



HAL
open science

Enzymes et catalyseurs bio-inspirés immobilisés sur électrodes nanostructurées pour l'élaboration de piles H₂/air sans métaux nobles

Solène Gentil

► **To cite this version:**

Solène Gentil. Enzymes et catalyseurs bio-inspirés immobilisés sur électrodes nanostructurées pour l'élaboration de piles H₂/air sans métaux nobles. Chimie inorganique. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV058 . tel-01706997

HAL Id: tel-01706997

<https://theses.hal.science/tel-01706997>

Submitted on 12 Feb 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie-Biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Solène GENTIL

Thèse dirigée par **Alan LE GOFF (EDCSV)**, CNRS, et co-dirigée
par **Vincent ARTERO (EDCSV)**, CEA
préparée au sein du **Département de chimie moléculaire** et du
Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

**Enzymes et catalyseurs bio-inspirés
immobilisés sur électrodes nanostructurées
pour l'élaboration de piles H₂/air sans
métaux nobles**

**Hydrogen oxidation and oxygen reduction
reactions catalyzed by bio-inspired catalysts
and enzymes connected on nanostructured
electrodes: design of platinum-free H₂/air
fuel cells**

Thèse soutenue publiquement le **15 novembre 2017** ,
devant le jury composé de :

Monsieur Alan LE GOFF

CHARGE DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION ALPES, Directeur de thèse

Monsieur Vincent ARTERO

CHERCHEUR, CEA GRENOBLE, Directeur de thèse

Monsieur Stéphane CAMPIDELLI

CHERCHEUR, CEA Saclay, Rapporteur

Madame Carole DUBOC

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION ALPES, Présidente du jury

Monsieur Thierry TRON

DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE AIX-MARSEILLE, Examinateur

Monsieur. Nicolas PLUMERE

PROFESSEUR, UNIV. DE LA RUHR A BOCHUM – ALLEMAGNE Rapporteur



Remerciements

Mes remerciements s'adressent aux membres du jury, qui ont accepté de juger mes travaux de thèse. Merci à Madame Carole Duboc, pour sa participation en tant que présidente du jury, mais également pour avoir suivi mes travaux de thèse en détail au cours de ces trois années. Je suis particulièrement reconnaissante envers mes deux rapporteurs, Messieurs Nicolas Plumeré et Stéphane Campidelli, pour le temps précieux qu'ils ont passé à lire mon manuscrit, et également pour la discussion très intéressante que nous avons eu au cours de ma soutenance. Enfin, je tiens à remercier Monsieur Thierry Tron pour notre collaboration au cours de ces travaux de thèse, mais également pour sa présence en tant qu'examinateur dans mon jury.

Ce doctorat a été réalisé dans deux laboratoires, le Département de Chimie Moléculaire, dans l'équipe BEA et le Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux dans l'équipe SolHyCat. Il a été entièrement financé par le Labex Arcane, organisme qui n'a pas eu pour seul vocation de me rémunérer, mais m'a également permis de présenter mes travaux de thèse et de me former au cours de diverses manifestations (fêtes de la Science, rencontres entre thésards Arcane, formation à la prise de parole en publique,...). Ceci a été un vrai plus pour ma formation doctorale et pour la création de réseaux inter-laboratoires. Un grand merci au Labex Arcane, qui j'espère perdurera encore longtemps.

Merci à Monsieur Serge Cosnier, directeur de l'équipe BEA, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire, d'avoir toujours été présent en toutes circonstances et notamment pour la recherche de mon post-doctorat. Merci à Monsieur Stéphane Ménage, directeur du LCBM, pour sa bonne humeur et son accueil chaleureux au LCBM.

C'est avec beaucoup d'émotions que je prends le temps aujourd'hui de faire le bilan sur ces travaux de thèse, qui ont été une réelle opportunité de m'épanouir dans la recherche, domaine que j'avais déjà découvert au cours de divers stages. Le parcours que j'ai mené jusqu'à aujourd'hui, n'a pas été de mon seul chef. De nombreuses personnes m'ont aidées à la fois scientifiquement et humainement. Je suis assez fière du travail accompli et je tiens à remercier tous ceux que j'ai pu rencontrer et qui ont fait de cette expérience, l'une des plus importantes de ma vie.

Comme je l'ai évoqué, ces travaux ont fait appel à de nombreuses collaborations que je tiens à citer et remercier vivement. Wendy J. Shaw et Arnab Dutta ont été les moteurs de l'étude sur le complexe de nickel $[\text{Ni}(\text{Cy},\text{Arg})]_2$, explicité dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Dotti Serre, Fabrice Thomas, Jennifer Molloy et Catherine Belle, nos collègues de l'équipe CIRE au DCM, ont participé à l'élaboration des cathodes à base de complexes de cuivre bio-inspirés et ont notamment été impliqués dans la synthèse et la caractérisation en solution (UV, RPE) des différents ligands, présentés dans le chapitre 4. Carlo Pifferi et Olivier Renaudet, nos collègues de l'équipe I2BM au DCM, ont été impliqués dans la synthèse des plateformes RAFT et dendrimères, exposés dans le chapitre 3. Thierry Tron et Pierre Rousselot-Pailley, du laboratoire iS2M à Marseille,

ont produit les laccases modifiées, et fortement contribués aux résultats du chapitre 3. Nicolas Mano, du CRP de Bordeaux, et Elisabeth Lojou, du BIP de Marseille, nous ont fourni les enzymes *BpBOD* et *AaHydI*, dans le cadre du projet Caroucell. Enfin, mes remerciements les plus profonds s'adressent aux nombreux stagiaires que j'ai encadré au cours de cette thèse et qui ont été plus brillants les uns que les autres : Romain Kunert (L3), Syamim Akmal (M2) et Marie Carrière (L3 et M2).

Ces travaux ont été dirigés par Alan Le Goff et Vincent Artero, qui ont su chacun apporté de grosses pierres à l'édifice avec des visions assez complémentaires. Je remercie Vincent pour sa réactivité (correction des papiers, du manuscrit, aide diverse au LCBM, répétitions,...), sa connaissance scientifique vaste et ses idées innovantes pour pimenter mes résultats. Ma plus profonde gratitude s'adresse à Alan, avec qui je travaille dans les domaines des biopiles et de la modification de surface, depuis le début de ma licence 2. Merci pour son optimisme, la liberté qu'il m'a donné pour réaliser mes travaux, et surtout pour les nombreuses mains qu'il m'a tendu quand le stress ou le manque de confiance étaient au rendez-vous. Merci à mes deux « Papas » pour leur bienveillance à mon égard et pour la rigueur scientifique qu'ils m'ont transmise.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres des équipes BEA et SolHycat avec qui j'ai pu échanger au cours des nombreuses heures passées à la paillasse ou en réunion d'équipe. Mes pensées s'adressent notamment à : Arielle et Adina, qui étaient toujours présentes pour m'aider dans mes recherches de produits ou de matériels ; Yannig Nedellec, qui m'a accompagné pour l'élaboration des piles H₂/air sans métaux nobles ; Chantal et Karine, qui ont joué les « mamans » et ont veillé à ma sécurité au laboratoire ; les posts-docs et thésards (Bertrand, Kamal, Fatima, Noémie, PY, Jules, Marie, Chen, Bridget, Oana...) qui sont passés par là et ont rendu ces trois années riches humainement et scientifiquement.

Les autres membres du DCM ont été également des acteurs majeurs : Régine Rozand, la gestionnaire du laboratoire mais également Véronique Gineste, secrétaire de direction du DCM. Merci à vous deux pour votre aide administrative d'une grande importance pour faciliter nos déplacements en congrès et tout simplement la vie en communauté ; Liliane, Hugues, Jérôme, nos voisins du 1^{er} étage, pour leur prêt de matériel et assistance sur la plateforme caractérisation des interfaces ; tous les thésards de ma promo des équipes CIRE et I2BM, avec qui nous nous sommes serrés les coudes jusqu'au bout (Laureen, Carlo, Jules, Robin, Long, Dotti,...).

Mes (presque) dernières pensées et non des moindres s'adressent à mes deux collègues de bureau (thésards également), Caroline et Quentin, avec qui j'ai commencé cette aventure le 1^{er} octobre 2014. Merci pour votre soutien, compréhension et écoute de tous les instants. Vous avez fait de la vie au laboratoire un instant de bonheur et de motivation. Je leur souhaite plein de bonnes choses dans leurs nouveaux projets, mais je suis sûre que je les reverrai très vite et que l'on gardera ce lien qui nous unit.

Mes amis Grenoblois, que je côtoie depuis bientôt 8 ans pour certains, ont également pris une part importante à cette thèse, que ce soit au cours des WE, soirées ou sorties sports. Grâce à leur présence sans faille, ils ont tout simplement contribué à mon

équilibre et au fait que je me sente bien dans ma tête. Merci à vous tous : Auré, Quentin, Line, Julien, Choup, Rominou, Juju, Robin, Céline, Cindy (ma vieille peau), Ratta,...

Je voudrais aussi remercier, les personnes les plus importantes de ma vie, mes parents, Régis et Catherine, ma famille et mes grand-parents, sans qui tout cela n'aurait pu aboutir. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir poussée toujours plus haut.

Mes derniers remerciements s'adressent à celui qui partage ma vie : Guillaume. Son soutien et ses encouragements ont vraiment été des plus importants. Merci de tout mon cœur pour sa patience quotidienne, bienveillance et l'équilibre sans faille qu'il m'apporte au quotidien.

CONTENU

Introduction générale	1
Chapitre I Bibliographie.....	5
I. Les piles à combustibles H ₂ /air.....	9
II. Des enzymes aux catalyseurs bio-inspirés pour la catalyse d'oxydation et de réduction de l'hydrogène.....	18
III. Des enzymes aux catalyseurs bio-inspirés pour la réduction du dioxygène	44
IV. Les techniques de fonctionnalisation de surface pour l'immobilisation de catalyseurs sur électrodes	57
V. Les piles à hydrogène à base d'enzymes et de catalyseurs moléculaires	88
Chapitre II Complexe de nickel bis-diphosphine pour l'oxydation d'H ₂	99
I. Introduction générale	101
II. Immobilisation de [Ni(Cy,Arg) ₂] sur électrode de nanotubes de carbone	103
III. Intégration du complexe de nickel dans une PEMFC	122
IV. Conclusion Générale	130
Chapitre III Des Biocathodes enzymatiques pour la réduction de l'oxygène à haut potentiel.....	131
I. Introduction Générale	134
II. Stratégies d'immobilisations des laccases UniK et Lac3 sur Electrodes de nanotubes de carbone.....	140
III. Vers le design de biopiles enzymatiques H ₂ /O ₂	166
IV. Conclusion générale	177
Chapitre IV Complexes de cuivre bio-inspirés pour la réaction de réduction de l'oxygène.....	179
I. Introduction Générale	182
II. Immobilisation de complexes de cuivre mononucléaire pour l'ORR.....	187
III. Immobilisation de complexes de cuivre dinucléaires sur NTCs pour l'ORR	203
IV. Elaboration d'une pile biomimétique	213
V. Conclusions et perspectives	216
Conclusion générale et perspectives	217
Références.....	223
Partie expérimentale	239
Annexes	249
Abréviations	259
Publications.....	263

INTRODUCTION GENERALE

De nos jours, les énergies fossiles, hydrocarbures, charbon et gaz naturel représentent 75 % de la consommation mondiale d'énergie primaire. Leur exploitation accentue la libération des gaz à effets de serre (GES) dans l'atmosphère et requiert souvent des structures massives pour leur raffinage, extraction et transport. La production énergétique est également influencée par la géopolitique, notamment dans la croissance de pays émergents.

En décembre 1997, le protocole de Kyoto¹ a adopté le terme de potentiel de réchauffement global (PRG) pour quantifier l'émission des GES. Il exprime le nombre de tonne de CO₂ ayant un effet de serre équivalent à une tonne de gaz. Ainsi, le PRG du CO₂ est fixé à 1 ; celui du méthane est de 23, ce qui signifie qu'une tonne de méthane a un pouvoir de réchauffement 23 fois supérieur à une tonne de CO₂. La plupart des GES tirent leur origine de l'activité humaine telles que la combustion des énergies fossiles, la déforestation et l'industrie chimique. Les plus dangereux sont les gaz fluorés, comme l'hexafluorure de soufre (SF₆), issus des climatisations ou de l'industrie du magnésium et de l'aluminium, qui ont un PRG de 23 500.

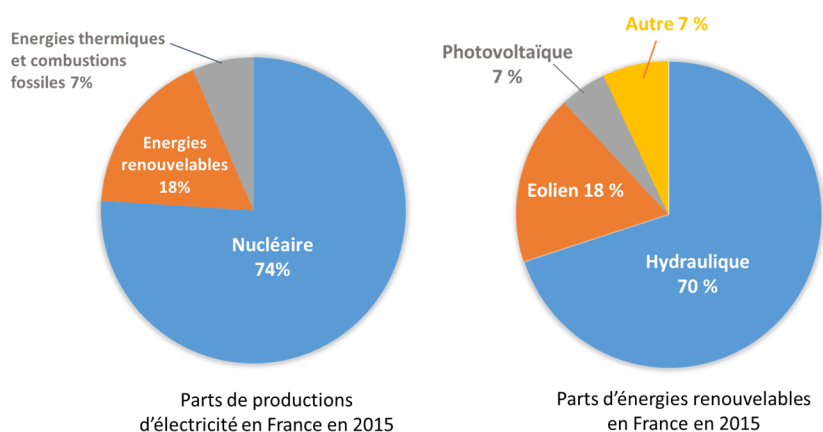


Figure I-1 : Répartition des modes de production d'électricité (gauche), dont renouvelables (droite) en France en 2015²

La Figure I-1 présente la répartition des modes de production d'électricité en France en 2015. 76% de l'électricité produite est issue du nucléaire, 7% des énergies thermiques et combustions fossiles et 18% des énergies renouvelables. Pour réduire les GES, le développement de modes de production renouvelables a connu un essor particulier dans le monde entier depuis le début des années 1990. Lors de la loi sur la transition énergétique de 2015, la France s'est engagée d'ici 2030 à utiliser 40% d'énergies renouvelables pour sa production d'énergie totale. La signature de la COP21 nous oblige à diminuer l'émission de gaz à effet de serre de 40 à 70 % par rapport à 2010 afin de stabiliser le réchauffement climatique à une valeur inférieure à 2°C d'ici 2100. En France, l'hydraulique représentait en 2015 70% des énergies renouvelables, contre 18% pour l'éolien et 5% pour le photovoltaïque.

Aujourd'hui, l'injection de quantités croissantes d'électricité renouvelable d'origine photovoltaïque et éolienne menace la stabilité du réseau de distribution et impacte la rentabilité à terme de ces modes de production. Il est nécessaire de développer des modes de stockage à grande échelle de cette électricité renouvelable.

La production d'hydrogène par électrolyse de l'eau peut constituer une solution à ce problème. Stocké par exemple au sein d'hydrures métalliques, cet hydrogène peut être reconverti en électricité, à la demande, grâce aux piles à combustible. Ces dernières transforment l'énergie chimique, issue de la combustion de l'oxygène de l'air et de l'oxydation de l'hydrogène, en énergie électrique et ont la particularité de ne rejeter que de la vapeur d'eau.

Le travail mené au cours de cette thèse s'inscrit dans ce contexte. Comme nous le décrirons dans le chapitre I, les piles à combustible à hydrogène actuelles requièrent l'utilisation de nanoparticules de platine en tant que catalyseurs. Afin de s'affranchir de ce métal rare et coûteux, nous avons étudié de nouveaux catalyseurs biologiques et bio-inspirés d'enzymes présentes dans la nature, et les avons immobilisés sur un support de carbone nanostructuré dans différents types de piles H_2/O_2 . Le but de cette thèse est de développer des électrodes à base de nanotubes de carbone (NTCs), d'enzymes et de catalyseurs moléculaires bio-inspirés, pour catalyser de manière hétérogène la réduction de l'oxygène en eau à la cathode et l'oxydation de l'hydrogène en protons à l'anode.

Le premier chapitre est une étude bibliographique divisée en six sous-parties traitant largement des différents aspects évoqués au cours de cette thèse. Les piles à combustible à hydrogène et les alternatives au platine seront décrites dans la première section. Dans un second temps, nous traiterons des enzymes et catalyseurs bio-inspirés pour l'oxydation d' H_2 , puis de la réduction de l'oxygène. En dernier lieu, nous parlerons des techniques de fonctionnalisation de surface des NTCs, donnerons des exemples variés de catalyseur immobilisés sur électrodes pour ces réactions catalytiques et traiterons des (bio)piles H_2/O_2 .

Le second chapitre se consacre à la modification chimique de la paroi de NTCs, afin d'immobiliser un complexe de nickel bio-inspiré des hydrogénases. Initialement étudiée en catalyse homogène, cette molécule est capable d'oxyder H_2 en protons, comme il sera démontré au cours des études électrochimiques. Le complexe de nickel a été associé à une cathode à base de Pt/C dans une pile à combustible H_2 /air. Ce projet de recherche s'est appuyé sur une collaboration avec l'équipe de Wendy J. Shaw, qui travaille à l'institut PNNL aux États-Unis.

Le troisième chapitre présente le greffage covalent de diverses enzymes à cuivre, variantes de la laccase *sp.30*, et modifiées par des fonctions alcynes, sur NTCs. Différentes architectures d'électrodes ont été étudiées afin d'immobiliser un maximum d'enzymes à la surface. L'objectif premier est d'optimiser les transferts d'électrons entre le site actif de l'enzyme et l'électrode afin de comprendre les mécanismes liés à l'orientation enzymatique. La dernière partie traite d'un nouveau concept de pile hybride enzymatique/bio-inspirée H_2 /air, qui associe le complexe de nickel à l'anode et l'enzyme bilirubine oxydase à la cathode.

Le quatrième et dernier chapitre décrit des complexes de cuivre mono- et dinucléaires inspirés de la structure du site actif des enzymes à cuivre, greffés sur électrodes de NTCs pour catalyser la réaction de réduction de l'oxygène. Cette

approche a conduit à l'élaboration de la première pile biomimétique sans platine à base de catalyseurs moléculaires.

Chapitre I

BIBLIOGRAPHIE

I. Les piles à combustibles H₂/air.....	9
I.1 L'Hydrogène en tant que vecteur énergétique.....	9
I.2 L'utilisation de l'hydrogène dans les piles à combustibles	9
I.2.A Principe de fonctionnement d'une pile à combustible h ₂ / air	9
I.2.B Mesures des performances d'une pile à combustible.....	11
I.2.C De la pile à combustible à la voiture à hydrogène.....	12
I.3 Le platine, catalyseur des piles à combustible à hydrogène à membrane échangeuse de protons (PEMFC)	13
I.3.A Benchmarking	13
I.3.B Pourquoi est-ce un si bon catalyseur ?.....	14
I.4 Des catalyseurs sans métaux nobles à l'anode et à la cathode.....	15
I.4.A Catalyseurs anodiques	15
I.4.B Catalyseurs cathodiques dopés a l'azote sur support de carbone M-N/C.....	16
I.5 Conclusion.....	17
II. Des enzymes aux catalyseurs bio-inspirés pour la catalyse d'oxydation et de réduction de l'hydrogène	18
II.1 Introduction générale	18
II.2 Les hydrogénases.....	19
II.2.A Introduction	19
II.2.B Les hydrogenases [NiFe].....	19
II.2.B (i) Structure et Site Actif.....	19
II.2.B (ii) Mécanisme catalytique	20
II.2.B (iii) Sensibilité au monoxyde de carbone et à l'oxygène.....	21
II.2.C Les hydrogénases [NiFeSe]	22
II.2.D Les hydrogénases [FeFe]	23
II.2.D (i) Structure et site actif	23
II.2.D (ii) Mécanisme catalytique	24
II.2.D (iii) Sensibilité à l'oxygène et au monoxyde de carbone.....	25
II.2.E Conclusion.....	25
II.3 Les complexes bio-inspirés des hydrogénases	25
II.3.A Introduction : Biomimétisme vs Bio-inspiration.....	25
II.3.B Vers l'élaboration de modèles d'hydrogénases	26
II.3.C Les modèles biomimétiques.....	27
II.3.C (i) Complexes hétérodinucléaires de type Ni-M	27
II.3.C (ii) Complexes dinucléaires NiFe.....	28
II.3.C (iii) Complexes dinucléaires FeFe	29
II.3.D Conclusion.....	31
II.4 Complexes de nickel bis-diphosphine mononucléaires bio-inspires pour l'oxydation et la réduction de l'hydrogène	34
II.4.A Les Catalyseurs de Dubois.....	34
II.4.A (i) Présentation	34
II.4.A (ii) Comment moduler le biais catalytique ?	34
1. Le rôle de la première sphère de coordination	35
2. Le rôle de la seconde sphère de coordination : vers l'intégration de bases pendantes	35
II.4.B Mécanismes catalytiques.....	36
II.4.C Utilisation de la thermodynamique pour contrôler le biais catalytique.....	37

II.5 Vers une nouvelle classe de complexes de nickel bio-inspirée intégrant des acides aminés dans la sphère de coordination externe	38
II.5.A Introduction	38
II.5.B Moduler les substituants de la sphère de coordination externe	38
II.5.C Présentation et performances des différents complexes de nickel à base d'acides aminés	39
II.5.C (i) [Ni(P ₂ CyN ₂ ^{Gly})] ⁴⁺ : un acide aminé glycine sur les bases pendantes	40
II.5.C (ii) [Ni(P ₂ CyN ₂ Arg)] ⁸⁺ : un acide aminé arginine sur les bases pendantes	41
II.5.C (iii) [Ni(P ₂ CyN ₂ ^{Tyr})] ²⁺ : un acide aminé tyrosine sur les bases pendantes	42
II.6 Conclusion	43
III. Des enzymes aux catalyseurs bio-inspirés pour la réduction du dioxygène 44	
III.1 Introduction	44
III.2 Activation du dioxygène par les enzymes a cuivre	44
III.2.A Les polyphénols oxydases	44
III.2.B La Galactose oxydase	46
III.3 Réduction enzymatique de l'oxygène	47
III.3.A Les Oxydases a centre cuivre multiples (MCOs)	47
III.3.A (i) Le site actif commun à toutes les MCOs	48
III.3.A (ii) Mécanisme de réduction de l'oxygène par les MCOs	48
III.3.A (iii) Les laccases	49
III.3.A (iv) Les bilirubines oxydase	50
III.3.B Les cytochrome c oxydases	51
III.4 Les complexes bio-inspirés des enzymes a cuivres	52
III.4.A Les complexes bio-inspirés des cytochrome c oxydases	52
III.4.A (i) Les modèles biomimétiques : complexes hème-Cu	52
III.4.A (ii) Les macrocycles à base de porphyrines de fer et de cobalt	53
III.4.B Les complexes bio-inspirés des enzymes à cuivre	53
III.4.B (i) Introduction	53
III.4.B (ii) Modèles de la galactose oxydase	54
III.4.B (iii) Modèles de la tyrosinase	55
III.4.B (iv) Modèles des MCOs	55
III.5 Conclusion	56
IV. Les techniques de fonctionnalisation de surface pour l'immobilisation de catalyseurs sur électrodes	57
IV.1 Introduction Générale	57
IV.2 Les Nanotubes de carbone	57
IV.2.A Présentation	57
IV.2.B Dispersion et dépôts à l'électrode	59
IV.2.C Les nanotubes de carbone comme matériaux d'électrodes	59
IV.2.D Les différentes méthodes de fonctionnalisation sur nanotubes de carbone	60
IV.2.D (i) Les méthodes non-covalentes	60
1. L'adsorption	60
2. Intéraction π - π	61
3. Utilisation de polymères	61
IV.2.D (ii) Les méthodes covalentes	61
1. La purification oxydante	62
2. Modifications chimiques indirectes des groupements carboxyliques	62

3.	Formation d'ylure d'azométhine : la réaction de Prato	63
4.	Fonctionnalisation par des sels d'aryles diazonium	63
5.	Autres réactions	64
IV.3	Techniques d'immobilisations d'enzymes sur électrodes.....	64
IV.3.A	L'adsorption ou la physisorption.....	64
IV.3.B	La réticulation de molécules à la surface de l'électrode.....	65
IV.3.C	L'encapsulation dans un polymère ou une matrice sol-gel.....	65
IV.3.D	L'interaction Hôte-Invité.....	66
IV.3.E	Le greffage covalent	66
IV.4	La connexion enzymatique sur électrodes.....	68
IV.4.A	Les principes de la connexion enzymatique.....	68
IV.4.A (i)	Le transfert électronique direct (TED).....	68
IV.4.A (ii)	Le transfert d'électrons médié (TEM).....	69
IV.4.B	Les hydrogénases en tant que bioanodes enzymatiques.....	69
IV.4.B (i)	Comprendre les mécanismes catalytiques grâce à l'électrochimie	70
IV.4.B (ii)	Immobilisation fonctionnelle.....	71
IV.4.B (iii)	Apport des nanotubes de carbones	72
IV.4.C	Les enzymes à cuivre en tant que biocathodes enzymatiques	74
IV.4.C (i)	Connexion enzymatique directe de la galactose oxydase	75
IV.4.C (ii)	Connexion enzymatique directe de la polyphénol oxydase	75
IV.4.C (iii)	Connexion enzymatique de la BOD	76
IV.4.C (iv)	Connexion enzymatique de la laccase.....	77
IV.5	Immobilisation de catalyseurs bio-inspirés sur électrodes.....	79
IV.5.A	Catalyseurs bio-inspirés des Hydrogénases.....	79
IV.5.B	Catalyseurs bio-inspirés des enzymes à cuivre.....	82
IV.5.B (i)	Introduction	82
IV.5.B (ii)	Mimes de la cytochrome C oxydases	82
IV.5.B (iii)	Complexes de cuivre mononucléaires	83
IV.5.B (iv)	Complexes de cuivre dinucléaire.....	83
IV.5.B (v)	Complexes de cuivre poly-nucléaires	84
IV.5.B (vi)	Conclusion	85
IV.6	Conclusion générale	86
V.	Les piles à hydrogène à base d'enzymes et de catalyseurs moléculaires	88
V.1	Introduction.....	88
V.2	Les biopiles enzymatiques	89
V.2.A	Introduction	89
V.2.B	Principe de fonctionnement d'une biopile enzymatique H ₂ /O ₂	90
V.2.C	Les biopiles enzymatiques H ₂ /O ₂	91
V.2.C (i)	Des exemples de biopiles enzymatiques.....	91
V.2.C (ii)	Stabilité et limites des biopiles H ₂ /O ₂	92
V.2.C (iii)	Conclusion et Perspective	93
V.3	Les PEMFC à base de catalyseurs bio-inspires.....	94
V.3.A (i)	Introduction	94
V.3.A (ii)	Exemples de piles biomimétiques	94
V.3.A (iii)	Conclusion	95

I. LES PILES A COMBUSTIBLES H₂/AIR

I.1 L'HYDROGENE EN TANT QUE VECTEUR ENERGETIQUE

Contrairement aux énergies fossiles, sources d'énergies primaires, un vecteur énergétique³ est une source d'énergie secondaire. En effet, elle doit être stockable et transportable avec le minimum de perte énergétique. Ils sont au nombre de trois : l'électricité, la chaleur et le dihydrogène. L'avantage de ce dernier est que sa conversion finale ne produit pas de gaz à effet de serre par rapport aux autres sources d'énergie.

Le dihydrogène, H₂, est une molécule très énergétique puisque sa combustion libère 120 MJ.kg⁻¹ soit 2,5 fois plus que l'essence.⁴ Bien que présent dans des fonds océaniques ou dans des couches terrestres profondes, l'hydrogène n'existe pas sur terre de manière massive à l'état moléculaire. De nos jours, son utilisation sous forme de carburant se distingue de deux manières :

- Dans le procédé Fischer-Tropsch⁵, découvert en 1923 en Allemagne, le dihydrogène et le monoxyde de carbone sont associés pour produire des hydrocarbures selon l'équation bilan suivante :



- La production d'hydrogène pur a pour vocation de stocker l'énergie, contrairement à l'éolien et au solaire qui en produisent. H₂ peut alors être utilisé dans diverses stratégies : (1) l'association d'une chaîne de production d'H₂ à d'autres énergies renouvelables intermittentes, telles que l'éolien ou le photovoltaïque, afin de créer un stockage de l'électricité aux heures de production et une injection sur le réseau quand la demande en énergie est élevée. L'université de Corse expérimente cette technologie en couplant l'énergie solaire avec une chaîne d'hydrogène sur la plateforme MYRTE ; ⁶ (2) la cogénération d'électricité et de chaleur pour les bâtiments ; (3) l'intégration des piles à combustibles à hydrogène dans les véhicules pour le transport.

Ces différentes méthodes n'émettent pas de GES. Cependant, la production actuelle d'hydrogène est issue des énergies fossiles, pour plus de 95% (voir annexe p. 251).

I.2 L'UTILISATION DE L'HYDROGENE DANS LES PILES A COMBUSTIBLES

I.2.A PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UNE PILE A COMBUSTIBLE H₂/AIR

La première pile à combustible (PAC) a été inventée par Grove et Schoenbein en 1839^{7,8} au cours d'une expérience d'électrolyse de l'eau. Au cours de cette expérience, un tube en U comprenant deux électrodes de platine était rempli d'une

solution d'acide sulfurique diluée. Ils ont mis en évidence qu'une réaction d'électrolyse inverse avait lieu. Mais ce n'est qu'en 1960 que le principe de piles à combustible (PAC) a été réutilisé par la NASA au cours des missions Apollo et Gemini.

