



HAL
open science

Développement de biocathodes pour biopiles enzymatiques utilisant la laccase

Mohamed Achraf Blout

► **To cite this version:**

Mohamed Achraf Blout. Développement de biocathodes pour biopiles enzymatiques utilisant la laccase. Chimie théorique et/ou physique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066249 . tel-01695524

HAL Id: tel-01695524

<https://theses.hal.science/tel-01695524>

Submitted on 29 Jan 2018

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale 397

Laboratoire de Réactivité de Surface

Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques

Développement de biocathodes pour biopiles enzymatiques utilisant la laccase

Par Mohamed Achraf Blout

Thèse de doctorat en Physique et Chimie des Matériaux

Co-dirigée par Claude Jolival et Alain Pailleret

Présentée et soutenue publiquement le 17 octobre 2017

Devant un jury composé de :

Michael Holzinger	Chargé de recherche Université Grenoble Alpes	Rapporteur
Elisabeth Lojou	Directrice de recherche CNRS Université d'Aix Marseille	Rapporteur
Christophe Innocent	Chargé de recherche ENSCM Chimie Montpellier	Examineur
Michèle Salmain	Directrice de recherche CNRS Université Pierre et Marie Curie	Examinatrice
Claude Jolival	Professeur Université Pierre et Marie Curie	Directrice de thèse
Alain Pailleret	Maitre de conférences Université Pierre et Marie Curie	Co-directeur de thèse
Farzaneh Arefi-Khonsari	Professeur Université Pierre et Marie Curie	Invitée

Remerciements

A l'issue de ce travail qui a été exaltant en tout point de vue, je tiens à remercier les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter et d'examiner ce manuscrit qui est le fruit de trois années de recherche riches aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain. Les travaux de recherche que j'ai menés m'ont permis de partir à la découverte des piles à combustible enzymatiques et d'acquérir de nouvelles compétences. En plus de son aspect innovant, ce travail m'a également permis de développer mes capacités en matière de recherche, d'analyse, de synthèse en plus de l'esprit critique. Sur le plan humain, je ne remercierai jamais assez tous ceux qui m'ont assisté et sans lesquels ce travail n'aurait jamais pu aboutir.

Ma gratitude va tout particulièrement à ma directrice de thèse Madame Claude Jolivald qui a dirigé mon travail et dont l'apport a été décisif. Sa confiance en mes capacités a été déterminante pour la suite. Le savoir et l'expertise qu'elle m'a communiqués m'ont forgé sur le double plan personnel et scientifique. L'accomplissement de ce travail n'a pas été sans difficultés et à chaque fois, son coaching intelligent et son optimisme de tous les instants m'ont été d'un très grand secours, ce qui m'a permis à chaque fois de mieux rebondir et de mener à son terme ce travail dans les meilleures conditions possibles.

Je ne remercierai également jamais assez mon co-directeur de thèse Monsieur Alain Pailleret qui m'a été d'un précieux concours tant au niveau de la démarche suivie, de la rigueur que des connaissances acquises. Sa codirection a été enrichissante à plus d'un titre et a permis à ce travail de mieux avancer. Ses qualités humaines m'ont énormément facilité la tâche.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à Madame Farzaneh Arefi Khonsari et à Monsieur Jérôme Pulpytel membre de l'équipe encadrante qui n'ont ménagé aucun effort pour orienter dans la bonne direction une partie de ce travail. Sans oublier bien évidemment Monsieur Hubert Perrot qui a apporté sa pierre à ce travail. Que serait ce travail sans la contribution de Shinsuke Mori. Les échantillons de Nanowalls de carbone qu'il a fourni ont permis de travailler sur une partie de ma thèse. Qu'il en soit ici remercié.

Je citerai également Madame Florence Billon, Madame Françoise Pillier, Monsieur Christophe Calers et Monsieur Christophe Méthivier, qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude pour leur savoir-faire, leur disponibilité, leur gentillesse et ce, à chaque fois où j'ai eu à les solliciter. J'adresserai une mention spéciale au Laboratoire de Réactivité de Surface et

au Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques qui ont accueilli les travaux de cette recherche.

Le soutien et les encouragements des membres de ma famille ont donné un sens supplémentaire à ce travail. A distance, ou à chaque retour en Tunisie ils ont été toujours là pour me mettre dans les meilleures conditions et me booster, avec une mention très spéciale à ma maman, à mon papa, à mon frère ainsi qu'à ma tante Ahlem. Je ne les remercierais jamais assez. J'ai une petite pensée pour mon chien Micha qui vient de nous quitter après avoir partagé notre vie 15 années durant et dont la compagnie nous a apporté beaucoup de joie. Au cours de ces trois années de thèse j'ai eu la chance de rencontrer des gens formidables avec lesquels j'ai passé de très bons moments et qui sont devenus mes amis. Je n'oublie pas tous mes amis où qu'ils soient qui m'ont permis à des degrés différents de m'épanouir.

Table des matières

Introduction générale	1
------------------------------------	---

CHAPITRE I. BIBLIOGRAPHIE 7

I.1. LES BIOPILES ENZYMATIQUES	9
I.1.1. CONTEXTE GENERAL	9
I.1.2. PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UNE BIOPILE	9
I.1.3. LES BIOPILES MICROBIENNES	11
I.1.4. LES BIOPILES ENZYMATIQUES	13
I.2. LES ENZYMES EMPLOYEES DANS LES BIOPILES ENZYMATIQUES	14
I.2.1. GENERALITES SUR LES ENZYMES.....	14
I.2.1.1. La structure d'une enzyme.....	14
I.2.1.2. Mécanisme et cinétique des réactions enzymatiques.....	17
I.2.2. LES ENZYMES OXYDOREDUCTASES	18
I.2.2.1. Les enzymes employées dans le compartiment anodique.....	19
I.2.2.2. Les enzymes employées dans le compartiment cathodique.....	21
I.2.3. LA LACCASE.....	24
I.2.3.1. Caractéristiques physico-chimiques des laccases	24
I.2.3.2. Structure de la laccase B de <i>Trametes versicolor</i>	25
I.2.3.3. Applications industrielles de la laccase	27
I.3. L'IMMOBILISATION DES ENZYMES	29
I.3.1. IMMOBILISATION PAR ADSORPTION	29
I.3.2. IMMOBILISATION PAR LIAISON COVALENTE.....	29
I.3.3. IMMOBILISATION PAR ENCAPSULATION	30
I.3.4. IMMOBILISATION PAR RETICULATION.....	31
I.4. LES SUPPORTS EMPLOYES DANS LES BIOPILES ENZYMATIQUES	31
I.4.1. LES MATERIAUX CARBONES	31
I.4.2. L'OR.....	33
I.5. FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE DES ELECTRODES	33
I.5.1. LES MATERIAUX CARBONES	34
I.5.1.1. Electroréduction de sels de diazonium	34
I.5.1.2. Traitement acide et oxydant.....	35
I.5.1.3. Procédé d'amination	36
I.5.1.4. Fonctionnalisation par procédé plasma.....	36
I.5.1.5. π -stacking	37
I.5.1.6. Fonctionnalisation par électropolymérisation.....	38

I.5.2. LES MATERIAUX CARBONES COMPOSITES.....	38
I.5.3. LES ELECTRODES D'OR.....	40
I.6. BIOPILE ENZYMATIQUE : VERS DES DISPOSITIFS IMPLANTABLES.....	40
I.7. CHOIX DES SYSTEMES D'ETUDE ET METHODOLOGIE	422

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES **47**

II.1. PRODUCTION DE LA LACCASE.....	49
II.1.1. CULTURE DE <i>TRAMETES VERSICOLOR</i>	49
II.1.2. CONCENTRATION DU MILIEU DE CULTURE	50
II.1.3. PURIFICATION DE LA LACCASE.....	50
II.1.3.1. Chromatographie échangeuse d'ions.....	50
II.1.3.2. Chromatographie d'interaction hydrophobe.....	52
II.1.4. OXYDATION DE LA LACCASE.....	56
II.2. ELABORATION DES ELECTRODES	57
II.3. IMMOBILISATION DE LA LACCASE	58
II.3.1. IMMOBILISATION COVALENTE DE LA LACCASE SUR L'ELECTRODE	58
II.3.1.1. Formation d'une liaison amide	58
II.3.1.2. Formation d'une liaison imine.....	59
II.3.2. IMMOBILISATION PAR ADSORPTION.....	60
II.4. MESURE DE LA SURFACE ELECTROACTIVE DE L'ELECTRODE DE GRAPHITE.....	61
II.4.1. PRINCIPE.....	61
II.4.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	61
II.5. MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA LACCASE.....	61
II.5.1. PRINCIPE.....	61
II.5.2. PROTOCOLE DE MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA LACCASE	62
II.6. MESURE DU COURANT BIOCATALYTIQUE	63
II.7. CARACTERISATION DE LA SURFACE DE L'ELECTRODE	63
II.7.1. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB)	63
II.7.2. SPECTROMETRIE PHOTOELECTRONIQUE A RAYONS X (XPS).....	64

CHAPITRE III. ELABORATION D'UNE CATHODE GRAPHITE/A-CNX/LACCASE: EFFET DE L'ORIENTATION DE LA LACCASE IMMOBILISEE **67**

III.1. MATERIELS ET METHODES.....	69
III.1.1. ELABORATION DE LA BIOCATHODE : DEPOT D'UNE COUCHE MINCE DE NITRURE DE CARBONE AMORPHE (A-CNX) PAR PULVERISATION CATHODIQUE REACTIVE MAGNETRON	69
III.1.2. MESURE DE LA STABILITE DE LA BIOCATHODE PAR CHRONOAMPEROMETRIE	70
III.1.3. CARACTERISATION DE LA SURFACE DE LA BIOCATHODE PAR AFM	71

III.1.4. LA SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE ELECTROCHIMIQUE (SIE).....	72
III.2. RESULTATS ET DISCUSSION	75
III.2.1. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET CHIMIQUE DE LA COUCHE D'A-CN _x AVANT ET APRES TRAITEMENT ANODIQUE.....	75
III.2.2. MESURES DE DENSITES DE COURANT BIOCATALYTIQUES DE L'ORR POUR DIFFERENTES METHODES D'IMMOBILISATION DE LA LACCASE.....	79
III.2.3. ACTIVITE DE LA LACCASE IMMOBILISEE VIS-A-VIS DE L'ABTS ET DETERMINATION DU TAUX DE COUVERTURE EN ENZYMES ACTIVES.	83
III.2.4. DETERMINATION DU TAUX DE COUVERTURE TOTAL EN ENZYMES PAR XPS.	84
III.2.5. DETERMINATION DU TAUX DE COUVERTURE TOTAL EN ENZYMES ET DE LEUR ORIENTATION SUR LE SUBSTRAT PAR AM-AFM ET PI-AFM.	88
III.2.6. EVALUATION DE LA STABILITE DE L'ACTIVITE BIOELECTROCATALYTIQUE DE LA LACCASE IMMOBILISEE VIS-A-VIS DE L'ORR.	91
III.2.7. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE BIO-ELECTROCATALYTIQUE DE LA LACCASE ENVERS L'ORR PAR SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE ELECTROCHIMIQUE.....	93
III.3. CONCLUSION	98

CHAPITRE IV. ELABORATION D'UNE CATHODE GRAPHITE/NANOWALLS DE CARBONE/LACCASE:EFFET DE LA NANOSTRUCTURATION DE L'ELECTRODE
..... 101

IV.1. MATERIELS ET METHODES	103
IV.1.1. LE PROCEDE PLASMA.....	104
IV.1.1.1. Nanostructuration du graphite par revêtement par des nanowalls de carbone.....	105
IV.1.1.2. Fonctionnalisation du graphite/CNWs par plasma atmosphérique.....	106
IV.1.2. CARACTERISATION DE L'ELECTRODE PAR SPECTROSCOPIE PHOTOELECTRONIQUE A RAYONS X	106
IV.1.2.1. Identification de groupements aldéhydes à la surface de l'électrode.....	106
IV.1.2.1.1. Mise en évidence des groupements carboxyliques à la surface de l'électrode par une méthode chimique	107
IV.1.3. MESURE D'ANGLE DE CONTACT	108
IV.1.4. LA METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES	109
IV.1.4.1. Principe de la méthode des plans d'expériences	109
IV.1.4.1.1. L'espace expérimental	110
IV.1.4.1.2. Surface de réponse	110
IV.1.4.1.3. Modélisation mathématique	111
IV.1.4.2. Plan factoriel fractionnaire du 1 ^{er} degré	112
IV.1.4.3. Plan composite	113
IV.1.4.4. Plan de Doehlert.....	113
IV.1.4.5. Détermination des facteurs influents.....	114

IV.2. RESULTATS ET DISCUSSION	114
IV.2.1. CARACTERISATION DE LA SURFACE D'UNE ELECTRODE GRAPHITE/CNWS.....	114
IV.2.2. DETERMINATION DE LA SURFACE ELECTROACTIVE D'UNE ELECTRODE GRAPHITE/CNWS	117
IV.2.3. PERFORMANCES D'UNE ELECTRODE GRAPHITE/CNWS: ESSAIS PRELIMINAIRES	119
IV.2.3.1. Analyse XPS après traitement APPJ.....	119
IV.2.3.2. Performances bioélectrobiocatalytiques.....	121
IV.2.4. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE TRAITEMENT PLASMA PAR LA MISE EN PLACE DE PLANS D'EXPERIENCES	123
IV.2.4.1. Optimisation des conditions de traitement plasma atmosphérique sur électrodes de graphite nu.....	123
IV.2.4.1.1. Plan d'expérience factoriel fractionnaire	123
IV.2.4.1.2. Plan d'expérience composite	130
IV.2.5. PERFORMANCES DES ELECTRODES GRAPHITE/CNWS DANS LES CONDITIONS DE TRAITEMENT PLASMA OPTIMISEES	134
IV.2.5.1. Electrodes graphite/CNWS60s	134
IV.2.5.1.1. Conditions de traitement plasma issues du plan d'expérience composite avec électrodes de graphite/CNWS60s	134
IV.2.5.1.2. Plan Doehlert.....	136
IV.2.5.2. Electrode graphite/CNWS120s.....	138
IV.2.5.2.1. Immobilisation de la laccase oxydée	139
IV.3. CONCLUSION.....	142

CHAPITRE V. ETUDE PAR PM-IRRAS DE L'IMMOBILISATION DE LA LACCASE SUR UNE SURFACE D'OR PLANE..... 145

V.1. MATERIELS ET METHODES	147
V.1.1. LA SPECTROSCOPIE PM-IRRAS	147
V.1.1.1. La spectroscopie infrarouge	147
V.1.1.2. Principe de l'IRRAS.....	149
V.1.1.3. Principe du PM-IRRAS	150
V.1.1.4. Dispositif expérimental	151
V.1.1.5. Spectroscopie infrarouge des protéines	152
V.1.1.5.1. Modes de vibration de la liaison peptidique.....	152
V.1.1.5.2. Modes de vibration en fonction l'orientation de la protéine sur la surface	153
V.1.2. PREPARATION DES PLAQUES D'OR	154
V.1.2.1. Prétraitement des plaques d'or	154
V.1.2.2. Greffage des SAMs (Self Assembled Monolayer).....	155
V.1.2.3. Immobilisation de la laccase	155
V.2. RESULTATS ET DISCUSSION.....	157

V.2.1. CARACTERISATION <i>EX SITU</i> DE L'IMMOBILISATION DE LA LACCASE	157
V.2.1.1. Analyse PM-IRRAS	157
V.2.1.2. Analyse XPS.....	163
V.2.2. ETUDE PM-IRRAS EN PHASE LIQUIDE (<i>IN SITU</i>)	164
V.2.2.1. Etude PM-IRRAS	164
V.2.2.2. Analyses XPS	170
V.3. CONCLUSION	171
Conclusion générale et perspectives	175
Annexes	181
Annexe 1 Production de la laccase mutante	183
Annexe 2 Saturation de la solution tampon acétate en oxygène	187
Références	189

Introduction générale

Les combustibles fossiles représentent actuellement 80 % de la consommation énergétique mondiale. Ils sont responsables de 80 % des émissions de dioxyde de carbone et des deux tiers des émissions de gaz à effet de serre responsables du réchauffement climatique. Face à ce constat, les sociétés devront s'adapter mais aussi essayer de ralentir ce réchauffement par la mise en place d'actions susceptibles de réduire la présence de gaz à effet de serre dans l'atmosphère. Les piles à combustible (PACs) constituent une source d'énergie électrique renouvelable alternative aux énergies fossiles. Elles génèrent de l'électricité à partir de l'oxydation d'un combustible (hydrogène, méthanol...) et de la réduction d'un comburant (l'oxygène). Il est indispensable d'utiliser des catalyseurs pour augmenter la vitesse de ces réactions. Le meilleur catalyseur à ce jour est à base de platine. Toutefois, les prix élevés et la limitation des réserves du platine ainsi que les verrous technologiques liés à leur fabrication font qu'il est actuellement difficile de développer les PACs à grande échelle. Une alternative à l'utilisation du platine serait de s'inspirer du monde vivant et d'élaborer des piles à combustible qui utilisent non pas un métal noble mais des composés biologiques pour catalyser les réactions mises en jeu. On va s'intéresser au cours de ce travail aux piles à combustible enzymatiques (biopiles enzymatiques). Ces dispositifs constituent une sous-classe des PACs conventionnelles. Elles utilisent des enzymes, protéines ayant des propriétés catalytiques, pour catalyser les réactions se déroulant aux électrodes. Ce n'est qu'à partir des années 60 que les piles à combustible enzymatiques ont commencé à se développer. La première biopile a été élaborée en 1964 par Yahiro *et al.* [1]. Il s'agissait d'un dispositif hybride : il utilisait une enzyme en tant que catalyseur anodique et le platine à la cathode. Malgré le fait qu'il ne permettait de fournir que de faibles potentiels à circuit ouvert, ce dispositif a montré que les enzymes pouvaient catalyser une demi-réaction d'une pile à combustible. Depuis cette découverte, plusieurs avancées ont été réalisées dans la conception des biopiles enzymatiques. A ce jour, on est arrivé à avoir des puissances de l'ordre du mW/cm^2 loin de celles fournies par les PACs conventionnelles (10 W à 1 MW). Ces biopiles seraient d'avantage adaptées à alimenter certains dispositifs médicaux implantables tels que des pacemakers (ces appareils consomment une puissance de $10 \mu\text{W}$), sphincters urinaires artificiels ($200 \mu\text{W}$) ou même des organes artificiels qui seraient ainsi autonomes. En effet, certaines biopiles sont susceptibles de générer de l'électricité par la transformation du glucose et de l'oxygène, deux substrats présents dans les fluides biologiques. Cependant, de nombreux défis restent encore à relever pour

optimiser ces dispositifs. Par exemple, l'élaboration des biopiles à combustible enzymatiques les plus performantes à ce jour nécessite la présence d'un médiateur, composé souvent toxique et donc difficilement compatible avec des dispositifs implantables, élaborer des enzymes résistantes à certains composés tels que l'acide ascorbique, l'urée, les halogénures, les hydroxydes présents dans le corps humain et qui inhibent l'activité catalytique de certaines enzymes. Une alternative (radicale) à l'utilisation des médiateurs redox serait de les supprimer et donc de développer le transfert direct d'électrons (DET). On sait que ce transfert est possible pour certaines enzymes utilisées dans les biopiles, notamment la bilirubine oxydase et la laccase, deux oxydases utilisées comme catalyseurs à la cathode. On s'est intéressé dans ce travail à la laccase de *Trametes versicolor* (*T.versicolor*), avec comme objectif, outre le fait de la faire fonctionner en transfert direct d'électrons, d'optimiser son immobilisation (covalente) sur différents substrats carbonés.

Le premier chapitre de ce manuscrit est constitué d'une étude bibliographique structurée en six parties. On se propose de présenter dans un premier temps les différentes classes de piles à combustible biologiques. On détaillera ensuite les différentes enzymes employées dans ces piles. Une attention particulière sera portée aux enzymes de type oxydase et plus particulièrement à la laccase de *T.versicolor*. Les différentes méthodes d'immobilisation des enzymes seront par la suite décrites. Dans les quatrième et cinquième parties, les supports employés pour l'immobilisation enzymatique sont tout d'abord exposés, ensuite l'immobilisation des enzymes via la modification de surface de ces différents supports ainsi que les performances des biocathodes sont présentées. Enfin, des exemples de biopiles glucose/oxygène implantables sont exposés.

Après un chapitre consacré aux méthodes de caractérisation et d'élaboration communes aux trois chapitres de résultats, deux matériaux de cathode de biopiles seront étudiés dans les troisième et quatrième chapitres. Dans le troisième chapitre, le graphite a été recouvert par un film mince de nitrure de carbone amorphe (a-CN_x). Ce film possède la caractéristique de présenter des groupements fonctionnels à sa surface. Différentes techniques ont été mises en œuvre (XPS, AFM et MEB) pour caractériser la surface de la biocathode. Les performances de la biocathode ont été évaluées par voie électrochimique et spectroscopique. Une étude par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) a été réalisée afin de modéliser le rôle et la répartition des enzymes sur la cinétique de l'ORR (Oxygen Reduction Reaction). Le deuxième

matériau de biocathode utilisé sont les nanowalls de carbone (CNWs). Ce matériau formé directement sur le graphite par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD) permet de nanostructurer sa surface. Les CNWs ont été par la suite fonctionnalisés par un jet plasma à la pression atmosphérique (APPJ). Dans ce quatrième chapitre, on a cherché à optimiser ces conditions de fonctionnalisation plasma en ayant recourt à des plans d'expériences.

Enfin, le dernier chapitre est consacré à l'étude en phase liquide (*in situ*) et à l'air (*ex situ*) de l'orientation de la laccase sur des plaques d'or par spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de phase (PM-IRRAS). Pour l'étude *ex situ*, l'enzyme est immobilisée à la surface des plaques d'or puis ces dernières sont analysées par PM-IRRAS tandis que pour l'étude *in situ*, les analyses sont effectuées en même temps que l'immobilisation de la laccase (suivi en temps réel du greffage). Une analyse XPS a aussi été réalisée afin de quantifier l'enzyme à la surface des plaques.

Chapitre I. Bibliographie

I.1. Les biopiles enzymatiques

I.1.1. Contexte général

La diminution des stocks d'énergies fossiles, la demande énergétique croissante et le réchauffement climatique obligent à trouver de nouveaux modes de production énergétique. Parmi les nouvelles sources alternatives, les piles à combustible biologiques (communément appelées biopiles) suscitent un fort intérêt. D'une façon générale, une pile permet de convertir l'énergie chimique en énergie électrique. Les biopiles constituent une sous-classe des piles à combustible conventionnelles. Elles utilisent des composés biologiques pour catalyser les réactions se déroulant aux électrodes [2].

I.1.2. Principe de fonctionnement d'une biopile

Par définition, une biopile est une pile à combustible dont au moins un des catalyseurs anodique ou cathodique est d'origine biologique (enzyme, micro-organisme) [3]. Elles peuvent être classées selon le type de biocatalyseur utilisé. On distingue les biopiles microbiennes, les biopiles à mitochondries et les biopiles enzymatiques. Ces biopiles renferment les mêmes composants qu'une pile à combustible conventionnelle, à savoir une anode siège de l'oxydation d'un combustible, une cathode siège de la réduction d'un comburant, généralement l'oxygène et un électrolyte (Figure I.1).

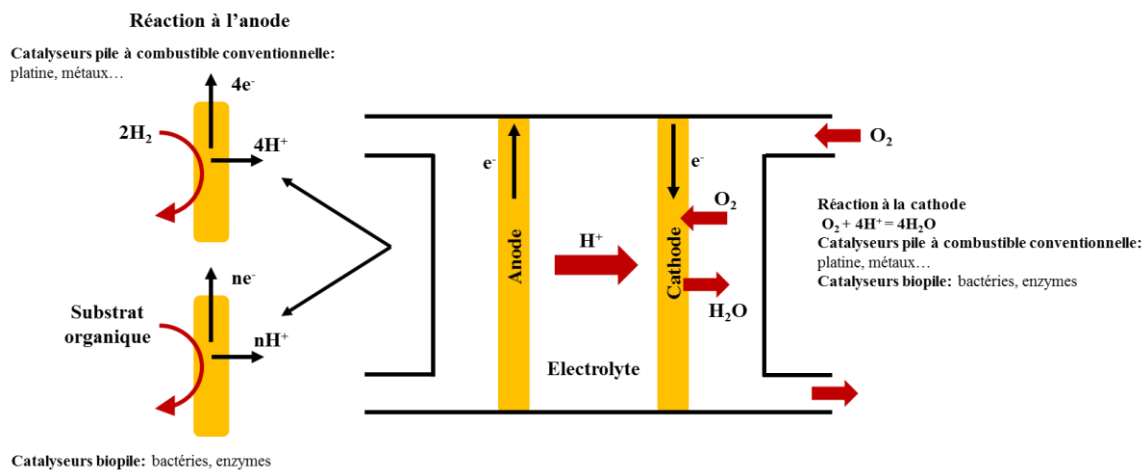


Figure I.1: Comparaison entre une pile à combustible conventionnelle et une biopile

Le potentiel à circuit ouvert (PCO) ainsi que les courbes de polarisation et de puissance permettent d'évaluer les performances d'une biopile [4]. Le PCO représente la différence de

potentiel thermodynamique aux bornes des deux électrodes à courant nul. La courbe de polarisation nous informe que les pertes ou polarisation proviennent principalement de trois sources : la polarisation d'activation due à la barrière d'activation que doivent dépasser les réactifs pour qu'une réaction puisse démarrer, la polarisation ohmique due à la résistance que rencontre le flux d'ions en traversant l'électrolyte et à la résistance que rencontrent les électrons dans les électrodes et le circuit électrique et la polarisation de diffusion due à la formation d'un gradient de concentration des réactifs. La courbe de puissance indique la puissance maximale pouvant être générée par la biopile. Un effondrement de la puissance débitée est observé lorsque la cinétique est limitée par le transport de matière (Figure I.2).

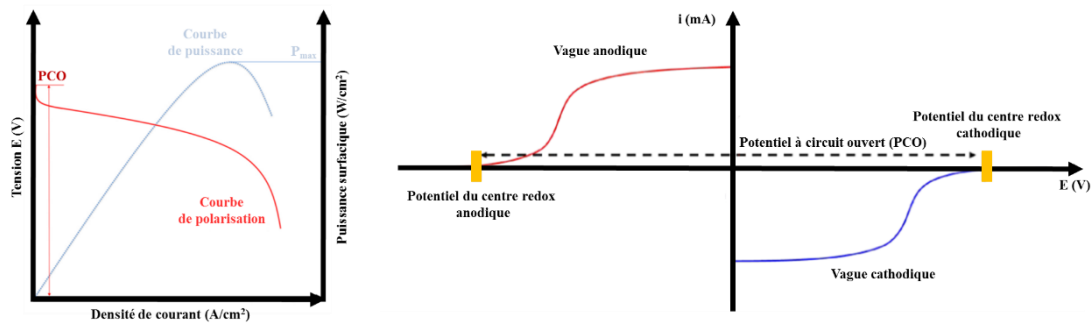


Figure I.2: Schéma des courbes intensité-potentiel (à droite) et variations de la tension et de la densité de puissance d'une pile à combustible en fonction de la densité de courant (à gauche)

Ces performances dépendent considérablement du transfert d'électrons susceptible de se dérouler selon deux mécanismes distincts (Figure I.3) : le transfert d'électrons direct (DET) et le transfert d'électrons médié (MET). Dans le transfert d'électrons direct (DET), les électrons transitent directement de l'électrode au substrat enzymatique via le site actif du biocatalyseur. Dans ce type de mécanisme, le transfert est étroitement lié à la distance entre le biocatalyseur et l'électrode. Cela signifie que le DET ne peut être efficace que lorsque l'électrode est située à une distance inférieure à la distance permettant l'effet tunnel qui est d'environ 1,5 nm [5]. Dans le transfert d'électrons médié (MET), de petites espèces chimiques à faible poids moléculaire, appelées médiateurs redox, sont introduites dans le système pour transférer les

électrons du site actif du biocatalyseur généralement difficilement accessible et diffusant librement en solution à l'électrode (Figure I.3).

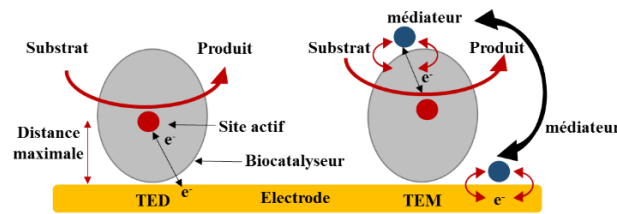


Figure I.3: Schéma représentant les transferts d'électrons direct et médié sur une électrode

I.1.3. Les biopiles microbiennes

Les Piles à Combustible Microbiennes (PCM) sont des dispositifs qui utilisent des biofilms bactériens pour catalyser les réactions se déroulant aux électrodes. Par définition, un biofilm est un amas structuré de cellules bactériennes enrobées d'une matrice de bio-polymères et attachées à une surface. Cette matrice est responsable des propriétés physiques et physico-chimiques du biofilm.

Dans la majorité des cas, une PCM est constituée d'une anode biologique et d'une cathode abiotique séparées physiquement par une membrane échangeuse de protons. Les bactéries présentes dans le compartiment anodique catalysent l'oxydation de la matière organique produisant ainsi les électrons et les protons nécessaires à la réduction du dioxygène dans le compartiment cathodique (les catalyseurs sont de type métallique tel que le platine) [6]. Les électrons sont transférés depuis des donneurs d'électrons vers des accepteurs d'électrons au cours de réactions d'oxydoréduction successives jusqu'à atteindre la membrane externe de la bactérie et ainsi être transportés vers la cathode à travers le circuit électrique. Les bactéries utilisées sont dites exo-électrogènes car elles sont capables de transférer les électrons hors de leurs cellules. Comme le dioxygène réagit avec les protons produits à l'anode et inhibe par conséquent la production d'électricité, il est nécessaire que ce compartiment fonctionne dans des conditions anaérobies. Le compartiment cathodique est exposé à l'air. La membrane quant à elle a pour objectif de permettre le transfert des protons mais aussi d'empêcher la diffusion de l'oxygène dans le compartiment anodique (Figure I.4).

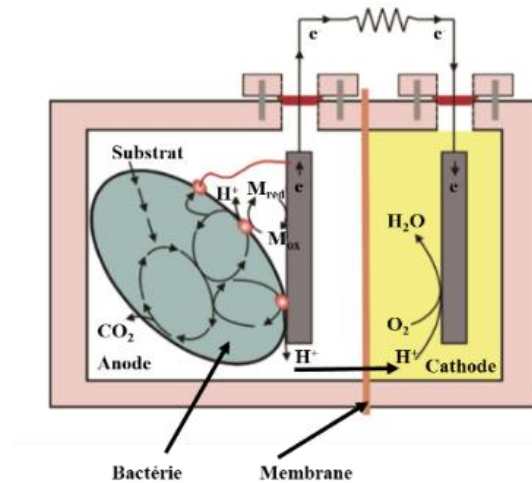


Figure I.4: Schéma d'une biopile microbienne. A l'anode, une bactérie oxyde un substrat pour produire des électrons et des protons et à la cathode, le dioxygène est réduit [7]

Contrairement aux piles à combustible conventionnel, les PCMs peuvent fonctionner à des températures comprises entre 15°C et 45°C, à des pH neutres et catalyser l'oxydation de substrats complexes (différents types de déchets ou d'effluents) [8]. Néanmoins, un temps de latence est nécessaire pour pouvoir fonctionner. En raison de la nature vivante des biocatalyseurs, les PCMs ont besoin d'une période de croissance pour former le biofilm. Les PCMs sont généralement destinées à être employées pour le traitement des eaux usées où la matière organique est décomposée par les bactéries en concomitance avec la production d'électricité [9]. Elles peuvent aussi être utilisées pour faire fonctionner des dispositifs de taille réduite, en tant que biocapteurs ou pour la production d'hydrogène [10]. Actuellement, la performance des PCMs (pour des volumes de réacteur de 1 L) est encore inférieure à l'objectif de 1 kW/cm³, puissance nécessaire pour produire de l'énergie à partir de matières organiques pour des applications industrielles [11]. Afin donc d'augmenter la puissance délivrée, il est nécessaire d'apporter des améliorations technologiques (matériaux d'électrodes) et de mieux comprendre les processus biologiques [12].

Les biopiles à mitochondries utilisent en tant que biocatalyseur à l'anode des mitochondries pour fonctionner [13, 14]. Ces dernières sont constituées d'une membrane externe et d'une membrane interne formée de crêtes augmentant sa surface (Figure I.5).

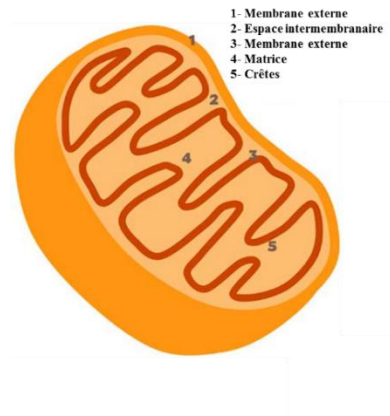


Figure I.5: Schéma de la mitochondrie

Elles sont le siège du cycle de Krebs. Les mitochondries constituent des organelles (ce terme désigne des structures spécialisées contenues dans le cytoplasme et délimitées du reste de la cellule par une membrane phospholipidique) intéressantes en raison du fait qu'elles sont capables de métaboliser complètement le pyruvate qui est le produit final de la dégradation du glucose et les acides gras en dioxyde de carbone. Elles peuvent aussi dégrader les protéines en acides aminés. Ces biopiles constituent des dispositifs prometteurs du fait qu'elles renferment quelques-unes des propriétés attrayantes des biopiles microbiennes (oxydation de substrats organiques complexes) et enzymatiques (puissances du même ordre de grandeur). Minteer *et al.* ont été les premiers à montrer expérimentalement que des mitochondries pouvaient oxyder un carburant à l'anode (la puissance fournie est de 0.203 mW/cm^2). Ils ont observé l'oxydation complète du pyruvate et une viabilité du dispositif durant soixante jours. En outre, les mitochondries ont montré une capacité à effectuer un transfert d'électrons non médié à travers leurs cytochromes de surface [15].

I.1.4. Les biopiles enzymatiques

Au cours de ce travail, on s'est intéressé aux biopiles enzymatiques. Ces dernières utilisent une enzyme et plus particulièrement une enzyme d'oxydo-réduction pour catalyser la réaction d'oxydation du glucose à l'anode et de réduction du dioxygène en eau à la cathode (Figure I.6). Il s'agit d'une réaction de réduction à quatre électrons. Les enzymes possèdent la particularité d'être spécifiques vis-à-vis de leur substrat.

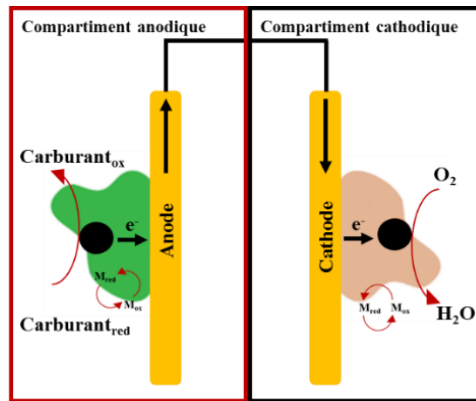


Figure I.6: Schéma de principe d'une pile à combustible enzymatique

I.2. Les enzymes employées dans les biopiles enzymatiques

Avant de décrire les enzymes employées dans les biopiles enzymatiques et plus particulièrement la laccase B de *Trametes versicolor*, on va tout d'abord s'attarder sur la structure d'une enzyme et sur son principe de fonctionnement.

I.2.1. Généralités sur les enzymes

I.2.1.1. La structure d'une enzyme

A l'exception de quelques enzymes composées d'ARN, les enzymes sont des protéines ayant des propriétés catalytiques. Elles se composent d'une partie protéique appelée apoenzyme (elle forme le corps de l'enzyme) constituée d'un enchainement d'acides aminés (molécule organique composée d'un atome de carbone asymétrique qui porte une fonction acide, amine et une chaîne latérale appelée résidu) liés entre eux par des liaisons amides (liaisons peptidiques) (Figure I.7). Une liaison amide résulte de la condensation du groupe α -carboxyle d'un acide aminé avec le groupe α -aminé de l'acide aminé suivant dans la chaîne. On l'appelle la chaîne peptidique.

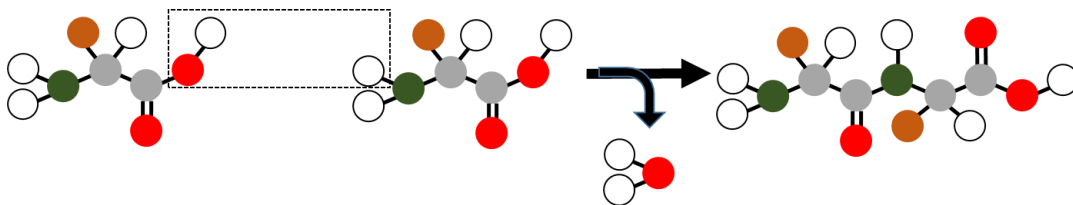


Figure I.7: Liaison peptidique entre deux acides aminés dans une chaîne peptidique

L'extrémité d'un polypeptide comportant un groupement amine libre s'appelle l'extrémité amino-terminale (N-terminale) et celle comportant un groupement carboxylique libre, l'extrémité carboxy-terminale (C-terminale). Par convention, la numérotation des résidus commence à l'extrémité N-terminale. La liaison peptidique est plane. Une rotation est possible autour du carbone alpha qui porte le résidu de l'acide aminé.

On distingue quatre niveaux structuraux chez les enzymes (protéines). La structure primaire correspond à la séquence en acides aminés de la protéine (Figure I.8).

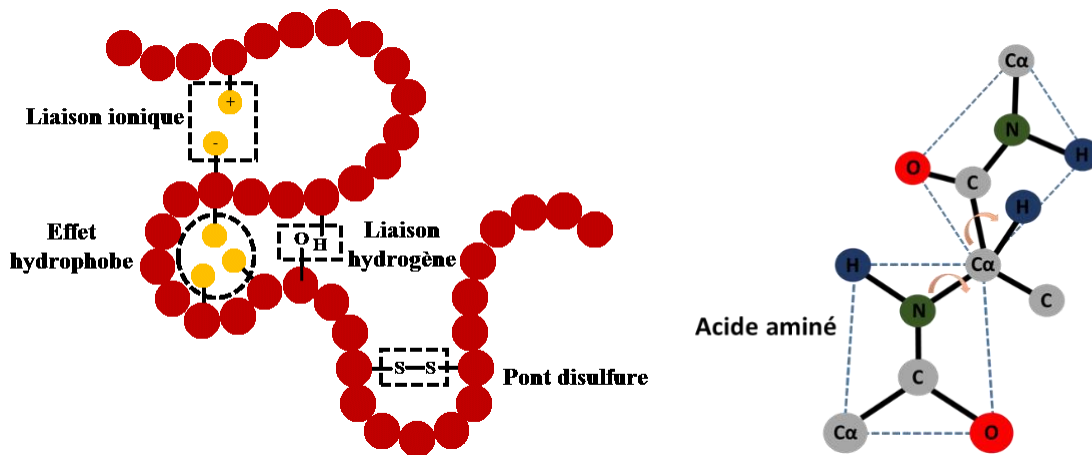


Figure I.8: Structure primaire d'une enzyme

La structure secondaire est relative au premier niveau de compaction. Elle consiste en un repliement des acides aminés en hélices alpha ou en feuillets bêta dont il existe deux formes : les feuillets parallèles et antiparallèles (Figure I.9). L'hélice alpha est constituée par l'enroulement régulier d'une chaîne polypeptidique sur elle-même. Elle résulte de la formation d'une liaison hydrogène entre des groupements C=O et N-H proches l'un de l'autre dans la chaîne. Dans une hélice alpha, l'atome d'oxygène du carbonyle de chaque résidu (acide aminé) forme une liaison hydrogène (qui va stabiliser la structure) avec l'azote du groupement amide situé quatre résidus plus loin dans la chaîne. Le résultat est une structure cylindrique où les résidus sont situés à l'extérieur de l'hélice. Elles détermineront les interactions de l'hélice alpha avec les autres parties de l'enzyme. Dans les feuillets bêta (brins bêta), deux chaînes s'associent entre elles via des liaisons hydrogènes. Ces chaînes peuvent être orientées dans le même sens (feuillelet bêta parallèle) c'est-à-dire par numérotation croissante des résidus des deux chaînes ou

en sens inverse (feuillet antiparallèle) à savoir par ordre croissant pour l'une des chaînes et décroissant pour l'autre. Il existe aussi des feuillets mixtes.

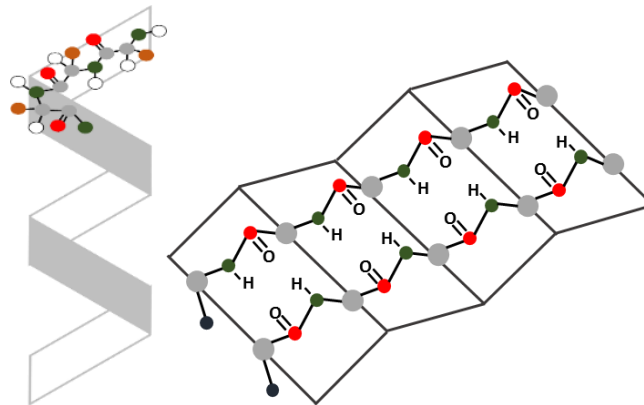


Figure I.9: Structure secondaire d'une enzyme, à gauche l'hélice alpha et à droite un feuillet β

La structure tertiaire correspond à la compaction des structures secondaires entre elles et enfin la structure quaternaire correspond à l'assemblage de plusieurs sous-unités protéiques ayant une structure tertiaire.

La partie protéique (apoenzyme) est parfois présente seule, dans ce cas il s'agit d'une enzyme purement protéique (holoenzyme). Certaines enzymes sont constituées d'une partie non protéique appelée cofacteur lorsque celle-ci n'est pas liée de façon covalente à la chaîne peptidique ou groupement prosthétique dans le cas inverse. Ce complexe apoenzyme-cofacteur forme ce que l'on appelle une hétéroenzyme. Cette partie non protéique est primordiale pour l'activité catalytique de l'enzyme. En effet, les hétéroenzymes ne peuvent pas fonctionner en l'absence de leur cofacteur (il constitue une des parties actives de l'enzyme).

Une enzyme n'est pas seulement caractérisée par sa structure primaire ou sa configuration dans l'espace (structure secondaire à tertiaire). Elle a aussi des caractéristiques qui lui sont conférées au cours de son processus de synthèse. On parle de modifications post-traductionnelles. Ces modifications consistent à modifier la nature chimique d'acides aminés, ce qui a pour effet d'en modifier les propriétés physiques et chimiques. La glycosylation constitue une modification post traductionnelle qui joue un rôle important dans le repliement de l'enzyme, sa stabilité ou certains phénomènes de signalisation cellulaires. Elle consiste à lier un sucre (glucide) à une protéine. Les chaînes polysaccharides sont souvent ramifiées. Les

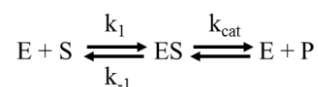
chaines glucidiques sont liées aux protéines par des liaisons O-glycosidiques ou N-glycosidiques selon leur site d'ancrage. Les chaines liées par des liaisons O-glycosidiques sont plus courtes, ne contiennent que un à trois résidus glucidiques. La liaison est établie entre la N-acétyl galactosamine (GalNAc) et les résidus OH des acides aminés sérines (Ser) et thréonines (Thr). Les chaines N-glycosidiques sont ancrées sur l'azote du groupement amide de l'asparagine. Le sucre qui est lié à l'asparagine est le N-acetylglucosamine (GlcNAc). Ils peuvent former des arborescences. Le site d'attachement des chaines liées en N est situé dans la zone consensus N-X-Ser/Thr de la séquence en acides aminés de la protéine. Ces chaines contiennent toutes une structure constituée de deux GlcNAc et de trois mannoses auxquels viennent se greffer d'autres glucides.

I.2.1.2.Mécanisme et cinétique des réactions enzymatiques

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques spécifiques, c'est-à-dire qu'une enzyme donnée ne peut catalyser qu'un seul type de réaction chimique. On distingue six grandes classes selon le type de réactions catalysées :

- Les oxydoréductases : catalysent les réactions d'oxydoréduction,
- Les transférases : transfère un groupement fonctionnel d'une molécule à une autre,
- Les hydrolases : catalysent la coupure de liaisons par hydrolyse,
- Les lyases : catalysent la coupure de liaisons par élimination,
- Les isomérasés : catalysent les réactions de changement dans la configuration du substrat,
- Les ligases : catalysent la condensation de deux molécules.

La vitesse de réaction d'une réaction enzymatique définit l'activité enzymatique. Celle-ci est exprimée en quantité de substrat transformée par unité de temps par quantité d'enzyme. Le mécanisme le plus couramment utilisé pour expliquer le processus catalytique est celui de Michaelis-Menten. Il a proposé que la réaction globale soit composée de deux réactions élémentaires : le substrat forme d'abord un complexe avec l'enzyme, puis ce complexe se décompose en produit. La réaction suivante résume ces différentes étapes :



Où E, S, ES et P symbolisent l'enzyme, le substrat, le complexe enzyme-substrat et le produit respectivement.

Il découle d'après cette réaction que la vitesse de formation du produit peut s'écrire selon l'Equation I.1 suivante :

$$V = \frac{k_{cat} k_1 [E]_{totale} [S]}{k_1 [S] + (k_{-1} + k_{cat})} \leftrightarrow V = \frac{V_m [S]}{[S] + K_M} \text{ (Eq I.1)}$$

V_m , vitesse maximale de la réaction catalytique, $K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$ (mM), constante de Michaelis, $[S]$ concentration en substrat, k_1 , constante de vitesse de la formation du complexe, k_{-1} , constante de vitesse de disparition du complexe et k_{cat} (s^{-1}), constante catalytique de l'enzyme.

La constante de Michaelis (K_M) et la constante de vitesse (k_{cat}) sont les deux constantes permettant de caractériser la cinétique d'une réaction enzymatique. k_{cat} est une constante de vitesse du premier ordre. Elle représente la fréquence à laquelle l'enzyme accomplit l'acte catalytique, c'est-à-dire en anglais son turnover. La valeur de k_{cat} donne la mesure de l'efficacité de la catalyse du substrat par l'enzyme. K_M représente l'affinité du substrat pour l'enzyme. L'affinité de ce dernier est d'autant plus grande que la valeur de la constante de Michaelis est petite. Le Tableau I.1 présente des exemples de K_M et k_{cat} pour certaines enzymes.

Tableau I.1: Exemples de constantes de Michaelis et de vitesses pour différentes enzymes

Enzyme	substrat	K_M	k_{cat}	k_{cat}/K_M
Acétylcholinestérase	Acétylcholine	$9,5 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^4$	$1,5 \times 10^8$
Anhydrase carbonique	CO ₂	$1,2 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^6$	$8,3 \times 10^7$
	HCO ₃ ⁻	$2,6 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$
Catalase	H ₂ O ₂	$2,5 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^8$
Fumarase	Fumarate	$5,0 \times 10^{-6}$	$8,0 \times 10^2$	$1,6 \times 10^8$
	Malate	$2,5 \times 10^{-5}$	$9,0 \times 10^2$	$3,6 \times 10^7$
Uréase	Urée	$2,5 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^5$
Laccase	ABTS (pH = 3)	$6,0 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^2$	$3,7 \times 10^6$

I.2.2. Les enzymes oxydoréductases

Les enzymes utilisées dans les piles à combustible enzymatiques appartiennent à la famille des oxydoréductases. Elles sont constituées par une partie protéique (apoenzyme) et une partie non protéique (cofacteur/métal). Elles catalysent les réactions d'oxydoréduction. On distingue :

- Les oxydases : elles catalysent une réaction d'oxydoréduction impliquant une molécule de dioxygène. Dans ces réactions, l'oxygène est réduit en eau ou en peroxyde d'hydrogène,
- Les réductases : elles diminuent l'énergie d'activation d'une réaction d'oxydoréduction,
- Les peroxydases : elles catalysent la réaction d'oxydation de substrats spécifiques à l'aide du peroxyde d'hydrogène,
- Les oxygénases : elles oxydent un substrat en y transférant un atome d'oxygène issu du dioxygène,
- Les dioxygénases : elles assurent l'incorporation de deux atomes d'oxygène dans une molécule,
- Les hydrogénases : elles catalysent la conversion des protons en dihydrogène (réaction réversible). Les sites actifs de ces enzymes sont de nature organométallique,
- Les déshydrogénases : elles oxydent un substrat par le transfert d'un ou plusieurs protons à un accepteur généralement un coenzyme tel que la pyrroloquinoléine quinone (PQQ) ou la flavine adénine dinucléotide (FAD).

1.2.2.1. Les enzymes employées dans le compartiment anodique

Dans le compartiment anodique, les enzymes utilisées peuvent être classées en trois groupes selon le cofacteur auquel elles sont associées [16]. Le premier groupe est formé par les enzymes utilisant comme cofacteur la pyrroloquinoléine quinone (PQQ) telles que la glucose déshydrogénase (GDH), l'alcool déshydrogénase et la glycérol déshydrogénase, étant signalé que le cofacteur PQQ est lié à l'enzyme. Le deuxième groupe comprend les enzymes utilisant comme cofacteur soit le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH/NAD⁺) ou le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH/NADP⁺). On peut citer aussi comme enzyme la glucose déshydrogénase et l'alcool déshydrogénase. Dans ce type d'enzyme, le cofacteur, centre redox, n'est que faiblement lié à la structure protéique de l'enzyme. Cette caractéristique permet à l'enzyme de transférer des électrons à l'électrode par diffusion du cofacteur. Les enzymes appartenant à la troisième catégorie ont comme cofacteur la flavine adénine dinucléotide (FAD). Ce cofacteur est étroitement lié à la structure protéique de l'enzyme, de façon covalente ou non. Il est généralement enfoui profondément dans la structure de l'enzyme. L'enzyme à FAD la plus couramment utilisée dans le domaine des biopiles est la

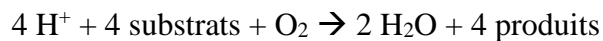
glucose oxydase (GOx). Il a été récemment établi que la GOx ne peut établir de transfert électronique direct avec l'électrode, son utilisation dans les biopiles requiert donc un médiateur.

Trois carburants sont principalement utilisés pour le fonctionnement de l'anode: l'hydrogène, les alcools (méthanol, éthanol) et les sucres (glucose, lactose, fructose). La glucose oxydase d'*Aspergillus niger* est l'enzyme la plus largement utilisée dans les biopiles enzymatiques pour réduire le glucose [2]. Il s'agit d'une enzyme homodimérique, c'est-à-dire qu'elle est formée de deux sous-unités polypeptidiques identiques. A l'intérieur de chacune de ces sous-unités est enfoui le cofacteur responsable de l'oxydation du glucose, à savoir la FAD. Ce biocatalyseur possède une spécificité, une activité et une stabilité très élevées vis-à-vis du beta-d-glucose présent dans les fluides biologiques par comparaison à d'autres enzymes employées pour l'oxydation du glucose. Le glucose s'oxyde en gluconolactone (ce dernier s'hydrolyse ensuite en acide gluconique) par un processus à deux électrons et deux protons. La GOx est ensuite régénérée en réagissant avec l'oxygène. Cette enzyme présente certains inconvénients. En effet, sa grande taille et le fait que son site actif soit enfoui dans sa structure rendent difficile le transfert d'électrons direct en raison de la longue distance (supérieure à l'effet tunnel) et augmentent les contraintes stériques. Par ailleurs, l'oxygène étant un substrat de la GOx, une compétition entre les réactions d'oxydation du substrat et de réduction du dioxygène peuvent entraîner une baisse des performances de la biopile enzymatique [17]. Une autre enzyme pouvant être employée pour l'oxydation du glucose est la cellobiose déshydrogénase (CDH). Cette dernière a suscité une attention croissante durant ces dernières années en tant qu'enzyme utilisée pour effectuer le transfert d'électrons direct dans les biopiles enzymatiques. La CDH se compose de deux domaines distincts : un domaine contenant une FAD et un autre domaine contenant un hème. La FAD est responsable de l'oxydation du substrat. Elle est par la suite régénérée en transférant successivement les deux électrons à l'hème. L'hème facilite le couplage électrique avec le matériau d'électrode. Il faut savoir que le glucose n'est pas le substrat (cible) de la CDH. L'efficacité catalytique de cette enzyme n'est donc pas aussi élevée que celle de la GOx. Le substrat natif de la CDH est la cellobiose, mais l'enzyme est capable d'oxyder aussi le lactose avec un fort rendement. Les glucoses déshydrogénases (GDH) sont aussi ces dernières années très utilisées pour oxyder le même substrat. Le fructose constitue aussi un carburant glucidique pour les biopiles enzymatiques. La fructose déshydrogénase se composant aussi de deux domaines (un domaine contenant un DFC

et un autre un hème) est utilisée pour oxyder ce carburant. La GDH et la FDH présentent l'avantage de ne pas réduire l'oxygène contrairement à la GOx. Pour les alcools et l'hydrogène, on peut utiliser comme enzyme l'alcool déshydrogénase et les hydrogénases respectivement.

I.2.2.2. Les enzymes employées dans le compartiment cathodique

Au cours de ce travail, on s'est intéressé au compartiment cathodique de la biopile enzymatique. Les enzymes les plus largement utilisées appartiennent à la famille des oxydases multi-cuivres (MCOs). Elles constituent une famille d'enzymes capables d'oxyder divers substrats concomitamment avec la réduction de l'oxygène en eau. Elles peuvent être divisées en deux catégories. On distingue les MCOs capables d'oxyder des substrats organiques (oxydases organiques) tels que les phénols. Dans cette catégorie, on retrouve les laccases, les bilirubines oxydases et l'ascorbate oxydase. Le deuxième type de MCOs est capable d'oxyder des ions métalliques (métalloxydases) [18]. Les métalloxydases sont spécifiques vis-à-vis de leur substrat tandis que les oxydases organiques présentent une large variété de substrats. Le bilan de la réaction enzymatique est le suivant :



Les MCOs contiennent quatre atomes de cuivre pouvant être classés en trois catégories selon leurs caractéristiques spectroscopiques. On distingue le cuivre T1 caractérisé par une absorption intense à l'origine de la coloration bleue dans le domaine du visible (600 nm) en raison de la liaison covalente entre le cuivre et le ligand histidine. Il possède aussi un signal en résonance magnétique nucléaire (RMN). Ce cuivre constitue le site d'entrée des électrons à partir de divers substrats (il s'agit du site où se déroule la réaction d'oxydation du substrat). Le cuivre T2 ne présente aucune bande d'absorption mais présente des propriétés paramagnétiques. Le centre cuivrique bi-nucléaire T3 présente quant à lui une absorption intense à 330 nm due au pont hydroxyde reliant les deux atomes de cuivre. Les sites de cuivre T2 et bi-nucléaire T3 forment ce que l'on appelle un cluster trinuécléaire. La réaction de réduction de l'oxygène en eau s'effectue au niveau de ce cluster (Figure I.10) [19].

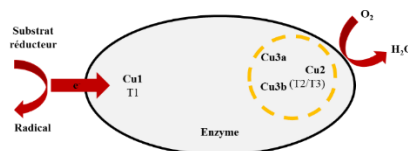


Figure I.10: Réactions catalysées par les MCOs

Sur la base des études cristallographiques, l'environnement des cuivres a été déterminé. Le cuivre T1 est coordonné au minimum par deux ligands histidines et un ligand cystéine. Dans de nombreux MCOs, un quatrième ligand en position axiale (la méthionine) peut être coordonné à l'atome de cuivre. La coordinence du cuivre est égale à quatre. Cette structure a été retrouvée chez certaines variétés de laccases issues des végétaux. Lorsque le cuivre est seulement coordonné à 3 ligands, il possède une géométrie trigonale plane. Un résidu hydrophobe (phénylalanine ou leucine) non coordonné est situé en position axial. On retrouve cette structure dans les laccases issues de champignons. Le cluster tri-nucléaire est situé à une distance de 13 Å environ du cuivre T1. Le cuivre T1 est connecté au cluster par un tri-peptide histidine-cystéine-histidine. Le cuivre T2 du cluster est coordonné à deux ligands histidines et un ligand aqueux (H₂O) situé en dehors du cluster. Les deux cuivres formant le centre bi-nucléaire sont coordonnés chacun à trois ligands histidines. A l'état oxydé, ils sont reliés par un pont hydroxyde [20].

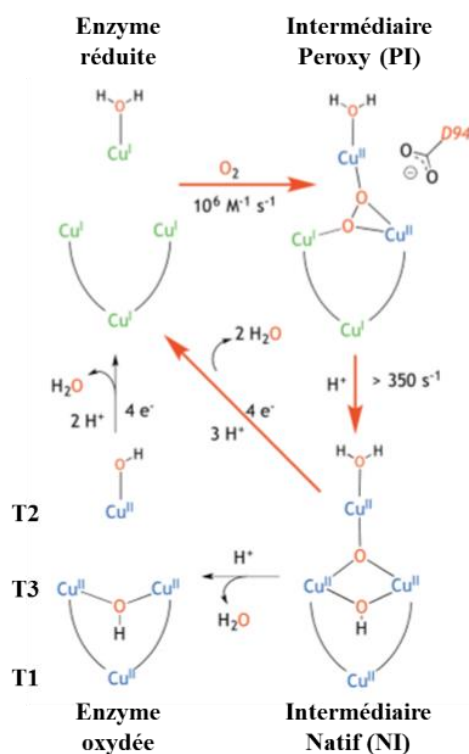


Figure I.11: Mécanisme de réduction du dioxygène [21]

Le mécanisme catalytique de réduction du dioxygène par les MCOs a été largement étudié dans la littérature (Figure I.11). Il est constitué de deux étapes de réduction à deux électrons. Il implique un transfert intramoléculaire rapide de quatre électrons du cuivre T1 au cluster tri-nucléaire. Tout d'abord, la forme réduite de l'enzyme va réagir avec le dioxygène avec une constante de vitesse de $1,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour former un intermédiaire peroxyde. Au sein de cet intermédiaire, le dioxygène gagne deux électrons et est coordonné avec les trois atomes de cuivre formant le cluster tri-nucléaire. Le cuivre T2 et l'un des cuivres du centre bi-nucléaire sont à l'état oxydé. La liaison O-O de cet intermédiaire suite à un transfert d'un électron et d'un proton du cuivre T1 va se cliver afin de former l'intermédiaire natif dans lequel l'ensemble des cuivres sont à l'état oxydé. Les atomes d'oxygène totalement réduits restent liés en tant que ligand (pontant) au cluster tri-nucléaire. Cette étape de clivage est cinétiquement déterminante. La constante de vitesse est supérieure à 350 s^{-1} . La réduction rapide à quatre électrons des centres cuivriques de l'intermédiaire natif conduit par la suite à la libération de deux molécules d'eau et à la régénération de l'enzyme (enzyme réduite). En l'absence de substrat réducteur, l'intermédiaire natif se transforme lentement en une enzyme oxydée où les trois atomes de cuivre constituant le cluster sont à l'état oxydé. Une molécule d'eau située à l'intérieur du cluster est libérée tandis que les autres forment un pont hydroxyde entre les centres cuivriques T3. Bien que le mécanisme de réduction du dioxygène soit très bien décrit dans la littérature, l'étape dans laquelle le substrat est oxydé et le cluster tri-nucléaire est réduit est moins connue. Dans cette étape, quatre électrons successifs réduisent le Cu(I) au site T1 en concomitance avec le transfert intramoléculaire des électrons entre le cuivre du site T1 et le cluster T2/T3 [19-21].

