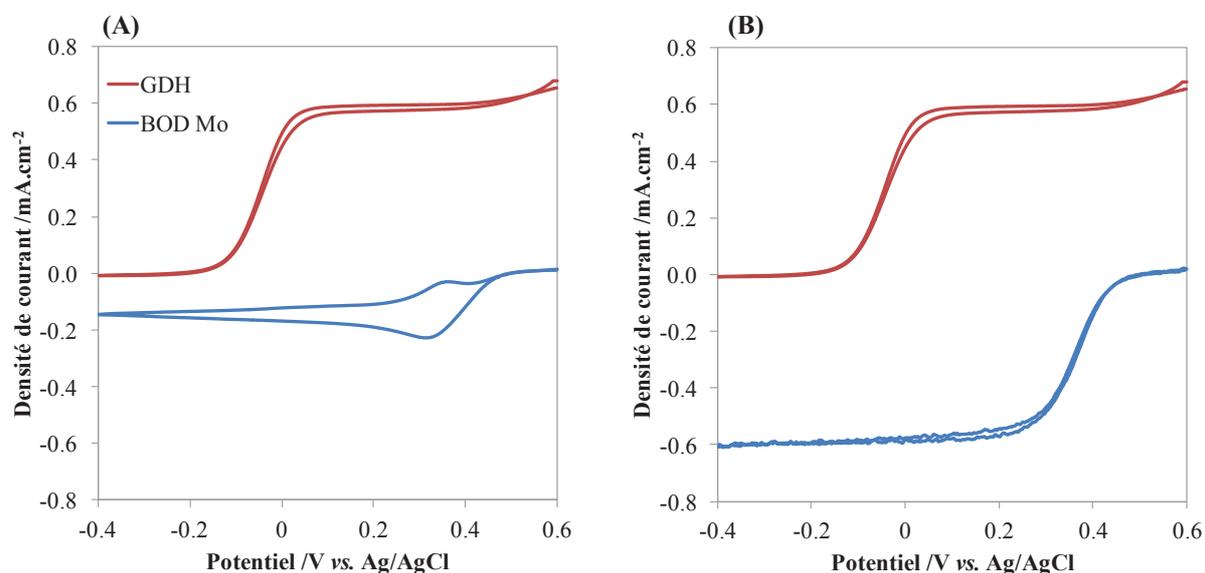


Figure III.4.7 : Densités de courant pour des fibres de carbone modifiées avec un hydrogel à base de GDH ou de BOD Mo, dans un échantillon de sang avec une glycémie de 5,6 mM, sous air et avec agitation magnétique à 5 mV/s (A) avant et (B) après oxygénation du sang.

Il se trouve que lorsque nous récupérons le sang de l'EFS, il est conditionné sous vide et est caractérisé par une couleur rouge sombre typique du sang veineux appauvri en oxygène. Nous avons donc procédé à la ré-oxygénation du sang par bullage d'oxygène afin d'accélérer le processus naturel d'oxygénation par diffusion. Sur la figure III.4.8 nous voyons clairement un changement de couleur prouvant que le sang est à présent correctement oxygéné. La catalyse s'en trouve donc nettement améliorée comme le montre la figure III.4.7.B.

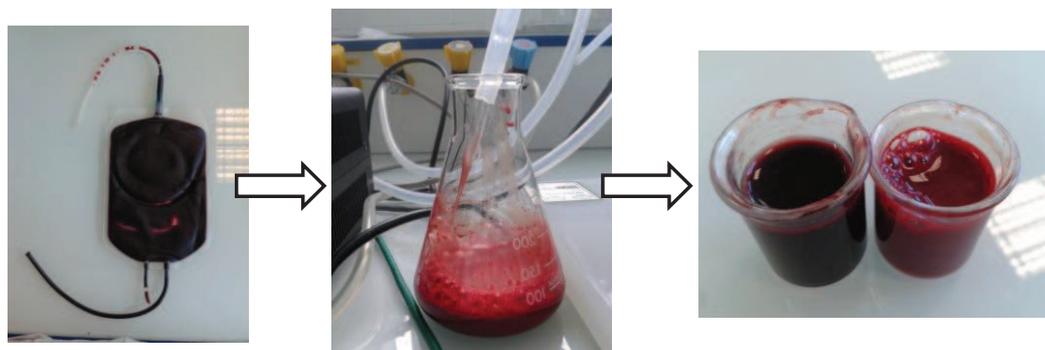


Figure III.4.8 : Processus d'oxygénation du sang.

4.2.3. Catalyses et courbe de puissance typiques

Après une oxygénation correcte du sang nous avons pu enregistrer des catalyses efficaces pour l'anode et la cathode. Pour ce faire, la biopile est directement immergée dans un bécher contenant 10 ml de sang total (sans additif ni dilution) thermostaté à 37,5°C par bain marie et avec agitation magnétique (figure III.4.9.A). Après plusieurs heures d'expérimentation, nous pouvons voir sur la figure III.4.9.B qu'aucune coagulation ne vient se former à la surface de la biopile, alors même que les échantillons de sang que nous utilisons contiennent 10 fois plus de plaquettes et leucocytes que la normale.

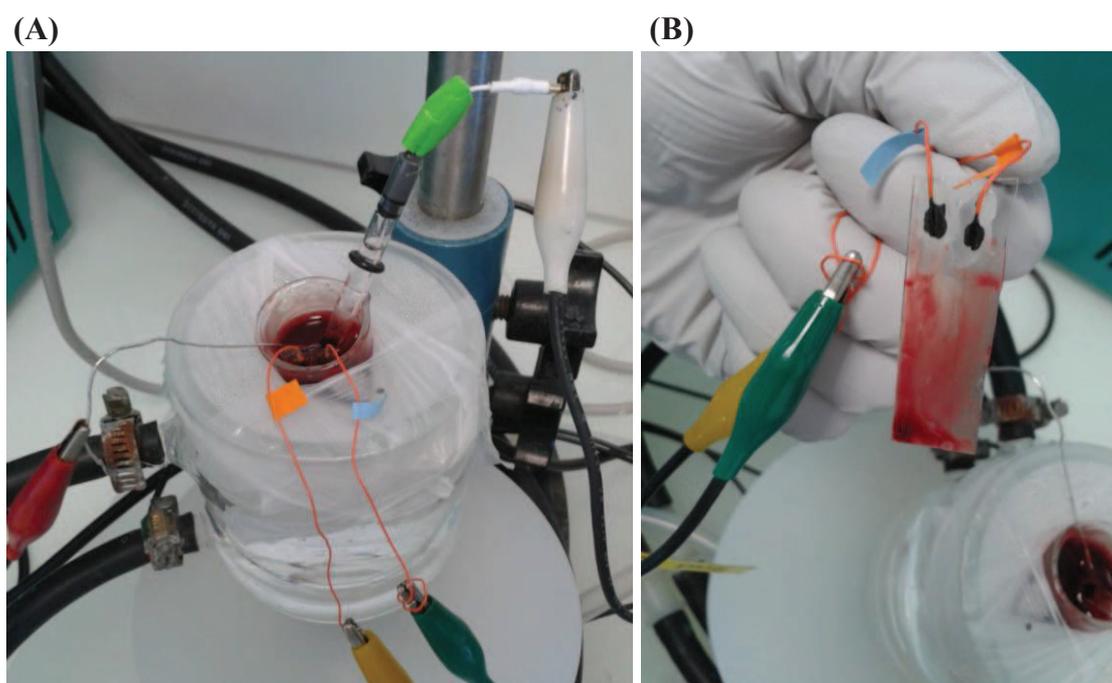


Figure III.4.9 : (A) Dispositif pour l'expérimentation dans le sang. (B) Aspect de la biopile après 4 à 6h d'immersion dans le sang.

Sur la figure III.4.10 sont présentés les signaux des polymères dans les tampons Pipes/CaCl₂ et PBS ainsi que dans du sang, de même pour les catalyses et les courbes de puissance. L'échantillon de sang utilisé ici a une glycémie de 5,6 mM, valeur moyenne pour un individu sain.

D'après la figure III.4.10.A nous constatons que les signaux des médiateurs enregistrés dans le sang sont bien définis malgré une diminution de la charge d'environ 40% par rapport aux mesures dans le PBS. Compte tenu de la présence de nombreuses protéines et molécules diverses dans le sang il est probable que des interactions se forment avec le médiateur causant des interférences dans la structure de l'hydrogel.

Au regard de la figure III.4.10.B, nous observons une nette diminution de la catalyse dans le sang comparé aux tampons. Les composants du sang ont donc également un effet

inhibiteur sur l'enzyme puisque la diminution du signal du médiateur n'est pas suffisante pour justifier la baisse de la catalyse.

Enfin, sur la figure III.4.10.C, bien que la puissance de la biopile soit nettement plus faible dans le sang (- 75% par rapport au Pipes/CaCl₂ et - 55% par rapport au PBS) elle est tout de même très intéressante puisqu'elle atteint un maximum de 63,25 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0,410 V. En effet, si nous nous reportons au chapitre I, nous avons vu que seuls 3 articles avaient rapporté des mesures de biopiles enzymatiques dans le sang et seul l'un d'eux donne la valeur de la glycémie mesurée. Ainsi, Wang et al ont atteint une puissance maximale de 2,8 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0,47 V dans un échantillon ayant une glycémie de 4,6 mM [14].

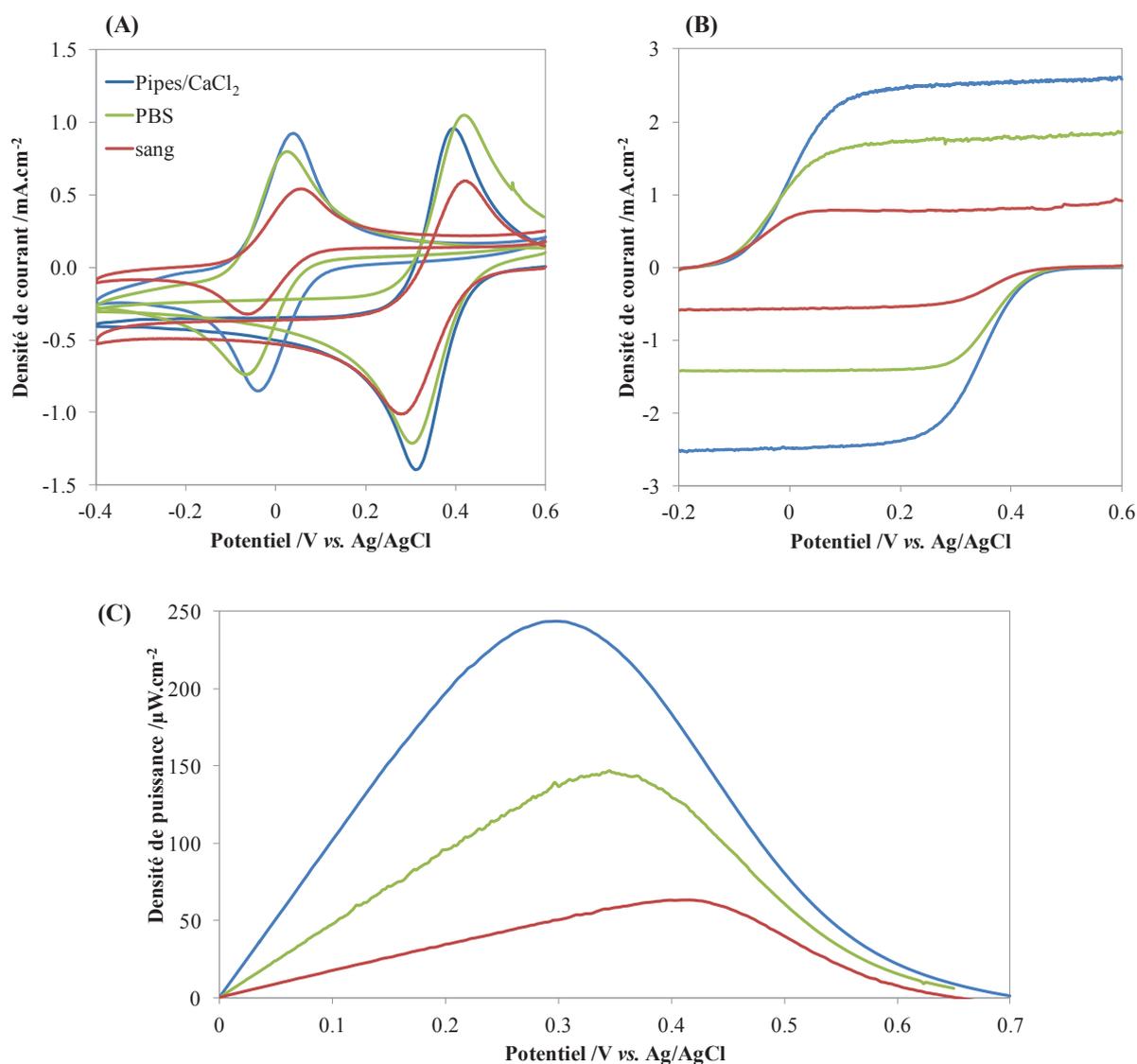


Figure III.4.10 : Densité de courant (A) à 100mV/s sous Ar et (B) à 5 mV/s sous O₂ + 5 mM glucose. (C) Courbes de densité de puissance à 5 mV/s sous O₂ + 5 mM glucose ; pour une biopile à base de BOD Mo et de GDH, mesurée dans du tampon Pipes 20 mM + CaCl₂ 3 mM (bleu) ou du PBS (vert) pH 7,2 ou dans un échantillon de sang à 5,6 mM de glycémie (rouge), à 37,5°C sous agitation magnétique.

4.3. Utilisation de membranes protectrices

Comme nous l'avons dit précédemment nous souhaitons augmenter la stabilité de notre biopile par l'utilisation de membranes la protégeant du milieu extérieur. Les tests réalisés dans le tampon (figures III.3.5 et III.3.6) ont montré que si l'utilisation d'un sac de dialyse ne perturbe que très peu la diffusion des substrats, ce n'est pas le cas des membranes à base de Nafion® et de PEGDGE qui entraînent une perte moyenne de 50% au niveau des densités de courant et puissance. Ces 3 membranes ont néanmoins été testées dans du sang comme nous pouvons le voir sur la figure III.4.11.

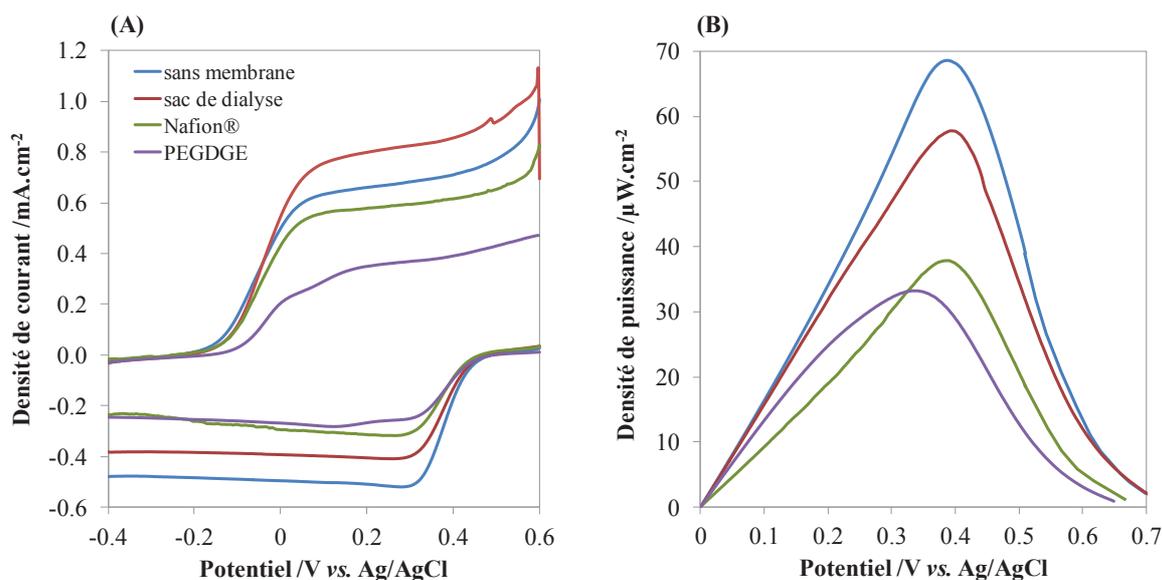


Figure III.4.11 : Densités (A) de courant et (B) de puissance pour des biopiles à base de BOD Mo et de GDH sans ou avec une membrane de protection. Mesures dans un échantillon de sang ayant une glycémie de 5,6 mM à 37,5°C et 5 mV/s sous air.

La figure III.4.11.A résume les densités de courants obtenues pour les anodes et cathodes en fonction du type de membrane protectrice utilisée. Concernant la cathode, l'effet des différentes membranes est le même que dans le tampon : il y a une diminution de la densité de courant par 2 avec les revêtements en PEGDGE et Nafion® et seulement 15 à 20% de baisse avec le sac de dialyse. A l'anode, seul le revêtement en PEGDGE semble avoir un impact négatif sur la densité de courant.

D'après la figure III.4.11.B, nous constatons que la même densité de puissance est obtenue pour les membranes en Nafion® et PEGDGE et est inférieure de 40 à 50% par rapport à la biopile non protégée. Pour la biopile protégée avec un sac de dialyse, seule une diminution de 15% est enregistrée. Ceci est notamment dû au fait que la cathode soit limitante dans les 3 biopiles, donc elle fixe la puissance maximale de chaque biopile. De plus nous

notons un décalage de potentiel pour la biopile avec une membrane en PEGDGE : l'oxydation du glucose commence en effet à un potentiel plus oxydant que les autres.