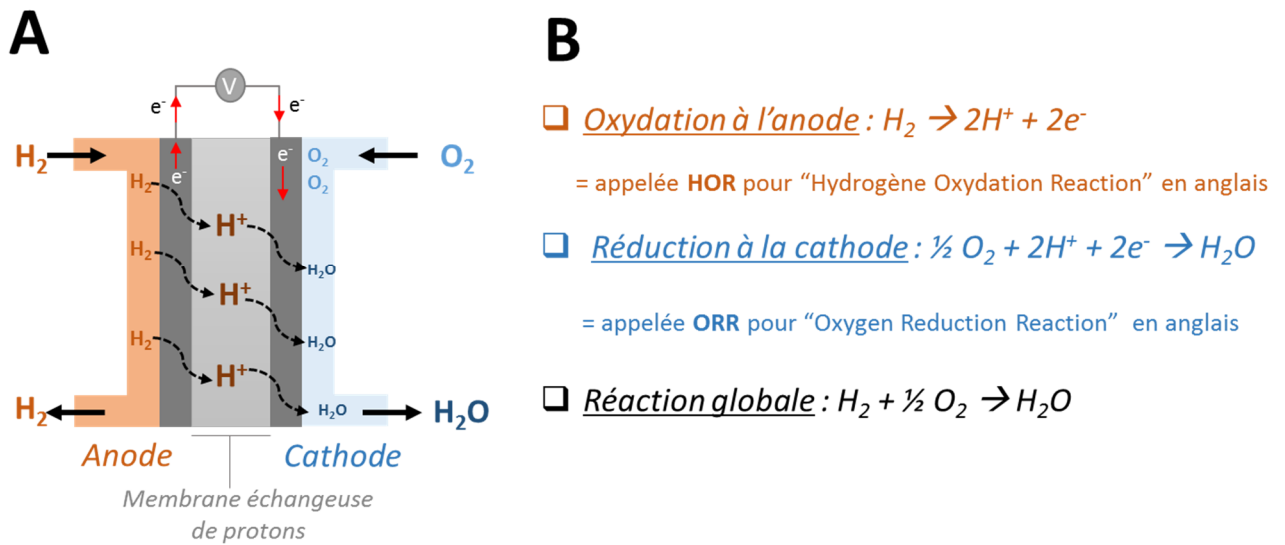


Figure I-1 : (A) Schéma d'une pile à combustible H₂/O₂ à membrane échangeuse de protons. (B) Equations d'oxydoréductions associées.

Les PEMFCs, communément appelées pile à membrane échangeuse de protons, font partie de la classe des PACs faibles températures (60 à 120 °C). En effet, elles sont composées de deux compartiments anodiques et cathodiques séparés par un électrolyte solide : une membrane échangeuse de protons. Ces dernières transforment l'énergie chimique en énergie électrique en rejetant de la vapeur d'eau et de la chaleur (Figure I-1A).

A l'anode, le dihydrogène gazeux est oxydé en protons. Cette réaction d'oxydation produit deux électrons qui transitent de l'anode vers la cathode, où le dioxygène de l'air est réduit en eau. Les protons générés à l'anode traversent la membrane, souvent en Nafion, pour aller vers la cathode (Figure I-1B). Les réactions aux deux électrodes étant non favorables cinétiquement, un catalyseur, à base de nanoparticules de platine, est requis pour que les deux réactions rédox aient lieu. Contrairement aux batteries qui sont plus grosses et nécessitent d'être rechargées (sauf dans le cas des batteries à flux), les PACs fonctionnent continuellement tant qu'elles sont alimentées en gaz.

I.2.B MESURES DES PERFORMANCES D'UNE PILE A COMBUSTIBLE

Une PAC est caractérisée par : (1) une courbe de polarisation qui donne la tension dans la pile en volt (V) en fonction de la densité de courant en mA.cm⁻² ; (2) une courbe de puissance qui donne la densité de puissance en mW.cm⁻² en fonction de la densité de courant. Les grandeurs caractéristiques qui permettent d'évaluer les performances sont les suivantes :

- la **tension à vide ou à circuit ouvert** obtenue quand le courant est nulle. Cette dernière est également connue sous le nom de force électromotrice et est définie par la différence de potentiel entre l'anode et la cathode :

$$f.e.m = E_{anode}^o - E_{cathode}^o$$

Dans le cas d'une PEMFC, la f.e.m attendue est de 1,23 V en tenant compte des potentiels d'oxydoréduction des couples H⁺/H₂ et H₂O/O₂ ($E_{H^+/H_2}^o = 0V$ vs RHE et $E_{H_2O/O_2}^o = 1.23V$ vs RHE).

- la **puissance maximale, P_{max}** est donnée au maximum de la courbe de puissance, qui est calculée suivant cette équation :

$$P = E \times j$$

où j est la densité de courant exprimée en mA.cm⁻².

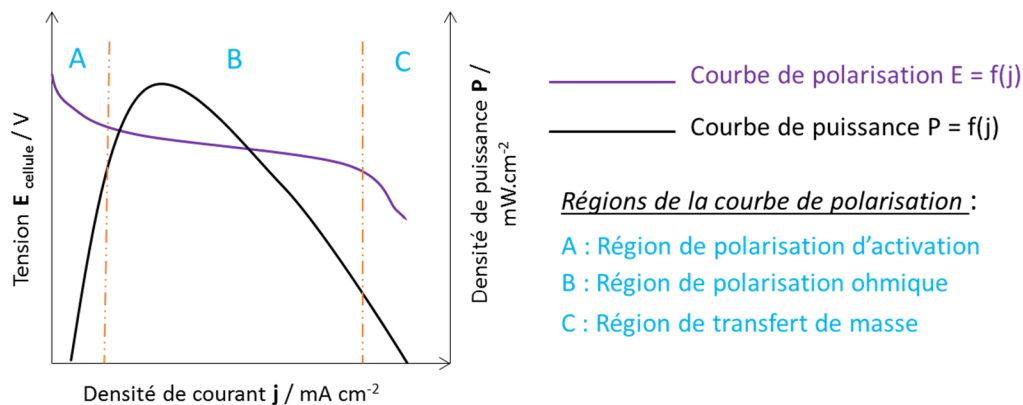


Figure I-2 : Schéma des courbes caractéristiques obtenues lors de la mesure des performances d'une PAC.

Par ailleurs, la courbe de polarisation donne des informations concernant le comportement de la pile en fonction de l'augmentation de densité de courant. Elle est décrite par trois régions distinctes visibles sur la Figure I-2. La région de polarisation d'activation (A) aux faibles densités de courant correspond à une perte d'énergie nécessaire pour activer la pile, cela peut varier fortement en fonction de la surtension appliquée à l'anode et à la cathode. La région de polarisation ohmique (B) a un comportement linéaire, dû à la chute ohmique du système : du flux d'ions dans l'électrolyte, du flux d'électrons dans les matériaux de l'électrode ou bien des composants de la pile (plaques bipolaires...). Enfin, la région de transfert de masse (C) correspond à la limitation du transfert des gaz à la surface des électrodes.

I.2.C DE LA PILE A COMBUSTIBLE A LA VOITURE A HYDROGENE

Les PACs ont notamment vocation à être utilisées dans les voitures à hydrogène. Dans cette configuration, la PAC est composée d'un empilement (stack) de plusieurs dizaines d'assemblages membrane/électrode (AMEs). Un AME correspond à la compression de l'anode et de la cathode autour de la membrane de nafion comme schématisé en Figure I-3. Ainsi, un stack de PEMFC atteint une tension de l'ordre de 40 V et une puissance de plusieurs dizaines de kW. La PAC peut alors fonctionner en pleine puissance (mode full power) ou être couplée à une batterie à lithium (mode range extender), qu'elle recharge afin de prolonger l'autonomie du véhicule.

Le stockage de l'hydrogène est également important afin de ne pas prendre trop de place dans l'habitacle. En général, l'hydrogène est comprimé à 700 bars : un réservoir de 100 kg renferme alors 6 kg d'H₂. On estime que le véhicule consomme 1 kg d'hydrogène tous les 100 km, ce qui signifie que l'autonomie de la voiture est d'environ 600km.⁶ Grenoble est une ville pionnière en France pour la promotion du véhicule à hydrogène, puisqu'elle compte environ 5 stations à hydrogène dans l'agglomération. Environ une dizaine de Kangoo ZE H₂ roulent depuis 2015 dans la métropole en partenariat avec l'entreprise SymbioFcell dans le cadre du projet HyWay.⁹

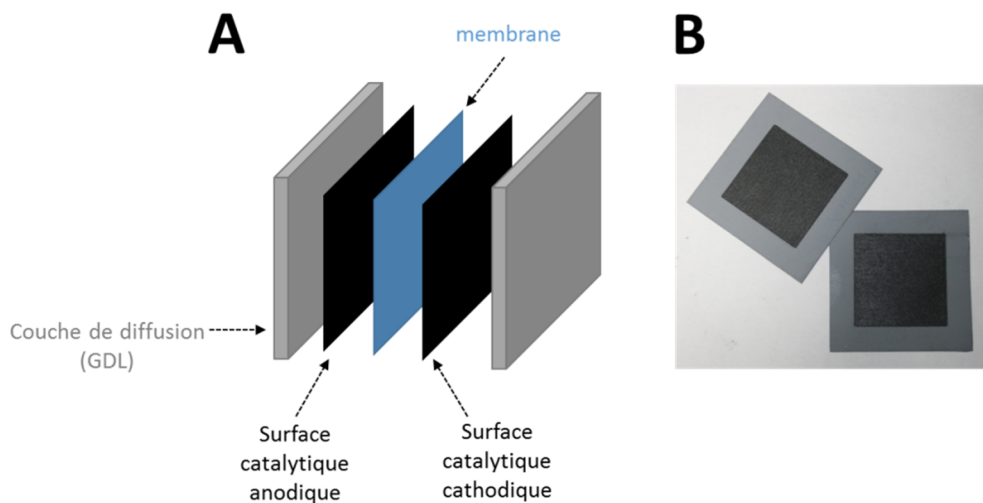


Figure I-3 : (A) Schéma d'un assemblage membrane-électrode (AME). (B) Photographie d'un AME.

I.3 LE PLATINE, CATALYSEUR DES PILES A COMBUSTIBLE A HYDROGENE A MEMBRANE ECHANGEUSE DE PROTONS (PEMFC)

I.3.A BENCHMARKING

Le platine fait partie de la famille des métaux nobles comme le palladium ou le ruthénium, et est peu abondant sur Terre. L'extraction majeure du platine est réalisée en Afrique du Sud avec le palladium et le rhodium en tant que sous-produits. Il est également extrait des mines de nickel et cuivre au nord de la Russie et au Canada. De nos jours, les réserves mondiales de platine sont estimées à 40 000 tonnes.¹⁰

Ce métal est très coûteux, son prix est réévalué tous les jours selon les cours de la bourse. En mars 2017, un gramme de platine valait 31€, en comparaison un gramme d'or 18 carats coûtait 27€ et 48 centimes d'euros pour un gramme d'argent. Ainsi, dans une PEMFC de 80kW, le platine représente 17% du coût du stack.¹¹ En 2011, Jaouen *et al.*¹⁰ ont estimé qu'une production annuelle de 100 millions de voitures à hydrogène requérait une production de platine de 1000 tonnes/an (si la totalité du parc automobile roulait à l'hydrogène). A l'heure actuelle, la production mondiale de platine est uniquement de 200 tonnes/an. Dans les années futures, la quantité de platine dans les PEMFC devra considérablement diminuer, si l'on veut convertir une partie significative des véhicules en voiture à hydrogène.

Le département de l'énergie des USA (DOE) a défini un objectif, d'ici 2020, de 11,3 g/véhicule de métaux de la famille du platine (platine, palladium, rhodium, iridium et ruthénium, appelés PGMs pour « platinum group metals » en anglais), soit 0,125 kW/g_{PGM} pour une puissance de 90 kW. En tenant compte du coût d'extraction de ces métaux et du prix de vente d'un véhicule, il serait judicieux de diminuer cet objectif à 0,0625 g_{pgm}/kW soit environ 6g/véhicule (Tableau I-1).¹² Dans un avenir proche, trouver des alternatives à ces métaux nobles sera donc fondamental.

Cas	Quantité de catalyseurs à l'anode (mg/cm ²)	Quantité de catalyseurs à la cathode (mg/cm ²)	Masse de catalyseur à l'anode (g)	Masse de catalyseur à la cathode (g)	Quantité de catalyseur normalisée (g/kW)
Aujourd'hui	0,05	0,2	4,5	18	0,25
Cible DOE 2020	0,025	0,1	2,3	9	0,125
Cible optimale	0,0125	0,05	1,1	4,5	0,0625

Tableau I-1 : Relation entre la quantité de Platine, à l'anode et à la cathode, et la masse absolue pour un stack de 90 kW et une puissance 1W.cm⁻² ¹

I.3.B POURQUOI EST-CE UN SI BON CATALYSEUR ?

Un bon catalyseur doit avoir les prérequis suivants :

- *Une activité optimale* : si l'interaction de liaison du substrat (ici H_2) au catalyseur est trop faible, le gaz ne s'absorbera pas sur la surface catalytique et la réaction sera trop lente ou n'aura pas lieu. Dans le cas d'une interaction de liaison trop forte avec le produit, la surface catalytique sera passivée et la réaction s'arrêtera. Les diagrammes de l'évolution de la surtension de HOR en fonction de l'enthalpie d'adsorption sont présentés en Figure I-4. Très bon catalyseur pour l'oxydation de l'hydrogène, le platine a une surtension proche de 0 V.
- *La sélectivité* : la réaction catalytique doit donner lieu à la formation du produit attendue en évitant la production d'espèces secondaires de réaction. La cathode des PEMFC peut produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), espèce nocive formant des radicaux qui vont dégrader la membrane. Un bon catalyseur cathodique doit donc produire peu d' H_2O_2 .
- *La stabilité* : les catalyseurs de la PEMFC, soumis à un faible pH, une température élevée et à la présence d'oxydants, doivent éviter la dégradation. La formation d'un film d'oxyde à la surface des particules de catalyseurs peut contribuer à inhiber la dissolution du catalyseur mais également la vitesse de la réaction de réduction de l'oxygène (ORR).
- *La résistance à l'empoisonnement* : le monoxyde de carbone et les espèces à base de soufre sont présents dans le gaz et induisent l'inhibition du catalyseur. Pour les éliminer, un système d'évacuation peut être mis en place dans la pile. En outre, la présence d'un alliage de platine peut diminuer l'énergie de liaison au métal et donc l'empoisonnement.

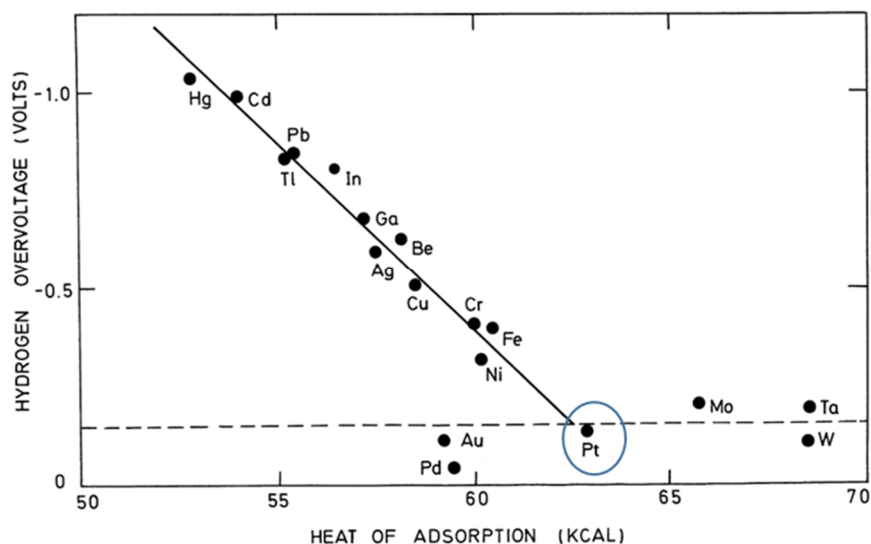


Figure I-4 : Dépendance de la surtension pour l'HOR en fonction de l'enthalpie d'adsorption M-H pour différents métaux de transition. Le résultat pour le platine est entouré en bleu.¹³

Dans les PEMFCs, le platine est présent à l'anode et à la cathode sous forme de nanoparticules. La réaction anodique a une cinétique très rapide et ne requiert qu'environ 0,05 mg.cm⁻² de platine. La réaction cathodique a une cinétique beaucoup plus lente, ce qui nécessite 0,2 mg.cm⁻² de platine. Ainsi, la cathode détermine la taille et le coût du stack. De plus, elle est la source d'environ la moitié des pertes de f.e.m dans la pile. Les recherches actuelles se concentrent donc principalement sur le remplacement du platine à la cathode. De nombreuses méthodes sont étudiées : (1) la formation d'alliage^{15,16} de type Pt₃X, où X est un atome de nickel de cobalt ou de fer ; (2) la formation d'une couche de platine cristalline en-dessous ou au-dessus de la surface d'un autre métal comme le cuivre pour former un alliage Cu/Pt ; ¹⁷ (3) l'utilisation de nanoparticules de platine dont le cœur est composé de Pd, Co ou Ni ¹⁸ ; (4) l'utilisation du palladium est également une alternative envisagée.¹⁹ Certains de ces catalyseurs sont décrits dans l'annexe II page 253.

I.4 DES CATALYSEURS SANS METAUX NOBLES A L'ANODE ET A LA CATHODE

Comme décrit dans le paragraphe précédent, le platine est un métal rare, ses réserves ne sont pas inépuisables ; aussi est-il nécessaire dans un souci économique et environnemental de limiter son extraction. La section suivante expose les principales alternatives, sans métaux nobles à l'anode et à la cathode.

I.4.A CATALYSEURS ANODIQUES

Catalyseurs	Types	Performances	Avantages	Inconvénients	Ref.
Carbures de tungstène	WC, W ₂ C ou WMC (M=Co, Ni)	WC : 5.7% de la P _{max} lorsque anode Pt/C 20% WNiC : 7.3% de la P _{max} lorsque anode Pt/C 20% CoWC/KC : 14% de la P _{max} lorsque anode Pt/C 20%	Tolérance CO et H ₂ S Stabilité mécanique et thermique Résistance à la corrosion	Méthodes de préparation contraignantes, carburisation à haute température (800K) Faible activité comparée à Pt/C	²³ ²⁴
Carbures de molybdène	CoMoC/KC	CoMoC/KC : 11% de la P _{max} lorsque anode Pt/C 20%	Tolérance CO et H ₂ S	Haute température de carburisation (723-973K)	²⁵

Tableau I-2 : Différents types de catalyseurs anodiques à base de carbure de molybdène et de tungstène.

Le Tableau I-2 récapitule les différents types de catalyseurs anodiques, sans métaux nobles, étudiés à l'heure actuelle. Peu d'exemples existent, car le catalyseur anodique devra, tout comme le platine, résister au monoxyde de carbone pour des concentrations inférieures à 100 ppm²⁰ et être stable en conditions acides.

Les plus utilisés sont les carbures de tungstène et de molybdène, qui ont été étudiés pour la première fois dans les années 60 par Böhm et Pohl.²¹ Tolérants au CO et à H₂S, ils ont une très bonne stabilité thermique et mécanique, mais sont également résistants à la corrosion. Le plus étudié est le carbure de tungstène, qui existe sous plusieurs phases.²²

I.4.B CATALYSEURS CATHODIQUES DOPES A L'AZOTE SUR SUPPORT DE CARBONE M-N/C

Le platine réduit également le dioxygène avec un potentiel à circuit ouvert proche de 1V vs RHE. Cependant, la quantité de catalyseurs requise à la cathode est quatre fois plus importante qu'à l'anode. L'activité des catalyseurs cathodiques à base de platine est à la fois dépendante de l'état cristallin, de la forme et de la taille des nanoparticules. En effet, les particules inférieures à 3nm sont moins actives du fait de l'augmentation de l'énergie de liaison Pt-H.²⁶ Aujourd'hui, la recherche avance pour son remplacement total à la cathode. Dans cette partie, nous évoquerons uniquement les catalyseurs cathodiques dopés à l'azote sur support de carbone M-N/C, car ce sont les plus utilisés.

Ces catalyseurs, initialement dénommés catalyseurs non-PGMs pour « non-Platinum Group Metal Catalyst » sont inspirés du site actif des enzymes de type cytochrome c oxydase, que nous détaillerons dans la suite du manuscrit (voir III.3.B). Les premiers catalyseurs de ce type ont été obtenus par pyrolyse de porphyrines métallées. Aujourd'hui, ils sont obtenus par traitement thermique (500-1000°C) en présence d'un ion métallique (Fe, Co...), d'une source de carbone (support de carbone, polymère, molécule) et d'une source d'azote. La notation générique pour ces composés est la suivante : MeN_xC_y. Les méthodes de synthèse sont les suivantes : (1) à partir d'un complexe macrocyclique MeN₄ (où Me = métal) qui agit en tant que précurseur métallique et azoté ;²⁷ (2) à partir d'un sel métallique et de NH_{3(g)} ;²⁸ (3) à partir d'un sel métallique et d'une molécule azotée.²⁹

Certains d'entre eux échappent à ces règles : *Liu et al.*³⁰ ont récemment proposé la synthèse d'un catalyseur Fe-N/C à partir d'un ZIF (Zeolite Imidazole Framework) pyrolysé à 1000°C. Quelle que soit la technique employée, chaque paramètre doit être précisément contrôlé : une température plus ou moins élevée peut influencer les propriétés catalytiques, la composition en gaz joue sur la taille des pores du catalyseur,...

Les M-N/C sont les catalyseurs cathodiques « sans platine » les plus performants. Cependant, la charge importante en catalyseur, de l'ordre de 1 à 6 mg.cm⁻², conduit à une épaisseur importante de la couche active, comprise entre 25 et 150 μm (contre 10 μm pour Pt/C). En tenant compte de ces caractéristiques, *Wu et al.* ont proposé dans Science en 2011³¹, la synthèse d'un catalyseur à base de polyaniline (PANI), de cobalt et de fer dénommé PANI-FeCo/C. Ils ont atteint un potentiel de catalyse ORR de l'ordre de 0.93V vs RHE et une stabilité de 700 heures à 0.4V avec un

taux de peroxyde d'hydrogène produit inférieur à 1%. Ce dernier se rapproche très fortement des performances du platine dans les mêmes conditions.

Les axes de recherche pour ces catalyseurs très prometteurs sont nombreuses : (1) diminuer l'épaisseur de la cathode en augmentant la surface spécifique active ; (2) améliorer le transport de masse du dioxygène dans l'électrode en jouant sur la porosité ou le support carboné utilisé ; (3) continuer les études fondamentales sur la conformation du catalyseur après pyrolyse afin d'augmenter les sites de liaisons de l'oxygène.³²

I.5 CONCLUSION

Dans cette section, nous avons défini les piles à combustible de type PEMFC en tant qu'enjeu énergétique pour produire de l'énergie plus propre. Cependant, la production d'H₂, combustible des PEMFC, est liée aux énergies fossiles (vaporéformage du méthane). De plus, le platine, métal noble, est le catalyseur préférentiel, donnant les rendements énergétiques les plus élevés.

Dans l'optique de trouver des alternatives à l'utilisation de ce métal coûteux, la recherche s'est concentrée sur : (i) la diminution des quantités de nanoparticules de platine (0,05 mg/cm² à l'anode et 0,2 mg/cm² à la cathode) ; (ii) l'utilisation d'autres métaux (Pd, Ir, V, Zr...) ; (iii) l'intégration de catalyseurs dopés à l'azote sur support de carbone (Co-N/C et Fe-N/C) à la cathode. Ces solutions restent malgré tout moins performantes que le platine pour des applications telles que l'alimentation de voitures à hydrogène.

Depuis des générations, l'Homme s'inspire de la nature. Les organismes vivants réalisent des transformations chimiques indispensables grâce à l'aide de catalyseurs biologiques, appelés enzymes. La production et l'activation d'H₂ sont réalisées par les Hydrogénases. La réduction de l'oxygène en eau se fait grâce aux oxydases à cuivre (cytochrome C oxydase, laccase et Bilirubine oxydase). Les sections II. et III. relatent en détails les recherches abondantes menées à ce sujet.

II. DES ENZYMES AUX CATALYSEURS BIO-INSPIRES POUR LA CATALYSE D'OXYDATION ET DE REDUCTION DE L'HYDROGENE

II.1 INTRODUCTION GENERALE

Les enzymes sont des protéines ayant un rôle de catalyseurs biologiques. Elles permettent de diminuer l'énergie d'activation d'une réaction chimique en augmentant la vitesse de réaction, sans subir de modifications au cours de la réaction (Figure II-1A).

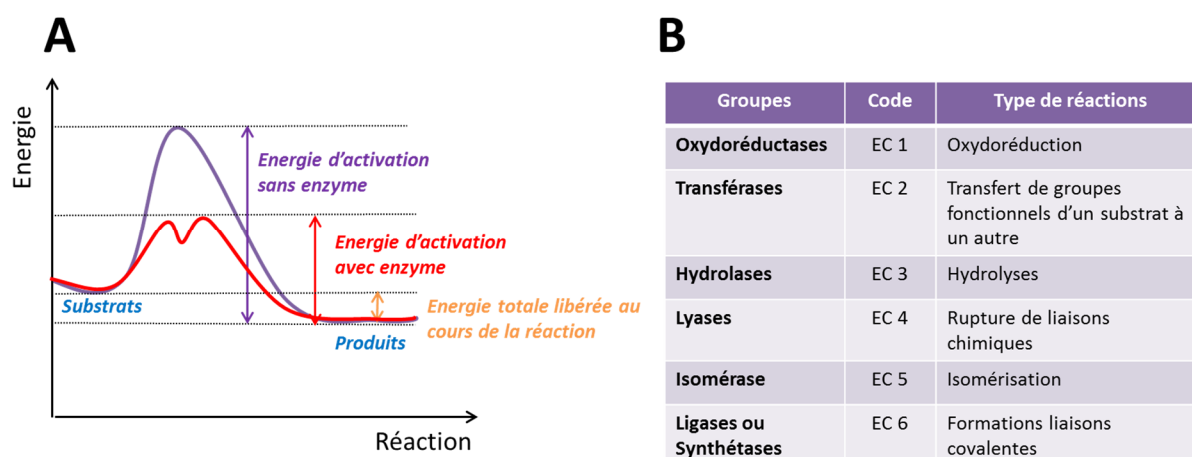


Figure II-1 : (A) Diagramme d'énergie avec et sans la présence d'enzymes. (B) Nomenclature EC regroupant les différents types d'enzymes suivant leurs fonctions catalytiques.

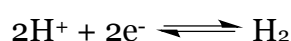
Une enzyme est composée d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques repliées entre elles, pour conduire à une structure tridimensionnelle. Le site actif, enfoui ou non dans la structure protéique, est une petite partie de l'enzyme qui regroupe le site catalytique et le site de liaison au substrat. La conformation de l'enzyme confère une spécificité vis-à-vis du substrat, qui se fixe sur un site de liaison spécifique pour être transformé en produit. L'enzyme et le substrat ont une complémentarité, qui conduit à ce que la réaction soit chimiosélective, régiosélective et stéréospécifique : on parle de modèle « clef-serrure ». L'activité du biocatalyseur est dépendante de plusieurs éléments : (1) une température et un pH optimum ; (2) l'action d'activateurs ou d'inhibiteurs enzymatiques ; (3) la présence d'un cofacteur, espèce chimique non protéique qui participe à la catalyse.

Les enzymes sont classifiées suivant la nomenclature EC (Enzyme Commission) en fonction du type de réactions catalytiques (Figure II-1B). Ce travail de thèse s'est intéressé aux oxydoréductases, connues sous le code EC 1, impliquées dans des réactions d'oxydoréductions. Dans cette partie, nous traiterons des enzymes hydrogénases et de mimes de leurs sites actifs.

II.2 LES HYDROGENASES

II.2.A INTRODUCTION

Présentes chez les archaées, bactéries et quelques eucaryotes, les hydrogénases existent sous forme soluble dans les périplasmés, cytoplasmes ou bien liées aux membranes biologiques.³³ En fonction de leur localisation dans les cellules biologiques³⁴, elles sont capables de catalyser la réduction réversible des protons en dihydrogène suivant la réaction suivante :



Elles sont classifiées en fonction de la nature métallique du site actif : (1) à base d'un atome ou deux atomes de fer, les hydrogénases [Fe] ou [FeFe] ; (2) à base d'un atome de nickel et d'un atome de fer, les hydrogénase [NiFe]. Comme précisé dans le Tableau II-1, les hydrogénases [FeFe] sont 50 à 100 fois plus actives que les hydrogénases [NiFe]³⁵ avec une fréquence catalytique de cycles (TOF pour « turnover frequency » en anglais) de 6000 à 60 000 molécules d'H₂ par site en s⁻¹ et une activité enzymatique de l'ordre de 10 à 50 mmol d'H₂ par min⁻¹.mg⁻¹.

Types d'hydrogénases	Activité pour oxydation de l'hydrogène (mmol substrat min ⁻¹ mg ⁻¹)	Activité pour la réduction des protons (mmol substrat min ⁻¹ mg ⁻¹)	TOF (molécules d'H ₂ par site en s ⁻¹)
[NiFe]	0.1 – 1	0.1 – 1	100 - 1000
[FeFe]	5-10	10-50	6000 – 60 000

Tableau II-1 : Valeurs d'activités et de fréquences de cycles catalytiques pour les hydrogénases [NiFe] et [FeFe].³⁶

Ces deux classes d'hydrogénases sont donc capables de réduire réversiblement les protons.