Il faut savoir que le substrat réducteur peut être remplacé par une électrode. Pour cette raison, en plus du fait que les MCOs sont capables de réduire l'oxygène, les MCOs ont été utilisées en tant que catalyseur cathodique dans les biopiles enzymatiques. La laccase et la bilirubine oxydase sont généralement utilisées dans ce dispositif (pour la réduction du dioxygène). Dans une moindre mesure, la cytochrome oxydase et le cytochrome c, deux enzymes dont le site actif est composé d'un centre hémique, ont également été utilisées [22]. Dans le cas de la réduction de H_2O_2 , la micropéroxydase [23, 24] et la peroxydase de raifort [25] sont couramment utilisées. Le Tableau I.2 regroupe les principales enzymes utilisées dans le compartiment cathodique des biopiles. On va s'intéresser ci-après à la laccase B de *Trametes versicolor*.

Tableau I.2: Enzymes utilisées dans le compartiment cathodique d'une biopile [22]

Oxydant	Enzyme	Métal/Cofacteur	Demi-réaction
Oxygène	laccase bilirubine oxydase cytochrome oxydase cytochrome c	Cu Cu Cu, Fe/hème Fe/hème	$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$
peroxyde d'hydrogène	micropéroxydase-11 peroxydase de Raifort	Fe/hème Fe/hème	$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O$

I.2.3.La laccase

La laccase a été découverte pour la première fois en 1883 par Yoshida chez une variété d'arbre, *le Rhus vernifica*. Depuis cette découverte, elle a été identifiée dans d'autres végétaux (mangue, pêche...), dans des bactéries (*Azospirillum lipoferum*), chez certains insectes (*Bombyx calliphora*) et surtout chez un grand nombre de champignons. Plus de soixante espèces de champignons producteurs de laccase ont été décrites à ce jour. Les plus importants sont essentiellement des basidiomycètes tels que le *Trametes versicolor* (*T. versicolor*), un champignon de la pourriture blanche (observée au cours de la dégradation du bois).

I.2.3.1.Caractéristiques physico-chimiques des laccases

La laccase est en fait un mélange de plusieurs isoformes. Pour un champignon donné, la production de laccases dépend de la souche utilisée, de la présence ou non d'inducteur et de la durée de la culture du microorganisme. Le champignon *Trametes versicolor*, sur lequel on s'est focalisé lors de ce travail, produit principalement la laccase dite A en l'absence d'inducteur alors qu'en présence d'inducteur la laccase B est majoritaire.

En général, les laccases ont une masse molaire moléculaire comprise entre 60 et 100 kDa dont environ 10 à 50 % sont attribués à la glycosylation. Les points isoélectriques (pI) des laccases des champignons sont situés entre 3 et 7 tandis que ceux des laccases produites par les plantes sont environ de 9. Les laccases ont une bonne stabilité thermique entre 5 et 55°C et sont relativement solubles dans l'eau. Le Tableau I.3 donne les caractéristiques de laccases issues de différents organismes.

Tableau I.3: Exemples de quelques laccases et leurs caractéristiques [26]

Champignons	Masse moléculaire (kDa)	pI	Glycosylation (%)
<i>Phlebia radiata</i>	64	3,5	2
<i>Pleurotus ostreatus</i>	64	2,9	13,4
<i>Rhus vernicifera</i>	110	8,6	45
<i>Trametes villosa</i>	63	3,5-6,5	0,5
<i>Trametes versicolor</i>	67	3,2	14

Les laccases ont des potentiels d'oxydoréduction variables (0,4 à 0,8 V/ENH) selon les espèces qui les produisent. La laccase B de *Trametes versicolor* qui nous intéresse est une laccase bleue de poids moléculaire de 60 à 70 kDa et de pI égal à 3,5. Elle possède un potentiel d'oxydoréduction autour de 0,78 V/ENH. L'activité catalytique des laccases est souvent inhibée par les halogénures, les hydroxydes et les ions urates. Ters *et al.* suggère que les halogénures par exemple se lient au cluster, ce qui restreint son accès [27].

I.2.3.2. Structure de la laccase B de *Trametes versicolor*

La laccase B *T. versicolor* a pour dimensions 70×50×50 Å. Elle est constituée d'hélices alpha en rouge et essentiellement de feuilletts beta antiparallèles en vert [28] (Figure I.12A). L'étude cristallographique de sa structure a permis de préciser l'environnement des quatre ions cuivriques (Figure I.12B), qui avaient précédemment été étudiés par des méthodes spectroscopiques.

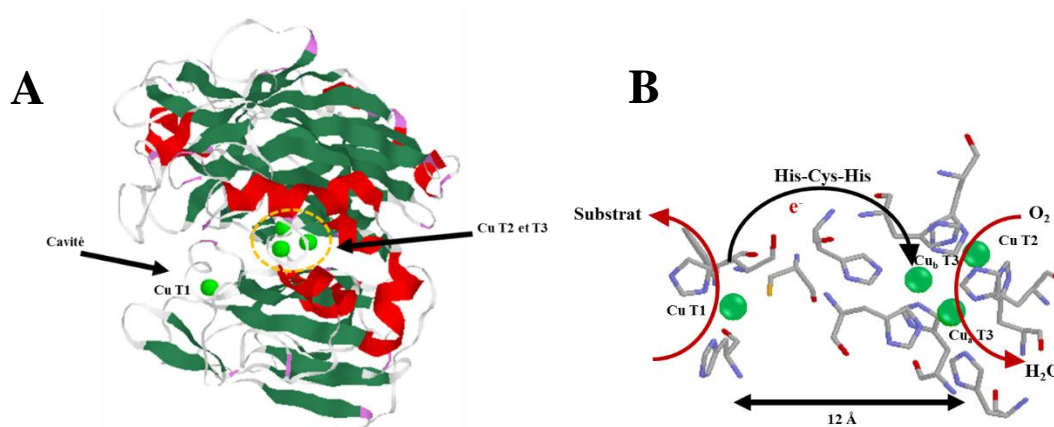


Figure I.12: Schéma A) de la laccase B de *Trametes versicolor*. En vert, les feuilletts beta et en rouge, les hélices alpha et B) de l'environnement des centres cuivriques (Schémas obtenus à l'aide du logiciel Rasmol v 2.6)

Le cuivre T1 (Figure I.13) possède une géométrie bipyramidale trigonale : il est coordonné à deux ligands histidines (His 395 et 458), un ligand cystéine (Cys 453) situé en position équatoriale et un ligand phénylalanine (Phe 463) en position axiale (liaison non covalente, l'autre position axiale n'étant pas occupée, elle est donc libre d'accueillir le substrat). Le cuivre T1 se situe à une distance de 6.5 Å de la surface de l'enzyme. On note la présence d'une cavité assez large proche de ce cuivre permettant l'accès à plusieurs types de substrats. Cette cavité a pour dimension 10×10×20 Å.

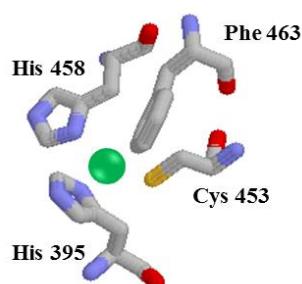


Figure I.13: Structure du centre cuivrique T1 de la laccase B de *T.versicolor*

Le centre T2 possède une géométrie tétraédrique déformée (Figure I.14A). Il est coordonné à deux ligands histidines et un ligand aqueux (H_2O ou OH^-). Concernant le centre bi-nucléaire T3 composé de deux cuivres (Cu_a et Cu_b), chaque cuivre est coordonné à trois ligands histidines : histidines 66, 109 et 454 pour Cu_a (Figure I.14B) et histidines 111, 400 et 452 pour Cu_b (Figure I.14B et Figure I.14C). Le Cuivre T2 est plus exposé et plus labile que le centre T3. La distance séparant le site T1 au centre T2/T3 est de 12 Å [29].

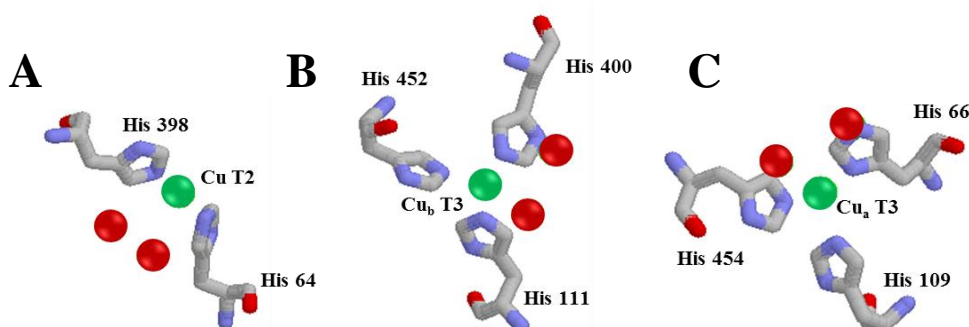


Figure I.14: Structure du cluster tri-nucléaire de la laccase B de *T. versicolor* : A) cuivre T2, B) cuivre T3a et C) cuivre T3b

Le point isoélectrique de la laccase B est d'environ 3, l'enzyme contient donc plus d'acides aminés de type acide que de type basique : 45 acides aspartiques et glutamiques (dont la chaîne latérale porte une fonction acide carboxylique) répartis de manière aléatoire à la surface de l'enzyme contre seulement cinq lysines (71, 174, 194, 59, et 157). La laccase contient également six sites potentiels de N-glycosylation ayant un consensus N-X-Thr. Les asparagines (Asn) concernées sont les Asn 51, 54, 208, 217, 333 et 436. L'étude cristallographique a clairement mis en évidence la glycosylation de quatre de ces asparagines (Asn 54, 217, 333 et 436) (Figure I.15).

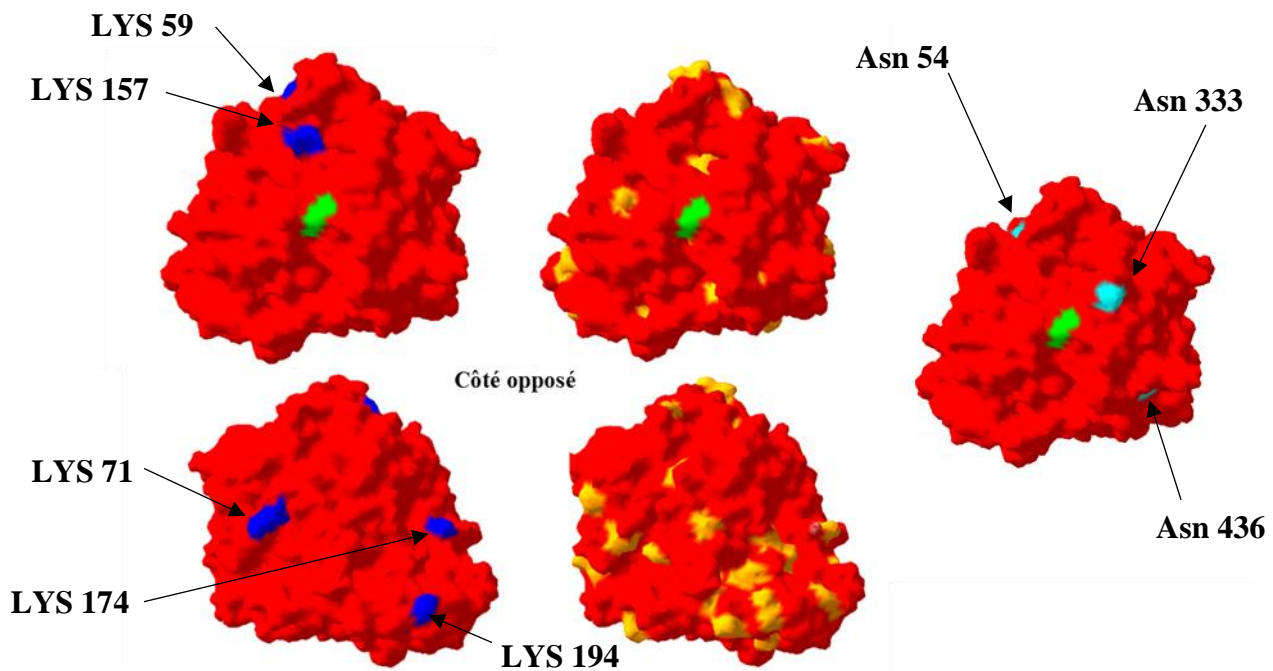


Figure I.15: Schéma représentant les lysines (en bleu), les acides aspartiques et glutamiques (en jaune) et les sites de glycosylation (en azur) de la laccase B de *T. versicolor*. En vert la xylydine (inducteur) proche du cuivre T1

I.2.3.3. Applications industrielles de la laccase

La laccase peut être utilisée dans une large gamme d'applications industrielles du fait de sa spécificité relativement faible. Dans l'industrie du papier par exemple, elle peut être utilisée pour remplacer les composés chlorés utilisés dans l'étape de blanchiment de la pâte à papier (délignification). L'utilisation de composés chlorés présente en effet plusieurs inconvénients tels que le rejet d'effluents toxiques pour l'environnement. Bourbonnais *et al.* ont démontré que la laccase pouvait constituer une alternative à l'utilisation de ces réactifs [30].

Car elle permet de délignifier de manière efficace la pâte à papier. Or, c'est la présence de résidus de lignine qui provoque le jaunissement du papier. La laccase peut être également utilisée dans le domaine de la dépollution environnement. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent des composés toxiques largement présents dans les milieux aquatiques. La laccase est capable de les oxyder en des molécules moins dangereuses. Pour pouvoir les transformer, un médiateur redox est nécessaire. Dans le domaine cosmétique, la teinture des cheveux nécessite l'utilisation d'agents chimiques assez agressifs pouvant endommager les cheveux. Les précurseurs de colorants peuvent être oxydés dans la teinture souhaitée en utilisant la laccase comme solution de remplacement.

La stabilisation du vin est l'une des principales applications de la laccase dans l'industrie alimentaire. Le vin constitue un mélange assez complexe de composés chimiques (il contient de l'éthanol, des acides organiques, des sels et des composés phénoliques). Il est primordial que ses caractéristiques gustatives restent constantes jusqu'à la consommation (suffisamment stables au moins durant la première année de stockage). Dans certaines conditions fortement liées à la présence de polyphénols, le vin s'oxyde et il en résulte un changement de couleur et d'arômes. Différentes méthodes ont été employées afin d'éviter la décoloration et l'altération de la saveur dans les vins tels que l'élimination des groupements phénoliques avec la polyvinylpyrrolidone (PVPP, polymère organique). Le PVPP possède une forte affinité vis-à-vis des polyphénols. Il faut savoir que l'élimination des polyphénols doit être sélective afin d'éviter toute altération indésirable des caractéristiques du vin. Une alternative aux adsorbants physico-chimiques pourrait être l'utilisation de la laccase qui ciblerait les polyphénols durant le processus de fabrication. Ces substances polyphénoliques seraient ainsi oxydées par l'enzyme, polymérisées puis éliminées par clarification. La laccase n'étant pas considérée comme un additif alimentaire, elle est utilisée sous forme immobilisée ce qui permet son élimination du vin et donc sa réutilisation. Le développement de troubles dans les bières lors du stockage est un problème persistant dans l'industrie brassicole. La formation de troubles dans les bières est le résultat de la précipitation de protéines sous l'effet de polyphénols. Ces derniers sont traditionnellement éliminés comme dans le cas du vin par traitement avec la PVPP. La laccase constitue donc une alternative de choix. Pour les jus de pomme et de raisin, l'oxydation des composés phénoliques a toujours posé un problème quant à la qualité organoleptique du jus.

I.3.L'immobilisation des enzymes

L'une des difficultés dans l'élaboration d'une biopile enzymatique repose sur l'immobilisation de l'enzyme avec l'électrode [31]. Les techniques de connexion utilisées pour immobiliser les enzymes entraînent la création d'interactions entre les enzymes et les matériaux d'électrodes. Classiquement, quatre méthodes peuvent être employées pour immobiliser l'enzyme à l'électrode. On distingue l'adsorption, le greffage covalent, la réticulation et l'encapsulation.

I.3.1.Immobilisation par adsorption

L'adsorption (physisorption) constitue la technique d'immobilisation la plus simple. L'enzyme est retenue à la surface grâce à des interactions faibles de type hydrophobe (comme dans le cas de la cavité hydrophobe proche du site T1 de la laccase l'enzyme), électrostatique ou Van der Waals [32]. Les enzymes non adsorbées sont éliminées par lavage (Figure I.16).



Figure I.16: Schéma illustrant l'immobilisation des enzymes par interaction électrostatique à la surface de l'électrode

I.3.2.Immobilisation par liaison covalente

Il est possible d'immobiliser de manière covalente l'enzyme à la surface de l'électrode. La surface de l'électrode doit être fonctionnalisée, ceci afin de pouvoir greffer l'enzyme. La technique consiste à effectuer une réaction chimique entre les groupements fonctionnels libres d'une enzyme et un groupement réactif du support sur lequel l'enzyme pourra être greffée. Les groupements réactifs d'une enzyme peuvent être des groupements aminés, carboxyliques, ou des carbonyles (aldéhydes) (Figure I.17).

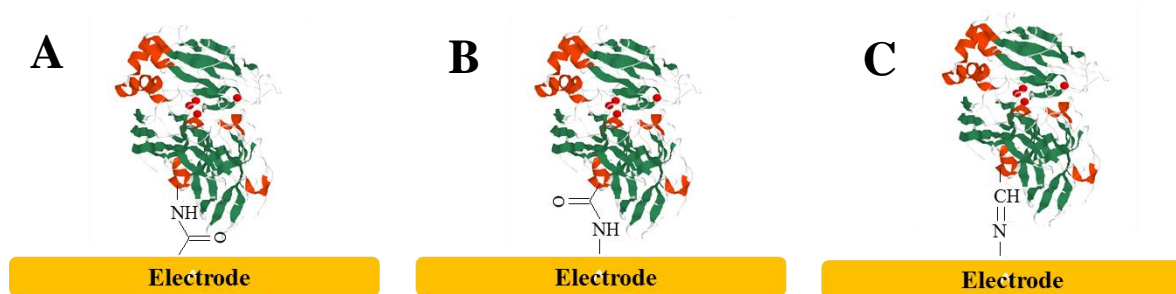


Figure I.17: Schéma des différents types d'immobilisation enzymatique covalente dans les biopiles : A et B) formation d'une liaison amide entre une amine et un acide carboxylique et C) formation d'une base de Schiff entre une amine et un aldéhyde

I.3.3. Immobilisation par encapsulation

L'encapsulation évite la perte des enzymes tout en laissant aux petites molécules la possibilité de diffuser à travers la matrice. Il s'agit d'une méthode qui lie les enzymes de manière non pas chimique mais physique seulement. Les polymères les plus couramment utilisés pour l'encapsulation enzymatique sont les ionomères. Un ionomère constitue un copolymère thermoplastique réticulé ioniquement. Ces matériaux possèdent de larges pores permettant ainsi la pénétration de la solution environnante. Les interactions électrostatiques entre les groupements chargés des ionomères et ceux des enzymes permettent d'avoir une meilleure stabilité. Parmi les ionomères, les polypyridines d'osmium, ou de ruthénium sont très utilisés pour l'encapsulation de la laccase et de la bilirubine oxydase [32]. Ces polymères constituent des hydrogels redox hydrosolubles avec un degré de réticulation moyen. Un hydrogel redox consiste en un réseau tridimensionnel de chaînes polymères hydrophiles renfermant des médiateurs redox. On peut aussi encapsuler l'enzyme dans du Nafion. Ce polymère possède des chaînes latérales terminées par une fonction acide sulfonique qui lui confère un caractère acide, ce qui limite son emploi en tant que matrice d'immobilisation enzymatique. L'échange des protons de l'acide sulfonique du Nafion avec du tétraalkylammonium permet de réduire cette acidité et induit un élargissement des pores permettant la diffusion de larges molécules dans la matrice. Le chitosan, un polyaminosaccharide naturel dérivé de la chitine, est aussi employé comme matrice d'encapsulation enzymatique. Il est biocompatible, peu coûteux et possède une bonne résistance mécanique. Son caractère hydrophobe peut être modifié par amination ce qui permet d'avoir un

environnement favorable à l'enzyme. Le procédé sol-gel est aussi souvent utilisé pour ce type d'immobilisation. Ce type de matrice inorganique à base de silice est avantageux en raison du fait qu'il permet d'avoir des structures et des propriétés variées en fonction des conditions de synthèse. Il est biocompatible mais possède une faible résistance mécanique [33].

I.3.4. Immobilisation par réticulation

Cette technique permet de lier entre elles les enzymes formant ainsi des agrégats par réaction intermoléculaire avec un agent bi- ou multifonctionnel appelé agent de couplage. L'agent de couplage le plus utilisé est le glutaraldéhyde. Les enzymes sont tout d'abord adsorbées sur un support puis traitées par l'agent de couplage. On forme ainsi un réseau enzymatique tridimensionnel. Les enzymes sont par la suite encapsulées dans un gel [34].

I.4. Les supports employés dans les biopiles enzymatiques

Le choix du matériau repose principalement sur sa conductivité, sa surface spécifique (grande porosité) et la présence de groupements fonctionnels afin de pouvoir immobiliser l'enzyme [3].

I.4.1. Les matériaux carbonés

Les matériaux carbonés sont les plus utilisés en raison de leur facilité d'élaboration, de leur prix relativement faible par comparaison aux autres matières premières et de leur biocompatibilité. Parmi les matériaux carbonés on distingue le graphite, le graphite pyrolytique similaire au graphite mais avec des liaisons covalentes entre les couches de graphène, le carbone vitreux... Une attention particulière ces dernières années s'est portée sur les matériaux carbonés nanostructurés (nanotubes de carbone, CNTs) (Figure I.18). On peut citer les nanotubes de carbone multi-paroi (MWCNT) ayant un diamètre compris entre 1,4 et plus de 100 nm et les nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNT) ayant un diamètre compris entre 0,4 et plus de 3 nm [35]. Ces matériaux carbonés découverts par Iijima *et al.* [36] au début des années 1990 sont composés de plusieurs feuillets de graphène enroulés sur eux-mêmes. La nanostructuration de la surface induite par le dépôt de ces CNTs permet d'augmenter la surface spécifique de l'électrode et donc la densité d'enzymes immobilisées à la surface. La plupart des biopiles enzymatiques les plus performantes ont été fabriquées en utilisant des CNTs [34]. En plus de

leur grande surface spécifique, les CNTs peuvent être facilement modifiés par des groupements fonctionnels permettant ainsi le greffage du biocatalyseur.

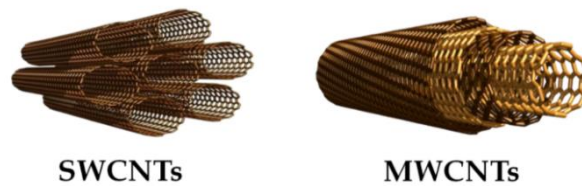


Figure I.18: Représentation des carbones mono-parois (SWCNT) à gauche et multi-parois (MWCNT) à droite [34]

Les propriétés des CNTs dépendent majoritairement de leur architecture. L'orientation selon laquelle l'enroulement du feuillet de graphène s'effectue définit les propriétés des nanotubes. En effet, l'angle d'enroulement détermine la chiralité du tube et dicte ses propriétés électriques et mécaniques. Ces dernières dépendent aussi des conditions de synthèse. Les CNTs peuvent être synthétisés directement sur le support par décharge électrique, ablation laser pulsée et par dépôt chimique en phase vapeur (CVD). La CVD reste la méthode la plus utilisée pour la croissance directe des films minces de CNTs sur un support. Cette méthode nécessite l'utilisation de catalyseurs métalliques afin de permettre la croissance des CNTs. Les paramètres clés permettant le contrôle de la cinétique de croissance sont la nature du gaz contenant la source de carbone, le temps de croissance, la température et la composition du catalyseur. Les CNTs formés par CVD sur le support peuvent être répartis de façon aléatoire ou alignés. Ce procédé conduit à la formation de CNTs avec des quantités significatives de catalyseur résiduel (une étape de purification après synthèse est nécessaire), ainsi qu'à un mélange de CNTs et il ne permet pas de travailler sur certains supports (plastique). En outre la CVD requiert de travailler sous vide et à de fortes températures.

L'élaboration de films de CNTs peut être aussi réalisée par le dépôt d'une phase liquide sur le support. Par comparaison à la méthode de croissance directe, ce procédé permet de travailler à basse température, ne nécessite pas d'être sous vide, réduisant ainsi considérablement les coûts d'élaboration et permet de travailler avec des supports en plastique. Afin d'obtenir ces films, plusieurs facteurs doivent être pris en considération tels que la dispersion des CNTs (les CNTs ont tendance à former des agglomérats dûs aux interactions de

Van der Waals, il est nécessaire d'ajouter un tensio-actif) le choix du support, les conditions de revêtement... Le principe de la méthode de dépôt d'une phase liquide sur un support consiste à fixer la solution de CNTs puis à la sécher. Dans certains cas, une étape supplémentaire d'élimination du surfactant est nécessaire. Il existe de nombreuses méthodes de dépôt de films minces de CNTs telles que la méthode de « Langmuir Blodgett » basée sur le caractère hydrophobe des CNTs, l'auto-assemblage basée sur les interactions entre les CNTs et la surface, le « dip coating » ou encore le « drop coating » [37].

Le graphène constitué d'une monocouche de carbone a attiré aussi une attention particulière et pourrait être considéré comme un matériau prometteur d'électrode. Il présente une bonne conductivité ainsi qu'une résistance mécanique et une surface spécifique assez importantes. Il peut être élaboré suivant différents procédés : exfoliation par voie liquide du graphite, décomposition thermique, dépôt en phase vapeur sur un substrat métallique ou réduction de l'oxyde de graphène (GO). Chacune de ces stratégies permet d'obtenir un graphène avec des caractéristiques différentes. Il peut être fonctionnalisé de la même façon que les autres matériaux carbonés.

I.4.2.L'or

L'or présente des propriétés intéressantes pour l'élaboration d'électrodes [38]. Sa surface peut être fonctionnalisée facilement afin d'avoir les fonctions chimiques d'intérêt. Cette fonctionnalisation est généralement effectuée par des monocouches auto assemblées (Self Assembled Monolayer, SAMs) de thiol ou par des sels de diazonium ayant la terminaison désirée. L'ensemble de ces caractéristiques fait que l'or est utilisé en tant que matériau d'électrode.

I.5.Fonctionnalisation de la surface des électrodes

Différentes méthodes de fonctionnalisation ont été utilisées pour modifier chimiquement la surface des électrodes (Figure I.19). L'objectif est d'introduire des groupements fonctionnels à la surface de l'électrode afin de pouvoir ensuite immobiliser les enzymes.

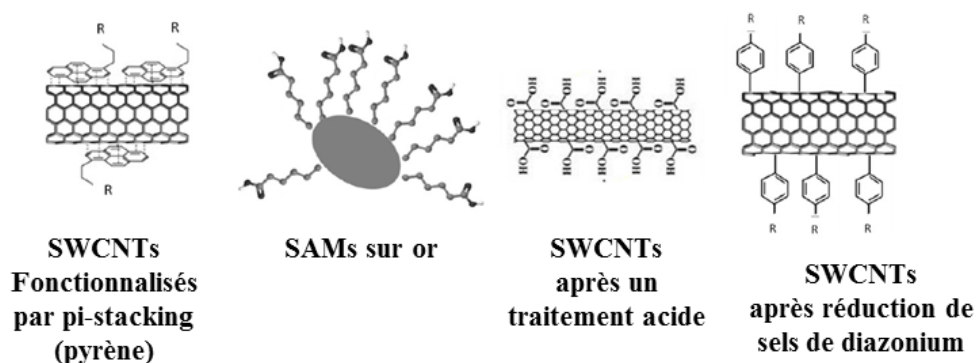


Figure I.19: Schéma de différents types de fonctionnalisation [35]

I.5.1. Les matériaux carbonés

I.5.1.1. Electroréduction de sels de diazonium

La réduction des dérivés de sels de diazonium benzéniques constitue l'une des stratégies de fonctionnalisation des matériaux carbonés pour l'immobilisation enzymatique (Figure I.20). Cette méthode permet d'avoir des noyaux benzéniques avec différents substituants (amines, carboxyliques, hydrocarbures aromatiques polycycliques). En fonction de la nature de ces substituants, différentes méthodes d'immobilisation enzymatique peuvent être envisagées.

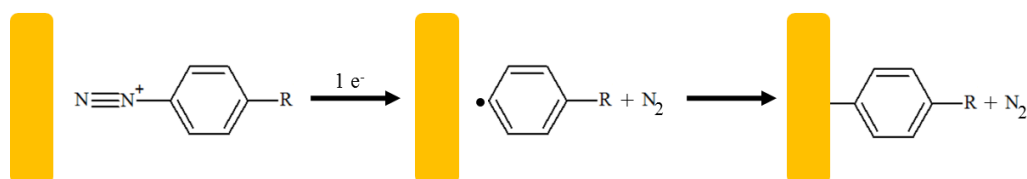


Figure I.20: Mécanisme d'électro-greffage de sels de diazonium benzéniques [39]

Armstrong *et al.* ont proposé une alternative à l'immobilisation de l'enzyme par la formation de liaisons amides et imines [40-42] en tirant avantage de la cavité hydrophobe de la laccase de *Trametes versicolor* proche du cuivre T1 afin de l'immobiliser. Ils ont modifié pour cela du graphite pyrolytique par des sels de diazonium ayant une terminaison chrysène (2-chrysènediazonium) [43]. Ils ont mesuré un courant de l'ordre de $-20 \mu\text{A}$. Ils ont aussi greffé sur ce même type de surface [44] du 2-anthracènediazonium. Ils ont mesuré une densité de courant de $-550 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (utilisation d'une électrode tournante, 2500 rpm). On aura dans ces cas une interaction π -stacking entre la cavité de la laccase et les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Cette méthode d'immobilisation a été par la suite transposée sur les nanotubes

de carbone (SWCNTs et MWCNTs) qui offrent une plus grande surface spécifique. Lalaoui *et al.* [45] ont ainsi immobilisé un dérivé du sel de diazonium (2-diazonium anthraquinone) sur des MWCNTs. Ils ont obtenu une densité de courant de $-0,9 \text{ mA/cm}^2$. Bielewiz *et al.* [46] ont quant à eux fonctionnalisé tout d'abord des SWCNTs par génération de sels de diazonium à partir d'aniline substituée par de l'antracène ou de l'antraquinone puis immobilisé la laccase. L'enzyme a été par la suite piégée dans une matrice de Nafion diminuant ainsi les pertes suite au lavage. Ils ont mesuré respectivement une densité de courant de $-215,8$ et $-187,2 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$ pour l'antracène et l'antraquinone.

Di bari *et al.* [47] ont électrodéposé des feuillets de graphène sur du carbone vitreux. Ces feuillets ont été par la suite fonctionnalisés par du 4-aminoaryl diazonium dans le cas de l'immobilisation la laccase (formation d'une base de Schiff entre les groupements amines du support et les sites de glycosylation de l'enzyme) et par du 2-carboxy-6-naphtol diazonium dans le cas de l'immobilisation de la bilirubine oxydase (formation d'une liaison amide entre les groupements carboxyliques du support et les amines de l'enzyme). Ils ont mesuré respectivement des densités de courant de -1 mA/cm^2 et $-0,4 \text{ mA/cm}^2$.

I.5.1.2. Traitement acide et oxydant

Des fonctions oxygénées (carboxyles, carbonyles et hydroxyles) peuvent être créés à la surface des matériaux carbonés sous des conditions acides et oxydantes [48]. Dans le cas des CNTs, lors de l'élimination des impuretés métalliques, des fonctions réactives telles que des carbonyles ou des acides carboxyliques sont générées. Ces groupements peuvent être utilisés pour l'immobilisation enzymatique. Meredith *et al.* ont fonctionnalisé des MWCNTs avec du chlorure 2-antracène carbonyle (Figure I.21) pour immobiliser la laccase via sa cavité hydrophobe. Ils ont obtenu une densité de courant de $-155 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$

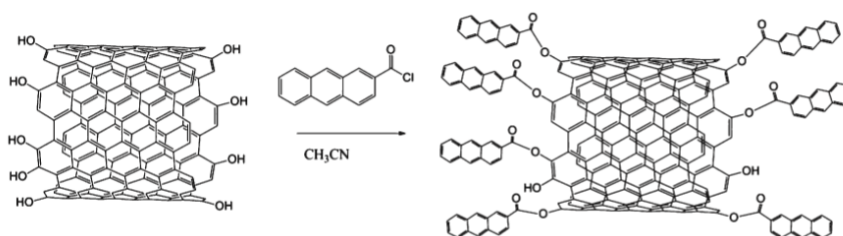


Figure I.21: Fonctionnalisation des CNTs par des groupements anthracènes [49]

Bielewiz *et al.* [46] ont aussi utilisé les fonctions carboxyliques présentes sur les CNTs.

Les groupements carboxyliques ont été modifiés avec de l'antracène et de l'antraquinone afin d'immobiliser la laccase. Ils ont mesuré des densités de courant (même ordre de grandeur) de $-93,8$ et $-151,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ respectivement.

I.5.1.3. Procédé d'amination

On peut aussi fonctionnaliser les CNTs par amination. Il s'agit d'une réaction au cours de laquelle un groupement amine est greffé à la surface d'un matériau par voie électrochimique. Sosna *et al.* [50] ont électro-oxydé des amines primaires modifiées par de l'antracène et de l'antraquinone sur du carbone vitreux. Les amines ont été protégées en utilisant le groupe fonctionnel tert-butoxycarbonyl (Boc) afin d'éviter la formation de plusieurs couches. Bartlett *et al.* [51] ont quant à eux mesuré sur des nanotubes de carbone fonctionnalisés par une diamine protégée ($\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NHBoc}$) puis modifiée par du 2-antraquinone carboxylique une densité de courant de $-3,5 \text{ mA}/\text{cm}^2$ sur électrode tournante (Figure I.22).

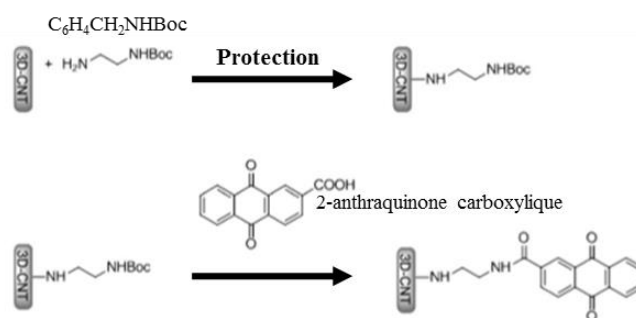


Figure I.22: Fonctionnalisation de nanotubes de carbone par une diamine suivie de sa déprotection et sa modification par du 2-antraquinone carboxylique [51]

I.5.1.4. Fonctionnalisation par procédé plasma

Dans le cas de la fonctionnalisation par électroréduction de sels de diazonium, il est difficile de contrôler l'épaisseur de la couche. On observe la formation de multicouches qui entravent le transfert des électrons. Quant à l'oxydation, elle peut parfois détruire la structure de surface du matériau. Pour surmonter ces limitations liées à la fonctionnalisation des matériaux carbonés, le procédé plasma peut constituer une alternative (le principe du procédé plasma sera décrit dans le chapitre IV). Un plasma d'azote permet d'avoir une large gamme de fonctions azotées à la surface du matériau (amines, imines, nitriles), tandis qu'un plasma d'oxygène permet d'avoir des groupements oxygénés (hydroxyles, carbonyles et

carboxyliques). Selon les paramètres du plasma, on peut contrôler la densité des groupements fonctionnels. De plus, le procédé plasma est non polluant, rapide et de faible coût. La méthode plasma la plus utilisée est le jet plasma à la pression atmosphérique (APPJ) en raison de sa facilité d'utilisation. Dans le cas de la fonctionnalisation des matériaux carbonés, seulement une publication a utilisé ce procédé [52]. Récemment l'immobilisation de la laccase sur des membranes à base de polymères traités par plasma pour une utilisation en tant que biocapteur a été étudiée [53, 54]. Dans le cas des biopiles enzymatiques, Ardhaoui *et al.* [3] ont fonctionnalisé du graphite par APPJ en étudiant l'influence de plusieurs paramètres (type d'immobilisation, nature du plasma...). Ils ont obtenu une densité de courant de réduction du dioxygène maximale de $-108 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ après immobilisation de la laccase par voie covalente.

I.5.1.5. π -stacking

Les différentes fonctionnalisations de la surface présentées ci-dessus constituent des méthodes impliquant la formation d'une liaison covalente entre le groupement fonctionnel et le support carboné. On peut aussi fonctionnaliser les matériaux carbonés de manière non covalente. Une technique possible se base sur des interactions π - π entre des molécules aromatiques polycycliques (Figure I.23) et les parois des CNTs [55, 56]. En 2001, Dai *et al.* [57] ont démontré la possibilité d'immobiliser des protéines sur des CNTs fonctionnalisés par un dérivé du pyrène (acide-1-pyrène-butanoïque).

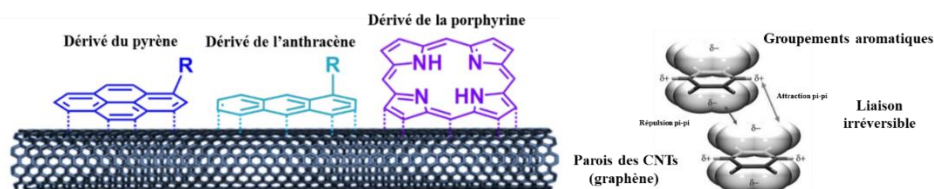


Figure I.23: Interaction π -stacking entre des composés aromatiques et la paroi des CNTs

Comme pour les sels de diazonium, la possibilité de faire varier les groupements fonctionnels du dérivé permet d'avoir un large spectre d'immobilisation enzymatique. Minter *et al.* [58] ont immobilisé la laccase sur des nanotubes de carbone fonctionnalisés avec du 1-amino pyrène ou du 1-pyrène méthanol. Ils ont mesuré des densités de courant de $-62,5$ et $-81,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ respectivement. Ils [58] ont aussi tiré avantage de la cavité de la laccase en fonctionnalisant les CNTs par du 1-amino pyrène ou du 1-pyrène méthanol modifié avec de

l'anthracène. Ils ont mesuré des densités de courant de -186 et $-153 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ respectivement. Bourourou *et al.* [59] ont utilisé sur des MWCNTs des dérivés du pyrène ayant un ou deux groupements anthraquinones. Ils ont mesuré des densités de courant de $-0,35$ et $-1 \text{ mA}/\text{cm}^2$. L'augmentation de la densité de courant dans le 2^{ème} type de fonctionnalisation est dû au fait qu'il y a plus de points d'ancrage pour l'enzyme (la laccase). L'ensemble des exemples cités précédemment ont utilisé la laccase comme enzyme pour la réduction de l'oxygène. D'autres équipes de recherche ont immobilisé la bilirubine oxydase [60].

I.5.1.6. Fonctionnalisation par électropolymérisation

Une autre méthode de fonctionnalisation non covalente est l'utilisation de polymères. Lalaoui *et al.* [61] ont tout d'abord électropolymérisé du pyrrole-pyrène ou du pyrrole-NHS sur nanotubes de carbone puis immobilisé la laccase. Ils ont mesuré une densité de courant de $-1,85 \text{ mA}/\text{cm}^2$ et $-0,77 \text{ mA}/\text{cm}^2$ respectivement. On peut voir que l'immobilisation de la laccase via sa cavité hydrophobe permet d'avoir de meilleurs résultats que lorsqu'elle est immobilisée via la formation d'une liaison amide entre ses groupements amines et les groupements carboxyliques activés du polymère.

I.5.2. Les matériaux carbonés composites

On peut aussi ajouter des nanoparticules d'or à la surface des matériaux carbonés. Les nanoparticules d'or ayant la particularité d'avoir une bonne conductivité permettent d'améliorer le transfert d'électrons et ainsi favoriser les DET.

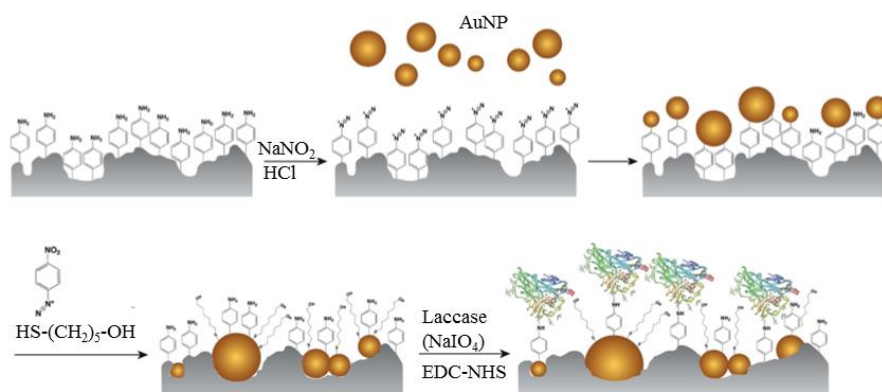


Figure I.24: Schéma de principe de la fonctionnalisation d'une surface de graphite par des nanoparticules d'or et immobilisation de la laccase [62]

Gutierrez-Sanchez *et al.* [62] ont modifié du graphite à faible densité (LDG) avec des nanoparticules d'or (Figure I.24). Ils ont tout d'abord fonctionnalisé le graphite par électroréduction de 4-nitrobenzènediazonium. Les groupements 4-aminophenyl vont ensuite réagir avec du nitrure de sodium pour former des fonctions diazonium qui, après une seconde étape d'électroréduction, permettent d'ancrer les nanoparticules d'or. Les nanoparticules ont enfin été fonctionnalisées par formation de SAMs mixtes constituées de 6-mercaptop-1-hexanol et de 4-aminophenyl. La laccase a été immobilisée via la formation d'une base de Schiff entre les groupements amines et les sites de glycosylation ou via la formation d'une liaison amide entre les groupements carboxyliques activés de la laccase et les amines de surfaces. Ils ont obtenu des densités de courant de $-1,5 \text{ mA/cm}^2$ sur une électrode tournante (500 rpm).

Une autre approche utilisant des NPs d'or a consisté à immobiliser les NPs d'or à la surface de l'électrode et l'enzyme via des interactions non covalentes selon le schéma de principe (Figure I.25). Dans un premier temps, les MWCNTs sont fonctionnalisés par π -stacking avec du 1-pyrenebutyrique adamantyl amide (pyrene-adamantane). Le groupement adamantane a une forte affinité pour la cyclodextrine qui a été greffée sur les nanoparticules d'or, ce qui permet l'immobilisation des NPs. Une laccase mutante ayant une seule lysine proche du cuivre T1 a ensuite été immobilisée sur les nanoparticules d'or modifiées. Ils ont mesuré pour ce type d'électrode une densité de courant de 3 mA/cm^2 . Il s'agit ici de la plus forte densité de courant obtenue jusqu'à ce jour. Cependant la réalisation d'un tel système reste assez complexe. On pourrait s'interroger ici, car avec ce type d'architecture moléculaire, le site T1 est bien loin de la surface de l'électrode.

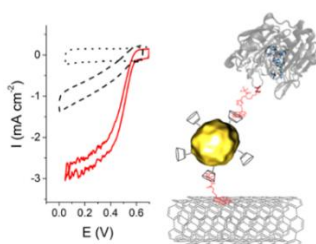


Figure I.25: (à gauche) voltampérométrie de la réduction de l'oxygène sur l'électrode étudiée sous oxygène (rouge), en présence d'argon (pointillés noirs) et sur une électrode MWCNTs en absence de nanoparticules d'or, (à droite) schéma de principe de la fonctionnalisation des CNTs par des nanoparticules d'or et immobilisation de la laccase [38]

Le groupe de Di Bari [63] quant à lui a déposé des nano-tiges d'or sur du graphite et immobilisé la laccase en suivant le même protocole expérimentale que Gutierrez-Sanchez *et al.* [62]. Ils ont obtenu des densités de courant de 0,5 mA/cm².

I.5.3. Les électrodes d'or

Dans le cas des surfaces d'or, la formation de SAMs par chimisorption de groupements thiols fournit des monocouches ordonnées de longueur et de fonctions terminales modulables. Pita *et al.* [41] ont immobilisé la laccase via ses groupements carboxyliques et ses résidus oxydés. Ils ont obtenu une densité de courant de -40 µA/cm². Gupta *et al.* [64] ont montré qu'une fonctionnalisation par des SAMs (4-aminophénol) permettait d'avoir la meilleure configuration pour le transfert d'électrons par la formation d'une base de Schiff entre l'enzyme et les amines de surfaces. Afin d'augmenter la surface spécifique, Sipek *et al.* [65] ont élaboré une électrode à base de nanoparticules d'or fonctionnalisées par des SAMs et des sels de diazonium ayant une terminaison carboxylique. Ils ont mesuré une densité de courant de -800 µA/cm².

I.6. Biopile enzymatique : vers des dispositifs implantables

Généralement, les biopiles enzymatiques génèrent de l'électricité par la transformation du glucose et de l'oxygène, deux substrats présents dans les fluides biologiques. Le glucose constitue la source d'énergie la plus importante pour plusieurs organismes. Il est produit constamment par le métabolisme suite à la dégradation de molécules organiques (glucides). Sa concentration dans les fluides extracellulaires est de 45 µM. L'oxygène, quant à lui, est apporté continuellement par les voies respiratoires. Sa concentration dans les fluides extracellulaires est de 5 mM. Il serait ainsi possible d'élaborer des biopiles enzymatiques pouvant être implantées dans des organismes vivants tels que l'homme. De tels dispositifs constituent une alternative attrayante pour remplacer par exemple les piles à combustible utilisées pour faire fonctionner des pacemakers (ces appareils consomment une puissance de 10 µW), robotiser les sphincters urinaires artificiels (200 µW) ou même faire fonctionner un rein artificiel (20 mW). Jusqu'à présent, ils n'ont jamais été implantés dans un corps humain. Ils ont cependant été testés *in vitro* (examens pratiqués en dehors de l'organisme vivant) dans divers milieux biologiques tels que le sérum, le plasma, la salive et l'urine. Les puissances des biopiles enzymatiques obtenues sont de l'ordre des µW/cm², ce qui est suffisant pour faire fonctionner un pacemaker. Contrairement

aux biopiles enzymatiques fonctionnant ex-situ, plusieurs barrières sont à surmonter pour pouvoir fonctionner dans des milieux biologiques. En 2007, Gao *et al.* [66] ont élaboré une biopile enzymatique en combinant un glucose déshydrogénase NADH/NAD⁺ dépendante à l'anode et une bilirubine oxydase à la cathode immobilisées sur des MWCNTs dans une matrice polymérique. Ils ont observé une baisse significative de la puissance générée par la biopile probablement dûe à la présence d'espèces chimiques dans le sérum. Pour essayer de palier à ce problème, Li *et al.* [67] ont proposé en 2008 d'associer à la glucose déshydrogénase et à la bilirubine oxydase une enzyme, l'ascorbate oxydase capable d'oxyder l'acide ascorbique en présence d'oxygène et ainsi diminuer sa concentration dans les fluides biologiques. L'acide ascorbique constitue l'une des principales espèces électroactive parasites. Il existe de manière significative dans les systèmes biologiques. Sa concentration chez certains mammifères est comprise entre 40 et 120 μM . Gobel *et al.* [68] ont quant à eux montré en plus de l'effet négatif de l'acide ascorbique celui de l'acide urique et de l'urée présents dans l'urine et la salive sur les performances des biopiles enzymatiques. Les enzymes utilisées sont la glucose déshydrogénase PQQ dépendante et la bilirubine oxydase à l'anode et à la cathode respectivement. Ils ont observé que de fortes concentrations en urée diminuaient l'activité de l'anode dans l'urine (la concentration en urée dans l'urine est de 250 mM). Le compartiment cathodique n'est pas affecté par la présence d'urée dans le milieu de fonctionnement. La présence d'acide urique a pour effet de décaler la réaction de réduction de l'oxygène vers des potentiels plus cathodiques.

En plus de ces espèces chimiques, il est nécessaire de prendre en considération les conditions environnementales (pH et température) dans lesquelles la biopile fonctionne. Shleev *et al.* [69] ont opté pour la cellobiose déshydrogénase de *Corynascus thermophilus* et la bilirubine oxydase en tant que catalyseur enzymatique. Ces enzymes possèdent la particularité de conserver leur activité catalytique à des pH neutres (pH des milieux biologiques). Concernant la température, Milton *et al.* [70] ont observé une diminution de la stabilité à la température corporelle. La viscosité du milieu pourrait aussi constituer un élément négatif pour les performances de la biopile enzymatique.

Par ailleurs, les biopiles enzymatiques ont été aussi implantées dans des mammifères. Les animaux vertébrés constituent des modèles idéaux pour la recherche biomédicale. Les puissances obtenues sont aussi de l'ordre des $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Cinquin *et al.* [71] ont implanté en 2010

la première biopile enzymatique implantable dans l'espace rétropéritonéal d'un rat. Zebda *et al.* [72] ont amélioré ce dispositif en augmentant la surface spécifique des électrodes constituant la biopile. Pour cela, ils ont utilisé des MWCNTs. Certaines équipes ont effectué des tests sur d'autres mammifères tels que des lapins [73].

En plus des applications biomédicales, une autre application pour les biopiles enzymatiques est l'alimentation de biocapteurs afin de surveiller de manière continue les conditions chimiques et physiques externes environnementales. Pour ce type d'application, les biopiles pourraient être implantés dans des petits organismes vivants tels que des insectes [74-76], des palourdes [77] et même des escargots [78]. Il est à noter que les conditions de fonctionnement dans ce type d'organisme sont totalement différentes de celles dans les fluides biologiques humains.

I.7.Choix des systèmes d'étude et méthodologie

Le développement des biopiles enzymatiques s'accompagne de la recherche de conditions optimales de fonctionnement. Outre le choix du biocatalyseur, la maîtrise du transfert d'électron entre l'enzyme et l'électrode d'une part, et l'élaboration de matériaux d'électrode avec une surface spécifique élevée d'autre part, constituent deux voies de recherche majeures pour le développement des biopiles, auxquelles on peut rajouter leur durée de vie et leur puissance, deux critères qui ne seront pas abordés dans ce travail.

Durant ces dernières années, une attention particulière s'est portée sur l'implication des nanotubes de carbone. Ces matériaux, en plus d'être biocompatibles, offrent une excellente conductivité électronique et une grande surface spécifique permettant ainsi d'immobiliser une grande quantité d'enzyme. Il est également nécessaire d'assurer une bonne communication entre le biocatalyseur et l'électrode car les performances d'une biopile enzymatique dépendent fortement du transfert d'électrons entre ces deux entités. Dans ce travail, on s'intéresse aux biopiles fonctionnant par transfert d'électrons direct entre l'enzyme et son support solide. Ce dernier doit donc offrir une topographie et une chimie de surface idéales pour les enzymes afin de garantir leur connexion électronique, une activité bioélectrocatalytique efficace et une grande stabilité dans le temps. Selon la nature de l'immobilisation (greffage covalent, interactions électrostatiques), l'orientation de l'enzyme est contrôlée par la position des groupements fonctionnels pouvant intervenir dans l'immobilisation de l'enzyme. Par exemple, la présence d'acides aminés proches du site actif permet une orientation favorable où la distance

entre le site actif de l'enzyme et l'électrode est minimale. Dans ce contexte, notre objectif est de développer de nouvelles architectures de biocathodes utilisant comme enzyme la laccase de *Trametes versicolor* afin d'optimiser son activité bioélectrocatalytique envers la réduction de l'oxygène. D'une part, on propose ici pour la première fois l'implication du nitrure de carbone amorphe dans la réalisation de telles biocathodes. L'objectif est ici d'approfondir la maîtrise et la compréhension de l'impact de l'orientation des enzymes greffées sur le transfert électronique direct enzyme-électrode et donc sur les propriétés bioélectrocatalytiques des enzymes greffées envers la réaction de réduction de l'oxygène (ORR). Selon nous, cette proposition repose d'une part sur la chimie de surface de cette famille de matériaux conducteurs électroniques parfaitement adaptée au greffage d'enzyme, ainsi que sur sa topographie extrêmement lisse qui donne accès à des techniques expérimentales incompatibles avec des bioélectrodes nanostructurées. Précisons ici que des biocathodes graphite/a-CN_x/laccase ont été développées, en parallèle de biocathodes Si/a-CN_x/laccase initialement pressenties dans cette partie de notre étude, car ces dernières ne produisent aucun courant cathodique détectable pour l'ORR dans nos conditions expérimentales. D'autre part, on présente également, et là-encore pour la première fois, la nanostructuration de biocathodes à l'aide de nanowalls de carbone (CNWs). Nous espérons ainsi cumuler la très grande surface spécifique ainsi produite avec une bonne maîtrise de l'orientation des enzymes greffées issue de nos observations acquises sur a-CN_x dans la perspective d'obtenir des densités de courant très compétitives par rapport à celles publiées dans la littérature. Grâce à l'expertise pour cette technique développée au laboratoire, on envisage également d'étudier l'orientation et la cinétique de greffage de l'enzyme en utilisant la technique PM-IRRAS en réalisant l'analyse post-immobilisation de l'enzyme sur le support mais également pendant l'immobilisation, c'est-à-dire *in situ* en phase liquide donc dans des conditions les plus proches possibles des conditions réelles. Plusieurs études ont été effectuées pour étudier l'orientation de l'enzyme notamment la bilirubine oxydase en utilisant cette technique de caractérisation mais aucune n'a été faite en phase liquide en étudiant la cinétique d'immobilisation de la laccase concomitamment aux mesures PM-IRRAS (étude *in situ*). L'objectif ici est non seulement d'étudier l'orientation de la laccase sur les surfaces d'or en effectuant une étude *in situ* et *ex situ* mais aussi d'évaluer le temps de greffage.

Le premier type de matériau développé au cours de ce travail est le nitrure de carbone amorphe déposé sous forme de couche mince sur graphite. Les premières tentatives de synthèse

de ces couches remontent à 1979 par Cuomo *et al.* [1]. Ce type de matériau appartient à la famille des « Diamond-like carbon » (DLC). Les DLCs constituent des formes métastables de carbone amorphe. Ils sont constitués d'atomes de carbones hybridés sp^2 (de type graphite) et sp^3 (de type diamant). La structure peut être décrite comme un réseau amorphe plus ou moins hydrogéné d'atomes de carbone liés de façon covalente sous différentes hybridations. Les propriétés des DLCs dépendent donc de la proportion en carbone sp^2/sp^3 et de la quantité d'hydrogène. On distingue les carbones amorphes notés a-C et a-C : H. Ils sont essentiellement composés d'atomes de carbone ayant une hybridation sp^2 . La deuxième famille est celle des carbones amorphes tétraédriques (ta-C et ta-C : H). Ils sont essentiellement constitués d'atomes de carbone en configuration sp^3 [79]. L'incorporation d'azote dans les carbones amorphes permet au carbone d'établir différents types de liaison chimique. Plusieurs méthodes ont été employées pour déposer les films de nitrure de carbone amorphe. Il s'agit essentiellement de techniques de dépôt sous vide (dépôts physiques en phase vapeur, dépôts chimiques en phase vapeur assistés par plasma). Les a-CN_x ainsi formés constituent une famille de matériau dont les propriétés sont diverses. On a choisi de travailler avec ce matériau en raison de ses propriétés électrochimiques intéressantes. Il offre une fenêtre de potentiel, une conductivité électronique et une réactivité électrochimique qui sont modulables en fonction du contenu en azote atomique de ces matériaux. Il possède aussi la particularité de présenter en surface des groupements amines produits naturellement au cours de son exposition à l'air immédiatement après la phase de dépôt, ce qui permettra le greffage d'enzymes à sa surface [80] sans étape préalable de fonctionnalisation de surface.

Le deuxième type de matériau envisagé, les CNWs, permet de nanostructurer la surface de l'électrode. Il s'organise sous la forme d'un empilement de feuillets de graphène en position verticale sur le substrat sur lequel ils sont déposés [81]. Contrairement au nitrure de carbone amorphe, les nanowalls de carbone comme les nanotubes de carbones, permettent d'augmenter considérablement la surface spécifique de l'électrode, mais ils ne présentent aucun groupement fonctionnel. Au cours de ces dernières années, plusieurs procédés de synthèse des nanowalls ont été étudiés (décharge micro-onde en utilisant comme gaz un mélange de CH₄/H₂ [82-84], plasma généré par radiofréquence [84], décharge électrique en courant continu en utilisant comme gaz un mélange CH₄/H₂/Ar [85], dépôt chimique en phase vapeur à haute fréquence en utilisant un CH₄/H₂/Ar [86]). On a utilisé dans ce travail pour la formation de nanowalls de

carbone par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma à excitation micro-onde (PECVD) en utilisant comme gaz plasmagène un mélange de monoxyde de carbone (CO) et de dihydrogène (H₂). L'objectif est de transposer sur ce nouveau matériau (nanowalls de carbone) la méthode de fonctionnalisation de surface par plasma à la pression atmosphérique précédemment développée et utilisée sur du graphite au sein du laboratoire [3], en procédant à l'identification et à l'optimisation, à l'aide de plans d'expérience, des paramètres déterminants de traitement plasma. Nous exploiterons également les conclusions obtenues sur a-CN_x et liées à l'optimisation du transfert électronique direct entre les enzymes greffées et leur support carboné dans l'objectif d'obtenir des densités de courants élevées pour l'ORR.

Chapitre II. Matériels et méthodes

II.1. Production de la laccase

II.1.1. Culture de *Trametes versicolor*

La laccase est produite par *Trametes versicolor* (*T.versicolor*), un champignon de la pourriture blanche selon un protocole décrit dans la littérature [87]. La souche ATCC 32745 de *T. versicolor* est cultivée stérilement sur boîte de Pétri sur milieu gélosé (composition décrite dans le Tableau II.1) et conservée à 4°C lorsque le mycélium a recouvert la surface de la boîte de Pétri. Elle est repiquée tous les mois. Pour la production de la laccase, le champignon est cultivé dans un milieu liquide contenant du maltose et du tartrate d'ammonium comme sources de carbone et d'azote, respectivement [88]. La composition de ce milieu est décrite dans le Tableau II.1. Six prélèvements de mycélium (10 mm de diamètre) sont inoculés stérilement dans un Erlenmeyer de 2 L contenant 500 mL de milieu de culture.

Tableau II.1: Composition du milieu de culture solide

Composition	Concentration (g/L)
Extrait de levure	5
Malt	20
Agar	15

Tableau II.2: Composition du milieu de culture liquide

Composition	Concentration (g/L)
Maltose	20
Sels:	
Tartrate d'ammonium	4
KH ₂ PO ₄	0,9
NaH ₂ PO ₄	0,18
Oligo-éléments :	
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,5
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,006
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,01
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,0005
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,005
Thiamine	0,00001
2,5-Xylidine	0,3 mM
2,2-diméthyl acide succinimide	20 mM

Les oligo-éléments, la thiamine, la 2,5-xylydine ainsi que l'acide succinimide ont été ajoutés stérilement par filtration sur un filtre de type Whatman de porosité 0,2 μm à la solution de maltose et de sels préalablement stérilisée en autoclave (121°C pendant 20 min).