Pour évaluer la stabilité des différentes biopiles, elles ont ensuite été rincées et testées dans un nouvel échantillon de sang (figure III.4.12). Cet échantillon ayant une glycémie très basse (1,09 mM) c'est à présent l'anode qui est limitante. Nous constatons que la densité de puissance est la même quel que soit le type de membrane et elle est presque 2 fois plus élevée que dans le cas de la biopile non protégée et pour laquelle le courant anodique est divisé par 2. Cette dernière est donc moins stable car exposée directement au milieu extérieur. Ainsi la présence d'une membrane permet d'augmenter la durée de vie de la biopile dans le sang.

Les effets des 3 membranes étant relativement similaires dans le sang, nous avons choisi de nous concentrer sur le sac de dialyse pour les chronoampérométries présentées plus loin dans ce chapitre car c'est une méthode plus simple à mettre en place et plus reproductible que les 2 autres. De plus elle n'altère pas la structure de l'hydrogel.

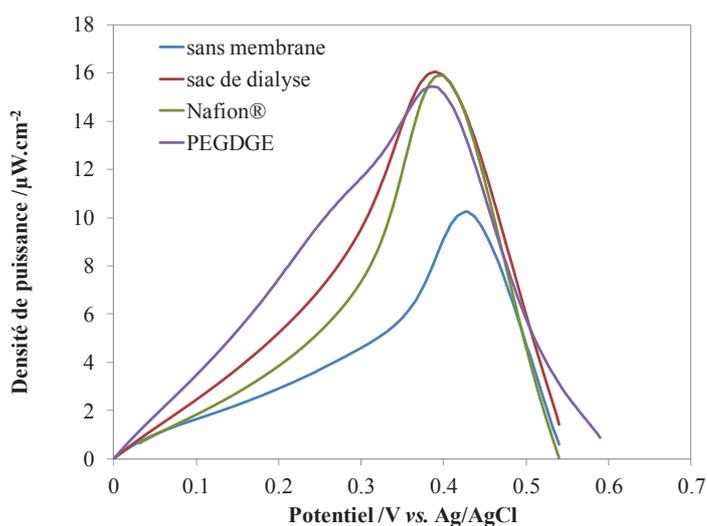


Figure III.4.12 : Densités de puissance pour des biopiles de la figure III.4.11 (après rinçage à l'eau) mesurées dans un deuxième échantillon de sang ayant une glycémie de 1,09 mM à 37,5°C et 5 mV/s sous air et agitation magnétique.

4.4. La biopile GDH/BOD de *Magnaporthe oryzae* dans plusieurs échantillons de sang

En plus de la production d'un courant électrique, nous avons voulu voir si notre biopile pouvait permettre d'évaluer la glycémie de chaque échantillon de sang. Pour cela nous avons supposé que la puissance maximale produite serait proportionnelle à la concentration en glucose, la teneur en oxygène étant relativement constante après l'étape de ré-oxygénation.

4.4.1. Mesures préliminaires dans le sang

Nous avons mesuré les courants de réduction et d'oxydation ainsi que les densités de puissance pour des biopiles à base de BOD *Mo* et de GDH dans différents échantillons de sang, avec des glycémies variant entre 1,09 et 11,2 mM.

Sur la figure III.4.13.A nous pouvons voir que le courant de réduction de l'oxygène est relativement stable autour de 1 μA . Concernant l'oxydation du glucose, le courant augmente de façon assez linéaire avec la glycémie. Néanmoins, à partir de 5 mM de glycémie, nous constatons que le courant cathodique devient limitant. Ceci explique que la densité de puissance augmente jusque là puis se stabilise autour de 70 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ (figure III.4.13.B).

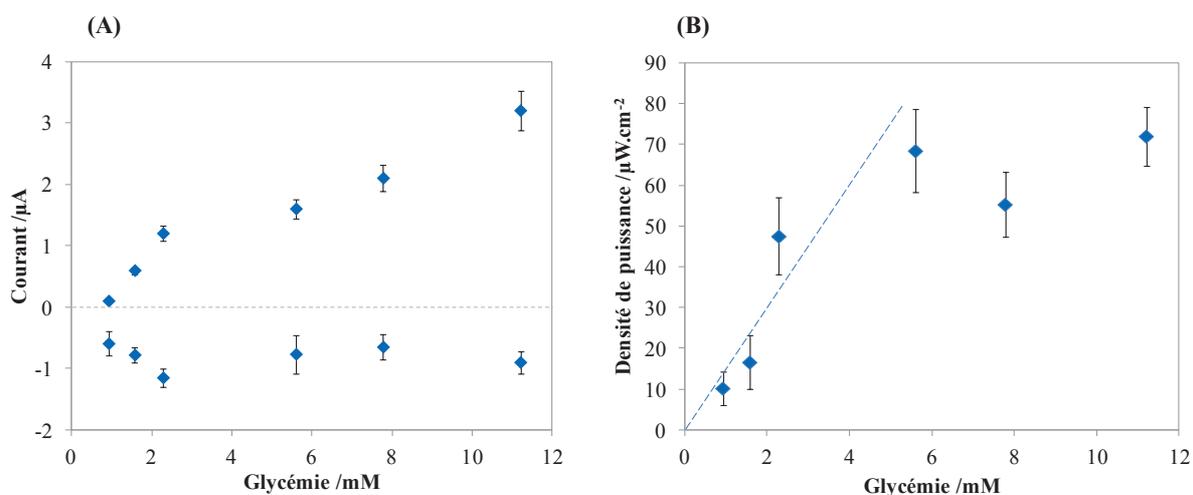


Figure III.4.13 : (A) Courants de réduction de l'oxygène et d'oxydation du glucose et (B) densités de puissance pour des biopiles BOD *Mo* - GDH testées dans des échantillons de sang ré-oxygénés de glycémie variable, à 5 mV/s sous air et agitation magnétique.

4.4.2. Optimisation de la cathode

Afin de ne plus être limité par la cathode, nous avons simplement décidé d'augmenter sa taille en la multipliant par 2 ou 3 fois comme schématisé sur la figure III.4.14.

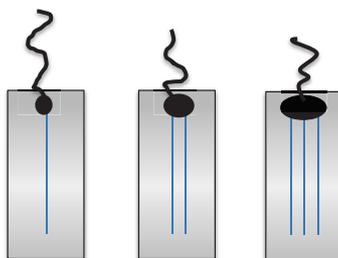


Figure III.4.14 : Schéma des cathodes simple, double et triple.

D'après la figure III.4.15, nous constatons qu'en augmentant la taille de la cathode nous avons bien une hausse de courant que ce soit au niveau du signal du médiateur ou du courant de réduction. De plus, cette augmentation est strictement proportionnelle à l'accroissement de la cathode puisqu'en normalisant le courant par la surface de chaque cathode nous obtenons exactement les mêmes densités de courant.

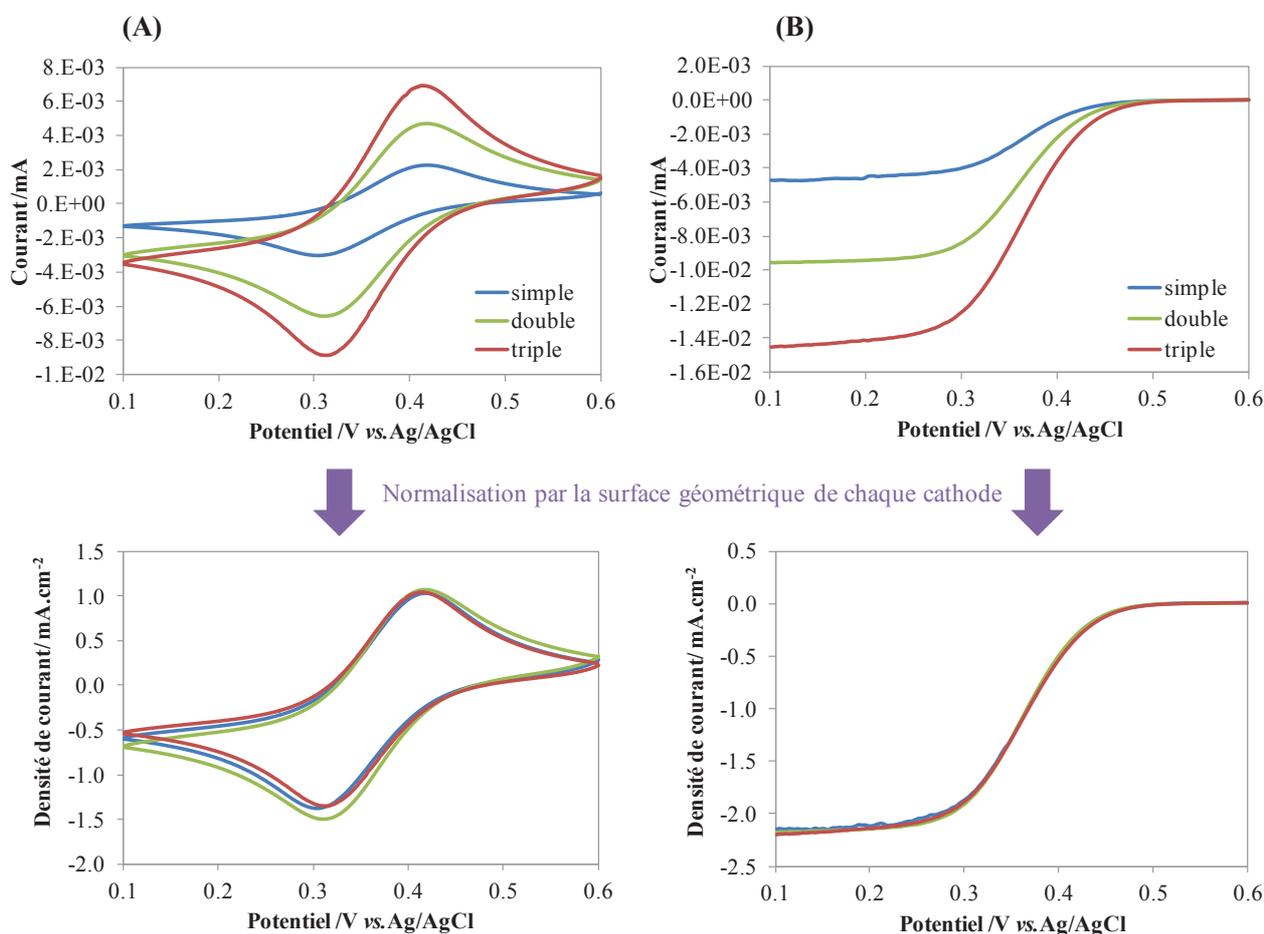


Figure III.4.15 : Courants et densités de courant pour des cathodes composées de 1, 2 ou 3 fibres de carbone modifiées chacune avec $2000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ d'hydrogel à base de BOD Mo ; séchage 18h à 4°C et mesure dans du PB 100 mM pH 7, 2 à $37,5^\circ\text{C}$ sous agitation magnétique (A) à 100 mV/s sous Ar et (B) à 5 mV/s sous O_2 .

A partir des résultats de la figure III.4.13 nous pouvons conclure qu'il faudrait multiplier le courant cathodique par 3 pour ne plus être limité dans la gamme de glycémie étudiée. Pour la suite nous utiliserons donc la triple cathode pour réaliser les biopiles.

Sur la figure III.4.16.A nous pouvons voir la comparaison des courants pour une simple et une triple cathode (figure III.4.15.B) à laquelle est rajouté le courant d'oxydation de la GDH. Pour une biopile à base de BOD Mo et de GDH, nous voyons que la différence de

potentiel au courant maximal (imposé par l'anode) est supérieure dans le cas de la triple cathode. Ceci implique une augmentation du potentiel optimal de fonctionnement de la biopile passant de 0,29 à 0,35 V vs. Ag/AgCl comme nous pouvons l'observer sur la figure III.4.16.B.

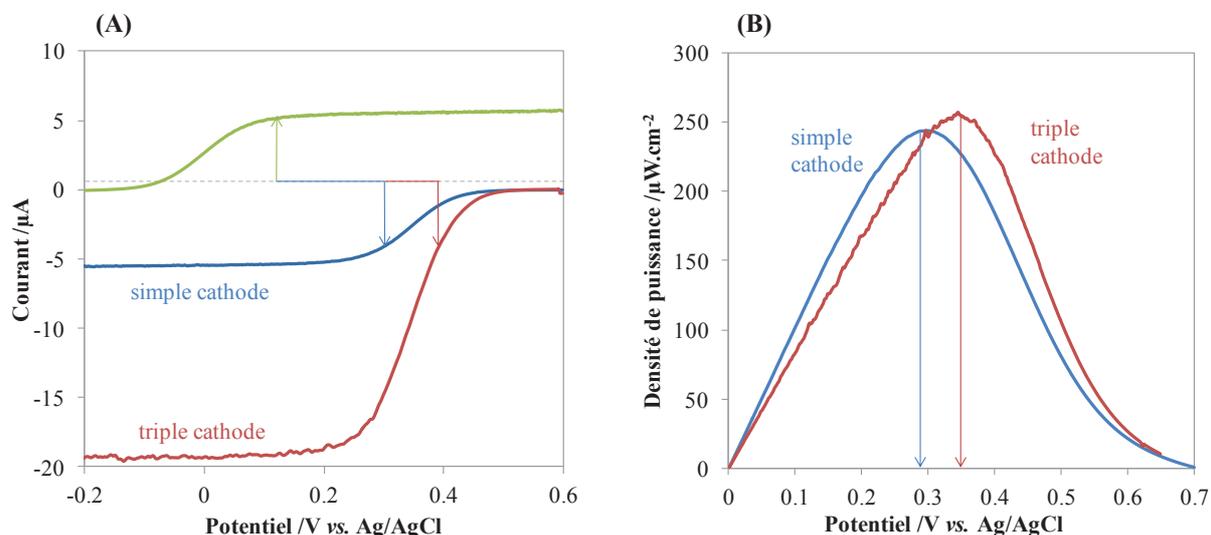


Figure III.4.16 (A) Courants et (B) densités de puissance pour des biopiles avec une simple (bleu) ou triple (rouge) cathode à base de BOD Mo et une anode à base de GDH ; séchage 18h à 4°C et mesure dans du Pipes 20 mM + CaCl₂ 3 mM pH 7, 2 à 37,5°C à 5 mV/s sous O₂ + 5 mM de glucose, avec agitation magnétique.

4.4.3. Mesures dans le sang : dosage de la glycémie

Nous avons à nouveau testé nos biopiles à base de BOD Mo et de GDH dans plusieurs échantillons de sang mais cette fois en triplant la taille de la cathode.

Comme nous pouvons le voir sur la figure III.4.17.A, l'augmentation du courant anodique est toujours proportionnelle à la glycémie des échantillons de sang. Le courant cathodique n'est quant à lui plus du tout limitant avec une valeur moyenne de -8 μA contre -1 μA précédemment pour la cathode simple. De plus si l'on compare les densités de courant, nous sommes passés de -0,45 à -1,21 mA.cm⁻². Nous avons deux explications qui pourraient permettre de justifier cette amélioration : tout d'abord il est possible que la réalisation des biopiles se soit améliorée avec la pratique, ensuite l'agitation magnétique a été améliorée grâce à l'utilisation de barreaux aimantés plus petits.

Sur la figure III.4.17.B nous voyons que la densité de puissance est bien linéaire avec la glycémie pour l'ensemble des échantillons testés grâce à la triple cathode. Si l'on considère l'augmentation linéaire du courant anodique, nous devrions pouvoir doser la glycémie jusqu'à environ 20 mM, la courant cathodique devenant alors limitant. Notons que cette valeur de glycémie est très largement au dessus de la gamme physiologique, même pour une personne souffrant de diabète (jusqu'à 15 mM dans les cas sérieux).

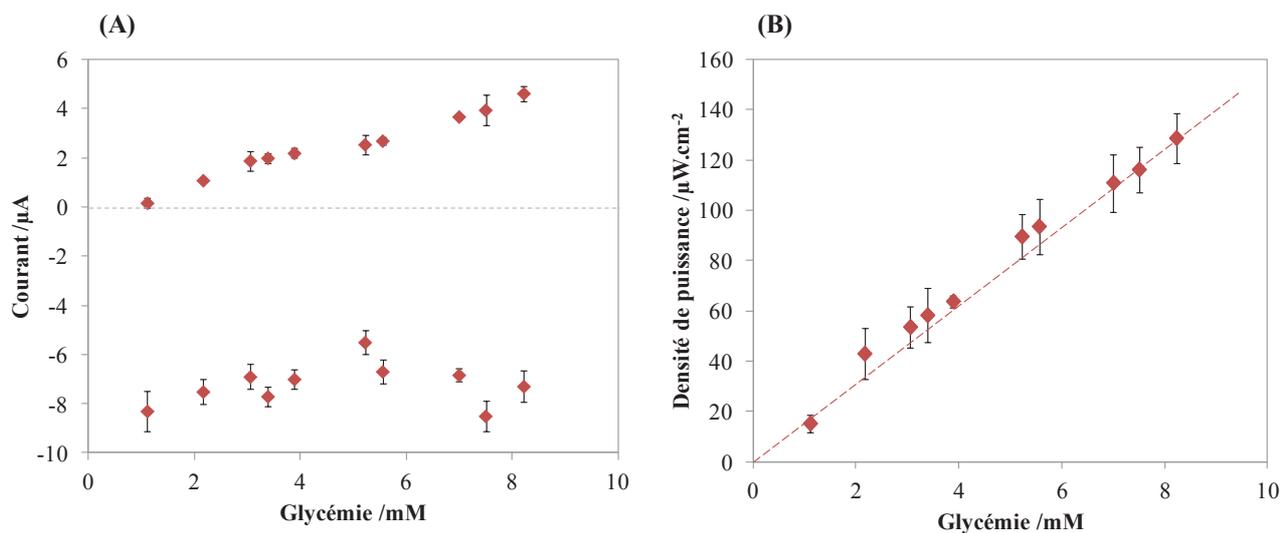


Figure III.4.17 : (A) Courants de réduction de l'oxygène et d'oxydation du glucose et (B) densités de puissance pour des biopiles BOD Mo - GDH testées dans différents échantillons de sang ré-oxygénés, sous air et à 5 mV/s avec agitation magnétique.