II.2.B LES HYDROGENASES [NiFe]

II.2.B (i) Structure et Site Actif

La première structure cristalline de l'hydrogénase [NiFe] de *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. (DvMF) a été obtenue par Higuchi *et al.* en 1987.³⁷ Presque dix ans se sont écoulés, avant que Fontecilla-Camps publie la structure de *Desulfovibrio Gigas* (Dg).³⁸

Cette protéine est composée (Figure II-2A) : (1) d'une petite sous-unité de 29 kDa, qui contient 1 cluster médian [3Fe-4S], et 2 clusters appelés proximal et distal [4Fe-4S]. Ces derniers sont des relais d'électrons; (2) d'une grande sous-unité de 63

kDa, contenant le site catalytique NiFe ; (3) d'un canal hydrophobe qui s'étend de la surface de la protéine au site actif, responsable de la diffusion du substrat.³⁴

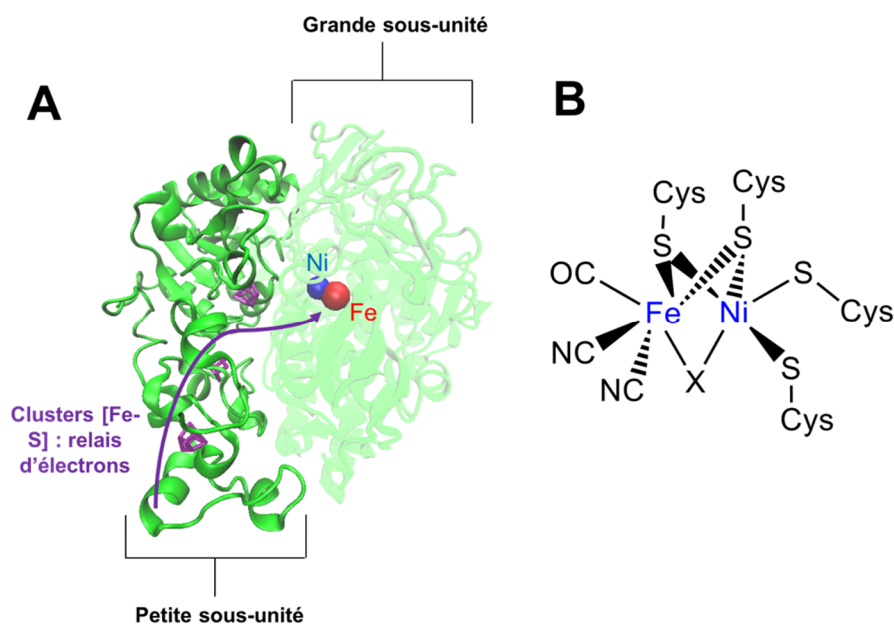


Figure II-2: (A) Structure de l'Hydrogénase [NiFe] de *D.Fructosovorans* (PDB : 1FRF). (B) Structure chimique du site actif des [NiFe].

Le site actif (Figure II-2B) est composé d'un atome de nickel et d'un atome de fer. Le nickel est coordonné par 4 atomes de soufre dont 2 pontant entre les deux métaux. La seconde sphère de coordination comporte 4 résidus cystéines coordonnés aux métaux via leurs atomes de soufre. La coordination de l'atome de fer est complétée par deux ligands cyanures (CN⁻) et un ligand carbonyle (CO). Les cyanures sont σ -donneurs et forment des liaisons hydrogènes avec les acides aminés environnants. Un troisième ligand pontant X est parfois présent entre les deux centres métalliques, il change de nature en fonction de l'état rédox de l'enzyme.

II.2.B (ii) Mécanisme catalytique

D'une part, les clusters [Fe-S] adoptent plusieurs états rédox au cours du cycle catalytique, qui ne seront pas détaillés ici. D'autre part, différents états rédox du site actif ont été caractérisés spectroscopiquement : (1) les formes oxydées Ni-A et Ni-B ; (2) les formes réduites Ni-C, Ni-R et Ni-L ; (3) les formes inhibées Ni-SCO et Ni-CO. La Figure II-3 représente le mécanisme catalytique pour les hydrogénases [NiFe]. H₂, activé par l'état Ni-Si_a (Ni^{II}-Fe^{II}), subit un clivage hétérolytique pour former l'hydrure pontant Ni-R. L'oxydation du Ni^{II} en Ni^{III} conduit à l'espèce Ni-C (hydrure de Ni^{III}-Fe^{II}). En 2015, K. Vincent a démontré que l'état Ni-L, complexe Ni^I-Fe^{II}, était impliqué dans la dernière étape catalytique de l'oxydation d'H₂.^{39,40} Enfin, une dernière étape de réduction régénère l'état Ni-Si_a.

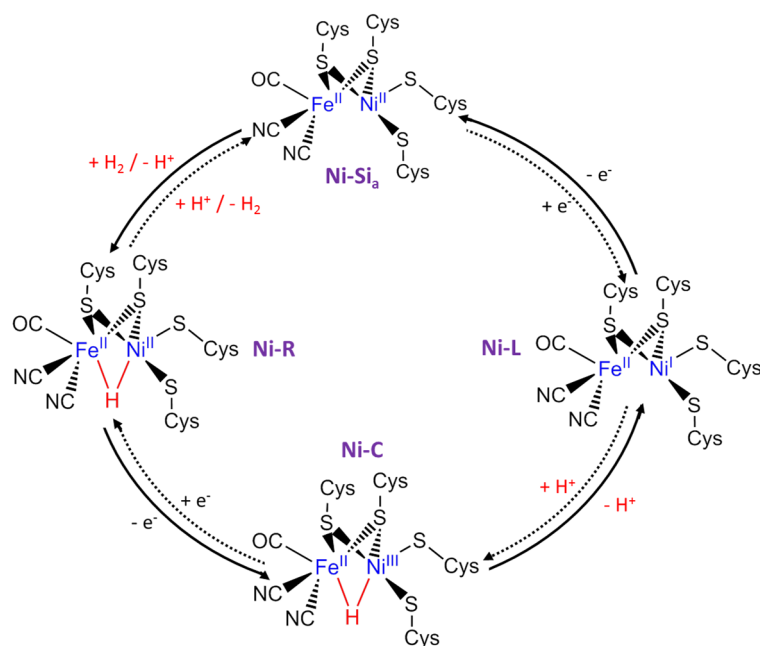


Figure II-3 : Mécanisme catalytique pour les Hydrogénases [NiFe].⁴¹

II.2.B (iii) Sensibilité au monoxyde de carbone et à l'oxygène

Il a été démontré par cristallographie aux rayons X et spectroscopie Raman que les hydrogénases [NiFe] sont réversiblement inactivées par le CO. Deux états distincts existent en fonction du degré d'oxydation du nickel : Ni^I-CO⁴² formé à partir de l'état Ni-L et Ni^{II}-SCO⁴³ formé à partir de Ni-Si_a (Figure II-4B). Dans les deux cas, l'état initial se régénère par photodissociation du CO à basse température (cryogénique).

Localisation « in-vivo »	Types d'hydrogénases [NiFe]	En présence d'air
Liée aux membranes biologiques	<i>Ralstonia eutropha</i> ⁴⁴ Hyd-I de <i>E. Coli</i> ⁴⁵ <i>Aquifex aeolicus</i> ⁴⁶	Activité catalytique conservée
Périplasmiques	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> MF ³⁷ <i>Desulfovibrio gigas</i> ³⁸ <i>Desulfovibrio Fructosorans</i> ⁴⁷ <i>Allochromatium vinosum</i> ^{48,49}	Inactivation réversible

Tableau II-2 : Hydrogénases [NiFe] tolérantes ou sensibles à l'oxygène.⁶⁹

Le Tableau II-2 récapitule la sensibilité pour l'oxygène de différents types d'enzymes [NiFe]. Tandis que les enzymes liées aux membranes biologiques conservent leur activité catalytique sous air, celles localisées dans le périplasma sont inactivées, mais retrouvent leur fonction après une étape de réduction.⁵⁰ La sensibilité à l'O₂ est due à plusieurs facteurs : (1) le type d'acides aminés présent dans le canal de diffusion des gaz : il a été démontré qu'une mutation d'une valine par une cystéine (localisé près du site actif) rendait l'enzyme tolérante pendant quelques minutes⁵⁰ ; (2) le type d'états oxydés, Ni-A ou Ni-B formé, en présence d'oxygène.

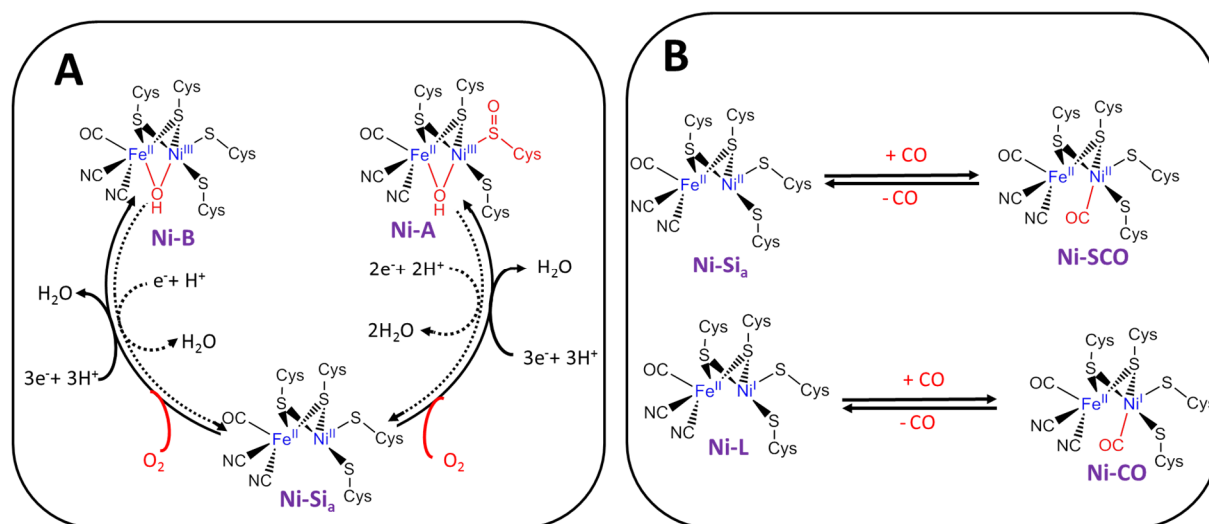


Figure II-4 : (A) Formation des états oxydés Ni-A et Ni-B après activation de l'oxygène. (B) Etapes d'inhibitions de Ni-Si_a et Ni-L par le CO pour former les états Ni-SCO et Ni-CO.

La forme Ni-B, qui conduit à l'apparition d'un ligand pontant hydroxo entre le complexe Fe^{II}-Ni^{III}, est réactivée en quelques minutes en présence d'H₂ : il est appelé « ready state ». ⁷⁷ *A contrario*, la forme Ni-A est appelée « unready state » puisque sa réactivation requiert un traitement de plusieurs heures dans des conditions réductrices (Figure II-4A). La structure du Ni-A n'était pas bien définie, jusqu'à la cristallisation en 2015 par Fontecilla-Camps de différentes structures d'états oxydés de l'enzyme *D. fructovorans*.⁵¹ Il a été proposé qu'un ligand pontant hydroxo se forme entre le fer et le nickel et que l'une des cystéines coordonnées au nickel était oxydée. (Figure II-4A).^{52,53} Récemment, Bruschi a déterminé par calculs DFT, laquelle des structures cristallographiques proposées par Fontecilla Camps était la plus stable.⁵³

II.2.C LES HYDROGENASES [NiFeSe]

Les hydrogénases [NiFeSe], sous-classe des [NiFe], ont été cristallisées dans deux organismes différents : *Desulfomicrobium baculatum* (Db)^{54,55} et *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DvH).

La différence structurale entre les deux enzymes se situe au niveau du site actif (Figure II-5), dans lequel une cystéine coordonnée au nickel est remplacée par une sélénocystéine (SeCys). Cet hétérodimère mesure 26 et 49 kDa. Le relais d'électrons est composé de 3 clusters [4Fe-4S]. Elle est moins sensible à l'oxygène que les [NiFe] due à la réactivité spéciale de la sélénocystéine vis-à-vis de O₂, qui s'oxyde réversiblement en sélinate (O=SeC_{se}-O⁻).⁵⁵

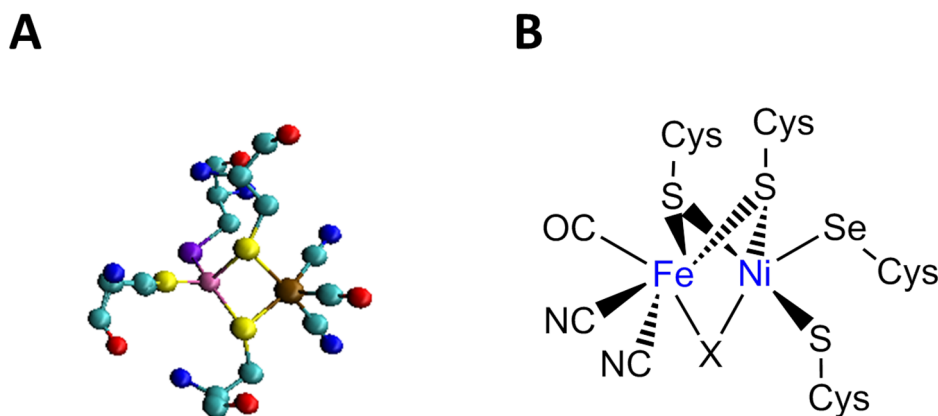


Figure II-5 : (A) Schéma du site actif de la Db [NiFeSe] dans la petite sous-unité : la sélénocystéine est indiquée en violet, l'atome de nickel en rose, le fer en marron, les carbone en cyan, les azotes en bleu et l'oxygène en rouge. (b) Site actif des [NiFeSe]

II.2.D LES HYDROGENASES [FeFe]

II.2.D (i) Structure et site actif

La plupart des hydrogénases [FeFe] étudiées sont produites chez les algues vertes, les organismes *Clostridia* et *Desulfovibrio*. En 1998, Peters et al.⁵⁶ ont cristallisé la première structure de l'hydrogénase [FeFe] de *Clostridium pastenarium I* (CpI). Cette dernière est composée d'une seule sous-unité contenant 3 clusters [4Fe-4S], un cluster [2Fe-2S] et le site actif, appelé H-cluster (Figure II-6A).

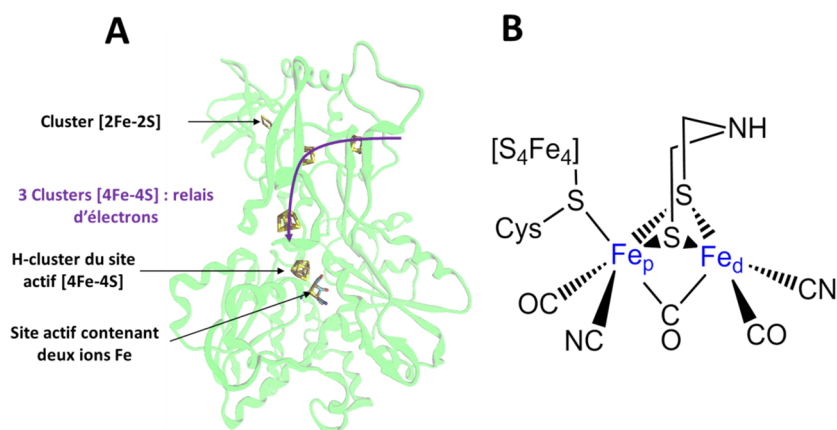


Figure II-6 : (A) Structure de l'hydrogénase [FeFe] de *Clostridium pastenarium I* (CpI). (PDB : 4XDC) (B) Composition du H-cluster : un complexe dinucléaire composé d'un atome de fer proximal Fe_p et d'un atome de fer distal Fe_d.

Le site catalytique est commun à toutes les enzymes : il s'agit d'un complexe dinucléaire de fer proximal et distal ponté par un ligand carbonyle et un ligand azadithiolate. Les deux fers sont chacun coordonnés par un CO et CN⁻. Enfin, l'atome

de fer proximal (le plus proche de la surface de la protéine) est coordonné au cluster [4Fe-4S] via une cystéine (Figure II-6B).

Tout comme les hydrogénases [NiFe], elles contiennent un canal gazeux composé d'acides aminés hydrophobes pour permettre la diffusion des espèces, $H_2(g)$, $O_2(g)$ et $CO(g)$, de la surface de la protéine au site actif. Les clusters [Fe-S] jouent le rôle de relais électroniques en adoptant différents états rédox. Un réseau de relais de protons a également été décrit :⁵⁷ ces derniers sont transférés de la surface au site actif via trois glutamates, une sérine, une molécule d'eau et une cystéine localisée près du H-cluster.

II.2.D (ii) Mécanisme catalytique

Le site actif des hydrogénases [FeFe] passe par plusieurs états rédox au cours du mécanisme catalytique réversible de production d' H_2 (Figure II-7). Le transfert d'électrons des divers clusters [Fe-S] jusqu'au H-cluster de la protéine et les changements d'états rédox associés permettent d'activer l'enzyme pour conduire à un état oxydé H_{ox} [$Fe^{II}-Fe^I$]. Sa réduction monoélectronique couplée à une étape de protonation de l'azote (du ligand azadithiolate) conduit à l'état H_{red} [$Fe^I-Fe^I(H)$]. Une étape d'addition oxydante se poursuit pour donner l'espèce [$Fe^{II}-Fe^{II}(H)$] dans laquelle l'amine protonée a été transférée sur le fer distal. Ensuite, une deuxième réduction couplée à une protonation donne l'état $H_{ox}(H^+,H^-)$ [$Fe^{II}-Fe^I(H^+,H^-)$] dans lequel un deuxième proton se coordonne à l'azote. Enfin, un réarrangement tautomérique permet la formation d'une molécule d' H_2 coordonnée sur le fer distal. Au cours de ces différentes étapes, le cluster [4Fe-4S] passe par divers états rédox qui ne seront pas décrits ici.⁵⁸

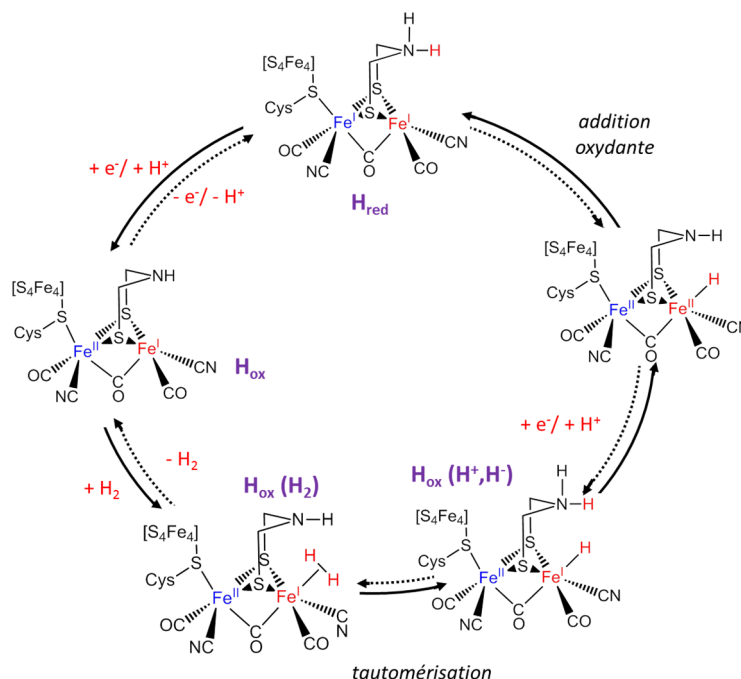


Figure II-7 : Mécanisme catalytique de la réduction réversible des protons des hydrogénases [FeFe]. Adapté de ^{34,58}

II.2.D (iii) *Sensibilité à l'oxygène et au monoxyde de carbone*

Ces enzymes sont également sensibles au monoxyde de carbone et à l'oxygène. Il a été récemment montré que l'oxygène se liait au H-cluster pour conduire à une rapide inactivation enzymatique, voire à sa dégradation.⁵⁹ Le monoxyde de carbone se coordonne à l'atome de fer distal pour former un état oxydé $H_{ox}-CO$.⁶⁰

II.2.E CONCLUSION

Les hydrogénases réduisent réversiblement les protons à des surtensions faibles et fréquences catalytiques de cycles élevées ($100\ 000\ s^{-1}$). Les mécanismes catalytiques, déjà bien décrits, ont notamment été renforcées par des études électrochimiques (voir V.II.B.(ii).**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Plus ou moins tolérantes à l'oxygène, les hydrogénases doivent être manipulées précautionneusement (en condition anaérobie) pour conserver leurs propriétés catalytiques.

Le biomimétisme s'attelle à tout ce qui s'inspire de la nature. De cette thématique est née la chimie bio-inspirée qui tente de mimer les fonctions physico-chimiques présentes dans la nature. Le paragraphe suivant définit de façon claire les termes souvent confus de biomimétisme et bio-inspiration et applique ce champ de recherche aux enzymes hydrogénases.

II.3 LES COMPLEXES BIO-INSPIRES DES HYDROGENASES

II.3.A INTRODUCTION : BIOMIMETISME VS BIO-INSPIRATION

Venant du grec « bios », vie, et « mimesis » imitation, le terme de biomimétisme a été repris en 1997 par la scientifique américaine Janine Benyus dans son livre intitulé *Biomimicry : Innovation Inspired by Nature*.⁶¹ Cela désigne le fait de s'inspirer de la nature pour réaliser des innovations. Le biomimétisme a lieu à plusieurs échelles : les formes du vivant, les matériaux et processus de fabrication, l'interaction des espèces entre elles ou encore les différents principes de fonctionnement des écosystèmes. Domaine de recherche en plein essor, la France est un pays précurseur en la matière avec la création du Centre Européen d'Excellence en Biomimétisme de Senlis (CEEBIOS) en 2015.⁶²

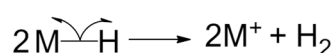
Dans la suite de ce manuscrit, nous ferons la distinction entre biomimétisme et bio-inspiration, en particulier dans le contexte de la conception de catalyseurs, sans métaux nobles, modèles des enzymes. Comme nous l'avons vu précédemment, les enzymes fonctionnent dans des conditions particulières de températures, pH optimum et doivent-être produites dans des organismes vivants, puis purifiées. Dans

une optique de réduction des coûts et production à grande échelle, la chimie bio-inspirée permet de synthétiser des catalyseurs performants en s'affranchissant de ces conditions spécifiques. Ainsi, un modèle bio-inspiré aura une fonction catalytique identique à l'enzyme mais sa structure chimique pourra en être différente. Par contre, nous appellerons complexe biomimétique, toute molécule qui mime le site actif de la façon la plus proche possible en reproduisant ou non les fonctions catalytiques.

II.3.B VERS L'ELABORATION DE MODELES D'HYDROGENASES

La rupture de l'hydrogène peut se faire selon deux mécanismes. Le clivage hétérolytique a lieu au cours de la réaction d'une espèce hydrure avec un acide, dans le cas de la réduction des protons, ou d'une base, dans le cas de l'oxydation. La rupture homolytique se produit avec le couplage symétrique de deux hydrures. En général, deux centres métalliques sont nécessaires pour qu'elle ait lieu (Figure II-8).

Clivage homolytique



Clivage hétérolytique

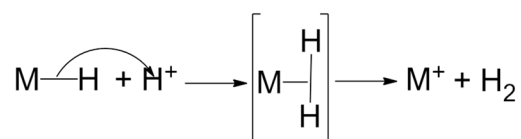


Figure II-8 : Mécanismes homo- et hétérolytiques pour la réduction des protons.

Afin de modéliser au mieux le site actif de ces enzymes et conserver les fonctions catalytiques, il est important de prendre en compte divers points au cours de la synthèse de mimes :

- La première sphère de coordination des métaux est riche en soufre, élément mou dans la théorie HSAB ;
- Une base pendante (uniquement chez les hydrogénases [FeFe]) est située dans la seconde sphère de coordination du métal pour éviter sa liaison au centre métallique. Elle est impliquée dans la rupture de la liaison métal-hydrure et l'activation de la liaison H-H ;
- Le modèle est bimétallique et on peut penser qu'une redistribution électronique entre les métaux a lieu pour stabiliser les intermédiaires ;
- Varier les ligands, l'encombrement stérique, la présence de relais de protons, ou de donneurs d'électrons influencent la réactivité ;
- Favoriser la rupture hétérolytique de l'hydrogène. Ce procédé est en compétition avec l'addition oxydante de l'hydrogène pour former un hydrure. Au site actif des hydrogénases, la rupture de H-H est hétérolytique et favorisée par la présence d'une

base pendante. Ainsi, le contrôle de la densité électronique autour du métal et la rétrodonation joue sur la vitesse de déprotonation. Par ailleurs, l'addition oxydante est restreinte lorsque l'encombrement stérique autour du complexe dihydrogéné est important (Figure II-8).

- La diminution de la surtension est contrôlée par la nature du centre métallique, les ligands ou la structure du catalyseur.

II.3.C LES MODELES BIOMIMETIQUES

II.3.C (i) Complexes hétérodinucléaires de type Ni-M

Les premiers modèles fonctionnels des hydrogénases [NiFe] étaient des complexes hétérodinucléaires Ni-Ru. Cela s'explique par le rôle important des ligands σ -donneurs CO et CN⁻ autour du fer (dans le site actif de l'enzyme), qui servent à moduler les propriétés électroniques et la réactivité. La chimie du ruthénium est beaucoup plus souple. Ainsi, le premier catalyseur actif a été publié en 2006 par Artero et Fontecave sous la forme d'un complexe nickel-ruthénium [Ni(xbsms)Ru(CO)₂(Cl)₂] (Figure II-9A).⁶³ Ce dernier réduit les protons en présence de triéthylamine dans le DMF atteignant un TON de 45. Dans la même lignée, d'autres dérivés ont été synthétisés.⁶⁴⁻⁶⁶

En 2007, Ogo propose un nouveau type de complexe NiRu aquahydrure catalysant l'oxydation de H₂ en solvant aqueux.⁶⁷ Malgré les caractérisations spectroscopiques de la structure cristalline, aucune étude électrochimique en catalyse homogène n'a été fournie.

En 2011, Fontecave et Artero substituent le centre ruthénium par un manganèse. [Ni(xbsms)Mn(CO)₃(H₂O)]⁺ produit de l'hydrogène en présence d'acide trifluoroacétique dans le DMF (Figure II-9B). Après 4 heures d'électrolyse, 2,5 mL d'H₂ ont été produits avec un rendement faradique de 94%, un TON de 15.8 et une surtension de 860 mV.⁶⁸ Deux ans plus tard, ces performances sont améliorées par l'équipe de Song.⁶⁹

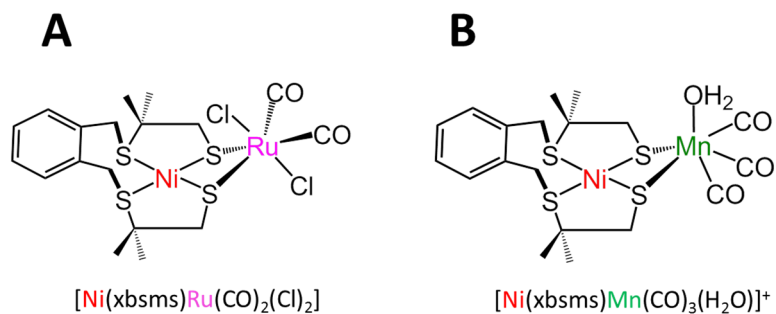


Figure II-9 : (A) Premier modèle fonctionnel des hydrogénases [NiFe] proposé par Artero et Fontecave en 2006.⁶³ (B) Complexe NiMn proposé par Artero et Fontecave en 2011.⁶⁸

II.3.C (ii) Complexes dinucléaires NiFe

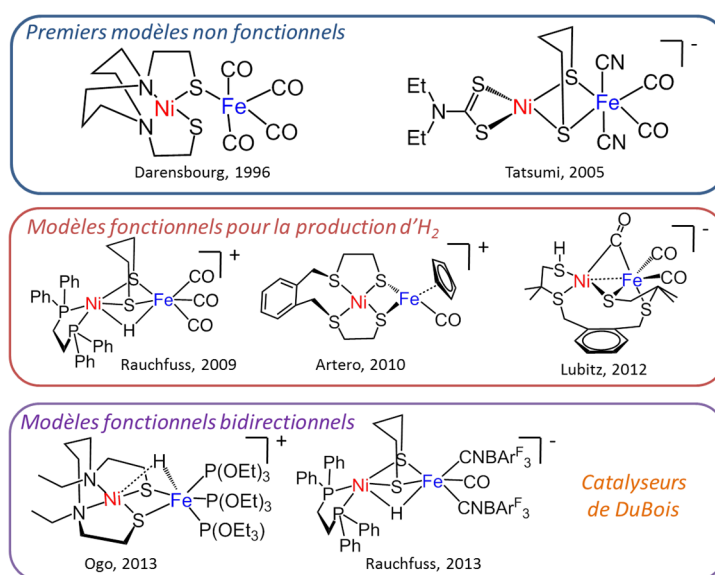


Figure II-10 : Exemples de différents modèles biomimétiques d'hydrogénase [NiFe]

Depuis la publication de la première structure cristalline en 1995, la construction du site actif des hydrogénases a inspiré de nombreux chimistes. Quelques exemples de complexes dinucléaires NiFe sont présentés dans la Figure II-10. Le premier modèle structural a été proposé par Darensbourg en 1996⁷⁰. En 2005, Tatsumi propose une nouvelle voie de synthèse qui permet l'ajout d'un pont dithiolate ainsi que de ligands carbonyles et cyanures autour du fer.⁷¹ Comme plus d'une cinquantaine d'autres exemples de la littérature,⁷² ces modèles ne présentent aucune activité catalytique.

Il faudra attendre 2009 pour voir apparaître le premier modèle fonctionnel décrit par Rauchfuss⁷³ sous la forme d'une espèce hydrure pontante, qui mime l'état Ni-R de l'enzyme. Ce catalyseur est actif pour la production d'H₂ en présence de d'acide trifluoroacétique dans le DMF. En 2010, Artero⁷⁴ publie un cluster avec des ligands S₄ autour du nickel et cyclopentadiényle autour du fer capable de produire 3.35 mL d'H₂ après 4h d'électrolyse et un nombre de cycle (TON) de 20. Cependant, sa surtension de 730 mV écarte toute utilisation. Enfin, en 2012 l'équipe de Lubitz⁷⁵ synthétise un complexe dinucléaire avec une fonction thiol protonée, modèle d'un intermédiaire catalytique de l'hydrogénase [NiFe]. Deux modèles protonés et déprotonés ont été isolés et réduisent les protons à une surtension de 540 mV, un TON de 20 et un TOF compris entre 5 et 8h⁻¹.

Dans la nature, les hydrogénases agissent bi-directionnellement. En 2013, Ogo⁷⁶ propose le premier cluster Ni-Fe mimant cette catalyse réversible en introduisant notamment des ligands triéthylphosphore sur le fer. En présence d'une base forte (méthanoate), ce complexe active le clivage hétérolytique d'H₂ dans un mélange MeCN/MeOH à température ambiante. Aucune étude catalytique électrochimique n'étant proposée, nous ne pouvons pas évaluer les performances de cette molécule.