La culture est réalisée sous agitation à 25°C dans l'obscurité pendant une semaine. Des aliquots sont prélevés toutes les 24 heures pour suivre l'évolution de la production de laccase.

II.1.2. Concentration du milieu de culture

Après une semaine de culture, l'activité du milieu de culture est de 8,5 U/mL (voir définition paragraphe II.5). Cette dernière est arrêtée. Après une première filtration du milieu de culture (400 mL) sur gaze pour éliminer le mycélium, 10 % (v/v) d'acétone à 4°C ont été ajoutés au milieu afin de précipiter les polysaccharides produits par les champignons. Des filtrations sous pression réduite successives sont ensuite effectuées sur des filtres (Amicon) de porosité décroissante (2,7 μm , 1,6 μm , 0,7 μm). Le milieu de culture est ensuite concentré dans une cellule d'ultrafiltration Amicon sur une membrane à base de cellulose Millipore (type YM 10) ayant un seuil de coupure de 10 kDa. L'ultrafiltration est réalisée sous pression à 1 bar d'azote et sous agitation magnétique douce afin d'éviter tout phénomène de colmatage de la membrane par formation à sa surface d'une couche de protéines. L'activité du filtrat est contrôlée tout au long de l'ultrafiltration afin de s'assurer que la cellule ne fuit pas. Une fois l'étape de concentration réalisée ($V_{\text{final}} = 10 \text{ mL}$), le retentat est dialysé dans la cellule d'ultrafiltration avec une solution tampon phosphate (20 mM) à pH 7. Ces conditions permettent d'optimiser la stabilité de la laccase. La solution est par la suite récupérée et la membrane lavée avec le tampon phosphate. La solution de lavage est rajoutée au retentat. Au final, on a 13 mL de surnageant de culture brut concentré à 200 U/mL soit un rendement de 76% que l'on conserve à 4°C avant de procéder aux étapes de purification par chromatographie.

II.1.3. Purification de la laccase

II.1.3.1. Chromatographie échangeuse d'ions

Après cette première étape de concentration et de dialyse, le surnageant de culture est purifié en utilisant une colonne échangeuse d'anions (Q Sepharose, Hiload 16/10, Pharmacia). Cette première étape de purification va permettre de séparer les différentes protéines selon leur état de charge global. La colonne utilisée est constituée d'une phase stationnaire (-

$\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) associée à des contre-ions. Les protéines chargées positivement, c'est-à-dire celles dont le point isoélectrique est supérieur au pH du tampon utilisé pour équilibrer la colonne, ne seront pas retenues sur celle-ci tandis que les protéines chargées négativement seront échangées contre les contre-ions et donc retenues sur la colonne. Un gradient de chlorure de sodium permettra dans un second temps de les élué. L'appareil de chromatographie utilisé est un Biologic Duoflow Bio Rad avec un collecteur de fraction Biologic Biofrac. La purification est programmée à l'aide du logiciel Biologic Duoflow. La détection en sortie de colonne se fait par détection UV à 280 nm et par mesure de conductivité électrique à l'aide d'un détecteur Biologic QuadTec UV-Vis Bio Rad. Le débit est maintenu constant à 1 mL/min. La colonne est dans un premier temps équilibrée avec une solution tampon phosphate citrate (CPB, 50 mM) de pH 5. Lorsque la fraction protéique non retenue a été éluée, un gradient de NaCl est programmé. Lorsque la totalité des protéines a été éluée, la colonne est à nouveau équilibrée avec du tampon CPB 50 mM pH 5.

La séparation a été réalisée en utilisant différents programmes afin d'optimiser sa qualité. Le chromatogramme suivant (Figure II.1) met en évidence la présence de plusieurs formes protéiques dans la solution préalablement concentrée. L'activité des différentes fractions est mesurée afin de vérifier la présence ou non de laccase.

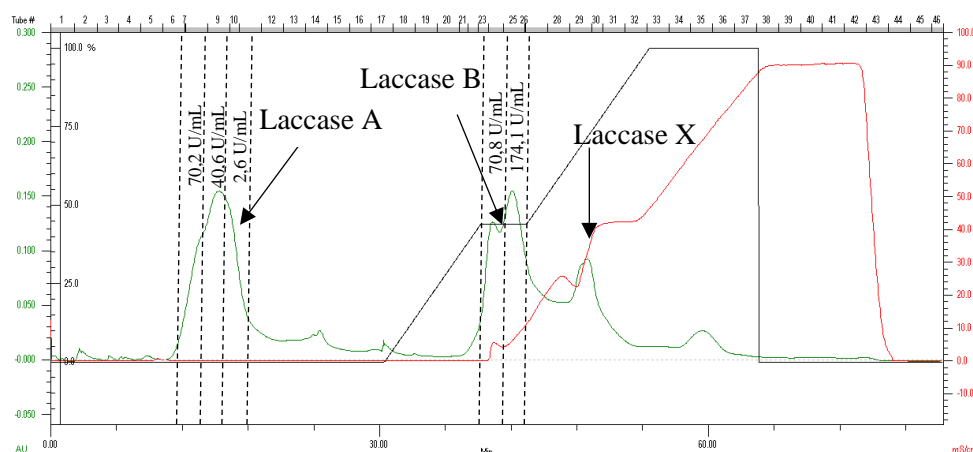


Figure II.1: Chromatogramme de la purification du surnageant de culture de *T. versicolor* par échange d'anion. En rouge la conductivité, en noir le % de tampon CPB + 1 M NaCl et en vert le spectre UV-visible à 280 nm de la phase mobile

Une première fraction protéique non retenue ayant une coloration jaunâtre (le premier pic) est éluée dans le tampon CPB pH 5 seul. Outre les protéines présentes dans le milieu de culture et dont le point isoélectrique est supérieur à 5, cette fraction contient de la laccase comme le montre la mesure de l'activité. Toutes les fractions correspondant à ce pic sont rassemblées, concentrées et ne seront pas purifiées plus avant. Ces fractions contiennent une forme de laccase notée A dont le point isoélectrique est estimé autour de 7, ce qui explique qu'elle ne soit pas retenue sur la colonne d'échange d'anions car sa charge globale est positive au pH de la phase mobile utilisée (pH 5). La laccase A est conservée dans du glycérol (15 % w/v) à -20°C. On a obtenu un rendement de 20 %. Le second massif de pics, élué à une concentration en NaCl d'environ 0,1 M contient également une laccase notée B. C'est cette isoforme de laccase (point isoélectrique égal à 3), dont la structure cristallographique a été résolue [28, 87], qui a été utilisée dans ce travail. La fraction est bleue, ce qui est un indice de l'efficacité de cette première étape de purification.

Les fractions contenant la laccase B sont rassemblées puis immédiatement dialysées dans un tampon phosphate citrate (50 mM) à pH 5 afin d'éviter la dénaturation de l'enzyme en présence des chlorures. Après dialyse, une étape de concentration dans une cellule d'ultrafiltration est réalisée. Finalement 5 mL de solution concentrée de laccase B avec une activité de 157,5 U/mL est obtenue soit un rendement de 30 %. On observe également qu'une troisième fraction de couleur jaune contenant de la laccase est éluée. Cette forme notée laccase X ne sera pas utilisée dans ce travail.

II.1.3.2. Chromatographie d'interaction hydrophobe

A l'issue de la première étape de purification par échange d'ions, les fractions contenant la laccase B ont été purifiées par chromatographie d'interaction hydrophobe (Hytrap Phenyl HP, 1 mL, Pharmacia). La colonne est équilibrée avec 5 mL de solution de sulfate d'ammonium (SA) à 30 % (w/v). 2 ou 3 mL de la solution contenant la laccase B diluée deux fois dans une solution de SA à 60 % sont déposés sur la colonne (la purification sur colonne d'interaction des 5 mL de laccase obtenus à l'issue de la purification par chromatographie d'échange d'anions a été réalisée en deux fois). Les protéines non retenues sont ensuite éluées avec 5 mL de SA à 30% puis la laccase B est éluée avec successivement 5 mL de SA à 20 % puis 5 mL de SA à 10%. L'activité des différentes fractions collectées en sortie de colonne est mesurée afin de

repérer les fractions contenant la laccase. La Figure II.2 montre les activités des différentes fractions récupérées.

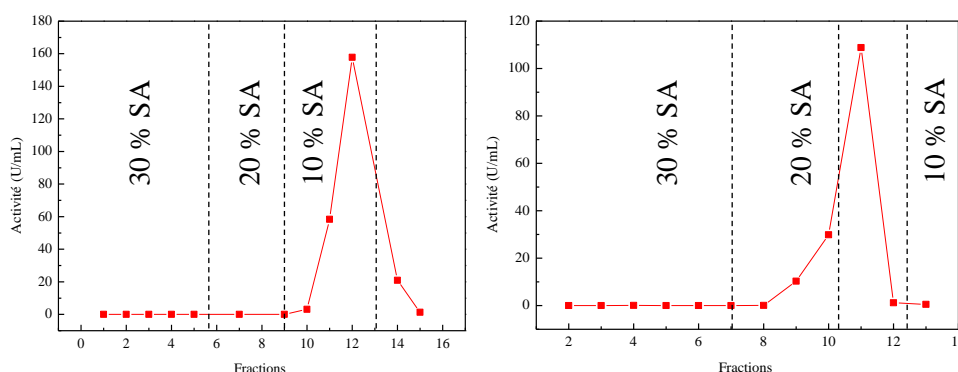


Figure II.2: Activité des fractions collectées à la sortie de la colonne de chromatographie d'interaction hydrophobe pour un volume de laccase introduit de 2 mL (à gauche) et 3 mL (à droite)

Une fois collectées, les solutions contenant l'enzyme sont regroupées, dialysées et concentrées dans un tampon phosphate citrate 50 mM à pH 5 afin d'éliminer le SA puis dans un tampon phosphate à pH 7 pour conservation à -20°C . Du glycérol 15 % (w/v) est ajouté aussi avant congélation de l'échantillon. Le résumé des quantités de laccase purifiées après chaque étape est donné dans le Tableau II.2. Le rendement est calculé par rapport au milieu de culture.

Tableau II.2: Récapitulatif des quantités de laccase produites et purifiées

Solution de laccase	Volume (mL)	Activité (U/mL)	Quantité de laccase (U)	Rendement (%)
Milieu de culture	400	8,5	3400	
Milieu de culture concentré (ultrafiltration)	13	200	2600	76
Purification de la laccase par chromatographie échangeuse d'ions				
Laccase A (pic 1)	20	51,1	1022,6	30
Laccase A concentrée et conditionnée	4,5	152,6	686,7	20
Laccase B (pic 2)	20	42,1	842	24,8
Laccase B concentrée puis dialysée dans tampon phosphate et conservée	5	157,5	787,7	30
Purification de la laccase par chromatographie hydrophobe				
Laccase B conditionnée	7,5	401,5	3011,3	

La perte d'activité de la laccase A entre l'étape d'éluion et celle de concentration/dialyse pourrait s'expliquer par le fait que quelques jours se sont écoulés entre l'étape de purification et l'étape de concentration ou par le fait qu'une portion de laccase a été perdue lors de l'étape de lavage de la membrane d'ultrafiltration. L'augmentation de l'activité de la laccase B après dialyse pourrait être expliquée par le fait que les ions chlorures qui inhibent l'activité de la laccase ont été retirés par ultrafiltration.

La solution de laccase B purifiée et concentrée est finalement analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide formé par réticulation d'un mélange d'acrylamide et de bis-acrylamide. Plus le pourcentage de ce dernier est élevé, plus la densité de chaînes sera élevée et plus les mailles du réseau seront serrées et en conséquence plus les protéines seront ralenties. Leur vitesse de déplacement sous l'effet d'un champ électrique dépend en effet à la fois de leur charge et de leur taille. On utilise un gel à 11,5 %, dont la composition est décrite dans le Tableau II.3. Un volume d'échantillon à 401,5 U/mL est déposé dans chaque puits. Les échantillons déposés ne contiennent pas de dodécyl sulfate de sodium (SDS) et n'ont pas subi de traitement thermique à 100°C afin de conserver intacte l'activité des protéines.

Tableau II.3: Composition des milieux pour la réalisation de l'électrophorèse

Gel de résolution (quantité pour une plaque) à 11,5 %	
Acryl acryl bis (solution commerciale à 40 %)	1,43 mL
Tampon A (Tris/HCl à 226,9 g/L, pH 8,9):	1 mL
Eau	2,48 mL
SDS 10 %	50 µL
PSA 10 % (persulfate d'ammonium)	37,5 µL
Temed	4 µL
Gel de stacking à 4 % (quantité pour une plaque)	
Acryl acryl bis	0,3 mL
Solution D (Tris/HCl 90 g/L, pH 6,8 ; SDS 10 %):	0,5 mL
Eau	
PSA 10 %	2,14 mL
Temed	60 µL
	4 µL

On a réalisé deux gels sur lesquels on a déposé les mêmes échantillons. Sur le premier gel, on révèle la présence de protéines après migration avec du nitrate d'argent tandis que l'activité

laccase est détectée sur le second par imprégnation dans une solution de guaïcol, un substrat de la laccase qui produit une quinone colorée en présence de laccase. (Figure II.3).

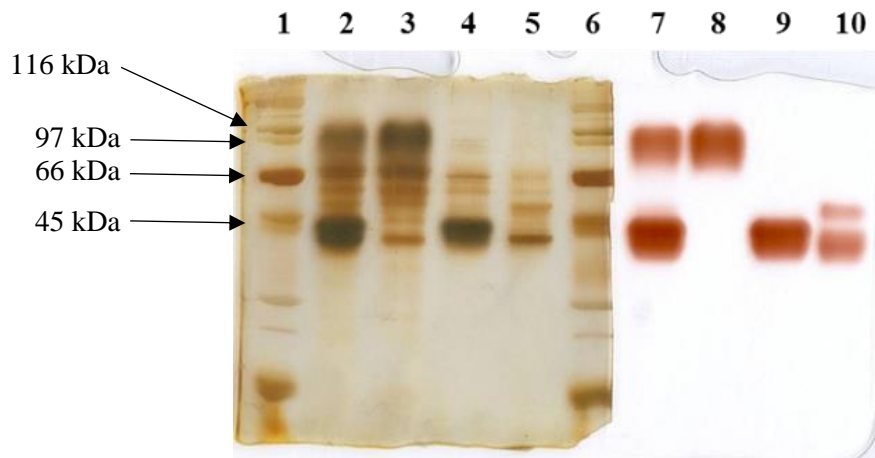


Figure II.3: Electrophorèse sur gel après révélation au nitrate d'argent (puits 1 à 6) et au guaïcol (puits 7 à 10)

Les puits 1 et 6 contiennent des marqueurs de masse moléculaire

Les puits 2 et 7 contiennent les surnageants de culture après concentration et dialyse

Les puits 3 et 8 contiennent la laccase A après échange d'anion

Les puits 4 et 9 contiennent la laccase B après échange d'anion

Les puits 5 et 10 contiennent la laccase X après échange d'anion

Les laccases A et B ont des masses moléculaires similaires de l'ordre de 60 kDa. Or on observe, et cette constatation est reportée également dans la littérature sans qu'il soit donné d'explication, que les laccases A et B migrent à des masses molaires différentes, respectivement 100 et 45 kDa. Il est à noter toutefois que lorsqu'on chauffe les échantillons à 100°C avant de les déposer sur le gel d'électrophorèse, les deux protéines migrent à la masse attendue, soit 60 kD. Cette « anomalie » de migration peut s'expliquer par le fait que le tampon de préparation de l'échantillon ne contient pas de SDS. La protéine migre donc non seulement en fonction de son poids moléculaire mais également de sa charge. Dans les conditions expérimentales utilisées ici, on observe que la protéine majoritaire du surnageant de culture (puits 2) est la laccase B. La fraction non retenue par chromatographie par échange d'ions contient majoritairement de la laccase A, ainsi que de nombreuses autres protéines. Par coloration au

guaïcol, on ne détecte pas la présence de laccase B. Le puits 4 contient la laccase B purifiée. On peut estimer la pureté de la laccase à au moins 95 % sur la base de l'intensité des bandes.

On a aussi essayé de produire sans réussite dans la levure *Yarrowia lipolytica* des laccases recombinantes mutées. Le protocole de production est décrit en annexe (Annexe 1).

II.1.4. Oxydation de la laccase

La laccase produite par *Trametes versicolor* est une protéine glycosylée. Ainsi 4 sites de glycosylation ont été révélés par la résolution de sa structure par cristallographie [28], alors que la séquence de la laccase comprend 7 sites putatifs de N-glycosylation (séquence Asn-X-sérine/thréonine). Les sucres présents sur ces sites de glycosylation sont susceptibles d'être oxydés en présence de periodate qui conduit à une coupure oxydante et à la formation de groupements aldéhyde (Figure II.4). Ce nouveau type de groupement fonctionnel sur la laccase permettra de l'immobiliser sous forme covalente par formation d'une base de Schiff avec une fonction amine du support de l'électrode (voir chapitres III et IV). Le protocole d'oxydation de la laccase s'effectue en deux temps. Dans un premier temps, on élimine le glycérol (qui permet de conserver l'enzyme mais serait oxydé par le periodate au détriment de l'enzyme) par chromatographie d'exclusion sur une colonne PD10 (Millipore) avec une phase mobile constituée de tampon de phosphate 50 mM pH 7. On dépose à la surface de la colonne un volume (V) de laccase égal à environ 1 mL. Après avoir collecté les fractions d'élution, on mesure l'activité pour déterminer les fractions contenant la laccase purifiée.

La seconde étape consiste à oxyder les fractions étudiées contenant la laccase en présence de 200 μ L de periodate de sodium 0,1 M (NaIO_4) durant 30 minutes à l'obscurité sous agitation continue. La solution est ensuite purifiée par chromatographie d'exclusion (même protocole que la première étape) afin d'éliminer le periodate de sodium. La laccase ainsi oxydée est concentrée par ultrafiltration. Le rendement obtenu est de 24 %.

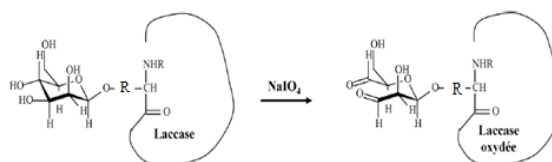


Figure II.4: Schéma du mécanisme d'oxydation des sucres de la laccase par du periodate de sodium

II.2.Elaboration des électrodes

Les électrodes utilisées dans ce travail ont été préparées à partir de tiges de graphite spectrographique commerciales (Mersen, France) de diamètre 0,7 cm. Dans un premier temps, la tige de graphite est découpée en disques de 0,2 cm d'épaisseur à l'aide d'une scie mécanique. Chaque disque est ensuite abrasé avec du papier de verre P80 durant 1 minute afin d'uniformiser sa surface (le découpage à la scie conduit à des rugosités différentes d'un disque à l'autre). Chaque disque est par la suite plongé dans une solution d'éthanol puis soumis aux ultrasons pendant 5 minutes afin de laver la surface et enfin séché à l'azote. Le disque de graphite ainsi préparé sera ensuite fonctionnalisé soit par dépôt d'un film mince de nitrure de carbone amorphe (voir chapitre III) soit nanostructuré par le dépôt de nanowalls de carbone produits par une méthode plasma sous vide. Le graphite nanostructuré sera dans ce cas fonctionnalisé à l'aide d'un procédé plasma à la pression atmosphérique (voir chapitre IV). Une fois la fonctionnalisation effectuée, le disque est monté en électrode. Pour cela, on découpe tout d'abord à l'aide d'une scie mécanique une plaque de verre à microscope de 0,8 cm de largeur et 5 cm de longueur. Ensuite, on colle une bande de scotch de cuivre sur toute la longueur d'une face du verre. On dépose ensuite une goutte d'alliage indium-gallium liquide à température ambiante sur une extrémité de la bande de scotch afin d'assurer un bon contact électrique au niveau de la jonction avec le disque de graphite déposé à son aplomb. On isole électriquement la périphérie du disque de graphite ainsi que la quasi-totalité de la bande de scotch de cuivre à l'aide d'une résine époxy à prise rapide (RS) afin d'assurer l'étanchéité de l'électrode de graphite (Figure II.5). On veille à ne pas recouvrir l'extrémité de la bande de scotch de cuivre opposée à celle portant le disque de graphite car elle servira à prendre le contact avec le potentiostat à l'aide d'une pince.

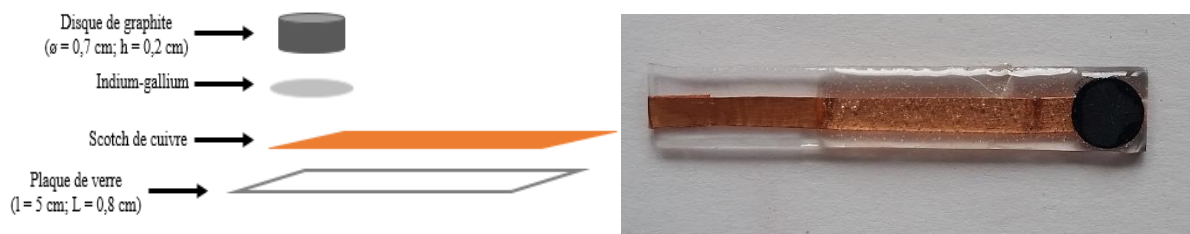


Figure II.5: Electrode de graphite

II.3. Immobilisation de la laccase

II.3.1. Immobilisation covalente de la laccase sur l'électrode

II.3.1.1. Formation d'une liaison amide

Deux protocoles ont été utilisés pour immobiliser la laccase sur la surface des électrodes par formation d'une liaison amide, selon le type de groupement fonctionnel présent à la surface.

Dans le cas d'une électrode fonctionnalisée avec des groupements carboxyliques, celle-ci est dans un premier temps activée en déposant une goutte d'un mélange de N-hydroxysuccinimide (NHS, 5 mM) et de 1-Ethyl-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC, 5 mM) durant 20 minutes sous cloche. La goutte d'EDC-NHS est ensuite retirée puis on rajoute entre 10 μL et 15 μL de laccase contenant 2 U/mL (oxydée ou non) à la surface du graphite. Ce mélange est maintenu sur l'électrode durant 2 heures à température ambiante et sous cloche afin de former la liaison amide entre l'enzyme et la surface de l'électrode (Figure II.6).

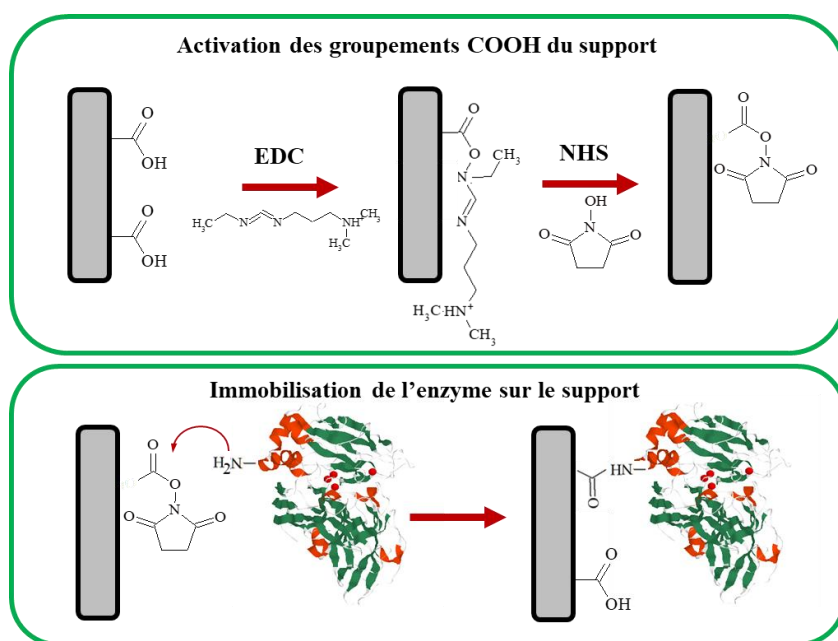


Figure II.6: Schéma du mécanisme d'immobilisation covalente de la laccase en présence d'EDC-NHS sur du graphite fonctionnalisé avec des groupements carboxyliques

Pour rappel, la laccase de *Trametes versicolor* renferme cinq lysines (Figure II.7). La chaîne latérale de ces lysines renferme des amines permettant l'immobilisation de la laccase.

On lave ensuite l'électrode dans 10 mL de solution de tampon phosphate 50 mM à pH 7 pendant 30 minutes sous agitation afin d'éliminer les enzymes non liées de manière covalente à l'électrode. Ce lavage est répété trois fois (à chaque lavage, la solution tampon est renouvelée et on vérifie que l'activité enzymatique est nulle dans le surnageant après le dernier rinçage). L'électrode est finalement conservée dans une solution tampon de phosphate 50 mM (pH 7) à 4°C pour une utilisation ultérieure.

Dans le cas d'une surface contenant des groupements amines, on active tout d'abord les groupements carboxyliques de la laccase et par la suite on dépose durant 2 heures sous cloche à température ambiante le mélange EDC-NHS/enzyme à la surface de l'électrode. On a la formation d'une liaison amide entre les 45 acides aspartiques et glutamiques dont la chaîne latérale contient des groupements carboxyliques activés et les amines du support. Ces acides aminés sont répartis sur l'ensemble de la structure de l'enzyme. On a ainsi un site d'accrochage plus aléatoire lors de son immobilisation à la surface du support que dans le cas où la laccase est immobilisée via ses résidus lysines.

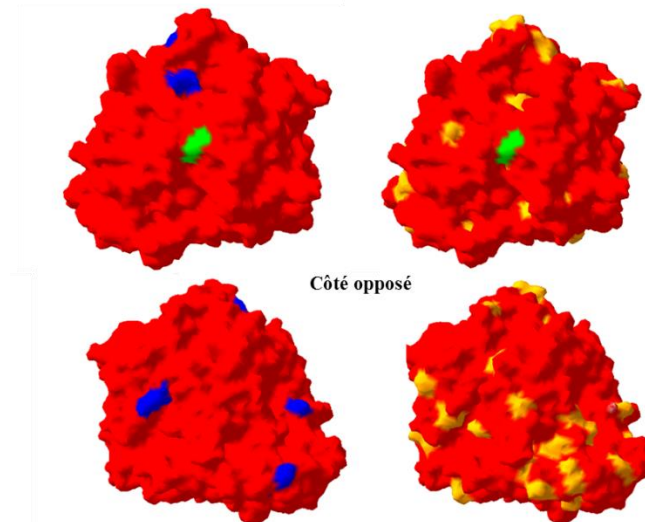


Figure II.7: Schéma représentant les lysines (en bleu) et les acides aspartiques et glutamiques (en jaune) de la laccase B de *T. versicolor*. En vert la xylydine substrat lié au cuivre T1

II.3.1.2. Formation d'une liaison imine

Dans le cas de la laccase oxydée, on dépose directement l'enzyme (2 U/mL) sur l'électrode fonctionnalisée avec des groupements amine. Une liaison imine (Figure II.8) se forme entre les groupements aldéhyde de la laccase et les groupements amine présents à la surface de

l'électrode. L'électrode est ensuite rincée suivant le même protocole que pour la formation des liaisons amides. La laccase renferme quatre sites de glycosylation mis en évidence par l'étude cristallographique (Figure II.9).

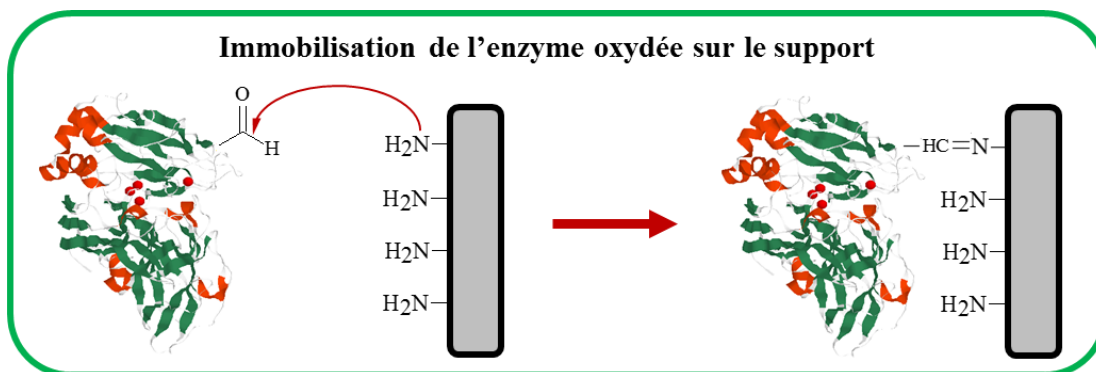


Figure II.8: Schéma du mécanisme d'immobilisation covalente de la laccase oxydée sur du graphite fonctionnalisé avec des groupements amines

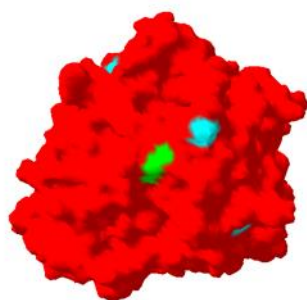


Figure II.9: Schéma représentant les sites de glycosylation (en azur) de la laccase B de *T. versicolor*. En vert la xylidine substrat lié au cuivre T1

II.3.2. Immobilisation par adsorption

Un volume compris entre 10 et 15 μL de laccase contenant 2 U/mL est déposé à la surface de l'électrode. Ce volume est maintenu sur l'électrode durant 2 heures à température ambiante et sous cloche. L'électrode est ensuite lavée trois fois durant 30 minutes dans une solution tampon de phosphate pH 7.

Dans le cas de l'immobilisation de la laccase naturelle, en présence d'une surface contenant des groupements amines, à pH 7 ces derniers sont chargés positivement tandis que les groupements carboxyliques de la laccase sont chargés négativement. On a ainsi majoritairement

des interactions favorables. Si la surface est fonctionnalisée par des groupements carboxyliques, les interactions électrostatiques sont défavorables entre les COO^- de surface du support et l'enzyme chargée négativement.

II.4. Mesure de la surface électroactive de l'électrode de graphite

II.4.1. Principe

La surface électroactive de l'électrode est déterminée en étudiant le comportement électrochimique du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ par voltampérométrie cyclique à différentes vitesses de balayage en utilisant la relation de Randles-Sevcik :

$$i_p = (2,69 \times 10^5) \times \alpha^{1/2} \times n^{3/2} \times S \times D^{1/2} \times C \times v^{1/2}$$

i_p : courant de pic anodique ou cathodique (en ampère (A))

α : coefficient de transfert de charge (considéré égal à 0,5)

n : nombre d'électrons échangés au cours de la réaction, $n = 1$ pour le couple ferricyanure/ferrocyanure

S : surface électroactive de l'électrode (en cm^2)

D : coefficient de diffusion du ferricyanure, $D = 6,32 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$

C : concentration de l'espèce électroactive (en mol/cm^3)

v : vitesse de balayage (en V/s)

La valeur de la surface électroactive S est calculée à partir de la pente de la droite $i_p = f(v^{1/2})$

II.4.2. Protocole expérimental

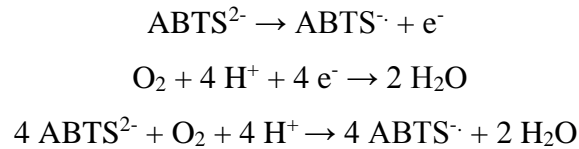
On détermine la surface électroactive de l'électrode de graphite en étudiant le comportement électrochimique du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 5 mM dans du KCl 0,1 M par voltampérométrie cyclique entre -0,5 V/ECS et 0,6 V/ECS à différentes vitesses de balayage ($20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $30 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $60 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ et $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$).

II.5. Mesure de l'activité enzymatique de la laccase

II.5.1. Principe

L'activité enzymatique (A) d'une solution d'enzyme est calculée par rapport à un substrat donné. Elle est exprimée en unité U/mL d'enzyme, sachant que U est le nombre de μmoles de substrat transformé par minute par l'enzyme ($\mu\text{mole}/\text{min}$). Le substrat de référence utilisé pour

déterminer l'activité enzymatique de la laccase est l'acide 2, 2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS). L'ABTS²⁻ est un composé incolore, mais son oxydation (par la laccase) en un radical stable provoque l'apparition d'une coloration verte permettant ainsi d'effectuer des mesures de spectrophotométrie UV-visible à 420 nm. Les réactions mises en jeu sont :



En mesurant l'absorbance en fonction du temps, nous pouvons déterminer la vitesse de formation du radical et donc par conséquent déterminer l'activité enzymatique de la laccase. En effet, d'après la loi de Beer-Lambert :

$$DO = \varepsilon l C$$

$$\leftrightarrow DO = \frac{\varepsilon \times l \times n}{V} \leftrightarrow n = \frac{DO \times V}{\varepsilon \times l} \leftrightarrow \frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta DO}{\Delta t} \times \frac{V}{\varepsilon \times l}$$

$$\rightarrow A = \frac{\Delta n}{\Delta t} = \left[\frac{\Delta DO}{\Delta t} \times \frac{V}{\varepsilon \times l} \right] \times \frac{1}{V_{\text{laccase}}}$$

DO: l'absorbance

A : activité enzymatique (en U/mL)

ε : 36 000 (en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) à 420 nm

C : concentration (en M) du radical ABTS^{·-}

n : nombre de moles de radical ABTS^{·-} formé (en mole)

V : volume de la solution analysée par UV-visible (en mL)

V_{laccase} : volume de laccase introduit dans la cuve (mL)

l : longueur trajet optique dans la cuve de spectrophotométrie = 1 cm

II.5.2. Protocole de mesure de l'activité enzymatique de la laccase

-Mesure de l'activité de la laccase en solution

Dans une cuve préalablement chauffée à 30 °C sont introduits (la cuve est aussi chauffée au cours de la mesure) :

-940 μL de tampon citrate/phosphate 50 mM (pH 3) préalablement saturé en oxygène par bullage d'air

-50 μL d'une solution d'ABTS à 20 mM

-10 μL de solution de laccase

D'après l'équation ci-dessous, l'activité totale de la laccase se calcule à partir de la pente de la droite $\text{DO} = f(t)$ selon l'équation ci-dessous.

$$A_{\text{totale}} = 2,77 \times \frac{\Delta\text{DO}}{\Delta t} \text{ (U/mL)}$$

-Mesure de l'activité de la laccase immobilisée à la surface de l'électrode de graphite

L'électrode est plongée dans une cuve de 3 mL préalablement chauffée à 30°C contenant 150 μL d'ABTS 20 mM ($V = 150 \mu\text{L}$) et un volume (2,85 mL) de tampon phosphate citrate 50 mM (pH 3) saturé en oxygène. La solution tampon a été préalablement aérée durant 15 minutes. L'activité de la laccase greffée à la surface de l'électrode se déduit de l'équation ci-dessous :

$$A = 0,083 \times \frac{\Delta\text{DO}}{\Delta t} \text{ (U)}$$

II.6. Mesure du courant biocatalytique

Le courant de réduction de l'oxygène est mesuré par voltampérométrie cyclique grâce à un balayage (aller-retour) du potentiel entre 0,9 V/ECS et -0,3 V/ECS dans un tampon acétate 50 mM, pH 4,2. Deux mesures sont systématiquement effectuées : une première mesure après avoir dégazé durant 15 minutes la solution avec de l'azote et ce afin de déterminer le courant capacitif. Une deuxième mesure après avoir oxygéné sous O_2 la solution durant 40 min et ce afin de déterminer le courant total (le courant faradique dû à la réduction d'oxygène biocatalysée et le courant capacitif). Les valeurs de courants de réduction biocatalysée du dioxygène ont été déterminées à un potentiel égal à 0,2 V/ECS, après soustraction du courant capacitif mesuré au même potentiel. Le montage est constitué d'une contre-électrode en platine, d'une électrode de référence au calomel saturée (ECS) et de l'électrode de travail testée. L'appareil de mesure utilisé est un potentiostat VSP (Bio-logic).

II.7. Caractérisation de la surface de l'électrode

II.7.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

L'appareil utilisé pour observer les surfaces des électrodes est le modèle Ultra 55 de ZEISS équipé de l'analyse élémentaire par spectrométrie de rayons X (EDS). La surface des électrodes n'a pas été métallisée. Elles ont été directement introduites dans la chambre.

II.7.2. Spectrométrie photoélectronique à rayons X (XPS)

Le principe de l’XPS repose sur la mesure de l’énergie cinétique des électrons de cœur émis par un matériau sous l’impact d’un faisceau monochromatique de photons X d’énergie $h\nu$. Connaissant l’énergie cinétique, il est possible de calculer l’énergie de liaison des électrons et ainsi d’accéder à la composition chimique de la surface du matériau. L’appareil XPS utilisé est un Physical Electronics Type 5600. Les spectres ont été collectés en utilisant un spectrophotomètre photo-électronique à rayons X de type Omicron (ESCA+). Les énergies de liaison sont calibrées par rapport au pic du carbone C1s (énergie de liaison égale à 284,6 eV). L’ensemble des spectres a été décomposé en utilisant le logiciel Casa XPS. Les analyses XPS ont permis de calculer le taux de recouvrement de la laccase sur l’électrode et de quantifier les groupements fonctionnels (groupements carboxyliques, amines et aldéhydes) à la surface du graphite. L’expression de la dérivé de l’intensité du signal XPS est la suivante (Equation II.1) :

$$dI = \phi \cdot n \cdot \left(\frac{A}{\cos\theta} \right) \cdot dz \cdot \sigma \cdot \Omega \cdot \exp\left(-\frac{z}{\lambda \cos\theta}\right) \cdot T(E_C) \quad (\text{Eq II.1})$$

De cette équation découlent plusieurs expressions qui font intervenir l’épaisseur de la couche étudiée. Dans le cas où l’on est en présence d’une couche semi-infinie non recouverte (Figure II.10) (par exemple une électrode de graphite d’épaisseur infinie non recouverte par l’enzyme), on intègre l’Equation II.1 entre zéro et l’infini ce qui conduit à l’expression suivante de l’intensité (Equation II.2).

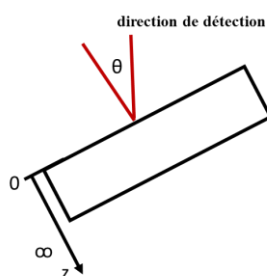


Figure II.10: Couche semi-infinie non recouverte

$$I(\infty) = \phi \cdot n \cdot \left(\frac{A}{\cos\theta} \right) \cdot \sigma \cdot \Omega \cdot T(E_C) \cdot \lambda \cdot \cos\theta \quad (\text{Eq II.2})$$

Dans le cas où une couche finie d'épaisseur d recouvre une couche semi-infinie (Figure II.11) (une électrode de graphite recouverte d'enzyme), l'intensité d'un élément contenu dans la couche d'épaisseur d est obtenue en intégrant l'Equation II.1 entre zéro et d . (Equation II.3) :

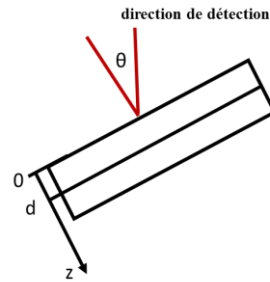


Figure II.11: Couche finie d'épaisseur d

$$I(d) = \phi.n. \left(\frac{A}{\cos\theta} \right) . \sigma . \Omega . T(E_C) . \lambda . \cos\theta . \left(1 - \exp\left(-\frac{d}{\lambda \cos\theta}\right) \right) \text{ (Eq II.3)}$$

Dans le cas où une couche d'épaisseur semi-infinie est recouverte d'une couche d'épaisseur d (Figure II.12), l'intensité d'un élément de la couche d'épaisseur semi-infinie par la couche d'épaisseur d est obtenue en intégrant l'Equation II.1 entre d et l'infini (Equation II.4).

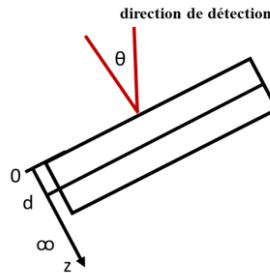


Figure II.12: Couche semi-infinie sous une couche d'épaisseur d

$$I(d-\infty) = \phi.n. \left(\frac{A}{\cos\theta} \right) . \sigma . \Omega . T(E_C) . \lambda . \cos\theta . \exp\left(-\frac{d}{\lambda \cos\theta}\right) \text{ (Eq II.4)}$$

$T(E_c)$: facteur de sensibilité de l'appareil

λ : chemin parcouru par les électrons du composé étudié à travers une couche

α : section efficace de l'élément considéré

Θ : angle entre le faisceau incident de détection et le faisceau réfléchi ($\cos\theta$ est égal à 0,7)

Chapitre III.Elaboration d'une cathode graphite/a- CN_x/laccase : effet de l'orientation de la laccase immobilisée

Dans ce chapitre, la surface d'une électrode de graphite a été recouverte par un film mince de nitrure de carbone amorphe (a-CN_x) potentiellement très lisse (rugosité RMS < 1 nm) ayant l'avantage de surcroît de présenter à l'état natif des groupements amines en surface qui sont nécessaires pour certains modes de greffage enzymatique. Ce type de matériau apparaît donc adapté pour la conception d'électrodes planes de biopiles dédiées à des techniques d'analyse non applicables ou difficilement exploitables sur des électrodes constituées de matériaux nanostructurés. Il semble donc plus pertinent pour la réalisation d'études fondamentales, et ce non seulement du fait de la présence de groupements fonctionnels intrinsèques de surface, mais aussi en raison d'un domaine étendu d'électroactivité. Au cours de ce chapitre, ce matériau sera utilisé comme support pour étudier l'influence de l'orientation de la laccase greffée sur son comportement bioélectrocatalytique vis-à-vis de la réduction de l'oxygène par transfert électronique direct.

III.1. Matériels et méthodes

Des électrodes graphite/a-CN_x ont été préparées par dépôt d'un film de nitrure de carbone amorphe sur une électrode de graphite élaborée selon le protocole décrit dans la section II.2. Elles ont ensuite été caractérisées par voltampérométrie cyclique, chronoampérométrie et spectroscopie UV-visible afin d'évaluer les performances bioélectrocatalytiques des enzymes greffées, puis par XPS, AFM et MEB afin de caractériser la topologie et la composition élémentaire de la surface des biocathodes, et enfin par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) afin de mieux comprendre l'influence des enzymes et de leur orientation sur la cinétique de l'ORR (Oxygen Reduction Reaction). On ne détaillera ici que les protocoles de revêtement du graphite par le nitrure de carbone amorphe, de chronoampérométrie, de spectroscopie d'impédance électrochimique et de microscopie à force atomique. Les autres méthodes de caractérisation ont déjà été décrites dans le chapitre II.

III.1.1. Elaboration de la biocathode : dépôt d'une couche mince de nitrure de carbone amorphe (a-CN_x) par pulvérisation cathodique réactive magnétron

Le nitrure de carbone amorphe est déposé par pulvérisation cathodique réactive magnétron. Avant de détailler le protocole utilisé pour déposer ce film, nous allons tout d'abord décrire brièvement le principe de cette méthode. La pulvérisation cathodique réactive magnétron est une méthode de dépôt de couches minces sous vide utilisant un plasma [79]. Le matériau de

départ est issu de la cathode (la cible) chargée négativement (dans notre cas, il s'agit d'une cathode de graphite) et le substrat est quant à lui positionné à l'anode. Le plasma arrache des atomes de carbone de la cible. On forme alors des clusters de carbone qui vont réagir avec l'azote du mélange de gaz plasmagène Ar/N₂ puis se déposer sur le substrat sous forme de couches minces d'a-CN_x dont la simple exposition à l'air conduit à l'amination de leur surface.

Le réacteur utilisé pour le dépôt d'a-CN_x à la surface de nos électrodes de graphite est le modèle MP 300S de PLASSYS S.A. Le dépôt s'effectue en plusieurs étapes. Le disque de graphite est tout d'abord fixé au centre d'un porte-échantillon afin d'avoir un dépôt homogène. L'ensemble est par la suite introduit dans la chambre de dépôt via un sas afin de maintenir constamment l'enceinte de dépôt sous ultravide. La pression au sein du sas est de 4,2 mTorr au maximum [80]. La pression dans la chambre de dépôt est maintenue à une valeur égale à 1 Pa pendant la phase de dépôt. Elle est alimentée en argon et en azote ($P(N_2)/P_{tot} = 0,03$). A l'intérieur de la chambre, la surface du graphite est décapée à l'aide d'un plasma Ar/N₂ dans une étape préliminaire (plasma etching) afin d'enlever la couche d'oxyde puis une couche mince d'a-CN_x est déposée à la surface. Des groupements carboxyliques de surface sur la couche d'a-CN_x ont été créés en effectuant un traitement anodique par chronopotentiométrie selon le protocole utilisé par Madeiros *et al.* [89]. Ce type d'électrode sera noté graphite/a-CN_x AT. Pour cela, l'électrode est polarisée dans une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium à 0,1 M durant une minute en appliquant une densité de courant de 3 mA/cm². Pour rappel, les mesures électrochimiques sont effectuées en utilisant une électrode au calomel saturée en tant qu'électrode de référence, ainsi qu'une grille de platine comme contre-électrode.

III.1.2.Mesure de la stabilité de la biocathode par chronoampérométrie

La stabilité de l'activité biocatalytique de la laccase immobilisée sur l'électrode graphite/a-CN_x selon les protocoles décrits dans le chapitre II a été étudiée par chronoampérométrie sur une durée de 24 heures. Le montage électrochimique est le même que pour les mesures de voltampérométrie cyclique : la biocathode est plongée dans une solution aqueuse de tampon acétate (50 mM) pH 4,2. Le milieu est tout d'abord saturé en oxygène par bullage d'O₂ (Annexe 2). Durant l'acquisition du chronoampérogramme, une couverture d'oxygène est maintenue au-dessus de la solution afin de garder une concentration constante en oxygène dans le milieu. Les mesures de courants de palier de l'ORR sont effectuées à un potentiel égal à 0,2 V/ECS pour

lequel le courant atteint précisément la valeur du courant de palier. Précisons que les densités de courant rapportées dans la littérature sont souvent mesurées à ce potentiel [42].

III.1.3. Caractérisation de la surface de la biocathode par AFM

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique qui permet de cartographier la topographie de surface d'un matériau, biologique ou autre, avec une résolution nanométrique voir atomique sous certaines conditions [79] pourvu que sa rugosité le permette. Il s'agit d'une méthode non destructrice. Cette technique est basée sur l'interaction entre une sonde se comportant comme un capteur de force et la surface d'un matériau. Le principe de l'AFM repose sur la mesure ou l'exploitation des différentes forces d'interaction (force de répulsion, force d'attraction) entre les atomes de la surface du matériau à analyser et les atomes de l'apex de la pointe AFM. Cette dernière est souvent constituée de nitrure de silicium (Si_3N_4) et possède une forme pyramidale. Elle est positionnée à l'extrémité d'une face d'un micro-levier flexible, ou cantilever, de raideur donnée. L'ensemble pointe-cantilever forme la sonde AFM capable de se déplacer dans les trois directions (x, y et z) de l'espace. Le matériau à analyser est immobilisé quant à lui sur un porte-échantillon. Lorsque l'échantillon est approché de la pointe, les forces d'interaction pointe-échantillon provoquent la déflexion du cantilever. Le contact est établi lorsque cette dernière atteint la valeur de consigne fixée par l'expérimentateur. Un faisceau laser réfléchi par la face arrière métallisée du cantilever vers une photodiode composée de quatre quadrants permet de mesurer cette déflexion. On peut citer les trois modes de fonctionnement de l'AFM :

- le mode contact où la pointe est en contact permanent avec la surface de l'échantillon pendant l'imagerie,
- le mode non-contact où la pointe subit continuellement à distance les forces d'attraction de la surface,
- le mode tapping où le contact entre la pointe et la surface est intermittent en raison du placement du levier en situation d'oscillation à une fréquence bien déterminée grâce à une excitation d'origine acoustique.

L'AFM étant une technique d'imagerie de très haute résolution, elle est mal adaptée aux surfaces fortement rugueuses, c'est pourquoi nous avons opté pour l'utilisation du silicium dopé au bore comme substrat de départ car il a la particularité d'avoir une surface lisse (RMS (Root

Mean Square) < 1 nm). Les mêmes protocoles ont été utilisés pour déposer le film d'a-CN_x sur Si (silicium) dopé B (bore) et le graphite et pour immobiliser la laccase à la surface des électrodes graphite/a-CN_x et Si/a-CN_x. L'appareil AFM utilisé est le modèle Molecular Imaging (base Pico SPM-LE). Il est constitué d'un nez AFM adapté au mode de fonctionnement envisagé, d'un scanner et d'un contrôleur (Picoscan SPM 2100). L'ensemble est dirigé par le logiciel Picoscan 5.3.2. Cet équipement AFM est également accompagné d'une caméra gérée par ordinateur qui facilite les étapes de positionnement de la sonde AFM au-dessus de l'échantillon. Elle permet aussi de vérifier le réglage du laser en s'assurant que le faisceau du laser tape sur l'extrémité du cantilever.

III.1.4. La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

La spectroscopie d'impédance électrochimique permet d'étudier les phénomènes électrochimiques se déroulant à l'interface électrolyte/électrode [90]. Le principe de l'impédance électrochimique est d'imposer un potentiel $\Delta E(t)$ (perturbation sinusoïdale) de faible amplitude (afin de conserver la réponse linéaire du système) superposé à un potentiel constant E , et d'enregistrer la réponse en courant du système (Figure III.1). Inversement, un courant $\Delta I(t)$ variant de façon sinusoïdale en fonction du temps peut être imposé au courant I_0 et le potentiel enregistré. La réponse ainsi obtenue est fonction de la fréquence du signal d'excitation appliquée au courant (impédance galvano-statique) ou au potentiel (impédance potention-statique).

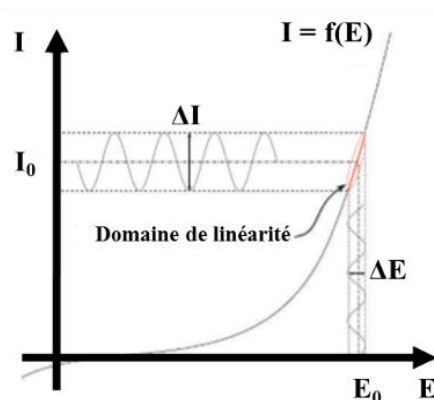


Figure III.1: Schéma d'un système électrochimique non linéaire soumis à une perturbation sinusoïdale

La perturbation imposée étant sinusoïdale (potentiel ou courant), elle est donc de la forme $x(t)=A.\sin(\omega t)$ et la réponse mesurée du système est $y(t)=B.\sin(\omega t+\phi)$ avec une fréquence f , une pulsation $\omega=2\pi f$ et un déphasage ϕ . L'impédance électrochimique est un nombre complexe noté $Z(\omega)$ qui a pour expression (Equation III.1) :

$$Z(\omega)=\frac{\Delta E(\omega)}{\Delta I(\omega)}=Z_r(\omega)+jZ_j(\omega)=|Z|e^{j\phi}=|Z|(\cos\phi+j\sin\phi) \text{ (Eq III.1)}$$

$j^2 = -1$, Z_r est la partie réelle, Z_j la partie imaginaire de l'impédance, $|Z|$ son module et ϕ la phase. $\Delta E(\omega)$ et $\Delta I(\omega)$ correspondent aux transformées de Fourier des grandeurs $\Delta E(t)$ et $\Delta I(t)$ respectivement.

Les données d'impédance peuvent être représentées en coordonnées cartésiennes par leur partie imaginaire en fonction de leur partie réelle, ce qui conduit à des graphes appelés diagrammes de Nyquist. Ces derniers sont le plus souvent utilisés en tant que première représentation des résultats. Ils permettent d'avoir une première analyse qualitative du système. Les données d'impédance peuvent aussi être représentées en coordonnées logarithmiques par leur module et leur phase en fonction de la fréquence (diagramme de Bode). Cette représentation permet d'avoir une visualisation complète des résultats d'impédance sur tout le domaine de fréquence (Figure III.2).

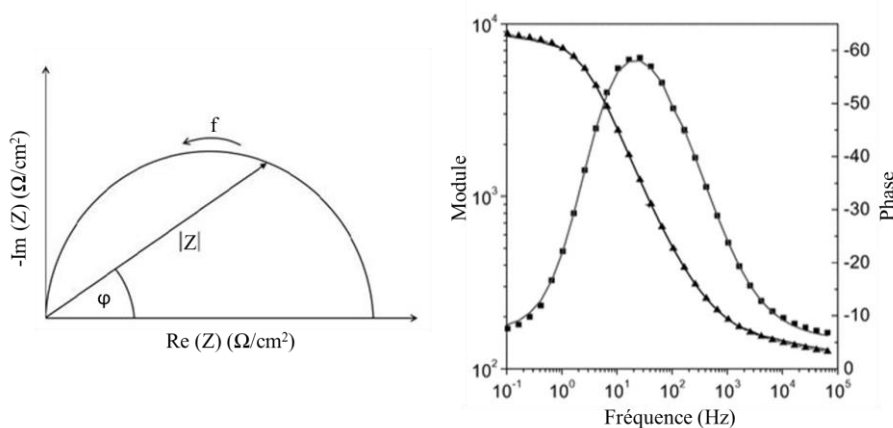


Figure III.2: A gauche diagramme de Nyquist et à droite diagramme de Bode

Les différents processus ayant lieu à l'interface électrode/électrolyte peuvent être modélisés en ayant recours à des composants électriques élémentaires (résistance, condensateur, etc...). Le circuit électrique formé par l'association de ces éléments et représentant le système

électrochimique est appelé circuit électrique équivalent. A titre d'exemple, il faut citer le circuit de Randles, composé d'une résistance d'électrolyte, d'une résistance de transfert de charge, d'une impédance de Warburg, et d'un CPE (constant phase element), qui est l'un des tout premiers utilisés. Il est impératif que les éléments constituant le circuit proposé aient un sens physique et puissent être associés à un processus chimique ou électrochimique précis se produisant effectivement au sein du système étudié. Par ailleurs, un spectre obtenu expérimentalement peut souvent être ajusté à l'aide de plusieurs circuits équivalents et il convient alors de sélectionner le plus pertinent.

Lors de la mise en contact d'une électrode et d'un électrolyte, plusieurs phénomènes dépendant du potentiel peuvent avoir lieu. Les variations de potentiel et de courant dans l'électrolyte conduisent à une chute ohmique décrite comme étant une résistance d'électrolyte R_e . Un autre phénomène observé à l'interface électrode/électrolyte est celui de la formation d'une double couche d'ions. L'application d'une perturbation sinusoïdale lors de la mesure d'impédance entraîne la charge et la décharge de cette couche qui se comporte alors comme un condensateur électrique. L'impédance d'un condensateur de capacité C a pour expression $Z(\omega) = \frac{1}{jC\omega}$. La capacité est souvent remplacée par un CPE (constant phase element) de manière à rectifier les déviations qui peuvent être dues à une inhomogénéité de surfaces telle qu'une rugosité. Il peut aussi se produire des processus faradiques. Deux cas sont à prendre en considération. Soit la cinétique de réaction est strictement contrôlée par le transfert de charge, et dans ce cas, l'impédance comprendra une contribution de R_{tc} (R_{tc} représente la résistance de transfert de charges), soit la cinétique est contrôlée par la diffusion, et il faut alors prendre en compte en plus les variations de concentrations des espèces électroactives. L'impédance de diffusion est appelée impédance de Warburg. Signalons ici que certains phénomènes électrochimiques conduisent à des spectres d'impédance qui ne peuvent être ajustés à l'aide de circuits électriques équivalents. Dans ce cas, des modèles analytiques fondés sur un jeu d'équations peuvent être utilisés.

Les mesures électrochimiques sont réalisées à l'aide du potentiostat Bio-Logic modèle VSP. Une électrode de platine a été connectée en parallèle de l'électrode de référence (ECS) afin d'éviter tout artéfact en haute fréquence dû à l'électrode de référence. Les expériences d'impédance sont réalisées dans le même milieu (tampon acétate 50 mM pH 4,2 dans 0,1 M

NaClO₄) que les expériences de chronoampérométrie et de voltampérométrie cyclique (saturé en oxygène). Les diagrammes d'impédance électrochimique sont tracés dans un domaine de fréquence compris entre 10⁵ Hz et 10⁻² Hz à un potentiel égal à 0,6 V/ECS, avec 10 points par décade et une amplitude crête-crête de 10 mV. Dans ce travail, l'ajustement des spectres d'impédance obtenus expérimentalement a été réalisé à l'aide du logiciel Simad développé au sein du LISE.

III.2.Résultats et discussion

III.2.1.Caractérisation morphologique et chimique de la couche d'a-CN_x avant et après traitement anodique

Avant d'évaluer les performances des biocathodes, les électrodes de graphite, graphite/a-CN_x et graphite/a-CN_x AT ont tout d'abord été caractérisées par MEB (Figure III.3). La structure du graphite s'organise sous forme d'un empilement de feuillets (Figure III.3A). On constate que le graphite possède une structure éclatée, ce qui lui confère une surface spécifique supérieure à la surface géométrique. L'étude du comportement électrochimique du couple (Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻) sur l'électrode de graphite par voltampérométrie cyclique à différentes vitesses de balayage montre que la surface électroactive obtenue en utilisant la relation de Randles-Sevcik (détaillée dans le chapitre II, section II.4) est égale à 0,80 cm² (Figure III.4). Pour rappel, la relation de Randles-Sevcik permet d'exprimer les courants de pic d'un couple oxydo-réducteur rapide comme dans notre cas le couple Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ en fonction de la surface électroactive et de la vitesse de balayage. Ce résultat est deux fois supérieur à la surface géométrique de l'électrode de graphite qui est de 0,38 cm². Après dépôt d'une couche mince de nitrure de carbone amorphe, la topographie de surface du graphite a totalement changé. Les feuillets de graphite ont été totalement recouverts par un film d'a-CN_x ayant une morphologie granulaire. Le diamètre d'un granule est d'environ 100 nm (Figure III.3B). L'étude du couple Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ après dépôt montre que la couche d'a-CN_x n'abaisse que très légèrement l'aire de la surface électroactive de l'électrode. On calcule en effet une surface de 0,7 cm².