En conclusion la biopile BOD Mo-GDH que nous avons conçue et optimisée nous permet à présent de doser la glycémie d'échantillons de sang de manière assez précise et linéaire dans la gamme de concentration physiologique. Une telle expérience a déjà été réalisée par Liu et al avec une biopile à anode enzymatique fonctionnant dans du PBS puis implantée en sous cutané dans un patient souffrant de diabète de type I [49], mais jamais avec une biopile totalement enzymatique et immergée directement dans du sang humain.

4.5. Stabilité de la biopile dans le sang : effet de l'utilisation de sacs de dialyse

4.5.1. Sur 6h de fonctionnement continu

Nous avons enregistré l'évolution de la densité de puissance de la biopile pendant 6h d'opération continue dans du tampon Pipes/ CaCl_2 ou PBS (cf figure III.3.3) et dans du sang, avec ou sans sac de dialyse.

Sur la figure III.4.18, nous constatons que la biopile est plus stable dans le sang que dans le PBS mais moins que dans le Pipes/ CaCl_2 . De plus, l'utilisation d'un sac de dialyse

permet d'augmenter la stabilité dans le sang puisqu'après 6h il reste 20% de la densité de puissance initiale contre seulement 12% pour la biopile non protégée.

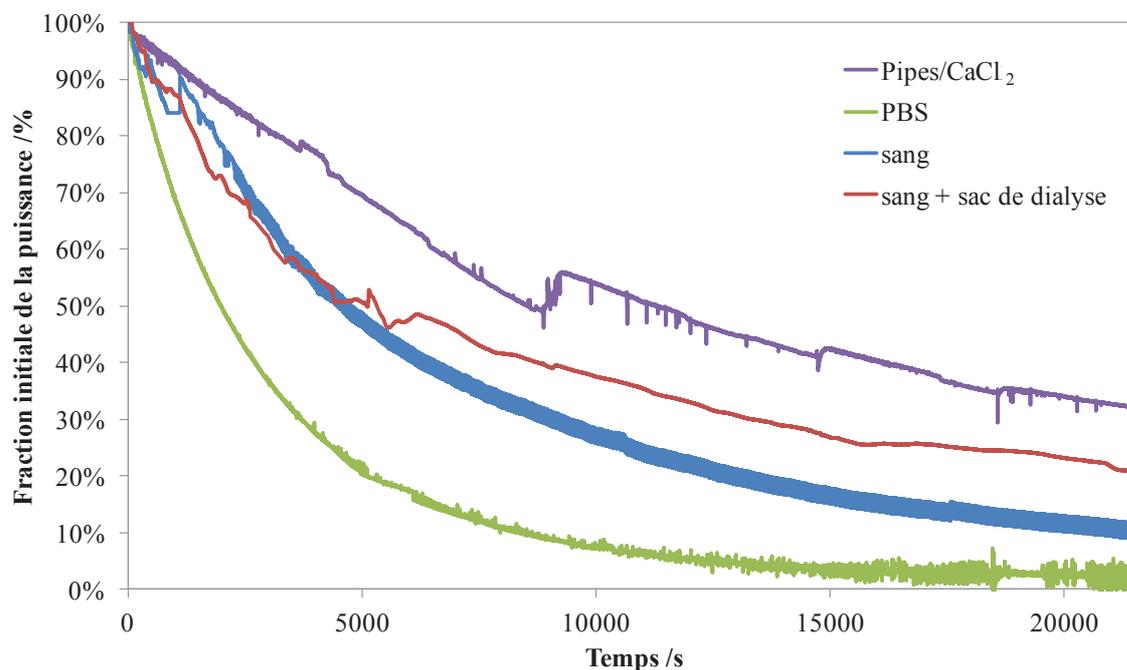


Figure III.4.18 : Chronoampérométries pour des biopiles à base de BOD Mo et de GDH mesurées pendant 7h dans du Pipes 20 mM + CaCl₂ 3 mM ou du PBS sous O₂ et 5 mM glucose ou du sang ayant une glycémie de 6,9 mM avec ou sans sac de dialyse. Potentiel fixé au potentiel de puissance maximale pour chaque biopile (+ 0,3 V dans le tampon et + 0,35 V dans le sang).

4.5.2. Sur les signaux des polymères rédox

D'après les signaux des polymères rédox enregistrés dans le sang (figure III.4.19.A) nous voyons que l'utilisation de sacs de dialyse a peu d'effet sur la diffusion des substrats dans le sang. Après 6h d'opération continue, nous constatons que la diminution du signal est similaire pour les 2 électrodes avec une légère amélioration grâce à la protection par le sac de dialyse : -73% en moyenne pour la biopile non protégée et -64% pour celle utilisant un sac de dialyse (Figure III.4.19.B).

Comme contrôle, pendant les 6h de chronoampérométrie nous avons également stocké des biopiles dans du tampon Pipes/CaCl₂ à température ambiante. Nous remarquons qu'il y a une perte de signal également d'environ 44% (figure III.4.19.B pointillés) qui est donc simplement due au décrochage de l'hydrogel. Ceci n'est pas surprenant car le film catalytique relativement fin est déposé sur une fibre de carbone simple sans porosité ni fonctionnalisation pouvant favoriser l'attachement de l'hydrogel.

La perte dans le cas de l'utilisation dans le sang est plus importante car :

- il y a agitation ce qui favorise le décrochage mécanique de l'hydrogel ;
- la biopile se trouve dans du sang où des molécules interférentes viennent dégrader l'hydrogel ; il faudrait peut-être alors essayer avec un sac de dialyse de pores plus petits pour empêcher le passage de ces interférents mais au risque de gêner également la diffusion des substrats.

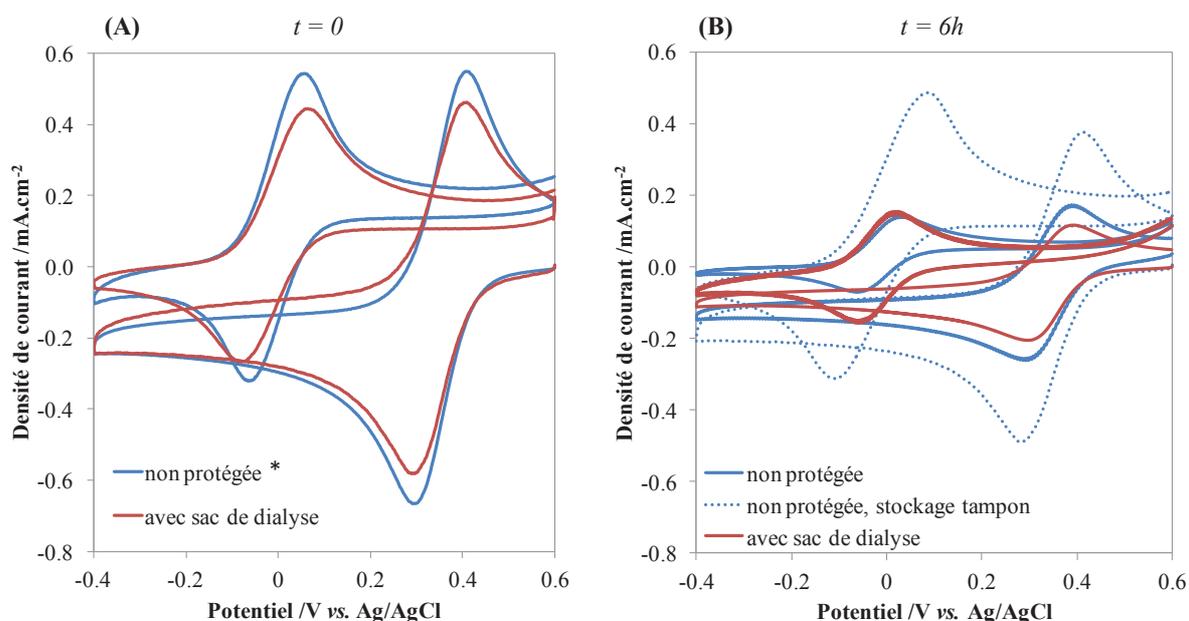


Figure III.4.19 : Densités de courant de biopiles BOD Mo-GDH protégées (rouge) ou non (bleu) par un sac de dialyse ; mesures dans un échantillon de sang de glycémie 5,6 mM bullé sous Ar, à 100 mV/s (A) avant et (B) après 6h soit d'opération continue dans du sang (traits pleins) soit de stockage à température ambiante dans du tampon Pipes/CaCl₂ (pointillés). * le signal à t = 0 est le même pour la biopile ayant fonctionné 6h dans le sang (figure B, courbe bleue, traits pleins) et pour celle ayant été stockée 6h dans du Pipes/CaCl₂ (figure B, courbe bleue, pointillés)

4.5.3. Sur le courant

Au regard des catalyses initiales dans le sang (figure III.4.20.A) nous constatons que l'utilisation d'un sac de dialyse a un impact limité sur la diffusion des substrats puisque les courants cathodiques et anodiques diminuent d'environ 15%.

Après 6h d'opération continue (figure III.4.20.B), la présence d'un sac de dialyse a permis de conserver 2 fois plus de courant que pour la biopile non protégée. Donc même si le sac de dialyse ne peut empêcher le décrochage de l'hydrogel il permet néanmoins d'augmenter la stabilité de l'enzyme.

Enfin, après 6h de stockage dans du tampon Pipes/CaCl₂ à température ambiante, nous observons une nette diminution de la catalyse (~ 64% de courant en moins) ce qui signifie qu'une partie de la perte de courant catalytique dans le sang est simplement due à la perte d'activité de l'enzyme dans le temps.

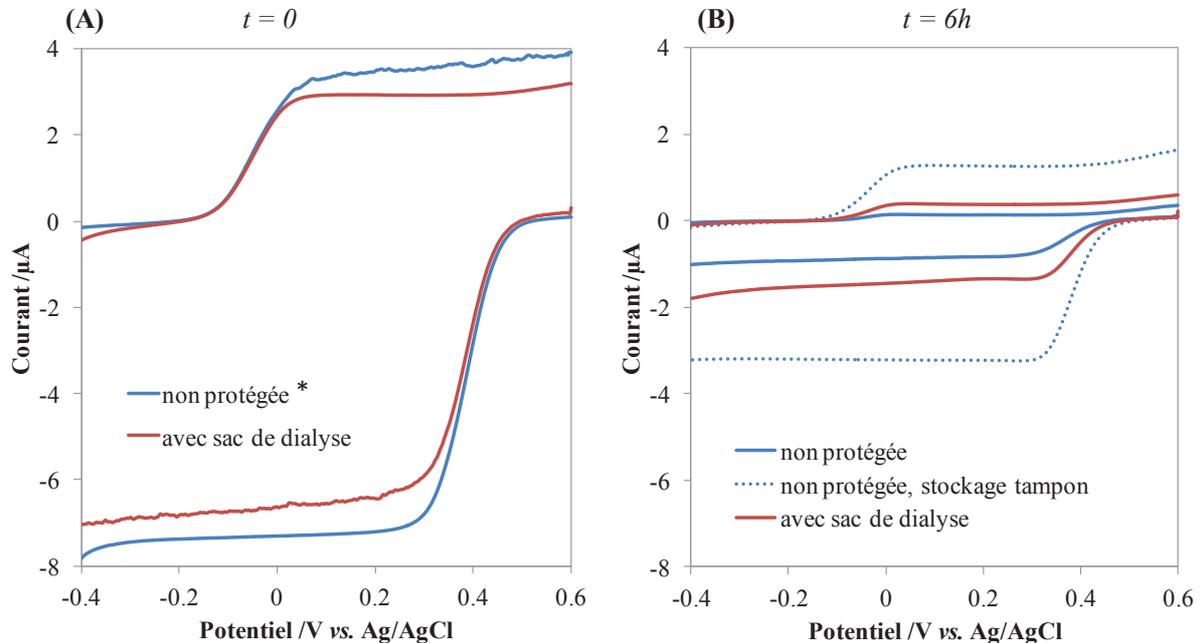


Figure III.4.20 : Catalyses anodiques et cathodiques de biopiles BOD Mo-GDH protégées (rouge) ou non (bleu) par un sac de dialyse ; dans un échantillon de sang de glycémie 5,6 mM à 5 mV/s (A) avant et (B) après 6h soit d'opération continue dans du sang (traits pleins) soit de stockage à température ambiante dans du tampon Pipes/CaCl₂ (pointillés). * le signal à $t = 0$ est le même pour la biopile ayant fonctionné 6h dans le sang (figure B, courbe bleue, traits pleins) et pour celle ayant été stockée 6h dans du Pipes/CaCl₂ (figure B, courbe bleue, pointillés)

Afin d'étudier plus en détail la stabilité de nos électrodes, nous avons résumé dans le tableau III.4.2 les différentes pertes enregistrées après 6h de fonctionnement continu dans du sang ou 6h de stockage dans du tampon (figures III.4.19 et 20). En première approximation, la perte dite enzymatique correspond à la différence de perte en courant catalytique (figure III.4.20) et la perte en polymère rédox (figure III.4.19).

Nous constatons que les différentes pertes mesurées dans le Pipes/CaCl₂ ou dans le sang après 6h d'opération continue sont similaires, avec généralement une amélioration au niveau de la cathode. Seul 20% de la perte en courant catalytique est dû à une perte enzymatique, les 80% restants étant attribués à la perte en polymère rédox. De plus, la perte en polymère rédox après 6h de stockage dans du tampon représente tout de même les 2/3 de la

perte en courant catalytique enregistrés dans les mêmes conditions. La biopile ne fonctionnant pas, cette perte correspond donc au simple décrochage de l'hydrogel. Ceci n'est pas surprenant étant donné que l'on travaille sur des films fins immobilisés sur des fibres non poreuses.

De plus, nous remarquons que l'utilisation d'un sac de dialyse permet de diminuer la dénaturation de l'hydrogel ainsi que de préserver un peu mieux l'activité enzymatique, quelle que soit l'électrode.

En conclusion, l'inhibition des enzymes et la dénaturation de l'hydrogel par les interférents présents dans le sang sont relativement faibles, le phénomène majoritaire responsable de la stabilité déclinante des électrodes étant le décrochage mécanique de l'hydrogel.

		Mesures dans le Pipes/CaCl ₂ avant et après 6 h d'opération dans le sang		Mesures dans le sang avant et après 6 h d'opération dans le sang		Mesures dans le sang avant et après 6 h de stockage dans le tampon	
		cathode	anode	cathode	anode	cathode	anode
Perte en courant catalytique	non protégée	84%	96%	88%	97%	60%	67%
	sac de dialyse	75%	84%	78%	88%	*	*
Perte en polymère rédox	non protégée	66%	78%	70%	76%	43%	45%
	sac de dialyse	61%	69%	63%	65%	*	*
Perte enzymatique	non protégée	12%	18%	17%	21%	17%	22%
	sac de dialyse	14%	15%	15%	23%	*	*

Tableau III.4.2 : Résumé des pertes en courant catalytique, polymère rédox et enzyme pour chaque électrode de biopiles BOD Mo – GDH après 6h de fonctionnement continu dans du sang ou de stockage dans du Pipes/CaCl₂, protégées ou non par un sac de dialyse. Mesures dans du sang ou du Pipes/CaCl₂. * résultats similaires à ceux de la biopile non protégée, dans les mêmes conditions de mesure.

4.5.4. Sur la puissance

Pour finir, nous avons enregistré les courbes de densité de puissance pour les biopiles avant et après 6h de chronoampérométrie, avec ou sans sac de dialyse. Sur la figure III.4.21 nous pouvons voir que la densité de puissance maximale est très similaire pour la biopile non protégée et celle avec un sac de dialyse. Après 6h d'opération continue, la densité de puissance est meilleure dans le cas de la biopile protégée, ce qui corrobore les résultats de la figure III.4.20. Lorsque la biopile est stockée 6h dans le tampon, la densité de puissance diminue d'environ 60% ce qui est logique compte tenu des observations de la figure III.4.20.