La même année, Rauchfuss⁷⁷ publie, sur la base de la molécule de 2009, un modèle hydrure avec deux ligands cyanures protégés par un trifluorophénylborane qui permet d'inhiber la basicité des cyanures pour éviter leurs coordinations avec le centre nickel ou avec l'hydrogène moléculaire. L'étude électrochimique de ce mème de l'état Ni-R suggère que l'oxydation est centrée sur le fer, contrairement à l'enzyme qui oxyde le Ni(II) en Ni(III). En présence d'une base, la catalyse d'oxydation d'H₂ en protons a lieu, tandis que l'utilisation d'un acide fort comme HCl induit la libération d'H₂ de l'espèce hydrure formée. Une valeur de TOF de 0.98s⁻¹ est observée pour le processus d'oxydation. Le mécanisme de production d'H₂ pour des modèles des hydrogénases [NiFe] a été détaillé récemment.⁷⁸

Enfin, Duboc et Artero⁷⁹ proposent en 2016, la synthèse d'un nouveau complexe Ni(II)-Fe(II) (Figure II-11) dont la réactivité est pour la première fois centrée sur le nickel. Deux intermédiaires catalytiques qui reproduisent les caractéristiques structurales et électroniques des états Ni-R et Ni-L ont été isolés.

En présence de 50 équivalents Et₃NHBF₄, source de protons, le catalyseur produit de l'hydrogène avec un TON de 16, un rendement faradique de 70 % et une surtension de l'ordre de 500 mV. L'étude cinétique par la méthode du pied de vague (FOWA pour « foot of the wave » en anglais) a permis de calculer une constante de catalyse cinétique du second ordre (k_{cat}) de l'ordre de 2.5 x 10⁻⁴ M⁻¹.s⁻¹ et un TOF de 250 s⁻¹ dans les conditions utilisées.

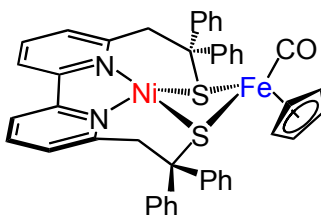


Figure II-11 : Structure du cluster Ni(II)-Fe(II) proposé par Duboc et Artero.⁷⁹

En parallèle de tous ces travaux, l'équipe de DuBois aux USA a proposé la synthèse de dérivés de complexes de nickel mononucléaires qui agissent parfois réversiblement. Le principe de fonctionnement et leurs performances de ces catalyseurs sont détaillés dans la partie Complexes de nickel bis-diphosphine mononucléaires bio-inspires pour l'oxydation et la réduction de l'hydrogène II.4 de ce chapitre.

II.3.C (iii) Complexes dinucléaires FeFe

La synthèse de mimes de sites actifs d'hydrogénases [FeFe] doit intégrer plusieurs éléments présents dans l'enzyme :

- Un complexe dinucléaire stable avec un encombrement stérique important pour laisser un site de coordination accessible à l'hydrogène ;
- La présence de relais de protons sous la forme de bases pendantes telles que des ligands azotés ;

- Un relais d'électrons mimant la fonction des clusters $[4\text{Fe}-4\text{S}]$: en ce sens les modèles intégrant des ligands non-innocents (électroactifs) ont une chance de montrer une meilleure activité catalytique.

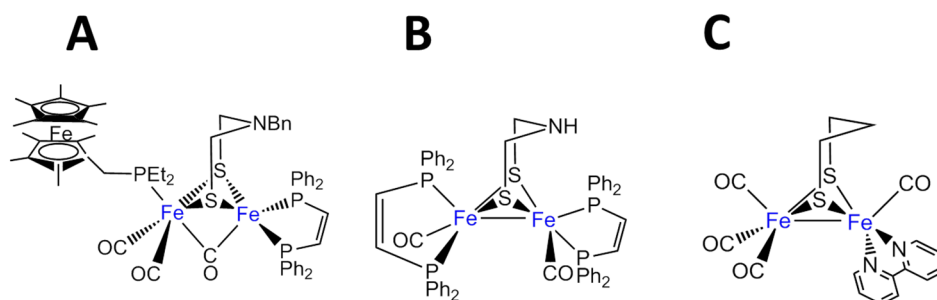


Figure II-12 : Exemples de complexes dinucléaire FeFe (A) Rauchfuss, 2012⁸⁰. (B) Caroll, 2012.⁸¹ (C) Jones, 2013⁸²

En 2005, Pickett⁸³ propose la première synthèse d'un complexe FeFe intégrant un cluster $[4\text{Fe}-4\text{S}]$, actif pour la réduction des protons. Au cours des années qui ont suivi, de nombreux modèles de l'état H_{red} ^{58,84}, impliqués dans la production d' H_2 ont été proposés. En 2008, l'équipe de Darensbourg⁸⁵ propose un modèle de l'état H_{ox} dans lequel le fer adopte, comme dans le site actif de l'enzyme, une valence mixte $[\text{Fe}^{\text{II}}-\text{Fe}^{\text{I}}]$.

Dans une étude récente, Rauchfuss et Camara⁸⁰ (Figure II-12A) ont synthétisé un mime fonctionnel capable d'activer H_2 en intégrant : (1) un centre FeFe réactif ; (2) une amine qui joue le rôle de relais de protons ; (3) et pour la première fois un module rédox, sous la forme d'un décaméthylferrocène lié à une trialkylphosphine. Ce complexe original est capable d'oxyder H_2 en présence d'une base de façon équimolaire, avec un TON assez faible de 0.4 h^{-1} .

En 2013, Caroll décrit le rôle des amines, en tant que relais de protons, dans le mécanisme catalytique en synthétisant un modèle sans et avec ligand azadithiolate (Figure II-12B).⁸¹ Ainsi, les espèces comportant l'amine sont plus actives pour la réduction des protons avec des TOF allant jusque 58 000 s^{-1} et 500 mV de surtension.

La présence de ligands non-innocents bipyridines, dans un modèle dinucléaire, a été étudiée par Jones en 2013 (Figure II-12C).⁸² La substitution d'une bipyridine sur le complexe $[\text{Fe}_2(\text{pdt})(\text{CO})_6]$ pour conduire à $[\text{Fe}_2(\text{pdt})(\text{CO})_4\text{bipy}]$ permet d'induire la réduction des protons. La catalyse a lieu dans des conditions d'acides forts ou faibles avec des mécanismes différents.

Très récemment, Gloaguen a détaillé les mécanismes impliqués dans l'électrocatalyse de réduction des protons pour des complexes di-fer azadithiolates.⁸⁶ Des conditions acides fortes impliquent deux réductions distinctes. Les procédés catalytiques, dont les potentiels rédox sont les moins négatifs, sont initiés par une N-protonation des complexes di-fer dithiolate et limités par une rupture hétérolytique lente de l'espèce dihydrure formée en présence d' H_2 . Lorsque la réduction a lieu à un potentiel plus négatif, la rupture hétérolytique est plus rapide. Ainsi, ils ont démontré que la réduction d'une forme N-protonée conduit à une réaction tautomérique pour

former un intermédiaire Fe-H, comme dans le mécanisme catalytique de l'enzyme.

Le Tableau II-3 résume les performances des différents modèles biomimétiques cités dans cette section. La plupart des modèles bio-inspirés, qui regroupent les catalyseurs gardant la fonction d'activation ou de production d'H₂ avec une structure chimique différente, sont actifs pour la réduction des protons. Ils ne seront donc pas détaillés dans ce manuscrit (plus de plus amples informations, voir l'annexe III page 256).

II.3.D CONCLUSION

Les modèles biomimétiques et bio-inspirés des hydrogénases sont présentés ci-dessous dans le Tableau II-3. Leurs performances catalytiques ont été étudiées, en catalyse homogène, dans des solvants organiques en présence d'acides plus ou moins forts. La plupart d'entre eux sont actifs pour la réduction des protons.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude en catalyse hétérogène des complexes de nickel de DuBois. Ces modèles biomimétiques dépassent largement les performances des catalyseurs présentés jusqu'à maintenant. Leur structure commune, un complexe de nickel mononucléaire bis-diphosphine, est facilement modulable en faisant varier les groupements chimiques de la première et seconde sphère de coordination. Les études détaillées, en termes de calculs thermodynamiques et DFT, ont permis de comprendre de façon claire les mécanismes catalytiques de l'HOR et l'HER.

Tableau II-3 : Comparaison des performances de divers modèles bio-inspirés des hydrogénases [NiFe] et [FeFe]

COMPLEXES	TYPE DE CATALYSE	CONDITIONS CATALYTIQUES	SURTENSION (MV)	TON	TOF	RENDEMENT FARADIQUE (%)	QUANTITE H ₂ PRODUITE (ML)	ANNEE	REF.
[L ^{NiS2} NiFe(Cp)(CO)]	Réduction	Et ₃ NHBF ₄ : MeCN	500	16	250 s ⁻¹	70	-	2016	Duboc et Artero ⁷⁹
[(dppv)Ni(μ-pdt) Fe(CO)(dppv)]	Réduction	CF ₃ COOH : MeCN p-TsOH : MeCN ClCH ₂ COOH : MeCN	-	-	480 s ⁻¹	93	-	2016	Rauchfuss ⁷⁸
[H(CO) ₂ (CNBAr ^{F3}) ₂ Fe(pdt)Ni(dppe)] ²⁻	Oxydation	1atm. H ₂ DBU	-	-	-	-	-	2013	Rauchfuss ⁷⁷
[(μ-pdt)Fe ₂ (CO) ₄ (κ ² bpy)]	Réduction	AcOH: MeCN	-	-	-	-	-	2013	Jones ⁸²
[Ni(RN(PPh ₂) ₂)(μSET) ₂ (μCl)Mn(CO) ₃] (R= p-MeC ₆ H ₄ CH ₂)	Réduction	AcOH: MeCN HBF ₄ : MeCN p-TsOH: MeCN	380	11	-	90	-	2013	Song ⁶⁹
[Ni(xbsms)Ru(C ₆ Me ₆)(Cl)] ⁺	Réduction	TFA : DMF	700	17.1	-	-	-	2013	Artero ⁶⁴
[HNi(xsbms)(μ-CO)(μ-S)Fe(CO) ₂ S](BF ₄)	Réduction	CF ₃ COOH : MeCN ou DMF	570	32	8 h ⁻¹	-	-	2012	Lubitz ⁷⁵
[HFe ₂ (adt ^{NH} H)(CO) ₂ (dppv) ₂] ₂₊	Réduction	TFA : DCM	500	-	16 h ⁻¹	90	-	2012	Rauchfuss ⁸¹
[Fe ₂ [(SCH ₂) ₂ NBn](CO) ₃ (FcP*)(dppv)] ⁿ⁺ (FcP* = Cp*Fe(C ₅ Me ₄ CH ₂ PEt ₂))	Oxydation	P(o-tolyl) ₃ : CH ₂ Cl ₂	-	-	0,4 h ⁻¹	-	-	2011	Rauchfuss ⁸⁰
[Ni(xbsms)Mn(CO) ₃ (H ₂ O)] ⁺	Réduction	TFA : DMF	860	16	4 h ⁻¹	94	2,5	2011	Artero ⁶⁸
[Ni(xbsms)FeCp(CO)] (BF ₄)	Réduction	TFA : DMF	730	20	5 h ⁻¹	72	3,35	2010	Artero ⁷⁴

$[\text{NiCl}(\text{xbsms})\text{Ru}(\text{CO})_3(\text{Cl})]$	Réduction	$\text{Et}_3\text{NHCl} : \text{DMF}$	-	19	-	-	-	2009	Artero 65
$[(\text{CO})(\text{dppe})\text{Fe}(\text{pdt})(\mu\text{-H})\text{Ni}(\text{dppe})]^+$	Réduction	$\text{CF}_3\text{COOH} : \text{DCM}$	-	-	-	-	-	2009	Rauchfuss 73
$[\text{HFe}_2(\text{S}_2\text{C}_3\text{H}_6)(\text{CO})_2(\text{dppv})_2]^+$	Réduction	$\text{HBF}_4 : \text{DCM}$	-	-	-	-	-	2008	Rauchfuss 84
$[\text{NiL}(\text{H}_2\text{O})(\mu\text{-H})\text{Ru}(\eta\text{-C}_6\text{Me}_6)](\text{SO}_4)$ (L=N,N'-diméthyl-N,N'-bis(2-mercaptoéthyl)-1,3-propanediamine)	Oxydation	$\text{H}_2\text{O}, 20^\circ\text{C}, 0.1\text{MPa}$	-	-	-	-	-	2007	Ogo 67
$[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SCH}_3)_3] \text{Fe}_2(\text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2\text{S})_3)(\text{CO})_5 \text{]}^{2-}$	Réduction	4,6diméthylpyridinium	-	-	-	-	-	2005	Pickett 83

II.4 COMPLEXES DE NICKEL BIS-DIPHOSPHINE MONONUCLEAIRES BIO-INSPIRES POUR L'OXYDATION ET LA REDUCTION DE L'HYDROGENE

II.4.A LES CATALYSEURS DE DUBOIS

II.4.A (i) *Présentation*

Les catalyseurs de DuBois sont composés d'un complexe mononucléaire de nickel (II). Les ligands de la première sphère de coordination ont connu plusieurs évolutions depuis leur apparition dans les années 2000. Aujourd'hui, la structure finale est un complexe de nickel entouré de deux ligands bis-diphosphine en géométrie pyramide à base carrée « distordue ». Ils sont référencés de la façon suivante : $[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{R}}\text{N}_2^{\text{R}'})_2]^{n+}$ (Figure II-13) avec $\text{P}_2^{\text{R}}\text{N}_2^{\text{R}'}$, ligand 1,5-diaza-3,7-diphosphacyclooctane.

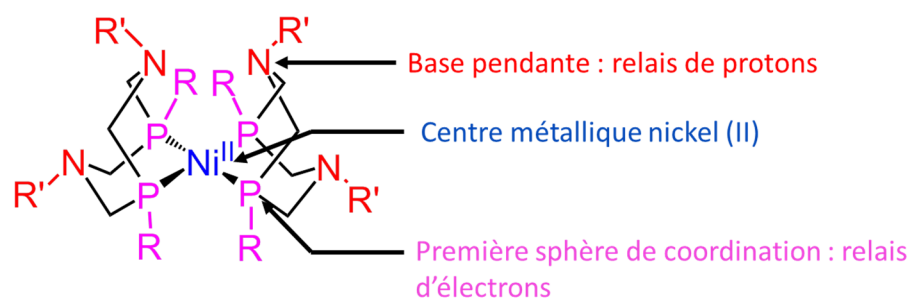


Figure II-13 : Structure du catalyseur de DuBois.

La première sphère de coordination comprend les ligands qui sont directement attachés au métal, ici les quatre atomes de phosphore. La seconde sphère de coordination intègre des groupes fonctionnels qui interagissent préférentiellement avec le substrat. Le motif $\text{P}_2^{\text{R}}\text{N}_2^{\text{R}'}$ porte des bases pendantes amines, relais de protons, proche du ligand azadithiolate du site actif des hydrogénases $[\text{FeFe}]$. Ce catalyseur est également bio-inspiré des hydrogénases $[\text{NiFe}]$ puisque le centre métallique est un atome de nickel (II). Les complexes de DuBois sont actifs pour l'oxydation d' H_2 , la réduction des protons ou bien fonctionnent bidirectionnellement. La modulation des groupes R et R' influence le biais catalytique.

II.4.A (ii) *Comment moduler le biais catalytique ?*

Le biais catalytique est défini comme la tendance d'un catalyseur à oxyder ou réduire un substrat en produit. Dans le cas des complexes de DuBois, les ligands de la première et seconde sphère de coordination sont fortement impliqués dans la modulation du biais catalytique.

1. Le rôle de la première sphère de coordination

La première sphère de coordination influence les propriétés du centre métallique comme par exemple la présence ou l'absence de sites de coordination vacants, le potentiel rédox, l'accessibilité stérique ou bien la densité électronique.⁸⁷ Les premiers complexes synthétisés, $[\text{Ni}(\text{diphosphine})_2]^{2+}$, étaient composés de deux ligands diphosphines. Des études thermodynamiques et spectroscopiques ont permis de déterminer les valeurs de pKa et l'hydricité des espèces $[\text{NiH}(\text{diphosphine})]^+$. L'hydricité correspond à l'énergie libre (kcal.mol^{-1}) requise pour cliver la liaison M-H et générer un ion hydrure H^- .⁸⁸ En général, une valeur de pKa élevée est attribuée à un complexe portant des groupements électroattracteurs sur les phosphores.

Par ailleurs, les angles dièdres, P-M-P formés entre le nickel et les phosphores adjacents, influencent fortement la fixation des ions hydrures sur le métal : quand le substituant R a un fort encombrement stérique, l'angle dièdre augmente, l'accessibilité au métal est donc plus importante et le complexe est un meilleur accepteur d'hydrure. $[\text{Ni}(\text{depp})]^{2+}$ (depp = $\text{Et}_2\text{P}(\text{CH}_2)_3\text{PEt}_2$) en est un exemple puisque son hydricité permet le clivage hétérolytique d' H_2 en présence d'une base.⁸⁹

2. Le rôle de la seconde sphère de coordination : vers l'intégration de bases pendantes

Tandis que le centre métallique coordonne des hydrures, les bases pendantes sont des accepteurs intramoléculaires de protons, qui influent énormément les performances catalytiques.

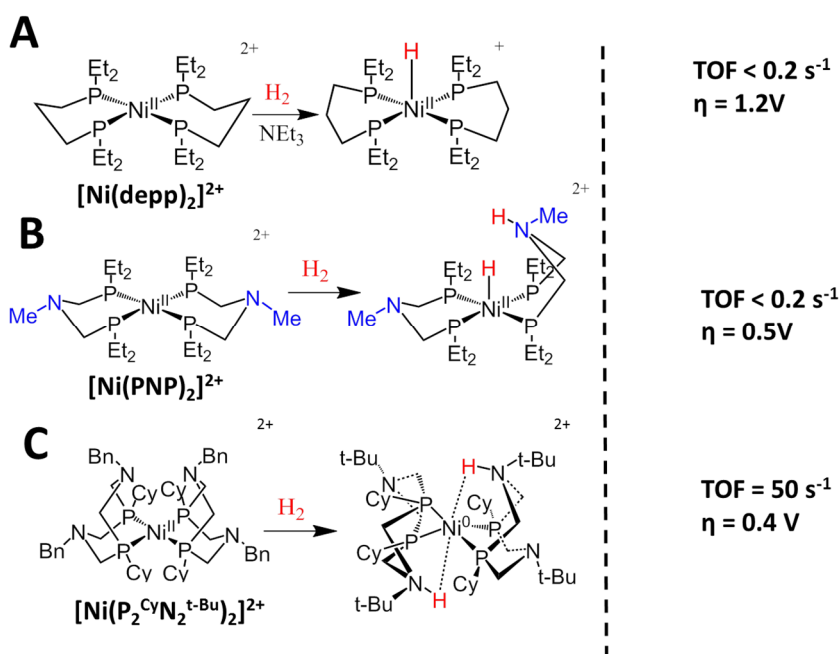


Figure II-14 : Evolution de la structure des complexes de nickel jusqu'à l'intégration de bases pendantes.

Le complexe $[\text{Ni}(\text{depp})_2]^{2+}$ (Figure II-14A) est la première génération de catalyseur, sans base pendante, pour l'oxydation d' H_2 . Ainsi, l'utilisation d'une base externe triéthylamine est requise pour réaliser le clivage d' H_2 . La catalyse est lente

(TOF < 0,2s⁻¹) et la surtension élevée (1,2V).⁸⁹ Dans le second exemple (Figure II-14B), une base pendante méthyle est ajoutée dans la seconde sphère de coordination. La rupture hétérolytique d'H₂ conduit à la formation d'une espèce hydrure dans laquelle un ligand phosphine PNP est protoné, ce qui conduit à une forte diminution de la surtension (de 1,2 V à 0,5V). Ceci s'explique par un mécanisme PCET lors de l'oxydation de l'hydrure [HNi(PNP)]²⁺ : le transfert d'un électron à l'électrode est couplé au transfert d'un proton du nickel à un atome d'azote. Cependant, le TOF reste encore très faible.

La fixation d'H₂ sur le catalyseur peut engendrer une interconversion chaise-bateau, ce qui a pour conséquence de diminuer la distance entre les bases pendantes protonées et le nickel, afin de stabiliser l'hydrure. C'est ce qui se produit avec [Ni(PNP)]²⁺. Finalement, les bases pendantes ne sont pas assez proches des sites vacants du centre métallique, comme dans le cas des hydrogenases [FeFe]. Ainsi, des complexes avec des ligands cycliques P₂^RN₂^{R'} ont été synthétisés pour forcer au moins un des ligands diphosphine à adopter une conformation bateau et ainsi positionner les bases pendantes au plus proche du centre métallique. De ce fait, [Ni(P₂CyN₂^{t-Bu})₂]²⁺ (Figure II-14C) oxyde H₂ avec un TOF beaucoup plus élevé égale à 50 s⁻¹ et une surtension minimale de 400 mV.⁹⁰ Les bases pendantes limitent l'interconversion chaise-bateau, qui est une barrière énergétique importante au cours du cycle catalytique et augmentent la vitesse de rupture hétérolytique de H₂.⁹¹

II.4.B MECANISMES CATALYTIQUES

Deux cycles catalytiques ont été proposés en fonction du type de bases externes présentes en solution (Figure II-15). La première étape est la réduction de Ni(II) en Ni(0) couplée à la protonation des bases pendantes en position endo pour former le premier intermédiaire observable⁹² endo/endo (ee²⁺). Au cours de cette étape, un clivage hétérolytique rapide de la liaison H-H suivi par un transfert de proton réversible entre le métal et les bases pendantes ont lieu. D'autres isomères peuvent se former, mais des études en DFT et RMN ont montré que l'espèce ee²⁺ était la seule impliquée dans la catalyse.⁹¹

ee²⁺ est ensuite oxydé (voie 1) ou déprotoné (voie 2). Une base avec un encombrement stérique important (voie 1) favorisera l'oxydation pour former l'espèce Ni(I) ee³⁺. La base externe réalise un échange de proton intermoléculaire avec le complexe. En effet, une base encombrée et faible n'est pas capable de déprotoner l'espèce ee²⁺, surtout si la gêne stérique sur les groupements R et R' est importante. La déprotonation de ee³⁺ pour former e²⁺ est thermodynamique favorable à cause de la charge globale plus élevée. De plus, la rupture de la liaison hydrogène Ni—HN diminue la longueur de la liaison Ni-N permettant une meilleure accessibilité du proton présent sur la base pendante pour la dernière étape de déprotonation qui conduit à l'espèce Ni(I). Enfin, une dernière oxydation conclut le cycle catalytique pour régénérer le complexe de départ Ni(II).

En présence d'une base forte (n-butylamine) ou de triéthylamine en présence d'eau, la déprotonation de ee^{2+} a lieu pour former l'espèce hydrure NiH^+ . Cette étape empêche la formation d'autres isomères. S'ensuit une étape d'oxydation à un potentiel plus élevé (que pour la formation de ee^{3+}) à cause des réactions de transfert de protons inter- et intramoléculaires et de transferts d'électrons, qui résultent de la formation de l'intermédiaire e^{2+} . Enfin, des étapes de déprotonation et d'oxydation régénèrent l'espèce Ni^{2+} . L'utilisation d'une base faible en présence d'eau conduit à des échanges de protons intermoléculaires via un mécanisme concerté entre la formation de l'hydrure et la présence de liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau et les bases pendantes. Ainsi, l'eau agit en tant que relais de protons entre la base exogène et les bases pendantes.

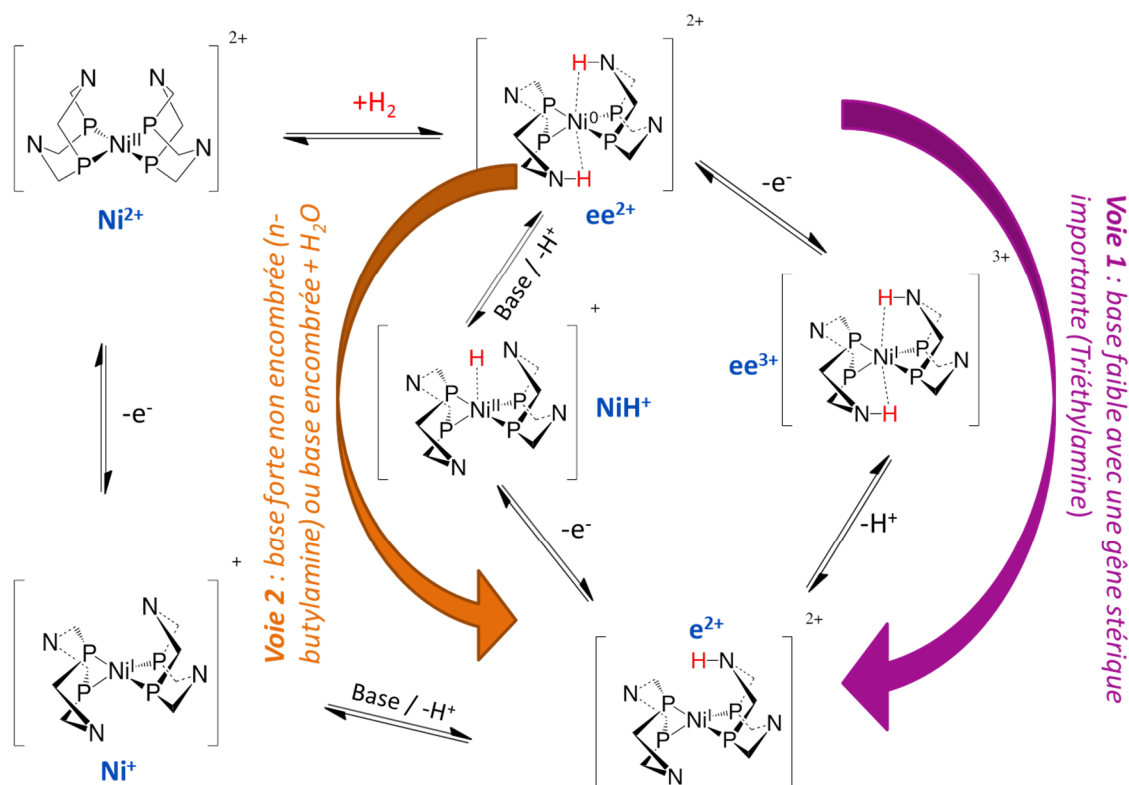


Figure II-15 : Différents mécanismes catalytiques d'oxydation d' H_2 pour le complexe de nickel bis-diphosphine $[Ni(P_2^R N_2^R)_2]^{n+}$.

Le mécanisme de réduction a lieu dans le sens inverse des aiguilles d'une montre sur la Figure II-15.

II.4.C UTILISATION DE LA THERMODYNAMIQUE POUR CONTROLER LE BIAIS CATALYTIQUE

DuBois a développé une méthode, basée sur des calculs thermodynamiques, qui prédit le biais catalytique des complexes de nickel en fonction des substituants R et R' présents sur les bases pendantes et les phosphores. La mesure des enthalpies libres de réaction à chaque étape du cycle catalytique permet de calculer $\Delta G^0 H_2$. Les complexes pour lequel $\Delta G^0 H_2$ est positif, produiront de l'hydrogène. A l'inverse, si $\Delta G^0 H_2$ est

négatif, l'oxydation d'H₂ aura lieu. Cette étude a été développée en détail dans de nombreuses revues.^{87,91,93}

Les complexes [Ni(P₂^{Ph}N₂C₆H₄X)₂]²⁺ où X = Br ou OMe ont été synthétisés⁹⁴ afin d'étudier une augmentation de l'acidité des bases pendantes protonées sans modifier la gêne stérique. Etant donné que -OMe est un meilleur donneur d'électrons que -Br, son pKa est plus élevé (11,9 vs 9,4). Le complexe avec le substituant Br est alors plus acide, la déprotonation des bases pendantes est plus rapide et donc la catalyse plus importante. En effet, le TOF augmente d'un facteur 2, passant de 480s⁻¹ avec le substituant -OMe à 1040s⁻¹ avec le substituant -Br.

La substitution d'un groupement phényle sur le phosphore par un méthyle augmente les propriétés de donneurs d'hydrure du centre métallique et ainsi le TOF d'un facteur 100. A contrario, la présence d'un substituant R encombré sur les phosphore conduira à un ralentissement de la catalyse de production d'H₂.

II.5 VERS UNE NOUVELLE CLASSE DE COMPLEXES DE NICKEL BIO-INSPIRÉE INTEGRANT DES ACIDES AMINES DANS LA SPHERE DE COORDINATION EXTERNE

II.5.A INTRODUCTION

Les complexes de nickel bis-diphosphine de DuBois ont fait des avancées remarquables pour mimer au mieux le site actif et les fonctions catalytiques des hydrogénases [FeFe] et [NiFe]. Ils sont bidirectionnels, mais avec des surtensions minimales importantes. Les réactions HER et HOR sont étudiées dans des conditions différentes : dans un solvant organique en présence d'une source de protons acides pour la réduction des protons, et d'une base forte pour l'oxydation d'H₂. En 2011, Wendy J. Shaw propose la synthèse de dérivés [Ni(P₂^{Ph}N₂^{Ph-R})]²⁺ dans lesquels des acides aminés et dipeptides sont ajoutés dans la sphère de coordination externe.⁹⁵ Les fréquences catalytiques de cycle de production d'H₂ augmentent de plusieurs ordres de grandeurs, démontrant le rôle important de ces substituants sur les performances catalytiques.

II.5.B MODULER LES SUBSTITUANTS DE LA SPHERE DE COORDINATION EXTERNE

Afin d'augmenter les performances catalytiques, il convient de prendre en compte plusieurs facteurs : (1) les effets électroniques (donneurs ou accepteurs d'électrons) ; (2) l'encombrement stérique autour des bases pendantes ; (3) le rôle de l'eau en tant que base exogène.