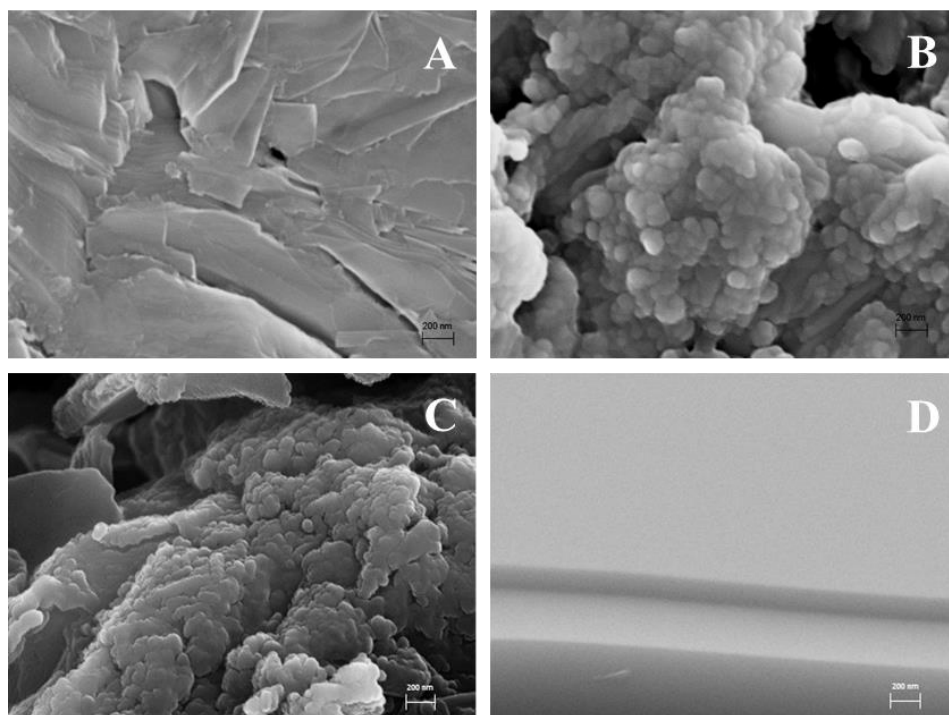


Figure III.3: Images MEB de disques A) de graphite, B) de graphite/a-CN_x, C) de graphite/a-CN_x AT et D) de silicium/a-CN_x

Le traitement anodique de surface de la couche d'a-CN_x réalisé par chronopotentiométrie (Figure III.5) n'altère pas la structure de ce dernier et ne modifie pas l'aire de sa surface électroactive (Figure III.3C) de façon significative. On observe d'après la Figure III.5A que l'essentiel du traitement anodique s'effectue à un potentiel de 1,55 V/ECS qui, d'après la courbe de voltampérométrie cyclique montrée sur la Figure III.5B se situe dans une gamme de potentiel où l'on procède à la fois à l'oxydation de l'eau et vraisemblablement à celle de la surface de la couche d'a-CN_x.

L'épaisseur du film a été mesurée par MEB après création d'une rainure dans la couche d'a-CN_x, en utilisant du silicium (surface lisse) comme support pour déposer la couche d'a-CN_x. D'après la Figure III.3D, on mesure une épaisseur de 90 nm. De précédentes études réalisées au sein du LISE ont montré que pour une pression $P(N_2)/P_{tot} = 0,03$, l'épaisseur du film est de 120 nm [80].

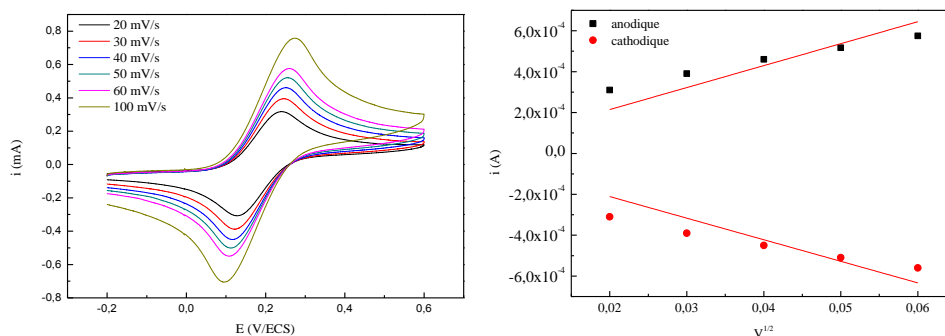


Figure III.4: A gauche, voltampérogrammes pour différentes vitesses de balayage sur une électrode de graphite nue dans une solution aqueuse de ferricyanure/ferrocyanure (5 mM) en utilisant comme sel de fond KCl (0,1 M) et à droite graphe $i_p = f(v^{1/2})$ correspondant

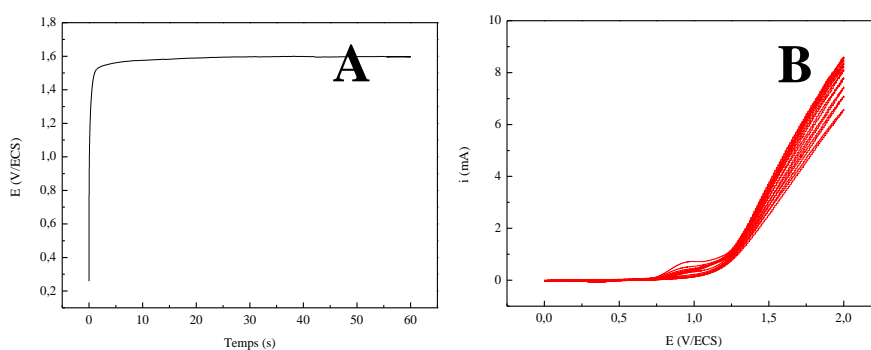
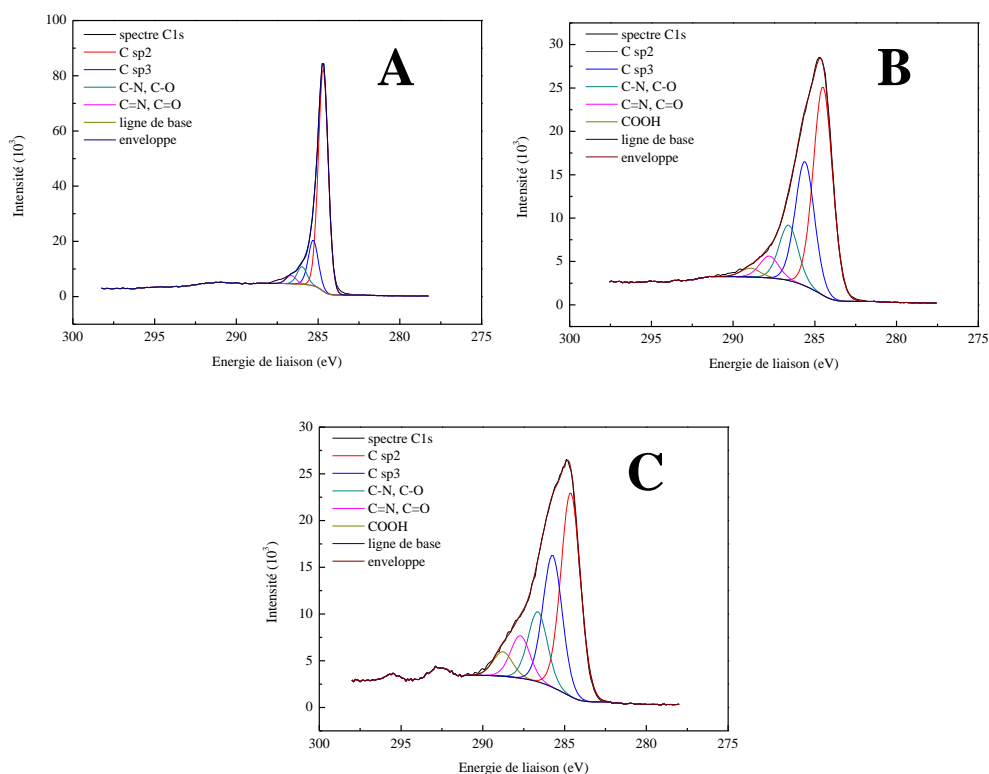


Figure III.5 : A) chronopotentiogramme lors du traitement anodique d'une électrode graphite/a-CN_x effectué dans une solution aqueuse de KOH (0,1 M) à l'aide d'une densité de courant appliquée de 3 mA/cm² et B) voltampérogrammes d'une électrode de graphite/a-CN_x obtenues dans une solution aqueuse de KOH (0,1 M), dix cycles consécutifs

L'électrode graphite/a-CN_x a été caractérisée également par XPS (Tableau III.1, Figure III.6). Les spectres obtenus avant et après dépôt de la couche d'a-CN_x montrent clairement des environnements chimiques différents pour le carbone. On observe un élargissement du pic C1s après dépôt de la couche mince d'a-CN_x. Le pic à 284,6 eV est caractéristique des atomes de carbone hybridés sp². L'aire du pic à 285,3 eV, caractéristique des atomes de carbone sp³, a été doublée après dépôt d'a-CN_x par traitement plasma. Sachant que l'analyse XPS est une méthode de caractérisation permettant l'analyse chimique des matériaux jusqu'à une profondeur de 10 nm et connaissant l'épaisseur de notre couche d'a-CN_x, nous pouvons dire que les résultats obtenus après dépôt sont caractéristiques de cette dernière.

Tableau III.1: Spectres XPS C1s et leur décomposition pour les électrodes graphite/ a-CN_x et graphite/a-CN_x AT.

	284,6 eV	285,7 eV	286,6 eV	287,7 eV	288,8 eV	O/C	N/C
	C=C(C,H) sp ²	C-(C,H) sp ³	C-(O,N)	C=(O,N)	O-C=O		
Graphite	75,6	15,6	6,0	2,8		0,02	-
graphite/a-CN_x	49,8	29,7	13,3	5,2	2,1	0,07	0,17
graphite/a-CN_x AT	43,1	27,9	14,8	9,0	5,2	0,17	0,12

**Figure III.6:** Spectre XPS et décomposition du pic C1s d'une électrode de A) graphite, B) graphite/a-CN_x et C) graphite/a-CN_x AT

Le film de nitrure de carbone amorphe renferme 13,7 % d'azote atomique, ce qui correspond à un ratio N/C égal à 0,17. De plus, S. Jribi *et al.* [80] ont montré par détection électrochimique d'une sonde redox ferrocène greffée spécifiquement sur les amines que seulement 6,5 % de l'azote atomique présent en surface sur a-CN_{0,12} est impliqué dans des groupements amines. La densité de groupements amines a ainsi été évaluée à $1,4 \cdot 10^{13}$ groupements/cm² dans le cas d'une couche a-CN_{0,12}. Ce nombre de groupements est supérieur à celui nécessaire pour recouvrir l'ensemble de la surface par une monocouche de laccase. En

effet, connaissant les dimensions de la laccase (5×7×5 nm) [28], on peut estimer la surface maximale occupée par une enzyme à 35 nm². La quantité d'enzyme pouvant être immobilisée à la surface de l'électrode graphite/a-CN_{0,17} en prenant en compte son aire géométrique est donc de 1,1.10¹² enzymes/cm².

Dans le cadre des travaux d'Ardhaoui *et al.* sur des électrodes de graphite fonctionnalisées par traitement plasma à la pression atmosphérique, il a été démontré que la laccase immobilisée sur des surfaces fonctionnalisées par des groupements carboxyliques permet d'avoir des courants catalytiques de réduction plus importants que lorsqu'elle est greffée sur des surfaces fonctionnalisées par des groupements amines [3]. Dans l'objectif de vérifier cette conclusion, un traitement anodique a donc été réalisé sur l'électrode graphite/a-CN_{0,17} afin d'introduire des groupements acide carboxylique. On observe que suite au traitement anodique du a-CN_{0,17}, le ratio O/C a augmenté (Tableau III.1). Il est passé de 0,074 à 0,17. La présence de groupements carboxyliques à la surface de l'électrode a été démontrée par la présence d'un pic à 288,8 eV. Le traitement anodique a permis d'augmenter la proportion de groupements carboxyliques de 2,1 % à 5,2 % des atomes de carbone de la couche sondée par l'XPS, ce qui implique vraisemblablement une forte sous-estimation de la densité surfacique de groupements carboxyliques créée par le traitement anodique (Figure III.6C). La densité de ces groupements a été évaluée par XPS sur la base de la modélisation du ratio I_{COOH}/I_{C1s} (méthode décrite dans le chapitre Matériels et Méthodes) à 1,4.10¹⁴ molécules/cm² à la surface de l'électrode graphite/a-CN_{0,17} AT, ce qui d'une part constitue un nombre de groupements fonctionnels supérieur à celui requis pour immobiliser de façon covalente une monocouche d'enzyme et est dix fois supérieur à la densité de groupements amine en surface de graphite/a-CN_{0,17}.

III.2.2. Mesures de densités de courant biocatalytiques de l'ORR pour différentes méthodes d'immobilisation de la Laccase

Une fois la surface de nos biocathodes graphite/a-CN_{0,17} et graphite/a-CN_{0,17} AT caractérisée, leurs performances envers l'électrocatalyse de la réduction de l'oxygène ont été évaluées par voltampérométrie cyclique après greffage de la laccase. La mesure des courants de réduction de l'oxygène a été réalisée dans un tampon acétate possédant un pH égal à 4,2 en utilisant comme sel de fond 0,1 M de NaClO₄ et à un potentiel égal à 0,2 V/ECS (Figure III.7) auquel aucun courant faradique ne peut être détecté en l'absence d'oxygène dans la solution.

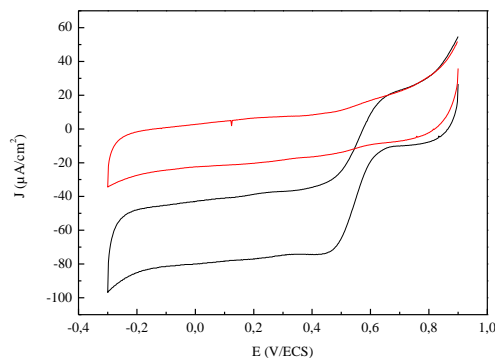


Figure III.7: Voltampérogrammes d'une électrode graphite/a-CN_{0,17}/laccase obtenus dans une solution saturée en oxygène (courbe rouge), et en l'absence d'oxygène sous N₂ (courbe noire)

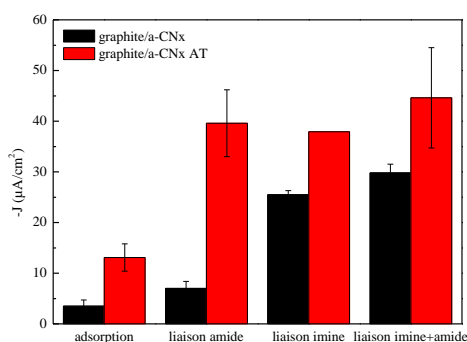


Figure III.8: Densités de courants pour les différentes stratégies d'immobilisation de la laccase

Différentes méthodes d'immobilisation de la laccase ont été évaluées sur les deux types d'électrodes (graphite/a-CN_{0,17} et graphite/a-CN_{0,17} AT) au cours de ce travail (Figure III.8, Tableau III.2). Signalons que les mesures de densités de courant ont été répétées pour chaque méthode d'immobilisation sur trois électrodes différentes dans le cadre d'un contrôle de la reproductibilité. On constate que pour les deux types d'électrodes, l'immobilisation de la laccase par adsorption fournit les densités de courants les plus faibles. On mesure des densités de courants de $-3,5 \pm 1,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ et de $-13,1 \pm 2,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ pour des électrodes graphite/a-CN_{0,17} et graphite/a-CN_{0,17} AT respectivement. L'immobilisation par greffage covalent (formation d'une liaison amide) avec activation a permis d'augmenter considérablement les densités de courants. En effet, dans le cas d'une électrode graphite/a-CN_{0,17}, on a multiplié par deux les densités de courant ($-7 \pm 1,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ au lieu de $-3,5 \pm 1,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Dans le cas d'une électrode

graphite/a-CN_{0,17} AT, les courants ont été multipliés par trois ($-39,6 \pm 6,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ au lieu de $-13,1 \pm 2,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). On remarque aussi que l'immobilisation covalente de la laccase par la formation d'une liaison amide sur une électrode graphite/a-CN_{0,17} AT permet d'avoir de meilleurs résultats que sur une électrode graphite/a-CN_{0,17}. On retrouve les mêmes résultats que ceux de la littérature [3]. A ce stade, deux hypothèses pourraient expliquer ce résultat : soit la quantité d'enzyme immobilisée est plus élevée (grâce à la plus forte densité des groupements carboxyliques), soit l'orientation de l'enzyme est plus favorable au transfert des électrons dans le cas d'une surface fonctionnalisée avec des groupements COOH. Pour rappel, afin d'optimiser le transfert d'électrons entre la surface de l'électrode et la laccase, une hypothèse largement reprise dans la littérature est qu'il est préférable que le cuivre T1 soit le plus proche possible de la surface de l'électrode. Dans le cas des électrodes possédant des groupements carboxyliques à la surface, la laccase va s'immobiliser majoritairement via ses groupements amines dont deux sont sur la même face que le site T1 et trois sur la face opposée. Par opposition, dans le cas d'une surface avec des groupements amines (cas de graphite/a-CN_{0,17}), la laccase va s'immobiliser via l'un (ou plusieurs) de ses groupements carboxyliques répartis aléatoirement sur l'enzyme. On aura alors une orientation aléatoire moins bénéfique pour la communication électronique entre l'enzyme et l'électrode.

Une méthode alternative à la formation d'une liaison amide entre l'électrode et l'enzyme consiste à immobiliser la laccase par la formation d'une liaison imine entre les groupements amines de l'électrode et les sites de glycosylation de la laccase. Pour cela, l'enzyme a été préalablement oxydée afin de créer des sites aldéhyde sur ses sites de glycosilation. Deux des quatre sites de glycosylation de la laccase (cf Figure I.15) étant du même côté que le cuivre T1, ce type de greffage peut permettre d'avoir une orientation favorable de l'enzyme. Dans ce type de greffage, aucun agent de couplage n'est nécessaire. Toutefois on a réalisé l'immobilisation de la laccase oxydée à la fois en absence et en présence du mélange EDC-NHS, agent de couplage nécessaire à la formation de la liaison amide afin de pouvoir comparer l'immobilisation de la laccase oxydée ou non toutes choses égales par ailleurs. On observe qu'en présence, comme en absence d'EDC-NHS, les densités de courant mesurées pour des électrodes graphite/a-CN_{0,17} ou graphite/a-CN_{0,17} AT sont quasiment identiques. Une explication pourrait être que la vitesse de réaction de la formation de la base de Schiff est plus rapide que celle de la formation de la liaison amide. La densité de courant la plus importante a

été obtenue dans le cas d'une électrode graphite/a-CN_{0,17} AT sur laquelle la forme oxydée de la laccase a été immobilisée en présence de l'agent de couplage : On a mesuré une densité de courant égale à $-44,6 \pm 9,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Mais si on tient compte de l'erreur expérimentale, le courant obtenu n'est pas significativement plus élevé que celui obtenu avec la laccase oxydée sans le mélange EDC-NHS). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que dans ce cas, l'enzyme est immobilisée à la surface de l'électrode soit via ses groupements amines, soit via ses sites de glycosilation suivant une orientation favorable dans les deux cas au transfert d'électrons (formation de liaisons imine ou amide grâce respectivement aux fonctions aldéhydes et amines de la laccase).

Tableau III.2: Activité enzymatique et taux de couverture de la laccase sur les électrodes graphite/a-CN_{0,17} and graphite/a-CN_{0,17} AT

	graphite/a-CN _{0,17}				graphite/ a-CN _{0,17} AT			
	Adsorption	Liaison amide	Liaison imine	Liaison amide+imine	Adsorption	Liaison amide	Liaison imine	Liaison amide+imine
Taux de couverture en enzymes électrocatalytiquement actives calculés à partir des densités de courant mesurées pour l'ORR								
-J (μA.cm²)	3,5 ± 1,2	7 ± 1,4	25,5 ± 0,8	29,8 ± 1,7	13,1 ± 2,8	39,6 ± 6,6	37,9	44,6 ± 9,9
Taux de couverture / %	0,5	1,1	4,0	4,7	2,1	6,3	6,0	7,1
Taux de couverture en enzymes actives vis-à-vis de l'ABTS calculés à partir de l'activité								
Activité, mU	21,8 ± 0,4	38 ± 2	32 ± 2	34,4 ± 0,2	8,2 ± 0,4	25 ± 2	8 ± 4	24 ± 1
Taux de couverture / %	64	112	105	101	24	74	24	69
Taux de couverture en enzymes calculés à partir des résultats XPS								
Modèle A hémisphérique								
d_{enzyme} = 5 nm	9		20	76			32	73
d_{enzyme} = 7 nm	8		17	64			28	61
Modèle B rectangulaire								
d_{enzyme} = 5 nm	6		13	45			20	43
d_{enzyme} = 7 nm	6		13	44			20	42

Il peut être démontré par le calcul suivant que la densité de courant attendue pour l'ORR sur une monocouche continue d'enzymes est de $-631,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. En effet, l'immobilisation

d'une monocouche de laccase sur une électrode plane conduit à des densités de courant dont la limite supérieure théorique s'exprime selon l'équation suivante (Equation III.1) :

$$J_{\max} = k_{\text{cat}} \times n \times F \times \Gamma_{\max} \text{ (Eq. III.1)}$$

k_{cat} représente la constante catalytique de la réaction enzymatique (350 s^{-1} pour l' O_2 en tant que substrat [20]), n le nombre d'électrons mis en jeu lors de la réaction de réduction de l'oxygène (4 électrons), F la constante de Faraday ($9,65 \times 10^4 \text{ C/mol}$) et Γ_{\max} la concentration superficielle maximale de laccase pouvant être immobilisée à la surface de l'électrode. Elle est exprimée selon l'Equation III.2.

$$\Gamma_{\max} = \frac{n_{\max \text{ enzyme}}}{S_{\text{électrode}}} \text{ (Eq. III.2)}$$

$n_{\max \text{ enzyme}}$, le nombre maximal d'enzymes dans une monocouche de laccase à la surface l'électrode ($1,8 \times 10^{12}$ moles) et $S_{\text{électrode}}$ la surface géométrique de l'électrode ($0,38 \text{ cm}^2$). L'expression de $n_{\max \text{ enzyme}}$ est décrite selon l'Equation III.3.

$$n_{\max \text{ enzyme}} = \frac{S_{\text{électrode}}}{N_A \times S_{\text{laccase}}} \text{ (Eq. III.3)}$$

N_A , la constante d'Avogadro, S_{laccase} la surface occupée par une enzyme ($3,5 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2$).

La densité de courant maximale a donc pour expression (Equation III.4) :

$$J_{\max} = k_{\text{cat}} \times n \times F \times \frac{1}{N_A \times S_{\text{laccase}}} = 631,0 \mu\text{A/cm}^2 \text{ (Eq. III.4)}$$

Par comparaison avec cette valeur, il apparaît que nos densités de courant sont toutes nettement plus faibles que J_{\max} . Ceci pourrait être expliqué soit par le fait qu'une partie des enzymes n'est pas active, soit que la surface de l'électrode n'est pas totalement recouverte. Les taux de couverture en enzymes présentant une activité bio-électrocatalytique vis-à-vis de la réduction de l'oxygène sont rapportées dans le Tableau III.2.

III.2.3. Activité de la laccase immobilisée vis-à-vis de l'ABTS et détermination du taux de couverture en enzymes actives.

Une autre méthode permettant d'évaluer les performances catalytiques des biocathodes consiste à déterminer l'activité enzymatique de la laccase une fois immobilisée (Tableau III.2). Le substrat de référence utilisé pour déterminer l'activité enzymatique de la laccase est l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS). Les mesures d'activité ont été répétées pour chaque méthode d'immobilisation sur trois électrodes différentes distinctes de celles utilisées pour la mesure du courant afin d'évaluer leur reproductibilité. On observe que

l'immobilisation de la laccase par adsorption conduit à mesurer des activités plus faibles (à une exception près) que le greffage covalent. En comparant l'activité pour un type d'immobilisation donnée sur les électrodes graphite/a-CN_{0,17} et graphite/a-CN_{0,17} AT, on remarque que l'activité est toujours plus faible pour une électrode graphite/a-CN_{0,17} AT. Ceci est à l'inverse des résultats de densité de courant de réduction de l'oxygène (Tableau III.2). Cette observation est compatible avec l'hypothèse formulée au paragraphe précédent d'une orientation préférentielle de l'enzyme. En effet, si le site T1 est proche de la surface de l'électrode, la réduction de l'oxygène est favorisée alors que l'accès de l'ABTS à T1 est difficile. Les variations de courants et d'activités sont donc inverses suivant le type d'immobilisation. Une deuxième explication pourrait être que dans le cas d'une surface fonctionnalisée avec des groupements carboxyliques déprotonés, les interactions électrostatiques entre l'ABTS chargé négativement et la surface de l'électrode sont défavorables.

Le taux de couverture de la laccase peut être calculé à partir des mesures d'activité en utilisant l'Equation III.5 suivante :

$$\Gamma = \frac{N_A \times S_{laccase} \times \text{Activité} \times 10^{-6}}{M_{laccase} \times S_{\text{électrode}} \times A_{\text{spécifique}}} \quad (\text{Eq. III.5})$$

$A_{\text{spécifique}}$, l'activité spécifique de la laccase (300 U/mg), $M_{laccase}$ sa masse molaire (63 kDa), $S_{laccase}$ la surface occupée par une enzyme ($3,5 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2$), N_A le nombre d'Avogadro ($6,02 \cdot 10^{23}$) et $S_{\text{électrode}}$, la surface géométrique de l'électrode ($0,38 \text{ cm}^2$).

On peut noter d'après le Tableau III.2 que les valeurs de taux de recouvrement en enzymes actives vis-à-vis de l'ABTS sont très nettement supérieures à celles relatives à l'activité électrocatalytique vis-à-vis de l'ORR déterminées à l'aide des densités de courant. De plus, certaines valeurs de taux de couverture calculés à partir de l'activité enzymatique dépassent les 100 % ce qui pourrait suggérer que la laccase développe une hyper-activité vis-à-vis de l'ABTS en conséquence de son immobilisation à la surface d'un support solide, conformément à ce qui a déjà été mentionné dans la littérature [91].

III.2.4.Détermination du taux de couverture total en enzymes par XPS.

Nous avons également cherché à calculer le taux de recouvrement de la laccase à partir des résultats XPS. A l'inverse des deux méthodes précédentes, celle-ci présente l'avantage de prendre en compte toutes les enzymes immobilisées, qu'elles soient actives ou non. Le spectre

XPS (Figure III.9) obtenu après immobilisation de la laccase montre clairement la présence d'enzyme à la surface de l'électrode par l'augmentation des pics représentatifs des groupements présents sur la protéine. Par comparaison avec les spectres obtenus avant immobilisation de la laccase (Figure III.9A et B), on note également une augmentation significative de l'intensité du pic à 288 eV représentatif des groupements carboxyliques, ainsi que des groupements amides.

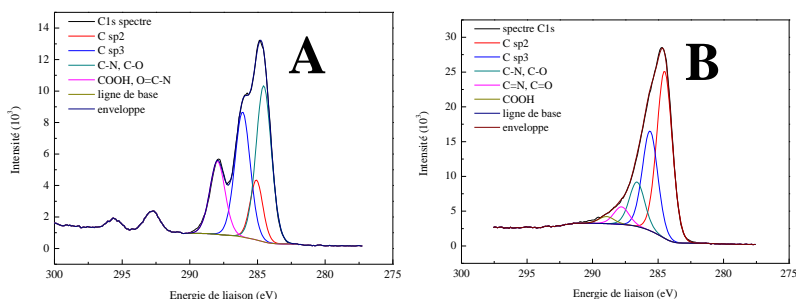


Figure III.9: Spectre XPS et décomposition du pic C1s d'une électrode A) graphite/a-CN_{0,17} en présence de laccase et B) en absence de laccase

Pour le calcul du taux de recouvrement de la laccase à partir des données XPS, on pourrait se baser sur les intensités de trois éléments : l'oxygène, le carbone ou le cuivre, tous trois présents dans l'enzyme. Cependant, le carbone et l'oxygène sont présents également dans le support ce qui complique les calculs. On a donc décidé de baser nos calculs sur l'analyse quantitative du cuivre, élément présent uniquement dans la laccase. L'analyse quantitative du taux de couverture de la laccase à partir des données XPS repose sur la comparaison du rapport d'intensité du signal I_{Cu}/I_{C1s} expérimental avec celui calculé pour différents taux de recouvrement à l'aide de deux modèles de répartition de l'enzyme en surface (Schéma III.1).

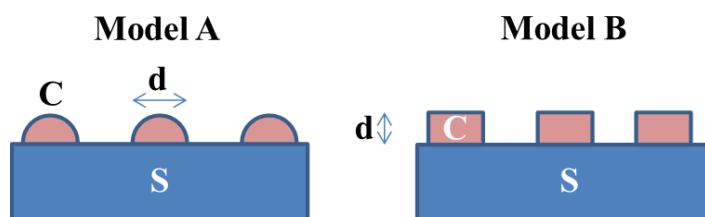


Schéma III.1: Représentation schématique d'une surface de a-CN_x recouverte par une couche discontinue de laccase en supposant que l'enzyme a une forme hémisphérique (modèle A, chaque hémisphère représente une enzyme) ou rectangulaire (modèle B, couche discontinue d'épaisseur d, un rectangle peut représenter plusieurs enzymes regroupées)

Le premier modèle A suppose que la géométrie de l'enzyme déposée est une demi-sphère et conduit à l'expression suivante pour le rapport I_{Cu}/I_{C1s} (Equation III.6) [92]:

$$\frac{I_{Cu}}{I_{C1s}} = \frac{\gamma \cdot n_{Cu}^{enzyme} \cdot \sigma_{Cu} \cdot T(E_{Cu}) \cdot \lambda_{Cu}^{enzyme} \cdot [1-\Lambda]}{\gamma \cdot n_{C1s}^{CNx} \cdot \sigma_{C1s} \cdot T(E_{C1s}) \cdot \lambda_{C1s}^{CNx} \cdot \Lambda + (1-\gamma) \cdot n_{C1s}^{CNx} \cdot \sigma_{C1s} \cdot T(E_{C1s}) \cdot \lambda_{C1s}^{CNx} + \gamma \cdot n_{C1s}^{enzyme} \cdot \sigma_{C1s} \cdot T(E_{C1s}) \cdot \lambda_{C1s}^{enzyme} \cdot [1-\Lambda]} \quad (\text{Eq. III.6})$$

Avec Λ facteur d'atténuation du signal dû à la présence d'une couche déposée

$$\Lambda = \left(\frac{8\lambda^2}{d_{enzyme}^2} \right) \left[1 - \left(\frac{d_{enzyme}}{2\lambda} + 1 \right) \exp \left(- \frac{d_{enzyme}}{2\lambda} \right) \right] \quad (\text{Eq III.7})$$

Le deuxième modèle B repose sur l'hypothèse que l'enzyme recouvre la surface sous la forme d'une couche discontinue d'épaisseur « d » uniforme (Equation III.8).

$$\frac{I_{Cu}}{I_{C1s}} = \frac{\gamma \cdot n_{Cu}^{enzyme} \cdot \sigma_{Cu} \cdot T(E_{Cu}) \cdot \lambda_{Cu}^{enzyme} \cdot \left[1 - \exp \left(- \frac{d_{enzyme}}{\lambda_{Cu}^{enzyme} \cos \theta} \right) \right]}{\gamma \cdot n_{C1s}^{CNx} \cdot \sigma_{C1s} \cdot T(E_{C1s}) \cdot \lambda_{C1s}^{CNx} \cdot \exp \left(- \frac{d_{enzyme}}{\lambda_{C1s}^{CNx} \cos \theta} \right) + (1-\gamma) \cdot n_{C1s}^{CNx} \cdot \sigma_{C1s} \cdot T(E_{C1s}) \cdot \lambda_{C1s}^{CNx} + \gamma \cdot n_{C1s}^{enzyme} \cdot \sigma_{C1s} \cdot T(E_{C1s}) \cdot \lambda_{C1s}^{enzyme} \cdot \left[1 - \exp \left(- \frac{d_{enzyme}}{\lambda_{C1s}^{enzyme} \cos \theta} \right) \right]} \quad (\text{Eq. III.8})$$

γ la fraction de la surface recouverte par l'enzyme, n_{Cu}^{enzyme} , n_{C1s}^{enzyme} représentent les concentrations de cuivre et de carbone dans l'enzyme et n_{C1s}^{CNx} la concentration de carbone dans la couche mince d'a-CN_x. Pour celle-ci, la concentration a été calculée à partir du ratio des densités $\rho_{a-CNx} = \rho_{graphite} = 2,1$. Pour l'enzyme, la concentration d'un élément a été calculée à partir de l'équation suivante :

$$n^{enzyme} = \frac{\rho_{enzyme} \times N^{enzyme}}{M_W^{enzyme}} \quad (\text{Eq. III.9})$$

$\rho_{enzyme} = 1,4 \text{ g/cm}^3$ et $M_W^{laccase} = 63 \text{ kDa}$. Le nombre d'atomes de carbone dans la laccase (structure primaire) est de 2399. La formule de la chaîne peptidique de la laccase est $C_{2399}H_{3600}N_{638}O_{729}S_9$. La laccase renferme aussi dans sa structure quatre chaînes glycosydiques [4] formées chacune de 11 mannoses et de 2 N-acetyl glucosamines. On doit donc rajouter 328 atomes de carbone. Au total, on a donc $N_C^{enzyme} = 2727$. Par ailleurs $N_{Cu}^{enzyme} = 4$

σ_{Cu} et σ_{C1s} représentent les sections efficaces de l'azote et du carbone respectivement.

$T(E_{Cu})$ et $T(E_{C1s})$ représentent les facteurs de sensibilité de l'instrument pour le cuivre (63,5) et le carbone (1,0) respectivement.

λ_{Cu}^{enzyme} (1,5 nm), λ_{C1s}^{CNx} (3,3 nm) et λ_{C1s}^{enzyme} (3,3 nm) représentent les libres parcours moyens des électrons du cuivre à travers la couche d'enzyme, et des électrons du carbone dans la couche d'a-CN_x et de l'enzyme, respectivement.

La laccase a pour dimensions $5 \times 5 \times 7 \text{ nm}$. Pour la suite des calculs, on a supposé que la couche discontinue d'enzymes recouvrant la surface de l'électrode pouvait avoir une épaisseur

de 5 nm ou de 7 nm. L'intensité du signal du carbone est décrite comme étant la somme de la contribution de trois termes : le signal de la couche d'a-CN_x recouverte par la laccase, le signal de la partie d'a-CN_x non recouvert par la couche d'enzyme et le signal du carbone présent dans la structure de la laccase. Deux modèles ont été utilisés pour le calcul des taux de recouvrement. On observe d'une manière générale pour les deux modèles considérés que les taux de recouvrement les plus bas ont été obtenus lorsque la laccase est simplement adsorbée. On observe aussi que les valeurs des taux de recouvrement calculées à partir du modèle A sont environ 50-60 % supérieures à celles du modèle B. Par exemple, dans le cas d'une électrode graphite/a-CN_{0,17} sur laquelle de la laccase oxydée a été immobilisée en présence d'un agent de couplage, le taux de couverture est de 45 % pour le modèle B et de 76 % pour le modèle A. On constate aussi que pour un modèle donné, la taille de l'enzyme (5 ou 7 nm) n'a pas une grande influence sur les résultats de taux de recouvrement. En comparant les modes d'immobilisation de la laccase, on constate que les taux de recouvrement sont plus élevés dans le cas d'un greffage covalent et lorsque la laccase est immobilisée par la formation d'une liaison amide et imine que lorsqu'elle est simplement greffée via la formation d'une liaison imine uniquement. Ce résultat est en accord avec les résultats de courants obtenus. Par ailleurs, le taux de couverture déterminé à partir des données XPS est toujours plus faible que celui calculé à partir de l'activité mais permet une estimation plus précise de la quantité d'enzyme présente à la surface de l'électrode. Ce dernier ne prend pas en compte l'orientation que peut avoir la laccase à la surface de l'électrode et donc ne permet pas d'avoir une sur/sous-évaluation de la quantité d'enzyme immobilisée. Il permet d'avoir une analyse quantitative et non qualitative.

En comparant les valeurs de taux de couverture soit de l'activité enzymatique soit des données XPS, on remarque que dans le cas d'une électrode graphite/a-CN_{0,17} AT, les résultats sont assez semblables lorsqu'on suppose que la laccase a une forme hémisphérique et une taille de 7 nm. Le taux de couverture calculé à partir de l'activité est de 24 % (liaison imine) et de 69 % (liaison imine et amide). Les valeurs prédites à partir des données XPS sont de 28 % (liaison imine) et 61 % (liaisons imine et amide). Cependant, dans le cas d'une électrode graphite/a-CN_{0,17}, on observe un écart entre les deux méthodes de calcul. Le taux de couverture calculé à partir de l'activité enzymatique est environ de 100 % quelle que soit la méthode de greffage alors que pour les mesures XPS les valeurs dépendent du type d'immobilisation et du modèle. On a calculé par exemple pour une taille de 7 nm un taux de couverture de 17 % (modèle A) et

13 % (modèle B) lorsqu'on a une liaison imine uniquement et 64 % (modèle A) et 44 % (modèle B) lorsqu'on a deux types de liaisons à la surface (imine et amide). On peut dire à ce stade que le modèle hémisphérique est le plus représentatif sur la base de la comparaison de l'activité et des données XPS.

III.2.5. Détermination du taux de couverture total en enzymes et de leur orientation sur le substrat par AM-AFM et PI-AFM.

Afin d'avoir de plus amples informations sur l'orientation de l'enzyme à la surface du support, des études par microscopie à force atomique (AFM) en modulation d'amplitude (AM-AFM) et en imagerie de phase (PI-AFM) ont été réalisées (Figure III.10, Figure III.11).

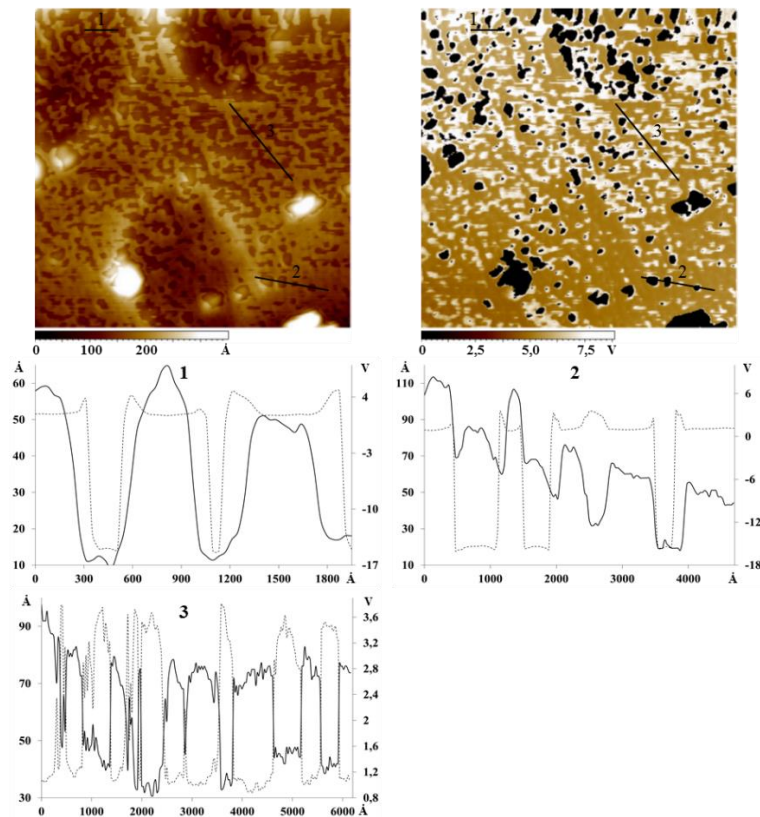


Figure III.10: Images obtenues par AFM ($20 \times 20 \mu\text{m}^2$), (gauche: topographie (AM-AFM), droite: phase (PI-AFM)) d'une électrode Si/a-CN_{0,17} avec la laccase naturelle immobilisée en présence d'EDC-NHS. Sur les profils 1), 2), et 3) : ___ pour la topographie, et pour la phase.

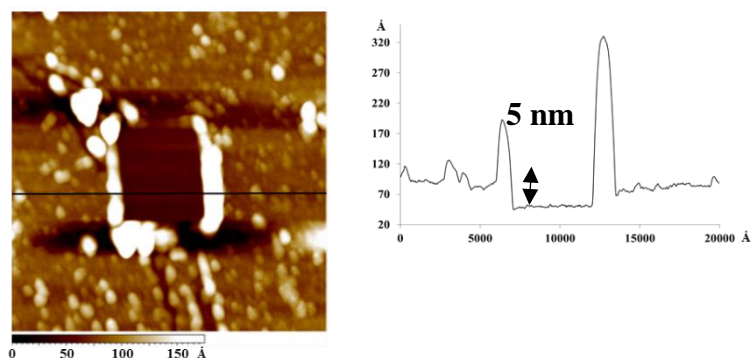


Figure III.11: Image de topographie obtenue par AM-AFM ($20 \times 20 \mu\text{m}^2$) d'une électrode Si/a-CN_{0,17} sur laquelle de la laccase oxydée a été immobilisée, après un test de nano-grattage effectué en mode contact, b) profil de topographie tracé selon la ligne noire apparaissant sur l'image.

On a déposé une couche mince de nitrure de carbone amorphe sur une plaque de silicium sélectionnée pour son caractère extrêmement lisse. Ensuite, la laccase a été immobilisée de manière covalente par la formation soit d'une liaison amide dans le cas de la laccase naturelle (Figure III.10), soit par la formation d'une liaison imine dans le cas de la laccase oxydée (Figure III.11). L'observation des images AFM obtenues en mode tapping (AFM en modulation d'amplitude, ou AM-AFM) montre que la laccase naturelle immobilisée en présence d'un agent de couplage sur une électrode Si/a-CN_x ne forme pas une couche continue (Figure III.10 à gauche). On remarque également que cette dernière semble présenter différentes conformations à la surface du support. En effet, d'après l'image de phase (Figure III.10 à droite), on observe une différence de contraste au niveau de la surface (variation de couleur) qui est confirmée par les profils de topographie obtenus. Sur l'image de phase, on observe trois types de zones. Celles qui sont noires (11 %) correspondent à des zones dures attribuées à la couche d'a-CN_x nu. Celles qui sont blanches (33 %) ou marron-beige (56 %), et donc plus molles, peuvent quant à elles être attribuées à la couche d'enzyme. La recherche de corrélation entre les profils de topographie et de phase (voir les superpositions des profils 1, 2 et surtout 3 dans la Figure III.10), permet de constater que les zones blanches sur l'image de phase correspondent toujours à des zones plus creuses sur l'image de topographie. Par ailleurs, l'examen notamment du profil 1 permet d'estimer l'épaisseur de la couche d'enzyme apparaissant en marron clair sur l'image de topographie et en marron sur l'image de phase à 5 nm environ. En conséquence, les zones

blanches apparaissant sur l'image de phase pourraient correspondre à de l'enzyme dénaturée et donc plus molle que l'enzyme non-dénaturée qui elle serait donc orientée à plat sur la couche d'a-CN_x, compte-tenu de son épaisseur. D'après les données AFM pour une électrode Si/a-CN_{0,17} sur laquelle de la laccase a été immobilisée, on peut dire que la surface du silicium est recouverte à 89 % de laccase. En comparant ce résultat au taux de recouvrement obtenu par XPS (70 %) dans le cas du modèle hémisphérique on peut dire que les résultats se rejoignent. La différence peut être expliquée par la nature du support utilisé (silicium pour l'AFM et graphite pour l'XPS)

Dans le cas du greffage de la forme oxydée de la laccase, on a observé toujours à l'aide du mode tapping de l'AFM la formation d'une couche d'enzyme couvrant complètement la surface du graphite. On a ensuite procédé à un test de nanograttage afin de déterminer l'épaisseur de la couche d'enzyme. Pour cela, on a balayé en mode contact une zone de 500x500 nm² à une vitesse de 1991 nm/s et en appliquant une force normale d'appui de 0,5 µN. Ces conditions de nanograttage sont sélectives vis-à-vis de la couche d'enzymes car il a été vérifié dans une expérience préliminaire qu'elles ne permettent pas d'endommager la couche d'a-CN_x nu. Sur l'image AFM de lecture obtenue en mode tapping du test de nanograttage de la surface qui est représentée sur la Figure III.11, on constate que cette couche possède une épaisseur de 50 Å, ce qui, connaissant la géométrie de la laccase, confirme la présence d'une monocouche d'enzyme complète.

Plusieurs études par AFM de la laccase immobilisée sur la surface d'une électrode ont été précédemment décrites dans la littérature. Ainsi, Pankratov *et al.* [93] ont immobilisé par adsorption deux oxydases multi-cuivres (la laccase *Trametes hirsuta* (dimension 45×55×65 Å) et la bilirubine oxydase de *Myrothecium verrucaria* (dimension 40×50×60 Å) sur une surface d'or polycristallin. Ils observent par imagerie par AFM en mode tapping après adsorption de l'enzyme à partir d'une solution concentrée ou diluée, une structure granuleuse similaire à celle caractéristique de l'or nu dont les grains ne sont cependant plus aussi lisses. D'après les auteurs, la surface d'or semble être recouverte par une sorte de structure globuleuse ayant pour largeur moyenne 20 nm, ce qui est nettement supérieur à la dimension d'une laccase ou d'une bilirubine. Ils ont par ailleurs mesuré d'après les images AFM pour les deux enzymes une épaisseur entre 4-6 nm et une hauteur de $2,9 \pm 0,6$ nm et de $3,0 \pm 0,8$ nm pour la laccase et la bilirubine respectivement. Ils estiment que pour les deux types d'enzymes, un recouvrement

total est observé. Selon eux, il est normal d'observer des hauteurs d'enzyme inférieures à leurs dimensions car la valeur de la hauteur d'un matériau mou tel qu'une couche d'enzyme mesurée par AFM est toujours inférieure à celle attendue, à cause de la compression de la matière par la pointe AFM. Arzola *et al.* [94] ont aussi essayé de caractériser un film de laccase par AFM en mode tapping sur une surface d'or ainsi que sur du graphite HOPG. Les films de laccase ont été obtenus par immersion des électrodes dans une solution d'enzymes à différents temps d'incubation. Les résultats AFM montrent que dans le cas d'une électrode d'or, la surface est totalement recouverte par un film uniforme, compact ayant une structure globuleuse. Dans le cas d'une surface de graphite HOPG, l'adsorption de la laccase à la surface de l'électrode s'effectue de manière plus lente que sur une surface d'or avec aussi une forte tendance des molécules de laccase à former des agglomérats. La surface du graphite n'est pas totalement recouverte par de l'enzyme. La laccase forme des agglomérats d'une largeur variant entre 50 et 70 nm et d'une hauteur de 3-5 nm. Pita *et al.* [41] ont quant à eux fonctionnalisé une surface d'or par des sels de diazonium puis immobilisé la laccase de *Trametes Hirsuta*. Après immobilisation de la laccase, ils observent l'apparition de structures globuleuses réparties de manière aléatoire à la surface qui peuvent être attribuées à de la laccase. Traunsteiner *et al.* [95] ont immobilisé de la laccase de *Trametes versicolor* sur une surface d'or fonctionnalisée par des SAMs (« Self Assembled Monolayer »). Ils observent que la laccase couvre l'ensemble de la surface. L'épaisseur de la couche est d'environ 9 nm, ce qui est supérieur au plus grand diamètre de la laccase de *Trametes versicolor*.

III.2.6. Evaluation de la stabilité de l'activité bioélectrocatalytique de la laccase immobilisée vis-à-vis de l'ORR.

La stabilité de la laccase immobilisée à la surface des électrodes a été évaluée par chronoampérométrie durant 24h sur différents types d'électrodes et méthodes d'immobilisation (Figure III.12).

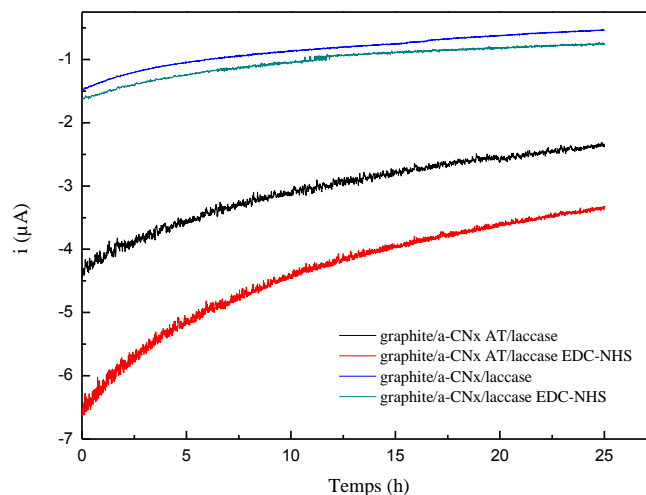


Figure III.12: Stabilité de la laccase immobilisée (adsorption et covalent) à la surface des électrodes graphite/a-CN_{0,17} et graphite a-CN_{0,17} AT durant 24 h

On note d'une manière générale une décroissance progressive du courant de réduction de l'oxygène pour les différents modes d'immobilisation. La diminution est rapide durant les trois premières heures et ralentit par la suite. Le niveau initial du courant pour les différentes électrodes est en cohérence avec le Tableau III.2. Dans le cas d'une immobilisation par adsorption, cette diminution pourrait être expliquée par le fait que la laccase n'est liée au support qu'à travers de simples interactions électrostatiques. En conséquence, au fur et à mesure que le temps avance, l'enzyme aurait tendance à se décrocher. Pour le greffage covalent, cette perte de courant pourrait être aussi expliquée par un décrochage de l'enzyme. En effet, le graphite a une structure sous forme de feuillets éclatés. Certaines enzymes pourraient être simplement emprisonnées au sein de certaines cavités. Une autre explication possible pour la chute progressive du courant pourrait être une baisse de l'activité catalytique de la laccase après un certain temps. En effet, des mesures d'activité enzymatique ont été effectuées à l'aide de l'ABTS à la suite de cette étude de stabilité et aucune activité n'a été observée. Les mêmes résultats sont obtenus dans le cas d'une électrode graphite/a-CN_{0,17} AT. Pour un greffage covalent de l'enzyme, on atteint des courants de 3 µA après 24 heures, ce qui correspond à une diminution de 50 % du courant initial.

III.2.7. Caractérisation de l'activité bio-électrocatalytique de la laccase envers l'ORR par spectroscopie d'impédance électrochimique

La technique de spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) a été utilisée dans ce travail afin de caractériser la cinétique de la réaction de réduction de l'oxygène catalysée par la laccase. Il faut noter que la littérature contient peu d'articles relatant l'exploitation de cette technique pour l'étude du transfert direct d'électrons.

On observe sur la Figure III.13 la présence d'une boucle à haute fréquence et le début d'une boucle à basse fréquence. Ceci pourrait nous amener à supposer qu'on a deux types de transferts de charges, et donc deux constantes de temps correspondantes.

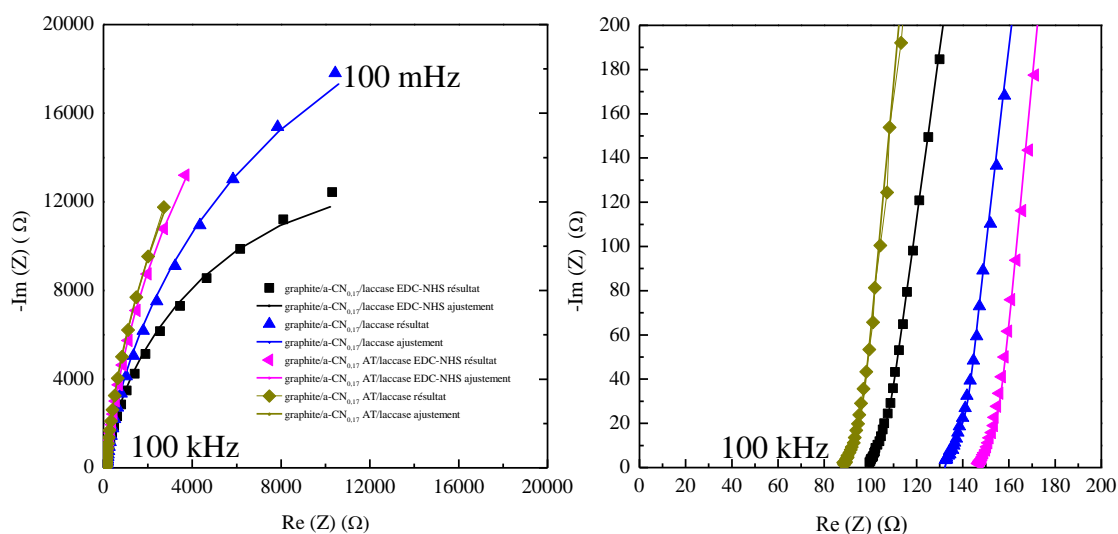


Figure III.13: Spectres d'impédance électrochimique selon la représentation de Nyquist pour les différentes électrodes étudiées. Les ajustements ont été effectués en utilisant le modèle du Schéma III.4

Afin de valider cette hypothèse, on a tracé la phase en fonction du logarithme de la fréquence (Figure III.14). On peut observer la présence de deux pics, un premier très intense à basse fréquence et un autre à haute fréquence de faible intensité (voir flèches noires sur la Figure III.14). Ceci nous amène à dire qu'on a bien deux constantes de temps.

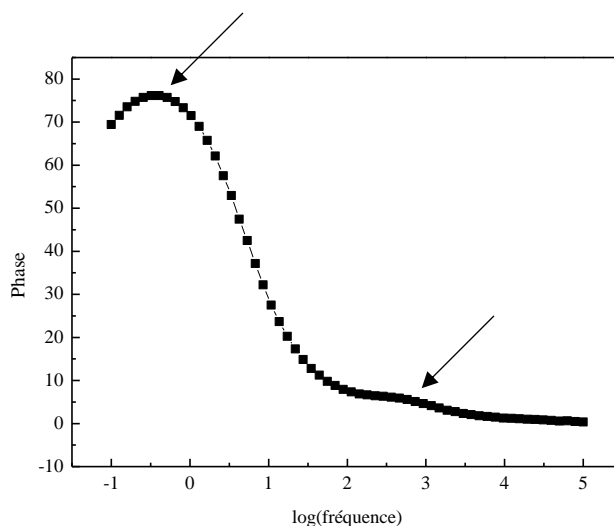


Figure III.14: Diagramme de Bode pour une électrode de graphite/a-CN_{0,17}/laccase en présence d'EDC-NHS

On a aussi tracé le logarithme de la partie imaginaire en fonction du logarithme de la fréquence (Figure III.15). On observe un comportement CPE à basse fréquence avec un exposant alpha (déterminé en effectuant une régression linéaire) égal environ à 0,8 pour chacune des électrodes.

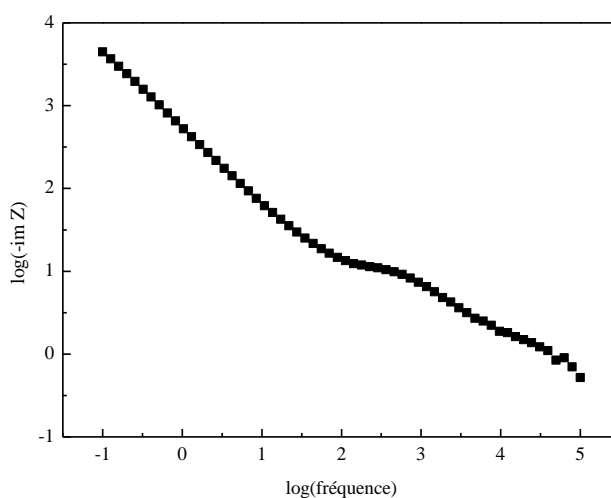


Figure III.15: Variation du logarithme de la partie imaginaire en fonction du logarithme de la fréquence pour une électrode de graphite/a-CN_{0,17}/laccase élaborée en présence d'EDC-NHS

Par ailleurs, d'après nos résultats de taux de recouvrement de l'enzyme active vis-à-vis de la réduction de l'oxygène, on peut supposer qu'à la surface de l'électrode, il est possible de

distinguer deux types de zones : celles avec des îlots d'enzymes actives et celles d'enzymes inactives (Schéma III.2). Ceci laisse à penser en conséquence que la biocathode pourrait être représentée par un réseau de microélectrodes constituées par quelques îlots d'enzymes actives disséminés au sein d'une couche d'enzyme principalement inactive et donc passivante.

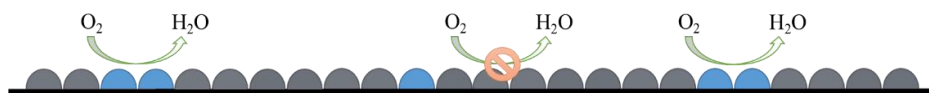


Schéma III.2: Schéma représentant des îlots de laccases actives et inactives pour la réduction de l'oxygène en eau. L'hémisphère bleu représente une enzyme active et l'hémisphère gris une enzyme inactive pour la réduction de l'oxygène

Partant de ces hypothèses et en se basant sur les résultats d'impédance effectués par Gabrielli *et al.* [96] sur des microélectrodes de platine dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ on peut assimiler notre système à un circuit équivalent (CE) (Schéma III.3) dans lequel l'impédance de diffusion a pour expression l'équation III.9.

$$Z_M(\omega) = \frac{R_M}{1+(j\omega\tau_M)^{\alpha_M}} \text{ (Eq.III.9)}$$

R_M , la résistance Cole-Cole et α_M la fréquence indépendante de l'impédance Cole-Cole.

L'impédance globale a pour expression (Equation III.10):

$$Z(\omega) = R_{el} + \frac{R_{ct} + Z_M}{1 + jC_{dl}\omega(R_{ct} + Z_M)} \text{ Eq.III.10}$$

R_{el} , la résistance de l'électrolyte, R_{ct} la résistance de transfert de charge, Z_M l'impédance de diffusion Cole-Cole et C_{dl} , la capacité de double couche. Elle peut être représentée selon le circuit électrique équivalent suivant (Schéma III.3) :

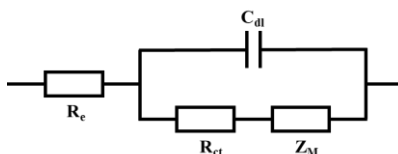


Schéma III.3: Circuit équivalent proposé

Mano *et al.* [97] ont récemment décrit le mécanisme de transfert d'électrons des oxydases multi-cuivres lorsqu'elles sont immobilisées à la surface d'une électrode (Figure III.16).

D'après eux, l'étape limitante est le transfert d'électrons entre l'électrode et le cuivre T1 des MCOs dans le cas où les enzymes ont une orientation défavorable (Etape 1). Le transfert d'électrons intramoléculaire entre le cuivre T1 et le cluster T2/T3 pourrait être aussi limitant (Etape 2). L'étape 3 de réduction du dioxygène au niveau du cluster tri-nucléaire est toujours une étape rapide. On peut préciser à ce stade que la SIE est susceptible de mieux révéler le processus électronique cinétiquement déterminant, à savoir le transfert d'électron le plus lent du processus cinétiquement rapide. La diffusion du dioxygène dans la solution peut être aussi une étape limitant ce(s) transfert(s) (Etape 4).