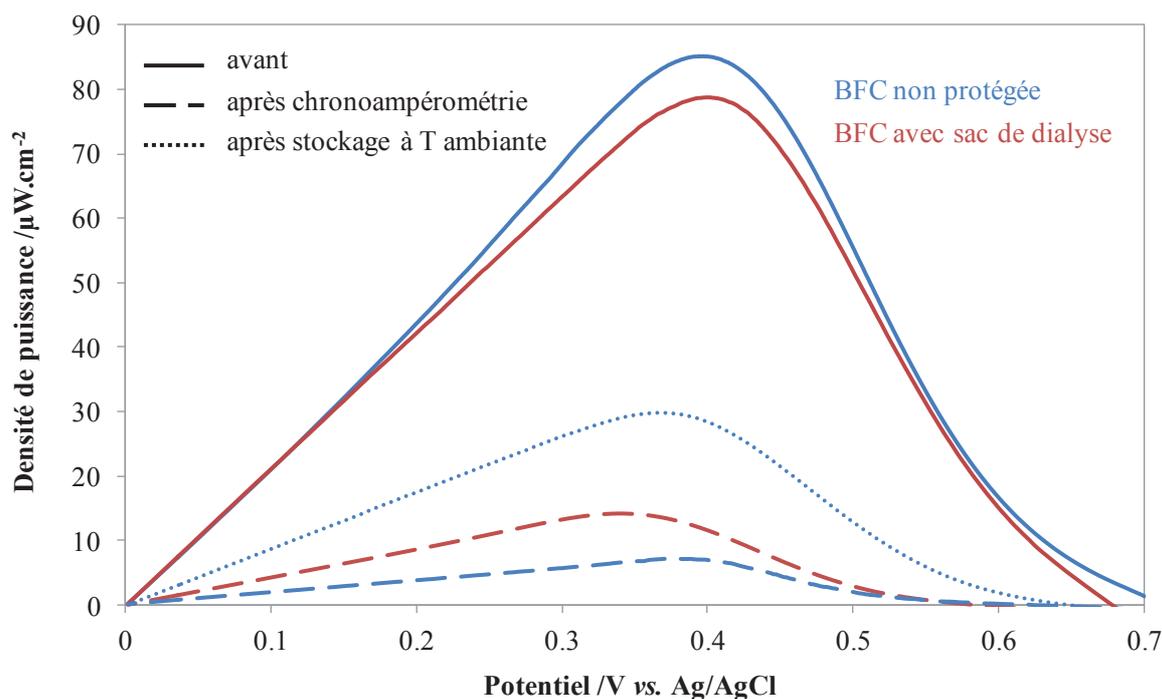


Figure III.4.21 : Densités de puissance de biopiles BOD Mo-GDH protégées (rouge) ou non (bleu) par un sac de dialyse ; mesures dans un échantillon de sang de glycémie 5,6 mM à 5 mV/s avant (traits pleins) et après 6h soit d'opération continue dans du sang (tirets) soit de stockage à température ambiante dans du tampon Pipes/CaCl₂ (pointillés).

4.5.5. Réflexion sur le caractère inhibiteur du sang

Ensuite, nous avons souhaité déterminer si l'inhibition des électrodes enzymatiques dans le sang était un processus réversible ou non. Dans ce but nous avons enregistré les signaux des polymères rédox, catalyses et courbes de puissance dans le tampon Pipes/CaCl₂ après avoir réalisé les mesures dans le sang. Ici nous présentons les résultats pour une biopile non protégée, des conclusions similaires étant obtenues avec l'utilisation d'un sac de dialyse.

D'après la figure III.4.22.A, nous constatons qu'il y a dans le sang des espèces qui vont interagir avec la structure de l'hydrogel et en altérer la structure mais que ce processus est en partie réversible. En effet, en enregistrant un voltammogramme cyclique dans du tampon immédiatement après la mesure dans le sang, les signaux des polymères rédox cathodiques et anodiques ré-augmentent. De plus les interférents vont également inhiber réversiblement les enzymes puisque les catalyses mesurées dans le tampon après passage dans le sang sont plus importantes d'environ 50% à la cathode et de 35% à l'anode, ce qui se traduit par une augmentation de la densité de puissance maximale d'environ 35% comme nous pouvons le voir sur les figures III.22.B et C. Cependant il n'est pas possible de

recupérer la totalité des courants enregistrés initialement (avant les 6h de chronoampérométrie) dans le tampon, ce qui peut être dû au décrochage de l'hydrogel auquel vient tout de même se combiner une inhibition partiellement irréversible des enzymes.

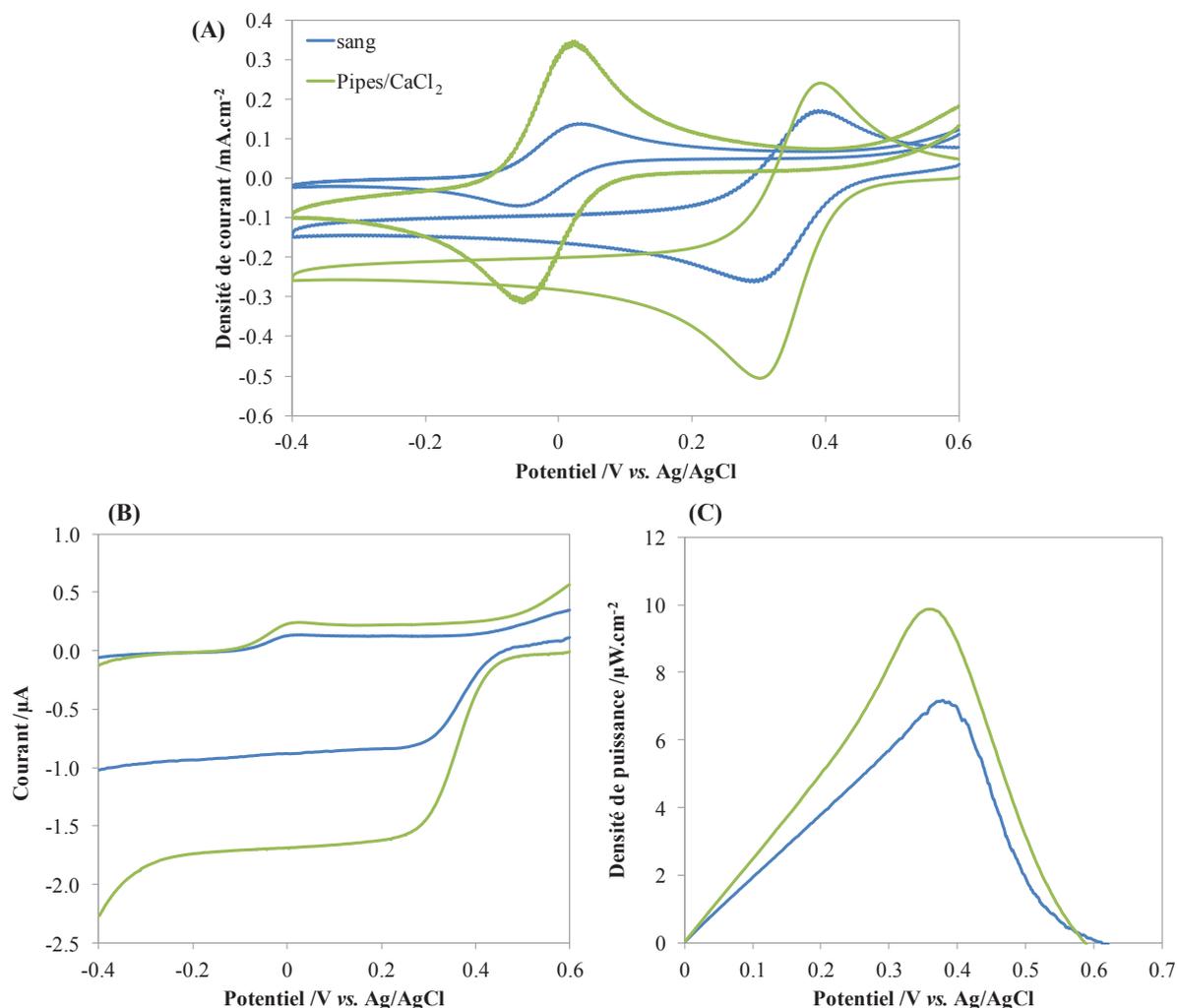


Figure III.4.22 : Signaux de biopiles après 6h de chronoampérométrie dans le sang (cf figure III.4.18), mesurés dans le sang (bleu) ou dans le Pipes/CaCl₂ pH 7,2 (vert) à 37,5°C sous agitation magnétique. (A) Densités de courant à 100 mV/s sous Ar dans le tampon ou dans un échantillon de sang désoxygéné, (B) courants et (C) densités de puissance à 5 mV/s sous O₂ + 5 mM glucose dans le tampon ou dans un échantillon de sang oxygéné à 5,6 mM de glycémie.

Enfin, ayant obtenu des résultats analogues pour une biopile protégée, nous pouvons en conclure que les interférents « réversibles » sont plutôt de petites molécules qui ne vont pas pouvoir être exclues par la membrane : le gain catalytique est le même que pour une biopile non protégée lorsqu'on passe du sang au tampon. A l'inverse les interférents « irréversibles » doivent être plus gros ou diffuser moins facilement dans le milieu car l'utilisation d'un sac de

dialyse permet malgré tout d'améliorer la durée de vie de la biopile ainsi que ses performances après 6h de fonctionnement continu.

4.5.6. Effet de la consommation en glucose et en oxygène de la biopile

Pour finir, nous avons constaté qu'en 6h d'opération continue dans un échantillon de sang l'anode consommait environ 20 mg/dl soit 1,09 mM de glucose par mesure avant et après la chronoampérométrie avec le kit d'auto-surveillance de la glycémie. Concernant l'oxygène, l'échantillon de sang utilisé ne semble pas avoir changé de couleur et nous faisons l'hypothèse que l'agitation magnétique assure une bonne diffusion de l'oxygène (des expériences complémentaires sont prévues pour quantifier précisément la consommation en oxygène de la cathode grâce à l'utilisation d'une sonde à oxygène de type électrode de Clark).

Pour vérifier si la consommation des différents substrats a une influence sur les diminutions de performances de la biopiles observées après 6h nous avons réalisé l'expérience suivante : nous avons comparé les courbes de densité de puissance et les catalyses obtenues dans l'échantillon de sang utilisé pendant 6h et dans un échantillon de sang « frais » ayant été mis de côté au début de l'expérience et qui possède donc une glycémie et une concentration en oxygène optimales (figure III.4.23).

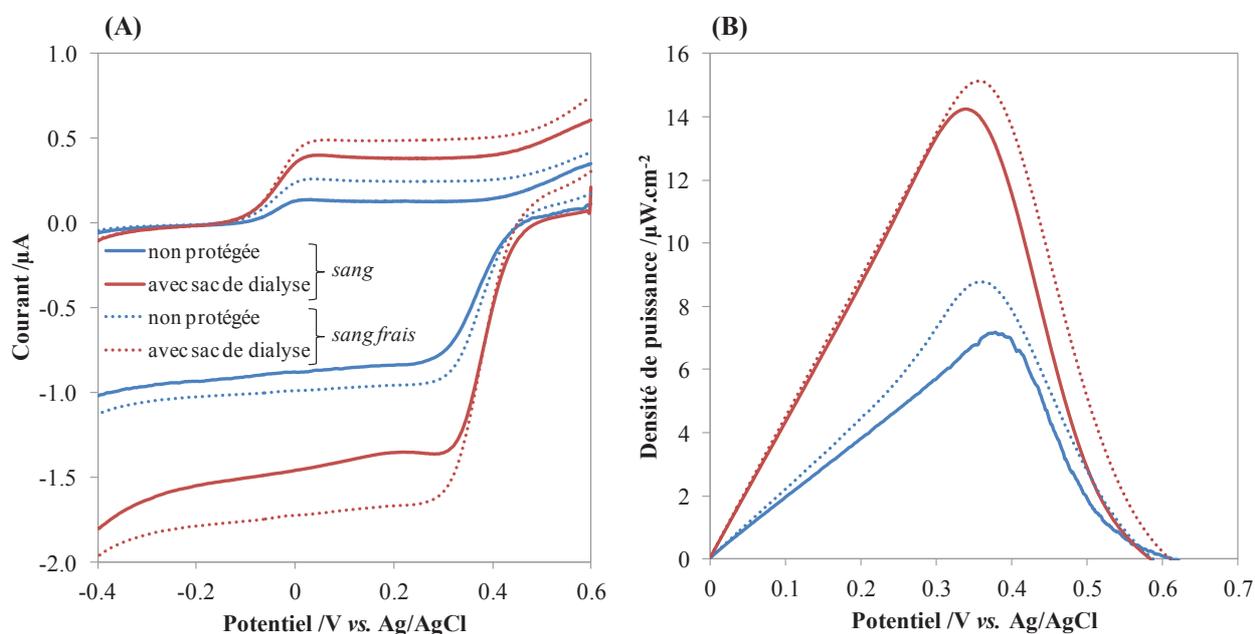


Figure III.4.23 : (A) Catalyses et (B) densités de puissances de biopiles BOD Mo-GDH protégées (rouge) ou non (bleu) par un sac de dialyse ; mesures dans un échantillon de sang utilisé pendant 6h et de glycémie finale $\sim 4,5$ mM (traits pleins) ou frais de glycémie 5,6 mM (pointillés) à 5 mV/s sous air et avec agitation magnétique.

D'après les résultats présentés sur la figure III.4.23, nous constatons qu'il y a certes une amélioration dans le sang « frais » mais qu'elle n'est pas suffisante pour justifier la baisse de performances observée après 6h par rapport aux catalyses initiales sur la figure III.4.20.A. Nous pouvons donc en conclure que la diminution de la densité de puissance après 6h (figure III.4.18) est principalement due au décrochage mécanique de l'hydrogel et à l'inhibition des enzymes par certains composants du sang (acide urique, acide ascorbique, NaCl,...), la consommation des substrats jouant un rôle minoritaire.

4.6. Comparaison des différentes biopiles dans le sang

Bien que la majorité de notre travail se soit concentré sur la biopile à base de BOD *Mo* à la cathode et de GDH à l'anode, nous avons également étudié les biopiles à base de BOD *Bp* et de GOx dans le sang.

Sur la figure III.4.24 nous pouvons voir l'évolution de la densité de puissance avec la glycémie. Nous constatons que pour les 2 biopiles à base de BOD *Bp* il n'y a pas de flagrante linéarité : dans les 2 cas, la cathode de BOD *Bp* donne un courant de réduction très faible et assez variable (ce résultat doit être considéré avec précautions, chaque expérience ayant été réalisée une seule fois). Il semblerait ainsi que cette BOD bien que généralement stable en solution [29] et en électrochimie dans du tampon [50] soit extrêmement sensible aux composants du sang comme l'acide ascorbique ou la dopamine par exemple ce qui entraîne sa dégradation, inhibition ou dénaturation.

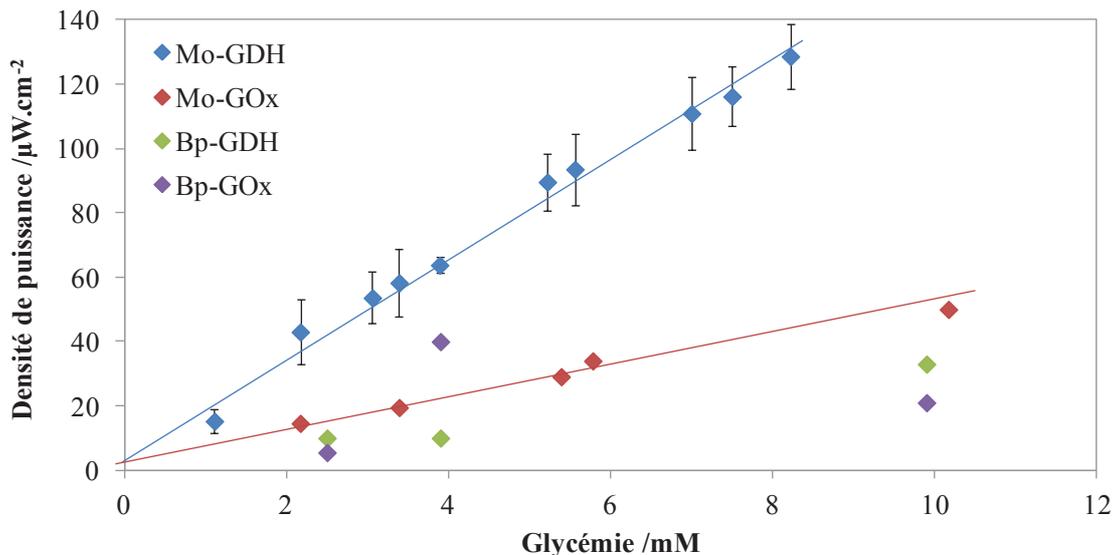


Figure III.4.24 : Evolution de la densité de puissance avec la glycémie dans plusieurs échantillons de sang pour les biopile BOD *Mo*-GDH, BOD *Mo*-GOx, BOD *Bp*-GDH et BOD *Bp*-GOx, mesures à 5 mV/s sous air, à 37,5°C et avec agitation magnétique.

Après 2 h de chronoamérométrie dans du sang, les pertes de puissance enregistrées sont présentées dans le tableau III.4.3. Nous constatons nettement la forte instabilité des biopiles à base de BOD *Bp* comparé à la BOD *Mo*. De plus, pour une même cathode, les biopiles à base de GOx sont plus stable que celles à base de GDH, comme nous avons déjà pu l'observer dans le tampon (figure III.3.11).

Biopile	Perte après 2h de chronoampérométrie
BOD <i>Mo</i> – GDH	33%
BOD <i>Mo</i> – GOx	21%
BOD <i>Bp</i> – GDH	91%
BOD <i>Bp</i> - GOx	63%

Tableau III.4.3 : Pertes de densité de puissance maximale pour les différentes biopiles calculées d'après les courbes de puissance mesurée avant et après la chronoampérométrie de 2h dans du sang.

Compte tenu de la faible efficacité de la BOD *Bp* dans le sang, nous avons décidé de nous concentrer sur la BOD *Mo* à la cathode et nous avons étudié plus en détail les performances utilisant la GDH ou la GOx à l'anode.

Sur la figure III.4.25 nous pouvons voir les courants catalytiques générés par chaque électrode ainsi que les courbes de puissance des 2 biopiles. Une diminution de signal d'environ 60% est observée pour l'anode et la biopile à base de GOx.