La synthèse de divers dérivés [Ni(P₂^{Cy}N₂^{Bn-R})]²⁺ a mis en avant l'influence des effets électroniques et stériques.⁹⁶ Un calcul DFT a été effectué sur l'isomère ee²⁺, correspondant au complexe dihydrure [Ni⁰(P₂^{Cy}N₂^{RH})]²⁺ (Figure II-15). Les

substituants R présents sur les phosphores se déplacent lorsque les bases pendantes sont protonées. Ainsi, le déplacement de substituants R peu encombrés permet de diminuer la distance Ni---H(N) et par conséquent d'augmenter la force de la liaison M--H(N). *A contrario*, un substituant T-Bu, ayant une gêne stérique élevée, aura l'effet inverse.

L'ajout de relais de protons sur les bases pendantes pourrait faciliter le transfert de protons jusqu'au centre métallique et diminuer ou affaiblir la liaison Ni--HN qui sera alors plus facile à déprotoner. La substitution d'un groupement méthylbenzène par une méthylpyridazine sur les bases pendantes diminue la surtension de 300 mV, au cours de l'activation d'H₂, avec l'eau en tant que base.⁹⁷ Une étude RMN du phosphore 31 en temps et température résolus a permis d'identifier que l'isomère protoné endo/exo était l'espèce catalytique. Finalement, le groupement pyridazine assure un transfert de protons intramoléculaire du nickel vers les positions endo et exo. Ce composé dihydrogéné est oxydé à un potentiel inférieur au complexe portant le groupement méthylbenzène, induisant cette baisse de surtension. Cependant, la catalyse, trois fois plus faible, indique une coordination possible entre les azotes de la pyridazine et le nickel. De ce fait, l'utilisation de groupements moins flexibles, comme par exemple l'ajout de peptides, pourrait annihiler cet effet.

En 2014, un complexe de nickel contenant un peptide dans la sphère de coordination externe a montré des performances intéressantes pour la réduction des protons avec des TOF de 100 000 s⁻¹, un rendement faradique de 96% et une perte d'activité catalytique de seulement 10% après 48h en conditions acides.⁹⁸

II.5.C PRESENTATION ET PERFORMANCES DES DIFFERENTS COMPLEXES DE NICKEL A BASE D'ACIDES AMINES

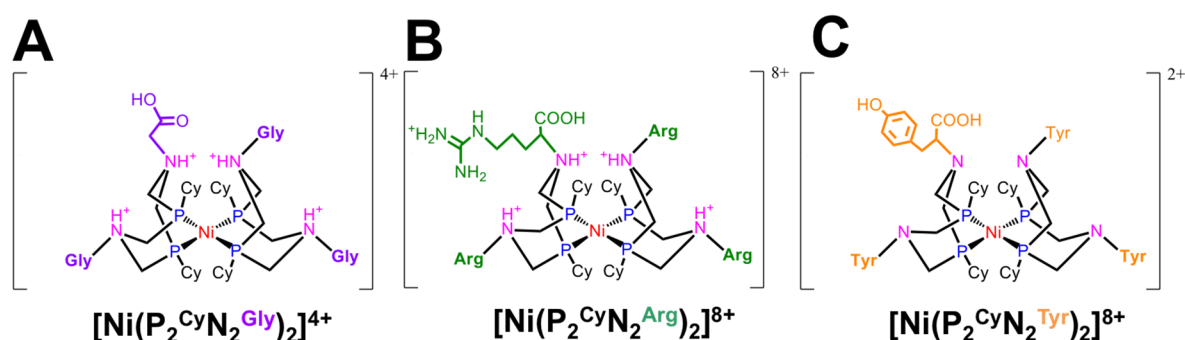


Figure II-16 : Complexes de nickel bis-diphosphine à base d'acides aminés glycine (A), argine (B) et tyrosine (C) dans la sphère de coordination externe.

Les travaux précédents, et notamment l'influence de l'eau en tant que base dans la catalyse, ont poussé Wendy J. Shaw à synthétiser à partir de 2013 des complexes portant des acides aminés dans la sphère de coordination externe. Ainsi, les différents

complexes présentés dans cette section sont, pour la première fois, solubles en solvants aqueux et comportent des relais de protons plus au moins efficaces. Leurs structures chimiques sont présentées en Figure II-16.

II.5.C (i) $[Ni(P_2^{Cy}N_2^{Gly})]^{4+}$: un acide aminé glycine sur les bases pendantes

$[Ni(P_2^{Cy}N_2^{Gly})]^{4+}$ (Figure II-16A) a été le premier complexe de cette série, publiée dans JACS en 2013.⁹⁹ La présence de quatre acides aminés glycine sur les bases pendantes introduit une seconde sphère de relais de protons, en plus des bases pendantes des ligands diphosphines. Soluble dans l'eau, ce composé active et produit de l'hydrogène. Même si la catalyse de réduction des protons est la plus performante (TOF = 2400 s⁻¹ à pH 0,5), la surtension d'oxydation d'H₂ est seulement de 160 mV contre 750 mV pour la réduction des protons (Figure II-17).

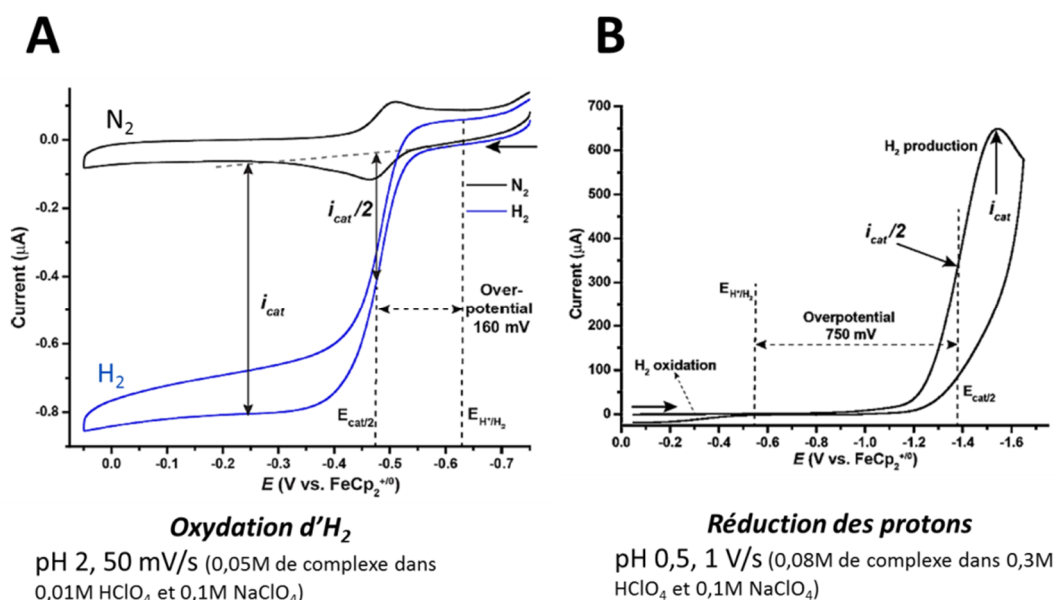


Figure II-17 : (A) Oxydation d'H₂ et réduction des protons (B) par le complexe $[Ni(P_2^{Cy}N_2^{Gly})]^{4+}$ en solvant aqueux. L'échelle est en convention américaine : le courant est négatif pour une oxydation et positif pour un processus de réduction. Adapté avec la permission de ⁹⁹. Copyright 2016 American Chemical Society.

Le voltampérogramme, réalisé sous N₂, (Figure II-17A) présente deux pics d'oxydation et de réduction réversibles correspondant à une superposition de deux systèmes rédox monoélectroniques des couples Ni(II/I) et Ni(I/o). Les relais de protons sont portés par les groupements carboxyles de la glycine. Ceci a été démontré par plusieurs techniques, dont la voltampérométrie cyclique par l'addition de base dans l'électrolyte sous N₂. Ainsi, le potentiel d'oxydoréduction varie, ce qui reflète que l'état de protonation de l'espèce Ni(II) est modifié. L'hypothèse la plus plausible est la coordination des COO⁻ au nickel après déprotonation.⁹⁹

Par ailleurs, le complexe est actif sur une large gamme de pH avec une activité renforcée à pH < 2, valeur à laquelle l'état de protonation du complexe augmente

puisque les carboxylates sont protonés. Lorsque le pH est supérieur, la fréquence catalytique de cycle chute rapidement : la protonation des bases pendantes limiterait les sites de fixation possible pour H₂.

II.5.C (ii) $[Ni(P_2CyN_2Arg)]^{8+}$: un acide aminé arginine sur les bases pendantes

$[Ni(P_2CyN_2Arg)]^{8+}$ (Figure II-16B) oxyde H₂ en protons sur une large gamme de pH comprise en 0 et 14 avec des performances plus élevées que $[Ni(P_2CyN_2Gly)]^{4+}$ comme l'indique la Figure II-18-B. Le TOF et la surtension sont directement corrélés avec les valeurs de pKa des COOH et du groupement guanidinium. En effet, plus l'état de protonation du complexe est élevé, plus la fréquence catalytique de cycle est importante. Ainsi, à pH 0,1 le TOF est de 210 s⁻¹ pour une surtension de 180 mV. En terme de stabilité et d'inhibition : (1) une perte de 7% de l'activité a été observée après 24h en conditions acides fortes ; (2) la sensibilité à l'oxygène a été avérée (purge de 10% O₂ pendant 40 minutes) mais le complexe retrouve environ 20% d'activité après une purge de 10 minutes sous H₂ ; (3) l'oxydation d'H₂ est possible même en présence de CO, puisque sa fixation au nickel est réversible.¹⁰⁰

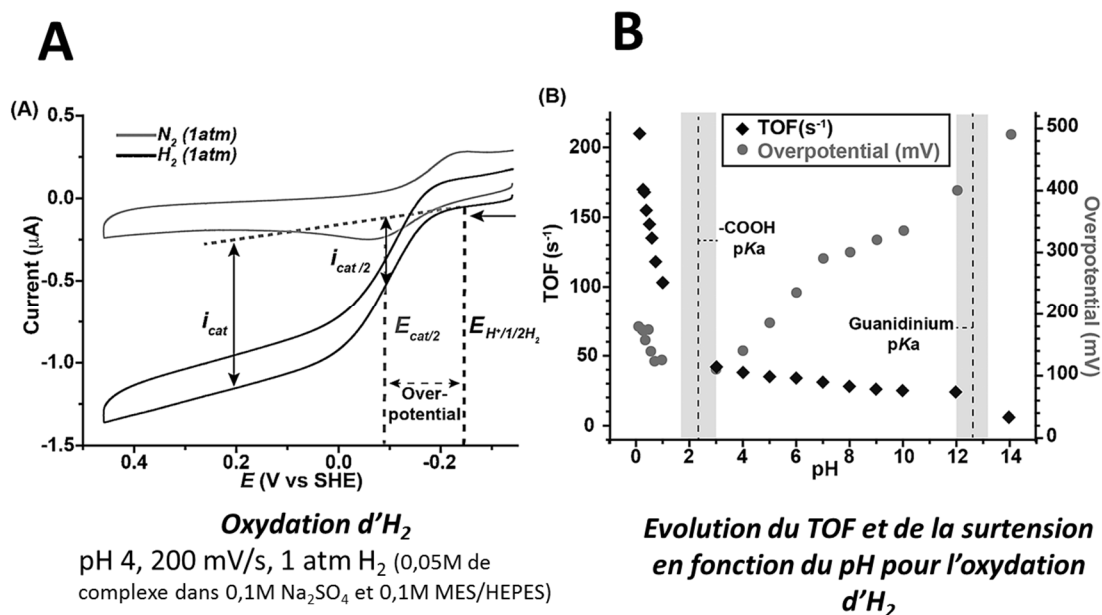


Figure II-18 : (A) Voltampérométrie du complexe $[Ni(P_2CyN_2Arg)]^{8+}$ sous N₂ et H₂ (B) Evolution du TOF et de la surtension en fonction du pH pour l'oxydation d'H₂. L'échelle est en convention américaine : le courant est négatif pour une oxydation. Adapté de ¹⁰¹ avec la permission de John Wiley and Sons (numéro de licence : 4093560090779)

Le rôle de l'arginine a été identifié par plusieurs études électrochimiques. Lorsque le pH est supérieur à 2,5, la forme COO⁻ prédomine et rentre alors en compétition avec H₂ pour la fixation au nickel (Figure II-18B). Ainsi, le TOF diminue et la surtension augmente. Une autre hypothèse est la formation d'un pont salin COO⁻...⁺HN qui empêcherait l'implication des bases pendantes dans le clivage hétérolytique de H₂. Par ailleurs, les guanidiums, qui n'étaient pas présents dans l'autre dérivé glycine, favoriseraient des interactions faibles entre les arginines

(formation de liaisons hydrogènes) pour conduire à un rapprochement des bases pendantes et ainsi une stabilisation de l'adduit dihydrogéné avec un clivage hétérolytique facilité.

L'influence de la température et de la pression en gaz a été approfondie :^{102,103} ce catalyseur est stable jusqu'à 72°C sous 100 atm. d'H₂ à pH 1 pour atteindre un TOF de 10⁻⁶s⁻¹ et une surtension de 240 mV. Ces résultats prometteurs en font le modèle d'hydrogénase le plus actif pour l'oxydation d'H₂ parmi ceux décrits jusqu'à aujourd'hui. Ces performances nous ont amené à l'utiliser en catalyse hétérogène supportée, en collaboration avec Wendy J. Shaw, et à l'intégrer dans un système de piles à combustible dont les résultats sont détaillés dans le chapitre 2 du manuscrit.

II.5.C (iii) $[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Cy}}\text{N}_2^{\text{Tyr}})]^{2+}$: un acide aminé tyrosine sur les bases pendantes

Le dernier catalyseur en date, $[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Cy}}\text{N}_2^{\text{Tyr}})]^{2+}$, comporte quatre résidus tyrosines.¹⁰⁴ Une électrocatalyse réversible, qui serait liée au cycle aromatique, a été observée en solvant aqueux et dans le méthanol en conditions acides. Des études de RMN et dynamiques moléculaires ont suggéré des interactions entre les noyaux aromatiques et les groupements carboxyliques qui limitent la flexibilité et favorisent ainsi le clivage hétérolytique d'H₂.

La Figure II-19 récapitule les performances catalytiques de chaque complexe de nickel présenté ci-dessus.

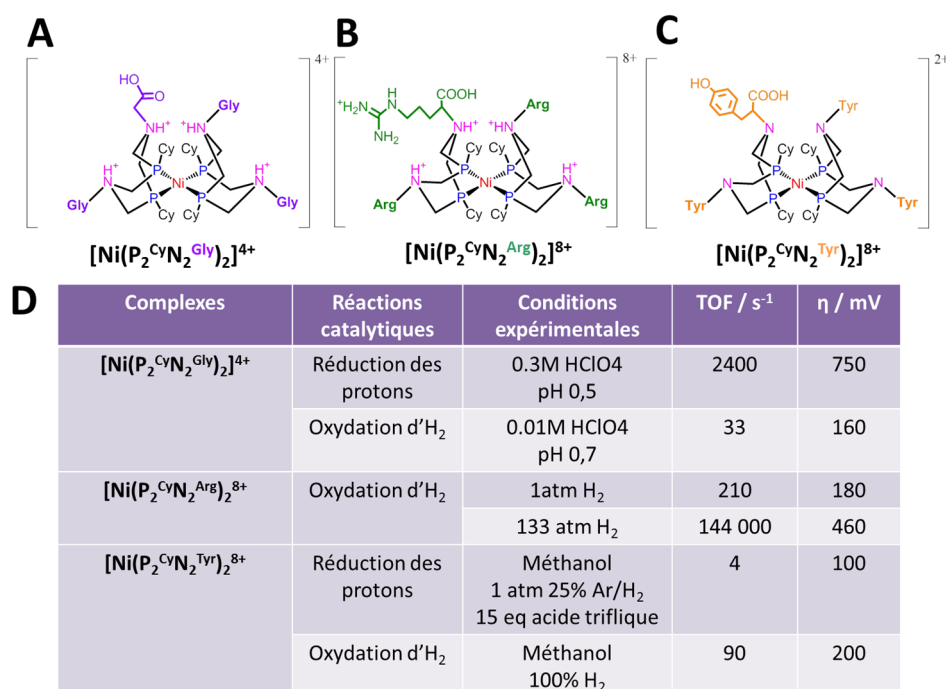


Figure II-19 : (A à C) Structure de différents complexes de nickel bis-diphosphines contenant un acide aminé dans la sphère de coordination externe. (D) Performances en catalyse d'activation et de production d'H₂.

II.6 CONCLUSION

Dans cette partie, nous avons détaillé les différents types d'hydrogénases et leurs mécanismes catalytiques. Les complexes bio-inspirés de ces dernières, dont la plupart réduisent les protons, ont été mis en avant. Toutefois, ce sont les catalyseurs de DuBois qui nous ont particulièrement intéressés dans ce travail de thèse. En effet, leurs propriétés catalytiques modulables, surtensions faibles et performances importantes en font de très bons candidats pour leur intégration dans une PEMFC. Parmi eux, les complexes de nickel bis-diphosphine décrit récemment par Wendy Shaw, sont parmi les catalyseurs d'oxydation d' H_2 les plus performants. L'intégration d'acides aminés dans la sphère de coordination externe augmente considérablement l'effet de relais de protons, déjà présents sur les catalyseurs de premières générations. D'autre part, la solubilité en solvants aqueux et stabilité à différents pH, les rapprochent un peu plus des performances des hydrogénases. Le chapitre 2 du manuscrit détaillera notamment l'intégration du complexe $[Ni(P_2^{Cy}N_2^{Arg})]^{8+}$ dans une PEMFC.

Après s'être intéressé au dihydrogène, combustible de l'anode, et aux différents types de catalyseurs qui le réduisent ou l'oxydent, le dioxygène est présenté de la même façon dans la section III. Oxydant de la cathode, il est réduit en eau par un mécanisme à $4H^+/4e^-$. Le remplacement du platine à la cathode est un enjeu majeur, puisqu'une grande partie du coût du stack est dépendant de la quantité de nanoparticules de platine, quatre fois plus importante à l'anode qu'à la cathode. Par ailleurs, la formation de peroxyde d'hydrogène au cours de l'ORR, peut diminuer considérablement les performances de la cathode. Encore une fois, la nature n'a pas fait les choses à moitié, puisque de nombreuses enzymes sont capables de réduire l'oxygène en eau ou en peroxyde d'hydrogène.

III. DES ENZYMES AUX CATALYSEURS BIO-INSPIRES POUR LA REDUCTION DU DIOXYGENE

III.1 INTRODUCTION

Le cuivre est un élément impliqué dans de nombreux processus biologiques engageant des transferts d'électrons, l'activation d'O₂ et sa réduction,...¹⁰⁵ Il est important de distinguer les enzymes à cuivre selon leurs propriétés catalytiques vis-à-vis de l'oxygène. En effet, elles peuvent être impliquées dans :

- L'activation réversible de l'oxygène (hémocyanine) ;
- La réduction de l'oxygène à deux électrons en H₂O₂, couplée à l'oxydation de substrats (amine oxydase, galactose oxydase et catéchol oxydase)
- L'activation de l'oxygène pour l'hydroxylation (dopamine β-hydroxylase, polyphénol oxydase)
- La réduction de l'oxygène à 4 électrons en H₂O couplée à l'oxydation de substrats (laccases, bilirubine oxydases) ou à la production d'ATP (cytochrome c oxydase).

En condition acide, la réduction du dioxygène se déroule suivant deux mécanismes : (1) à 2 protons et 2 électrons pour former du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ; (2) à 4 protons et 4 électrons pour former de l'eau. Ces diverses réactions rédox sont décrites dans la Figure III-1.

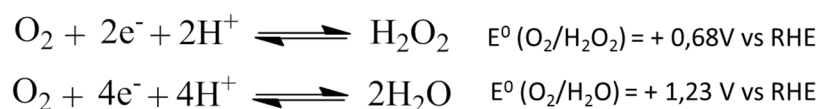


Figure III-1 : Equations rédox pour la formation du peroxyde d'hydrogène et de l'eau à partir de l'oxygène. Les valeurs des potentiels thermodynamiques d'oxydo-réductions associées sont données

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux enzymes à cuivres actives vis à vis de l'ORR. Ces dernières varient en fonction du nombre d'atomes de cuivre présents dans le site catalytique. Enfin, nous décrirons les modèles moléculaires inspirés de ces catalyseurs biologiques.

III.2 ACTIVATION DU DIOXYGENE PAR LES ENZYMES A CUIVRE

III.2.A LES POLYPHENOLS OXYDASES

Les polyphénols oxydases (PPOs), impliqués dans la biosynthèse de mélanine, sont divisés en deux catégories les tyrosinases (Ty) ou monophénol monoxygénases (EC 1.14.18.1) et les catéchol oxydases (EC 1.10.3.1). Elles activent l'oxygène pour

produire des quinones chez une variété d'organismes (plantes, champignons, anthropodes, animaux...). Le site actif est composé de deux centres cuivre magnétiquement couplés, appelé site T3 dont le potentiel d'oxydoréduction est de + 0,36 V vs NHE.¹⁰⁶ Les acides aminés entourant les centres métalliques varient en fonction du type de tyrosinase, mais sont majoritairement des résidues histidines. La tyrosinase catalyse la conversion de la L-tyrosine en L-DOPA ($k_{cat} = 10s^{-1}$ et $K_m = 300 \mu M$)¹⁰⁷, puis cette dernière est oxydée en o-L-DOPAquinone ($k_{cat} = 150 s^{-1}$, $K_m = 450 \mu M$)¹⁰⁸⁻¹¹⁰ (Figure III-2A).

Au cours de la catalyse, trois états de l'enzyme ont été caractérisés : deoxy ($[Cu^I_2]^{2+}$), oxy ($[Cu^{II}_2O_2]^{2+}$) et met ($[Cu^{II}_2OH]^{3+}$). Le cycle catalytique fait appel à deux voies (Figure III-2B) : (1) une activité diphénolase, dans laquelle deux ortho-diphénols sont transformés successivement en ortho-quinone ; (2) une activité monophénolase qui transforme un seul diphénol en ortho-quinone. Les catéchol oxydases catalysent uniquement cette dernière étape.

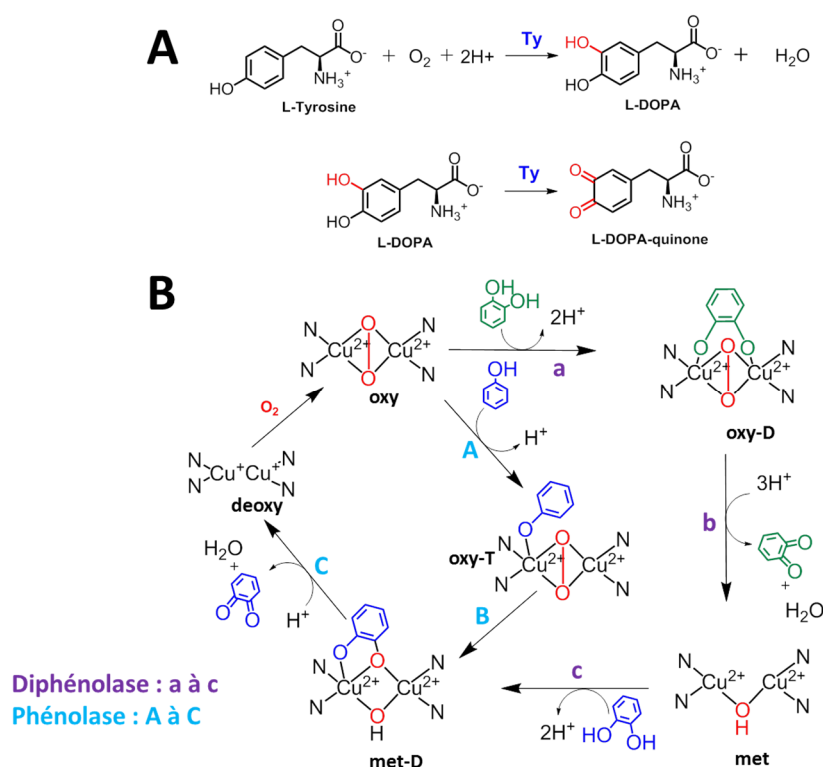


Figure III-2 : (A) Transformation catalytique de la L-Tyrosine en L-DOPA-quinone par la Ty. (B) Mécanisme catalytique de la PPO pour les activités phénolase et diphénolase. Adapté de ¹⁰⁵

L'activité diphénolase (étape a à c) fait appel à deux molécules de substrat ortho-diphénol et utilise un dioxygène par cycle. Après l'étape d'activation de l'oxygène pour conduire à la forme *oxy*, dans laquelle O₂ est pontant entre les deux Cu(II), une première molécule de substrat se coordonne au cuivre pour former l'état *oxy-D*. S'ensuit la libération d'une ortho-quinone et d'une molécule d'eau pour conduire à l'état *met* dans lequel les deux cuivres sont pontés par un ligand hydroxy. Enfin, un dernier o-diphénol se fixe pour donner l'état *met-D*, dont la libération d'une ortho-quinone et d'une molécule d'eau permet de régénérer l'état *deoxy*. L'activité phénolase

se déroule en 3 étapes (A à C) pour libérer une seule molécule d'ortho-quinone et une molécule d'eau.

Ainsi, l'oxygène se lie à l'état *deoxy-Ty* avec une constante de dissociation comprise entre 16,5 et 46,6 μM ^{111,112} et une vitesse de fixation de l'O₂ d'environ 20 $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.^{106,111}.

III.2.B LA GALACTOSE OXYDASE

La galactose oxydase (EC 1.1.3.9) est une protéine monomérique de 68 kDa divisée en trois domaines distincts. Son site actif, situé à la surface du second domaine, est composé d'un centre cuivre (II) mononucléaire entouré par 3 histidines et une tyrosine selon une géométrie pyramide à base carrée (Figure III-3).¹¹³ Cette enzyme catalyse l'oxydation stéréospécifique des alcools primaires en aldéhydes couplée à la réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. Le potentiel rédox du couple (Cu^{II}/Cu^I) de l'enzyme est de + 0.45V vs NHE.¹¹⁴

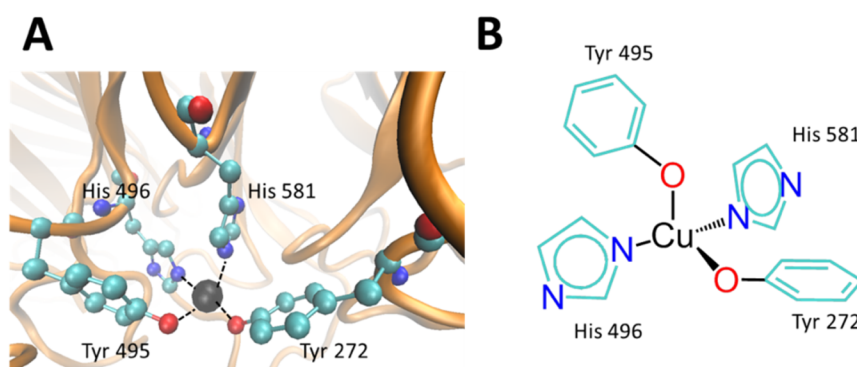


Figure III-3 : (A) Site actif de la galactose oxydase à la surface du domaine 2. (PDB : 1GOG) L'atome de cuivre est représenté en noir, les oxygènes sont en rouge, les azotes en bleu et les carbones en cyan. (B) Structure chimique du site actif : complexe de cuivre (II) mononucléaire en géométrie pyramide à base carrée.

Le mécanisme catalytique implique trois états d'oxydation de l'enzyme ayant des signatures spectroscopiques distinctes : la forme oxydée AGO, la forme réduite RGO et la forme intermédiaire inactive IAGO. Ainsi, la formation d'un radical tyrosyle est couplée à la réduction du Cu(II) en Cu(I) pour libérer un aldéhyde et un peroxyde d'hydrogène. La catalyse consiste en deux étapes de réduction et d'oxydation séparées suivant un mécanisme ping-pong (Figure III-4). L'enzyme passe d'une forme oxydée (AGO) à réduite (RGO) suite à l'oxydation du substrat (alcool) en produit (aldéhyde). La constante cinétique k_{red} varie fortement en fonction du type de substrat (0,8 à $2,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).^{105,113,11} La régénération de la forme oxydée de l'enzyme est couplée à la réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène avec une constante cinétique k_{ox} ($10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). De plus, la constante de Michaelis-Menten est de 82 mM pour le substrat D-Galactose saturé en O₂.

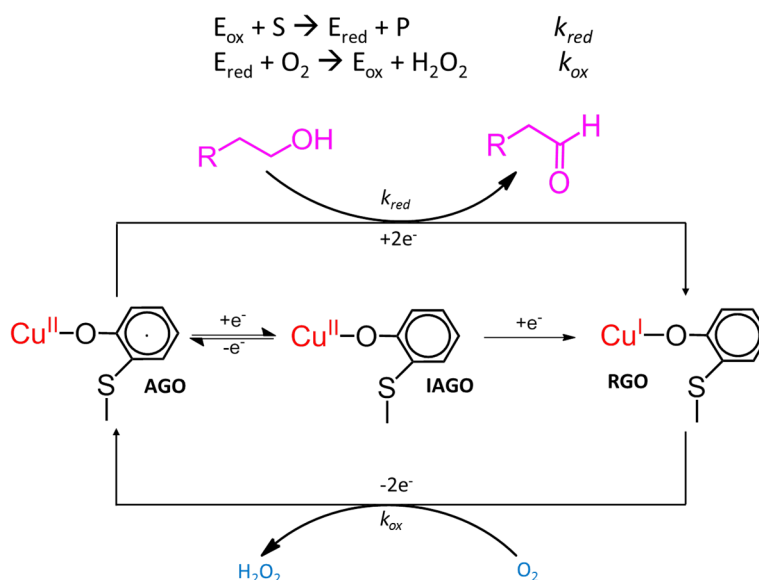


Figure III-4 : Mécanisme catalytique ping-pong de la galactose oxydase.

III.3 REDUCTION ENZYMATIQUE DE L'OXYGENE

III.3.A LES OXYDASES A CENTRE CUIVRE MULTIPLES (MCOs)

Les MCOs constituent une large et diverse famille d'enzymes dans laquelle l'oxydation du substrat est couplée à la réduction de l'oxygène par un mécanisme à $4H^+/4e^-$ pour former deux molécules d'eau. La catalyse a lieu au sein du site actif, plus ou moins conservé chez toutes les MCOs, et composé de quatre atomes de cuivre.