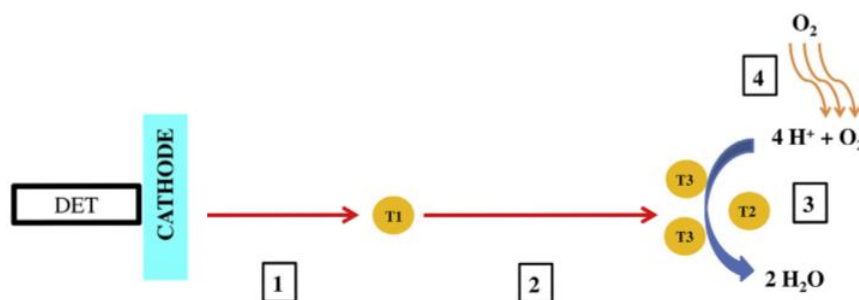


Figure III.16: Différentes étapes de transfert d'électrons direct lorsque une MCO est immobilisée sur une électrode [97]

D'après ces hypothèses et compte-tenu du fait que nous sommes très vraisemblablement en présence d'un réseau de microélectrodes, plusieurs circuits équivalents (à partir du Schéma III.3) peuvent être proposés. Chacun de ces circuits permet de reproduire de manière très satisfaisante, après ajustement des paramètres, les spectres d'impédance obtenus expérimentalement. L'option à un seul circuit équivalent de type Schéma III.3 a cependant été éliminée en raison du fait de la mise en évidence de deux constantes de temps et donc de deux transferts d'électrons (Figure III.14).

Une autre option consiste à mettre deux circuits en série (Schéma III.4), ce qui correspondrait par exemple à une situation où le transfert d'électrons entre l'électrode et le cuivre T1 constituerait l'étape limitante (qui serait alors représentée par la grande boucle observée à basse fréquence) et où la réduction de l'oxygène serait l'étape rapide (qui serait alors représentée par la petite boucle du spectre d'impédance).

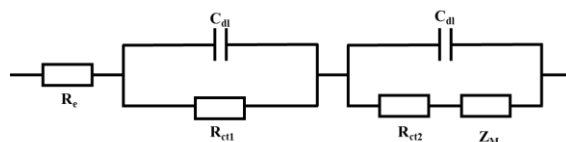


Schéma III.4: Deux circuits équivalents en série pour les systèmes graphite/a-CN_{0,17} et graphite/a-CN_{0,17} AT recouverts d'une couche d'enzymes immobilisées de façon covalent ou par adsorption

On peut aussi proposer deux circuits en parallèle (Schéma III.5). Dans ce cas on émet l'hypothèse qu'il y a plusieurs orientation de l'enzyme à la surface : une orientation qui pourrait être favorable qui permettrait d'avoir un transfert d'électrons optimal (dans ce cas, le centre cuivrique T1 devrait être proche de la surface de l'électrode) et une orientation moins favorable lorsque le cuivre T1 est loin de la surface de l'électrode.

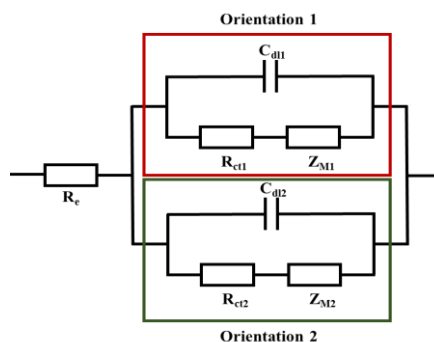


Schéma III.5: Deux circuits équivalents en parallèle pour les systèmes graphite/a-CN_{0,17}

Afin de valider ou non ces deux modèles, on a comparé les résistances au transfert de charge (Tableau III.3).

Tableau III.3: Résistances de transfert (R_{ct}) de charge pour les électrodes graphite/a-CN_{0,17} et graphite/a-CN_{0,17} AT après immobilisation covalente ou adsorption de la laccase

Type d'électrodes	Résistance au transfert de charge (Ω)			
	CE en série		CE en parallèle	
	R_{ct1}	R_{ct2}	R_{ct1}	R_{ct2}
graphite/a-CN _{0,17} /laccase/EDC-NHS	58,7	2,7	15,9	42
graphite/a-CN _{0,17} /laccase	56,6	4,9	39,0	77,8
graphite/a-CN _{0,17} AT/laccase/EDC-NHS	49,7	3,1	33,3	156,0
graphite/a-CN _{0,17} AT/laccase	47,1	2,14	19,2	175,0

D'après le tableau ci-dessus, on constate que dans le cas d'un circuit équivalent en série, quelle que soit la méthode d'immobilisation et le type d'électrode, la résistance au transfert de charge R_{ct1} est plus de dix fois supérieure à la résistance de transfert de charge R_{ct2} . On a ainsi deux transferts : un lent et un rapide. On peut émettre l'hypothèse que R_{ct1} est représentatif du transfert de charge de l'électrode vers le cuivre T1, cette étape constituerait donc l'étape limitante du système et que R_{ct2} est relative à la réduction de l'oxygène par la laccase (étape rapide). En effet, on constate une différence dans les valeurs de R_{ct1} selon le type d'électrode. Dans le cas d'une électrode graphite/a-CN_{0,17} AT, la résistance au transfert de charge R_{ct1} est moins importante que pour une électrode graphite/ACN_{0,17}. Ceci pourrait éventuellement dire que nous avons plus de probabilité d'avoir une orientation favorable lorsque la surface contient majoritairement des groupements carboxyliques que des groupements amines. Concernant R_{ct2} , elle est relativement constante quel que soit le type d'immobilisation et sa valeur est autour de 3,2 Ω . D'après ces constatations, on pourrait dire que les deux circuits en série pourraient représenter le système étudié.

Concernant la deuxième proposition de circuit (deux circuits type schéma III. 5 en parallèle) qui suppose qu'on a différentes orientations possibles d'enzyme, on observe que R_{ct1} et R_{ct2} varient de manière aléatoire et ce quel que soit le type de greffage. Ceci pourrait être cohérent avec le fait que la laccase contient de nombreux groupements fonctionnels, soit COOH soit NH₂ (150 en tout). Finalement, nous n'avons pas une orientation unique de l'enzyme mais plusieurs orientations possibles. Cette hypothèse viendrait éventuellement contredire les observations des deux circuits équivalents en série qui supposait qu'on avait une orientation favorable ou défavorable en fonction de la nature des groupements fonctionnels du support. A ce stade, on peut dire que les deux modèles peuvent être valables.

III.3. Conclusion

L'immobilisation de la laccase a été réalisée pour la première fois sur du graphite recouvert d'une couche de a-CN_{0,17} déposée en utilisant la technique de pulvérisation cathodique réactive magnéton. Ce matériau a la particularité d'avoir des groupements amines à la surface permettant ainsi l'immobilisation covalente de l'enzyme. Les courants cathodiques obtenus sur la biocathode sont assez faibles, autour de -7 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, mais ont été améliorés de plus d'un facteur cinq après un traitement anodique d'a-CN_{0,17} conduisant à la formation de groupes

carboxyliques réactifs à la surface. Les courants les plus élevés ont été obtenus sur une électrode graphite/a-CN_{0,17} AT avec la laccase oxydée immobilisée en présence d'un agent de couplage (formation à la fois de liaisons amide et imine). On a mesuré alors une densité de courant de $-44,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Les mesures de taux de recouvrement à partir des densités de courant ont permis de mettre en évidence la présence de fractions d'enzymes actives et inactives à la surface des électrodes étudiées.

L'analyse AFM a montré que sur une électrode Si/a-CN_{0,17}, la surface est entièrement recouverte d'une monocouche d'enzyme dans le cas de l'immobilisation de la laccase oxydée et partiellement pour l'immobilisation covalente de la laccase naturelle. Dans ce dernier cas, on a mesuré à partir de l'image de phase un taux de recouvrement de 89 %. En comparant ce résultat au taux de recouvrement obtenu par XPS (70 %) dans le cas du modèle hémisphérique on peut dire que les résultats se rejoignent. La différence peut être expliquée par la nature du support utilisé. En effet, pour les analyses AFM, un support lisse a été utilisé (silicium) tandis que pour les mesures XPS, on a utilisé du graphite qui présente une surface rugueuse.

En comparant les valeurs de taux de couverture calculés à partir de l'activité enzymatique ou des données de XPS, on remarque que dans le cas d'une électrode graphite/a-CN_{0,17} AT, les résultats sont assez semblables lorsqu'on suppose que la laccase a une forme hémisphérique et une taille de 7 nm. Ceci pourrait valider le modèle hémisphérique comme étant plus représentatif que le modèle d'une couche discontinue d'enzymes. Cependant, dans le cas d'une électrode graphite/a-CN_{0,17}, on observe un écart entre les deux méthodes de calcul. Le taux de couverture calculé à partir de l'activité enzymatique est environ de 100 % quelle que soit la méthode de greffage alors que pour les mesures XPS les valeurs dépendent du type d'immobilisation, ce qui pourrait suggérer que la laccase développe une hyper-activité vis-à-vis de l'ABTS en conséquence de son immobilisation à la surface d'un support solide.

Les mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique ont mis en évidence que le transfert de charge fait intervenir deux constantes de temps. Cependant, les deux modèles proposés de transferts d'électrons représentés par un circuit équivalent constitué de deux transferts de charge soit en série soit en parallèle sont compatibles avec les résultats expérimentaux de SIE obtenus. A ce stade, on ne peut donc pas trancher entre les deux hypothèses, à savoir deux populations de laccase dont l'une à une orientation favorable sur l'électrode et l'autre une orientation défavorable ou un système toujours représenté par deux

orientations de la laccase mais qui varieraient suivant la méthode d'immobilisation ou le type d'électrode.

Chapitre IV.Elaboration d'une cathode graphite/nanowalls de carbone/laccase : effet de la nanostructuration de l'électrode

Plusieurs types de support ont été étudiés au cours de ce travail. Dans le chapitre précédent, la surface du graphite a été recouverte par un film mince de nitrure de carbone amorphe ayant la particularité de présenter des groupements amines de surface qui permettent le greffage covalent de l'enzyme. Des groupements carboxyliques peuvent également être introduits par un traitement électrochimique. Les résultats obtenus sur a-CN_x ont montré que les courants catalytiques les plus élevés sont mesurés lorsque la laccase est immobilisée de façon covalente sur des surfaces riches en groupements carboxyliques. Cependant, ce type de support ne permet pas de présenter une grande surface spécifique et en conséquence d'avoir des courants catalytiques élevés. On s'est donc tournés, avec l'objectif d'améliorer les performances de la cathode en terme de densité de courant produit, vers la nanostructuration de la surface de graphite. La technique choisie consiste à former des nanowalls de carbone (CNWs) à la surface du graphite, augmentant ainsi sensiblement la surface disponible, et donc la surface électroactive. Ces surfaces ont été élaborées par l'équipe de Shinsuke Mori au sein du département d'ingénierie chimique du Tokyo Institute of Technology. Ce type d'électrode sera noté graphite/CNWs. Une fois les nanowalls de carbone formés sur la surface du graphite, ces derniers ont été fonctionnalisés par un jet plasma à la pression atmosphérique (APPJ) au LISE en collaboration avec Arefi-Khonsari Farzaneh et Jérôme Pulpytel. On a dans un premier temps effectué les mesures de performances catalytiques sur les échantillons de graphite/CNWs. Dans un second temps, on a cherché à optimiser ces conditions de fonctionnalisation plasma en ayant recours à des plans d'expériences. Le nombre d'échantillons de graphite/CNWs à notre disposition étant limité, on a décidé d'effectuer l'étude d'optimisation tout d'abord sur du graphite nu (sans nanowalls de carbone). Les paramètres de traitement plasma ainsi optimisés ont ensuite été utilisés pour fonctionnaliser les électrodes graphite/CNWs.

IV.1. Matériels et méthodes

On ne détaillera ici que les protocoles de revêtement du graphite par les nanowalls de carbone effectués par l'équipe de S.Mori au Japon ainsi que ceux de leur fonctionnalisation par plasma, d'identification des groupements aldéhydes à la surface des électrodes par XPS et de mesures d'angle de contact. Les autres méthodes de caractérisation ont été décrites précédemment dans le manuscrit.

Les disques de graphite/CNWs ont été préparés sous forme de pastille suivant le protocole décrit dans le chapitre II matériels et méthodes section II.2. Après le dépôt des CNWs, la pastille a été montée en électrode. Une fois élaborées, les électrodes ont été caractérisées par voltampérométrie cyclique afin d'évaluer la surface électroactive et les courants de réduction de l'oxygène, par spectroscopie UV-visible pour mesurer l'activité enzymatique, par XPS pour identifier et quantifier les groupements fonctionnels présents à la surface de l'électrode après fonctionnalisation et par mesure d'angle de contact afin d'évaluer la mouillabilité de la surface de la biocathode.

IV.1.1.Le procédé plasma

Le plasma est un gaz partiellement ionisé électriquement neutre. Il constitue le quatrième état de la matière. Il est formé d'un ensemble de particules neutres ou excitées, d'ions et d'électrons. Le passage d'un gaz à l'état plasma nécessite une énergie suffisante pour que les électrons libres constituant le gaz entrent en collision avec les particules neutres du gaz et provoquent l'ionisation de ces molécules. Cependant, électrons et atomes ionisés s'attirent, et ils peuvent alors se recombiner pour former des atomes. Pour atteindre l'état plasma, il faut que l'ionisation soit plus fréquente que la recombinaison. Cette énergie peut être apportée sous l'effet d'un champ électrique ou par simple chauffage.

Les plasmas peuvent être classés en fonction de leur densité, de leur température et de leur degré d'ionisation. Ainsi, on distingue tout d'abord le plasma froid. Ce gaz est très faiblement ionisé et donc constitué essentiellement d'atomes et de molécules neutres. Il possède une faible densité d'énergie. Par opposition, le plasma chaud est totalement ionisé c'est-à-dire formé uniquement d'ions et d'électrons. Il possède une densité d'énergie élevée. Dans l'industrie, les technologies plasma peuvent être utilisées pour nettoyer des surfaces, effectuer des dépôts de couches minces et conférer des groupements fonctionnels à la surface d'un matériau. Au cours de ce travail, on s'intéressera au plasma froid. La fréquence d'excitation de la source électrique est très importante puisqu'elle influe sur le comportement des électrons et des ions. On distingue trois groupes : les décharges continues (DC) et basse fréquence, les plasmas initiés par radiofréquence et les décharges micro-ondes. Nous avons utilisé deux sortes de plasma froid: un jet plasma à la pression atmosphérique (APPJ) a permis de fonctionnaliser la surface du substrat carboné. Ce procédé suscite un fort intérêt industriel du fait qu'il fonctionne à

pression atmosphérique et que aucun réacteur (enceinte fermée) n'est nécessaire dans le cas d'un traitement à l'air libre. Le dispositif se compose de deux électrodes à travers lesquelles circule le gaz plasmagène. On applique une fréquence d'excitation dans le domaine des radiofréquences afin de créer le plasma entre les deux électrodes.

Un deuxième type de plasma a été utilisé pour former les nanowalls de carbone : il s'agit d'un plasma induit par micro-ondes à basse pression pour le dépôt chimique en phase vapeur (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition, PECVD). Le principe de cette technique consiste à déposer un matériau solide sous forme de couche mince dont l'épaisseur et la topographie varient selon le temps de dépôt sur le substrat. En CVD thermique classique (dépôt chimique en phase vapeur), le substrat est chauffé pour fournir l'énergie d'activation nécessaire au déclenchement de la réaction chimique. La réduction de l'énergie thermique nécessaire peut être obtenue par le procédé CVD assisté par plasma. On crée une vapeur réactive (plasma) par application d'un champ électrique à un gaz dans une enceinte fermée. Les espèces réactives et radicaux formés réagissent entre eux et à l'interface plasma/surface pour former le dépôt. La réactivité du plasma froid permet de décomposer les précurseurs gazeux à plus basse température. Ce type de procédé est généralement utilisé sous pression réduite mais peut être aussi réalisé à pression atmosphérique.

IV.1.1.1. Nanostructuration du graphite par revêtement par des nanowalls de carbone

Une fois découpées sous forme de pastilles (diamètre de 0,7 cm), les échantillons de graphite ont été envoyés au Japon afin de former les nanowalls de carbone (CNWs) selon un protocole mis au point par l'équipe de S. Mori. L'appareil utilisé est le modèle ASTeX DPA25. Les conditions de traitement sont les suivantes : un débit total de 50 sccm ($46 \text{ cm}^3/\text{min}$) pour CO et 4 sccm pour H_2 , une pression de travail de 250 Pa, une température de 700°C et une puissance de 60 W. Le substrat est chauffé par décharge micro-onde et sa température est déterminée par un pyromètre infrarouge (Japan Sensor TMZ9). Au cours de ce travail, trois durées différentes de dépôt ont été effectués (30 s, 60 s et 120 s). Les électrodes graphite/CNWs selon la durée de traitement seront notées graphite/CNWs30s, graphite/CNWs60s et graphite/CNWs120s.

IV.1.1.2.Fonctionnalisation du graphite/CNWs par plasma atmosphérique

Une torche à plasma atmosphérique de type Plasmatreteat (Figure IV.1) a été utilisée pour fonctionnaliser la surface des électrodes de graphite et de graphite/CNWs en ayant recours soit à l'azote soit à l'air en tant que gaz plasmagène. Plusieurs paramètres que l'on a fait varier au cours de ce travail, doivent être fixés pour un traitement donné. On distingue le Plasma Cycle Time (paramètre permettant la mesure de l'intensité du plasma et qui représente sa durée de fonctionnement efficace), la distance entre la torche et les disques de graphite/CNWs, la vitesse de déplacement de la torche sur les disques de graphite/CNWs, le nombre de passage de la torche et enfin le débit du gaz d'ionisation.



Figure IV.1: Torche plasma à la pression atmosphérique de type Plasmatreteat

IV.1.2.Caractérisation de l'électrode par spectroscopie photoélectronique à rayons X

IV.1.2.1.Identification de groupements aldéhydes à la surface de l'électrode

L'analyse XPS ne permet pas de différencier certains groupements fonctionnels notamment les aldéhydes, les cétones et les imines. Dans notre cas, ce problème s'est posé pour la quantification des fonctions aldéhydes. Afin de le résoudre, on a dérivé chimiquement les aldéhydes en ayant recours à une molécule sonde. Les aldéhydes réagissent avec les hydrazides

pour former des hydrazones dont la liaison imine peut être ensuite réduite pour éviter la réaction inverse d'hydrolyse. L'idée est d'utiliser un hydrazide possédant un élément caractéristique qui pourra être détecté par XPS et attribué sans ambiguïté à la molécule sonde qui sera la seule à contenir cet élément. La sonde utilisée est le 2-chlorobenzohydrazide (Figure IV.2).

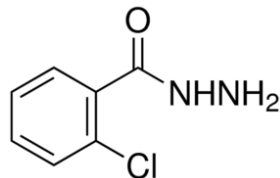


Figure IV.2: Formule chimique du 2-chlorobenzohydrazide

Elle est de petite taille, ce qui limite le risque d'encombrement stérique à la surface des échantillons et contient du chlore, qui fait office de sonde pour l'XPS. Chaque disque de graphite est immergé dans un bécher contenant 5 mL de solution d'hydrazide (0,1 mg/mL) avec une légère agitation pendant 4 h à température ambiante. L'hydrazide 2-chlorobenzoyique est en large excès par rapport au nombre de groupements aldéhydes. 50 μ L d'une solution de NaCNBH₃ (2 mol/L) sont ensuite ajoutés. Les échantillons sont ensuite placés durant une nuit à 4°C pour réduire l'imine, puis rincés pendant 5 minutes dans de l'éthanol puis dans l'eau, le tout sous agitation mécanique afin d'éliminer l'hydrazide n'ayant pas réagi sur la surface. Enfin les échantillons sont analysés par XPS.

IV.1.2.1.1. Mise en évidence des groupements carboxyliques à la surface de l'électrode par une méthode chimique

La détermination du nombre de groupements carboxyliques présents à la surface a été effectuée à l'aide d'une méthode spectroscopique en utilisant du bleu de toluidine (TBO). Il s'agit d'un colorant avec un maximum d'absorption à une longueur d'onde égale à 633 nm. Après fonctionnalisation par traitement plasma, les disques sont immergés pendant 6h dans 1 mL d'une solution de TBO (5×10^{-4} M) préparée dans de la soude à pH 10 sous agitation continue. Le TBO (Figure IV.3), molécule chargée positivement, se lie avec les fonctions carboxyliques de surface déprotonées par interaction électrostatique. Les disques sont ensuite lavés avec de la soude à pH 10 et deux fois avec de l'eau distillée. 100 μ L d'une solution d'acide acétique à 50 % sont par la suite ajoutés afin de protoner les fonctions carboxyliques de surface, ce qui entraîne le relargage en solution du TBO adsorbé en surface. Cette étape est réalisée

pendant 10 minutes. La densité optique de cette solution de relargage a été par la suite mesurée par spectroscopie UV-visible à 633 nm ($\epsilon = 26400 \text{ L/mol/cm}$). La densité des groupements carboxyliques présents à la surface a été déterminée en se basant sur l'hypothèse que 1 mole de TBO complexe 1 mole de groupements carboxyliques.

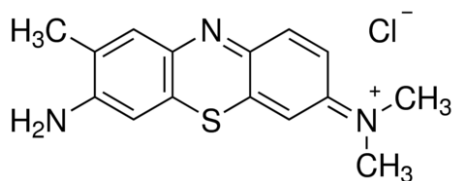


Figure IV.3: Formule chimique du bleu de toluidine

IV.1.3. Mesure d'angle de contact

La mesure d'angle de contact est une technique permettant d'évaluer l'affinité d'un liquide par rapport à une surface. La méthode consiste à mesurer l'angle θ que forme une goutte de liquide posée sur la surface d'un solide et la surface de ce dernier. Dans le cas d'une goutte d'eau et puisque l'on compare des surfaces de rugosité équivalente, ainsi qu'en attestent les images de microscopie à balayage (Figure IV.11), on peut considérer que la valeur de l'angle θ permet d'estimer le caractère hydrophobe ou hydrophile de la surface. Lorsque l'angle θ augmente la surface devient moins hydrophile et sa mouillabilité diminue. Une surface hydrophobe sera caractérisée par un grand angle θ et une faible énergie de surface, tandis qu'une surface hydrophile sera caractérisée par un faible angle de contact et une grande énergie de surface, ce qui correspond à une forte mouillabilité (Figure IV.4).

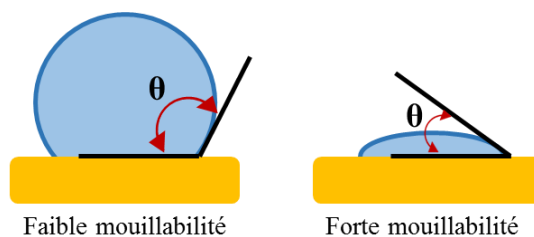


Figure IV.4: Schéma de l'angle de contact d'un liquide avec un solide

Le dispositif expérimental est composé d'une micro-seringue permettant de déposer un volume précis de liquide, d'une source de lumière et d'une caméra (TELI CCD) reliée à un ordinateur qui permet via un logiciel de traiter les images obtenues et de calculer l'angle de

contact. Pour chaque mesure, une goutte d'eau distillée d'un volume égal à 1 μL a été déposée à la surface des échantillons quelques minutes après fonctionnalisation par APPJ.

IV.1.4. La méthode des plans d'expériences

IV.1.4.1. Principe de la méthode des plans d'expériences

La méthode intuitive traditionnelle n'est pas souvent le meilleur choix pour réaliser une série d'expériences. Elle consiste à fixer un paramètre et à mesurer la réponse du système pour plusieurs grandeurs d'intérêt. Si plusieurs paramètres doivent être étudiés, il faudrait répéter cette méthode sur chaque paramètre étudié ce qui amène à réaliser un nombre élevé d'expériences. Afin de diminuer ce nombre, on pourrait réduire le nombre de paramètres mais cela réduirait la pertinence des résultats obtenus. Une alternative serait de réaliser des plans d'expériences.

La méthode des plans d'expériences permet d'organiser au mieux les essais. Les plans d'expériences permettent de déterminer et d'optimiser les paramètres déterminants d'un système ou encore de prédire par modélisation le comportement d'un procédé en minimisant le nombre d'expériences. Cette méthode établit un lien entre deux types de grandeurs : la réponse qui constitue la grandeur physique mesurée dont on souhaite comprendre le comportement (dans notre cas il peut s'agir du courant catalytique de réduction d' O_2 par exemple) et les facteurs (paramètres) qui représentent les grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur et ayant une influence sur la variation de la réponse. Elle vise donc à étudier les relations qui lient la réponse aux facteurs (on utilise pour cela un modèle mathématique de type polynômial). La méthode des plans d'expériences peut être utilisée avec deux différentes approches, la technique de screening (ou criblage) qui permet de déterminer les facteurs ayant une influence significative sur les variations de la réponse et dans laquelle il est aussi possible d'identifier les corrélations éventuelles entre les paramètres ayant une importance sur la réponse. La seconde méthode est celle des surfaces de réponse. Dans ce type d'étude, les variations de la réponse sont calculées en fonction des paramètres précédemment jugés importants. Elle vient en complément à une étude de type screening. La compréhension des plans d'expériences s'appuie ainsi sur deux notions, celle d'espace expérimental et celle de la modélisation mathématique des grandeurs physiques étudiées. Ces deux notions sont expliquées ci-après.

IV.1.4.1.1.L'espace expérimental

La réponse dépend de un ou plusieurs facteurs. Chaque facteur peut être représenté sur un axe. La valeur donnée à un facteur est appelé niveau. Généralement, lorsqu'on étudie un facteur, on limite ses variations entre deux bornes : une borne inférieure appelée niveau bas notée par -1 et une borne supérieure appelé niveau haut notée 1 (Figure IV.5). Si les seules valeurs des facteurs sont ses bornes, on est en présence de plans d'expériences à deux niveaux.

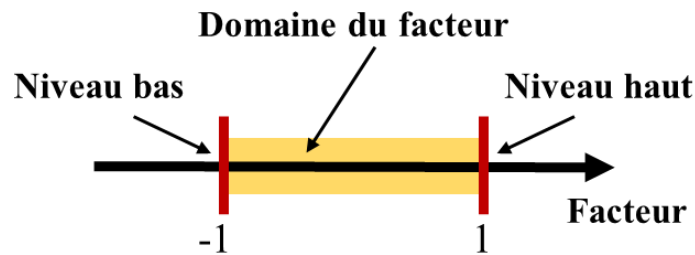


Figure IV.5: Domaine d'un facteur

Les valeurs que peut prendre un facteur entre le niveau bas et le niveau haut constituent le domaine de variation du facteur. Chaque facteur étudié est représenté par un axe orthogonal aux autres axes et est défini par son niveau haut, son niveau bas et son domaine de variation. Le regroupement des domaines constitue ce que l'on appelle le domaine d'études qui représente l'espace expérimental dans lequel les expériences doivent être réalisées. La Figure IV.6 représente le domaine d'étude pour deux facteurs.

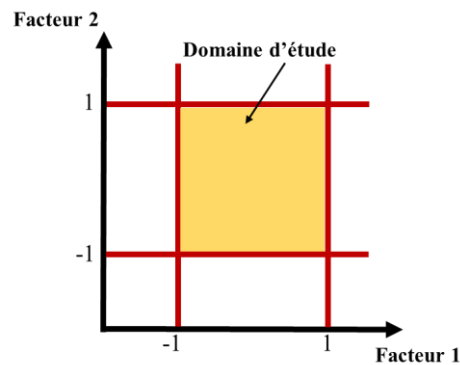


Figure IV.6: Domaine d'étude pour un espace à deux dimensions

IV.1.4.1.2.Surface de réponse

A chaque point du domaine d'étude est associée une réponse. L'ensemble de ces points correspond à un ensemble de réponses qui se situe sur une surface que l'on appelle surface de

réponse (Figure IV.7). On ne connaît que les points expérimentaux de cette surface. Les points inconnus sont déterminés à l'aide d'un modèle mathématique.

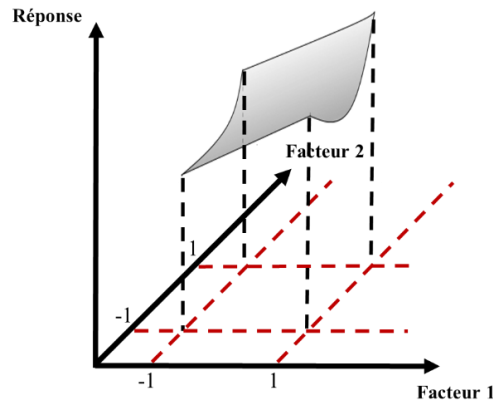


Figure IV.7: Surface de réponse pour un espace à deux dimensions dans le cas d'une étude avec deux facteurs

IV.1.4.1.3. Modélisation mathématique

La méthode des plans d'expériences utilise un modèle mathématique simple reliant la réponse aux facteurs (ces facteurs constituent les variables sur lesquelles on compte agir). Il s'agit d'un modèle polynomial. La formule de ce modèle dans le cas de deux facteurs est une équation du second degré (Equation IV.1).

$$Y = b_0 + \sum b_i \cdot X_i + \sum_i \sum_{i \neq j} b_{ij} \cdot X_i \cdot X_j + \sum b_{ii} \cdot X_i^2 + \varepsilon \quad (\text{Eq IV.1})$$

b_i , b_{ii} , b_{ij} représentent les coefficients du polynôme, Y la réponse et X_i le facteur i .

Une fois les niveaux des facteurs à étudier fixés soit expérimentalement soit en se basant sur une étude bibliographique, l'objectif est de calculer les coefficients du modèle polynomial. Plus la valeur absolue du coefficient sera importante, plus le terme correspondant aura une influence sur le système. Les plans d'expériences nécessitent l'utilisation de la technique de régression multilinéaire par la méthode des moindres carrés pour la détermination des coefficients du modèle polynomial. Cette méthode utilise le calcul matriciel (Equation IV.2).

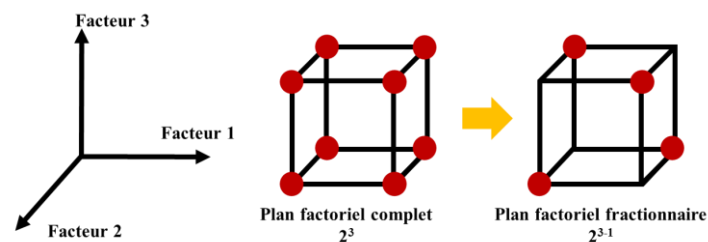
$$(X^t \cdot X)^{-1} \cdot X^t \cdot Y = b \quad (\text{Eq IV.2})$$

X représente la matrice d'expérience, X^t sa transposée, $(X^t \cdot X)^{-1}$ l'inverse du produit matriciel, Y la réponse et b la matrice des coefficients du polynôme.

Les plans d'expériences sont caractérisés par une répartition des points dans le domaine expérimental qui soit « mathématiquement » optimale. Il existe de nombreux plans d'expérience dans la littérature tels que les plans factoriels et les plans de surface de réponse.

IV.1.4.2. Plan factoriel fractionnaire du 1^{er} degré

Dans un plan factoriel complet du 1^{er} degré (les interactions d'ordre 2 ou plus sont souvent négligeables), il y a au moins autant d'expériences à réaliser que de coefficients à déterminer. Le nombre d'expériences à réaliser augmente significativement avec le nombre de facteurs (paramètres) étudiés. En effet, pour n paramètres, le plan nécessiterait 2^n expériences à réaliser. Cela signifie que dans le cas où l'on a 8 facteurs à faire varier, il faudra effectuer 256 expériences sans compter les répétitions afin de consolider le modèle. On peut réduire le nombre d'expériences par la réalisation d'un plan factoriel fractionnaire construit sur le modèle d'un plan factoriel complet. Ainsi un plan factoriel fractionnaire du 1^{er} degré permet de ne réaliser que 2^{n-1} expériences pour déterminer les coefficients du modèle. Ce type de plan constitue un bon choix lorsque les ressources sont limitées ou que le nombre de facteurs à faire varier est important comme dans notre cas. La Figure IV.8 schématise pour un système constitué de trois facteurs la différence entre ces deux types de plan factoriel et détaille le modèle polynomial pour chaque plan.



$$Y = b_0 + b_1.X_1 + b_2.X_2 + b_3.X_3 + b_{12}.X_1.X_2 + b_{13}.X_1.X_3 + b_{23}.X_2.X_3 + b_{123}.X_1.X_2.X_3 \text{ (plan complet)}$$

$$Y = b_0' + b_1'.X_1 + b_2'.X_2 + b_3'.X_3 \text{ (plan fractionnaire)}$$

Figure IV.8: Comparaison entre un plan factoriel complet et un plan factoriel fractionnaire

Chaque coefficient du modèle fractionnaire (b_i') est une combinaison des coefficients aliasés (regroupés) du plan complet : En général, on suppose que les effets les plus élevés (interaction entre trois facteurs) sont négligeables.

IV.1.4.3. Plan composite

Un plan composite est un plan de surface. Il est le plus souvent utilisé suite à la détermination des facteurs importants à l'aide des plans factoriels. Il est décrit par un domaine sphérique. Le plan composite est constitué de la combinaison d'un plan factoriel (complet ou fractionnaire) auquel on ajoute un groupe de points situés sur les axes de chacun des facteurs (Figure IV.9). Ces points sont appelés les points en étoile.

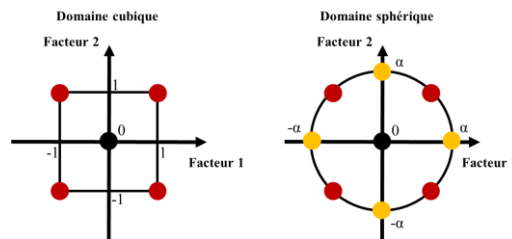


Figure IV.9: Schéma montrant la différence entre un plan factoriel et un plan de surface composite pour deux facteurs

IV.1.4.4. Plan de Doehlert

Le plan de Doehlert est aussi un plan de surface. Dans ce cas, les points forment un hexagone régulier dans l'espace expérimentale. L'avantage de ce type de plan par rapport au plan composite décrit ci-dessus est qu'il permet d'étendre le domaine d'étude si nécessaire (par exemple dans le cas où les résultats recherchés ne sont pas dans le domaine d'étude hexagonale initial) par une simple translation qui ne modifie pas la répartition des points dans l'espace expérimental. Par exemple sur la Figure IV.11, en ajoutant les trois points en jaune, on forme un nouvel hexagone en les associant aux points 1, 2, 3 et 7. On peut par la suite encore étendre le plan d'expériences dans d'autres directions (Figure IV.10).

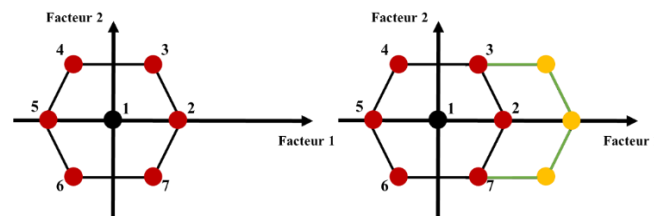


Figure IV.10: Schéma d'un plan de Doehlert. Les boules rouges représentent le plan initial et les boules jaunes les expériences supplémentaires pour l'obtention du nouveau plan

IV.1.4.5. Détermination des facteurs influents

La méthode utilisée afin de déterminer les facteurs ayant un impact important est celle de Pareto. Cette méthode permet de classer les facteurs par ordre croissant d'importance. Elle a été introduite à la fin du XIXe siècle par l'économiste italien Vilfredo Pareto qui a constaté que d'une manière générale dans les plans de criblage comprenant un grand nombre de paramètres expérimentaux, 20 % de ces paramètres contrôlent 80 % des réponses. La méthode est la suivante : pour chaque coefficient b_i , on calcule un P_i qui a pour expression l'équation suivante (Equation IV.3):

$$P_i(\%) = 100 \cdot \frac{b_i^2}{\sum b_i^2} \text{ (Eq IV.3)}$$

On classe les valeurs de P_i calculées par ordre croissant, on les additionne jusqu'à ce que leur somme soit supérieure à 80 %. Les coefficients b_i dont les P_i entrent dans cette somme sont les coefficients influents du modèle.

IV.2. Résultats et discussion

IV.2.1. Caractérisation de la surface d'une électrode graphite/CNWs

La surface des disques de graphite/CNWs a été caractérisée par microscopie électronique à balayage (MEB). Les nanowalls de carbone s'organisent sous forme de feuillets en position verticale. Ils forment un assemblage de murs enchevêtrés entre eux. On peut observer d'après la Figure IV.11 que l'augmentation du temps de formation a pour effet d'augmenter la densité des CNWs. Ainsi pour un temps de formation égal à 30 s (Figure IV.11A), la surface du graphite n'est pas totalement recouverte par les nanowalls. Pour la suite des expériences, les nanowalls formés avec un temps de traitement égal à 30s ont été abandonnés. Lorsqu'on augmente le temps de traitement à 60 s, la surface du graphite est entièrement recouverte de CNWs. Pour une durée de synthèse de 120 s, le graphite est totalement recouvert et les CNWs sont plus fins et plus denses. Ils forment une sorte de choux fleurs de taille variable (Figure IV.11D).

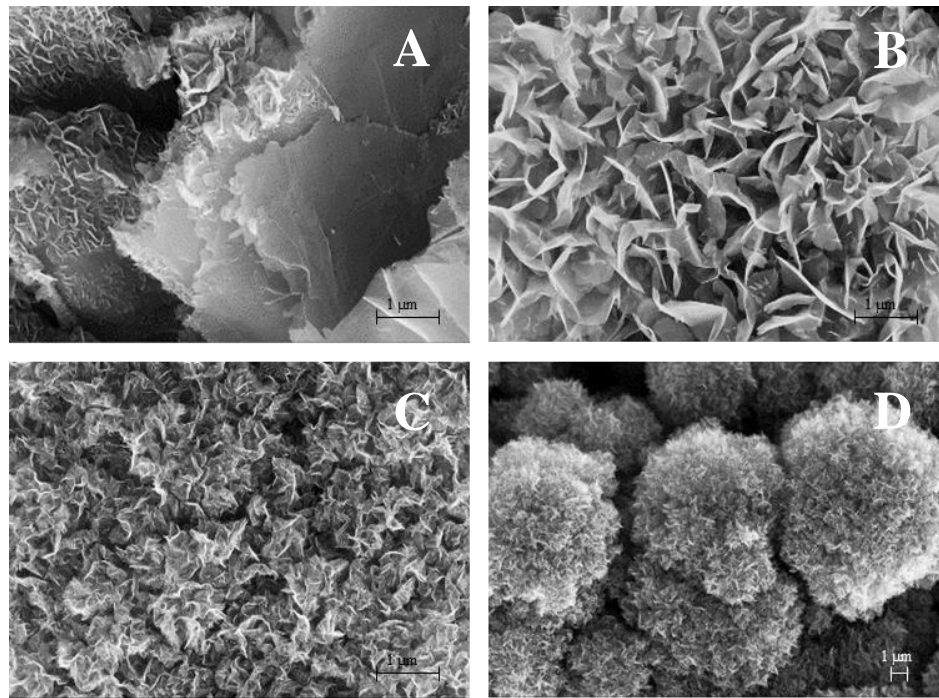


Figure IV.11: Images MEB de CNWs pour différents temps de traitement A) graphite/CNWs30s, B) graphite/CNWs60s C et D) graphite/CNWs120s

S.Mori *et al.* [81] ont montré qu'après un temps de croissance de 1 minute sur du silicium, les CNWs ont une hauteur de 1 µm (Figure IV.12). La largeur d'un nanowall (seul) est comprise entre 100 et 300 nm et son épaisseur est de quelques dizaines de nanomètres. L'augmentation du temps de formation rend les CNWs plus ondulés, fins et hauts. Ils observent également que l'espacement entre deux nanowalls de carbone adjacents diminue lorsque le temps de croissance augmente. Ils ont aussi caractérisé les CNWs par spectroscopie Raman pour différentes durées de formation (Figure IV.12). Les spectres montrent la présence de deux pics caractéristiques des matériaux carbonés: un pic à 1590 cm^{-1} (bande G) qui indique la présence de feuillets de graphène cristallin et un pic à 1350 cm^{-1} (bande D) lié au désordre dû à la taille des cristaux fins. En plus de ces deux principaux pics, s'ajoute un pic à 1650 cm^{-1} (bande D') associé aussi au désordre structural. La présence de bandes intenses D et D' suggère la présence d'une structure plus nanocristalline et la présence de défauts au niveau du graphène. On remarque aussi que lorsque le temps de croissance augmente, l'intensité de la bande D' diminue et celle de la bande G s'élargit. Cela signifie que la cristallinité du graphite diminue lors de la croissance

des CNWs, ce qui est conforme aux images MEB dans lesquels les CNWs paraissent plus ondulés.

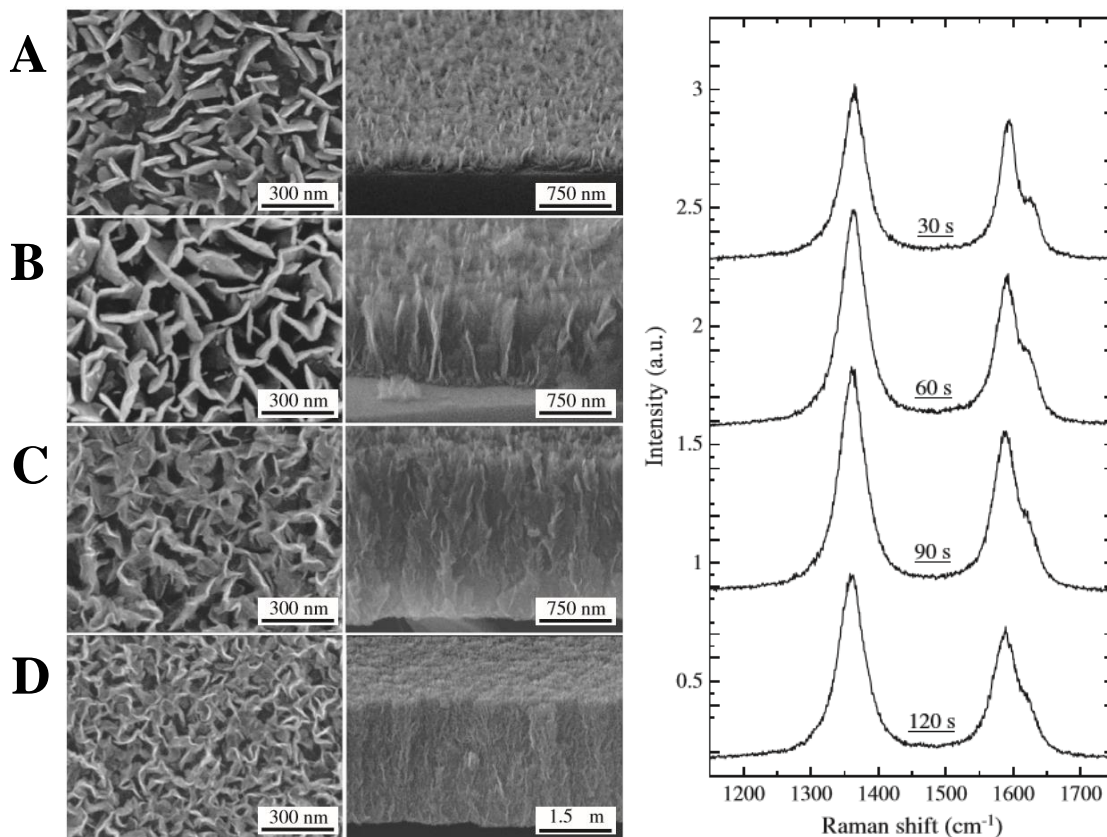


Figure IV.12: A gauche, images MEB de CNWs produits sur du silicium pour un temps de traitement de A) 30s, B) 60 s, C) 90 s et D) 120s (vue du dessus et coupe transversale) et à droite spectres Raman de CNWs pour les différents temps de dépôt [81]

On a aussi effectué des analyses XPS sur les disques de graphite/CNWs. La Figure IV.13 représente la décomposition du pic C1s d'une électrode graphite/CNWs60s. La présence d'azote à la surface des disques graphite/CNWs n'est pas détectée (Tableau IV.1). Par ailleurs on note une légère augmentation du ratio C_{sp^3}/C_{sp^2} avec la durée de formation des CNWs. Cette observation est en adéquation avec les résultats obtenus en spectroscopie Raman par S.Mori sur le fait que la cristallinité du graphite diminue avec la croissance des CNWs.

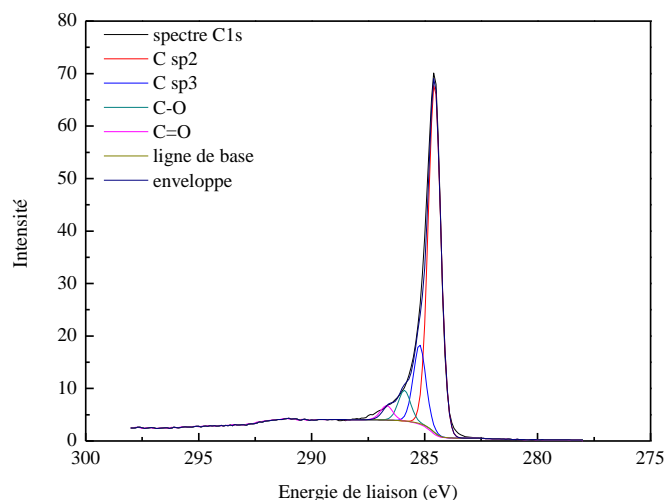


Figure IV.13 Spectre XPS et décomposition du pic C1s d'une électrode graphite/CNWs60s

Tableau IV.1: Spectres XPS C1s et leur décomposition pour les électrodes graphite/CNWs60s et graphite/CNWs120s

	C1s			O1s	O/C	N1s
	C sp ²	C sp ³	Csp ³ /Csp ²			
graphite/CNWs60s	74	16,5	0,22	2	0,022	-
graphite/CNWs120s	70,2	18	0,25	1,9	0,021	-

IV.2.2.Détermination de la surface électroactive d'une électrode graphite/CNWs

On a déterminé la surface électroactive des électrodes graphite/CNWs en étudiant le comportement électrochimique du couple $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ par voltampérométrie cyclique à différentes vitesses de balayage (Figure IV.14). La surface électroactive de l'électrode a été déterminée en utilisant la relation de Randles-Sevcik. Ainsi, en traçant $i_p = f(v^{1/2})$ on obtient une droite dont la pente permet de déterminer la surface électroactive de l'électrode. Pour les électrodes graphite/CNWs120s et graphite/CNWs60s, on mesure une surface de 0,25 cm² et 0,18 cm² respectivement. Ces résultats sont inférieurs à la surface géométrique du graphite qui est de 0,38 cm². Cette sous-estimation manifeste de la surface de l'électrode peut résulter de l'hydrophobicité de la surface. On a donc traité la surface de l'électrode graphite/CNWs60s par jet plasma à la pression atmosphérique dans des conditions de traitement plasma utilisées dans le cadre d'un travail antérieur de fonctionnalisation de la surface du graphite nu (sans nanowalls de carbone) [3] afin de rendre la surface des nanowalls

de carbone hydrophile. Après ce traitement, on a mesuré une surface électroactive de 1,2 cm² qui est certes trois fois supérieure à la surface géométrique mais ne semble pas être en adéquation avec les images obtenues par MEB.

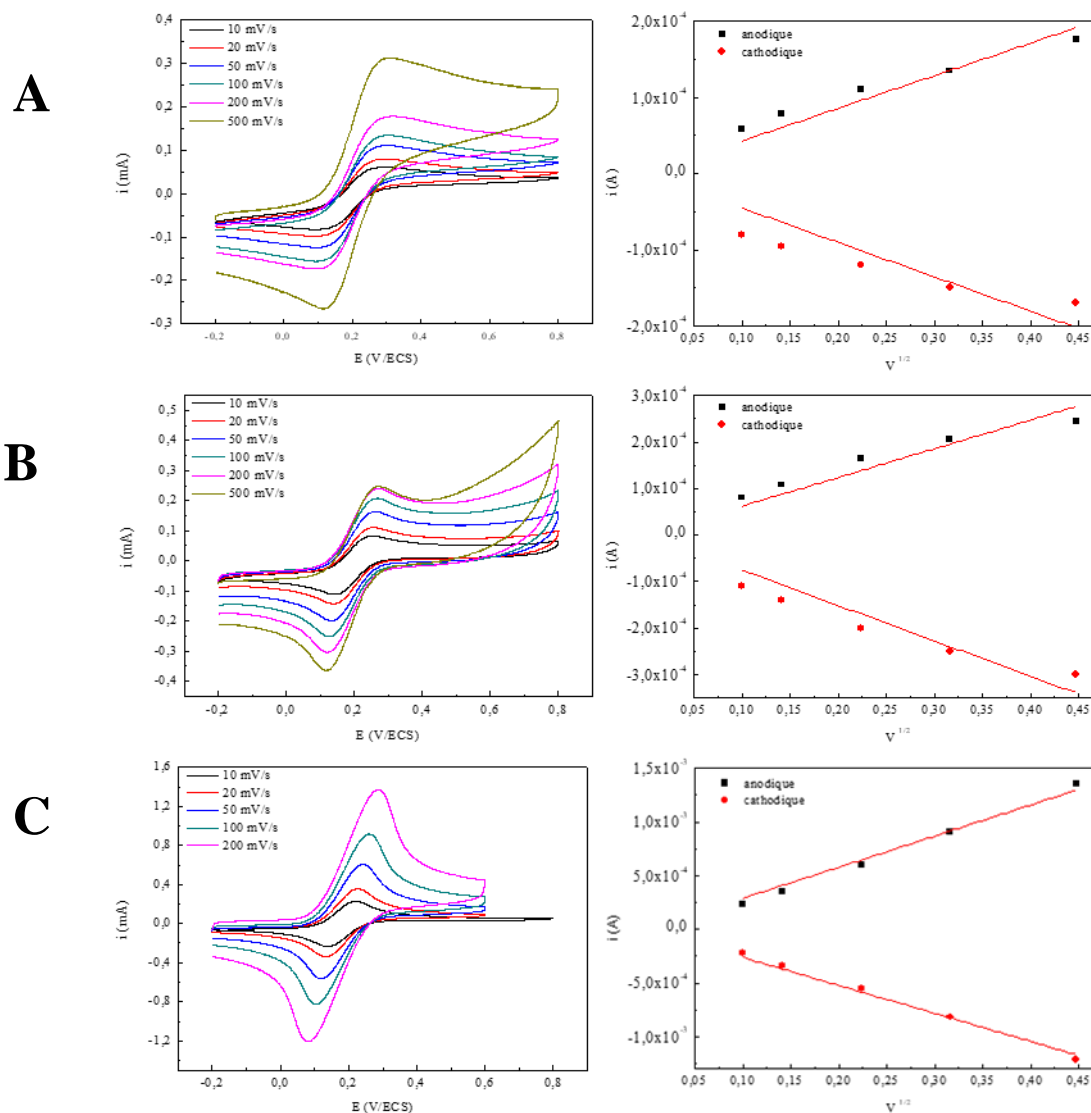


Figure IV.14: A gauche, voltampérogrammes d'une électrode A) graphite/CNWs60s, B) graphite/CNWs120s et C) graphite/CNWs60s fonctionnalisée par traitement plasma à pression atmosphérique dans une solution 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ en utilisant comme sel de fond 0,1 M de KCl et à droite les droites anodiques et cathodiques $i_p = f(v^{1/2})$ correspondantes

IV.2.3. Performances d'une électrode graphite/CNWs: essais préliminaires

Ardhaoui *et al.* [3] ont fonctionnalisé par jet plasma à la pression atmosphérique des électrodes de graphite en utilisant comme gaz plasmagène de l'oxygène, de l'air ou de l'azote. Le dispositif expérimental de traitement plasma APPJ est identique au notre. Ils ont immobilisé sur ces électrodes la laccase de *Trametes versicolor* et ont étudié l'effet de la variation de divers paramètres de traitement plasma tels que le Plasma Cycle Time (100, 50 ou 30 %), le nombre de passage de la torche sur l'échantillon (1 ou 3 passages) et le type de gaz plasmagène (oxygène, air ou azote). La distance torche-échantillon, la fréquence de pulsation et la vitesse de déplacement de la torche étant égales à 1 cm, 21 kHz et 15 m/min respectivement. Ils ont obtenu des densités de courants maximales de l'ordre de $-100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ après l'immobilisation covalente de la laccase pour un PCT de 100 % et un seul passage de la torche ou un PCT de 30 % et trois passages de la torche sur le graphite. Dans notre travail, on a décidé de fixer le PCT à 80 %, la distance entre la torche et l'échantillon à 1 cm, la vitesse de déplacement de la torche à 10 m/min, le débit de gaz à 2000 L/h, la fréquence à 21 kHz et le nombre de passages de la torche à 1 ou 2 passages. Deux types de gaz plasmagène ont aussi été utilisés (azote ou air). L'enzyme a été immobilisée à la surface de l'électrode soit par adsorption soit par greffage covalent en utilisant l'agent de couplage EDC-NHS quelques minutes après la fonctionnalisation des électrodes par plasma à la pression atmosphérique.

IV.2.3.1. Analyse XPS après traitement APPJ

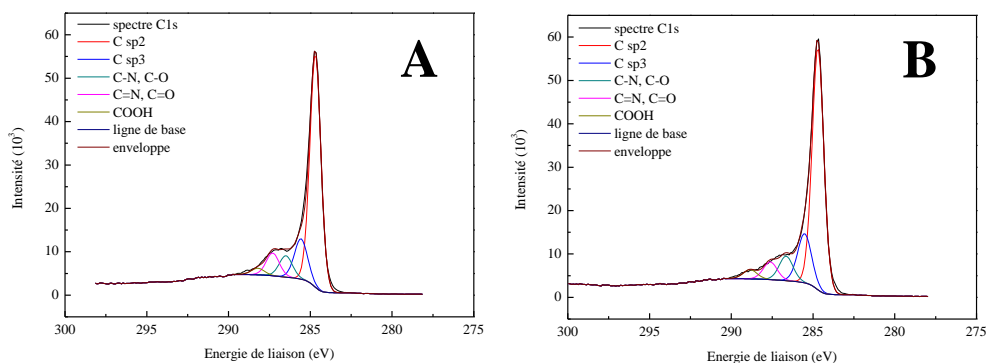


Figure IV.15: Spectre XPS et décomposition du pic C1s d'une électrode graphite/CNWs120s ayant subi un traitement APPJ avec un seul passage de la torche A) à l'air et B) à N₂

On observe d'après les spectres XPS (Figure IV.13 et Figure IV.15) un élargissement du pic C1s après traitement plasma (azote ou air) avec notamment l'apparition d'un pic à 288,4 eV

caractéristique des groupements carboxyliques. Le traitement plasma (azote ou air) a aussi permis de créer des groupements azotés à la surface des électrodes. D'après le Tableau IV.2, on observe que le ratio O/C a été multiplié par environ dix pour les deux types de traitement et que ce ratio est dix fois supérieur au ratio N/C. Ceci laisse à penser que nous avons à la surface des électrodes graphite/CNWs majoritairement des groupements oxygénés.

Dans le cas de la variation du nombre de passage de la torche sur l'échantillon, on note une augmentation du ratio C_{sp^3}/C_{sp^2} et du pourcentage en groupements carboxyliques lorsque le nombre de passages augmente pour les deux types de gaz plasmagène. Le ratio N/C est constant et assez faible.

Les groupements carboxyliques ont été quantifiés par XPS (Tableau IV.3). Les résultats montrent que le plasma à l'azote permet d'avoir une plus grande densité en groupements carboxyliques que le plasma à l'air. Ce résultat est contre intuitif. Certes le gaz plasmagène est de l'azote mais le traitement plasma s'effectue à l'air à la pression atmosphérique, d'où la présence d'oxygène qui permet de former des groupements oxygénés. Par ailleurs, on observe que l'augmentation du nombre de passage s'accompagne par une augmentation de la densité des COOH.

Tableau IV.2: Spectres XPS C1s et leur décomposition pour les différentes conditions de traitement plasma (pourcentages et ratios)

Energie de liaison (eV)		284,6	285,4	286,3	287,2	288,4	O/C	N/C	C_{sp^3}/C_{sp^2}
Composition		C sp ²	C sp ³	C-O	C=O	COOH			
Traitement plasma à l'azote									
graphite/CNWs60s	1p	66,5	16,3	8,1	5,8	3,0	0,15	$8,6 \cdot 10^{-3}$	0,24
graphite/CNWs120s	1p	65,8	15,7	8,6	7,0	2,9	0,15	0,011	0,23
	2p	64,0	16,4	9,8	6,5	3,1	0,16	0,011	0,25
Traitement plasma à l'air									
graphite/CNWs60s	1p	71,5	13,2	7,4	5,7	2,0	0,12	0,01	0,18
	2p	66,9	14,9	8,4	6,9	3,0	0,14	0,011	0,22
graphite/CNWs120s	1p	68,0	14,2	7,5	8,0	2,3	0,14	$8,4 \cdot 10^{-3}$	0,20
	2p	64,2	16,5	8,6	7,8	3,0	0,16	0,011	0,25

* :1p = 1 passage ; 2p = 2 passages

Tableau IV.3: Quantification des groupements carboxyliques présents à la surface des électrodes graphite/CNWs pour les différentes conditions de traitement plasma (APPJ)

		COOH (10^{-9} mol/cm ²)	COOH (10^{14} molécules/cm ²)
Traitement plasma à l'azote			
graphite/CNWs60s	1p	1,7	10,2
graphite/CNWs120s	1p	1,6	9,9
	2p	1,8	10,9
Traitement plasma à l'air			
graphite/CNWs60s	1p	1,2	7,4
	2p	1,7	10,2
graphite/CNWs120s	1p	1,3	8,0
	2p	1,7	10,2

IV.2.3.2. Performances bioélectrobiocatalytiques

La quantification du courant de réduction du dioxygène biocatalysée par la laccase sur les électrodes graphite/CNWs a été effectuée à un potentiel égal à 0,2 V/ECS, un potentiel où aucun courant faradique ne peut être observé en l'absence d'oxygène dans la solution (Figure IV.16). On a aussi effectué les mesures de courants sur du graphite nu (sans nanowalls de carbone) afin de pouvoir comparer les résultats entre une surface nanostructurée et une surface électroactive de graphite égale à 0,80 cm² (Chapitre III). On constate tout d'abord que les électrodes graphite/CNWs120s permettent généralement d'obtenir des densités de courants plus importantes que les électrodes graphite/CNWs60s. La densité de courant la plus importante a été observée dans le cas d'une électrode graphite/CNWs120s ayant subi un traitement plasma à l'azote et sur laquelle la torche n'a effectué qu'un seul passage. On a mesuré une densité de courant égale à $-433,4 \pm 21,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. On a réussi à multiplier par huit la densité de courant par comparaison à une surface de graphite nu. Concernant le type de gaz plasmagène, on observe qu'un plasma azote permet d'obtenir de meilleures densités de courant qu'un plasma air. Ceci peut être expliqué par la présence d'une plus grande densité de groupements carboxyliques à la surface des électrodes. Dans le cas de la variation du nombre de passage, on remarque qu'un deuxième passage de la torche plasma sur les deux types d'électrodes (graphite/CNWs60s et graphite/CNWs120s) diminue les courants de réduction mis à part dans le cas de l'électrode graphite/CNW120s ayant subi avant greffage de la laccase un traitement plasma d'air en 2 passages ($-489,5 \pm 70 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Cette diminution générale des densités de courant mesurées

peut être expliquée par l'augmentation du ratio C_{sp^3}/C_{sp^2} . La présence d'une quantité plus importante de carbone sp^3 induit une baisse de la conductivité du matériau de l'électrode et peut ainsi expliquer cette baisse de courant. Concernant le type d'immobilisation, on constate que quelles que soient les conditions de traitement plasma l'immobilisation de la laccase par adsorption fournit les densités de courants les plus faibles. La plus faible densité de courant ($-23,9 \mu A/cm^2$) a été mesurée pour une électrode graphite/CNWs120s ayant subi un traitement plasma azote et sur laquelle la torche a effectuée deux passages.