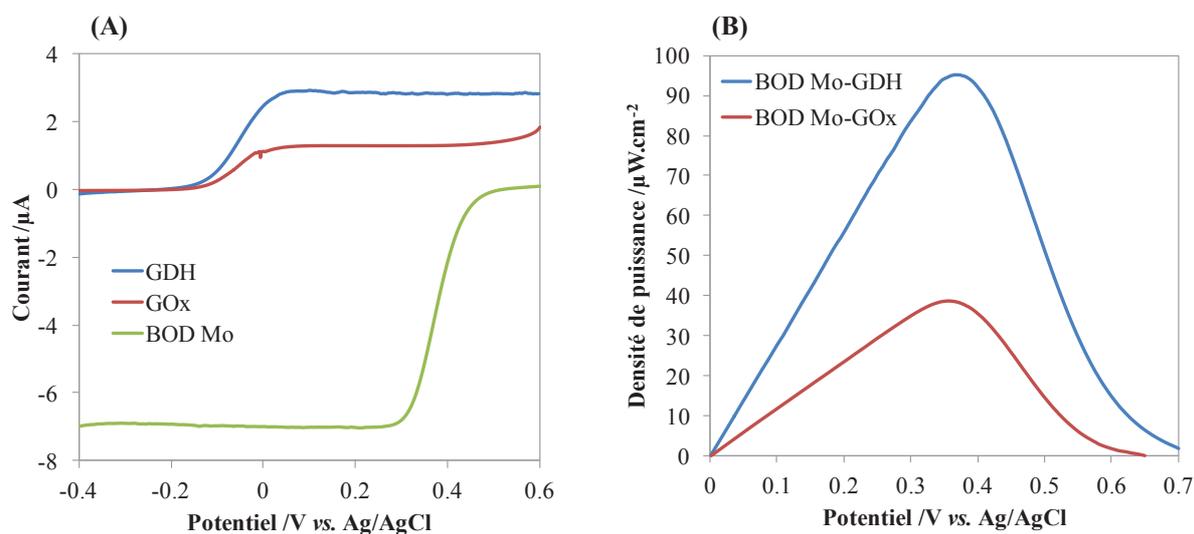


Figure III.4.25 : (A) Courants et (B) Densités de puissance pour des biopiles à base de GDH ou de GOx à l'anode et de BOD *Mo* à la cathode. Mesures dans du sang oxygéné de glycémie 5,6 mM sous air, à 37,5°C sous agitation magnétique et à 5 mV/s.

Nous avons ensuite réalisé une chronoampérométrie de 1h dans du sang pour chaque électrode des 2 biopiles présentées sur la figure III.4.25.

D'après la figure III.4.26 nous constatons que les 2 cathodes de BOD *Mo* sont reproductibles avec une perte moyenne de 30%. Pour les anodes, celle à base de GDH perd 55% de courant contre seulement 30% pour celle à base de GOx.

Ainsi, même si la biopile BOD *Mo*-GOx a une densité de puissance initiale plus faible, elle possède une anode nettement plus stable que celle à base de GDH, ce qui est très intéressant pour une future implantation de la biopile.

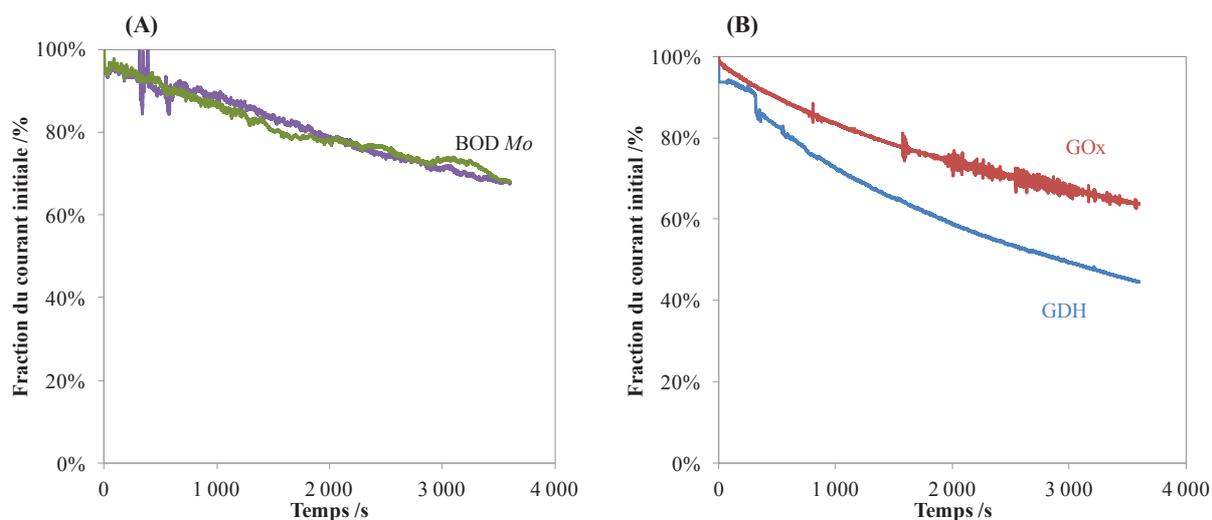


Figure III.4.26 : Chronoampérométries pour des électrodes à base de (A) BOD *Mo* à la cathode et de (B) GDH ou GOx à l'anode ; mesurées pendant 1h dans du sang avec une glycémie de 5,6 mM sous air à 37,5°C et sous agitation magnétique. Potentiel fixé à + 0,1 V vs. Ag/AgCl pour la cathode et + 0,3 V vs. Ag/AgCl pour l'anode.

4.7. Conclusion intermédiaire

Les premières mesures effectuées dans des échantillons de sang humain ont montré une bonne efficacité de notre biopile à base de BOD *Mo* et de GDH avec notamment des signaux bien définis, sans bruit de fond dû à l'utilisation de sang comme électrolyte.

Assez rapidement nous avons constaté une limitation de la puissance de la biopile à partir de 5 mM de glycémie en raison du faible courant cathodique. Pour s'en affranchir, nous avons simplement augmenté la taille de la cathode en passant d'1 fibre de carbone à 3. Nous aurions pu augmenter le taux de recouvrement mais nous avons montré qu'au-delà de 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ il était impossible de connecter davantage d'hydrogel.

Grâce à cette triple cathode la biopile n'était plus limitée que par l'anode : nous avons donc pu obtenir une évolution linéaire de la densité de puissance avec la glycémie des différents échantillons de sang.

Concernant la stabilité de la biopile, l'utilisation d'un sac de dialyse comme membrane protectrice permet de limiter les pertes de courant et de densité de puissance après 6h de fonctionnement continu. De plus, nous avons montré qu'une partie de ces pertes est simplement mécanique car le fait de conserver une biopile pendant le même temps dans du tampon et à température ambiante entraîne déjà une baisse de stabilité dont 70% sont dus au décrochage de l'hydrogel et 30% à la baisse de l'activité enzymatique dans le temps.

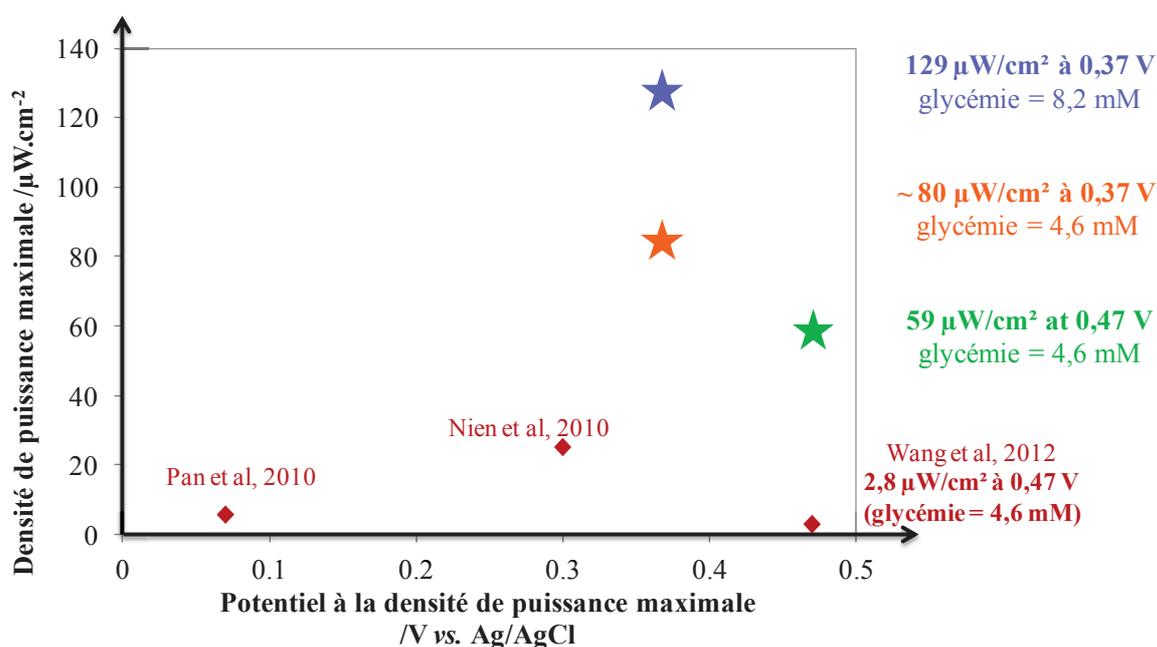
Par conséquent après 6h d'opération continue dans du sang, la majorité de la perte en courant catalytique est liée au décrochage de l'hydrogel, le reste étant attribué à la combinaison de l'inhibition des enzymes et la dénaturation de l'hydrogel par les composants du sang ainsi que de la baisse d'activité « naturelle » de l'enzyme dans le temps. Ce résultat pouvait être attendu compte tenu que les électrodes utilisées sont constituées d'un film catalytique fin immobilisé sur un matériau non poreux. Enfin comme nous utilisons des échantillons de sang enrichis en plaquettes et leucocytes nous pouvons imaginer que l'inhibition des enzymes et la dénaturation de l'hydrogel pourraient être diminuées dans du sang « normal ». Il est donc intéressant de noter ici que même en conditions extrêmes notre biopiles délivre une densité de puissance significative, et ce même après 6h d'opération continue.

Enfin nous avons également testé l'efficacité de biopiles à base de BOD *Bp* et de GOx dans le sang. Quelle que soit l'anode utilisée, les biopile à base de BOD *Bp* montrent une très faible stabilité et les puissances générées n'évoluent pas avec la glycémie. Il semblerait donc que la BOD *Bp* soit extrêmement sensible à certaines molécules interférentes présentes dans le sang. Pour la biopile de BOD *Mo* et de GOx, les résultats obtenus sont très encourageants puisque la perte de courant à l'anode après 1h de chronoampérométrie dans du sang passe de 55% à 30% lorsque la GDH est remplacée par la GOx.

5. Conclusion

Après avoir optimisé l'anode nous sommes parvenus à construire une biopile enzymatique efficace, à base de BOD *Mo* à la cathode et de GDH à l'anode, générant $250 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ dans du tampon Pipes/ CaCl_2 et $140 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ dans du PBS.

Cette biopile a également montré de bonnes performances lors de mesures dans du sang humain. Lorsque nous comparons nos résultats à ce qui a déjà été rapporté dans la littérature (cf Chapitre I) nous pouvons établir le schéma suivant :



Les biopiles de Pan et al [13] et Nien et al [12] ne peuvent servir de point de comparaison car la glycémie de référence de l'échantillon n'a pas été mesurée. De plus, Nien et al ont immergé uniquement l'anode dans le sang.

Concernant la biopile de Wang et al [14], elle produit $2,8 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0,47 V pour une glycémie de 4,6 mM. A la même glycémie, nous parvenons à générer au maximum $80 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0,37 V et $59 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ si l'on se place à 0,47 V.

Enfin, parmi toutes les biopiles que nous avons réalisées et testées dans du sang, la densité de puissance maximale obtenue est de $129 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0,37 V et 8,2 mM de glycémie. Ce résultat supplante largement tout ce qui a déjà été présenté dans la littérature.

En outre nous sommes parvenus à établir une courbe d'étalonnage pour le dosage de la glycémie grâce à nos biopiles, ce qui n'a jamais été réalisé jusqu'à présent avec une biopile totalement enzymatique immergée directement dans du sang humain.

Il nous reste maintenant à optimiser la stabilité de la biopile, notamment dans le sang. Pour ce faire nous avons trouvé plusieurs pistes :

- l'anode étant l'électrode limitante, nous avons constaté qu'en remplaçant la GDH par la GOx nous améliorerions la stabilité de la biopile ;
- l'utilisation de sacs de dialyse comme membranes protectrices permet d'augmenter la stabilité de l'enzyme ;
- nous pourrions également travailler sur l'optimisation des autres membranes que nous avons testées, à savoir les revêtements de Nafion® et PEGDGE. De meilleurs résultats pourraient peut-être être obtenus en adaptant les conditions de dépôt comme l'épaisseur du film, le temps de séchage, la concentration des composants, ... ;
- enfin il semble évident que l'utilisation d'électrodes poreuses au lieu des fibres de carbone actuelles permettrait d'augmenter la quantité d'hydrogel fixé et surtout le protégerait du milieu extérieur et préviendrait son décrochage.

Enfin, rappelons que les échantillons de sang utilisés ici sont enrichis en plaquettes et leucocytes qui sont des cellules impliquées dans les réactions inflammatoires (cf Chapitre II) et dont l'action consiste à isoler et dégrader tout élément reconnu comme étranger par l'organisme. Nous pouvons donc imaginer que le travail dans du sang « normal », contenant 10 fois moins de plaquettes et leucocytes, permettrait d'augmenter la durée de vie de la biopile.

6. Références bibliographiques

1. Gao, F., et al., *An enzymatic glucose/O₂ biofuel cell: Preparation, characterization and performance in serum*. *Electrochemistry Communications*, 2007. **9**: p. 989-996.
2. Li, X., et al., *A Miniature Glucose/O₂ Biofuel Cell With a High Tolerance Against Ascorbic Acid*. *Fuel Cells*, 2009. **9**(1): p. 85-91.
3. Coman, V., et al., *A Direct Electron Transfer-Based Glucose/Oxygen Biofuel Cell Operating in Human Serum*. *Fuel Cells*, 2010. **10**(1): p. 9-16.
4. Ammam, M. and J. Fransaer, *Micro-biofuel cell powered by glucose/O₂ based on electro-deposition of enzyme, conducting polymer and redox mediators: Preparation, characterization and performance in human serum*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2010. **25**: p. 1474-1480.
5. Ammam, M. and J. Fransaer, *Glucose/O₂ biofuel cell based on enzymes, redox mediators, and Multiple-walled carbon nanotubes deposited by AC-electrophoresis then stabilized by electropolymerized polypyrrole*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012. **109**(7): p. 1601-1609.
6. Castorena-Gonzalez, J.A., et al., *Biofuel Cell Operating in Vivo in Rat*. *Electroanalysis*, 2013. **25**(7): p. 1579-1584.
7. Ó Conghaile, P., et al., *Tethering Osmium Complexes within Enzyme Films on Electrodes to Provide a Fully Enzymatic Membrane-Less Glucose/Oxygen Fuel Cell*. *Journal of the Electrochemical Society*, 2013. **160**(7): p. G3165-G3170.
8. Holade, Y., et al., *Pacemaker Activated by an Abiotic Biofuel Cell Operated in Human Serum Solution*. *Electroanalysis*, 2014. **26**: p. 2445-2457.
9. Scherbahn, V., et al., *Biofuel cells based on direct enzyme-electrode contacts using PQQ-dependent glucose dehydrogenase/bilirubin oxidase and modified carbon nanotube materials*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014. **61**: p. 631-638.
10. Kwon, C.H., et al., *Stability of carbon nanotube yarn biofuel cell in human body fluid*. *Journal of Power Sources*, 2015. **286**: p. 103-108.
11. Kwon, C.H., et al., *High-power biofuel cell textiles from woven bicrolled carbon nanotube yarns*. *Nature Communications*, 2014. **5**(3928).
12. Nien, P.C., et al., *Encapsulating benzoquinone and glucose oxidase with a PEDOT film: Application to oxygen-independent glucose sensors and glucose/O₂ biofuel cells*. *Bioresource Technology*, 2010. **101**(14): p. 5480-5486.
13. Pan, C., et al., *Generating Electricity from Biofluid with a Nanowire-Based Biofuel Cell for Self-Powered Nanodevices*. *Advanced Materials*, 2010. **22**(47): p. 5388-5392.
14. Wang, X., et al., *Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2012. **31**(1): p. 219-225.
15. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae*: an attractive new enzyme for biotechnological applications*. *Appl Microbiol Biotechnol*, , 2012. **96**(6): p. 1489-1498.
16. Durand, F., et al., *Designing a highly active soluble PQQ-glucose dehydrogenase for efficient glucose biosensors and biofuel cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010. **402**(4): p. 750-754.
17. Gao, F., O. Courjean, and N. Mano, *An improved glucose/O₂ membrane-less biofuel cell through glucose oxidase purification*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009. **25**(2): p. 356-361.
18. Mano, N., F. Mao, and A. Heller, *On the parameters affecting the characteristics of the "wired" glucose oxidase anode*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2005. **574**(2): p. 347-357.