Le Tableau III-1 présente une liste non exhaustive de différents types de MCOs. Ce sont en particulier les laccases et les bilirubines oxydases, qui sont les plus étudiées en tant que biocathodes enzymatiques, en raison de leur haut potentiel de réduction d' O_2 . (voir IV.4.C).

MCOs	Substrats	Fonctions	Espèces
Laccase	Phénols	Biosynthèse de la lignine,...	Plantes, champignons,...
Ascorbate oxydase	Ascorbate	Défense des plantes, croissance	<i>Zucchini</i>
CueO	Cu^+	Homéostasie du cuivre	<i>Escherichia Coli</i>
Bilirubine oxydase	Bilirubine	Dégradation de la lignine	<i>Myrothecium verrucaria</i> ,...

Tableau III-1 : Liste non exhaustive des MCOs présentes sur la planète.¹¹⁵

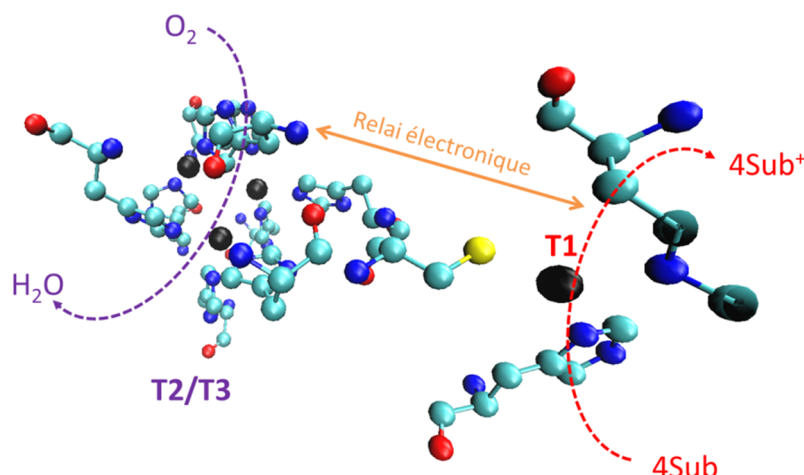
III.3.A (i) *Le site actif commun à toutes les MCOs*

Figure III-5 : Site actif T1 et T2/T3 des MCOs issu de la Laccase de *Trametes versicolor* (PDB 1KYA)¹¹⁶

La première structure cristalline d'une MCO a été publiée en 1989.¹¹⁷ Ainsi, le site actif est composé de quatre atomes de cuivre divisé en 2 sites. Le centre T1 est coordonné par deux résidus histidines et une cystéine, responsable de la couleur bleue de ces enzymes avec une bande d'adsorption autour de 614 nm.¹⁰⁵ Situé à une distance d'environ 5 à 8 Å de la surface protéique, ce site de fixation du substrat est enfoui et accessible pour les composés hydrophobes. Le cluster trinucléaire T2/T3 est coordonné par 8 ligands histidines soit 3 pour chaque cuivre T3 et 2 pour le cuivre T2. De plus, une molécule d'eau est également liée au T2 (Figure III-5).

Ainsi, le cuivre mononucléaire T1 est le lieu d'oxydation des substrats polyphénols. Le cluster trinucléaire T2/T3 (TNC pour « trinuclear cluster » en anglais) est responsable de la réduction de l'oxygène en eau. Les électrons générés suite l'oxydation du substrat au site T1 sont transférés vers le T2/T3 via un chemin électronique composé d'acides aminés histidine-cystéine-histidine d'une distance de 12 à 14 Å.¹¹⁸

III.3.A (ii) *Mécanisme de réduction de l'oxygène par les MCOs*

Le mécanisme de réduction de l'oxygène (Figure III-6) a été déterminé par des études cinétiques, spectroscopiques et de mutagénèses. L'état réduit de l'enzyme, dans lequel les quatre atomes de cuivre sont sous la forme Cu^{I} , réagissent avec l'oxygène pour former l'intermédiaire peroxyde. Le groupement carboxylate de l'aspartate 94,¹¹⁹ présent dans la seconde sphère de coordination du site actif des laccases, diminuerait le potentiel de réduction des sites T2 et T3, leur permettant de donner deux électrons à l'oxygène. S'ensuit la formation de l'intermédiaire natif par la rupture de la liaison O-O, la protonation du carboxylate et l'oxydation des atomes de cuivre en Cu^{II} . Une étape rapide de réduction pour donner deux molécules d'eau permet de régénérer l'état réduit. En absence d'un excès de réductant, IN se dénature lentement en cédant une molécule d'eau. L'état de repos, qui comporte un ligand pontant hydroxyde sur le site

T3, se forme alors. Finalement, une étape de réduction lente permet de régénérer l'état réduit Cu^I.

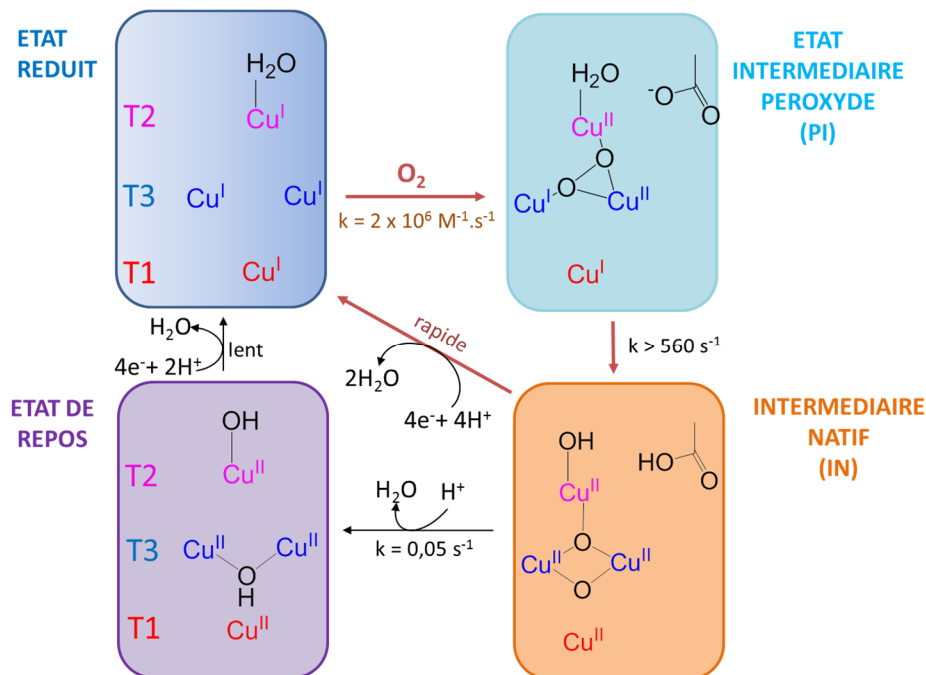


Figure III-6 : Mécanisme de réduction d'O₂ par les MCOs. Les flèches rouges indiquent le cycle catalytique. Les flèches noires montrent la réduction de l'état de repos et la dénaturation de l'état natif intermédiaire. Adapté de¹²⁰

III.3.A (iii) Les laccases

Les laccases (EC 1.10.3.2), famille des MCOs les plus abondantes, existent chez de nombreux organismes vivants. Les laccases fongiques sont les plus décrites avec plus d'une centaine d'enzymes purifiées et autant de structures cristallines.¹²¹ Elles ont la capacité d'oxyder un grand nombre de substrats phénoliques et sont utilisées dans diverses applications comme la dégradation de micropolluants¹²² ou de la lignine.¹²³ Cependant, c'est son utilisation en tant que cathode enzymatique pour la réduction de l'oxygène qui a été développée au laboratoire depuis plusieurs années.¹²⁴

. Pour la majorité d'entre elles, le potentiel du cuivre T1 varie entre 430 et 780 mV vs NHE. Cette valeur fluctue en fonction du type d'acides aminés proche du cuivre T1 : les résidus hydrophobes et encombrants auront tendance à augmenter le potentiel du T1. La laccase de *Trametes versicolor* (*Tv* Lac), enzyme de 60 kDa cristallisée au début des années 2000,^{116,125} est l'une des plus efficace ($E^0(T1) = 780\text{mV}$). Son site T1 est tétracoordonné par deux histidines, une cystéine, une phénylalanine.¹²⁶ Le potentiel du cluster T2/T3, plus difficile à mesurer à cause de son enfouissement plus important dans la protéine, a été estimé à un potentiel d'environ 400 mV pour laccase de *Rhus vernicifera*^{127,128}, dont le potentiel du T1 est de 430 mV.

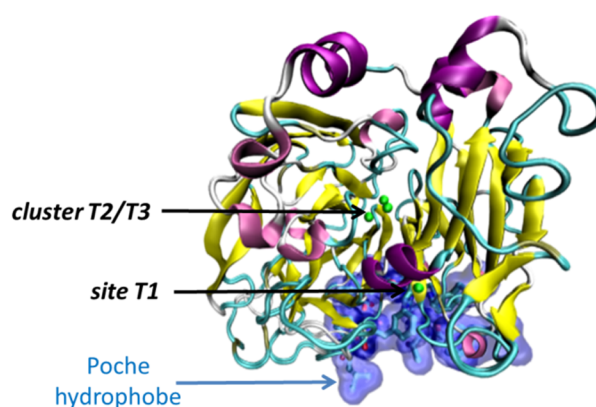


Figure III-7 : Schéma de la Laccase de *Trametes versicolor* avec la poche hydrophobe près du T1.

La poche hydrophobe (Figure III-7), située près du cuivre T1, permet à la protéine d'oxyder une large gamme de substrats. Son point isoélectrique acide lui confère une surface chargée négativement. Même si ses performances catalytiques varient peu entre pH 3 et 5, elle est inactivée réversiblement à pH neutre et inhibée en présence d'ions chlorures.¹²⁹

III.3.A (iv) *Les bilirubines oxydase*

Les bilirubines oxydases (BODs) (EC 1.3.3.5) oxydent la bilirubine en biliverdine en utilisant l'oxygène en tant qu'accepteur d'électrons. Elles sont également capables d'oxyder les substrats phénoliques. La première structure cristalline de la BOD de *Myrothecium verrucaria* (*Mv* BOD), publiée en 2010¹³⁰, a démontré des similarités conformationnelles aux laccases fongiques (Figure III-8). Elles se différencient de ces dernières par leur tolérance aux ions chlorures, leur capacité à fonctionner à pH neutre et à réduire ainsi l'oxygène dans des conditions physiologiques. De plus, le potentiel du cuivre T1 de *Mv*BOD est de 490 mV vs NHE, soit 300 mV plus faibles que *Tv* Lac.¹³¹

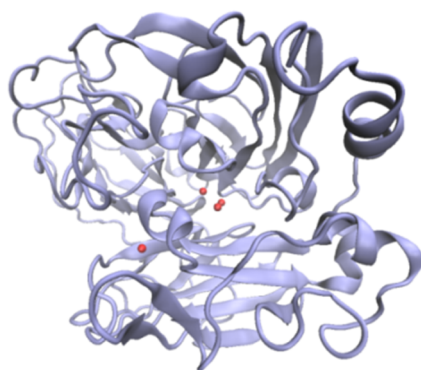
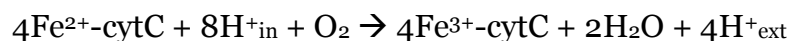


Figure III-8 : Structure protéique de la *Mv* BOD (PDB : 3ABG). Les atomes de cuivre apparaissent en rouge.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à *Mv* BOD¹³², l'une des plus étudiées, essentiellement due à sa disponibilité commerciale. Avec son poids moléculaire de 66 kDa et son pH d'activité optimum de 6,5, elle transforme l'ABTS en ABTS^{•+} avec un K_M de 250 μ M et un k_{cat} de 115 s^{-1} .^{130,133}

III.3.B LES CYTOCHROME C OXYDASES

Les cytochromes c oxydases, ou complexe IV de la chaîne respiratoire, sont localisées, chez les eucaryotes, dans les membranes internes mitochondriales. Elles catalysent la réduction complète de l'oxygène en eau couplée, couplée à l'oxydation du centre Fe(II) héminique du cytochrome c selon l'équation bilan suivante :



La fonction principale du complexe IV est de pomper les protons vers l'extérieur de la mitochondrie, afin de créer un gradient de protons qui servira à faire fonctionner la machinerie enzymatique ATP synthase et produire de l'ATP.¹⁰⁵

Le site actif de liaison de l'oxygène est composé d'un complexe bimétallique fer-cuivre. Le cuivre, appelé Cu_B, et coordonné à 3 histidines, est positionné à une distance d'environ 5 Å de l'hème, coordonné axialement à une histidine.

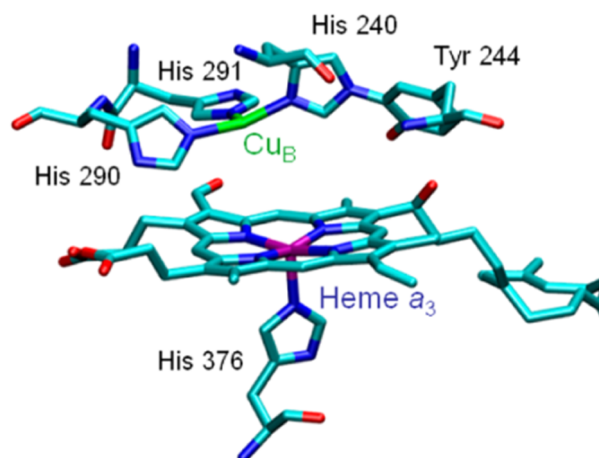


Figure III-9 : Structure du site de liaison à l'oxygène dans la cytochrome c oxydase bovine (PDB : 1V55)¹³⁴

III.4 LES COMPLEXES BIO-INSPIRES DES ENZYMES A CUIVRES

III.4.A LES COMPLEXES BIO-INSPIRES DES CYTOCHROME C OXYDASES

III.4.A (i) *Les modèles biomimétiques : complexes hème-Cu*

Divers modèles structuraux de la cytochrome c oxydase ont été synthétisés afin de comprendre le mécanisme catalytique et caractériser les intermédiaires réactionnels non observés.

Karlin a intensivement étudié l'activation de l'oxygène par des centres cuivre-hémiques grâce à la variation de la sphère de coordination autour du cuivre et du fer depuis le début des années 90.^{135,136} En effet, l'addition du dioxygène dans un mélange équimolaire de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TMPA})]^+$ et de dérivé hémique $[(\text{F}_8)\text{Fe}^{\text{II}}]$ conduit à la formation d'un dérivé peroxyde pontant $[(\text{F}_8)\text{Fe}^{\text{III}}(\text{O}_2^{2-})\text{-Cu}^{\text{II}}(\text{TMPA})]$ à -40°C , identifié par spectroscopie RMN et Mössbauer (Figure III-10).¹³⁷ Récemment, une nouvelle méthode de génération d'adduits peroxydes a été reportée afin de former un complexe $\eta^2:\eta^2$ peroxyde hème-cuivre.¹³⁸

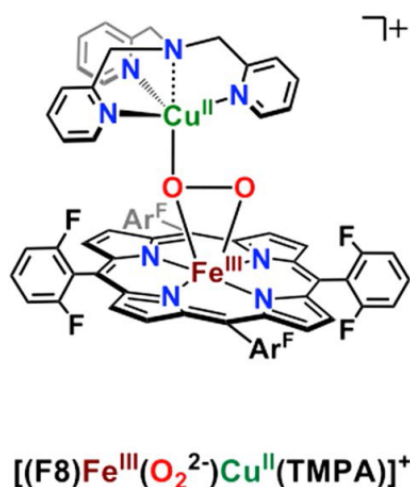


Figure III-10 : Dérivé peroxyde pontant hème-cuivre proposé par Karlin en 2001. ¹³⁷

Collman a également travaillé sur cette thématique en proposant en 2003 un complexe hétérodinucléaire avec un état d'oxydation différent : $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Cu}^{\text{I}}$, qui forme un dérivé η^1 -supéroxyde en présence d'oxygène.

III.4.A (ii) *Les macrocycles à base de porphyrines de fer et de cobalt*

En 1964, Jasinski a découvert que les complexes de ligands macrocycliques tétra-azotés (MeN_4) de type cobalt phtalocyanine, absorbés sur une électrode de carbone, catalysent l'ORR.¹³⁹ Plusieurs motifs de porphyrines sont alors envisagés : les tétra-phénylporphyrines (TPP), tétra-benzodiazoporphine (TBDP) ou encore les phtalocyanines (PC) avec divers centres métalliques Fe, Co, Ni ou Cu.¹⁴⁰ La réactivité évolue en fonction du type de support, du métal, du type d'immobilisation et du pH de l'électrolyte. Très vite, les architectures ont évolué allant vers la synthèse de porphyrines dinucléaires pour influencer le potentiel de catalyse du métal réduit.^{141,142}

L'un des problèmes majeurs de ces catalyseurs est leur désactivation en conditions de cyclages répétés ou encore leur dénaturation en présence de peroxyde d'hydrogène, produit intermédiaire formé au cours de l'ORR. A partir de 1989, une nouvelle voie de synthèse, dans laquelle le catalyseur n'était pas un complexe macrocyclique, a été proposée.¹⁴³ La pyrolyse des porphyrines sur support a permis d'augmenter la stabilité et les propriétés catalytiques. Ainsi, les catalyseurs dopés à l'azote sur support M-N/C se sont imposées comme potentielle nouvelle alternative au platine dans les PEMFC (voir I.4.B)

Aujourd'hui, la recherche sur les porphyrines métalliques continue¹⁴⁴ avec l'apparition de nouveaux matériaux d'électrodes comme les NTCs¹⁴⁵ et de nouvelles techniques d'immobilisation.^{146,147} Par ailleurs, ces dernières sont également actives pour la réduction du CO_2 ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, autre molécule avec une forte valeur ajoutée pour la diminution des GES.

III.4.B LES COMPLEXES BIO-INSPIRES DES ENZYMES A CUIVRE

III.4.B (i) *Introduction*

La plupart des modèles bio-inspirés publiés depuis les années 80 ont pour vocation de comprendre les mécanismes de fixation de l'oxygène et de rupture de liaisons O-O qui se succèdent dans les différentes enzymes à cuivre (Figure III-11A et B).¹⁵¹ Très peu d'entre eux catalysent la réduction de l'oxygène en solution. Ainsi, seulement quelques exemples de mimes structuraux, sélectionnés en fonction de ceux étudiés dans le chapitre 4, seront présentés dans cette partie. L'ORR catalysée par des complexes de cuivre est plus amplement détaillée dans la partie IV.5.B.

Plusieurs intermédiaires Cu_nO_2 peuvent être formés en fonction du nombre d'atomes de cuivre et du mode de fixation de l'oxygène, comme le montre la Figure III-11A et B. Ces complexes sont intensivement décrits dans deux revues de Tolman¹⁵² et Karlin.¹⁵¹ La première structure cristallographique d'un adduit Cu_2O_2 , trans μ -1,2 peroxyde (Figure III-11C), a été publiée par Karlin en 1988.¹⁵³

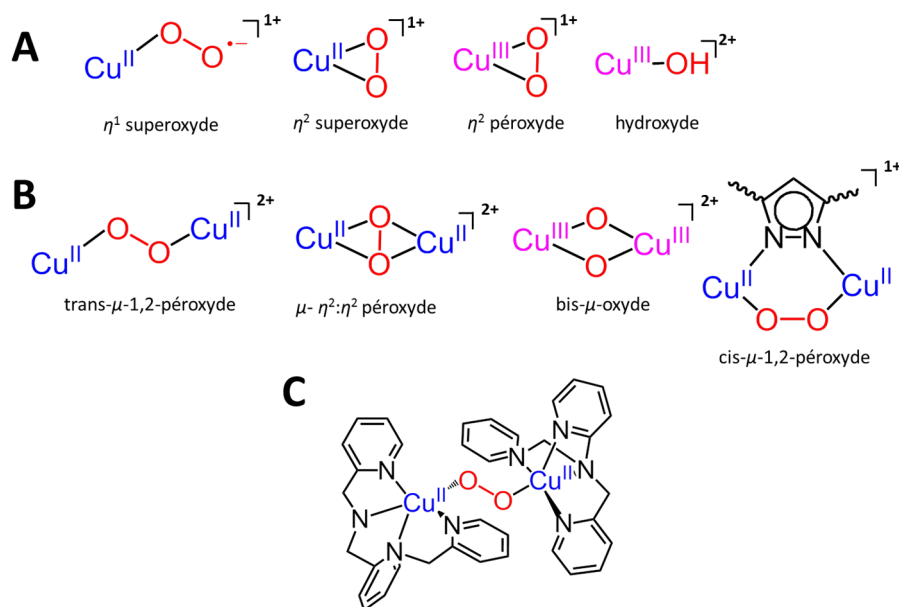


Figure III-11 : (A) Adduit Cu-O₂ pour les complexes de cuivre mononucléaire. (B) Adduit Cu₂O₂ pour les complexes de cuivre di-nucléaire. Adapté de ¹⁵¹ (C) Premier complexe Cu₂O₂ cristallisé par Karlin en 1988.

III.4.B (ii) Modèles de la galactose oxydase

Les modèles du site actif de la galactose oxydase sont des complexes de cuivre mononucléaires possédant des ligands phénoxy.¹⁵⁴ Ils ont permis de donner des informations pour comprendre le cycle catalytique telles que les propriétés physicochimiques du radical phénoxy ou encore la catalyse d'oxydation des alcools par l'intermédiaire d'un Cu(II)-phénoxy.¹⁵⁵

Le premier modèle de l'état de repos Cu(II)-phénolate de l'enzyme a été proposé par Whittaker en 1993.¹⁵⁶ En 2002, Thomas *et al.*^{157,158} propose, avec le complexe [Cu^{II}(LH)(OAc)], l'un des premiers modèles structural et fonctionnel. Le cuivre (II) adopte une géométrie pyramide à base carrée et est coordonné par un ligand tripode qui comporte deux phénols (Figure III-12). L'oxydation de l'alcool benzylique est catalysée par [Cu^{II}(LH)(OAc)] en présence d'O₂ et d'une quantité catalytique de KOH. Un TON de 220 est obtenu après 2 jours.

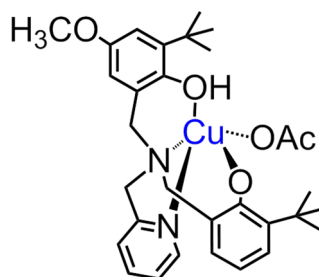


Figure III-12 : Complexe [Cu^{II}(LH)(OAc)] proposé par Thomas *et al.* en 2002.²⁰⁹

Dans ce travail de thèse, ce complexe nous a servi de base pour proposer un modèle bio-inspiré immobilisé qui catalyse l'ORR.

III.4.B (iii) *Modèles de la tyrosinase*

Le site actif de la tyrosinase contient deux cuivres Cu_A et Cu_B coordonnés par six histidines. Avec la volonté de mimer le site actif et l'activité catalytique, de nombreuses molécules ont été synthétisées depuis les 30 dernières années.¹⁵⁹ Ils peuvent être classés en deux catégories : (1) les systèmes qui hydrolysent un groupement aromatique (phénol) présent sur les ligands ;^{160,161} (2) les molécules qui oxydent un substrat externe.¹⁶²

En 2002, Belle *et al.*¹⁶³ proposent la synthèse de complexes Cu(II) di-nucléaires μ -hydroxo et bis-aqua dont l'interconversion est dépendante du pH. Seul le complexe μ -OH décrit dans la Figure III-13 possède une activité pour l'oxydation des catéchols en présence d' O_2 dans l'acétonitrile. Un donneur d'électrons sur le groupement R augmente l'activité catalytique du complexe.

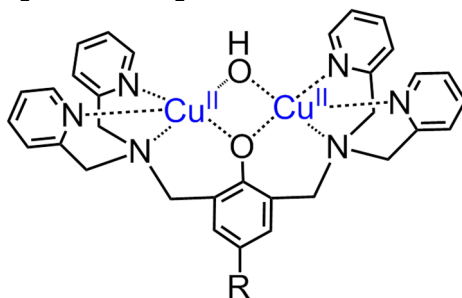
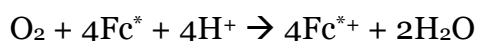


Figure III-13 : Complexe dinucléaire μ -OH proposé par Belle *et al.* en 2002.¹⁶³

III.4.B (iv) *Modèles des MCOs*

Le premier cluster $[Cu_3O_2]^{3+}$ a été proposé par Solomon en 1996.¹⁶⁴ Par ailleurs, de nombreux complexes de cuivre II trinuéaires ont été synthétisés et utilisés en tant que catalyseurs pour l'oxydation des hydrocarbures (conversion du méthane en méthanol).¹⁶⁵ La plupart des modèles de laccase synthétisés essaient de mimer les intermédiaires peroxy et natif afin d'aller plus loin dans l'interprétation du mécanisme catalytique de réduction de l'oxygène en eau.¹⁶⁶

Peu d'exemples de modèles fonctionnels ont été décrits. Ils sont étudiés en solvant organique en présence d'un donneur d'électron et d'un acide fort. En 2012, Fukuzumi¹⁶⁷ propose un complexe dinucléaire $[Cu^{II}_2(LN_3)(H_2O)_2](ClO_4)_2$ qui catalyse la réduction de l'oxygène par un mécanisme à $4H^+/4e^-$ dans une solution d'acétone saturée en O_2 en présence de décaméthylferrocène (Fc^*) et de TFA selon la réaction suivante :



La réduction du Cu^{II} en Cu^I couplée à l'oxydation de Fc^* conduit à la formation d'un complexe μ - $\eta^2:\eta^2$ peroxyde en présence d' O_2 . Une nouvelle oxydation de Fc^* conduit

à la forme d'un intermédiaire bis- μ -oxo, dont la libération de deux molécules d'eau régénère le complexe de dinucléaire de départ (Figure III-14).

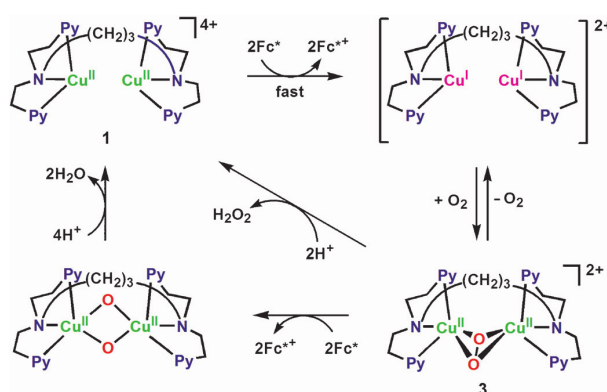


Figure III-14 : Mécanisme catalytique de réduction de l'oxygène en eau par le complexe de cuivre dinucléaire synthétisé par Fukuzumi en 2012. Reproduit de¹⁶⁷ avec la permission de John Wiley and Sons (numéro de licence : 4097671158156)

III.5 CONCLUSION

Dans cette section, nous avons mis en avant les différents types d'enzymes qui réduisent ou activent le dioxygène. Les MCOs, de la famille des laccases ou bilirubine oxydases, sont les plus étudiées car elles effectuent l'ORR à un potentiel élevé d'environ 1,1V vs RHE, soit une surtension de 150 mV. Les différents mécanismes catalytiques proposés, sont issus à la fois d'études cristallographiques et spectroscopiques, mais également de la synthèse de complexes de cuivre modèles. De ce fait, la catalyse homogène en solution est peu référencée. Les mimes fonctionnels des enzymes à cuivre sont pour la plupart immobilisés sur électrodes et sont présentés dans la suite de ce chapitre.

Avant de traiter de catalyse hétérogène, il convient de définir les techniques de fonctionnalisation de surface pour immobiliser des catalyseurs biologiques et/ou bio-inspirés. Divers supports d'électrodes sont utilisés et de ces derniers découlent des méthodes de greffage adaptées. Cette thématique est exposée en détail dans la partie IV. de ce chapitre.

IV. LES TECHNIQUES DE FONCTIONNALISATION DE SURFACE POUR L'IMMOBILISATION DE CATALYSEURS SUR ELECTRODES

IV.1 INTRODUCTION GENERALE

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'immobilisation de catalyseurs enzymatiques et bio-inspirés sur électrodes, afin de réaliser de la catalyse moléculaire supportée. Dans ce mécanisme, analogue à la catalyse hétérogène, les transferts d'électrons transitent du catalyseur à l'électrode ou inversement. L'entité catalytique, ainsi immobilisée, est utilisée en tant qu'anode ou cathode, si elle catalyse une oxydation ou réduction rédox, respectivement.

Un panel de matériaux et de méthodes de fonctionnalisation existe. Nous avons choisi de travailler avec les NTCs, qui présentent des propriétés physico-chimiques bien adaptées au greffage d'enzymes et de catalyseurs bio-inspirés. Les différentes caractéristiques et techniques de fonctionnalisation des NTCs seront détaillées ici.

Contrairement aux catalyseurs moléculaires, le site catalytique d'une enzyme est enfoui au sein de sa structure protéique. Diverses méthodes de fonctionnalisation ont été envisagées pour tirer profit de leurs propriétés catalytiques. De plus, la connexion enzymatique à la surface d'une électrode fait appel à deux stratégies principales, appelées transfert électronique directe (TED) ou médié (TEM). Après avoir défini ces deux termes, nous citerons des exemples non exhaustifs de bioanodes enzymatiques à base d'hydrogénases et de biocathodes enzymatiques composées de galactose oxydase, polyphénol oxydase, bilirubine oxydase et laccase.

Enfin, l'immobilisation de catalyseurs bio-inspirés sur électrodes sera mise en avant. Nous exposerons les catalyseurs de DuBois immobilisés sur électrodes de carbone et NTCs pour l'HOR et l'HER, puis donnerons des exemples de quelques complexes de cuivres absorbés catalysant la réduction de l'oxygène en eau.