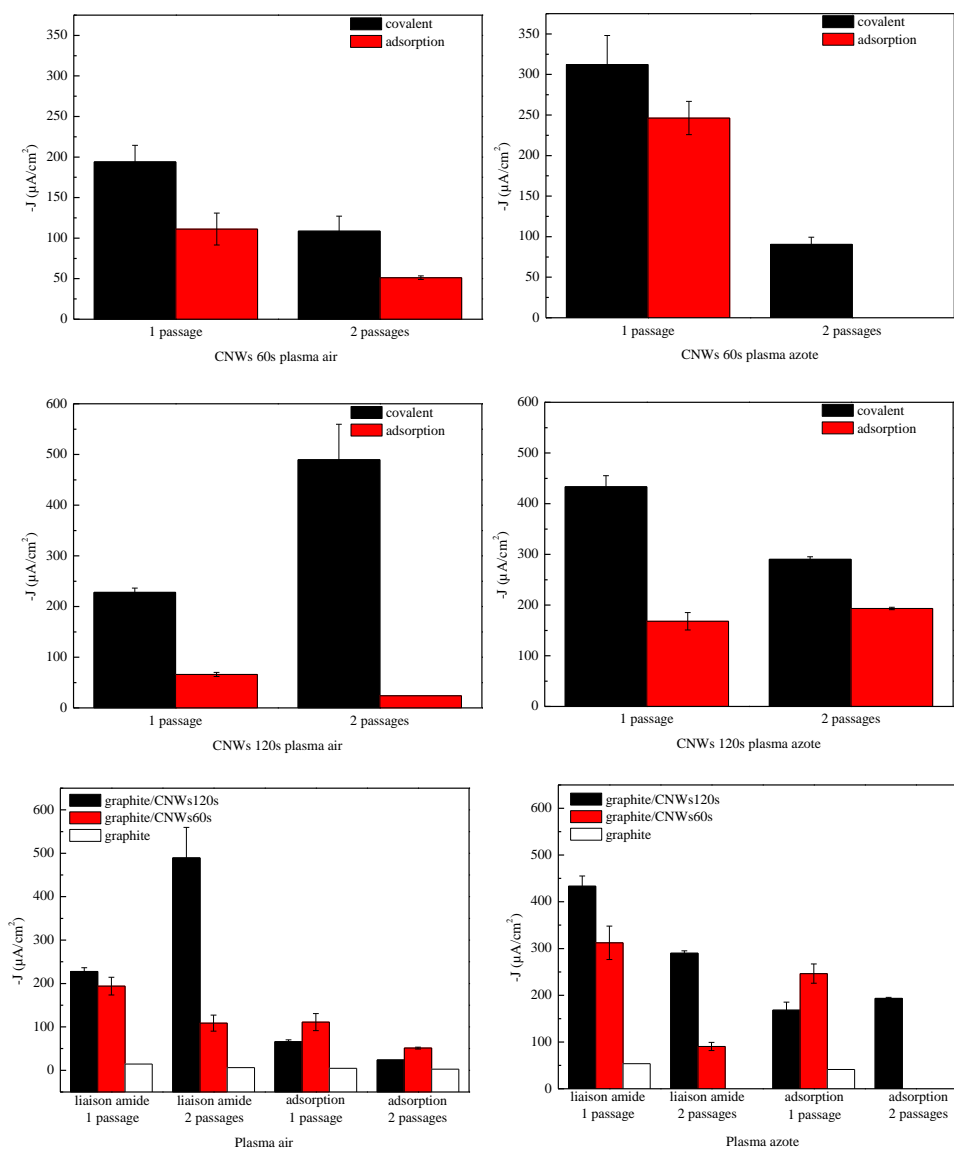


Figure IV.16: Densités de courant obtenues pour les différentes conditions de traitement APPJ, formation des CNWs et d'immobilisation de la laccase

IV.2.4.Optimisation des conditions de traitement plasma par la mise en place de plans d'expériences

L'objectif ultime de cette étude est d'optimiser les paramètres de fonctionnalisation des électrodes graphite/CNWs. Pour rappel, les conditions de traitement plasma des expériences préliminaires dont les résultats sont exposés dans les paragraphes précédents de ce chapitre sont : une distance entre la torche et le support égale à 1 cm, une vitesse de déplacement de la torche de 10m/min, un PCT de 80 % et une fréquence de pulsation de la décharge de 21kHz, et un débit de gaz de 2000 L/h. On a fait varier le nombre de passages de la torche sur l'échantillon (un ou deux passages) ainsi que le type du gaz introduit dans la torche plasma (air ou azote). Suite à cette étude, on a conclu que l'utilisation de l'azote comme gaz plasmagène et un seul passage de la torche permettaient d'obtenir des courants catalytiques de réduction du dioxygène plus importants. Globalement, ces résultats nous ont amenés à dire que les conditions de traitement plasma « douces » conduisent à de meilleurs résultats en termes de courant.

Dans une recherche de ce type de traitement plasma, on a tout d'abord essayé d'utiliser une torche à buse rotative. Ce type de torche génère un plasma moins agressif qu'une torche à buse fixe et nous a permis d'obtenir de meilleurs résultats en terme de courant de réduction du dioxygène. On a mesuré une densité de courant égale à $-300,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ en utilisant l'azote en tant que gaz plasma et en effectuant deux passages sur l'échantillon (les autres paramètres étant identiques à ceux utilisés pour la torche à buse fixe). Cependant le risque d'un traitement non homogène du support par une torche à buse rotative est grand. En effet, cette dernière effectue des mouvements circulaires lors de son déplacement et certaines zones risquent d'être non traitées sur l'échantillon. On a donc choisi de continuer à utiliser la torche à buse fixe mais en modifiant les conditions expérimentales du traitement plasma. Etant limités en terme de nombre d'échantillons (les CNWs sont fabriqués au Japon), on a décidé d'effectuer dans un premier temps l'étude d'optimisation sur du substrat graphitique nu.

IV.2.4.1.Optimisation des conditions de traitement plasma atmosphérique sur électrodes de graphite nu

IV.2.4.1.1.Plan d'expérience factoriel fractionnaire

Dans un premier temps on a mis en œuvre un plan d'expérience factoriel fractionnaire. L'objectif est de déterminer les facteurs influents de fonctionnalisation des électrodes graphite nu parmi les principaux paramètres expérimentaux déterminant le traitement plasma. Les

facteurs susceptibles d'avoir une influence sur le traitement plasma sont au nombre de quatre (on garde la fréquence de pulsation constante et égale à 21 kHz). On aura donc un plan faisant intervenir quatre facteurs prenant chacun deux niveaux (un niveau bas et un niveau haut), c'est-à-dire un plan à 2^{4-1} (huit expériences). On distingue :

-Le Plasma Cycle Time (PCT). L'appareil « plasmatreteat » permet de produire deux régimes de puissance bien distincts : un régime à faible puissance (PCT entre 10 et 40%) et un régime à haute puissance (PCT entre 70 et 100 %). On a choisi deux valeurs chacune représentatives d'un des régimes (30 % et 80 %).

-La distance séparant la torche du substrat permet de contrôler d'une part l'effet thermique du plasma sur l'échantillon et d'autre part de modifier la fonctionnalisation de surface. Elle a été sélectionnée suite à des mesures d'angle de contact en faisant varier cette distance entre 0,5 cm et 2,0 cm en gardant comme conditions de traitement un PCT de 80 %, une vitesse de 10 m/min, un débit de 2000 L/h et de l'azote en tant que gaz plasmagène (Figure IV.17). On a observé, que lorsque la distance entre la torche et le substrat augmente, la surface devient de moins en moins hydrophile (Figure IV.18, Tableau IV.4) puisque l'angle θ augmente en fonction de la distance. Les expérimentations réalisées sur les électrodes graphite/CNWs dans la partie précédente ont été effectuées à une distance de 1 cm. On a fixé comme niveau bas une distance égale à 1 cm et choisi comme niveau haut une distance égale à 1,5 cm pour ne pas avoir une surface d'hydrophobicité trop élevée comme le montrent les résultats d'angle de contact. L'hypothèse que l'on fait à ce stade de l'étude d'avoir une surface assez hydrophile afin de pouvoir par la suite y greffer l'enzyme.

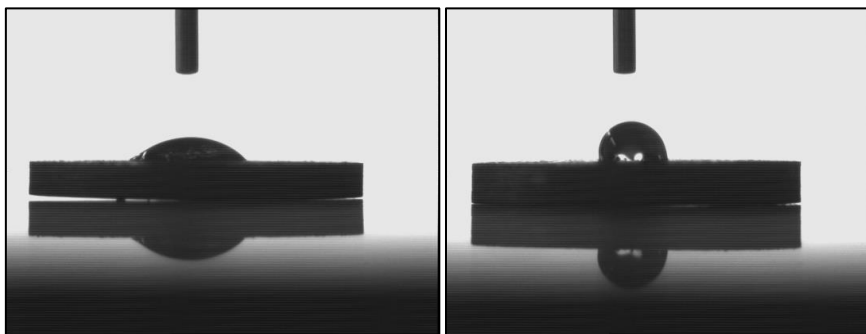
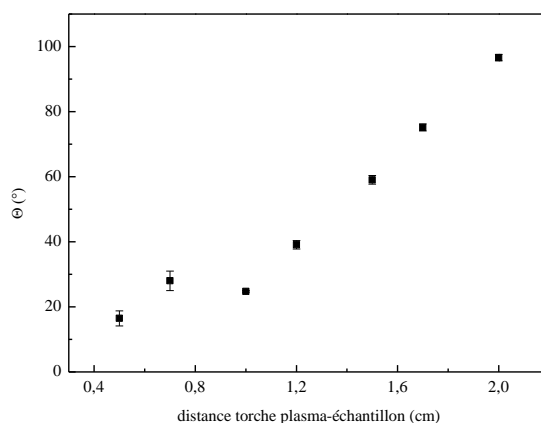


Figure IV.17 Clichés obtenus lors de la mesure d'angles de contact. Une goutte d'eau ($V = 1\mu\text{L}$) est déposée à la surface du substrat pour une distance de traitement plasma entre la torche et l'échantillon égale à 1,0 cm à gauche et 2,0 cm à droite

Tableau IV.4: Variation de l'angle θ en fonction de la distance de traitement plasma APPJ sur graphite nu

N°	d (cm)	Angle θ (°)
1	0,5	16,5 ± 2,3
2	0,7	28,0 ± 3,0
3	1,0	24,8 ± 0,2
4	1,2	39,1 ± 1,3
5	1,5	59,0 ± 1,3
6	1,7	75,1 ± 1,1
7	2	96,6 ± 1,0

**Figure IV.18:** Evolution de l'angle de contact eau/substrat graphitique en fonction de la distance de la torche

-La vitesse de déplacement de la torche détermine la durée de contact entre le plasma et l'échantillon. Plus elle est grande, plus la durée de traitement sera faible. On a fixé comme niveau bas une vitesse de 10 m/min et comme niveau haut une vitesse de 20 m/min.

-Le débit du gaz plasmagène caractérise aussi la puissance du plasma. A puissance constante, le fait d'augmenter le débit diminue l'intensité du plasma. L'énergie disponible est distribuée entre un plus grand nombre de molécules. On a choisi un débit de 1000 L/h (niveau bas) et de 2000 L/h (niveau haut).

Le tableau ci-dessous résume les niveaux de variation fixés pour chaque facteur (Tableau IV.5).

Tableau IV.5: Niveaux et valeurs de chaque facteur étudié

Variables (facteurs)		Niveaux	
		-1	1
1	Plasma Cycle Time (PCT) %	30	80
2	Distance torche substrat (d) cm	1	1,5
3	Vitesse de la torche (V) m/min	10	20
4	Débit du gaz plasma (D) L/h	1000	2000

Les conditions expérimentales des huit expériences du plan factoriel fractionnaire ont été déterminées grâce à un calcul matriciel. Elles sont regroupées dans le tableau ci-dessous (Tableau IV.6).

Tableau IV.6: Conditions expérimentales du plan d'expériences factoriel fractionnaire

N°	PCT (%)	d (cm)	V (m/min)	D (L/h)
1	30	1	10	1000
2	80	1	10	2000
3	30	1,5	10	2000
4	80	1,5	10	1000
5	30	1	20	2000
6	80	1	20	1000
7	30	1,5	20	1000
8	80	1,5	20	2000

Pour chaque combinaison, une mesure d'angle de contact et une analyse XPS, qui a permis de calculer le taux de recouvrement de la surface par les groupements carboxyliques avant greffage de l'enzyme, ont été réalisées. Après immobilisation de la laccase, des mesures de courants de réduction du dioxygène et d'activité enzymatique de la laccase immobilisée ont été effectuées afin de déterminer les facteurs du traitement plasma les plus significatifs parmi les quatre testés. Comme précisé dans le chapitre II, la laccase a été greffée de manière covalente. Pour rappel, les mesures de courant sont réalisées dans un tampon acétate 50 mM, pH = 4,2

avec 0,1 M de NaClO_4 . Le courant est calculé en soustrayant le courant mesuré dans une solution saturée en oxygène au courant mesuré en absence d'oxygène, à un potentiel de 0,2 V/ECS. L'activité enzymatique est déterminée en utilisant comme substrat l'ABTS.

Le Tableau IV.7 regroupe l'ensemble des résultats obtenus. Concernant les résultats de densité de courant, on observe que la densité de courant la plus élevée a été obtenue pour l'expérience 7, c'est-à-dire pour un PCT de 30 %, une distance torche-échantillon égale à 1,5 cm, une vitesse de 20 m/min et un débit de 1000 L/h. On a mesuré une densité de courant égale $-102,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Cette densité est deux fois plus élevée que la valeur de référence ($\sim -53,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), c'est-à-dire les densités de courant mesurées sur graphite avant l'élaboration du plan d'expérience (PCT = 80 %, $d = 1 \text{ cm}$, $V = 10 \text{ m/min}$ et $D = 2000 \text{ L/h}$). La densité de courant la plus faible, lors de la réalisation de ce plan d'expériences, a été obtenue pour l'expérience 1 (PCT = 30 %, $d = 1 \text{ cm}$, $V = 10 \text{ m/min}$ et $D = 1000 \text{ L/h}$). Ce résultat pourrait être expliqué par le caractère fortement hydrophobe de la surface du graphite.

On observe par ailleurs que plus l'hydrophobicité de la surface est élevée, plus les courants obtenus sont importants (en ne prenant pas en considération l'expérience 1). Le traitement plasma doit permettre de fonctionnaliser la surface du graphite, qui est très hydrophobe avant traitement (angle θ égale à 100°) en introduisant des groupements fonctionnels hydrophiles. Donc à priori, on pourrait penser que plus le traitement plasma est efficace, c'est-à-dire plus la surface traitée est hydrophile et moins l'enzyme adsorbée en surface serait dénaturée, et donc pourrait donner de forts courants. Or les résultats expérimentaux montrent la tendance inverse. Deux hypothèses peuvent l'expliquer : le lien n'est pas forcément direct entre l'activité de la laccase et le courant, on peut supposer que l'orientation de l'enzyme à la surface a également un rôle, ce qui relativise le raisonnement précédent. D'autre part, le traitement plasma s'il est trop poussé peut conduire à des phénomènes de gravure de la surface, avec pour conséquence une diminution de la conductivité du matériau d'électrode. Ainsi les résultats de l'analyse XPS avant et après traitement plasma APPJ montrent une augmentation du pourcentage de carbone sp^3 , au détriment du carbone sp^2 . (Tableaux IV.1 et IV.2). Concernant l'activité enzymatique et le taux de recouvrement, aucune corrélation ne peut être dégagée avec les densités de courant mesurées. Dans le cas de la quantification des groupements carboxyliques par la méthode chimique, les taux de recouvrement sont assez proches quel que soit le type de traitement. On note de plus que les valeurs de densité des groupements carboxyliques, toujours supérieures à

10^{-8} mol/cm² sont très élevées. Des résultats similaires ont été rapportés dans le travail de M. Zheng, dans le cas de graphite fonctionnalisé par électroréduction du 4-carboxybenzène diazonium [42]. A titre de comparaison, la densité atomique des atomes de carbone graphite est égale à $7,3 \cdot 10^{-9}$ mol/cm² sur le plan basal. Il paraît peu vraisemblable que le traitement plasma ait pu conduire à une densité de groupements fonctionnels supérieure à cette valeur. On peut donc penser que la densité de groupements carboxyliques déterminée par la méthode au TBO est largement surestimée.

Tableau IV.7: Caractérisation des électrodes de graphite fonctionnalisées en fonction des conditions de traitement par plasma APPJ fixées selon le plan d'expérience fractionnaire

N°	Angle θ (°)	-J ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	Activité ($\mu\text{U}/\text{cm}^2$)	Recouvrement COOH ($\times 10^{-8}$ mol/cm ²)
1	97	36,1	11,3	4,22
2	24,8	63,8	10,5	3,94
3	55,7	64,8	12,9	3,90
4	38,1	63,3	6,1	3,30
5	35,1	79,6	4,5	4,17
6	45,7	82,9	5,3	4,35
7	70,9	102,6	3,2	4,36
8	68,4	97,5	16,8	4,85

La méthode de Pareto a été ensuite utilisée afin de classer les facteurs par ordre croissant d'influence (Figure IV.19). Pour le courant, les facteurs les plus significatifs (coefficients dont la somme des P_i est supérieure à 80 %) sont la distance torche-échantillon (b'_2) et la vitesse de déplacement de la torche (b'_3). Plus ils augmentent, plus le courant est élevé. Pour l'activité enzymatique, le débit de gaz plasma est l'unique facteur fort (b'_4). Le temps de traitement intervient aussi dans deux interactions fortes. Le PCT (b'_1) n'est jamais un facteur fort (sauf dans le cas de l'activité enzymatique (b'_{13}), mais il est cependant difficile d'interpréter des interactions aliasées entre elles). Pour les mesures d'angle de contact, les facteurs forts sont

aussi la distance et la vitesse de traitement. Plus ils augmentent, meilleur est le courant. On peut donc conclure que ces deux facteurs sont les plus importants.

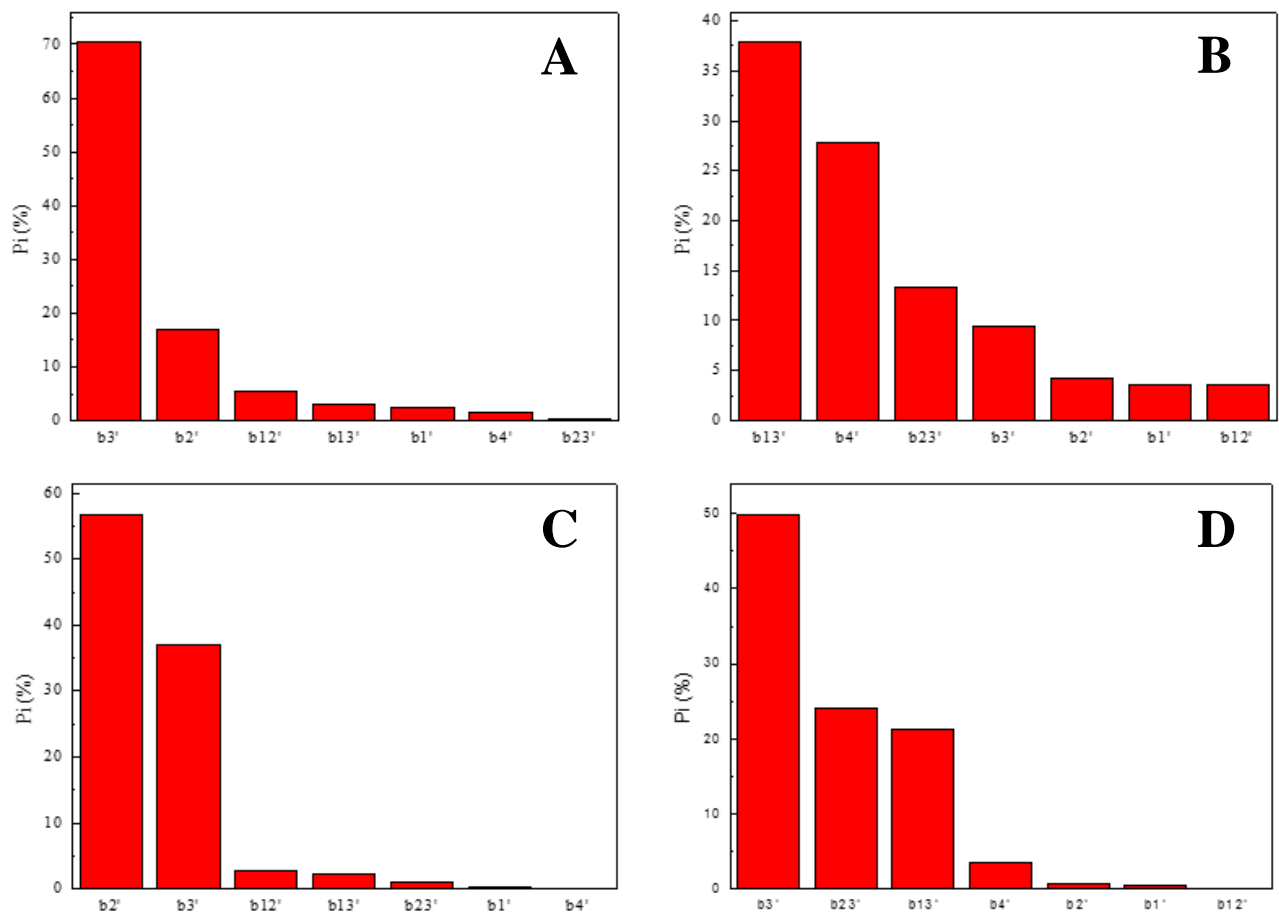


Figure IV.19: Pi calculés par la méthode Pareto et classés par ordre décroissant pour différentes caractéristiques cible A) le courant catalytique de réduction, B) l'activité enzymatique C) angle de contact et D) le taux de recouvrement en COOH

En conclusion, ce plan factoriel fractionnaire nous a permis de déterminer les facteurs ayant une influence sur les performances des électrodes. Ce sont la distance et la vitesse de la torche plasma. On a dans un deuxième temps décidé d'effectuer un nouveau type de plan d'expérience dans lequel nous ferons varier uniquement ces deux facteurs tout en gardant les autres fixes, ceci afin d'affiner les paramètres de fonctionnalisation par plasma et de consolider les résultats obtenus.

IV.2.4.1.2. Plan d'expérience composite

Le plan d'expérience choisi est de type composite. Il permet d'affiner les résultats obtenus avec le plan fractionnaire en explorant un espace expérimental proche des conditions expérimentales les plus favorables mises en évidence par le plan fractionnaire et plus dense afin d'espérer localiser un optimum. On a fixé un débit de gaz à 2000 L/h et un PCT à 80 %. On a obtenu les meilleurs résultats en densité de courant avec un PCT à 30 % mais cette option a été écartée. En effet, d'une part, l'analyse Pareto a montré que le PCT n'est pas un facteur déterminant, ce que l'on observe notamment en comparant les expériences 7 et 8 qui conduisent à une densité de courant du même ordre, aux erreurs expérimentales près. D'autre part, on a estimé qu'il est préférable pour l'étape d'immobilisation de l'enzyme de ne pas avoir une surface trop hydrophobe, qui risque de conduire à une dénaturation de l'enzyme. On a fait varier la distance entre la torche et l'échantillon (facteur 1) et la vitesse de déplacement de la torche (facteur 2) dans des intervalles [1, 2] et [20, 50] respectivement. Le Tableau IV.8 regroupe les différentes combinaisons des conditions expérimentales du plan composite pour les deux facteurs testés.

Tableau IV.8: Conditions expérimentales du plan d'expérience composite

N°	d (cm)	V (m/min)
1	1,20	24,0
2	1,60	24,0
3	1,20	42,0
4	1,60	42,0
5	1,12	33,0
6	1,68	33,0
7	1,40	20,3
8	1,40	45,7
9	1,40	33,0

On a mesuré pour chacune des expériences décrites dans le Tableau IV.7, les densités de courant de réduction du dioxygène par la laccase immobilisée de façon covalente quelques minutes après la fonctionnalisation du graphite (Tableau IV.9).

Tableau IV.9: Performances électrocatalytiques des électrodes graphite préparées selon le plan d'expérience composite

Expérience	d (cm)	V (m/min)	-J ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
1	1,2	24,0	104,4
2	1,6	24,0	94,7
3	1,2	42,0	95,9
4	1,6	42,0	115,1
5	1,1	33,0	18,2
6	1,7	33,0	109,7
7	1,4	20,3	97,7
8	1,4	45,7	82,4
9	1,4	33,0	40,7

La densité de courant la plus importante, $-115,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, a été obtenue pour une vitesse de $42,0 \text{ m}/\text{min}$ et une distance de $1,6 \text{ cm}$. On remarque par ailleurs que mis à part les expériences 5 et 9, les densités de courant mesurées sont assez proches les unes des autres quelles que soit la valeur de la vitesse et la distance de la torche au substrat. Ceci pourrait laisser à penser qu'on aurait atteint les limites d'optimisation du système. La Figure IV.21 compare les valeurs expérimentales des courants catalytiques d'ORR (valeurs en vert) avec celles calculées à partir du modèle polynomial (valeurs en noir) dont les paramètres ont été déterminés grâce au plan d'expérience. On observe que si certains points sont bien prédits par le modèle, avec un écart relatif entre 1 et 6 % (les points noirs) d'autres (les points rouges) ont un écart assez important. Par ailleurs, on constate que dans la partie droite de la Figure IV.20 entourée d'un trait bleu, le courant varie peu quelles que soient les conditions opératoires de la fonctionnalisation plasma. Cette zone peut être qualifiée de robuste.

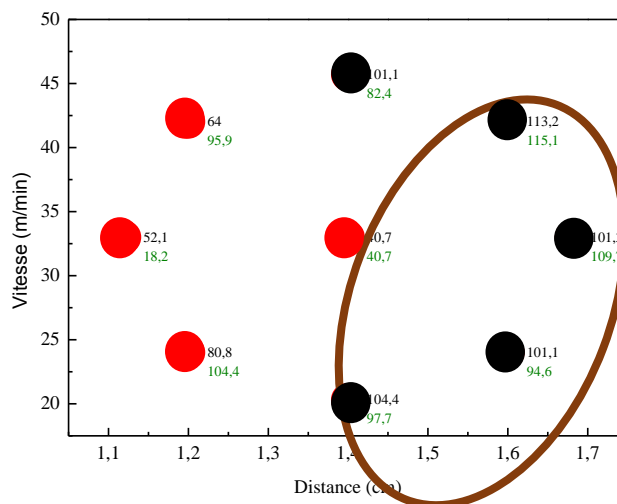


Figure IV.20: Comparaison entre les courants catalytiques de réduction de l'oxygène ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) expérimentaux (valeurs en vert) et les résultats prédits par le modèle (valeurs en noir) dans le domaine expérimental

On a aussi cherché à identifier par analyse XPS les groupements fonctionnels présents à la surface des échantillons graphite après leur fonctionnalisation par plasma APPJ selon le plan composite. On observe après décomposition du pic C1s des spectres d'XPS (Figure IV.21) l'absence de pic à 288,5 eV caractéristique des groupements carboxyliques et ce quelles que soit la vitesse et la distance de la torche. Le pic à 287,5 eV révèle la présence de groupements carbonyles mais ne permet pas de distinguer s'il s'agit de cétones ou de groupements aldéhydes.

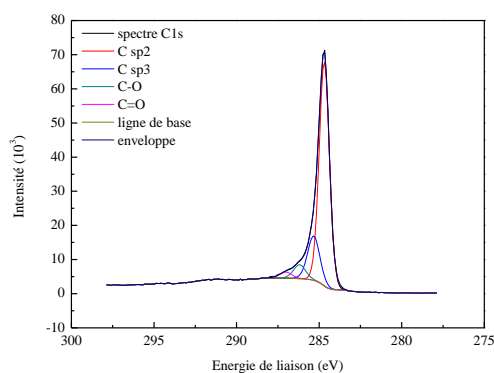


Figure IV.21: Spectre XPS et décomposition du pic C1s pour les conditions de traitement plasma $d = 1,6$ cm et $V = 24$ m/min (à partir du plan composite)

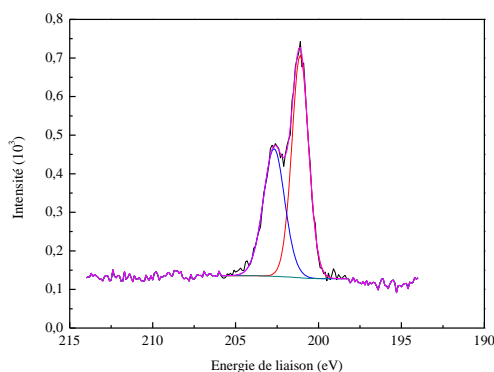


Figure IV.22: Spectre XPS et décomposition du pic Cl₂p d'une électrode de graphite issu du plan composite (expérience 7) après greffage de la molécule (hydrazide)

On a donc essayé de mettre en évidence et de quantifier ce dernier type de groupements fonctionnels en ayant recours à une molécule sonde (2-chlorobenzohydrazide). Celle-ci, après réaction sur les groupements aldéhydes de surface, s'ils existent, forme une hydrazone qui pourra être détectée par XPS grâce au signal du chlore, élément uniquement présent sur la molécule sonde. La Figure IV.22 présente un extrait du spectre XPS du support fonctionnalisé par plasma après réaction avec la molécule sonde autour de 200 eV, l'énergie représentative de Cl₂p. Cette figure montre que le pic Cl₂p présente deux pics à 200,6 eV et 202,2 eV, qui sont caractéristiques du chlore organique. La présence de ces deux pics permet de confirmer que la sonde a bien été greffée à la surface du substrat et qu'il existe donc des fonctions aldéhydes à la surface après fonctionnalisation dans les conditions présentées dans le Tableau IV.9. Le Tableau IV.10 regroupe la densité de groupements aldéhydes de surface déduite des taux de recouvrement de l'hydrazide chlorobenzoiïque.

Tableau IV.10: Taux de recouvrement des groupements aldéhydes pour les différentes conditions de traitement plasma

d (cm)	V (m/min)	I _{Cl₂p} /I _{Cl₁s}	n _{Cl₂p} ×d (×10 ⁻⁹ mol/cm ²)
1,6	24	0,0467	6,25
1,4	20,3	0,0396	5,22
1,5	20	0,0387	4,90
1,6	42	0,0370	4,52
1	10	0,0459	6,08

La présence de groupements aldéhydes à la surface du support permettrait d'immobiliser l'enzyme par formation d'une liaison covalente entre les amines de la laccase et les groupements aldéhydes du support.

En conclusion, l'utilisation du plan d'expérience composite a permis d'identifier cinq conditions expérimentales du traitement APPJ du graphite dans lesquelles on a obtenu des courants catalytiques supérieurs à $-95 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ contre deux conditions dans le plan d'expériences factoriel fractionnaire. Adoucir les conditions de traitement allait donc bien dans le bon sens. On a donc choisi pour la suite des expériences de travailler dans la zone dite robuste et de tester ces conditions sur les échantillons de graphite/CNWs.

IV.2.5. Performances des électrodes graphite/CNWs dans les conditions de traitement plasma optimisées

IV.2.5.1. Electrodes graphite/CNWs60s

On a dans un premier temps travaillé avec les échantillons graphite/CNWs formés en 60 s de traitement plasma afin de vérifier que les conditions d'optimisation déterminées avec le plan d'expérience composite sur des surfaces de graphite « nu » sont transposables aux surfaces nanostructurées de type CNWs.

IV.2.5.1.1. Conditions de traitement plasma issues du plan d'expérience composite avec électrodes de graphite/CNWs60s

On a choisi de garder les quatre conditions opératoires les plus robustes parmi celles des plans d'expériences réalisées sur les électrodes de graphite. Les conditions du traitement plasma ultérieur de fonctionnalisation à pression atmosphérique sont répertoriées dans le Tableau IV.11. A titre de comparaison, on a également traité des échantillons de graphite/CNWs60s selon les paramètres des expériences préliminaires, à savoir $d=1 \text{ cm}$ et $V=10 \text{ m/min}$. L'enzyme a ensuite été immobilisée à la surface des électrodes graphite/CNWs60s fonctionnalisées en utilisant le mélange d'agent de couplage (EDC-NHS), bien qu'il ait été montré au paragraphe précédent que les surfaces fonctionnalisées dans les conditions optimales de traitement plasma ($d=1,6 \text{ cm}$ et $V=24 \text{ m/min}$) ne permettent pas de former des groupements carboxyliques en surface, ce qui devrait rendre inutile l'utilisation d'agent de couplage EDC-NHS dans ce cas. Ce choix des conditions expérimentales d'immobilisation de la laccase a été retenu afin de

pouvoir comparer entre elles les différentes conditions de traitement plasma, avec dans chaque cas une immobilisation covalente de la laccase en surface.

Tableau IV.11: Conditions de traitement plasma retenues pour les électrodes graphite/CNWs60s

N°	d (cm)	V (m/min)
1	1,6	24,0
2	1,4	20,3
3	1,5	20,0
4	1,6	42,0
5	1	10

Nous avons comme pour les électrodes de graphite nu mesuré pour chacune des expériences décrites dans le Tableau IV.12 , les densités de courant de réduction de l'oxygène et réalisé une analyse XPS afin de caractériser la chimie de surface de l'électrode après traitement plasma de fonctionnalisation et avant immobilisation de l'enzyme.

Tableau IV.12: Performances électrocatalytiques des électrodes graphite/CNWs60s

N°	d (cm)	V (m/min)	-J ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
1	1,6	24,0	440,4
2	1,4	20,3	368,8
3	1,5	20,0	216,3
4	1,6	42,0	276,9
5	1	10	312,2

La densité de courant la plus élevée ($-440,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) a été mesurée avec des conditions de traitement plasma de 1,6 cm pour la distance torche/substrat et une vitesse de la torche de 24 m/min. Il faut rappeler qu'avant la réalisation des plans d'expériences (c'est-à-dire pour une distance de 1 cm et une vitesse de 10 m/min) une densité de courant égale à $-312,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ avait été obtenue. Le courant après optimisation n'a été multiplié que par 1,4 contrairement au cas des électrodes de graphite dit « nu », pour lequel il est passé dans les mêmes conditions de

traitement de $-41,0$ à plus de $-94,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. On remarque d'autre part que, comme dans le cas du graphite « nu », l'analyse XPS du pic C1s du carbone montre qu'il n'y a pas de composante à 288 eV significative pouvant indiquer la présence de groupements carboxyliques en surface, et ce dans aucune des conditions de traitement retenues (Figure IV.23). L'utilisation de l'hydrazide 4-chlorobenzoïque suivie d'une analyse XPS de la surface ainsi traitée a permis de mettre en évidence sur les disques de graphite nu (sans nanowalls de carbone) la présence de groupements aldéhydes. On a donc supposé que l'immobilisation covalente de la laccase peut avoir lieu via la formation d'une liaison imine entre ces groupements de surface et les lysines de l'enzyme. Ces expériences de vérification de la présence de groupements aldéhydes de surface n'ont pas été réalisées dans le cas des CNWs60s mais on peut émettre l'hypothèse que les conditions de traitement plasma APPJ étant identiques à celles utilisées sur le graphite nu, les groupements aldéhydes sont également formés dans ce cas, conduisant à l'immobilisation de la laccase via les groupements amine de ses cinq résidus lysine.

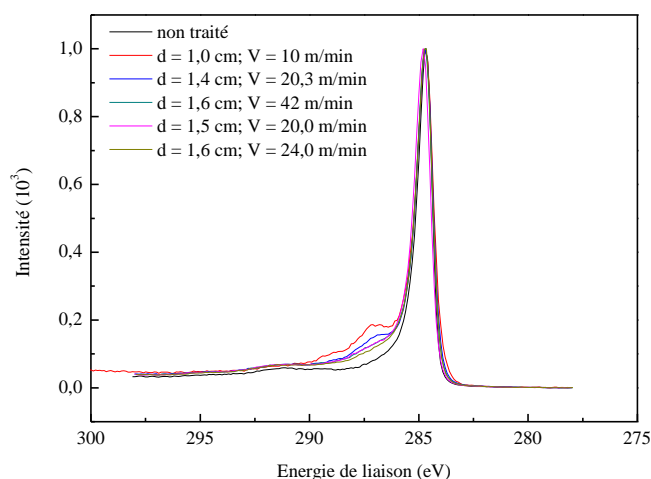


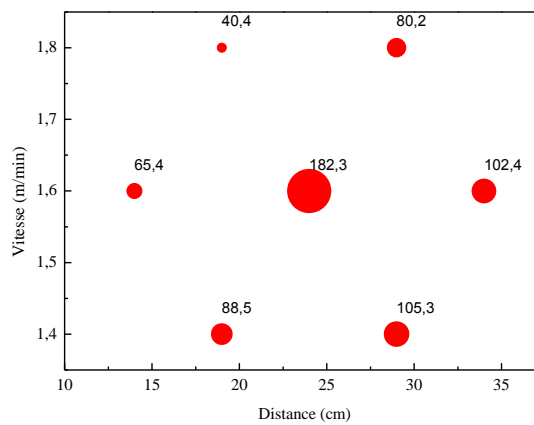
Figure IV.23: Spectre XPS et décomposition du pic C1s sur graphite/CNWs60s après fonctionnalisation par traitement plasma APPJ

IV.2.5.1.2. Plan Doehlert

On a décidé d'effectuer un plan d'expérience de Doehlert afin de vérifier qu'on est proche des conditions de traitement optimales. Le Tableau IV.13 regroupe les différentes combinaisons testées. La Figure IV.25 montre les courants bioélectrocatalytiques obtenus dans ces conditions.

Tableau IV.13: Conditions expérimentales du plan de Doehlert

N°	d (cm)	V (m/min)
1	1,6	24
2	1,6	34
3	1,8	29
4	1,8	19
5	1,6	14
6	1,4	19
7	1,4	29

**Figure IV.24:** Représentation schématique des résultats de courant catalytique de réduction de l'oxygène suite à la réalisation du plan Doehlert

On constate (Figure IV.24) que les courants mesurés dans les conditions retenues pour le plan d'expérience de type Doehlert sont toutes très significativement inférieures à celles obtenues dans les conditions dites « robustes », qui ne sont pourtant pas si différentes (excepté pour $d=1$ cm et $V=10$ m/min). Ainsi, dans les mêmes conditions de traitement plasma APPJ, on est passé d'un courant de $-440,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ à $-182,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Cette baisse significative reste inexpliquée. Cela n'empêche pas de pouvoir comparer les résultats obtenus. On observe qu'avec les plans Doehlert et composite, les conditions optimales de traitement plasma sont identiques, à savoir une distance de $d=1,6$ cm et une vitesse $V=24$ m/min.

IV.2.5.2. Electrode graphite/CNWs120s

Les conditions dites « robustes » et conduisant aux courants les plus élevés qui ont été déterminées par mise en œuvre d'un plan d'expérience composite sur des électrodes de graphite nu s'étant avérées optimales également pour des électrodes nanostructurées de type graphite/CNWs60s, les mêmes conditions ont été utilisées pour traiter les électrodes graphite/CNWs120s (Tableau IV.14).

Tableau IV.14: Performances électrocatalytiques des électrodes préparées selon les conditions robustes retenues à partir du plan d'expérience composite pour les électrodes graphite/CNWs120s

N°	d (cm)	V (m/min)	-J ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
1	1,6	24,0	193,0 \pm 101,9
2	1,4	20,3	380,5 \pm 32,4
3	1,5	20,0	425,8 \pm 57,5
4	1,6	42,0	227,4 \pm 105,2
5	1	10	433,4 \pm 21,9

On observe sur la base des courants mesurés, que les conditions optimales du traitement plasma APPJ sont une distance de 1,5 cm et une vitesse de 20 m/min. On a mesuré dans ce cas une densité de courant égale à $-425,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ soit un courant plus de deux fois plus élevé que dans les conditions qui ont permis d'obtenir un courant maximum dans le cas du graphite/CNWs60S, à savoir $d=1,6$ cm et $V=24$ m/min. Pour chacun des types de nanowalls étudiés, le courant maximal obtenu est similaire, à savoir de l'ordre de $-400 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, bien que ce courant ait été mesuré dans des conditions de traitement plasma légèrement différentes. De plus, et de façon encore plus affirmée que dans le cas du graphite/CNWs60s, l'optimisation des conditions de traitement par plasma APPJ via la mise en œuvre d'un plan d'expériences n'a pas permis d'améliorer le courant de façon significative.

Dans le cas des électrodes nanostructurées que ce soit graphite/CNWs120s ou graphite/CNWs60s, on observe que, contrairement à ce qui a été obtenu avec le graphite nu, des courants significativement différents sont obtenus dans les quatre conditions fixées. On ne peut donc plus parler dans ce cas d'une zone « robuste » de traitement plasma. Toutefois, si on

tient compte des erreurs expérimentales mesurées, on pourrait évaluer à environ $-300 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ le courant « moyen » obtenu.

IV.2.5.2.1. Immobilisation de la laccase oxydée

L'étude des surfaces de type a-CN_x a montré au chapitre II que les courants électrocatalytiques les plus élevés ont été obtenus avec une laccase oxydée. Comme d'autre part, les analyses XPS ont montré que les surfaces de graphite nanostructurées contiennent, après fonctionnalisation par plasma APPJ de l'azote (en moyenne un rapport molaire N/C de 10^{-2}), on peut de plus émettre l'hypothèse que la laccase oxydée pourrait être immobilisée de façon covalente par formation d'une liaison imine entre ses groupements glycosidiques oxydés et les amines en surface des nanowalls de carbone, ce qui pourrait conduire à une orientation différente de l'enzyme en surface, et peut-être plus favorable à l'électrocatalyse. Nous avons donc comparé les performances d'une électrode nanostructurée puis fonctionnalisée et enfin bioélectroactive par immobilisation soit de laccase naturelle soit oxydée. Dans les deux cas, l'azote constitue le gaz plasmagène, le débit du gaz est de 2000 L/h, le PCT est égal à 80 % et la torche n'effectue qu'un seul passage sur l'échantillon. Dans la première série d'expériences (set de conditions 1) on fixe une distance torche/substrat égale à 1,6 cm et une vitesse de la torche de 24 m/min. Ce sont les conditions de traitement plasma déterminées avec le plan d'expérience composite qui permettent d'obtenir le plus fort courant sur les électrodes graphite/CN_Ws60s. Le deuxième groupe de conditions est une distance de 1 cm et 10 m/min (set de condition 2), c'est-à-dire les valeurs des paramètres du plasma utilisées lors des essais préliminaires avec le graphite.

Dans le cas des électrodes graphite/CN_Ws60s, on constate (Figure IV. 25) que le set de conditions 1 permet d'avoir les meilleurs courants catalytiques et ce quelle que soit la forme de la laccase. Par ailleurs, on observe que pour un même set de conditions de traitement, laccase oxydée ou non, les courants sont assez proches. Ceci pourrait être expliqué par le fait que dans les deux sets de conditions de traitement plasma APPJ, les groupements fonctionnels présents à la surface sont soit des groupements carboxyliques (set de conditions 2) soit des groupements aldéhydes (set de conditions 1). Dans les deux cas, la laccase sera donc potentiellement immobilisée uniquement via le groupement amine de ses résidus lysines, soit par formation d'une liaison amide lorsque la laccase est non oxydée (set de conditions 2) soit par formation

d'une liaison imine lorsque l'enzyme est sous forme oxydée (set de conditions 1). Ces deux schémas d'immobilisation conduisent à une même orientation de l'enzyme, ce qui conduirait à des courants du même ordre de grandeur.

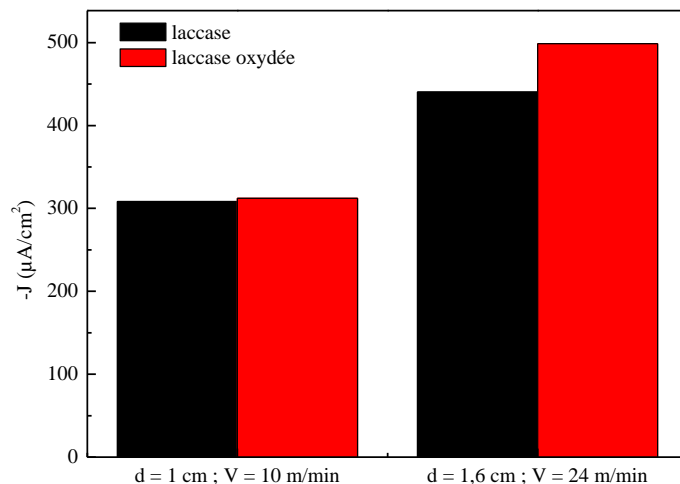


Figure IV.25: Densités de courant obtenues pour les différents sets de conditions de traitement plasma des électrodes graphite/CNWS60s après avoir immobilisé la laccase oxydée ou la laccase naturelle

Dans le cas du graphite/CNWS120s, on a élargi la comparaison entre laccase naturelle et oxydée à plusieurs types d'immobilisation, à savoir par adsorption ou par greffage covalent, avec ou sans agent de couplage. On remarque que quelles que soient les conditions de traitement plasma APPJ, l'immobilisation de la laccase (oxydée ou non) par adsorption uniquement fournit les densités de courants les plus faibles (Figure IV.26). La plus faible densité de courant est de $-273,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. La plus forte densité de courant a été mesurée à environ $-1 \text{ mA}/\text{cm}^2$ dans le cas d'une électrode graphite/CNWS120s traitée par plasma APPJ à une distance de 1 cm et une vitesse de 10 m/min sur laquelle de la laccase oxydée a été immobilisée de manière covalente, en présence du mélange EDC-NHS (le support a été activé). On observe par ailleurs que contrairement aux électrodes graphite/CNWS60s, l'immobilisation de la laccase oxydée permet d'avoir de meilleurs courants catalytiques que la laccase non oxydée. Or les électrodes graphite/CNWS120s et graphite/CNWS60s traités à $d=1 \text{ cm}$ et $V=10 \text{ m/min}$ possèdent les mêmes rapports molaires O/C et N/C et les mêmes types de groupements de surface d'après les analyses XPS (Tableau IV.2.). Comment donc expliquer le fait que la laccase oxydée conduise

à des courants plus élevés sur graphite/CNWs120s que sur graphite/CNWs60s? Cela pourrait être dû au fait que vu la structure (sous forme de chou-fleur) des nanowalls de carbone, la laccase a tendance en plus de s'immobiliser de manière covalente à la surface à être piégée au sein de cavités. La laccase oxydée ayant une taille plus petite que la laccase non oxydée, elle aura plus de facilité d'accès aux espaces confinés.

Afin de confirmer cette hypothèse, on a cherché à quantifier la laccase immobilisée à la surface des électrodes à partir des résultats de l'analyse XPS en utilisant le modèle mathématique détaillé dans le chapitre a-CN_x basé sur l'utilisation du rapport des intensités entre le signal du cuivre et celui du carbone. On a également utilisé le rapport I_{N1s}/I_{C1s} car il n'a pas été possible de détecter le signal du cuivre sur l'ensemble des électrodes analysées.

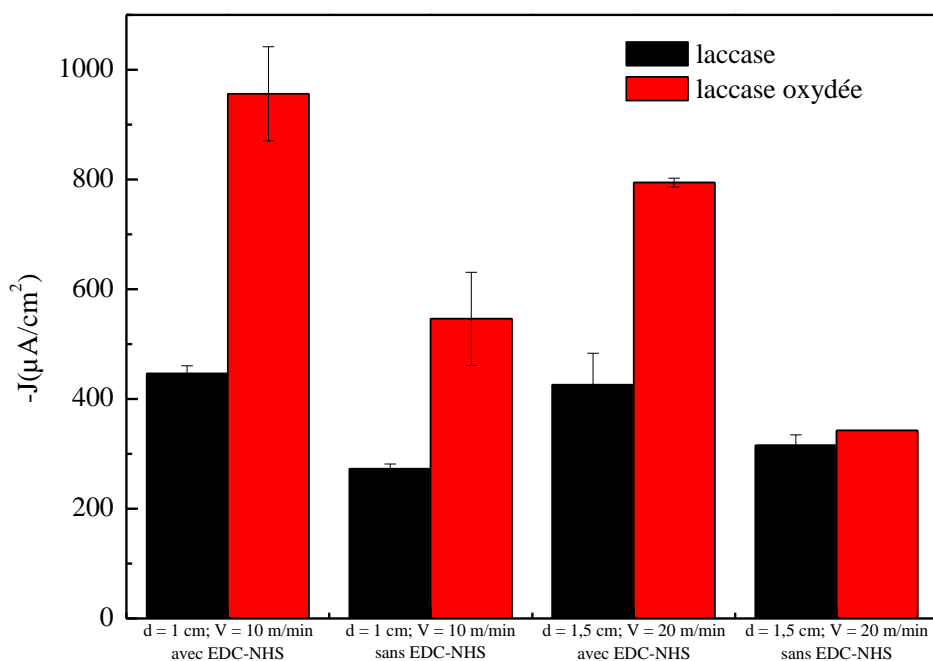


Figure IV.26: Densités de courant obtenues pour les différents sets de conditions de traitement plasma des électrodes graphite/CNWs120s après avoir immobilisé la laccase oxydée ou la laccase naturelle en présence ou non d'agent de couplage (EDC-NHS)

Le Tableau IV.15 regroupe l'ensemble des résultats. Les taux de recouvrement ont été calculés en supposant que la laccase prend une forme hémisphérique à la surface de l'électrode. Si on raisonne par rapport à l'intensité du pic de l'azote, aucune conclusion claire ne peut être dégagée. Dans le cas par exemple d'une distance de 1 cm et d'une vitesse de 10 m/min, on

obtient pour l'immobilisation de la laccase naturelle des taux de recouvrement très comparables et pour l'immobilisation de la laccase oxydée des résultats qui ne vont pas dans le même sens que le courant. Par contre, si on calcule le taux de recouvrement à partir du ratio I_{Cu}/I_{C1s} , on observe que dans le cas d'un traitement plasma avec une distance de 1,5 cm et une vitesse de 20 m/min le taux de recouvrement de la laccase oxydée est deux fois supérieur à celui de la laccase non oxydée dans le cas d'une immobilisation covalente. Ce résultat est cohérent avec les courants mesurés.

Tableau IV.15: Taux de couverture de la laccase à la surface des électrodes calculé à partir du ratio I_{N1s}/I_{C1s} et I_{Cu}/I_{C1s} extrait des résultats XPS

Immobilisation	Conditions de traitement plasma							
	d = 1 cm et V = 10 m/min				d = 1,5 cm et V = 20 m/min			
	Laccase non oxydée		Laccase oxydée		Laccase non oxydée		Laccase oxydée	
	Adsorption	covalent	Adsorption	covalent	Adsorption	covalent	Adsorption	covalent
Taux de couverture à partir du pic XPS N1s								
Modèle hémisphérique								
$d_{enzyme} = 5 \text{ nm}$	0,9	0,9	0,8	0,6		0,7	1,0	1,0
$d_{enzyme} = 7 \text{ nm}$	1,1	1,1	1,0	0,8		0,9	1,2	1,2
Taux de couverture à partir du pic XPS Cu2p								
Modèle hémisphérique								
$d_{enzyme} = 5 \text{ nm}$				0,5		0,4		0,8
$d_{enzyme} = 7 \text{ nm}$				0,4		0,5		1

IV.3. Conclusion

Au cours de ce travail nous avons utilisé comme matériau d'électrode du graphite recouvert de nanowalls de carbone qui s'organisent sous forme d'un enchevêtrement de feuillets de graphène en position verticale. La surface du substrat est ainsi nanostructurée, ce qui permet d'augmenter de façon considérable sa surface géométrique. Ce type de matériau est attractif en raison des nombreuses applications dans lesquelles il peut être utilisé (électrodes pour piles à combustible [98], capteurs chimiques, batteries lithium-ion [99]). Par ailleurs le graphène constitue un matériau conducteur et constitue un matériau prometteur pour la fabrication d'électrode. Les nanowalls de carbone ont été utilisés dans ce travail pour la première fois en tant que matériau d'électrode pour une cathode de biopile enzymatique et ce contrairement aux nanotubes de carbone qui ont fait l'objet de plusieurs études. L'inconvénient des CNTs

contrairement aux nanowalls est la présence d'une grande quantité d'impuretés [100]. Une étape de purification des CNTs est donc nécessaire après leur synthèse.

On a utilisé dans ce travail pour la formation des nanowalls de carbone le dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma à excitation micro-onde (PECVD) en utilisant comme gaz plasmagène un mélange de monoxyde de carbone (CO) et de dihydrogène (H₂). Différentes durées de formation ont été testées. Une fois élaborés, les nanowalls de carbone ont subi un traitement plasma à jet atmosphérique afin de les fonctionnaliser. Le traitement plasma constitue une alternative aux traitements chimiques pour la génération de groupements fonctionnels à la surface de matériaux. On s'est intéressé au cours de ce travail au plasma atmosphérique. Il faut savoir que très peu d'études concernant l'utilisation des plasmas ont été réalisées pour générer des groupements fonctionnels sur des matériaux afin d'immobiliser des enzymes à la surface. Labus *et al.* [53] ont immobilisé de manière covalente la laccase et la tyrosinase sur des membranes d'ultrafiltration à base de cellulose et de polyamide en créant des groupements carboxyliques, amines, hydroxyle par plasma. Tastan *et al.* [54] ont quant à eux immobilisé la laccase de *Trametes versicolor* sur des membranes de polytrétrafluoroéthylène fonctionnalisées par plasma initié par radiofréquence. Ardhaoui *et al.* [3] ont fonctionnalisé du graphite par jet de plasma atmosphérique pour une utilisation en tant que matériau d'électrode pour une cathode de biopile enzymatique.

L'objectif de cette étude était d'optimiser les conditions de fonctionnalisation de ces surfaces nanostructurées par traitement plasma à la pression atmosphérique en mettant en place des plans d'expériences et ainsi augmenter les performances catalytiques de la cathode. On a dans un premier temps décidé d'effectuer les mesures de performances catalytiques sur les échantillons de graphite/CNWs (graphite/CNWs60s et graphite/CNWs120s) dans des conditions de traitement plasma fixées à partir des précédents résultats obtenus au sein du laboratoire pour la fonctionnalisation des biocathodes [3]. Suite à cette étude, on a conclu que l'utilisation de l'azote comme gaz plasmagène et des conditions plus douces de fonctionnalisation de surface permettraient d'obtenir des courants catalytiques de réduction du dioxygène plus importants. Afin d'optimiser les conditions de fonctionnalisation plasma on a réalisé une série de plans d'expériences. Etant limités en terme de nombre d'échantillons, on a décidé d'effectuer dans un premier temps l'étude d'optimisation sur du substrat graphitique nu (sans nanowalls de carbone). On a effectué tout d'abord un plan d'expérience fractionnaire afin

de déterminer les facteurs (distance torche-substrat, vitesse de déplacement de la torche, PCT et le débit de gaz plasmagène) ayant une influence sur les performances des électrodes de graphite. Suite à cette étude, on a conclu que la distance et la vitesse de la torche plasma constituent les paramètres influents. Par la suite on a décidé d'effectuer un deuxième plan d'expérience composite (toujours sur les électrodes de graphite) afin d'affiner les paramètres de fonctionnalisation par plasma et consolider les résultats obtenus. Ce plan d'expérience a permis d'atteindre des densités de courant supérieures à $-95 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ et d'identifier une zone dite robuste. Il faut savoir que dans cette zone, on ne forme que des groupements aldéhydes. Ceci n'est pas étonnant vu que les conditions de traitement sont plus douces. On oxyde moins la surface (on reste au degré d'oxydation deux du carbone) alors qu'avec des conditions plus dures, on va jusqu'à l'acide carboxylique (degré d'oxydation quatre). On a par la suite effectué les expériences sur les électrodes graphite/CNWs60s et graphite/CNWs120s afin de vérifier que les conditions d'optimisation déterminées avec le plan d'expérience composite sur les électrodes de graphite nu sont transposables aux surfaces nanostructurées de type CNWs. On a élargi la comparaison entre laccase naturelle et oxydée à plusieurs types d'immobilisation, à savoir par adsorption ou par greffage covalent, avec ou sans agent de couplage. La densité de courant maximale obtenue a été de l'ordre de $-1 \text{ mA}/\text{cm}^2$ dans le cas d'une électrode graphite/CNWs120s traitée par plasma à une distance torche-substrat de 1 cm, un PCT de 80%, un débit de 2000 L/h et une vitesse de 10 m/min sur laquelle la laccase oxydée a été immobilisée de manière covalente. La présence de nanowalls en surface du graphite a donc permis d'augmenter la densité de courant bioélectrocatalytique d'un facteur 10 par rapport à l'étude d'Ardhaoui *et al.*

Chapitre V. Etude par PM-IRRAS de l'immobilisation de la laccase sur une surface d'or plane

Ce chapitre est consacré au suivi par spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de phase (PM-IRRAS) de l'immobilisation de la laccase sur des plaques d'or, préalablement fonctionnalisées par un dépôt d'une monocouche de thiols auto-assemblée (SAM) et terminée par une fonction acide carboxylique ou amine. Dans une première partie, l'enzyme est immobilisée à la surface des plaques d'or fonctionnalisées par trempage dans une solution de laccase, puis les plaques sont analysées par PM-IRRAS à l'air. On appellera ce type d'analyse *ex situ*. Dans le cas de l'étude *in situ*, l'analyse par PM-IRRAS de la plaque d'or fonctionnalisée est effectuée, **en phase liquide**, concomitamment à l'immobilisation de l'enzyme. On effectue ainsi un suivi en temps réel du greffage. Une analyse XPS a également été réalisée après immobilisation.

V.1. Matériels et méthodes

On ne détaillera ici que le principe de la spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de phase (PM-IRRAS) et le mode de préparation des plaques d'or.

V.1.1. La spectroscopie PM-IRRAS

V.1.1.1. La spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge (IR) est une technique spectroscopique vibrationnelle non destructrice permettant d'identifier la nature des liaisons chimiques de la molécule étudiée. Elle utilise une source de rayonnement électromagnétique afin d'exciter les vibrations internes des molécules. Les liaisons chimiques se comportent comme des oscillateurs qui vibrent en permanence à des fréquences dépendant de la nature de ces liaisons. Les règles de sélection des vibrations actives en Infrarouge stipulent que seules les vibrations impliquant une variation du moment dipolaire de la molécule sont observées. En pratique, les spectrophotomètres IR mesurent l'énergie transmise ou réfléchiée en fonction du nombre d'onde σ (en cm^{-1}), le nombre d'onde étant proportionnel à la fréquence des vibrations ν selon l'équation $\sigma = \nu/c$ avec c la vitesse de la lumière.