19. Girault, H.H., *Electrochimie physique et analytique*. PPUR presses polytechniques, 2007.
20. Montenegro, I., M.A. Queiros, and J.L. Daschbach, *Microelectrodes: Theory and Applications*. Springer Science & Business Media, 1991.
21. Chen, R.L.C., *Electrochemistry for Biomedical Researchers*. National Taiwan University Press, 2008. **G**: p. 126-128.
22. Kim, H.-H., et al., *A Miniature Membrane-less Biofuel Cell Operating under Physiological Conditions at 0.5 V*. Journal of the Electrochemical Society, 2003. **150**(2): p. A209-A213.
23. Mano, N., F. Mao, and A. Heller, *Characteristics of a Miniature Compartment-less Glucose-O₂ Biofuel Cell and Its Operation in a Living Plant*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(21): p. 6588-6594.
24. Gao, F., et al., *Engineering hybrid nanotube wires for high-power biofuel cells*. Nat Commun, 2010. **1**: p. 2.
25. Zebda, A., et al., *Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices*. Scientific Reports, 2013. **3**(1516): p. 1-5.
26. Kang, C., et al., *An Oxidizable Anion-Excluding Polymer-Overlayer for Oxygen Electrodes*. Electroanalysis, 2009. **21**: p. 2709-2712.
27. Xie, H., X.L. Tan, and Z. Gao, *An interference-free implantable glucose microbiosensor based on use of a polymeric analyte-regulating membrane*. Frontiers in Bioscience, 2005. **10**(2): p. 1797-1801.
28. Salaj-Kosla, U., et al., *Direct electron transfer of bilirubin oxidase (*Myrothecium verrucaria*) at an unmodified nanoporous gold biocathode*. Electrochemistry Communications, 2012. **16**: p. 92-96.
29. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 7.
30. Tremey, E., et al., *Switching an O₂ sensitive glucose oxidase bioelectrode into an almost insensitive one by cofactor redesign*. Chemical Communications, 2014. **50**(44): p. 5912-5914.
31. Milton, R.D., et al., *Bilirubin oxidase bioelectrocatalytic cathodes: the impact of hydrogen peroxide*. Chemical Communications, 2014. **50**: p. 94-96.
32. Milton, R.D., et al., *Hydrogen peroxide produced by glucose oxidase affects the performance of laccase cathodes in glucose/oxygen fuel cells: FAD-dependent glucose dehydrogenase as a replacement*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**: p. 19371-19379.
33. Milton, R.D., et al., *Glucose oxidase progressively lowers bilirubin oxidase bioelectrocatalytic cathode performance in single-compartment glucose/oxygen biological fuel cells*. Electrochimica Acta, 2014. **140**: p. 59-64.
34. EFS, *Pour sauver des vies donnez votre sang*. www.dondusang.net.
35. Baele, P.M. and P. Van der Linden, *Le transport de l'oxygène par le sang*. UCL-ULB, 2002.
36. QM, *Sang*. <http://fr.questmachine.org/Sang>, 2015.
37. NCI-Frederick, *A three-dimensional ultrastructural image analysis of a T-lymphocyte (right), a platelet (center) and a red blood cell (left), using a Hitachi S-570 scanning electron microscope (SEM) equipped with a GW Backscatter Detector*. The National Cancer Institute at Frederick (USA), 2011.
38. Stehling, L., et al., *Guidelines for blood utilization review*. Transfusion, 1994. **34**(5): p. 438-448.
39. *Médecine transfusionnelle*. <http://www.toutsurlatransfusion.com>, 2015.

40. Andreu, G., *Transfusion chez l'adulte: quels produits sanguins labiles?* Médecine Thérapeutique, 1997. **3**: p. 813-818.
41. Girard, A., *Déleucocytation des produits sanguins et infections post-transfusionnelles.* Revue Française de Transfusion et d'Hémobiologie, 1993. **36**(3): p. 265-279.
42. Santé, A.F.d.S.S.d.P.d., <http://www.hemovigilance-cncrh.fr/Indicat/granreco.PDF>. 2003.
43. Barisien, C., et al., *La transfusion de concentrés de granulocytes : indications et contraintes.* Hématologie, 2009. **15**(6): p. 478-483.
44. Hübel, K., et al., *Current Status of Granulocyte (Neutrophil) Transfusion Therapy for Infectious Diseases.* Journal of Infectious Diseases, 2001. **183**(2): p. 321-328.
45. Doumas, B.T., *Standards for Total Serum Protein Assays - A Collaborative Study.* Clinical Chemistry, 1975. **21**(8): p. 1159-1166.
46. Moussy, F., et al., *Performance of subcutaneously implanted needle-type glucose sensors employing a novel trilayer coating.* Anal Chem, 1993. **65**(15): p. 2072-7.
47. Falch, J.A., M. Mowé, and T. Bohmer, *Low levels of serum ascorbic acid acid in elderly patients with hip fracture.* Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, 1998. **58**(3): p. 225-228.
48. Bindra, D.S., Y. Zhang, and G.S. Wilson, *Design and in Vitro Studies of a Needle-Type Glucose Sensor for Subcutaneous Monitoring.* Analytical Chemistry, 1991. **63**(17): p. 1692-1696.
49. Liu, Z., et al., *Miniature Amperometric Self-Powered Continuous Glucose Sensor with Linear Response.* Analytical Chemistry, 2012. **84**(7): p. 3403-3409.
50. Edembe, L., et al., *A highly efficient O₂ cathode based on bilirubin oxidase from Bacillus pumilus operating in serum.* Electrochemistry Communications, 2013. **23**: p. 80-82.

CONCLUSION GENERALE

Grâce à une recherche bibliographique approfondie, nous avons pu mettre en évidence la complexité des systèmes enzymatiques utilisés pour la mise au point de biopiles. Même si la diversité des enzymes, médiateurs rédox et matériaux d'électrodes a grandement aidé au développement de ce domaine de recherche, les interactions entre chaque composant et donc l'efficacité des biopiles sont régies par de nombreux paramètres : cinétique enzymatique, diffusion des substrats et des électrons, structure et potentiel rédox du médiateur, méthode d'immobilisation de l'enzyme, conductivité des matériaux,... [1-5]. La conception d'une biopile enzymatique fonctionnelle réside donc dans l'optimisation indépendante puis combinée de ces différents éléments. La cathode étant actuellement la partie limitante dans les biopiles enzymatiques à glucose/oxygène, voilà pourquoi nous avons d'abord amélioré cette électrode avant de l'intégrer dans une biopile.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'optimisation d'une nouvelle enzyme cathodique, la BOD de *Magnaporthe oryzae*, dont les performances prometteuses en solution [6] laissent présager une bonne efficacité une fois immobilisée sur l'électrode. Pour la conception de l'électrode enzymatique nous avons travaillé sur chacun des éléments la composant :

- tout d'abord nous nous sommes intéressés à l'enzyme elle-même. D'un côté nous avons étudié son comportement en électrochimie en fonction des conditions de préparation et de mesure de l'électrode enzymatique. Nous sommes ainsi parvenus à produire une densité de courant d'environ $-1,37 \text{ mA.cm}^{-2}$, ce qui est le double de celles générées par les BODs de *Bacillus pumilus* et de *Trachyderma tsunodae* et surtout neuf fois supérieure à celle de la BOD de *Myrothecium verrucaria* qui est la seule BOD commercialisée actuellement. D'un autre côté nous avons essayé de mettre au point des nanofleurs à base de BOD, ces super-structures étant supposées augmenter l'activité de l'enzyme, mais cela ne s'est pas révélé concluant ;
- ensuite nous avons synthétisé différents polymères rédox à base d'osmium en modulant leur structure ainsi que la concentration en complexes rédox. En fonction de la BOD utilisée (*Mo* ou *Bp*) ainsi que des conditions de séchage et de mesure de l'hydrogel, nous avons constaté que selon le polymère rédox utilisé nous pouvions obtenir une nette augmentation de la densité de courant et de la diffusion électronique. Ainsi, avec le polymère rédox contenant la plus faible proportion de vinylimidazole et donc peu de complexes d'osmium nous avons atteint $-1,8 \text{ mA.cm}^{-2}$ quelle que soit l'enzyme ce qui suggère que la diminution de l'encombrement stérique favorise

l'interaction avec l'enzyme et donc le transfert électronique ($D_{app} = 7,76$ et $15,1 \cdot 10^{-9}$ $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement pour les BODs *Mo* et *Bp*).

- enfin nous sommes passés d'une électrode de carbone vitreux en 2 dimensions à une fibre d'or poreuse. La structure poreuse est particulièrement intéressante en vue d'une future implantation car elle permet d'augmenter la surface active (en maintenant une surface géométrique la plus petite possible) et la quantité de catalyseur fixé tout en assurant une protection par rapport au milieu extérieur. Après optimisation de la modification de la fibre d'or avec de l'hydrogel à base de BOD *Mo*, nous avons évalué la biocompatibilité de l'électrode. Aucune cytotoxicité n'a été identifiée pour la fibre modifiée et seule une légère réaction inflammatoire a été observée. Ces résultats concluants nous ont ensuite permis de procéder à l'implantation de la fibre dans des souris. Après 1 semaine d'implantation, nous n'avons récupéré aucune activité catalytique mais la structure de la fibre a été très bien conservée alors qu'aucune protection n'a été utilisée. De plus, même après 10 semaines les souris n'ont développé aucun signe d'inflammation ou d'infection.

Dans un second temps, nous avons combiné notre cathode à base de BOD *Mo* à une anode optimisée à base de GDH pour constituer une biopile en utilisant des fibres de carbone comme matériaux d'électrode. Le passage d'une macro à une microélectrode avec des régimes de diffusion améliorés a notamment permis d'augmenter la densité de courant anodique à faible concentration de glucose. Après plusieurs optimisations, la biopile génère $240 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ à 0,3 V dans le tampon Pipes/ CaCl_2 ; la présence des ions calcium permettant de stabiliser la GDH et d'augmenter son activité catalytique. En conditions physiologiques (tampon avec 140 mM de NaCl), la densité de puissance baisse à $150 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ en raison de l'inhibition de la BOD par le chlore et de la GDH par le phosphate. Afin d'améliorer la stabilité de la biopile nous avons ensuite étudié l'effet de différentes membranes de protection sur la diffusion des substrats. L'utilisation d'un sac de dialyse s'est montrée très prometteuse, n'entraînant qu'une baisse de 15% des densités de courant et puissance contre 50% avec les autres dispositifs. Enfin, nous avons constaté que les biopiles à base de BOD *Bp* et de GOx présentaient une meilleure stabilité que celle à base de BOD *Mo* et GDH.

Pour finir, nous nous sommes intéressés aux performances de la biopile de BOD *Mo* et GDH dans du sang humain. En effet, même si l'implantation future des biopiles enzymatiques est la motivation principale de la majorité des équipes de recherches travaillant dans ce

domaine, il en résulte que très peu de systèmes ont réellement été testés dans des conditions physiologiques (implantation, mesures dans du sang ou du sérum humain). Ainsi, dans la littérature on trouve une dizaine de biopiles implantées dans divers animaux et insectes, une autre dizaine ont été testées dans du sérum sanguin humain et seulement 3 systèmes fonctionnant dans du sang humain ont été rapportés. Parmi ces 3 exemples, seuls Wang et al ont mesuré la glycémie de leur échantillon de sang et nous ont donc servi de point de comparaison [7]. Dans un échantillon de sang de 4,6 mM de glycémie ils sont parvenus à générer $2,8 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0,47 V avec une biopile à base de CDH et de BOD de *Myrothecium verrucaria*. A glycémie égale, nous sommes parvenus à multiplier cette densité de puissance par presque 30 en produisant près de $80 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0,36 V avec une biopile utilisant la GDH à l'anode et la BOD de *Magnaporthe oryzae* à la cathode.

En plus d'avoir conçu une biopile enzymatique efficace dans du sang humain, nous avons constaté que la densité de puissance augmentait linéairement avec la glycémie de différents échantillons de sang. En effet, après optimisation de la cathode de manière à produire un courant largement supérieur à l'anode, nous avons fait de notre biopile un biocapteur à glycémie ce qui n'avait jamais été rapporté auparavant. Avec une glycémie de 8,22 mM (la plus haute parmi tous les échantillons testés) nous avons pu générer jusqu'à $129 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, cette valeur étant du même ordre de grandeur que les densités de puissance rapportées dans le sérum.

Après avoir vérifié la viabilité de la biopile dans le sang, nous nous sommes ensuite penchés sur sa stabilité après plusieurs heures de fonctionnement en continu et en utilisant ou non un sac de dialyse comme membrane protectrice. Avec le dispositif de protection, la stabilité de biopile dans le sang est augmentée de 40% après 6h d'opération continue. De plus, nous avons déterminé que la majeure partie de la perte en courant catalytique est due au décrochage mécanique de l'hydrogel, l'inhibition des enzymes et la dénaturation de l'hydrogel par le sang étant finalement assez limitées.

Enfin, nous avons constaté que la BOD *Bp* était fortement sensible aux différentes molécules inhibitrices présentes dans le sang, donnant des densités de courant faibles et peu reproductibles. Concernant la GOx, elle présente une meilleure stabilité que la GDH mais son activité catalytique est plus faible ; néanmoins, couplée à la BOD *Mo*, elle permet elle aussi une détection linéaire de la glycémie ce qui en fait donc une alternative intéressante à la GDH en vue d'une future implantation.

En résumé les travaux présentés ici proposent une optimisation d'une biopile enzymatique à base de BOD *Mo* et de GDH dans le but d'une qualification finale dans du sang humain. La biopile ainsi conçue a démontré une efficacité inégalée dans du sang humain en plus de permettre un dosage de la glycémie des différents échantillons de sang.

Après 3 années de travail dans la conception et l'optimisation de biopiles, il m'apparaît qu'elles constituent une alternative réellement intéressante et sérieuse aux piles à combustibles pour les applications de petite échelle dans le domaine des biocapteurs. La biopile développée et décrite dans ce manuscrit délivre une puissance tout à fait honorable, et inégalée, dans du sang humain qui rappelons-le est enrichi d'un facteur 10 en plaquettes et leucocytes. Cela m'a beaucoup plu de travailler en milieu réellement physiologique, d'autant plus si l'on considère le peu de données publiées sur des biopiles enzymatiques opérant dans du sang humain.

Au vu des derniers résultats présentés dans le Chapitre III, je pense que le point clé à améliorer à présent est la stabilité de notre système : celle-ci pourrait facilement être doublée voire triplée en améliorant l'attachement du film électrocatalytique à la surface des électrodes, grâce notamment à l'utilisation d'électrodes poreuses.

Enfin, d'après moi les tests de biocompatibilité comme ceux que nous avons réalisés sur la biocathode et l'ensemble de ses composants sont indispensables si l'on souhaite à terme implanter la biopile. Une telle étude n'avait jamais été rapportée auparavant alors que l'on trouve un nombre croissant de systèmes « potentiellement implantables ».

Références bibliographiques

1. Luz, R.A.S., et al., *Enzyme Biofuel Cells : Thermodynamics, Kinetics and Challenges in Applicability*. ChemElectroChem Reviews, 2014. **1**: p. 1751-1777.
2. Osman, M.H., A.A. Shah, and F.C. Walsh, *Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: enzymatic cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2011. **26**: p. 6.
3. Cooney, M.J., et al., *Enzyme catalysed biofuel cells*. Energy & Environmental Science, 2008. **1**: p. 320-337.
4. Minteer, S.D., B.Y. Liaw, and M.J. Cooney, *Enzyme-based biofuel cells*. Current Opinion in Biotechnology, 2007. **18**(3): p. 228-234.
5. Davis, F. and S.P.J. Higson, *Biofuel cells - Recent advances and applications*. Biosensors & Bioelectronics, 2007. **22**(7): p. 1224-1235.
6. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Magnaporthe oryzae: an attractive new enzyme for biotechnological applications*. Appl Microbiol Biotechnol, , 2012. **96**(6): p. 1489-1498.
7. Wang, X., et al., *Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **31**(1): p. 219-225.

MATERIELS ET METHODES

Sommaire

1. Matériels.....	276
1.1. Produits chimiques	276
1.2. Les enzymes	276
1.3. Les polymères rédox.....	277
2. Méthodes expérimentales.....	277
2.1. Tests d'activité en solution avec l'ABTS	277
2.2. Mesures électrochimiques	278
2.3. Modification des électrodes de carbone vitreux avec un hydrogel rédox	278
2.4. Préparation et caractérisation des nanofleurs de BOD de <i>Bacillus pumilus</i>	279
2.4.1. Protocole de préparation des nanofleurs	279
2.4.2. Spectre d'absorbance.....	280
2.4.3. La microscopie électronique à balayage	280
2.4.4. Calcul du taux d'encapsulation	280
2.4.5. Mesure de l'activité en solution	280
2.5. Synthèse et caractérisation des polymères rédox cathodiques	281
2.5.1. Protocole de synthèse	281
2.5.1.1. Synthèse des copolymères	281
2.5.1.2. Synthèse des complexes Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine) ₂ Cl ₂	282
2.5.1.3. Couplage du copolymère et des complexes d'osmium	282
2.5.2. Caractérisation.....	283
2.5.2.1. Spectroscopie infrarouge	283
2.5.2.2. Spectrométrie de masse à temps de vol (TOF-MS).....	283
2.5.2.3. Electrochimie pour vérifier le potentiel rédox du médiateur.....	283
2.5.2.4. Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion multi-angle de la lumière	283

2.5.2.5.	Analyse élémentaire	284
2.5.2.6.	Spectroscopie UV-visible	284
2.6.	Préparation et modification des fibres d'or macroporeuses	284
2.7.	Tests de biocompatibilité des fibres d'or macroporeuses modifiées	285
2.7.1.	Stérilisation des fibre d'or poreuses	285
2.7.2.	Modification des fibres d'or poreuses en conditions stériles	285
2.7.3.	Mesures <i>in vitro</i>	286
2.7.4.	Mesures <i>in vivo</i>	286
2.8.	Préparation des fibres de carbone et des biopiles	286
2.9.	Utilisation de membranes protectrices	287
2.10.	Mesures dans le sang	287
2.10.1.	Les échantillons de sang	287
2.10.2.	Précautions d'utilisation	288
2.10.3.	Mesure de la glycémie	288
2.10.4.	Electrochimie dans le sang	288
3.	Références bibliographiques	289

1. Matériels

1.1. Produits chimiques

Tous les produits chimiques de qualité analytique ou supérieure ont été achetés chez Sigma (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO). Le poly éthylène glycol diglycidyl éther (400) (PEGDGE) a été acheté chez Polysciences Inc. (Warrington, PA). La peinture de carbone conductrice à 20 % de matière solide dans l'isopropanol provenait de chez SPI supplies, (West Chester, PA). Les fibres de carbones (7 μm de diamètre) ont été fournies par Goodfellow (Cambridge Science Park, England)

Les échantillons de sang ont été fournis par l'EFS Aquitaine-Limousin conformément à l'agrément DC-2014-2203 et à la convention CPIS 15-08.