IV.2 LES NANOTUBES DE CARBONE

IV.2.A PRESENTATION

Les nanotubes ont été observés par Iijima en 1991, au cours d'une expérience d'arc électrique pendant laquelle il souhaitait initialement former du fullerène.¹⁶⁸ En fonction du nombre de feuillets de graphène enroulés les uns sur les autres, les NTCs existent sous la forme mono-feuillet SWCNT (diamètre de 0,4 à 3 nm) ou multi-feuillet MWCNT (diamètre de 1 à 100 nm) (Figure IV-1).¹⁶⁹ Ils sont synthétisés par diverses techniques : l'arc électrique, l'ablation laser, ou encore la CVD (« chemical vapor

deposition » en anglais).¹⁷⁰ Cette dernière, la plus commune, associe un gaz contenant une source de carbone (acétylène, éthylène), un catalyseur (nanoparticules de Ni, Fe, Co) et une température élevée (700-900°C) pour faire croître les nanotubes sur les sites catalytiques du substrat (silicium) de façon aléatoire ou organisée. Cette stratégie crée des films avec une densité plus ou moins importante en fonction de la quantité de catalyseurs et du temps de fabrication. Cette technique coûteuse génère des traces d'impuretés métalliques dans le film.

En fonction de l'orientation de l'axe du tube par rapport aux carbones sp_2 , les propriétés métalliques et semi-conductrices varient en fonction des vecteurs n et m (Figure IV-2A). Ainsi, la conductivité est métallique, si $n=m$, avec une orientation dite « armchair ». On parle de conformation « zig-zag », pour $m=0$, et « chiral » si $n \neq m$ (Figure IV-2B). Si $n-m \neq 3k$, les NTCs sont semi-conducteurs et ont un band-gap E_g inversement proportionnel au diamètre du NTC. Les MWCNTs sont tous métalliques ($n-m = 3k$).

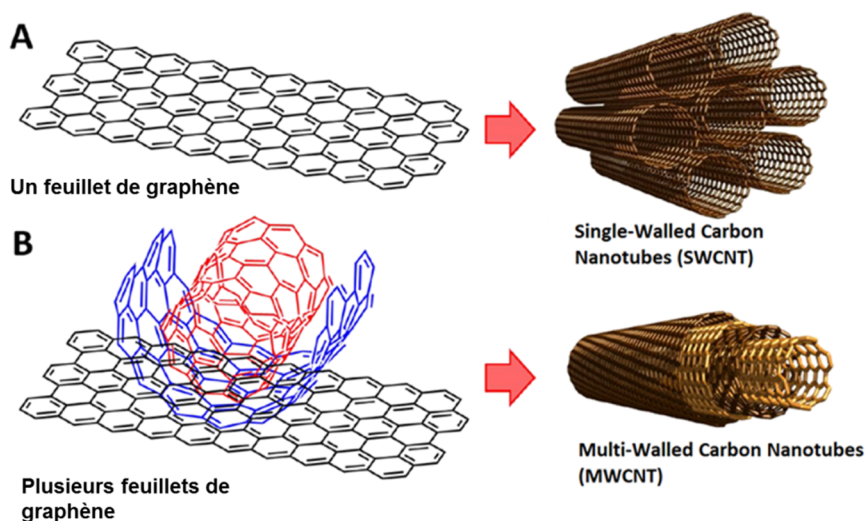


Figure IV-1 : (A) Nanotubes de carbone mono-feuillet (SWCNT). (B) Nanotubes de carbone multifeuillets (MWCNT).

L'hybridation sp_2 des atomes de carbone leur confère des propriétés électroniques remarquables avec une conductivité comprise entre 50 à 600 $S.cm^{-1}$ pour les SWCNTs.¹⁷¹ Par ailleurs, leur stabilité chimique, thermique et mécanique rend possible leur utilisation dans des conditions opératoires variées.

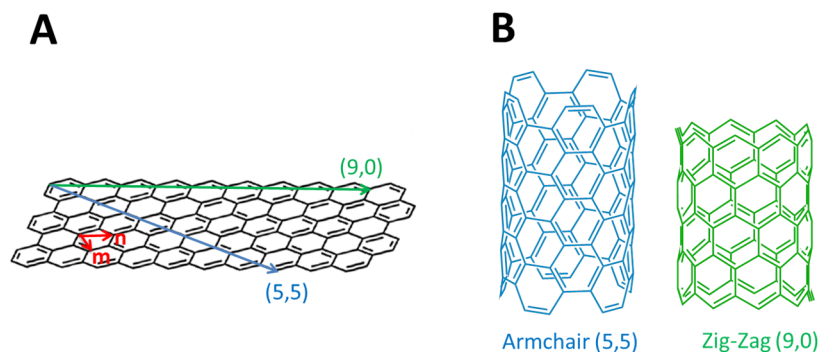


Figure IV-2 : (A) Définition des vecteurs n et m . (B) Différents types de NTCs en fonction des vecteurs (n,m) .

IV.2.B DISPERSION ET DEPOTS A L'ELECTRODE

La solubilité des NTCs en solvant organique et aqueux a longuement été étudiée.¹⁷² Ce sont les forces de Van der Waals entre les tubes qui sont responsables de la faible solubilité de ces nanomatériaux. Leur dispersion sans les dénaturer et diminuer leur conductivité électronique est donc un enjeu important.¹⁷³

L'utilisation de surfactants, l'encapsulation dans un polymère, la dispersion de NTCs fonctionnalisés ou non dans un solvant (aqueux ou organique) sont autant de méthodes pour les disperser. Au laboratoire, les dispersions sont généralement réalisées dans le solvant organique N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) après sonication pendant 30 minutes pour atteindre une densité volumique de l'ordre de 10 mg.mL⁻¹.¹⁷⁴ Une fois la dispersion réalisée, il est important d'évaluer sa stabilité par diverses méthodes de caractérisation telles que la spectroscopie Raman, la microscopie électronique (MEB, TEM). De plus, un simple contrôle visuel permet de voir s'il y a eu ou non formation d'agrégats.

Après avoir dispersé les nanotubes, diverses méthodes de formation de films fins permettent de les déposer :

- *La méthode de Langmuir-Blodgett* : les NTCs sont dispersés en solvant aqueux puis déposés sur le substrat par dépôt couche par couche.¹⁷⁵
- *L'auto-assemblage* : basé sur des interactions entre le substrat et les NTCs venant d'une fonction chimique ou d'une charge différente.¹⁷⁶
- Le substrat est plongé dans la dispersion et les NTCs se déposent sur celui-ci selon des phénomènes de viscosité, au cours du *dip-coating*.¹⁷⁷ Un volume fini est déposé sur le substrat, suivi d'une étape de rotation à grande vitesse (*spin-coating*) ou séchage (*drop-casting*).
- Des *techniques de transfert de film d'un substrat à un autre* par l'utilisation de membranes solubles¹⁷⁸, d'une surface adhésive¹⁷⁹ ou par impression par microcontact¹⁸⁰ peuvent également être utilisées.

IV.2.C LES NANOTUBES DE CARBONE COMME MATERIAUX D'ELECTRODES

Les NTCs sont utilisés en tant que matériaux d'électrodes dans les piles à combustibles, l'électrocatalyse, les batteries Li-ion ou les supercondensateurs.¹⁸¹ Leur grande surface spécifique augmente considérablement la quantité de catalyseurs greffés à la surface. Dans le cas des enzymes rédox, leur surface nanométrique a démontré leur rôle efficace dans le transfert direct d'électrons entre le centre rédox d'un grand nombre d'enzymes et la surface de l'électrode.¹⁸² Ces derniers forment un réseau enchevêtré de tubes d'environ 10 nm de diamètre, avec une surface poreuse (Figure IV-3).

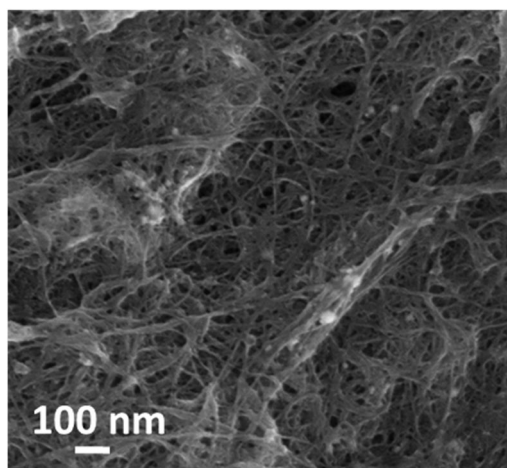


Figure IV-3 : Images de microscopie électronique à balayage d'un réseau enchevêtré de SWCNTs obtenu par « drop-casting ».

IV.2.D LES DIFFERENTES METHODES DE FONCTIONNALISATION SUR NANOTUBES DE CARBONE

Depuis leurs découvertes en 1991, de nombreuses méthodes de fonctionnalisation de la surface des NTCs ont été décrites.¹⁸³ Cela passe essentiellement par des modifications non-covalentes et covalentes. L'un des enjeux est que la fonctionnalisation n'altère pas les propriétés électroniques de NTCs. Leur modification permet notamment d'augmenter la solubilité, faciliter leur manipulation et greffer des catalyseurs à la surface lorsqu'ils sont utilisés en tant que matériaux d'électrodes (voir IV.2.C).

On distingue plusieurs types de fonctionnalisation : (1) les méthodes non-covalentes, qui font appel à des interactions faibles (2) les méthodes covalentes, permettant de greffer une entité fonctionnelle sur les parois externes des NTCs ou bien à leurs extrémités.

IV.2.D (i) *Les méthodes non-covalentes*

Les méthodes non-covalentes regroupent la formation de liaisons hydrogènes, les forces de Van der Waals, les interactions électrostatiques et π - π . Ces techniques forment peu de défauts et préservent le système π -conjugué des NTCs et leurs propriétés électroniques.

1. *L'adsorption*

La nature hydrophobe des nanotubes de carbone en fait de bons candidats pour l'adsorption d'entités par simple interactions hydrophobes. Ceci a notamment été observé pour la streptavidine¹⁸⁴ ou l'ADN.¹⁸⁵

2. Intéraction π - π

L'immobilisation de molécules aromatiques sur des NTCs a été étudiée au début des années 2000.¹⁸⁶ Cela produit une interaction entre les orbitales sp_2 des NTCs et le système π -conjugué du noyau aromatique : on parle alors de « π -stacking ». Cette technique est aujourd'hui la plus utilisée pour greffer des molécules avec des résidus anthracène, pyrène ou porphyrine par exemple (Figure IV-4).

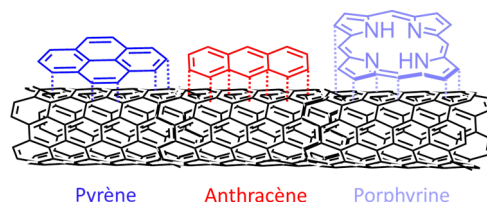


Figure IV-4 : Exemples de composés aromatiques couramment utilisés pour greffer des molécules sur NTCs par interaction π -stacking.

En 2001, une protéine a été immobilisée par couplage peptidique sur des NTCs modifiés avec un groupement pyrene-N-ester-succinimide.¹⁸⁷ Cette technique est encore largement utilisée aujourd'hui pour immobiliser des biomolécules.¹⁸⁸

3. Utilisation de polymères

Les polymères organiques ou inorganiques ont été utilisés pour former des complexes supramoléculaires avec les NTCs afin d'augmenter leur solubilité et explorer de nouvelles propriétés.¹⁸⁹ La technique la plus élégante est l'électropolymérisation de polymères conducteurs à la surface d'un film fin de NTCs¹⁹⁰ dans le but de piéger des catalyseurs.^{191,192} Le principe est le même que celui énoncé pour l'encapsulation d'enzymes (IV.3.C). Ainsi, de nouvelles fonctionnalités peuvent être ajoutées au matériau composite NTC/polymère comme par exemple un groupement chimique pour augmenter l'interaction entre le polymère et la molécule piégée ou bien un médiateur rédox pour améliorer le transfert électronique ou sein de la matrice 3D. Ceci a été décrit avec les hydrogels d'osmium pour piéger et connecter les MCOs (voir IV.4.C).¹⁹³

IV.2.D (ii) *Les méthodes covalentes*

La fonctionnalisation covalente engendre un changement d'hybridation des carbone sp_2 en sp_3 avec rupture du système π -conjugué, ce qui crée des défauts au sein du réseau pouvant altérer les propriétés conductrices et mécaniques des NTCs.¹⁹⁴ La modification peut également avoir lieu au niveau de défauts déjà présents au sein de la matrice, sur les parois externes ou à l'extrémité des nanotubes. Ceci se traduit par la présence de groupements carboxyliques, d'irrégularités heptagonales ou pentagonales dans le feuillet de graphène (initialement hexagonal) ou bien par l'apparition de sites oxygénés après purification.

De nombreuses méthodes covalentes ont été décrites¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ et sont généralement divisées en deux catégories : (1) les modifications directes sur les parois des NTCs ; (2) les modifications chimiques indirectes sur les groupements carboxyliques présents après purification oxydative. Quelques exemples non-exhaustifs sont cités ci-dessous.

1. La purification oxydante

Le traitement oxydant sert initialement à purifier les NTCs afin d'éliminer les particules métalliques formées après synthèse. Diverses conditions oxydantes ont été mise au point : les NTCs sont traités en présence d'acide nitrique¹⁹⁸, acide sulfurique¹⁹⁹, d'un mélange d'acide sulfurique et d'eau oxygénée, ou d'ozone²⁰⁰,... Ainsi, des groupements carboxyliques, esters, hydroxyles peuvent être introduits à la surface et aux extrémités des NTCs (Figure IV-5). Par ailleurs, cette technique permet également de contrôler la taille des NTCs qui peuvent-être coupés, raccourcis ou ouverts en fonction des conditions opératoires

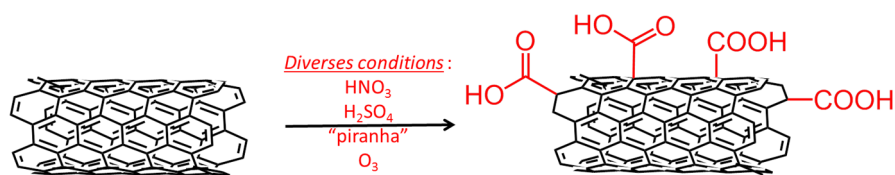


Figure IV-5 : Purification oxydative des NTCs en conditions acides fortes pour former des groupements carboxyliques sur les parois externes et aux extrémités.

2. Modifications chimiques indirectes des groupements carboxyliques

Les différents types de modification chimique de CNT-COOH sont présentés dans laFigure IV-6. La formation d'un groupement carboxamide est produite après activation du -COOH par un chlorure de thionyle (SOCl₂), suivi de la formation de la liaison amine.²⁰¹ Ceci donne accès au greffage de biomolécules par couplage peptidique. Les chlorures d'acyles (R-COCl) formés après traitement par SOCl₂ peuvent réagir avec des fonctions alcools au cours d'une estérification. En 2003, Kim *et al.* insèrent un thiol (-SH) après des étapes de réduction, chlorination et thiolation.²⁰²

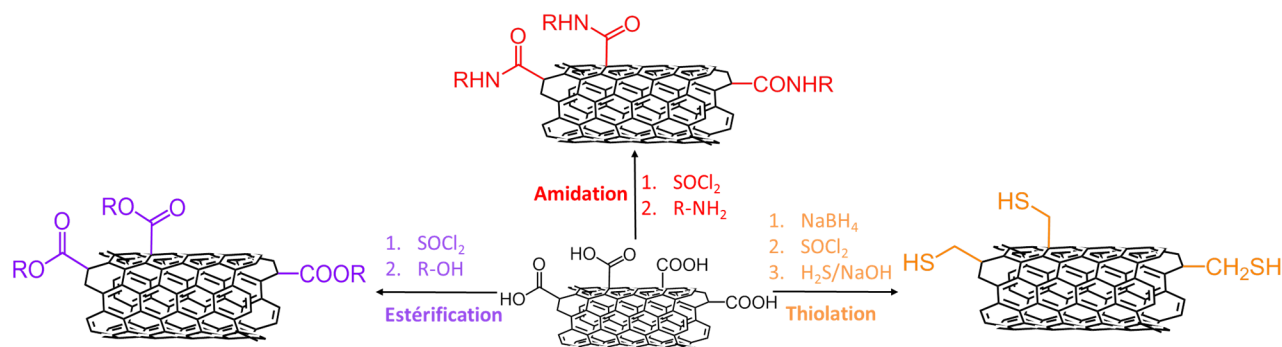


Figure IV-6 : Différents types de modifications chimiques indirectes des CNT-COOH

3. Formation d'ylure d'azométhine : la réaction de Prato

Initialement développée pour le fullerène, Prato met en évidence en 1993 l'addition 1,3 dipolaire d'ylure d'azométhine.²⁰³ Cette méthode sera transférée au NTCs au début des années 2000.¹⁹⁶ Elle consiste au traitement des NTCs à haute température dans le DMF avec un dérivé aldéhyde et une glycine N-substituée, résultant à la formation de résidus pyrrolidine substitués (Figure IV-7). Cette méthode fonctionne sur tous types de NTCs de carbone, oxydés ou non.

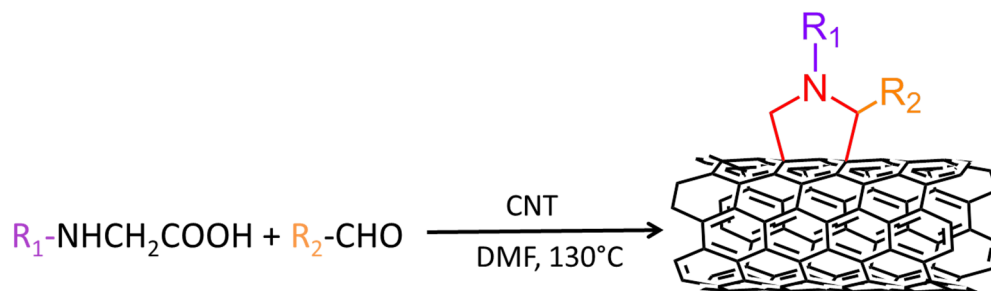


Figure IV-7 : Mécanisme de la réaction de Prato.

4. Fonctionnalisation par des sels d'aryles diazonium

Suite aux travaux de Pinson et Savéant²⁰⁴ (1992), Tour *et al.* réalise en 2001 la réduction électrochimique à un électron d'une série de sels de diazonium à la surface d'une électrode de « bucky paper » de NTCs.²⁰⁵ Ainsi, le radical aryle généré s'y fixe spontanément suivant le mécanisme présenté en Figure IV-8. L'électrogreffage peut avoir lieu : (1) par chronoampérométrie en appliquant le potentiel de réduction du sel de diazonium à l'électrode de travail pendant un temps donné ; (2) par voltampérométrie cyclique, le pic de de réduction du diazonium est irréversible.

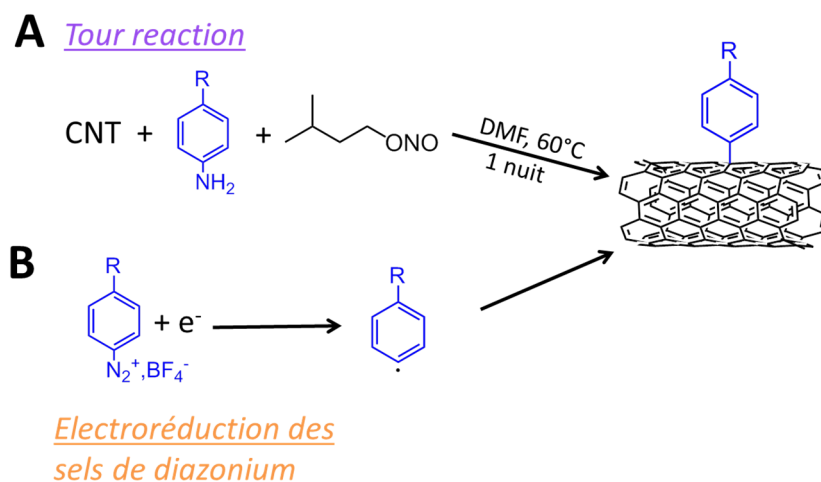


Figure IV-8 : (A) Réaction de Tour pour générer "in-situ" un diazonium à la surface des NTCs. (B) Electroréduction du sel de diazonium à la surface d'une électrode de NTCs.

De cette méthode naîtra la réaction de Tour dans laquelle, la génération in-situ de sels de diazonium se produit, à partir d'isopentylnitrite et de l'aniline correspondante (Figure IV-8A).²⁰⁶

5. Autres réactions

Les exemples cités ci-dessus ne sont pas exhaustifs.^{196,207} D'autres réactions chimiques directes existent comme l'addition de carbènes, l'addition de nitrènes ou encore l'hydrogénation. La Figure IV-9 illustre ces exemples.

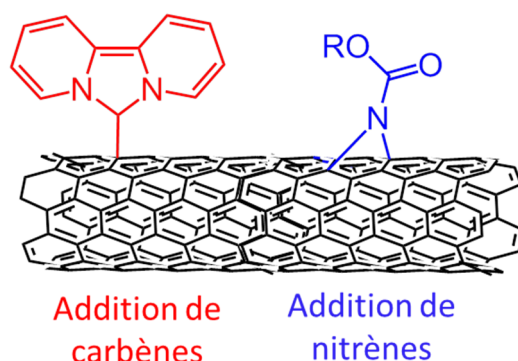


Figure IV-9 : Autres types de groupements chimiques formés à la surface des nanotubes par fonctionnalisation covalente directe.

IV.3 TECHNIQUES D'IMMOBILISATIONS D'ENZYMES SUR ELECTRODES

Diverses méthodes pour connecter les enzymes à la surface d'une électrode ont été envisagées et seront présentées dans cette section. Pour qu'une réponse électrochimique soit générée, l'électrode se substitue au co-substrat qui joue le rôle de donneur ou accepteur d'électrons dans les conditions naturelles de fonctionnement de l'enzyme. La technique d'immobilisation ne doit pas modifier la structure tridimensionnelle de l'enzyme afin de conserver la réactivité, cinétique et la sélectivité, afin de ne pas altérer ses propriétés catalytiques.²⁰⁸

IV.3.A L'ADSORPTION OU LA PHYSISORPTION

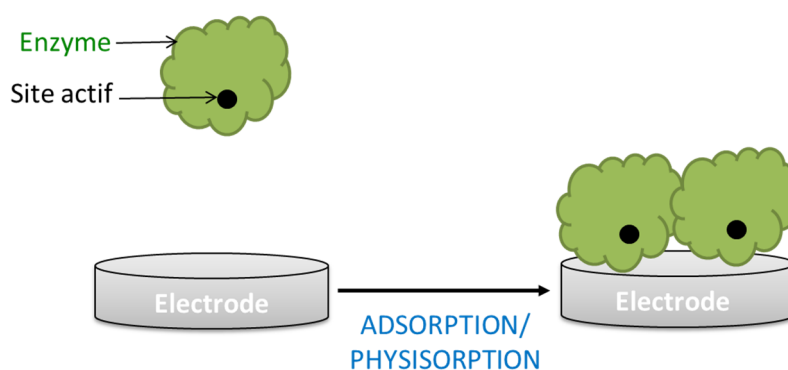


Figure IV-10 : Adsorption ou physisorption enzymatique sur une électrode.

L'adsorption ou la physisorption (Figure IV-10) s'appuient sur des interactions faibles, hydrophobes et de Van der Waals, entre la surface de l'électrode modifiée ou non et l'enzyme. Cette méthode, douce, ne dénature pas la biomolécule. Cependant, des phénomènes de désorption peuvent se produire au cours du temps diminuant la stabilité de la bioélectrode.

IV.3.B LA RETICULATION DE MOLECULES A LA SURFACE DE L'ELECTRODE

La réticulation à la surface de l'électrode a lieu par interaction entre l'enzyme et un cross-linker ou agent de couplage (Figure IV-11). Ce dernier porte des groupements chimiques spécifiques qui permettront sa liaison avec les fonctions amines situées en surface de la protéine. Les réticulants généralement utilisés sont le glutaraldéhyde,^{209,210} ou bien des molécules avec des motifs ester activé ou époxyde.²¹¹

Cette méthode est beaucoup plus stable que la physisorption, car l'enzyme est en quelque sorte piégée. Toutefois, la structure enzymatique et les propriétés catalytiques peuvent être altérées.

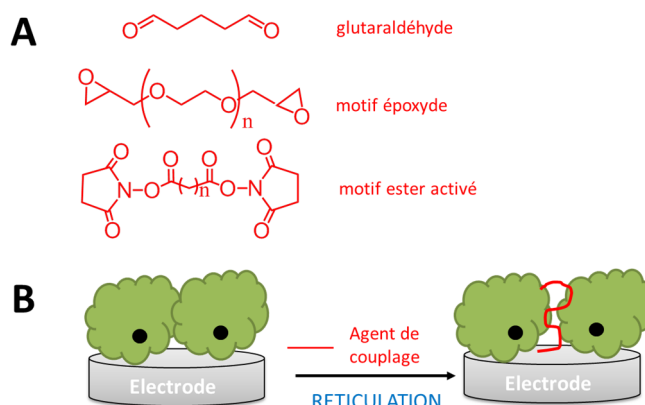


Figure IV-11 : (A) Exemples d'agents de couplage et de cross-linkers utilisés pour immobiliser les enzymes par réticulation.

IV.3.C L'ENCAPSULATION DANS UN POLYMERE OU UNE MATRICE SOL-GEL

L'encapsulation dans des polymères non-conducteurs²¹² (nafion, chitosan ou cellulose) ou dans une matrice inorganique sol-gel²¹³ piège l'enzyme dans un environnement tridimensionnel.

Certaines études, en particulier celles réalisées au sein du laboratoire, ont pour objectif l'encapsulation d'enzymes dans une matrice de polymères électrogénérés tels que le polypyrrole, la polyanniline, le polythiophène ou le PEDOT (Figure IV-12A).²¹⁴ Le monomère, immobilisé sur électrode, est polymérisé par oxydation chimique ou électrochimique afin d'obtenir un polymère conducteur. En plus d'augmenter la conductivité électronique du matériau, ce dernier permettra une connexion plus

efficace de l'enzyme dans une matrice tridimensionnelle avec un meilleur transfert d'électrons. Par ailleurs, la dénaturation de l'enzyme est ralentie. Dans cette configuration, des problèmes de diffusion du substrat au sein de la matrice 3D peuvent avoir lieu (Figure IV-12B).

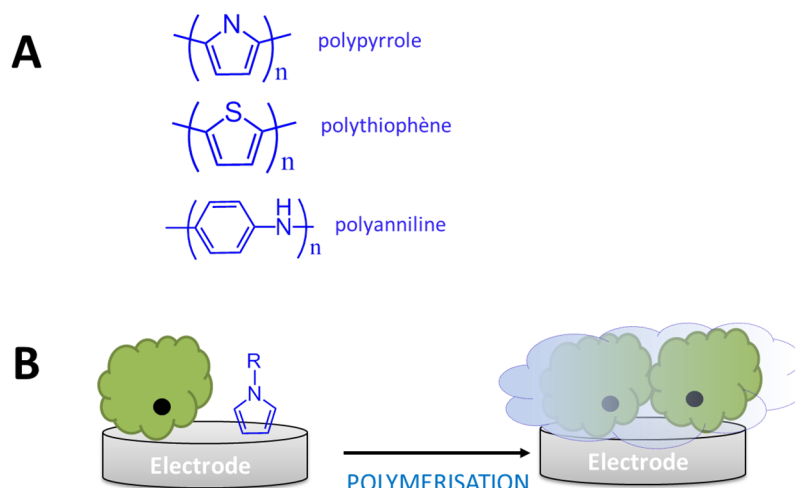


Figure IV-12 : (A) Polymères conducteurs générés à la surface de l'électrode pour piéger l'enzyme (B) dans une matrice 3D.

IV.3.D L'INTERACTION HÔTE-INVITÉ

Les interactions hôte-invité s'appuient sur ce qui se fait déjà dans la nature avec la reconnaissance enzyme-substrat ou encore l'hybridation du double brin d'ADN. Un groupement chimique modifié à l'électrode et une partie modifiée ou non de l'enzyme interagissent par chimie supramoléculaire. Cette reconnaissance dite « hôte-invité » est liée à des interactions hydrophobes et des liaisons de Van der Waals. Les plus connues sont les interactions avidine-biotine²¹⁵, ferrocène-cyclodextrine²¹⁶, adamantane-cyclodextrine²¹⁷. Une autre méthode s'appuie sur le motif clef-serrure : l'électrode est fonctionnalisée par une partie du substrat, reconnue par l'enzyme, qui va alors directement interagir avec son site de liaison. Cela a été notamment mis en évidence avec des dérivés d'anthracène et anthraquinone chez la laccase de *Trametes versicolor*.²¹⁸

IV.3.E LE GREFFAGE COVALENT

Il s'agit d'introduire une fonction chimique réactive entre la surface de l'électrode et un acide aminé de l'enzyme. Le greffage par un lien covalent est irréversible et ne dénature pas les propriétés catalytiques de l'enzyme sous certaines conditions. Si la liaison covalente se forme entre une fonction chimique et un acide aminé de l'enzyme, il n'est pas possible de contrôler à quel endroit le greffage aura lieu. Une technique élégante consiste alors à greffer une fonction chimique sur l'enzyme afin

d'avoir un meilleur contrôle de son orientation. Théoriquement, le transfert d'électrons entre le site actif et l'électrode est meilleur que dans le cas des autres techniques cités précédemment. Les liens covalents les plus référencés sont les suivant :

- L'amination réductrice pour former une liaison amide entre une lysine de l'enzyme et un groupement aldéhyde ou ester activé à la surface de l'électrode (Figure IV-13A) ;
- Les fonctions thiols (-SH) des acides aminés cystéines réagissent avec un groupement maléimide (Figure IV-13B) ;
- Les éléments nucléophiles (-X) de l'enzyme peuvent réagir avec un surface modifiée par un époxyde (Figure IV-13C) ;
- La cycloaddition 1-3 dipolaire de Huisgen consiste à la formation d'un groupement triazole entre un résidu azoture $-N_3$ et un alcyne (Figure IV-13D).