Les vibrations simples peuvent être classées en deux grands groupes (Figure V.1) : les vibrations de déformation angulaire (bending) et les vibrations de valence ou d'élongation (stretching) qui se déclinent en fonction de leur symétrie. Une vibration de valence ou d'élongation est un mouvement des atomes le long de l'axe de la liaison. Elle est représentée

par « ν ». Elle peut être symétrique (ν_s) ou asymétrique (ν_{as}). Ce type de vibration se situe dans un intervalle de nombre d'onde allant de 4000 à 1000 cm^{-1} . Une vibration de déformation est un mouvement des atomes en dehors de l'axe de la liaison. Les vibrations de déformation sont représentées par « δ ». Ces vibrations peuvent se réaliser dans le plan : cisaillement « δ » (scissoring) et rotation plane « ρ » (rocking). Elles peuvent aussi se réaliser hors du plan : balancement « ω » (wagging) et torsion « τ » (twisting). Les vibrations de déformation sont d'intensité plus faible que celles de vibration de valence. Elles constituent la région du spectre dite empreinte digitale (1000 à 600 cm^{-1}).

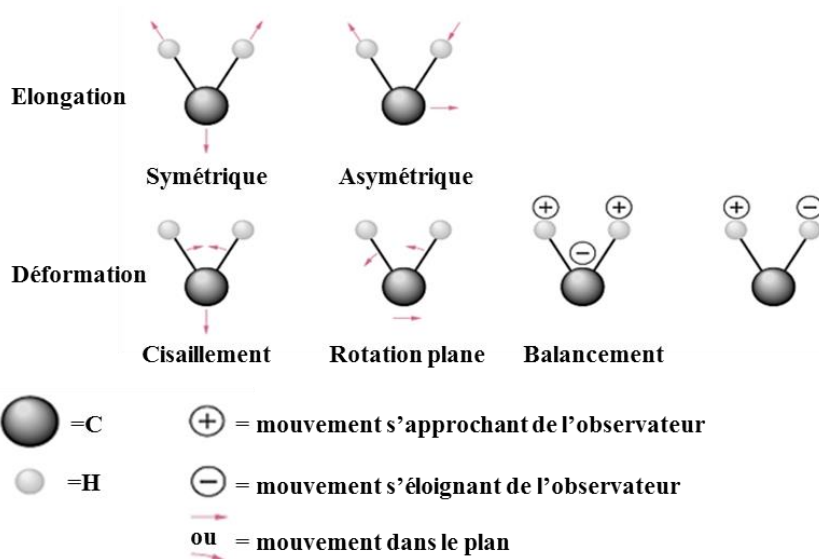


Figure V.1: Schéma des différents modes de vibrations dans une molécule C-H

La grande diversité des montages expérimentaux permet la caractérisation par IR d'échantillons solides ou liquides, sur tout type de surface. Cependant, l'analyse de couches très minces (épaisseur < 500 Å) par spectroscopie IR pose des problèmes de sensibilité. Dans le cas des substrats métalliques, il est alors possible d'utiliser une méthode IR fondée sur la réflexion de l'onde électromagnétique incidente et qui permet d'augmenter la sensibilité de la détection : l'InfraRed Reflexion Absorption Spectroscopy ou IRRAS.

V.1.1.2.Principe de l'IRRAS

La spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de phase (IRRAS) est un type de spectroscopie infrarouge permettant l'analyse de la structure et de l'orientation de molécules adsorbées en surface.

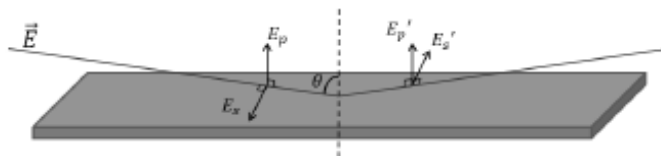


Figure V.2: Réflexion du champ électrique E du faisceau IR à l'interface d'un substrat métallique. θ est appelé l'angle d'incidence

Dans le cas des surfaces métalliques, les interactions entre la composante électrique de l'onde incidente, le moment dipolaire des vibrations des molécules et les propriétés de réflexion du support conditionnent l'absorption du faisceau. Le travail de Greenler a montré l'importance de l'angle d'incidence θ entre le faisceau et la surface métallique et de l'état de polarisation de la lumière sur le spectre de réflexion/absorption [101]. Quand une onde électromagnétique est réfléchiée à la surface du métal, les composantes parallèle et perpendiculaire au plan d'incidence du vecteur champ électrique, notées E_p et E_s respectivement (figure V.2) subissent un changement de phase qui dépend de l'angle d'incidence. La figure V.3 montre que ce changement de phase varie selon la composante du champ électrique considérée. La composante du champ électrique perpendiculaire au plan d'incidence E_s subit un déphasage d'environ 180° , peu influencé par la valeur de l'angle d'incidence. Par contre, la composante parallèle au plan d'incidence dont le changement de phase est faible pour un angle d'incidence inférieur à 45° subit un déphasage croissant lorsque l'angle d'incidence dépasse 45° . Ainsi, à un angle d'incidence proche de 80° , dit rasant, le déphasage est proche de 90° et conduit à une exaltation du champ électrique résultant perpendiculaire à E_p .

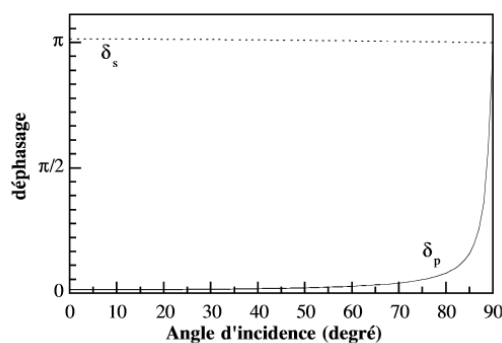


Figure V.3: Déphasages subis par les champs électriques polarisés p et s à la surface d'un substrat métallique

De plus, lorsque le faisceau incident est réfléchi à angle rasant, seules les vibrations des molécules ayant une variation de moment dipolaire non parallèle à la surface seront détectées en IRRAS. Ces règles de sélection particulières vont ainsi pouvoir donner des informations sur l'orientation des groupes moléculaires en surface.

Lorsqu'on travaille en lumière polarisée, le spectre de l'échantillon est obtenu en enregistrant successivement le spectre de réflectivité perpendiculaire au plan d'incidence, appelé R_s , qui contient des informations sur le volume de l'échantillon mais pas sur sa surface puis le spectre de réflectivité parallèle au plan d'incidence, appelé R_p , qui contient des informations à la fois sur le volume et la surface. Le spectre correspondant aux molécules de surface est obtenu en normalisant R_p par R_s . L'inconvénient de cette technique est qu'il faut réaliser un spectre de référence pour s'affranchir de l'environnement (gazeux ou liquide).

V.1.1.3.Principe du PM-IRRAS

La technique PM-IRRAS combine les trois techniques suivantes :

- La réflectivité en lumière polarisée et sous incidence quasi-rasante (IRRAS). Les règles de sélection inhérentes à la spectroscopie IRRAS sont encore vraies en PM-IRRAS ;
- La modulation rapide de la polarisation du faisceau incident entre les polarisations p et s au moyen d'un modulateur photoélastique.
- Le filtrage, la démodulation et le traitement mathématique de l'intensité détectée afin d'obtenir les signaux (R_p-R_s) et (R_p+R_s) puis le signal de réflectivité différentielle normalisé (Equation V.1). Ce signal est uniquement représentatif du voisinage de la surface.

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad (\text{Eq V.1})$$

V.1.1.4. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé au cours de ce travail comprend un spectrophotomètre NICOLET 5700 et un montage optique de modulation-polarisation. A la sortie du spectrophotomètre, le faisceau infrarouge incident est tout d'abord focalisé sur l'échantillon à l'aide d'un miroir à un angle optimal. Entre ce miroir et l'échantillon, le faisceau est polarisé par un polarisateur à grille (ZnSe) puis passe à travers un modulateur photoélastique en ZnSe (Hinds Instruments, PEM 90, fréquence de modulation égale à 37 kHz). Le faisceau réfléchi par l'échantillon est par la suite focalisé sur un détecteur au tellure de mercure et de cadmium à large bande refroidi. Les spectres infrarouges ont été enregistrés avec une résolution de 8 cm^{-1} en réalisant 128 scans.

Le dispositif a aussi été utilisé pour effectuer des analyses en phase liquide *in situ*. Pour cela l'échantillon à analyser est introduit dans une cellule inspirée de celle réalisée par le groupe de Tadjeddine (Figure V.4). La partie supérieure de cette cellule est composée d'une fenêtre semi-cylindrique à base de CaF_2 . Son volume total est de 10 mL. Les solutions sont introduites dans cette cellule à l'aide d'une pompe péristaltique. La circulation de la solution est interrompue lors de l'analyse PM-IRRAS et l'échantillon est plaqué contre la fenêtre. Il est séparé de cette fenêtre par un film liquide d'une épaisseur estimée à $1 \mu\text{m}$. Il peut être également retiré à quelques mm de la fenêtre, de sorte que l'adsorption ne soit pas limitée par la quantité de molécules présentes dans la couche mince de liquide. L'angle d'incidence optimal a été fixé à 70° .

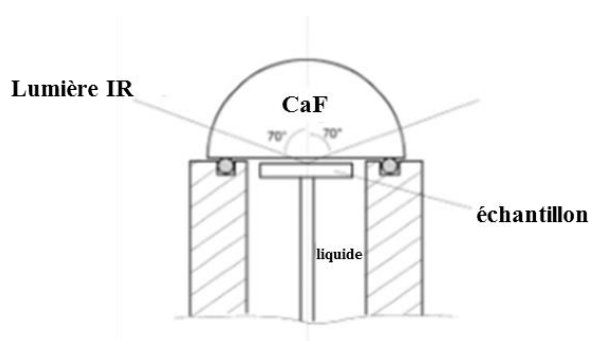


Figure V.4: Schéma de la cellule contenant l'échantillon pour des mesures *in situ* [102]

Les analyses PM-IRRAS sont réalisées en utilisant de l'eau deutérée en tant que solvant. Ce dernier possède la particularité de ne pas avoir de bandes de vibrations dans le domaine de vibration des bandes amides I et II et ce contrairement à l'eau qui empêche une analyse précise dans cette région d'intérêt (Figure V.5). La présence de bande d'absorption dans cette région dans le cas de l'eau peut être attribuée soit à une orientation de la molécule d'eau soit à une certaine hétérogénéité du champ électrique au voisinage de la surface.

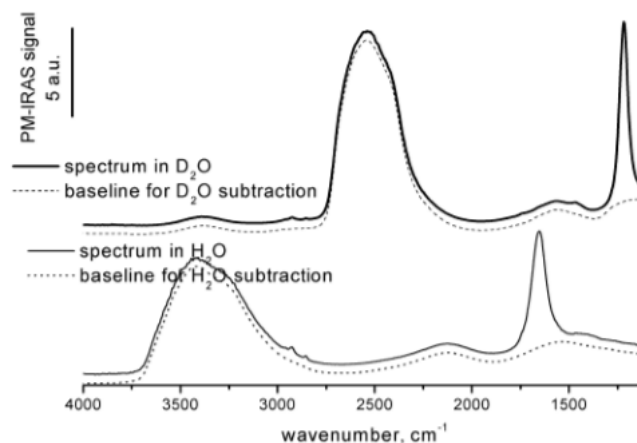


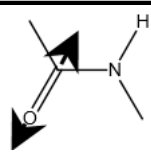
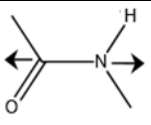
Figure V.5: Spectres PM-IRRAS d'une plaque d'or fonctionnalisée par un SAM de cystéamine obtenus dans l'eau ou l'eau deutérée [102]

V.1.1.5. Spectroscopie infrarouge des protéines

V.1.1.5.1. Modes de vibration de la liaison peptidique

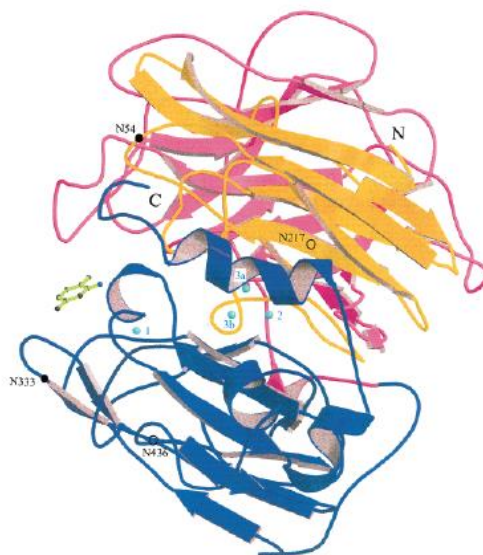
Pour rappel, une protéine est un biopolymère constitué de l'enchaînement d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Ces liaisons donnent des bandes d'absorption caractéristiques qu'on nomme bandes amides. Les bandes les plus intenses sont la bande amide I et la bande amide II. Le mode de vibration de la bande amide I est essentiellement dû à l'élongation de la liaison C=O. Cette bande se situe entre 1600 et 1700 cm^{-1} . Le mode de vibration de la bande amide II est essentiellement dû à la déformation de la liaison N-H couplée à l'élongation de la liaison C-N. La bande amide II se situe entre les nombres d'ondes 1510 et 1580 cm^{-1} . Les nombres d'ondes de ces bandes ainsi que leur description sont répertoriés dans le Tableau V.1.

Tableau V.1: Représentation des modes de vibration amide I et II de la liaison peptidique

Bandes de vibration	Description	Nombre d'ondes (cm ⁻¹)
Amide I		1700-1600
Amide II		1580-1510

V.1.1.5.2. Modes de vibration en fonction l'orientation de la protéine sur la surface

En IRRAS, seules les vibrations des molécules ayant une variation de moment dipolaire non parallèle à la surface sont détectées. D'après son étude cristallographique, on sait que la structure secondaire de la laccase B de *T.versicolor* est essentiellement constituée de feuillets β antiparallèles orientés selon un axe commun et dont les plans sont dans la même direction (cf Figure V. 7 qui explicite les plans des feuillets β ainsi que leur axe), en l'occurrence verticaux sur la figure V.6, dans au moins 2 des 3 domaines de l'enzyme (Figure V.6). Dans un feuillet β antiparallèle, les liaisons hydrogène entre les NH de l'un des brins et le C=O de la liaison peptidique de l'autre brin sont parallèles et dans le même plan, de sorte que les contributions au moment dipolaire du feuillet β de toutes ses liaisons C=O est maximale dans le plan du feuillet et perpendiculairement à son axe.

**Figure V. 6:** Schéma de la laccase B de *Trametes versicolor*. [28]

Si la laccase est immobilisée sur un support horizontal avec une orientation telle que l'axe de ses feuilletts β soit parallèle à la surface du support et que leurs plans soient verticaux, les vibrations de valence des groupements C=O seront donc perpendiculaires à cette surface. La bande amide I sera plus intense sur le spectre PM-IRRAS, qui exalte le signal des vibrations perpendiculaires à la surface explorée, que la bande amide II. Inversement, si l'axe des feuilletts β est perpendiculaire à la surface ou si les plans des feuilletts β ne sont pas verticaux, les contributions des vibrations de C=O vont diminuer tandis que les vibrations de déformation des liaisons N-H caractéristiques de la bande amide II seront plus intenses. Le ratio de l'intensité des bandes amide I et amide II est donc sensible à l'orientation de l'enzyme à la surface et peut permettre de déterminer si la méthode d'immobilisation ou le type de fonctionnalisation de la surface influent sur l'orientation de l'enzyme.

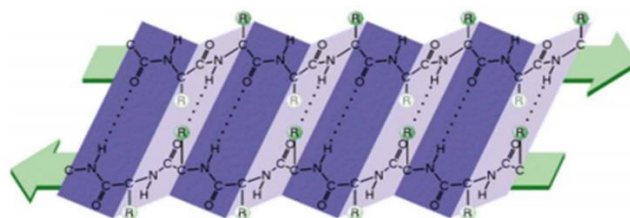


Figure V.7: Feuillet β antiparallèle d'une enzyme. Les flèches représentent l'axe du feuillet. Ses plans « plissés » sont figurés en violet clair et foncé

V.1.2. Préparation des plaques d'or

V.1.2.1. Prétraitement des plaques d'or

Les surfaces utilisées sont des plaques de verre (11 mm x 11 mm) recouvertes successivement d'une couche de chrome de 50 Å et d'une couche d'or de 200 nm d'épaisseur (Arrandee, Werther, Allemagne). Les plaques sont recuites au moyen d'une flamme pour garantir une bonne cristallinité de la couche superficielle d'or (reconstruite en Au (111)) puis traitées par UV-ozone durant 20 minutes avant d'être rincées successivement 5 minutes dans l'éthanol absolu et 5 minutes dans l'eau déminéralisée pour éliminer les traces d'éthanol. Elles sont enfin séchées sous un flux d'azote. Pour contrôler que l'on a bien éliminé un maximum de pollution organique, les plaques sont analysées par PM-IRRAS.

V.1.2.2. Greffage des SAMs (Self Assembled Monolayer)

Les plaques d'or (Au) sont immergées dans une solution d'acide thioglycolique (AT) ou de cystéamine (Figure V.8) à 10^{-3} M dans l'éthanol absolu pendant une nuit sous agitation à température ambiante avant d'être rincées pendant 15 minutes dans l'éthanol absolu pour éliminer l'excès d'acide thioglycolique ou de cystéamine non greffés de manière covalente (Figure V.9). Les plaques sont ensuite rincées dans l'eau déminéralisée (MilliQ) pendant 10 minutes pour éliminer les traces d'éthanol, puis séchées sous un flux d'azote.

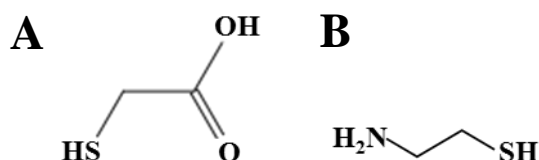


Figure V.8: Formules des molécules A) acide thioglycolique et B) cystéamine

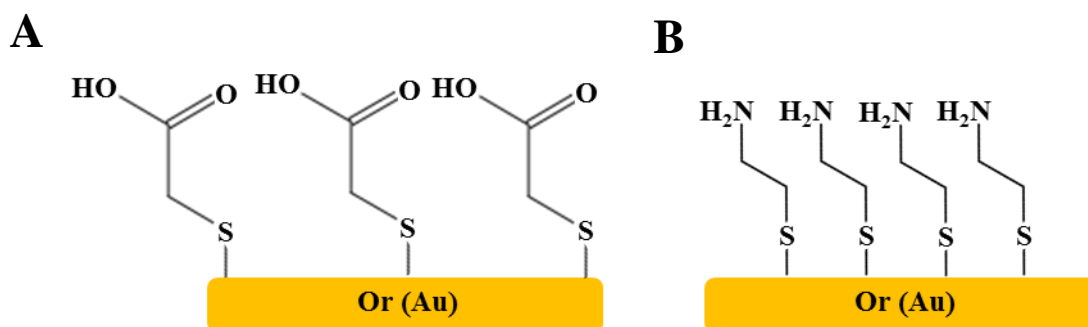


Figure V.9: Schéma greffage sur une plaque d'or de A) acide thioglycolique et B) cystéamine

V.1.2.3. Immobilisation de la laccase

Une fois les plaques d'or recouvertes par l'acide thioglycolique ou la cystéamine, on a immobilisé la laccase selon deux protocoles en fonction du type de groupements fonctionnels présents à la surface des plaques. Les plaques d'or fonctionnalisées par la cystéamine sont plongées dans un tampon phosphate 50 mM ($V = 5\text{mL}$) contenant de la laccase (2 U/mL) et le mélange EDC-NHS (5mM) pendant 2 heures. L'activation a été réalisée à un pH 5 car il est préférable que les groupements carboxyliques soit protonés tandis que l'immobilisation a été faite à un pH 7 afin de déprotoner les groupements amines. Dans le cas des plaques d'or fonctionnalisées par l'acide thioglycolique, l'immobilisation est réalisée en deux étapes : d'abord l'activation des groupements carboxyliques de l'acide thioglycolique par le mélange EDC-NHS (5 mM) pendant 20 minutes, puis le rinçage de la plaque et enfin son immersion

dans une solution de laccase (tampon phosphate 50 mM pH 7, 2 U/mL). Quatre types de plaques d'or ont été élaborés selon les conditions résumées dans le Tableau V.2.

Tableau V.2: Conditions d'immobilisation de la laccase sur plaques d'or pour analyse PM-IRRAS *ex situ*

	Type de fonctionnalisation de la plaque	Activation avec EDC-NHS	pH du tampon phosphate lors des étapes d'activation/immobilisation
Au1	cystéamine	oui	5/5
Au2	cystéamine	non	7
Au3	acide thioglycolique	non	7
Au4	acide thioglycolique	oui	5/7

Dans le cas de l'étude PM-IRRAS dite *in situ*, c'est-à-dire en phase liquide, le protocole de fonctionnalisation des plaques d'or par formation de SAMs reste inchangé. Les plaques fonctionnalisées sont par la suite placées dans la cellule de PM-IRRAS. Dans le cas d'une plaque fonctionnalisée avec la cystéamine, (**Au1'**) on fait circuler dans la cellule un mélange de laccase (2 U/mL) et d'EDC-NHS 5 mM dans D₂O à pH 7 (ajusté avec NaOD). Dans le cas de la plaque fonctionnalisée avec l'acide thioglycolique (**Au2'**), on fait circuler successivement dans la cellule de PM-IRRAS une solution d'EDC-NHS 5 mM dans D₂O puis une solution de laccase (2U/mL) dans D₂O (pH 7) (Tableau V.3).

Tableau V.3: Conditions d'immobilisation de la laccase sur plaques d'or pour analyse PM-IRRAS *in situ*

	Type de fonctionnalisation de la plaque	Activation avec EDC-NHS	pH de la solution lors de l'activation/immobilisation
Au1'	cystéamine	oui	7
Au2'	Acide thioglycolique	oui	5/7

V.2.Résultats et discussion

V.2.1.Caractérisation *ex situ* de l'immobilisation de la laccase

V.2.1.1.Analyse PM-IRRAS

Avant d'immobiliser la laccase à la surface des plaques d'or, une analyse systématique par PM-IRRAS des plaques d'or est réalisée afin de vérifier le succès de chacune des étapes précédant le greffage de l'enzyme (les étapes de prétraitement et de fonctionnalisation des plaques d'or). Un spectre représentatif de ceux obtenus après assemblage d'un SAM de cystéamine à la surface de l'or est présenté dans la Figure V.10.

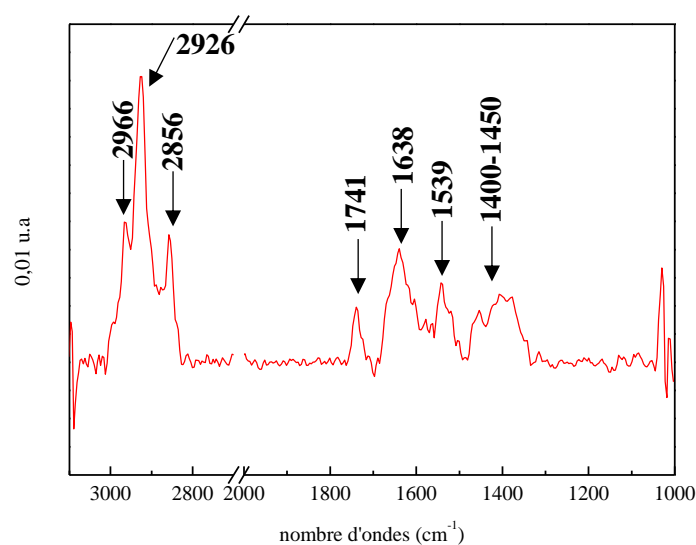


Figure V.10: Spectre PM-IRRAS d'une plaque d'or fonctionnalisée par un SAM de cystéamine

Les surfaces d'or fonctionnalisées par un SAM de cystéamine présentent quatre vibrations caractéristiques des chaînes aliphatiques, l'une vers 2966 cm^{-1} qui peut être attribuée à la vibration de valence asymétrique (ν_{SCH_3}) des liaisons CH_3 . Deux autres à 2856 et 2926 cm^{-1} [103, 104] sont attribuées respectivement aux vibrations de valences symétrique (ν_{SCH_2}) et asymétrique (ν_{asCH_2}) des liaisons CH_2 . La dernière vers 1400 cm^{-1} (large pic) est caractéristique des vibrations de déformation des CH_2 . Deux autres pics centrés autour de 1534 et 1639 sont attribués aux vibrations de déformation (δ) symétrique et asymétrique des liaisons amines. On note aussi la présence d'un pic à 1741 cm^{-1} qui est attribué aux vibrations des fonctions COO^- .

Les groupements carboxyliques sont en effet déprotonés car le rinçage final des plaques s'effectue dans l'eau à pH 5. Ces groupements carboxyliques pourraient provenir de traces de glycine, l'acide aminé utilisé comme réactif dans la synthèse de la cystéamine et qui ne serait pas complètement transformé. L'analyse du spectre PM-IRRAS permet ainsi de confirmer la fonctionnalisation de la surface par la cystéamine.

Le spectre PM-IRRAS des surfaces d'or fonctionnalisées par un SAM d'acide thioglycolique (Figure V.11) présente quant à lui aussi les quatre vibrations caractéristiques des chaînes aliphatiques à 2966, 2926, 2856 et 1420 cm^{-1} . On observe aussi la présence de deux pics à 1716 et 1735 cm^{-1} attribués aux vibrations de valences (ν) des groupements carboxyliques protonés et non protonés [102]. Le pic à 1539 cm^{-1} est caractéristique des vibrations asymétriques (ν_{as}) des groupements carboxyliques déprotonés (COO^-) [105, 106]. Ces différents pics permettent ainsi de confirmer la fonctionnalisation de la surface par l'acide thioglycolique.

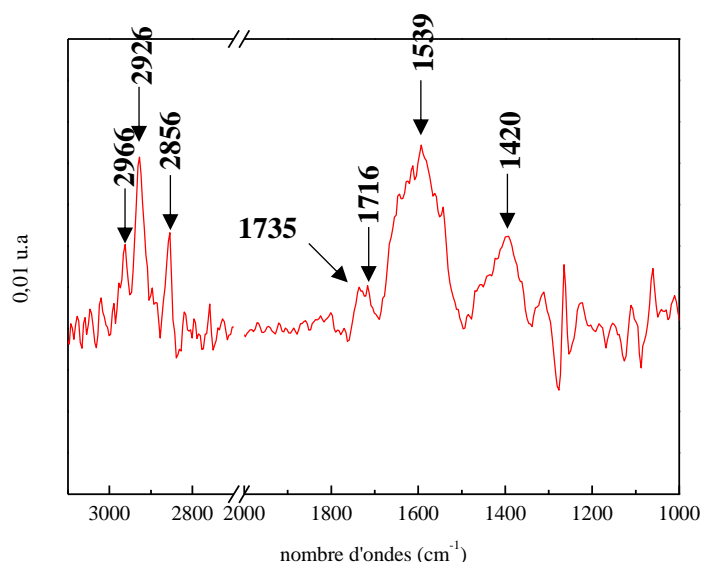


Figure V.11: Spectre PM-IRRAS d'une plaque d'or fonctionnalisée par un SAM d'acide thioglycolique

Une fois la fonctionnalisation de la surface des plaques d'or vérifiée, la laccase y a été immobilisée. La figure suivante (Figure V.12) présente les différents spectres PM-IRRAS obtenus suite à l'immobilisation de la laccase sur une plaque d'or fonctionnalisée par la cystéamine.

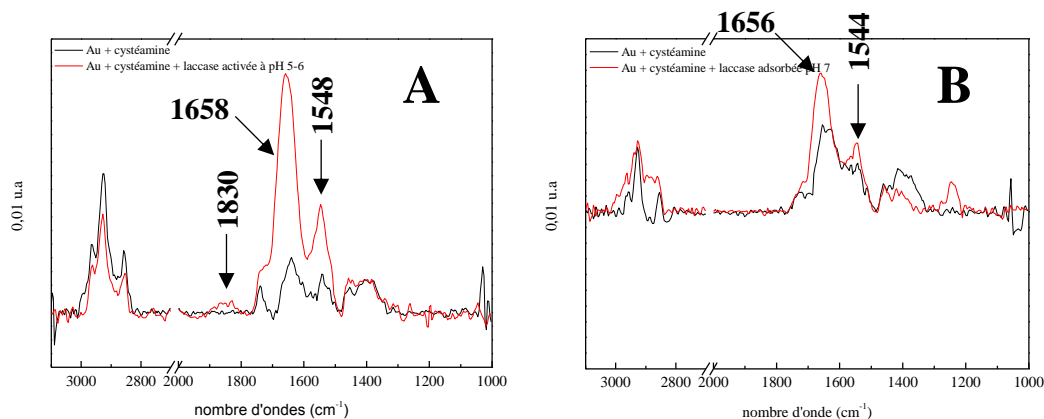


Figure V.12: Spectres PM-IRRAS obtenus après immobilisation de la laccase sur les plaques d'or fonctionnalisées avec un SAM de cystéamine A) laccase immobilisée de manière covalente et B) laccase adsorbée

On observe pour les deux types d'immobilisation (covalent et adsorption) l'apparition de deux pics intenses autour de 1657 et 1546 cm^{-1} attribués aux bandes amide I et amide II de la chaîne peptidique. La bande amide I correspond principalement aux vibrations de valence des liaisons C=O, tandis que la bande amide II est représentative de la vibration de déformation des liaisons N-H mais aussi dans une moindre mesure des vibrations de valence des liaisons C-N. Le pic à 1739 cm^{-1} est attribué aux vibrations de valence des liaisons C=O des groupements carboxyliques déprotonés. On note par ailleurs sur le spectre A un pic à 1830 cm^{-1} qui peut être attribué à la vibration d'un groupement NHS-ester [103, 107]. Ce pic confirme donc l'activation de la laccase par l'agent de couplage EDC-NHS (Figure V.17). La présence de ce pic révèle que certains des groupements carboxyliques de la laccase sont encore activés et donc que tous les groupements activés de l'enzyme n'ont pas réagi avec la cystéamine sans doute pour des raisons stériques. Ce pic n'est logiquement pas observé lorsque la laccase est adsorbée à la surface des plaques d'or et donc n'a pas été activée.

La figure V.13 présente les spectres PM-IRRAS de la laccase immobilisée sur des plaques d'or fonctionnalisées avec un SAM d'acide thioglycolique. On observe comme sur les surfaces fonctionnalisées par un SAM de cystéamine l'apparition des bandes amides I et II. Lorsque l'acide thioglycolique a été activé par formation de l'ester N-hydroxysuccinimique, aucun pic n'est observé vers 1800 cm^{-1} , ce qui laisse supposer que tous les groupements ester de surface ont soit été couplés de façon covalente avec la laccase soit ont été hydrolysés en présence d'eau.

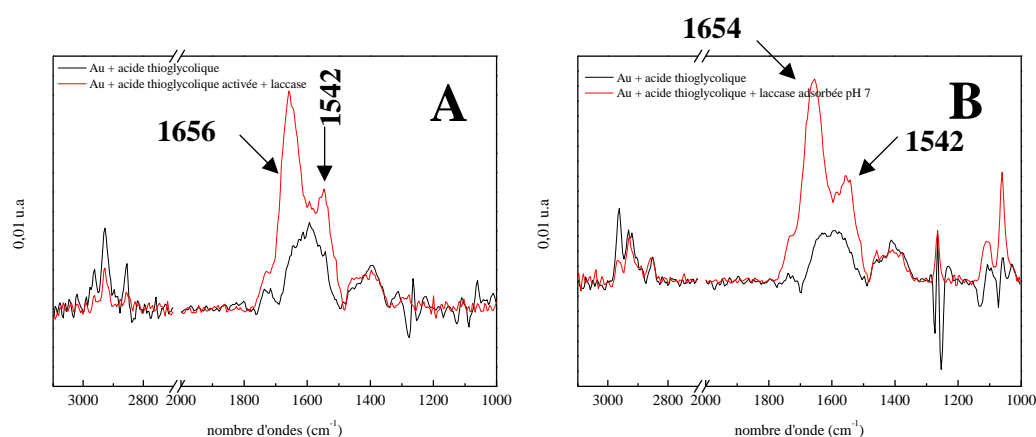


Figure V.13: Spectres PM-IRRAS obtenus après immobilisation de la laccase sur les plaques d'or fonctionnalisées par un SAM d'acide thioglycolique A) acide thioglycolique activée à pH 5 (immobilisation covalente) et B) laccase adsorbée à pH 7

Par ailleurs, on a réalisé un spectre ATR de la laccase de *Rhus vernifira* libre (non immobilisée) afin de vérifier que la structure secondaire de la laccase n'a pas été modifiée après son immobilisation sur les plaques d'or fonctionnalisées avec un SAM de cystéamine ou d'acide thioglycolique (Figure V.14).

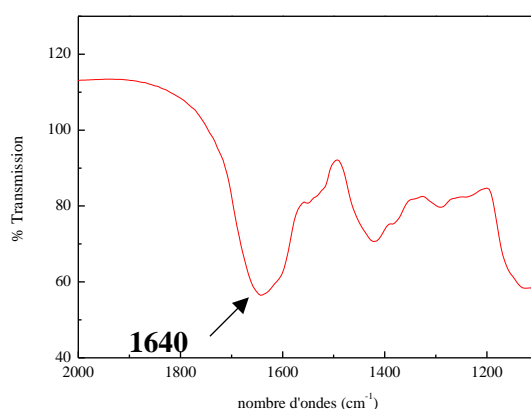


Figure V.14: Spectre ATR de la laccase de *Rhus vernifira*

On observe un shift de la bande I par rapport à la laccase de *Rhus vernifira* de 17 cm^{-1} et 15 cm^{-1} pour un SAM de cystéamine et d'acide thioglycolique respectivement. Cela pourrait supposer un changement de la structure secondaire, cependant l'enzyme étudiée n'est pas celle de *Trametes versicolor*. Aucune conclusion ne peut être tirée.

On a donc essayé de déterminer l'orientation de la laccase B de *T. versicolor* sur les plaques d'or fonctionnalisées. Puisque l'élément déterminant des spectres de PM-IRRAS qui permet d'obtenir des informations sur l'orientation de l'enzyme à la surface est le rapport d'intensité des pics amide I et amide II, on a décomposé les spectres et plus particulièrement la région contenant les bandes amides grâce au logiciel Origin (Figure V.15).

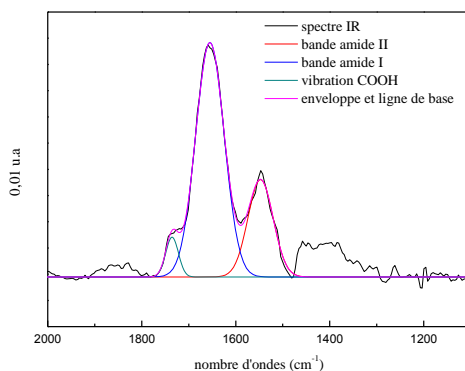


Figure V.15: Décomposition du spectre PM-IRRAS d'une plaque d'or fonctionnalisée par de la cystéamine et après immobilisation de la laccase par greffage covalent

Le Tableau V.4 regroupe les aires de chaque pic (amide I et II) de l'ensemble des résultats pour les différentes méthodes d'immobilisation.

Tableau V.4: Aires des bandes amide I et II pour les différentes immobilisations de la laccase

	Amide I	Amide II	Ratio amideI/amideII
Au/cystéamine/greffage covalent de la laccase	69,3	25,4	2,7
Au/cystéamine/laccase adsorbée	65	31,6	2
Au/AT/laccase adsorbée	61	34	1,8
Au/AT activé/ greffage covalent de la laccase	54,6	41,2	1,3

Pour les deux types de fonctionnalisation des surfaces d'or, on observe que la bande amide I est plus intense que la bande amide II quel que soit le type d'immobilisation (covalent ou adsorption). Les groupements C=O étant situés sur le plan des feuillettes β , ceci nous amène à dire d'après la règle de sélection du PM-IRRAS et la structure des feuillettes β antiparallèles,

qu'on devrait observer une contribution maximale du moment dipolaire des groupements C=O lorsque les feuillets β sont perpendiculaires à la surface des plaques et que leur axe est parallèle à la surface de la plaque. Inversement, si la laccase est immobilisée sur la surface de telle sorte que l'axe des feuillets β est perpendiculaire à la surface ou que l'axe et le plan des feuillets β est parallèle, la contribution des vibrations de la liaison C=O sera minimale, et l'intensité de la bande amide I va diminuer, ainsi que le ratio Amide I/amide II (Figure V.16).

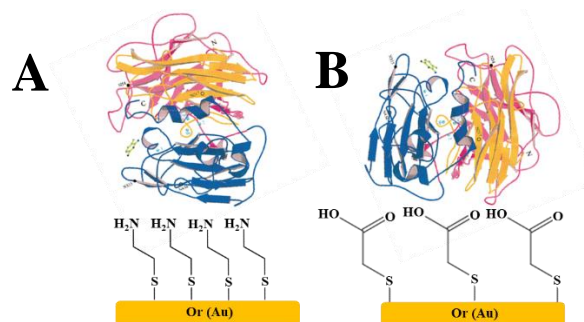


Figure V.16: Orientation de la laccase B *T.versicolor* sur une plaque d'or A) de cystéamine et B) d'acide thioglycolique

Or on constate une différence entre les ratios en fonction de la méthode de fonctionnalisation de la surface. On note que le ratio amide I/amide II est inférieur lorsque la laccase est immobilisée sur une surface fonctionnalisée par l'acide thioglycolique. Toutefois, la différence est très faible et vraisemblablement de l'ordre de l'erreur expérimentale entre les deux types de surface dans le cas d'une immobilisation par adsorption : 1,8 pour la plaque avec l'acide thioglycolique et 2 avec la cystéamine. On pourrait interpréter ce résultat en concluant que dans ces deux cas l'orientation de la laccase est la même, malgré le fait que la charge de la surface d'or fonctionnalisée est opposée : positive en présence de cystéamine et négative en présence d'acide thioglycolique alors que le potentiel électrostatique de la laccase (calculé avec le logiciel pdbviewer, est négatif sur toute sa surface à pH 7 du fait de la surreprésentation des acides aminés acides (45 acides aspartiques et glutamiques) par rapport à la lysine (5 résidus) dans la séquence primaire de l'enzyme.

Par contre, on observe que le ratio amide I/amide II est plus que double entre une immobilisation covalente sur acide thioglycolique et cystéamine, passant de 1,3 à 2,7. Cela suggère que l'orientation de la structure secondaire de l'enzyme est différente pour les deux types de support. Sur une surface fonctionnalisée avec des groupements cystéamine, la

contribution des vibrations des C=O est importante, on pourrait supposer que les feuillets β de l'enzyme sont orientés avec leur axe parallèle à la surface et leurs plans verticaux, dans le cas d'une surface d'or horizontale (Figure V.15A). Par comparaison, sur une surface fonctionnalisée par l'acide thioglycolique, la baisse du ratio amide I/amide II pourrait être représentative d'un pivotement de 90° de l'enzyme (Figure V.15B). Cette orientation pourrait être compatible avec la formation covalente de la laccase via ses 5 groupements lysines dont deux sont situés sur la face de l'enzyme qui serait alors au contact de la surface, et 3 sur la face opposée.

V.2.1.2. Analyse XPS

Afin d'évaluer le taux de recouvrement de l'enzyme immobilisée selon le type de fonctionnalisation de surface ou de méthode d'immobilisation, des analyses XPS ont été réalisées sur les plaques d'or Au1 (Au/cystéamine/greffage covalent de la laccase) et Au3 (Au/AT/laccase adsorbée). On observe un pic caractéristique du cuivre $Cu_{2p3/2}$ (Figure V.17), et on confirme ainsi la présence de la laccase à la surface de ces plaques d'or.

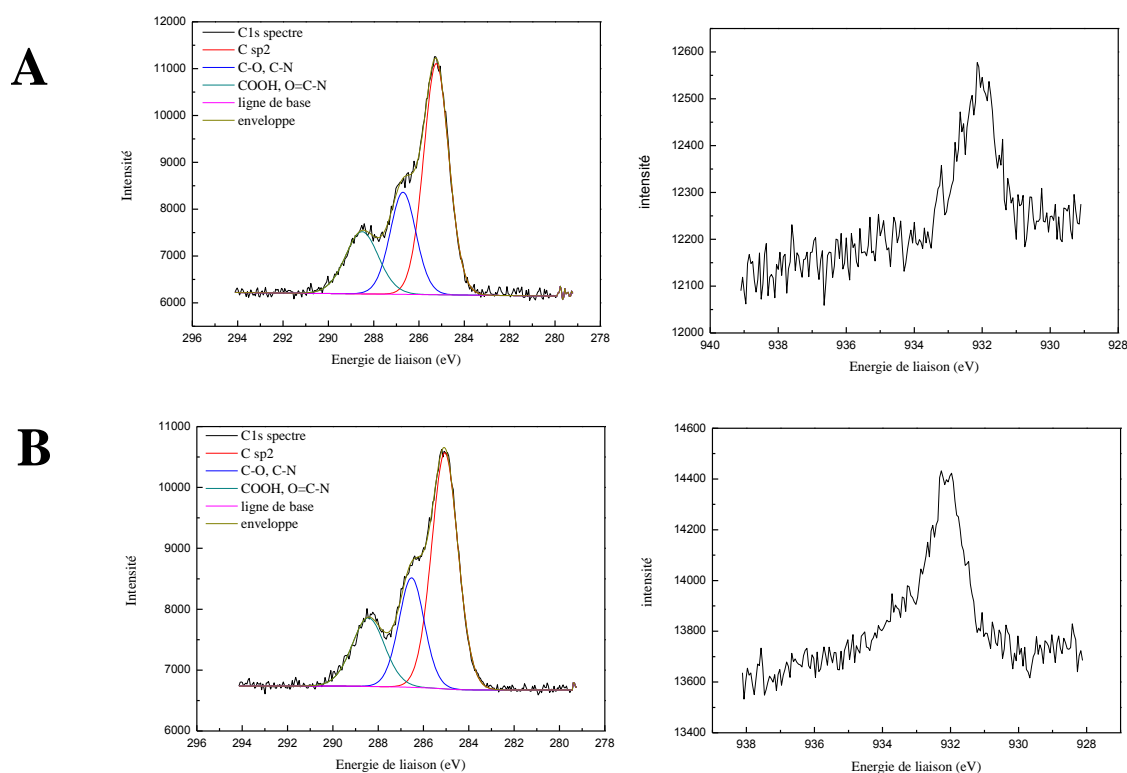


Figure V.17: Spectres XPS C1s après décomposition (à gauche) et $Cu_{2p3/2}$ (à droite) d'une plaque d'or en présence de laccase A) Au1 et B) Au3

L'analyse quantitative du taux de couverture de la laccase à partir du signal XPS repose sur la comparaison du rapport d'intensité I_{Cu}/I_{Au} mesuré par XPS à ce même rapport calculé selon deux modèles de recouvrement de la surface par la laccase décrits dans le chapitre III.

Tableau V.5: Taux de couverture de la laccase calculés à partir du ratio I_{Cu}/I_{Au} .

Au1		Au3	
Modèle A (hémisphérique)			
$d_{enzyme} = 5 \text{ nm}$	1,3		1,4
$d_{enzyme} = 7 \text{ nm}$	1,1		1,2
Modèle B (rectangulaire)			
$d_{enzyme} = 5 \text{ nm}$	1,3		1,4
$d_{enzyme} = 7 \text{ nm}$	1,1		1,2

On constate tout d'abord d'après le Tableau V.5 que pour les deux échantillons, le taux de recouvrement calculé est supérieur à 1. La laccase formerait donc à la surface des plaques au moins une monocouche. Par ailleurs, chacun des modèles utilisés conduit au même résultat. La topologie de la couche de protéine n'a donc pas une influence sur le taux de recouvrement.

V.2.2. Etude PM-IRRAS en phase liquide (*in situ*)

Suite à la réalisation des expériences de PM-IRRAS à l'air (*ex situ*), on a décidé d'effectuer une étude *in situ* permettant de suivre l'évolution de l'immobilisation de la laccase en fonction du temps et en phase liquide. On a utilisé pour cela comme solvant pour la préparation des solutions (solution contenant la laccase et l'agent de couplage) de l'eau deutérée (D_2O). Ce dernier possède la particularité de ne pas avoir de bandes de vibrations dans le domaine de vibration des bandes amides I et II. Deux types de plaques d'or ont été élaborés :

Au1' : Au/cystéamine/greffage covalent de la laccase

Au2' : Au/acide thioglycolique activée/greffage covalent de la laccase

V.2.2.1. Etude PM-IRRAS

Dans le cas d'une plaque d'or fonctionnalisée par de l'acide thioglycolique, on a dans un premier temps effectué le suivi de l'activation des groupements carboxyliques de l'acide par le mélange EDC-NHS. Cette activation s'effectue en deux étapes. Les fonctions carboxyliques de l'acide thioglycolique réagissent dans un premier temps avec l'EDC. Le composé formé est une

O-acylurée. Dans une deuxième étape, le NHS va réagir avec cet intermédiaire afin de former un ester succinimidique [108] (Figure V.18).

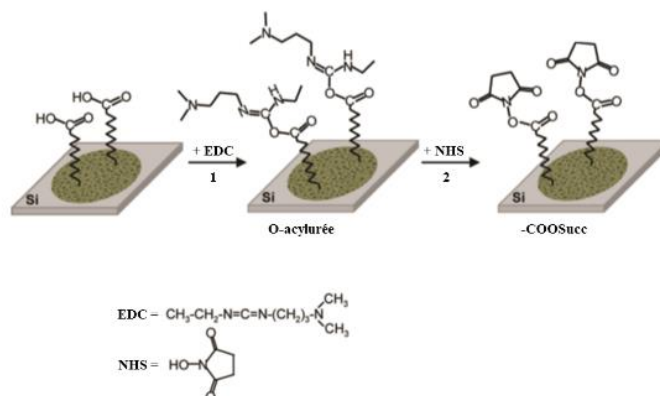


Figure V.18: Schéma détaillant les étapes d'activation d'une plaque fonctionnalisée par des acides carboxyliques par de l'EDC-NHS [108]

On remarque tout d'abord d'après les spectres PM-IRRAS ci-dessous (Figure V.19) qu'après 15 minutes de circulation de la solution contenant l'agent de couplage au voisinage de la plaque d'or fonctionnalisée par de l'acide thioglycolique, que les fonctions carboxyliques sont partiellement activées. En effet, si on note toujours la présence d'un pic à 1715 cm^{-1} attribué aux vibrations de valence des liaisons C=O des fonctions carboxyliques, un pic à 1736 cm^{-1} ainsi que deux épaulements à 1815 et 1777 cm^{-1} attribués respectivement aux vibrations asymétriques ($\nu_{\text{asC=O}}$) des liaisons C=O cycle du succinimide, de valence symétriques ($\nu_{\text{sC=O}}$) des liaisons N-C=O et aux vibrations de valence symétriques ($\nu_{\text{sC=O}}$) confirme l'activation partielle de la plaque d'or par le NHS [108]. Le pic à 1736 cm^{-1} peut être aussi caractéristique des vibrations de valences des groupements carboxyliques non activés [103]. Un pic à 1377 cm^{-1} attribué aux vibrations de valence asymétriques des liaisons C-N-C du cycle du succinimide confirme aussi l'activation partielle des COOH. On observe par ailleurs un pic à 1700 cm^{-1} dont l'intensité diminue en fonction du temps. Ce pic est caractéristique de la formation de l'intermédiaire réactionnel (O-acylurée) suite à la réaction de l'EDC avec les fonctions carboxyliques de la surface des plaques d'or [108]. Le pic à 1584 cm^{-1} , le plus important dans l'intervalle $1400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$, est sans doute dû à la présence de traces d'eau dans la solution.

La surface d'or activée présente aussi quatre vibrations caractéristiques de la chaîne aliphatique, l'une vers 1467 cm^{-1} pouvant être attribuée aux vibrations de déformation (δ_{CH_2})

des liaisons CH_2 , les deux autres à 2924 et 2851 cm^{-1} sont attribués respectivement aux vibrations de valences symétrique (ν_{sCH_2}) et asymétrique (ν_{asCH_2}) des liaisons CH_2 et une à 2957 cm^{-1} affecter à la vibration de valence asymétrique (ν_{SCH_3}) des liaisons CH_3 [108, 109]. On n'observe pas de corrélation entre l'intensité de ces bandes avec la durée de la circulation de la solution du mélange EDC-NHS au voisinage de la surface d'or fonctionnalisée. Les deux pics larges vers 3400 et 3800 cm^{-1} sont attribués aux vibrations de valences des liaisons O-H probablement du NHS ou de H_2O présent dans la solution.

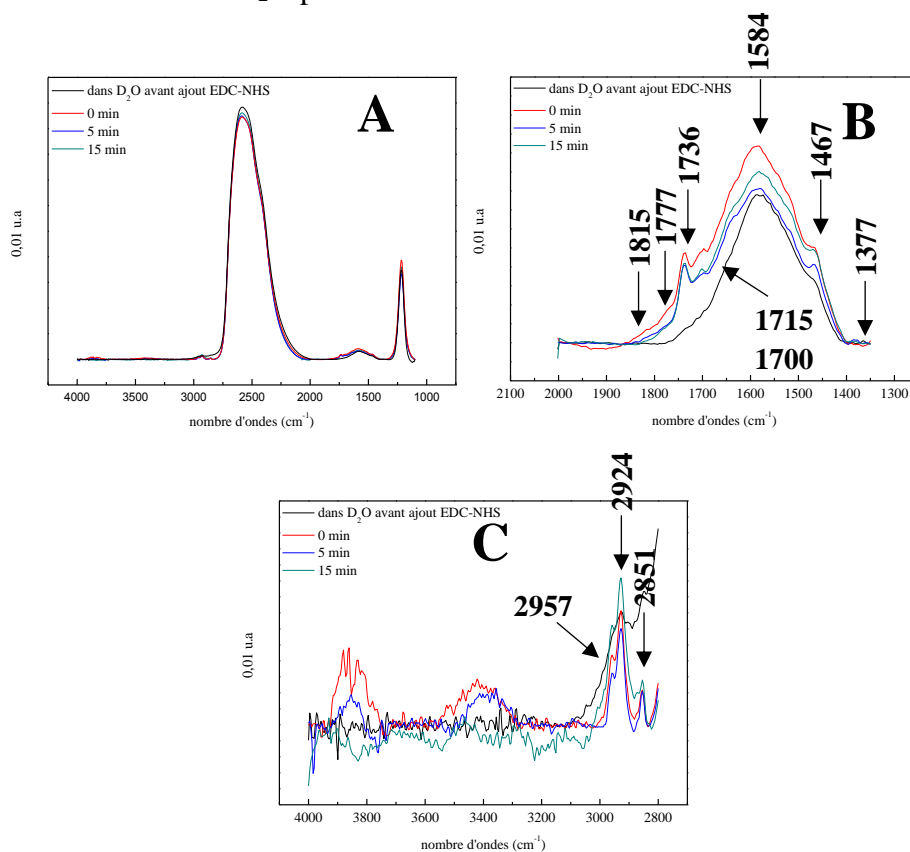


Figure V.19: Spectres PM-IRRAS *in situ* d'une plaque d'or fonctionnalisée par de l'acide thioglycolique en fonction de la durée de l'activation par EDC-NHS A) spectre complet, B) entre 2100 et 1350 cm^{-1} et C) entre 4100 et 2800 cm^{-1}

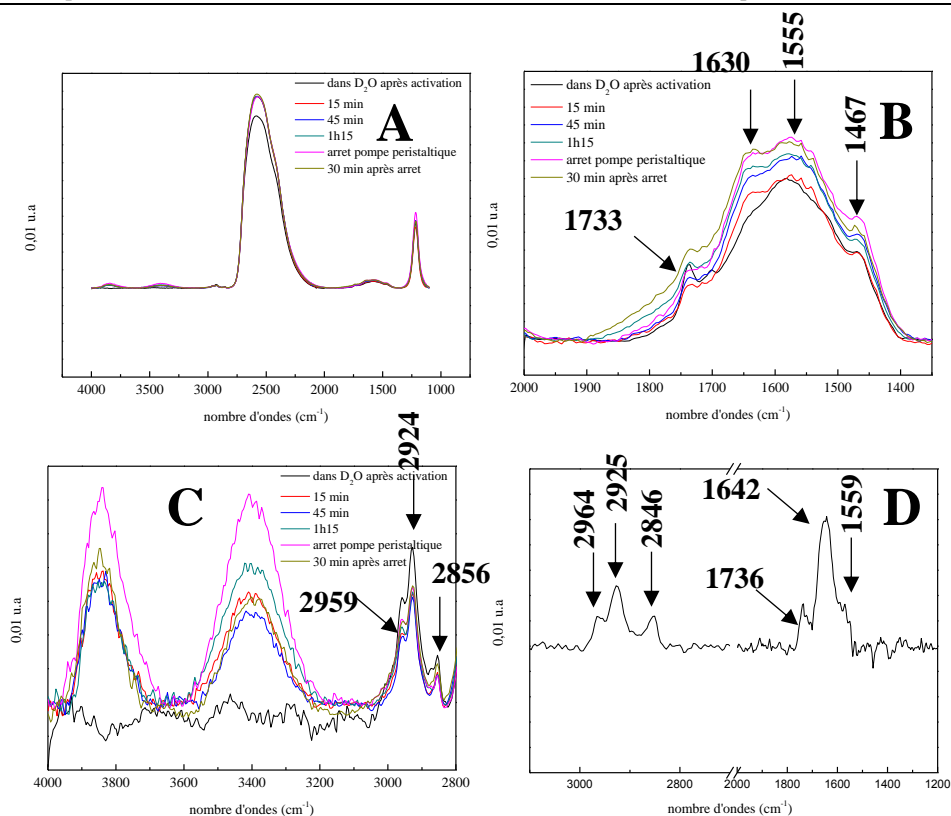


Figure V.20: Spectres PM-IRRAS en phase liquide d'une plaque d'or fonctionnalisée par un SAM d'acide thioglycolique activé avec EDC-NHS en fonction de la durée du greffage covalent de la laccase A) spectre complet, B) entre 2100 et 1350 cm^{-1} , C) entre 4100 et 2800 cm^{-1} et D) à l'air suite à l'étude *in situ*

Une fois l'acide thioglycolique activé, on a fait circuler un volume $V = 50 \text{ mL}$ d'une solution de laccase diluée (2 U/mL , $\text{pH } 7$) dans de l'eau deutérée afin d'immobiliser cette enzyme de manière covalente par la formation d'une liaison amide. Les spectres PM-IRRAS (Figure V.20) présentent le suivi de l'immobilisation de l'enzyme sur la plaque durant 1h15. On observe une augmentation avec le temps de l'intensité des trois pics caractéristiques des chaînes aliphatiques, ce qui serait cohérent avec l'immobilisation de l'enzyme, qui elle-même contient des chaînes carbonées. Dans la région spectrale allant de 2100 à 1300 cm^{-1} , on constate également une augmentation de l'intensité en fonction de la durée de circulation de la solution de laccase de quatre vibrations. L'une vers 1467 cm^{-1} est attribuée aux vibrations de déformation (δ_{CH_2}) des liaisons CH_2 , celle vers 1733-1736 cm^{-1} est caractéristique des vibrations de valence des groupements carboxyliques et la bande amide I vers 1630-1633 cm^{-1} correspondant aux vibrations de valence des liaisons $\text{C}=\text{O}$ caractéristiques de l'enzyme. On

observe un léger pic (1555 cm^{-1}) caractéristique de la bande amide II. Ce dernier est masqué par les vibrations de déformation des liaisons O-H des molécules d'eau (qui proviennent notamment de la solution mère de laccase conservée à -80°C et utilisée pour préparer la solution diluée d'enzyme circulant dans la cellule). Après 1h15 de circulation de la solution de laccase et 30 minutes après l'arrêt de la circulation, on a réalisé un spectre PM-IRRAS de la plaque d'or à l'air (Figure V.20D). On peut observer dans ce cas clairement les deux bandes amides caractéristiques de l'enzyme.

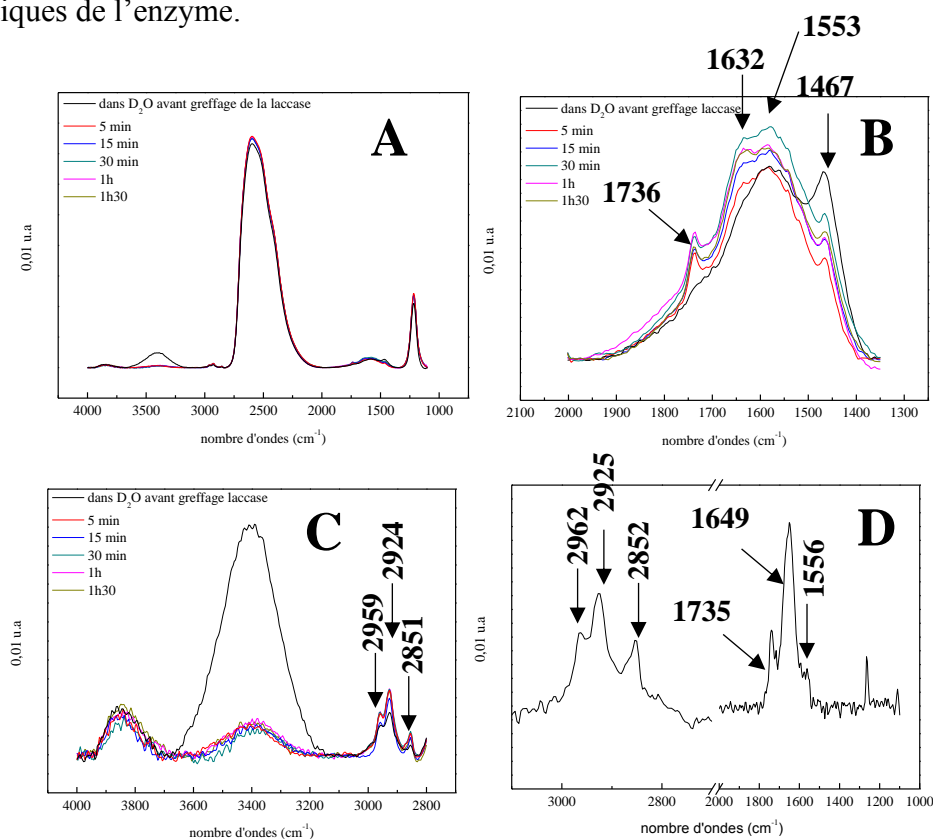


Figure V.21: Spectres PM-IRRAS en phase liquide d'une plaque d'or fonctionnalisée par un SAM de cystéamine en fonction de la durée de circulation d'une solution d'enzyme activée A) spectre complet, B) entre 2100 et 1350 cm^{-1} , C) entre 4000 et 2800 cm^{-1} et D) à l'air suite à l'étude *in situ*

Dans le cas d'une plaque d'or fonctionnalisée par un SAM de cystéamine, les spectres PM-IRRAS (Figure V.21) obtenus au cours de l'immobilisation *in situ* de la laccase préalablement activée montrent eux aussi une augmentation de l'intensité des pics caractéristiques des chaînes aliphatiques en fonction du temps. On observe de façon très claire après seulement 5 minutes

de circulation la présence et l'augmentation au cours du temps de l'intensité d'une bande amide I à 1632 cm^{-1} , d'une bande à 1736 cm^{-1} attribuable soit à l'ester succinimique soit aux groupements carboxyliques de l'enzyme ainsi qu'une bande à 1467 cm^{-1} attribuable aux groupements CH_2 . Comme sur les plaques fonctionnalisées avec l'acide thioglycolique, on note la présence de la bande amide II vers 1556 cm^{-1} masquée par la présence d'eau. Un spectre IR à l'air a été par ailleurs réalisé après l'étude *in situ*. On observe comme pour la plaque fonctionnalisée par un acide thioglycolique les deux bandes amides confirmant ainsi l'immobilisation de la laccase. On note aussi un shift (environ 14 cm^{-1}) de la bande amide I (par rapport aux expériences *ex situ*) vers des nombres d'ondes moins élevés pour les deux types de fonctionnalisation. Ceci s'explique par le fait que les expériences ont été réalisées dans de l'eau deutérée [110].