1.2. Les enzymes

La production et la purification des deux nouvelles BODs ont été réalisées selon des protocoles décrits pour *B. pumilus* [1] et *M. oryzae* [2]. Les deux enzymes ont été conservées dans du tampon phosphate de sodium à 50 mM pH 7,6 sans chlore à 56,64 mg.ml^{-1} pour *B. pumilus* et 61,44 mg.ml^{-1} pour *M. oryzae*. Avant utilisation, chaque enzyme a été diluée avec de l'eau distillée jusqu'à 5 mg.ml^{-1} .

La BOD commerciale de *T. tsunodae* et la GOx commerciale d'*Aspergillus niger* nous ont été fournies respectivement par Amano (Lombard, IL) et Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO). La BOD de *T. tsunodae* a été purifiée et concentrée à 51 mg.ml^{-1} dans notre laboratoire suivant un protocole précis [3], puis diluée à 5 mg.ml^{-1} dans de l'eau avant utilisation. La GOx d'*Aspergillus niger* a été purifiée [4] et conservée à 60,7 mg.ml^{-1} puis diluée à 8,36 mg.ml^{-1} avant utilisation.

La BOD commerciale de *Myrothecium verrucaria* a été achetée chez Sigma Aldrich et utilisée directement après dilution à 5 mg/ml dans de l'eau puis conservée à -80°C [5].

La PQQ-GDH d'*Acinotobacter calcoaceticus* a été produite et purifiée selon le protocole décrit dans la littérature [6] et a été conservée dans du tampon 20 mM PIPES + 3 mM CaCl_2 pH 7,2 sans chlore à 14,57 mg.ml^{-1} puis diluée à 5 mg.ml^{-1} dans de l'eau avant utilisation.

1.3. Les polymères rédox

Le polymère rédox cathodique utilisé est le PAA-PVI-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺, avec un potentiel rédox de + 0,34 V vs. Ag/AgCl, conservé à 10 mg.ml⁻¹ dans de l'eau. La synthèse et les caractéristiques de ce polymère ont été rapportées par Cadet et al. [7]. Le polymère rédox anodique utilisé est le PVP-[Os(1,1'-diméthyl-2,2'-bisimidazole)₂-2-(6-méthylpyridin-2-yl)imidazole]^{2+/3+}, avec un potentiel rédox de - 0,03 V vs. Ag/AgCl. Fourni par Abbot Diabetes Care, il est stocké à 7,14 mg.ml⁻¹ dans du tampon NaP 20mM pH 7,0 et son utilisation a été rapporté par Courjean et al [8].

2. Méthodes expérimentales

2.1. Tests d'activité en solution avec l'ABTS

Les analyses de spectroscopie UV-visible, on été réalisées sur un spectrophotomètre (Cary 100 system) de chez Varian, Inc. (Palo Alto, CA), équipé d'un portoir multi cellules thermo réglable.

Les tests d'activité sont réalisés à pH 4 avec des solutions aqueuses de 100 mM d'ABTS dissout dans l'eau. La solution de mesure est obtenue en mélangeant 30 µl de solution d'ABTS à 3 ml de tampon phosphate citrate à pH 4 dans une cuve de spectrophotomètre, puis on y ajoute le volume approprié d'enzyme diluée à 50 nM dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,6.

L'oxydation de l'ABTS par la BOD entraine une coloration verte plus ou moins intense en fonction de l'activité de l'enzyme testée. Ce changement de couleur est enregistré par le spectrophotomètre à la longueur d'onde de l'ABTS qui est de 420nm. La réaction de catalyse enzymatique est traduite par une droite (absorbance en fonction du temps) dont la valeur de la pente est directement reliée à l'activité spécifique **As** de l'enzyme, calculée grâce à la formule suivante :

$$\mathbf{As = d*(Vf/Vi)*(pente/\epsilon_{ABTS})/Ce}$$

Avec : d = coefficient de dilution de l'enzyme

Vf = volume total de solution introduite dans la cuve = 3ml

Vi = volume d'enzyme introduite dans la cuve = entre 5 et 40µl selon l'enzyme

pente = valeur de la pente de la droite calculée par le spectrophotomètre

ϵ_{ABTS} = coefficient d'extinction molaire de l'ABTS = 36,2.mol⁻¹.cm⁻¹

Ce = concentration initiale de l'enzyme en mg/ml

Cette activité spécifique correspond à la quantité de produit formé par unité de temps et par mg d'enzyme et s'exprime en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, donc en U/mg d'enzyme.

Pour déterminer l'activité d'une enzyme donnée la moyenne sur 3 mesures à différentes concentrations d'enzyme est effectuée. L'incertitude se situe généralement vers ± 30 U/mg, pour des activités autour de 600 U/mg.

2.2. Mesures électrochimiques

Les mesures ont été effectuées en utilisant des potentiostats (CH Instruments, modèles CHI 660C, 760C, 842B et 1140B Austin, TX, USA) connectés chacun à un ordinateur dédié. Un fil de platine spiralé est utilisé comme contre-électrode et tous les potentiels sont mesurés par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl conservée dans 3 M NaCl (BAS, West Lafayette, IN). Toutes les mesures électrochimiques sont effectuées dans une cellule thermostatée connectée à un circulateur isotherme (Companion Lab, FR).

Les électrodes tournantes sont fixées à un rotor de chez Pine Instruments. La rotation de l'électrode permet de produire une contrainte de cisaillement et des conditions de transport de masse semblables à ce que subiraient des biopiles implantées, le sang circulant à une vitesse élevée ($> 10 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) [9].

Les tampons de mesures sont systématiquement bullés sous un flux d'argon ou d'oxygène pendant 15 minutes, avant les tests électrochimiques ; par la suite un flux léger est maintenu dans le tampon durant chaque expérience.

2.3. Modification des électrodes de carbone vitreux avec un hydrogel rédox

Des électrodes de carbone vitreux de 3 ou 5 mm de diamètre ont été polies avec une poudre de particules d'alumine (Al_2O_3) de $0,05 \mu\text{m}$ (Buehler, lac Bluff, IL), puis rincées aux ultrasons pendant 5 min dans de l'eau distillée. L'étape de polissage est répétée, jusqu'à ce qu'aucune caractéristique voltammétrique ne soit observée lors d'un balayage à $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ dans du tampon phosphate entre $-0,4$ et $0,6 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Les électrodes sont ensuite séchées sous flux d'air et hydrophilisées par passage au plasma O_2 à 1 Torr pendant 5 minutes.

Par la suite, les électrodes ont été modifiées avec un hydrogel rédox, aux ratios optimums pour chaque enzyme comme indiqué ci-après :

- cathode à base de BOD de *T. tsunodae* : hydrogel constitué de 77,3 %m de polymère rédox PAA-PVI-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺ à 10 mg.ml⁻¹, 15,2 %m de BOD à 5 mg.ml⁻¹ et 7,4 %m de PEGDGE à 2 mg.ml⁻¹ puis séchage 2 h à 25 °C.
- cathode à base de BOD de *M. verrucaria* : hydrogel constitué de 48,5 %m de polymère rédox cathodique à 10 mg.ml⁻¹, 44,6 %m de BOD à 5 mg.ml⁻¹ et 6,9 %m de PEGDGE à 2 mg.ml⁻¹ puis séchage 18 h à 25 °C.
- cathodes à base de BOD de *B. pumilus* et *M. oryzae* (BODs *Bp* et *Mo*) : hydrogel constitué de 62,1 %m du même polymère rédox 30,5 %m de BOD à 5 mg.ml⁻¹ et 7,4 %m de PEGDGE à 2 mg.ml⁻¹. Les électrodes ainsi modifiées sont séchées pendant 18 heures à 4 °C pour la BOD *Mo* et 4 heures à 25 °C ou 18h à 4°C pour la BOD *Bp*.
- anode à base de GOx d'*Aspergillus niger* : hydrogel constitué de 55 %m de polymère rédox PVP-[Os(1,1'-diméthyl-2,2'-bisimidazole)₂-2-(6-méthylpyridin-2-yl)imidazole]^{2+/3+} à 7,14 mg.ml⁻¹, 35 %m de GOx à 5 mg.ml⁻¹ et 10 %m de PEGDGE à 2 mg.ml⁻¹ puis séchage 18 h à 4 °C.
- anode à base de GDH d'*Acinotebacter calcoaceticus* : hydrogel composé de 72 %m du même polymère rédox, 22 %m de GDH à 5 mg.ml⁻¹ et 6 %m de PEGDGE à 2 mg.ml⁻¹ et séchage 18h à 4°C.

Sauf mention contraire, le taux de recouvrement est de 108 µg.cm⁻². Tout changement dans la composition de l'hydrogel, les conditions de séchage ou autre est indiqué directement dans le manuscrit.

Chaque expérience est réalisée au minimum deux fois, avec une reproductibilité de ± 5%.

2.4. Préparation et caractérisation des nanofleurs de BOD de *Bacillus pumilus*

2.4.1. Protocole de préparation des nanofleurs

Les nanofleurs ont été synthétisées selon le protocole publié par Ge et al [10].

Le mélange réactionnel est composé de 3ml de PBS 1X pH 7,4 (3mM PB + 155mM NaCl) + 0,1mg/ml de BOD de *Bp* + 20µl de solution aqueuse de Cu₂SO₄ à 120mM initial et est introduit dans un pilulier en verre de 7ml.

L'incubation est fixée à 3 jours à 25°C sans agitation initialement. Des tests ont été réalisés en appliquant une agitation ponctuelle de 1 à 3 fois par jours pendant l'incubation ainsi qu'en montant la température à 30°C.

Après incubation, la solution est filtrée sous vide sur membranes de polycarbonate (taille des pores = 0,1 μ m). Généralement les filtrats sont récupérés pour calculer le taux d'encapsulation de BOD, les nanofleurs récupérées sur la membrane sont utilisées pour l'imagerie MEB. Pour certaines expériences (électrochimie et mesure d'activité des nanofleurs), le surnageant ou le précipité/culot ont directement été prélevés dans le pilulier après incubation.

2.4.2. Spectre d'absorbance

Le spectre d'absorbance des filtrats a été réalisé dans du PBS 1X après concentration par centrifugation : 500 μ l de filtrat concentré est ajouté à 3ml de PBS 1X.

Le contrôle a été effectué avec 0,1 mg.ml⁻¹ de BOD *Bp* (non incubée) dans 3ml de PBS 1X.

L'absorbance de chaque échantillon est mesurée entre 200 et 800nm, le signal typique des protéines étant détecté à 280nm. Pour la BOD *Bp*, nous avons $\epsilon_{280} = 1,22 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.4.3. La microscopie électronique à balayage

Les observations en microscopie électronique à balayage ont été réalisées avec un microscope Hitachi S2500 à une tension d'accélération de 5 à 30 kV.

Les échantillons ont été métallisés sous vide avec un alliage or-palladium avant observation pour un meilleur contraste.

2.4.4. Calcul du taux d'encapsulation

Le taux d'encapsulation de BOD dans les nanofleurs a été calculé par dosage de l'enzyme libre résiduelle contenue dans le filtrat des solutions de nanofleurs : soit en réalisant un spectre d'absorbance, soit en mesurant l'activité en utilisant l'ABTS comme substrat.

2.4.5. Mesure de l'activité en solution

L'activité en solution des filtrats a été mesurée comme indiqué dans la partie 2.1. Concernant l'activité des nanofleurs nous avons d'abord isolé le culot du surnageant puis dosé

la concentration en enzyme dans le culot. Le test d'activité a été réalisé sur 10 à 20 μ l de ce culot dilué dans 3ml de PBS 1X contenant 1mM d'ABTS

2.5. Synthèse et caractérisation des polymères rédox cathodiques

2.5.1. Protocole de synthèse

2.5.1.1. Synthèse des copolymères

Le protocole présenté ici donne les quantités de réactifs pour préparer le copolymère des médiateurs A, B, C et 1:4, c'est-à-dire contenant 1 équivalent de PVI pour 4,37 équivalents de PAA. Pour les copolymères 1:2, 1:7 et 1:9 les proportions en PVI et PAA sont respectivement 1 pour 2, 1 pour 7 et 1 pour 9 équivalents.

1) Prendre un ballon monocol 500 ml avec barreau aimanté. Y ajouter dans l'ordre et sous agitation à température ambiante :

- 12 g d'acrylamide (TT-156)
- 75 ml d'eau
- 3,50 ml de vinylimidazole (CF-275)
- 25 ml d'eau
- 0,35 ml de TEMED (CF-207)
- 75 ml d'eau
- 0,20 g de S_2O_8

2) Remplir le ballon d'azote et le fixer au dessus du réfrigérant préalablement adapté sur le ballon. Lancer la réaction pour 30 min à 100°C.

3) A la fin de la réaction, laisser refroidir le ballon à température ambiante.

Dans un erlenmeyer équipé d'un barreau aimanté et refroidi par un bain de glace, introduire 1L d'éthanol absolu. Sous agitation poussée (formation d'un vortex) on ajoute le milieu réactionnel goutte à goutte : il doit se former un précipité d'apparence fileuse.

Récupérer le précipité et le sécher à l'évaporateur rotatif.

4) Peser le produit sec et faire un spectre IR pour vérifier sa composition.

5) Dissoudre le polymère dans un minimum d'eau : commencer par 10ml, puis 20 voire 30 ml et le purifier par dialyse (pores de 10 kDa) dans l'eau.

2.5.1.2. Synthèse des complexes Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)₂Cl₂

Dans un ballon de 100 ml avec barreau aimanté ajouter :

- 1 g d'ammonium hexachloroosmate (2.28 mmol)
- 25 ml d'éthylène glycol
- 1.05 g de 4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine (4.48 mmol soit 2 équivalents), commercialisé par CMS Chemicals Ltd (Berkshire, UK).

Lancer la réaction sous N₂ au reflux pendant 2h. A température ambiante : filtration et lavage du produit 1 fois avec une solution saturée de Na₂S₂O₄ et 2 fois avec de l'éther puis séchage sous vide du précipité.

2.5.1.3. Couplage du copolymère et des complexes d'osmium

1) Dans un ballon bicol de 100 ml ajouter :

- 150 mg de copolymère
 - 150 mg de complexes d'osmium
 - 20 ml d'éthylène glycol
- } (en proportion 1:1)

2) Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 160°C pendant 4h pour le polymère A, 1h à 180°C pour le polymère B ou 2h à 180°C pour les polymères C, 1:2, 1:4, 1:7 et 1:9. Le couplage est réalisé sous atmosphère d'azote. En effet l'oxygène oxyde les osmiums qui sont alors impossibles à coupler avec le polymère : l'azote permet de maintenir les centres rédox dans un état réduit, permettant ainsi le couplage.

3) L'évolution de la réaction est suivie par électrochimie environ toutes les 30 minutes. En début de réaction on a des complexes d'osmium libres ainsi que le début du couplage du polymère aux osmiums : on aura donc deux pics, l'un vers 0,1 V pour les Os seuls et l'autre vers 0,35 V pour les polymères couplés. Plus la réaction progressera et plus le premier pic diminuera à l'inverse du deuxième qui augmentera jusqu'à ce que ce premier ait totalement disparu, marquant la fin de la réaction.

4) A la fin de la réaction le produit est précipité dans l'éther et purifié par ultrafiltration. Puis on dissout le produit dans de l'eau et on réalise une dialyse dans l'eau en utilisant une membrane de 10 kDa, qui permettra d'éliminer les complexes d'osmium non fixés et les polymères rédox de poids moléculaire faible. Les polymères couplés sont ensuite re-concentrés pour arriver à la concentration voulue et le produit obtenu est caractérisé par électrochimie.

2.5.2. Caractérisation

2.5.2.1. Spectroscopie infrarouge

Les mesures d'infrarouge ont été réalisées au CRPP sur un spectroscope FT-IR Nicolet 6700 de chez Thermo Scientific. Les analyses, réalisées sur une goutte de chaque copolymère dilué dans de l'eau, sont purement qualitatives puisque la concentration des échantillons n'a pas été préalablement déterminée.

2.5.2.2. Spectrométrie de masse à temps de vol (TOF-MS)

Ces analyses ont été réalisées par la plateforme analytique CESAMO de l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux sur l'appareil Qstar ABSciex.

2.5.2.3. Electrochimie pour vérifier le potentiel rédox du médiateur

Pour la mesure des signaux des médiateurs seuls, 2 μ l de médiateur ont été déposés sur une électrode de carbone vitreux de 3mm de diamètre, polie et soniquée au préalable. Après 2h de séchage à température ambiante, les électrodes sont testées dans du PBS pH 7,2 à 37,5°C sous argon, sans rotation et à 100mV/s. La faible adhérence du médiateur à la surface de l'électrode ne permet pas de diminuer la vitesse de balayage.