La décomposition des spectres réalisés à l'air à l'issue des expériences réalisées dans la cellule de circulation en phase liquide (Figures V.20D et 21D) dans la région $1400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ (figure V.22) permet de calculer les ratios de l'intensité des bandes amide I et II.

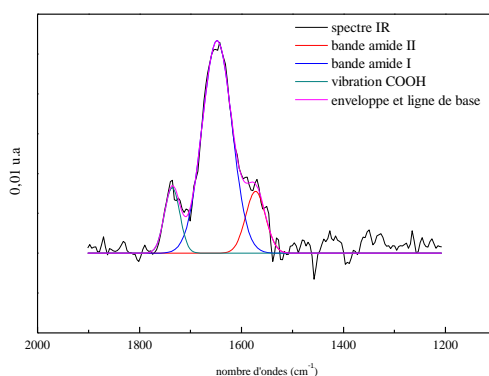


Figure V.22: Décomposition du spectre PM-IRRAS à l'air d'une plaque d'or fonctionnalisée par de l'acide thioglycolique après son activation et le greffage de la laccase réalisés dans la cellule de circulation

Tableau V.6: Aires des bandes amide I et II de la laccase immobilisée de façon covalente sur SAM cystéamine ou acide glycolique dans la cellule à circulation

	Amide I	Amide II	ratio amideI/amideII
Au1 [?]	73,8	11,8	6,2
Au2 [?]	75,7	15,4	4,9

On observe d'après le Tableau V.6, une différence au niveau des ratios selon le type de groupements fonctionnels (acide thioglycolique ou cystéamine) qui suggère que l'orientation de la structure secondaire de l'enzyme est différente pour les deux types de support. Les ratios amide I/amide II sont supérieurs dans le cas d'une surface recouverte par la cystéamine. Ceci reflète une contribution au signal des vibrations des liaisons C=O qui serait donc plus importante que celle des liaisons N-H. On pourrait donc conclure que les plans des feuilletts β de la laccase sont perpendiculaires à la surface de la plaque tandis que leur axe est parallèle à celle-ci. Ce résultat rejoint celui des analyses PM-IRRAS effectuées à l'air après immobilisation de la laccase par immersion des plaques d'or, ce qui est rassurant et gage de la reproductibilité de l'orientation de l'enzyme pour une méthode donnée.

V.2.2.2. Analyses XPS

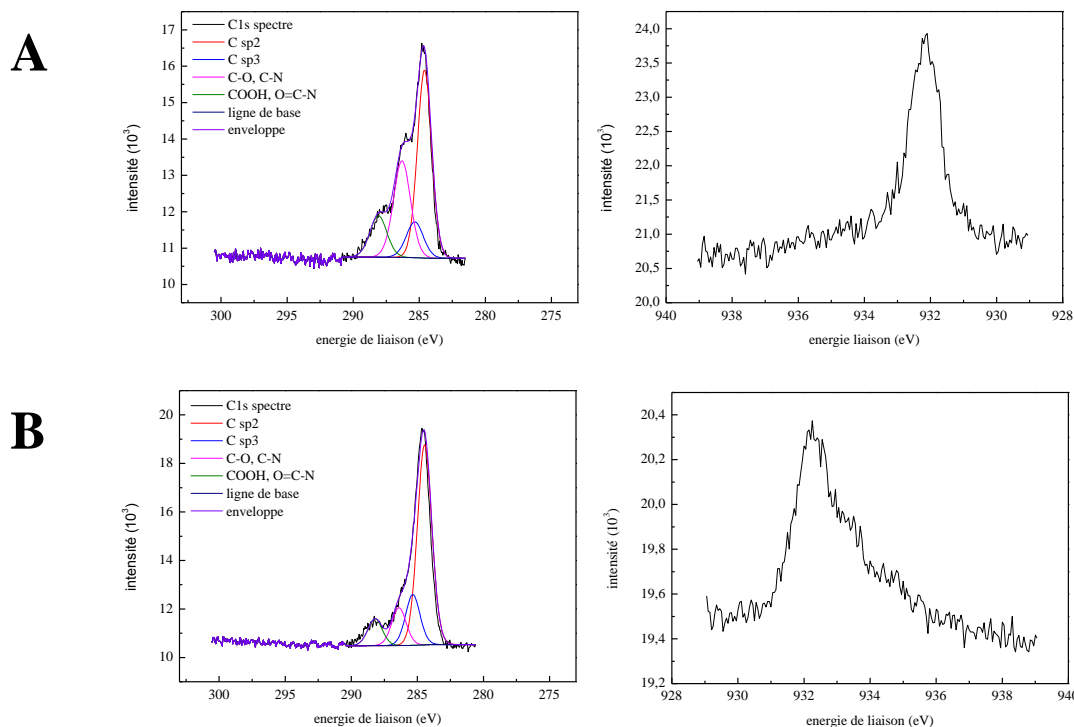


Figure V.23: Spectres XPS du pic C1s après décomposition (à gauche) et Cu2p3/2 (à droite) d'une plaque d'or en présence de laccase A) Au1' et B) Au2'

Des analyses XPS ont été réalisées sur les surfaces d'or fonctionnalisées et celles sur lesquelles la laccase a été immobilisée. Les données XPS (Figure V.23) confirment

l'immobilisation de l'enzyme à la surface des plaques et ce grâce à la présence du pic caractéristique de l'élément cuivre sur chacune des plaques.

Tableau V.7: Taux de couverture de la laccase des plaques d'or calculé à partir de l'activité enzymatique et des résultats XPS à partir du ratio I_{Cu}/I_{Au} .

	Au1'	Au2'
Taux de couverture à partir des résultats XPS		
Modèle A (hémisphérique)		
$d_{enzyme} = 5 \text{ nm}$	1,2	1,4
$d_{enzyme} = 7 \text{ nm}$	1	1,2
Modèle B (rectangulaire)		
$d_{enzyme} = 5 \text{ nm}$	1,2	1,4
$d_{enzyme} = 7 \text{ nm}$	1	1,2

On a aussi comme pour les expériences réalisées à l'air déterminé le taux de recouvrement de la laccase à la surface des plaques d'or en utilisant les mêmes modèles mathématiques (Tableau V.7). D'après ce tableau, on obtient plus d'une monocouche de laccase à la surface des plaques. Par ailleurs on obtient les mêmes résultats que pour les expériences réalisées à l'air pour le même type de configuration. Ceci permet de montrer qu'on immobilise la même quantité de laccase en faisant circuler l'enzyme dans la cellule de PM-IRRAS pendant un temps beaucoup plus court que celui utilisé dans le protocole habituel. En effet l'immobilisation de la laccase a été effectuée durant 1h15-1h30 alors que dans le protocole d'immobilisation par trempage, ou dépôt d'une goutte de laccase sur une électrode de graphite la durée de mise en contact de la solution enzymatique avec la surface est de 2 heures.

V.3.Conclusion

Dans la littérature ? peu d'études ont été réalisées afin de déterminer l'orientation de laccase à la surface d'un matériau en utilisant la technique de PM-IRRAS. Olejnik et *al.* [111] ont immobilisé par adsorption la laccase *Cerrena unicolor* sur une surface d'or fonctionnalisée soit par de l' aminoethylphenyl chargé positivement ($-C_6H_4(CH_2)_2NH_3^+$) soit par de l'acide ethyl-benzoïque chargé négativement ($-C_6H_4(CH_2)_2COO^-$). Ils ont remarqué que dans le cas d'une fonctionnalisation de la surface d'or par des groupements chargés positivement, l'intensité des bandes amide I et II est significativement moins importante que pour une surface fonctionnalisée avec ($-C_6H_4(CH_2)_2COO^-$). Par ailleurs, ils ont constaté un shift vers des nombres

d'ondes plus importants des bandes amide I et II qui pourrait être expliqué selon eux non pas par la dénaturation de la structure enzymatique (elle est toujours une activité catalytique après immobilisation) mais par un changement de l'état d'oxydation et une relaxation de la structure tertiaire.

Gutierrez-Sanchez *et al.* [112] ont immobilisé la bilirubine oxydase *Myrothecium verrucaria* sur une surface d'or fonctionnalisée par des SAMs chargés positivement (ATP) ou négativement (MHA). Ils ont aussi étudié l'orientation de cette enzyme par PM-IRRAS. Ils ont tout d'abord démontré en étudiant la structure cristallographique de la bilirubine oxydase que 34 % des liaisons amides sont localisés dans les feuillets β , 19 % dans les hélices α et 23 % répartis de manière aléatoire. Les résultats de PM-IRRAS ont montré que les hélices α de la bilirubine sont disposées verticalement par rapport à la surface d'or (Figure V.24). Le ratio des bandes amides I et II est identique et ce quelle que soit la méthode de fonctionnalisation de la surface. Cela indique que l'orientation de la structure secondaire de l'enzyme est identique mais avec une rotation de 180° par rapport à la surface.

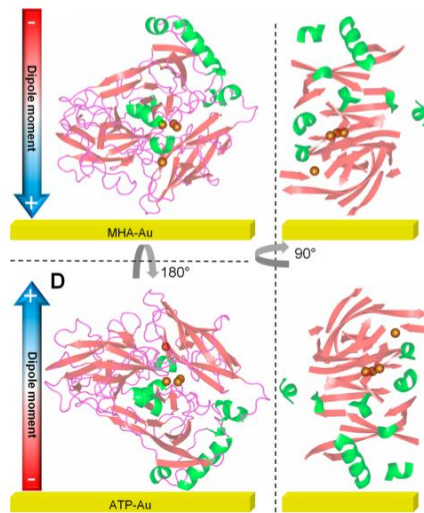


Figure V.24: Schéma de l'orientation de la bilirubine en fonction de son dipôle et de la charge de surface des SAMs A) MHA et B) ATP [112]

Ciaccafava *et al.* [113] ont immobilisé par adsorption une hydrogenase [NiFe] sur une surface d'or fonctionnalisée par des SAMs ayant un caractère hydrophile ($S(CH_2)_nCOOH$) ou hydrophobe ($S(CH_2)_nCH_3$). Ils ont observé que l'immobilisation de la protéine sur la surface ne modifiait pas la structure secondaire de l'enzyme car la forme de la bande amide I reste

identique à celle mesurée par ATR-IR de l'enzyme déposée sur le cristal de Germanium du spectrophotomètre. Cependant l'orientation de l'enzyme est différente suivant le caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface. Ils ont mesuré un ratio amide I/amide II de 6,5 et 4 pour une plaque d'or hydrophile et hydrophobe respectivement. En supposant que l'enzyme est uniquement composée d'hélices α (en réalité 40 % d'hélices α et 15 % de feuillets β) et que l'angle avec la surface est le même pour toutes les hélices, ils ont pu calculer un angle des hélices de 20° sur des surfaces hydrophobes et de 40° sur des surfaces hydrophiles.

En prenant en considération la littérature, et les résultats que nous avons obtenus, il est difficile, en se basant sur les feuillets β de la laccase, de déterminer une orientation particulière de l'enzyme. On peut simplement supposer la position des feuillets β sur le support. Néanmoins, on a pu mettre en évidence que l'orientation de la structure secondaire de l'enzyme est différentes pour les deux types de support (cystéamine ou acide thioglycolique). Sur une surface fonctionnalisée avec des groupements cystéamine, la contribution des vibrations des C=O est importante, on pourrait supposer que les feuillets β de l'enzyme sont orientés avec leur axe parallèle à la surface et leurs plans verticaux. Sur une surface fonctionnalisée avec de l'acide thioglycolique, on aurait d'un pivotement de 90° de l'enzyme. L'axe des feuillets β serait perpendiculaire. L'étude *in situ* par PM-IRRAS nous a permis d'évaluer le temps d'activation des groupements carboxyliques et de mettre en évidence la présence de groupements non activés sur une plaque d'or fonctionnalisée par un SAM d'acide thioglycolique. Elle nous a aussi permis de voir que l'immobilisation sous cloche ou en flux continu de la laccase conduit à la même orientation des feuillets β . Il s'agit ici de la première étude sur le suivi de l'immobilisation de la laccase *in situ* réalisée par PM-IRRAS. L'étude XPS quant à elle a montré que la laccase forme une monocouche à la surface des plaques d'or quel que soit le type de fonction (amine ou carboxylique).

Conclusion générale et perspectives

Dans ce travail, on s'est intéressé au compartiment cathodique d'une biopile enzymatique utilisant comme enzyme la laccase, une oxydase multi-cuivres, en tant que biocatalyseur pour la réaction de réduction de l'oxygène. La particularité de cette cathode est que les enzymes sont directement greffées sur le matériau d'électrode. Au départ de ce travail, plusieurs stratégies ont été exploitées pour immobiliser l'enzyme à la surface de l'électrode en modifiant la procédure de greffage, en oxydant la laccase ou le matériau d'électrode en vue d'une part optimiser la réaction de réduction de l'oxygène et d'autre part comprendre l'impact de l'orientation des enzymes greffées sur le transfert d'électrons. On s'est proposé d'utiliser deux types de matériau à savoir le nitrure de carbone amorphe (a-CN_x) et les nanowalls de carbone tous deux déposés sur du graphite. Les matériaux carbonés offrent l'avantage d'être biocompatibles, peu coûteux et ont d'excellentes propriétés électroniques.

Le choix s'est porté sur le dépôt d'a-CN_x car on peut contrôler la couche déposée (composition et épaisseur), sa surface contient des groupements fonctionnels adaptés au greffage de l'enzyme et sa topographie permet d'avoir accès à des techniques expérimentales inappropriées pour des électrodes présentant une surface nanostructurée. Les courants cathodiques obtenus en utilisant comme électrode un disque de graphite recouvert de a-CN_{0,17}, c'est-à-dire d'un rapport molaire N/C=0,17 étaient assez faibles, autour de $-7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, mais ont été améliorés de plus d'un facteur six après un traitement anodique d'a-CN_x conduisant à la formation de groupes carboxyliques réactifs à la surface. On a alors mesuré une densité de courant maximale de $-44,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Signalons que la forme oxydée de la laccase permet d'avoir de meilleurs résultats pour l'ORR. L'analyse AFM a montré que la surface a-CN_x non traitée est entièrement recouverte d'une monocouche d'enzyme dans le cas de l'immobilisation de la laccase oxydée et partiellement pour la méthode d'immobilisation avec la laccase naturelle. Les taux de recouvrement calculés à partir des données XPS, AFM et de l'activité enzymatique vis-à-vis de l'ABTS ont permis d'avoir une estimation de la quantité d'enzyme présente à la surface. Le regroupement de l'ensemble de ces résultats a permis d'émettre l'hypothèse que notre électrode se comporte comme un système de microélectrodes, c'est-à-dire qu'il y a à la surface de la cathode des enzymes actives et d'autres inactives et ainsi de proposer plusieurs modèles permettant de rendre compte de façon satisfaisante des mesures d'impédances. Cependant, plusieurs hypothèses ont été émises quant à la nature du transfert et à l'orientation de l'enzyme sans que les données dont on dispose à ce jour permettent de trancher.

A travers la nanostructuration de l'électrode de graphite via la formation de nanowalls de carbone (CNWs) par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma nous espérons augmenter de manière significative la surface spécifique de la cathode avec un contrôle de l'orientation de l'enzyme issu de nos observations acquises sur a-CN_x afin d'obtenir des densités de courant pouvant rivaliser avec celles mesurées dans la littérature. Un autre objectif de cette étude a été d'optimiser les conditions de traitement ultérieur de fonctionnalisation de la surface par APPJ en mettant en place des plans d'expériences. Suite à la réalisation de ces plans, on a mesuré la plus forte densité de courant, environ -1 mA/cm². Ces résultats sont compétitifs par rapport aux résultats obtenus sur des nanotubes de carbone. On a mis en évidence que les courants plus élevés ont été mesurés sur des électrodes fonctionnalisées par traitement plasma APPJ dans des conditions douces. Or dans ces conditions, l'oxydation du carbone est limitée : les analyses XPS ont montré qu'il n'y a pas de groupements carboxyliques en surface mais elles ont permis de mettre en évidence la présence de groupements aldéhydes. C'est sans doute via la formation d'une liaison imine entre ces groupements et ses propres fonctions amines que la laccase est immobilisée de façon covalente à la surface.

L'étude PM-IRRAS de l'orientation et de la cinétique de greffage de la laccase sur des surfaces d'or par PM-IRRAS a permis d'accéder à la cinétique de greffage et d'aborder la problématique de l'orientation de la laccase sous un angle original. Ainsi, on a pu mettre en évidence que l'orientation de la structure secondaire de l'enzyme est différente en fonction de la nature des groupements fonctionnels présents sur les surfaces d'or (cystéamine ou acide thioglycolique). L'étude *in situ* par PM-IRRAS nous a permis quant à elle d'évaluer le temps d'activation des groupements carboxyliques et de mettre en évidence la présence de groupements non activés sur une plaque d'or fonctionnalisée par un SAM d'acide thioglycolique. Elle nous a aussi permis de voir que l'immobilisation sous cloche ou en flux continu de la laccase conduit à la même orientation des feuillets β. Il s'agit ici de la première étude sur le suivi de l'immobilisation de la laccase *in situ* réalisée par PM-IRRAS. On a pu aussi démontrer par XPS que la laccase forme une monocouche à la surface de ces surfaces.

En résumé, ce travail a permis de démontrer le potentiel de deux types de matériaux (a-CN_x et les nanowalls de carbone) pour la conception d'une cathode de biopile. Il nous a aussi permis d'évaluer l'orientation et la cinétique d'immobilisation de la laccase. Ces travaux mettent aussi en évidence les aspects à améliorer et à étudier pour la conception d'une biopile

enzymatique performante et ainsi pouvoir utiliser ces dernières dans des dispositifs implantables. Les perspectives s'articulent autour de plusieurs axes : la chimie de surface, la stabilité et l'ingénierie de l'enzyme ainsi que la compréhension du transfert d'électrons.

Pour améliorer le premier point, de nouvelles méthodes de fonctionnalisation peuvent être testées afin de mieux contrôler l'orientation de l'enzyme à la surface. On peut immobiliser la laccase par π -stacking en utilisant des dérivés du pyrène, de l'anthracène en fonctionnalisant les nanowalls de carbone afin d'immobiliser la laccase via sa cavité hydrophobe qui se situe proche du cuivre T1. On peut aussi ajouter sur ces nanowalls des nanoparticules d'or. Les nanoparticules d'or ayant la particularité d'avoir une bonne conductivité, elles permettent d'améliorer le transfert d'électrons et ainsi favoriser le DET [38, 62, 63]. La surface des nanoparticules d'or peut être facilement fonctionnalisée par plasma afin d'avoir des groupements fonctionnels ou on peut utiliser des molécules polycycliques.

L'amélioration de la stabilité des électrodes nécessite de comprendre les phénomènes à l'origine de la diminution des courants catalytiques. On a noté une diminution progressive du courant durant 24 heures. A titre d'exemple pour une électrode graphite/a-CN_{0,17}, on a observé une baisse de 50 % du courant. Cette diminution est-elle due à des propriétés propres à l'enzyme ou à son immobilisation à la surface des électrodes ?

On pourrait aussi augmenter les densités de courant en modifiant la séquence de l'enzyme par la création de mutants dont on pourra ensuite mieux contrôler l'orientation. Une tentative a été effectuée durant la thèse dans laquelle des points d'ancrage de la laccase proches du cuivre T1 ont été créés. Malheureusement la production des souches contenant les gènes mutants est très faible et n'a pas permis d'obtenir une quantité de mutants suffisantes pour mener à bien des tests d'immobilisation sur électrode. Il serait nécessaire d'optimiser les conditions de culture.

Enfin, la compréhension du transfert d'électrons pourrait être effectuée par une meilleure compréhension de l'orientation en combinant la technique de spectroscopie d'impédance électrochimique et de PM-IRRAS en utilisant aussi des enzymes mutantes ayant un site d'accroche.

Annexes

Annexe 1 Production de la laccase mutante

On a essayé au cours de la thèse d'immobiliser des enzymes mutantes afin d'améliorer l'orientation à la surface des électrodes. La laccase produite par *Trametes versicolor* renferme dans sa séquence cinq lysines. Ces lysines sont notées : LYS71, LYS174, LYS194, LYS59, LYS157 selon leur position dans la chaîne peptidique.. Sept plasmides ont été synthétisés par Eurogentech : l'option 1 (OPT1) dans laquelle trois lysines (LYS 71, LYS 174 et LYS194) ont été mutées en alanine. Il ne reste plus dans cette option que deux lysines (LYS59 et LYS157). La laccase ne pourra donc avoir que deux orientations possibles dans le cas d'une électrode avec des amines de surface, voire une seule si on suppose que l'enzyme s'accroche par ces deux lysines simultanément puisqu'elles sont situées sur la même face. L'option 2 (OPT2) et l'option 3 (OPT3) ne renferment plus qu'une seule lysine (LYS157 et LYS59 respectivement). Dans les options 4 (OPT4) et 5 (OPT5), toutes les lysines natives de la laccase ont été mutées en alanine. Une nouvelle lysine a été créée en position 334 (GLY334LYS) pour l'option 4 et en position 161 (ALA161LYS) pour l'option 5. Quant à l'option 6 (OPT6), plus aucune lysine n'est présente dans la structure de la laccase. Dans ce cas, un greffage covalent n'est plus possible lorsque la surface des électrodes présente des groupements carboxyliques.

Production des laccases mutantes

Tableau A.1: Composition du milieu YNB 5000

	Concentration (g/L)
Yeast nitrogen base	1,7
Sulfate d'ammonium	5
Glucose	10
Agar	15
Eau	1 L
Sulfate de cuivre après stérilisation	0,025
ABTS après stérilisation	20 mM

La première étape avant production est de vérifier si les levures sont capables de synthétiser la laccase. Cette vérification s'effectue sur boîte de pétri dans un milieu YNB 5000 dont la composition (V = 1 L) est décrite dans le Tableau A.1. La stérilisation du sulfate de cuivre et

de l'ABTS s'effectuent à l'aide d'une seringue ayant un filtre Whatman. Le développement d'une coloration verte au niveau des boîtes de pétri au bout d'une semaine de culture confirme que les clones sont capables de produire une laccase mutante active (Figure A.1).

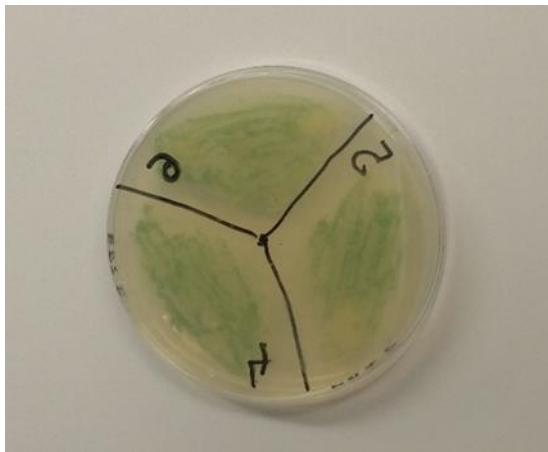


Figure A.1: Production de laccase dans un milieu YNB 5000

Pour entretenir la souche, les levures sont cultivées sur boîte de pétri dans un milieu YPD. Le piquage est réalisé en moyenne chaque semaine. Les cultures sont par la suite entreposées au réfrigérateur à une température égale à 4°C. La composition du milieu est décrite dans le Tableau A.2.

Tableau A.2: Composition du milieu YPD

	Concentration g/L
Extrait de levure	10
Glucose	10
Bactopeptone	10
Agar (culture sur boîte de pétri)	15

Les levures ayant produit la laccase sont par la suite cultivées dans un milieu de culture liquide PPB durant 7 à 10 jours (Tableau A.3) sous agitation vigoureuse à une température de 28°C. Une pré-culture avant inoculation des clones a été tout d'abord réalisée dans un milieu YPD sous agitation durant 24 heures à 28°C. Ensuite un certain volume de cette solution a été prélevé et ajouté au milieu de culture PPB de façon à avoir une densité optique initiale (DO) de

0,1 à 600 nm. Durant la culture, le pH est vérifié quotidiennement et ajusté avec de la soude à 0,1 M de façon à rester constant et égal à 7. Cette culture a été tout d'abord réalisée dans de faibles volumes avant de passer à une production plus importante. Un témoin positif appelé YL4 a été utilisé afin de vérifier le rendement de la culture. La Figure A.2 montre l'évolution de l'activité enzymatique des milieux de culture pour les différents clones sélectionnés.

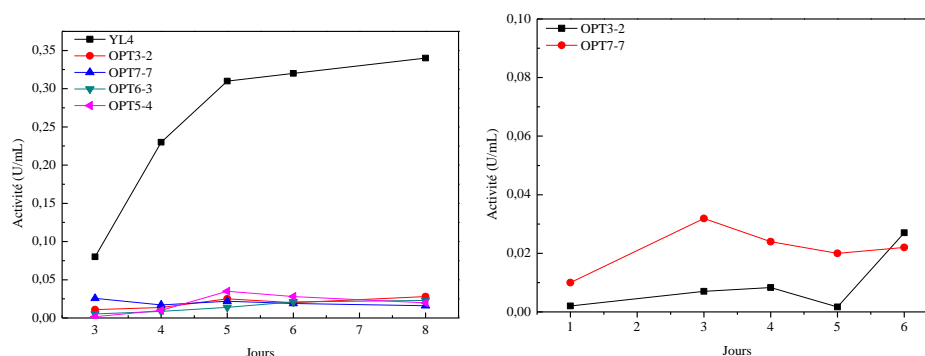


Figure A.2: Evolution de l'activité enzymatique des laccases mutantes

Tableau A.3: Composition du milieu PPB

	Concentration g/L
Glucose	20
Extrait de levure	1,32
NH ₄ Cl	1,32
Na, K phosphate	50 mM
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,24
CuSO ₄	0,025
Thiamine	1 μM

Afin de stocker de manière définitive les levures et ne pas avoir à effectuer des piquages chaque semaine, ces dernières sont conservées dans du glycérol à -80°C. Un milieu YPD est tout d'abord préparé selon le protocole habituel (Tableau A.2). On ajoute à ce milieu 25 % de glycérol et on stérilise le mélange. On prépare aussi dans des boîtes de pétri avec YPD une culture des différentes levures. On prélève ensuite à l'aide d'une ose stérile la levure qu'on

disperse dans le milieu YPD + glycérol. On congèle l'ensemble dans de l'azote liquide puis dans un congélateur à -80°C.

Annexe 2 Saturation de la solution tampon acétate en oxygène

La Figure A.1 montre les courbes de voltampérométrie cyclique obtenues sur Pt et sur a-CN_x nu dans une solution de tampon acétate 50 mM, (pH = 4,2) saturée en oxygène. Le temps de bullage d'oxygène nécessaire pour atteindre la saturation a été déterminé en utilisant comme électrode de travail du platine et en se plaçant à une valeur du potentiel de réduction de l'oxygène sur le platine qui a été fixée à -0,5 V/ECS à l'aide de la Figure A.1A. La Figure A.2 présente les courbes de chronoampérométrie obtenues pour différents temps de bullage. On observe qu'après un temps de bullage entre 30 et 40 min le courant de réduction de l'oxygène ne varie plus. On a donc opté pour un temps de bullage de 40 min.

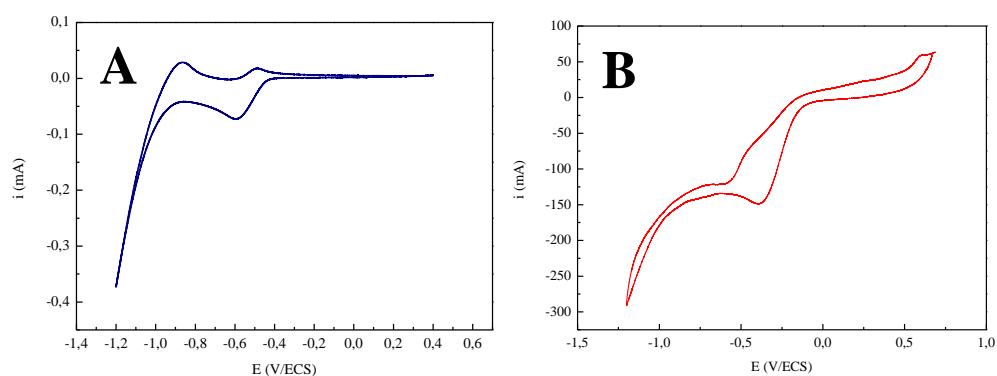


Figure A.1: Voltampérogrammes obtenus dans une solution saturée en oxygène dans un tampon acétate 50 mM, (pH = 4,2) d'une électrode A) de platine et B) graphite/a-CN_{0,17}

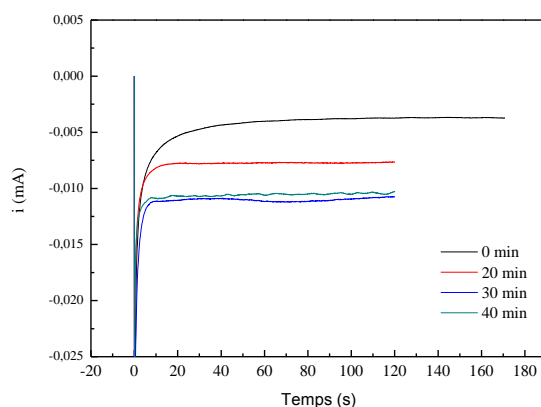


Figure A.2: Courbe de chronoampérométrie de réduction de l'oxygène sur une électrode de platine dans un tampon acétate 50 mM, (pH = 4,2) à différents temps de bullage.

On a également confirmé la stabilité du courant d'ORR dans une solution saturée en oxygène sur une durée minimale de 5 minutes supérieure donc aux 4 minutes nécessaires pour effectuer la CV et donc la mesure de densité de courant.

Références

- [1] A. Yahiro, S. Lee, D. Kimble, *Bioelectrochemistry: I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Biophysical Subjects*, 88 (1964) 375-383.
- [2] S. Cosnier, A. J. Gross, A. Le Goff, M. Holzinger, Recent advances on enzymatic glucose/oxygen and hydrogen/oxygen biofuel cells: Achievements and limitations, *Journal of Power Sources*, 325 (2016) 252-263.
- [3] M. Ardhaoui, M. Zheng, J. Pulpytel, D. Dowling, C. Jolival, F.A. Khonsari, Plasma functionalized carbon electrode for laccase-catalyzed oxygen reduction by direct electron transfer, *Bioelectrochemistry*, 91 (2013) 52-61.
- [4] M.T. Meredith, S.D. Minter, Biofuel cells: enhanced enzymatic bioelectrocatalysis, *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 5 (2012) 157-179.
- [5] D. Leech, P. Kavanagh, W. Schuhmann, Enzymatic fuel cells: Recent progress, *Electrochimica Acta*, 84 (2012) 223-234.
- [6] B.E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, K. Rabaey, *Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology*, *Environmental Science & Technology*, 40 (2006) 5181-5192.
- [7] M. Rahimnejad, A. Adhami, S. Darvari, A. Zirepour, S.-E. Oh, Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review, *Alexandria Engineering Journal*, 54 (2015) 745-756.
- [8] C. Santoro, C. Arbizzani, B. Erable, I. Ieropoulos, Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review, *Journal of Power Sources*, 356 (2017) 225-244.
- [9] P. Choudhury, U.S.P. Uday, N. Mahata, O. Nath Tiwari, R. Narayan Ray, T. Kanti Bandyopadhyay, B. Bhunia, Performance improvement of microbial fuel cells for waste water treatment along with value addition: A review on past achievements and recent perspectives, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79 (2017) 372-389.
- [10] B.E. Logan, J.M. Regan, *Microbial fuel cells-challenges and applications*, in, ACS Publications, 2006.
- [11] D. Pant, G. Van Bogaert, L. Diels, K. Vanbroekhoven, A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production, *Bioresour Technol*, 101 (2010) 1533-1543.
- [12] K. Rabaey, W. Verstraete, *Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation*, *Trends Biotechnol*, 23 (2005) 291-298.
- [13] D. Bhatnagar, S. Xu, C. Fischer, R.L. Arechederra, S.D. Minter, Mitochondrial biofuel cells: expanding fuel diversity to amino acids, *Phys Chem Chem Phys*, 13 (2011) 86-92.
- [14] R.L. Arechederra, K. Boehm, S.D. Minter, Mitochondrial bioelectrocatalysis for biofuel cell applications, *Electrochimica Acta*, 54 (2009) 7268-7273.
- [15] R. Arechederra, S.D. Minter, Organelle-based biofuel cells: Immobilized mitochondria on carbon paper electrodes, *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 6698-6703.
- [16] M.H. Osman, A.A. Shah, F.C. Walsh, Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: enzymatic cells, *Biosens Bioelectron*, 26 (2011) 3087-3102.
- [17] A. de Poulpiquet, *Biopile enzymatiques H₂-O₂: Nanostructuration de l'interface électrochimique pour l'immobilisation des enzymes redox*, Thèse (2014).

- [18] L. Quintanar, C. Stoj, A.B. Taylor, P.J. Hart, D.J. Kosman, E.I. Solomon, Shall We Dance? How A Multicopper Oxidase Chooses Its Electron Transfer Partner, *Accounts of Chemical Research*, 40 (2007) 445-452.
- [19] C.H. Kjaergaard, S.M. Jones, S. Gounel, N. Mano, E.I. Solomon, Two-Electron Reduction versus One-Electron Oxidation of the Type 3 Pair in the Multicopper Oxidases, *J Am Chem Soc*, 137 (2015) 8783-8794.
- [20] S.M. Jones, E.I. Solomon, Electron transfer and reaction mechanism of laccases, *Cell Mol Life Sci*, 72 (2015) 869-883.
- [21] D.E. Heppner, C.H. Kjaergaard, E.I. Solomon, Mechanism of the reduction of the native intermediate in the multicopper oxidases: insights into rapid intramolecular electron transfer in turnover, *J Am Chem Soc*, 136 (2014) 17788-17801.
- [22] I. Ivanov, T. Vidaković-Koch, K. Sundmacher, Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells: Experiments and Modeling, *Energies*, 3 (2010) 803-846.
- [23] I. Willner, G. Arad, E. Katz, A biofuel cell based on pyrroloquinoline quinone and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 44 (1998) 209-214.
- [24] E. Katz, I. Willner, A.B. Kotlyar, A non-compartmentalized glucose|O₂ biofuel cell by bioengineered electrode surfaces, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 479 (1999) 64-68.
- [25] A. Pizzariello, M. Stred'ansky, S. Miertuš, A glucose/hydrogen peroxide biofuel cell that uses oxidase and peroxidase as catalysts by composite bulk-modified bioelectrodes based on a solid binding matrix, *Bioelectrochemistry*, 56 (2002) 99-105.
- [26] H.P. Call, I. Mücke, History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process), *Journal of Biotechnology*, 53 (1997) 163-202.
- [27] T. Ters, T. Kuncinger, E. Srebotnik, Carboxylic acids used in common buffer systems inhibit the activity of fungal laccases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61 (2009) 261-267.
- [28] T. Bertrand, C. Jolival, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak, C. Mougin, Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics, *Biochemistry*, 41 (2002) 7325-7333.
- [29] E.I. Solomon, A.J. Augustine, J. Yoon, O₂Reduction to H₂O by the multicopper oxidases, *Dalton Transactions*, (2008) 3921-3932.
- [30] R. Bourbonnais, M.G. Paice, Oxidation of non-phenolic substrates, *FEBS Letters*, 267 (1990) 99-102.
- [31] T. Noll, G. Noll, Strategies for "wiring" redox-active proteins to electrodes and applications in biosensors, biofuel cells, and nanotechnology, *Chem Soc Rev*, 40 (2011) 3564-3576.
- [32] R. Bilewicz, M. Opallo, Biocathodes for Dioxygen Reduction in Biofuel Cells, in: *Fuel Cell Science*, John Wiley & Sons, Inc., 2010, pp. 169-214.
- [33] M.J. Moehlenbrock, S.D. Minter, Extended lifetime biofuel cells, *Chemical Society Reviews*, 37 (2008) 1188-1196.
- [34] N. Lalaoui, Réduction bioélectrocatalytique du dioxygène par des enzymes à cuivre connectées sur des électrodes nanostructurées et fonctionnalisées: Intégration aux biopiles enzymatiques, thèse, (2015).

- [35] A. de Poulpiquet, A. Ciaccafava, E. Lojou, New trends in enzyme immobilization at nanostructured interfaces for efficient electrocatalysis in biofuel cells, *Electrochimica Acta*, 126 (2014) 104-114.
- [36] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*, 354 (1991) 56-58.
- [37] L. Hu, D.S. Hecht, G. Grüner, Carbon Nanotube Thin Films: Fabrication, Properties, and Applications, *Chemical Reviews*, 110 (2010) 5790-5844.
- [38] N. Lalaoui, P. Rousselot-Pailley, V. Robert, Y. Mekmouche, R. Villalonga, M. Holzinger, S. Cosnier, T. Tron, A. Le Goff, Direct Electron Transfer between a Site-Specific Pyrene-Modified Laccase and Carbon Nanotube/Gold Nanoparticle Supramolecular Assemblies for Bioelectrocatalytic Dioxygen Reduction, *ACS Catalysis*, 6 (2016) 1894-1900.
- [39] J. Pinson, F. Podvorica, Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts, *Chemical Society Reviews*, 34 (2005) 429-439.
- [40] C. Vaz-Dominguez, S. Campuzano, O. Rudiger, M. Pita, M. Gorbacheva, S. Shleev, V.M. Fernandez, A.L. De Lacey, Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition, *Biosens Bioelectron*, 24 (2008) 531-537.
- [41] M. Pita, C. Gutierrez-Sanchez, D. Olea, M. Velez, C. Garcia-Diego, S. Shleev, V.M. Fernandez, A.L. De Lacey, High Redox Potential Cathode Based on Laccase Covalently Attached to Gold Electrode, *The Journal of Physical Chemistry C*, 115 (2011) 13420-13428.
- [42] M. Zheng, S. Griveau, C. Dupont-Gillain, M.J. Genet, C. Jolival, Oxidation of laccase for improved cathode biofuel cell performances, *Bioelectrochemistry*, 106 (2015) 77-87.
- [43] C.F. Blanford, C.E. Foster, R.S. Heath, F.A. Armstrong, Efficient electrocatalytic oxygen reduction by the 'blue' copper oxidase, laccase, directly attached to chemically modified carbons, *Faraday Discussions*, 140 (2009) 319-335.
- [44] C.F. Blanford, R.S. Heath, F.A. Armstrong, A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O₂ reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface, *Chemical Communications*, (2007) 1710-1712.
- [45] N. Lalaoui, A. Le Goff, M. Holzinger, M. Mermoux, S. Cosnier, Wiring laccase on covalently modified graphene: carbon nanotube assemblies for the direct bio-electrocatalytic reduction of oxygen, *Chemistry*, 21 (2015) 3198-3201.
- [46] K. Stolarczyk, M. Sepelowska, D. Lyp, K. Żelechowska, J.F. Biernat, J. Rogalski, K.D. Farmer, K.N. Roberts, R. Bilewicz, Hybrid biobattery based on arylated carbon nanotubes and laccase, *Bioelectrochemistry*, 87 (2012) 154-163.
- [47] C. Di Bari, A. Goñi-Urtiaga, M. Pita, S. Shleev, M.D. Toscano, R. Sainz, A.L. De Lacey, Fabrication of high surface area graphene electrodes with high performance towards enzymatic oxygen reduction, *Electrochimica Acta*, 191 (2016) 500-509.
- [48] P. Singh, S. Campidelli, S. Giordani, D. Bonifazi, A. Bianco, M. Prato, Organic functionalisation and characterisation of single-walled carbon nanotubes, *Chemical Society Reviews*, 38 (2009) 2214-2230.
- [49] M.T. Meredith, M. Minson, D. Hickey, K. Artyushkova, D.T. Glatzhofer, S.D. Minter, Anthracene-Modified Multi-Walled Carbon Nanotubes as Direct Electron Transfer Scaffolds for Enzymatic Oxygen Reduction, *ACS Catalysis*, 1 (2011) 1683-1690.
- [50] M. Sosna, J.M. Chretien, J.D. Kilburn, P.N. Bartlett, Monolayer anthracene and anthraquinone modified electrodes as platforms for *Trametes hirsuta* laccase immobilisation, *Phys Chem Chem Phys*, 12 (2010) 10018-10026.

- [51] M. Sosna, L. Stoica, E. Wright, J.D. Kilburn, W. Schuhmann, P.N. Bartlett, Mass transport controlled oxygen reduction at anthraquinone modified 3D-CNT electrodes with immobilized *Trametes hirsuta* laccase, *Phys Chem Chem Phys*, 14 (2012) 11882-11885.
- [52] D. Kolacyak, J. Ihde, C. Merten, A. Hartwig, U. Lommatzsch, Fast functionalization of multi-walled carbon nanotubes by an atmospheric pressure plasma jet, *Journal of Colloid and Interface Science*, 359 (2011) 311-317.
- [53] K. Labus, I. Gancarz, J. Bryjak, Immobilization of laccase and tyrosinase on untreated and plasma-treated cellulosic and polyamide membranes, *Materials Science and Engineering: C*, 32 (2012) 228-235.
- [54] E. Tastan, S. Onder, F.N. Kok, Immobilization of laccase on polymer grafted polytetrafluoroethylene membranes for biosensor construction, *Talanta*, 84 (2011) 524-530.
- [55] C. Gutiérrez-Sánchez, W. Jia, Y. Beyl, M. Pita, W. Schuhmann, A.L. De Lacey, L. Stoica, Enhanced direct electron transfer between laccase and hierarchical carbon microfibers/carbon nanotubes composite electrodes. Comparison of three enzyme immobilization methods, *Electrochimica Acta*, 82 (2012) 218-223.
- [56] H.L. Pang, J. Liu, D. Hu, X.H. Zhang, J.H. Chen, Immobilization of laccase onto 1-aminopyrene functionalized carbon nanotubes and their electrocatalytic activity for oxygen reduction, *Electrochimica Acta*, 55 (2010) 6611-6616.
- [57] R.J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai, Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization, *Journal of the American Chemical Society*, 123 (2001) 3838-3839.
- [58] F. Giroud, S.D. Minter, Anthracene-modified pyrenes immobilized on carbon nanotubes for direct electroreduction of O₂ by laccase, *Electrochemistry Communications*, 34 (2013) 157-160.
- [59] M. Bourourou, K. Elouarzaki, N. Lalaoui, C. Agnès, Le, A. Goff, M. Holzinger, A. Maaref, S. Cosnier, Supramolecular Immobilization of Laccase on Carbon Nanotube Electrodes Functionalized with (Methylpyrenylaminomethyl)anthraquinone for Direct Electron Reduction of Oxygen, *Chemistry - European Journal*, 19 (2013) 9371-9375.
- [60] N. Lalaoui, A. Le Goff, M. Holzinger, S. Cosnier, Fully Oriented Bilirubin Oxidase on Porphyrin-Functionalized Carbon Nanotube Electrodes for Electrocatalytic Oxygen Reduction, *Chemistry*, 21 (2015) 16868-16873.
- [61] N. Lalaoui, K. Elouarzaki, A. Le Goff, M. Holzinger, S. Cosnier, Efficient direct oxygen reduction by laccases attached and oriented on pyrene-functionalized polypyrrole/carbon nanotube electrodes, *Chem Commun (Camb)*, 49 (2013) 9281-9283.
- [62] C. Gutierrez-Sanchez, M. Pita, C. Vaz-Dominguez, S. Shleev, A.L. De Lacey, Gold nanoparticles as electronic bridges for laccase-based biocathodes, *J Am Chem Soc*, 134 (2012) 17212-17220.
- [63] C. Di Bari, S. Shleev, A.L. De Lacey, M. Pita, Laccase-modified gold nanorods for electrocatalytic reduction of oxygen, *Bioelectrochemistry*, 107 (2016) 30-36.
- [64] G. Gupta, V. Rajendran, P. Atanassov, Bioelectrocatalysis of Oxygen Reduction Reaction by Laccase on Gold Electrodes, *Electroanalysis*, 16 (2004) 1182-1185.
- [65] T. Siepenkoetter, U. Salaj-Kosla, X. Xiao, P.Ó. Conghaile, M. Pita, R. Ludwig, E. Magner, Immobilization of Redox Enzymes on Nanoporous Gold Electrodes: Applications in Biofuel Cells, *ChemPlusChem*, 82 (2017) 553-560.

- [66] F. Gao, Y. Yan, L. Su, L. Wang, L. Mao, An enzymatic glucose/O₂ biofuel cell: Preparation, characterization and performance in serum, *Electrochemistry Communications*, 9 (2007) 989-996.
- [67] X. Li, L. Zhang, L. Su, T. Ohsaka, L. Mao, A Miniature Glucose/O₂Biofuel Cell With a High Tolerance Against Ascorbic Acid, *Fuel Cells*, 9 (2009) 85-91.
- [68] G. Göbel, M.L. Beltran, J. Mundhenk, T. Heinlein, J. Schneider, F. Lisdat, Operation of a carbon nanotube-based glucose/oxygen biofuel cell in human body liquids—Performance factors and characteristics, *Electrochimica Acta*, 218 (2016) 278-284.
- [69] M. Cadet, S. Gounel, C. Stines-Chaumeil, X. Brilland, J. Rouhana, F. Louerat, N. Mano, An enzymatic glucose/O₂ biofuel cell operating in human blood, *Biosens Bioelectron*, 83 (2016) 60-67.
- [70] R.D. Milton, K. Lim, D.P. Hickey, S.D. Minter, Employing FAD-dependent glucose dehydrogenase within a glucose/oxygen enzymatic fuel cell operating in human serum, *Bioelectrochemistry*, 106 (2015) 56-63.
- [71] P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J.-P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathé, P. Porcu, S. Cosnier, A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats, *PLOS ONE*, 5 (2010) e10476.
- [72] A. Zebda, S. Cosnier, J.P. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui, P. Cinquin, Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices, *Sci Rep*, 3 (2013) 1516.
- [73] T. Miyake, K. Haneda, N. Nagai, Y. Yatagawa, H. Onami, S. Yoshino, T. Abe, M. Nishizawa, Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms, *Energy & Environmental Science*, 4 (2011) 5008-5012.
- [74] M. Rasmussen, R.E. Ritzmann, I. Lee, A.J. Pollack, D. Scherson, An Implantable Biofuel Cell for a Live Insect, *Journal of the American Chemical Society*, 134 (2012) 1458-1460.
- [75] K. Shoji, Y. Akiyama, M. Suzuki, T. Hoshino, N. Nakamura, H. Ohno, K. Morishima, Insect biofuel cells using trehalose included in insect hemolymph leading to an insect-mountable biofuel cell, *Biomedical Microdevices*, 14 (2012) 1063-1068.
- [76] K. Shoji, Y. Akiyama, M. Suzuki, N. Nakamura, H. Ohno, K. Morishima, Biofuel cell backpacked insect and its application to wireless sensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 78 (2016) 390-395.
- [77] A. Szczupak, J. Halamek, L. Halamkova, V. Bocharova, L. Alfonta, E. Katz, Living battery - biofuel cells operating in vivo in clams, *Energy & Environmental Science*, 5 (2012) 8891-8895.
- [78] L. Halámková, J. Halánek, V. Bocharova, A. Szczupak, L. Alfonta, E. Katz, Implanted Biofuel Cell Operating in a Living Snail, *Journal of the American Chemical Society*, 134 (2012) 5040-5043.
- [79] S. Jribi, Réactivité électrochimique et fonctionnalisation de surface de films minces de nitrure de carbone amorphe: vers l'élaboration de sondes mixtes AFM-électrochimiques, Thèse, (2012).
- [80] S. Jribi, S.I. Cordoba de Torresi, T. Augusto, H. Cachet, C. Debiemme-Chouvy, C. Deslouis, A. Pailleret, Determination of surface amine groups on amorphous carbon nitride thin films using a one step covalent grafting of a redox probe, *Electrochimica Acta*, 136 (2014) 473-482.

- [81] S. Mori, T. Ueno, M. Suzuki, Synthesis of carbon nanowalls by plasma-enhanced chemical vapor deposition in a CO/H₂ microwave discharge system, *Diamond and Related Materials*, 20 (2011) 1129-1132.
- [82] Y. Wu, P. Qiao, T. Chong, Z. Shen, Carbon nanowalls grown by microwave plasma enhanced chemical vapor deposition, *Advanced Materials*, 14 (2002) 64-67.
- [83] Y. Wu, B. Yang, B. Zong, H. Sun, Z. Shen, Y. Feng, Carbon nanowalls and related materials, *Journal of Materials Chemistry*, 14 (2004) 469-477.
- [84] S. Genta, M. Tetsuharu, K. Toshiaki, H. Rikizo, Fast Growth of Carbon Nanowalls from Pure Methane using Helicon Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition, *Japanese Journal of Applied Physics*, 45 (2006) 5210.
- [85] K. Kobayashi, M. Tanimura, H. Nakai, A. Yoshimura, H. Yoshimura, K. Kojima, M. Tachibana, Nanographite domains in carbon nanowalls, *Journal of Applied Physics*, 101 (2007) 094306.
- [86] T. Dikonimos Makris, L. Giorgi, R. Giorgi, N. Lisi, E. Salernitano, CNT growth on alumina supported nickel catalyst by thermal CVD, *Diamond and Related Materials*, 14 (2005) 815-819.
- [87] T. Bertrand, C. Jolival, E. Caminade, N. Joly, C. Mougin, P. Briozzo, Purification and preliminary crystallographic study of *Trametes versicolor* laccase in its native form, *Acta Crystallographica Section D*, 58 (2002) 319-321.
- [88] L. Lesage-Meessen, M. Delattre, M. Haon, J.-F. Thibault, B.C. Ceccaldi, P. Brunerie, M. Asther, A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*, *Journal of Biotechnology*, 50 (1996) 107-113.
- [89] R.A. Medeiros, R. Matos, A. Benchikh, B. Saidani, C. Debiemme-Chouvy, C. Deslouis, R.C. Rocha-Filho, O. Fatibello-Filho, Amorphous carbon nitride as an alternative electrode material in electroanalysis: simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid, *Anal Chim Acta*, 797 (2013) 30-39.
- [90] M.E. Orazem, B. Tribollet, Methods for Representing Impedance, in: *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., 2008, pp. 307-331.
- [91] F. Jia, B. Narasimhan, S. Mallapragada, Materials- based strategies for multi- enzyme immobilization and co- localization: a review, *Biotechnology and bioengineering*, 111 (2014) 209-222.
- [92] C.C. Dupont-Gillain, I. Jacquemart, Patterned collagen layers on polystyrene: direct probing using AFM in the adhesion mapping mode, *Surface science*, 539 (2003) 145-154.
- [93] D. Pankratov, J. Sotres, A. Barrantes, T. Arnebrant, S. Shleev, Interfacial behavior and activity of laccase and bilirubin oxidase on bare gold surfaces, *Langmuir*, 30 (2014) 2943-2951.
- [94] K. Gonzalez Arzola, Y. Gimeno, M.C. Arevalo, M.A. Falcon, A. Hernandez Creus, Electrochemical and AFM characterization on gold and carbon electrodes of a high redox potential laccase from *Fusarium proliferatum*, *Bioelectrochemistry*, 79 (2010) 17-24.
- [95] C. Traunsteiner, S. Sek, V. Huber, C. Valero-Vidal, J. Kunze-Liebhäuser, Laccase immobilized on a mixed thiol monolayer on Au(111) – structure-dependent activity towards oxygen reduction, *Electrochimica Acta*, 213 (2016) 761-770.
- [96] C. Gabrielli, M. Keddam, N. Portail, P. Rousseau, H. Takenouti, V. Vivier, Electrochemical impedance spectroscopy investigations of a microelectrode behavior in a thin-layer cell: Experimental and theoretical studies, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110 (2006) 20478-20485.

- [97] C. Stines-Chaumeil, E. Roussarie, N. Mano, The nature of the rate-limiting step of blue multicopper oxidases: Homogeneous studies versus heterogeneous, *Biochimie Open*, 4 (2017) 36-40.
- [98] L. Giorgi, T. Makris, R. Giorgi, N. Lisi, E. Salernitano, Electrochemical properties of carbon nanowalls synthesized by HF-CVD, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 126 (2007) 144-152.
- [99] O. Tanaike, N. Kitada, H. Yoshimura, H. Hatori, K. Kojima, M. Tachibana, Lithium insertion behavior of carbon nanowalls by dc plasma CVD and its heat-treatment effect, *Solid State Ionics*, 180 (2009) 381-385.
- [100] M. Valcárcel, S. Cárdenas, B. Simonet, Role of carbon nanotubes in analytical science, *Analytical chemistry*, 79 (2007) 4788-4797.
- [101] C. Méthivier, C.-M. Pradier, Infra Red Reflection Absorption Spectroscopy and Polarisation Modulation-IRRAS, in: *Characterization of Solid Materials and Heterogeneous Catalysts*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012, pp. 255-287.
- [102] C. Méthivier, B. Beccard, C.M. Pradier, In Situ Analysis of a Mercaptoundecanoic Acid Layer on Gold in Liquid Phase, by PM-IRAS. Evidence for Chemical Changes with the Solvent, *Langmuir*, 19 (2003) 8807-8812.
- [103] V. Humblot, J.F. Yala, P. Thebault, K. Boukerma, A. Hequet, J.M. Berjeaud, C.M. Pradier, The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers, *Biomaterials*, 30 (2009) 3503-3512.
- [104] C.D. Bain, E.B. Troughton, Y.T. Tao, J. Evall, G.M. Whitesides, R.G. Nuzzo, Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold, *Journal of the American Chemical Society*, 111 (1989) 321-335.
- [105] E. Briand, M. Salmay, J.M. Herry, H. Perrot, C. Compere, C.M. Pradier, Building of an immunosensor: how can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency?, *Biosens Bioelectron*, 22 (2006) 440-448.
- [106] L. Bertilsson, B. Liedberg, Infrared study of thiol monolayer assemblies on gold: preparation, characterization, and functionalization of mixed monolayers, *Langmuir*, 9 (1993) 141-149.
- [107] R.V. Duevel, R.M. Corn, Amide and ester surface attachment reactions for alkanethiol monolayers at gold surfaces as studied by polarization modulation Fourier transform infrared spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 64 (1992) 337-342.
- [108] S. Sam, L. Touahir, J. Salvador Andresa, P. Allongue, J.N. Chazalviel, A.C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, A. Moraillon, F. Ozanam, N. Gabouze, S. Djebbar, Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces, *Langmuir*, 26 (2010) 809-814.
- [109] A. Moraillon, A. Gouget-Laemmel, F. Ozanam, J.-N. Chazalviel, Amidation of monolayers on silicon in physiological buffers: A quantitative IR study, *The Journal of Physical Chemistry C*, 112 (2008) 7158-7167.
- [110] P.I. Haris, D. Chapman, The conformational analysis of peptides using Fourier transform IR spectroscopy, *Biopolymers*, 37 (1995) 251-263.
- [111] P. Olejnik, B. Palys, A. Kowalczyk, A.M. Nowicka, Orientation of Laccase on Charged Surfaces. Mediatorless Oxygen Reduction on Amino- and Carboxyl-Ended Ethylphenyl Groups, *The Journal of Physical Chemistry C*, 116 (2012) 25911-25918.
- [112] C. Gutierrez-Sanchez, A. Ciaccafava, P.Y. Blanchard, K. Monsalve, M.T. Giudici-Ortoni, S. Lecomte, E. Lojou, Efficiency of Enzymatic O₂Reduction by *Myrothecium*

verrucariaBilirubin Oxidase Probed by Surface Plasmon Resonance, PMIRRAS, and Electrochemistry, ACS Catalysis, 6 (2016) 5482-5492.

[113] A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Lecomte, M.T. Giudici-Ortoni, E. Lojou, Electrochemistry, AFM, and PM-IRRA Spectroscopy of Immobilized Hydrogenase: Role of a Hydrophobic Helix in Enzyme Orientation for Efficient H₂ Oxidation, Angewandte Chemie International Edition, 51 (2012) 953-956.

Abstract

Enzymatic biofuel cells are an attractive alternative for renewable electricity generation. In this work, we are focusing on the cathodic compartment of a biofuel cell using laccase, a multi-copper oxidase, as biocatalysts for the oxygen reduction reaction (ORR) by direct electron transfer of electrons. Several strategies have been used to optimize the kinetic of ORR on graphite electrode. One strategy was to deposit thin film of amorphous carbon nitride (a-CN_x) on graphite. The presence of surface amine groups then allowed the covalent grafting of the laccase. Carboxylic groups can also be produced by an electrochemical treatment. By combining several characterisation techniques, especially impedance measurements, we have demonstrated that our system behaves like microelectrodes network. For this type of electrode, we have measured a maximal current density equal to $-44,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. In another strategy, the surface of graphite was nanostructured by forming carbon nanowalls (CNWs) using the plasma-enhanced chemical vapour deposition technique in a CO/H₂ microwave discharge. We have optimized then the APPJ functionalization conditions using experiments design. We reached current densities of the order of $-1 \text{ mA}/\text{cm}^2$. We have also studied the orientation and the kinetic of enzyme immobilisation on gold surface using PM-IRRAS technique.

Key-words: enzymatic biofuel cell, laccase, graphite, amorphous carbon nitride, carbon nanowalls, control of the orientation

Résumé

Les biopiles enzymatiques constituent une alternative intéressante de production d'électricité renouvelable. On s'est intéressé dans ce travail au compartiment cathodique d'une biopile utilisant la laccase, une oxydase multi-cuivres, comme biocatalyseur pour la réduction de l'oxygène (ORR) par transfert direct des électrons. Plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin d'optimiser la cinétique de l'ORR sur électrode de graphite. Une des stratégies a consisté à déposer un film mince de nitrure de carbone amorphe (a-CN_x) sur le graphite. La présence de groupements amines de surface a ensuite permis le greffage covalent de la laccase. Des groupements carboxyliques peuvent également être introduits par un traitement électrochimique. En alliant plusieurs techniques de caractérisation, notamment des mesures d'impédance, on a démontré que notre système se comporte comme un réseau de microélectrodes. Pour ce type d'électrode on a mesuré une densité de courant maximale de $-44,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Dans une autre stratégie, la surface du graphite a été nanostructurée par formation de nanowalls de carbone (CNWs) par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma. On a optimisé les conditions du traitement ultérieur de fonctionnalisation de la surface par APPJ en ayant recours à des plans d'expériences, ce qui a permis d'atteindre des densités de courants de l'ordre de $-1 \text{ mA}/\text{cm}^2$. On a également étudié l'orientation et la cinétique de greffage de l'enzyme sur une surface d'or en utilisant la technique PM-IRRAS.

Mots-clés : biopile enzymatique, laccase, graphite, nitrure de carbone amorphe, Nanowalls de carbone, contrôle de l'orientation