Concernant les hydrogels, ils ont été réalisés et testés dans les conditions décrites dans la partie 2.3. Les concentrations des médiateurs sont les suivantes : 1,3 mg.ml⁻¹ pour le polymère A, 3 mg.ml⁻¹ pour le B, 10 mg.ml⁻¹ pour le C et les polymères 1:4 à 1:9 et 6,92 mg.ml⁻¹ pour le 1:2.

2.5.2.4. Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion multi-angle de la lumière

Cette mesure a été effectuée par Christophe Schatz au Laboratoire de chimie des polymères organiques de Bordeaux.

L'appareil utilisé est le PL-GPC 50 Plus de chez Agilent Technologies équipé de colonnes de chromatographie de type TOSOH TSK.

2.5.2.5. Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire des atomes d'azote et d'oxygène contenus dans les copolymères des polymères rédox 1:2, 1:4, 1:7 et 1:9 a été effectuée au laboratoire SRSMC de Nancy par Sandrine Adach, assistante-ingénieur en techniques de synthèse chimique. L'appareil utilisé est un Flash EA 1112 de chez Thermofinnigan.

2.5.2.6. Spectroscopie UV-visible

Le spectre d'absorbance UV des 4 copolymères a été réalisé sur le même spectromètre que pour les tests d'activité enzymatique en solution. Le but de cette expérimentation est de doser la teneur en imidazole de chaque copolymère afin de remonter aux fractions en acrylamide et vinylimidazole pour chacun. La référence est réalisée avec une solution d'imidazole puis ont fait le rapport des absorbances à 210 nm (pour l'imidazole $\epsilon_{206} = 4,99 \cdot 10^3 \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [11]). On se place à 210 nm plutôt qu'à 206 nm qui correspond pourtant au maximum d'absorbance de l'imidazole pour s'affranchir de la contribution de l'acrylamide [12].

Les copolymères ainsi que l'imidazole ont été dissouts à 17ng/ml dans 3ml d'eau pour la mesure.

2.6. Préparation et modification des fibres d'or macroporeuses

Les fibres d'or poreuses ont été synthétisées comme détaillé dans la publication de Reculosa et al [13]. Pour l'ensemble de nos expériences, nous avons fixé la structure à 15 demi-couches de pores de 585 nm de diamètre pour une fibre ayant une longueur de 2cm et un diamètre de 250 μm .

La caractérisation de leur surface active a été réalisée dans de l'acide sulfurique 0,1 M par séries de 10 à 20 cycles à 50 mV/s. Pour le calcul exact de la surface active nous avons mesuré la charge sous le pic de réduction de l'or à 0,9 V. Sachant que pour une fibre d'or non poreuse, une surface active (= surface géométrique) de 1,54 cm^2 correspond à une charge de $3,90 \times 10^{-5}$ C sous le pic de réduction, nous avons pu en déduire la surface active pour chacune des fibres poreuses utilisées ici.

L'hydrophilisation des fibres a été réalisée par traitement au plasma à oxygène pendant 5 minutes à 150 mTorr.

Pour la modification des fibres, celle-ci ont été introduites dans un capillaire de 2 cm de long et 1 mm de diamètre rempli d'hydrogel composé de 62,1 %m de polymère rédox cathodique, 30,5 %m de BOD à 5 mg.ml⁻¹ et 7,4 %m de PEGDGE à 2 mg.ml⁻¹. Après un temps d'immersion variable (1h ou 24h à 4°C ou 25°C) les fibres modifiées sont séchées 18h à 4°C.

Dans le cas du transfert électronique direct, trois cas de figure ont été utilisés :

- modification avec BOD + PEGDGE : incubation 1h à 4°C dans une solution contenant 80%*m* de BOD *Mo* à 5 mg.ml⁻¹ dans de l'eau et 20%*m* de PEGDGE à 2 mg.ml⁻¹ dans de l'eau, puis séchage 2h à 4°C
- modification avec BOD puis PEGDGE : incubation 1h à 4°C dans une solution de BOD *Mo* à 5 mg.ml⁻¹ dans de l'eau, séchage 2h à 4°C, puis incubation 3min à 4°C dans une solution de PEGDGE à 2 mg.ml⁻¹ dans de l'eau et séchage 2h à 4°C
- modification avec BOD seule (dans le cas de la fonctionnalisation préalable de la fibre avec une SAM de cystéamine) : incubation 1h à 4°C dans une solution de BOD *Mo* à 5 mg.ml⁻¹ dans de l'eau puis séchage 2h à 4°C

Les mesures sont effectuées à 37,5°C dans du tampon PB 100 mM pH 7,2.

2.7. Tests de biocompatibilité des fibres d'or macroporeuses modifiées

2.7.1. Stérilisation des fibre d'or poreuses

La stérilisation des fibres d'or a été réalisée par traitement de 15minutes dans un four UV T8C 8W à 254 nm de chez VWR (référence 732-6604).

La lampe UV utilisée est celle d'une hotte stérile Holten LaminAir modèle SAFE 2010 de chez Thermo Electron Corporation.

2.7.2. Modification des fibres d'or poreuses en conditions stériles

Chacun des composants de l'hydrogel a été filtré en conditions stériles (sous hotte stérile de laboratoire L2) en utilisant des filtres stériles en PVDF avec des pores de 0,22 µm de diamètre (Millex®-GV de chez Millipore). L'assemblage des composants et la modification de la fibre ont été effectués sous hotte stérile.

Pour le séchage, les fibres ont été insérées dans une boîte stérile rendue hermétique avant d'être placées à 4°C pour un séchage de 18h.

2.7.3. Mesures *in vitro*

Les tests de biocompatibilité *in vitro* ont été réalisés par une tierce personne (Annabelle TANGA) en accord avec la norme ISO 10993-5 :2009 [14] qui décrit l'ensemble des protocoles à utiliser.

Pour tous les tests réalisés, les fibres d'or poreuses ont été modifiées en conditions stériles comme décrit dans les parties 2.7.1 et 2.7.2.

2.7.4. Mesures *in vivo*

Pour les expérimentations *in vivo*, les fibres ont été préparées comme dans la partie 2.7.1. L'implantation et le sacrifice des souris ont été réalisés par Sébastien Lepreux, anatomopathologiste, et Pierre Costet, responsable de l'animalerie.

Les fibres ont été implantés sous la peau, dans le bas du dos des animaux après injection d'un anesthésiant [15]. Aucun traitement particulier n'a été appliqué pendant la durée de l'implantation. Le sacrifice a été réalisé par dislocation cervicale des souris.

2.8. Préparation des fibres de carbone et des biopiles

La biopile est faite de deux fibres de carbone de 7 μm de diamètre et 2 cm de long (Goodfellow, Cambridge, U.K.). Les fibres séparées de 0,5 cm ont été placées sur une portion de lame de microscope de 3 cm long. L'extrémité de chaque fibre est connectée à un fil de cuivre à l'aide d'une peinture de carbone conductrice. La peinture sèche est ensuite isolée avec de la résine époxy (Araldite). La surface active de chaque fibre est de 0,22 mm^2 .

Les fibres de carbone rendues hydrophiles pendant 5 minutes au plasma sous oxygène, ont été modifiées comme suit :

- pour l'anode à base de GOx d'*Aspergillus niger* : 1,426 μl d'un hydrogel composé de 55 %m de PVP-[Os(1,1'-diméthyl-2,2'-bisimidazole)₂-2-(6-méthylpyridin-2-yl)imidazole]^{2+/3+} à 7,14 mg.ml^{-1} , 35 %m de GOx purifiée à 8,36 mg.ml^{-1} et 10 %m de PEGDGE à 2 mg.ml^{-1} .
- pour l'anode à base de GDH d'*Acinotobacter calcoaceticus* : 1,537 μl d'un hydrogel composé de 72 %m du même polymère rédox, 22 %m de GDH à 5 mg.ml^{-1} et 6 %m de PEGDGE à 2 mg.ml^{-1} .

- pour la cathode à base de BOD *Magnaporthe oryzae* ou de *Bacillus pumilus* : 1,406 μl d'un hydrogel composé de 62,1 %m de PAA-PVI-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)₂Cl⁻]⁺²⁺, 30,5 %m de BOD à 5 mg.ml⁻¹ et 7,4 %m de PEGDGE à 2 mg.ml⁻¹.

Le taux de recouvrement à l'anode et à la cathode a été maintenu à 2000 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. Les fibres de carbone ainsi modifiées sont séchées 18 heures à 4°C.

Pour les biopiles à triple cathode, 2 fibres supplémentaires ont été rajoutées à la fibre qui constituait la cathode dans les biopiles simples en respectant un espacement de 2 cm entre chaque fibre cathodique. Pour chaque fibre la modification a été réalisée comme indiqué ci-avant.

2.9. Utilisation de membranes protectrices

Trois types de membranes de protection ont été utilisés sur les biopiles modifiées :

- les sacs de dialyse [16] : les sacs de dialyse (10 kDa) ont d'abord été rincés à l'eau distillée puis les biopiles ont simplement été introduites dedans juste avant utilisation ;
- le revêtement Nafion®/PAA-PVI [17] : une première couche de PAA-PVI à 25 mg.ml⁻¹ dans de l'eau a été déposée par trempage de la biopile dans la solution. Après 6 h de séchage à 4°C une deuxième couche de Nafion® à 1% dans de l'eau a été déposée de la même façon. La biopile est finalement placée 18h à 4°C pour sécher.
- le revêtement PEGDGE + PAA-PVI [18]: la biopile est trempée dans une solution aqueuse contenant 10% PEGDGE + 25mg/ml PAA-PVI puis séchage 24h à 4°C.

2.10. Mesures dans le sang

2.10.1. Les échantillons de sang

Les échantillons de sang humain ont été récupérés auprès de l'EFS Aquitaine-Limousin (AQLI) sur le site de l'hôpital Pellegrin à Bordeaux après :

- autorisation par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de l'utilisation au CRPP de produits sanguins humains délivrés à l'EFS AQLI sous le numéro d'agrément **AC 2013-2025** obtenu le 16 juin 2014 ;
- autorisation par l'EFS AQLI d'utiliser des produits sanguins humains dans le cadre du projet de recherche soumis et accepté sous le numéro de convention **DC-2014-2203** obtenu le 11 février 2015.

Les échantillons sont commandés 2 jours avant et réceptionnés le jour même de leur utilisation. Ils ne doivent pas être conservés au-delà de la journée d'expérimentation prévue car le CRPP ne dispose pas de l'autorisation de stockage des produits sanguins humains.

Tous les échantillons fournis par l'EFS AQLI sont préalablement testés pour le dépistage de maladies transmissibles :

- détection d'anticorps anti-VIH1, anti-VIH2 et diagnostic viral VIH,
- détection d'anticorps anti VHC et diagnostic génomique viral VHC,
- détection d'anticoprs anti-HTLV
- recherche de la syphilis

2.10.2. Précautions d'utilisation

Les échantillons de sang doivent être manipulés avec soin. Une fois ouverts, il est nécessaire de s'équiper d'une blouse, de gants, lunettes et masque de protection.

L'élimination de tous les déchets ayant été en contact avec le sang se fait dans les poubelles jaunes dédiées aux déchets biologiques en vue d'une destruction par incinération.

2.10.3. Mesure de la glycémie

Pour chaque échantillon de sang, la glycémie a été mesurée grâce à un set d'autosurveillance de la glycémie One Touch Vita commercialisé par LifeScan France.

2.10.4. Electrochimie dans le sang

Pour les mesures en électrochimie, 10 ml de sang ont été versés dans un bécher de 10ml thermostaté à 37,5°C grâce à la cellule thermostatée connectée à un circulateur isotherme. Une agitation magnétique a été appliquée pour éviter la sédimentation des globules rouges.

3. Références bibliographiques

1. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Bacillus pumilus: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 7.
2. Durand, F., et al., *Bilirubin oxidase from Magnaporthe oryzae: an attractive new enzyme for biotechnological applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. **96**(6): p. 10.
3. Flexer, V., et al., *Porous mediator-free enzyme carbonaceous electrodes obtained through integrative chemistry for biofuel cells*. Energy and Environmental Science, 2011. **4**(6): p. 10.
4. Gao, F., O. Courjean, and N. Mano, *An improved glucose/O₂ membrane-less biofuel cell through glucose oxidase purification*. Biosensors & Bioelectronics, 2009. **25**(2): p. 6.
5. Mano, N., et al., *Oxygen Is Electroreduced to Water on a "Wired" Enzyme Electrode at a Lesser Overpotential than on Platinum*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(50): p. 15290-15291.
6. Durand, F., et al., *Designing a highly active soluble PQQ-glucose dehydrogenase for efficient glucose biosensors and biofuel cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010. **402**(4): p. 750-754.
7. Cadet, M., et al., *Design of a highly efficient O₂ cathode based on bilirubin oxidase from Magnaporthe oryzae*. Chemical Physical Chemistry, 2013: p. 4.
8. Courjean, O., et al., *Effect of Degree of Glycosylation on Charge of Glucose Oxidase and Redox Hydrogel Catalytic Efficiency*. ChemPhysChem, 2010. **11**: p. 2795-2797.
9. Wan, M., X. Gong, and M. Qian, *In Vivo Hemodynamic Evaluation Based on Transverse Doppler Measurements of Blood Velocities and Vessel Diameter*. IEEE transactions on biomedical engineering, 1999. **46** p. 1074-1080.
10. Ge, J., J. Lei, and R.N. Zare, *Protein-inorganic hybrid nanoflowers*. Nature Nanotechnology, 2012. **7**: p. 428-432.
11. Butler, R.D., *Ultraviolet absorption spectra of histamine, histidine and imidazole : effect of pH and certain foreign ions on the spectrum of histamine*. Kansas State University, 1961.
12. Liu, P., L. Zhang, and L. Liu, *Determination of acrylamide in potato chips by high-performance liquid chromatography coupled to diode array detection*. <http://www.chemistrymag.org/cji/2008/102009pe.htm>, 2008. **10**(2): p. 9.
13. Reculosa, S., et al., *Design of Catalytically Active Cylindrical and Macroporous Gold Microelectrodes*. Advanced Functional Materials, 2011. **21**(4): p. 691-698.
14. FDA, *Use of International Standard ISO-10993, 'Biological Evaluation of Medical Devices 2014*.
15. Tanga, A., et al., *A Role for Platelet CD154 in the Foreign Body Reaction to Biomaterial*. ESB 25th European Society for Biomaterials, Liverpool (UK), 2014.
16. Zebda, A., et al., *Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices*. Scientific Reports, 2013. **3**(1516): p. 1-5.
17. Kang, C., et al., *An Oxidizable Anion-Excluding Polymer-Overlayer for Oxygen Electrodes*. Electroanalysis, 2009. **21**: p. 2709-2712.
18. Xie, H., X.L. Tan, and Z. Gao, *An interference-free implantable glucose microbiosensor based on use of a polymeric analyte-regulating membrane*. Frontiers in Bioscience, 2005. **10**(2): p. 1797-1801.

Liste des publications

BIOcompatible and BIOfunctional porous electrodes for miniaturized enzymatic BIOfuel cells, Tanga, A., Cadet, M., Karajic, A., Kuhn, A., Durand, M., Ripoche, J., Mano, N., **en préparation**

Cadet, M., Mano, N., *An enzymatic glucose/O₂ biofuel cell operating in human blood*, *ChemElectroChem*, **soumis**

Gounel, S. Rouhanna, J., Cadet, M., Mano, N., *Increasing the specific activity bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus* by improving the production*, **soumis**

Cadet, M., Brilland, X., Gounel, S., Louerat, F., Mano, N., *Design of a Highly Efficient O₂ Cathode Based on Bilirubin Oxidase from *Magnaporthe oryzae**, *Chem PhysChem*, 2013, **14**(10): p. 2097-2100

Edembe, L., Gounel, S., Cadet, M., Durand, F., Mano, N., *A highly efficient O₂ cathode based on bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus* operating in serum*, *Electrochem. Commun.*, 2012, **23**, p. 80-82

Liste des conférences

2015

Communication orale:

“A biofuel cell based on bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae* operating in blood”

Marine Cadet, Sébastien Gounel, Nicolas Mano

XXIII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics

14-18 juin, Malmö, SUEDE

2014

Ecole d'été :

Poster et communication orale “Glucose/oxygen biofuel cells”

Bioenergy Summer School

28 septembre – 04 octobre, Ile d'Oléron, FRANCE

Poster :

“A biofuel cell operating in human blood based on a new efficient bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae*” – **Prix de poster**

Marine Cadet, Sébastien Gounel, Nicolas Mano

65th annual meeting of the International Society of Electrochemistry

31 août-05 septembre, Lausanne, SUISSE

Poster :

“A biofuel cell based on a new efficient bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae* and operating in blood”

Matrafüred 2014, International Conference on Electrochemical Sensors

Marine Cadet, Sébastien Gounel, Nicolas Mano

15-20 juin, Visegrad, HONGRIE

Poster

“Design and optimization of a highly efficient biocathode based on a new bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae*”

Marine Cadet, Xavier Brilland, Sébastien Gounel, Frédéric Louerat, Nicolas Mano

Journée de l'Ecole Doctorale des Sciences Chimiques de Bordeaux

16 avril, Bordeaux, FRANCE

2013

Communication orale:

“A highly efficient O₂ cathode based on bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae*”

Marine Cadet, Xavier Brilland, Sébastien Gounel, Frédéric Louerat, Nicolas Mano

Journées d'Electrochimie 2013

08-11 juillet, Paris, FRANCE