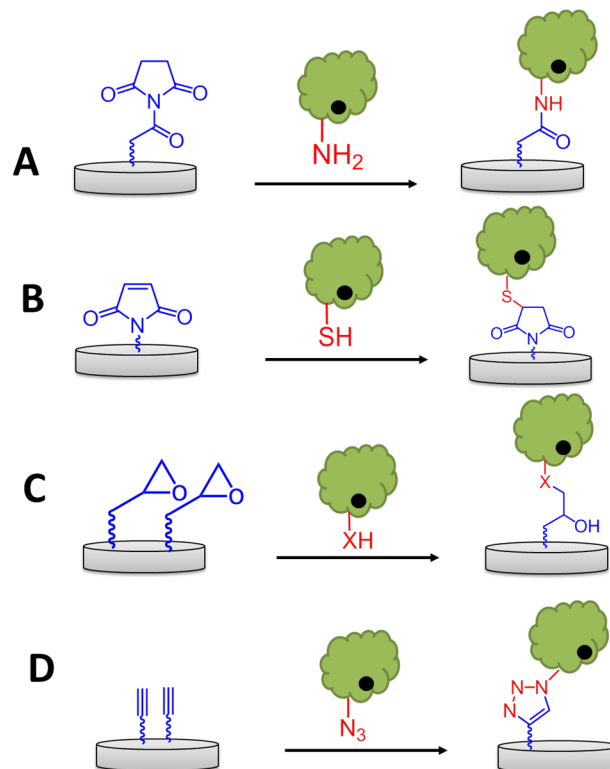


Figure IV-13 : (A) Amination réductrice entre un groupement ester activé (NHS) et une fonction amine (-NH₂) d'une lysine. (B) Réaction d'un groupement maléimide avec une fonction thiol (-SH) d'une cystéine de l'enzyme. (C) Réaction d'un groupement nucléophile (-X) avec un résidu époxyde. (D) Cycloaddition 1,3- dipolaire de Huisgen entre un alcyne et un azoture pour former une liaison triazole.

IV.4 LA CONNEXION ENZYMATIQUE SUR ELECTRODES

IV.4.A LES PRINCIPES DE LA CONNEXION ENZYMATIQUE

La connexion d'enzyme sur électrode a été pour la première fois décrite par Yahiro en 1964, avec l'enzyme glucose oxydase, capable d'oxyder le glucose en gluconolactone en présence d'oxygène.²¹⁹ Comme évoqué dans les paragraphes précédents, le site actif des enzymes est généralement enfoui dans la structure protéique et un relai d'électrons au sein de la protéine est mis en place entre la surface et le centre rédox. Ainsi, deux stratégies de connexions enzymatiques sont donc mises en place : (1) le transfert électronique direct (TED) ; (2) le transfert électronique médié (TEM).

IV.4.A (i) *Le transfert électronique direct (TED)*

Comme son nom l'indique, le TED s'applique lors d'un transfert d'électrons direct entre le site actif de l'enzyme et la surface de l'électrode (Figure IV-14). Ainsi, l'électrode se substitue au cofacteur ou co-substrat de l'enzyme et joue le rôle d'accepteur d'électrons (oxydation enzymatique) ou de donneur d'électrons (réduction enzymatique)

Pour que ce mécanisme ait lieu, le site actif de l'enzyme doit-être assez proche de la surface de l'électrode. D'après la théorie de Marcus,²⁰ le transfert électronique diminue exponentiellement avec l'augmentation de la distance entre l'électrode et le site actif de l'enzyme.²²⁰ Le TED a lieu jusqu'à une distance de 25Å entre le site actif et l'électrode.²²¹ Dans cette configuration, le potentiel de catalyse correspond au potentiel d'oxydo-réduction du centre rédox de l'enzyme. Ainsi, la surtension est la même que l'enzyme soit connectée ou en solution.

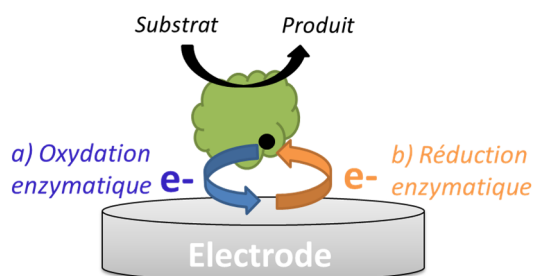


Figure IV-14 : Mécanisme de transfert électronique direct entre le site actif de l'enzyme et l'électrode.

L'orientation d'enzyme à la surface de l'électrode est importante pour la connexion en TED. Cela consiste à immobiliser la protéine dans une conformation favorable afin que le site actif ou le relais de transfert d'électrons (cluster [Fe-S] des hydrogénases) soit au plus proche de la surface de l'électrode

IV.4.A (ii) *Le transfert d'électrons médié (TEM)*

Le transfert électronique médié est réalisé à l'aide d'une molécule rédox, appelée médiateur, qui joue le rôle de navette d'électrons entre le site actif et l'électrode. Ceci peut s'avérer indispensable quand le site actif de l'enzyme est enfoui au sein de la protéine et est donc trop éloigné de la surface de l'électrode. Le médiateur rédox peut librement diffuser en solution ou bien être lié à un polymère ou un gel dans lesquels l'enzyme est piégée. Lors d'une réduction enzymatique, l'enzyme cède des électrons, le médiateur passe alors de la forme oxydée à réduite et est régénéré à la surface de l'électrode (Figure IV-15A). Lors d'une oxydation enzymatique, l'enzyme a besoin d'électrons, le médiateur passe alors de la forme réduite à oxydée et est régénéré à la surface de l'électrode (Figure IV-15B).

Le potentiel rédox auquel a lieu la catalyse est donné par le potentiel du médiateur redox. Il a été postulé, sur la base de la théorie de Marcus, que la différence de potentiel entre l'enzyme et le médiateur doit-être au minimum de 50 mV pour atteindre un transfert électronique efficace.²²²

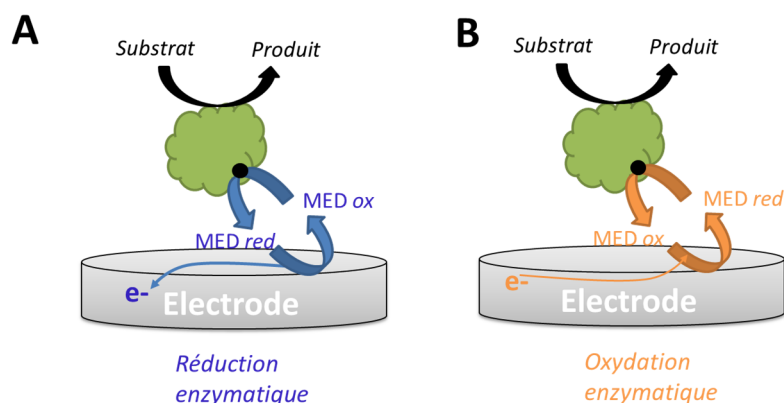


Figure IV-15 : Mécanismes de transferts électroniques médiés dans le cas d'une réduction enzymatique (A) et d'une oxydation enzymatique (B).

IV.4.B LES HYDROGENASES EN TANT QUE BIOANODES ENZYMATIQUES

Les hydrogénases sont les premières métalloenzymes à avoir été connectées en TED dès les années 70²²³ grâce à la proximité du cluster [FeS] distal avec la surface de l'électrode. En 1982, l'Hydrogénase *Thiocapsa roseopersicina* est connectée sur noir de carbone et un premier mécanisme catalytique de l'oxydation d' H_2 est envisagé.²²⁴

IV.4.B (i) *Comprendre les mécanismes catalytiques grâce à l'électrochimie*

La connexion de ces enzymes par simple adsorption étant très efficace, l'électrochimie s'impose rapidement comme technique de choix pour comprendre les propriétés catalytiques des hydrogénases. L'étude de voltampérométrie cyclique d'un film protéique est alors développée (« Protein Film Electrochemistry » pour PFE en anglais). Cela consiste en l'absorption d'un film fin de protéine sur une électrode, souvent en graphite, de telle sorte qu'un TED ait lieu. Le courant électrique généré par l'enzyme en présence de substrats donne une mesure directe de l'activité catalytique et de la fréquence catalytique de cycle (TON). En faisant varier les conditions expérimentales (pH, présence d'inhibiteurs, température), il est possible d'extraire des informations complémentaires aux études biochimiques, spectroscopiques et cristallographiques.²²⁵

La Figure IV-16 met en évidence les réponses électrochimiques obtenues après adsorption de 3 types d'hydrogénases sur électrode de graphite. A un potentiel inférieur à 0,3 V vs SHE, les protons sont réduits en hydrogène (zone 1). En présence d'argon, les trois enzymes réduisent les protons. En présence d'H₂, les hydrogénases [FeFe] et [NiFe] réalisent l'HER (Figure IV-16A et B). Le biais catalytique, souvent utilisé en modélisation, qui se situe entre les zones 1 et 2, est défini par la capacité de l'enzyme à activer ou produire H₂. Lorsque E > -0,3V vs SHE, l'oxydation d'H₂ en protons a lieu et est divisée en deux zones distinctes (2 et 3). De manière générale, les hydrogénases sont inactivées réversiblement à haut potentiel (zone 3) : on parle d'inactivation en condition oxydante. Ici, elle a lieu pour les hydrogénases [FeFe] (Erreur ! Source du renvoi introuvable.A) et [NiFe] (Figure IV-16B) et est inexistante dans le cas des [NiFeSe] (Figure IV-16C).

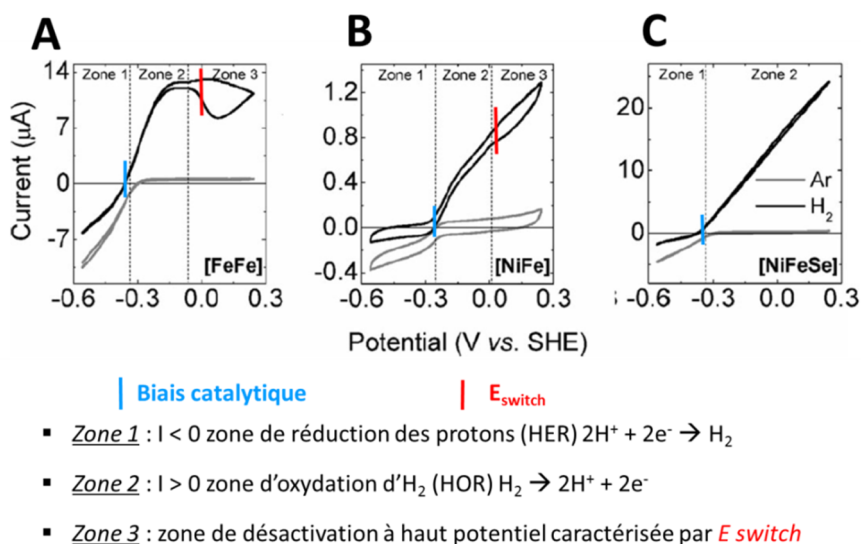


Figure IV-16 : PFV de différentes hydrogénases, (A) Db [FeFe], (B) Rm-[NiFe]-MBH et (C) Db [NiFeSe] absorbées sur électrodes de graphite sous argon et H₂ (25°C, pH 6, 10 mV.s⁻¹, 2500 rpm). Les différentes zones sont définies en dessous et les notions de E_{switch} (ligne rouge) et biais catalytique (ligne bleue) apparaissent. Adapté de ⁷⁵ après accord de la Royal Chemical Society (numéro de licence : 4102540191723).

On définit par E_{switch} le potentiel auquel la réactivation a lieu sur le voltamogramme quand on balaye vers les potentiels négatifs. Cette valeur varie en fonction de la sensibilité à l'oxygène : ainsi, les hydrogénases standards donnent des valeurs autour de -100 mV contre 100 mV pour les hydrogénases tolérantes à l'oxygène.²²⁶ En présence d' H_2 , la désactivation à haut potentiel observée suite à la diminution du courant catalytique correspond à la formation d'états inactivés de l'enzyme. Il s'agit des espèces Ni-B pour les enzymes [NiFe] et H_{ox}^{inact} pour les enzymes [FeFe].³⁴ Ces dernières sont réactivées en quelques secondes, sous H_2 , à la suite du E_{switch} .

En résumé, de nombreuses informations sont accessibles grâce à l'électrochimie : (1) les constantes catalytiques K_M et k_{cat} ; (2) les fréquences catalytiques de cycle ; (3) la détermination des étapes catalytiques cinétiquement limitantes ; (4) l'étude des inhibiteurs par la sensibilité à l' O_2 , au CO et à l' H_2S .

IV.4.B (ii) Immobilisation fonctionnelle

L'immobilisation des hydrogénases a pour but de contrôler l'orientation de l'enzyme, de diminuer la désorption observée dans les études de PFE et d'augmenter le courant catalytique. Des études récentes ont montré que la baisse des performances résultait d'un changement lent de la conformation du site actif²²⁷, ou bien d'une réorientation enzymatique à l'interface.²²⁸

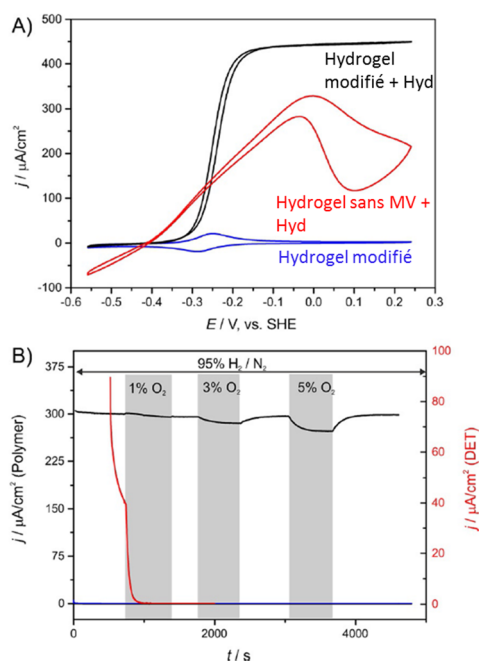


Figure IV-17 : (A) Voltampérométrie cyclique de l'hydrogel modifié drop-coaté sur électrode de carbone vitreux (courbe bleue) et de l'Hydrogénase [FeFe] de *Chlamydomonas reinhardtii* encapsulée dans un hydrogel sans viologène (courbe rouge) et dans un hydrogel modifié (courbe noire) en présence d' H_2 (2000 rpm, pH7, 25°C, 20 mV/s). (B) Chronoampérométrie pour évaluer la tolérance à l'oxygène pour l'enzyme immobilisée dans l'hydrogel non-modifié (courbe rouge) et dans l'hydrogel modifié (courbe noire) (+0.141 mV, pH5, 25°C, 95% H_2 et x% O_2). Adapté de ²²⁹avec l'autorisation de John Wiley and Sons (numéro de licence : 4104770852394)

L'encapsulation dans une matrice d'argile modifiée a été l'une des premières investigations menées à partir de 2003. Nécessitant un matériel peu onéreux et stable, avec des propriétés d'échangeur d'ions, l'argile a été modifiée par le méthylviologène²³⁰ ou le cytochrome c3.²³¹ Avec cette technique les courants catalytiques restent assez faibles et la surtension dépendante du médiateur.

L'encapsulation dans une matrice polymère modifiée avec des médiateurs rédox a été pour la première fois proposée en 1994.²³² Ainsi, l'immobilisation dans une matrice de polypyrrole-viologène a depuis été fréquemment mise en avant.^{233,234} Récemment, Plumeré *et al.* ont proposé un nouveau type d'hydrogel rédox modifié avec du méthylviologène,²³⁵ qui permet d'immobiliser des enzymes sensibles à l'oxygène.²³⁶ Ainsi, l'hydrogénase [FeFe] de *Chlamydomonas reinhardtii*, inactivée irréversiblement en présence d'O₂, a été connectée de cette façon. La modification du polymère permet de s'astreindre de la désactivation à haut potentiel, et d'atteindre ainsi un plateau catalytique d'oxydation d'H₂ de l'ordre de 400 μA /cm² à pH 7 (Figure IV-17A). L'hydrogel rédox permet de détourner une partie des électrons générés par l'oxydation de H₂ afin de réduire l'oxygène avant qu'il n'atteigne le site actif de l'hydrogénase comme démontré au cours de l'expérience de chronoampérométrie présentée en Figure IV-17B.

Enfin, l'immobilisation directe sur électrode modifiée par la réduction de sels de diazonium²³⁷ ou par formation de SAMs²³⁸ a ensuite été envisagée. Toutefois, les courants catalytiques obtenus restent souvent trop faibles pour l'intégration dans une pile avec des puissances élevées.

IV.4.B (iii) *Apport des nanotubes de carbones*

Pour augmenter la quantité d'hydrogénases immobilisées et ainsi avoir accès à des courants catalytiques plus élevées, l'utilisation des NTCs en tant que plateforme d'immobilisation a été considérablement étudiée.²³⁹⁻²⁴¹ En 2007, De Lacey réalise une électrode de forêt de NTCs par dépôt CVD sur or. L'hydrogénase Dg [NiFe] est immobilisée par plusieurs techniques (Figure IV-18-A) : simple adsorption, interactions électrostatiques ou greffage covalent par couplage peptidique obtenu après réduction d'un sel de diazonium amine sur les NTCs. Le voltampérogramme correspondant (Figure IV-18B) montre que l'hydrogénase oxyde H₂ à -0,6V vs SCE (soit -0,356 vs SHE) pour atteindre la densité de courant la plus élevée (-2,5 mA.cm⁻²) dans le cas du greffage covalent. La surtension de 356 mV fait de cette bioanode enzymatique une bonne candidate pour des applications en piles à combustible.

L'hydrogénase [NiFe] *Aquifex aeolicus* est une enzyme thermophile qui réalise l'HOR, en présence d'O₂, sur une large gamme de température.⁴⁶ Son immobilisation sur NTCs modifiés par des groupements carboxylates (f-NTCs) permet de diminuer la désactivation à haut potentiel observée sur NTCs seuls donnant des densités de courant de 1 à 2,5 mA.cm⁻² à pH7 et -0,3 V vs ECS (Figure IV-19A). De plus, l'augmentation de l'épaisseur des NTCs accroît la densité de courant, ce qui confirme

que le nombre d'enzymes connectées en TED est proportionnel à la quantité de NTCs jusqu'à atteindre un optimum (Figure IV-19B).²⁴²

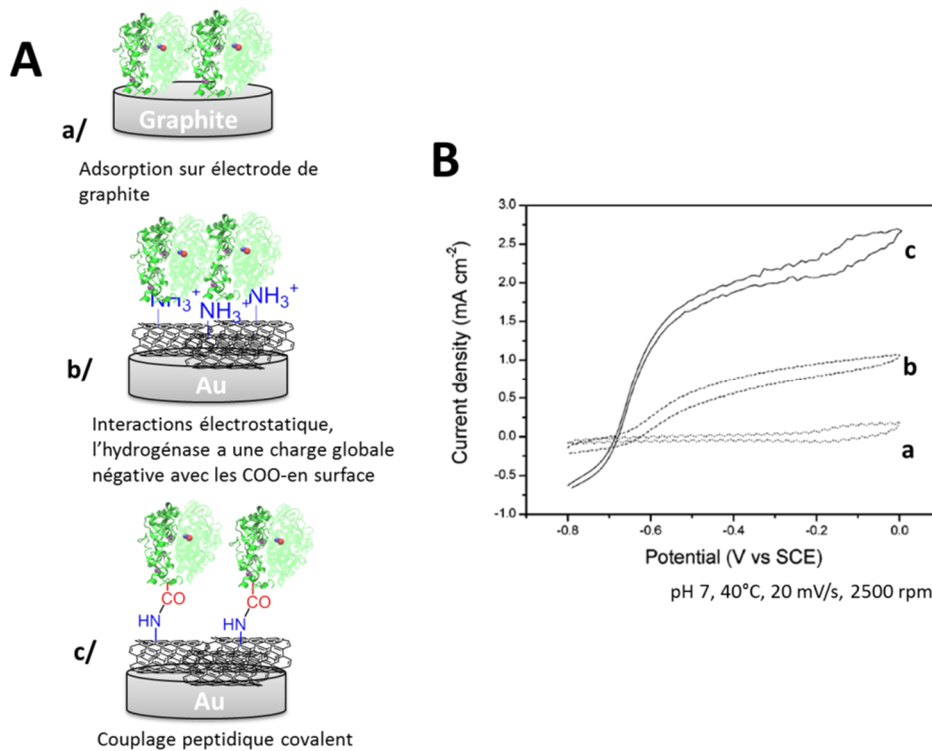


Figure IV-18 : (A) Différentes techniques d'immobilisations de l'hydrogénase Dg[NiFe]. (B) HOR de l'enzyme immobilisée dans les différents cas (a à c) étudiée en voltampérométrie cyclique (pH 7, 2500 rpm, 40°C, 20 mV/s, 1atm H₂). Adapté avec la permission de ²⁴³. Copyright 2017 American Chemical Society.

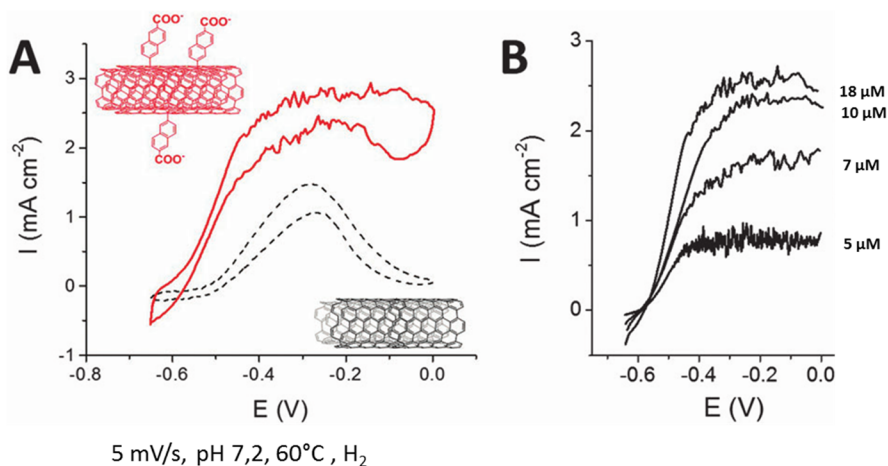


Figure IV-19 : (A) Voltampérogramme de l'Hyd [NiFe] Aquifex aeolicus immobilisé sur NTCs (courbe noire pointillée) et f-NTCS (courbe rouge) sous H₂ (5mV/s, pH 7,2, 60°C, H₂). (B) Evolution du courant catalytique en fonction de l'épaisseur des f-NTCs. Adapté de ²⁴² avec l'autorisation de Royal Society of Chemistry (numéro de licence : 4105321153220)

Ainsi, l'immobilisation des hydrogénases sur NTCs a permis d'augmenter fortement les densités de courants catalytiques par rapport aux premiers travaux réalisés en PFV et de s'affranchir de médiateurs rédox. La nanostructuration des électrodes est donc un enjeu important pour augmenter les performances catalytiques et réussir à s'astreindre de la désactivation à haut potentiel, l'un des facteurs limitant l'utilisation des biopiles enzymatiques H₂/O₂. (voir V.2)

IV.4.C LES ENZYMES A CUIVRE EN TANT QUE BIOCATHODES ENZYMATIQUES

Comme évoquée dans la partie III. , les enzymes à cuivres sont divisées en plusieurs catégories : (1) celles qui activent le dioxygène telles que la galactose oxydase ou la polyphénol oxydase ; (2) celles qui réduisent l'oxygène par un mécanisme à $4H^+/4e^-$ telles que les MCOs (BOD et Lac). Le Tableau V-1 récapitule les fonctions catalytiques et potentiels d'oxydo-réductions du site actif de diverses enzymes à cuivres étudiées pour l'ORR.

Contrairement aux hydrogénases, dont les relais d'électrons sont particulièrement proches de la surface protéique, les enzymes à cuivres peuvent posséder un relai d'électron T1 dont la connexion par transfert direct est difficile à mettre en œuvre. Le site actif T2/T3 est quant à lui souvent enfoui au sein de la protéine. En TED, le potentiel de catalyse se rapprochera fortement du potentiel rédox du site actif : le T1 ou le TNC dans le cas des MCOs, le T3 dans le cas de la PPO et le site mononucléaire Cu(II) pour la galactose oxydase. Ainsi, les cathodes enzymatiques à base de MCOs ont été les plus étudiées : le potentiel rédox du cuivre T1 se situe en moyenne autour de 0,7V vs NHE, correspondant à une surtension faible de 150 mV par rapport au potentiel rédox du couple O_2/H_2O .

Enzymes	Fonctions catalytiques	Site Actif	Potentiel d'oxydoréduction du site rédox (V vs NHE)
Galactose oxydase (GOx)	Oxydation des alcools primaires en aldéhyde couplée à la réduction d' O_2 en H_2O_2	Cu(II) mononucléaire	$E^\circ(Cu^{II}/Cu^I) = +0,45V^{113}$
Polyphénol oxydase (PPO)	Oxydation des catéchols. O_2 est réduit en H_2O et agit en tant que cofacteur.	Site T3 Cu(II) dinucléaire	$E^\circ(T3) = +0,36 V^{106}$
Bilirubine oxydase (BOD)	Oxydation de la bilirubine en biliverdine couplée à la réduction de O_2 en H_2O par un mécanisme à $4H^+/4e^-$	Site T1 Cu(II) mononucléaire + site T2/T3 cluster Cu(II) trinucléaire site T2/T3	<i>Myrothecium verrucaria</i> $E^\circ(T1) = + 0,690 V^{244}$ $E^\circ(T2/T3) = + 0,39 V^{126,244}$
Laccases fongiques (Lac)	Oxydation des polyphénols couplée à la réduction d' O_2 en H_2O .	Site T1 Cu(II) mononucléaire + site T2/T3 cluster Cu(II) trinucléaire site T2/T3	<i>Trametes versicolor</i> $E^\circ(T1) = +0,78 V^{116,125}$ Varie entre = +0,43 et +0,78 V en fonction du type de Lac

Tableau IV-1 : Récapitulatifs des propriétés catalytiques, du site actif et des potentiels d'oxydoréduction de différentes enzymes à cuivre étudiées pour l'ORR.

Dans cette section, nous citerons des exemples de la connexion enzymatique principalement en TED des enzymes à cuivres citées précédemment et définirons plus en détails les enjeux d'orientation enzymatique avec les MCOs.

IV.4.C (i) *Connexion enzymatique directe de la galactose oxydase*

La galactose oxydase est une enzyme qui réduit l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. La seule évidence de TED a été publiée par Schiffrin en 2009.²⁴⁵ Une SAM, comportant des nanoparticules d'or fonctionnalisées par groupements carboxylates, (Figure IV-20A) a permis d'immobiliser l'enzyme par la coordination directe des COO⁻ sur son site actif. L'électrocatalyse est testée par voltampérométrie cyclique à pH7 (Figure IV-20B). En absence d'oxygène (cas a), deux pics rédox réversibles apparaissent autour de -0,1 V et 0,2 V vs SCE (insert) attribués respectivement au couple Cu^{II}/Cu^I et à la formation du radical tyrosile.

Sous O₂, une vague de réduction apparaît, preuve de la réduction de l'oxygène à la surface de l'électrode par TED.

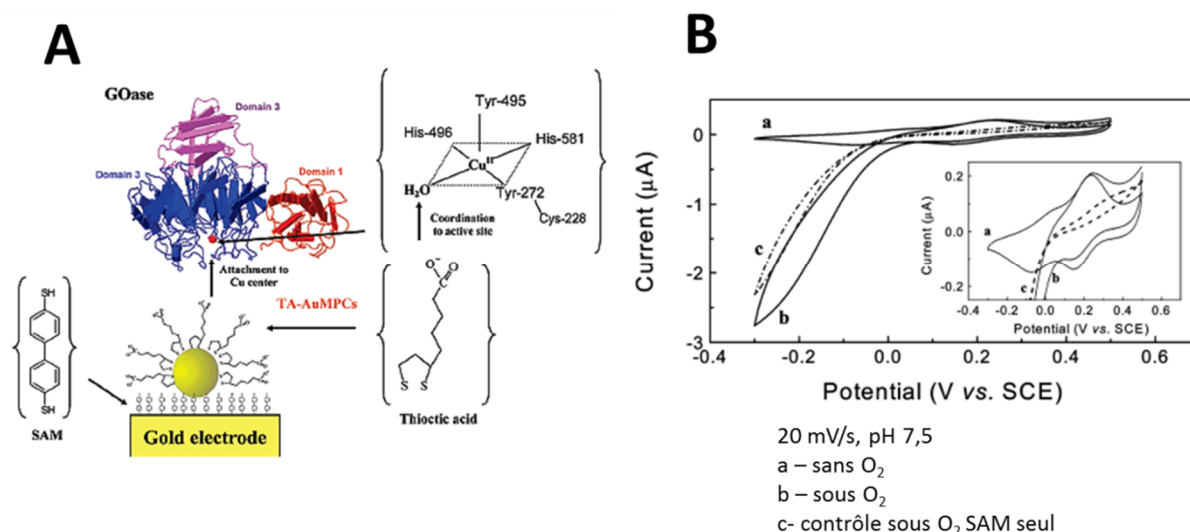


Figure IV-20 : (A) Schéma de l'immobilisation de la GOx sur SAMs modifié par des nanoparticules d'or décorées par un acide thioctique. (B) Voltampéromégramme de l'enzyme immobilisée sur SAM (a) en présence d'O₂ (b) et expérience contrôle de la SAM seule sous O₂ (c) (pH 7,5, 20mV/s). Adapté avec la permission de ²⁴⁵. Copyright 2017 American Chemical Society.

IV.4.C (ii) *Connexion enzymatique directe de la polyphénol oxydase*

La connexion enzymatique de la PPO a été maintes fois étudiée dans le domaine des biocapteurs de par sa capacité à dégrader un panel large de substrats catéchol.^{246,247} Son utilisation en tant que biocathode enzymatique est limitée par deux facteurs : (1) le potentiel du site actif assez faible, conduit par défaut à une forte surtension pour l'ORR ; (2) un centre rédox enfoui, qui rend difficile le TED.

La première mise en évidence de TED sans détecter de sensibilité à l'O₂ a été mise en évidence en 1996 par Yaropolov *et al.*²²⁴ En 2012, Reuillard *et al.*²⁴⁸ immobilisent la PPO dans une matrice de NTCs et démontre un TED couplé à la réduction bioélectrocatalytique de l'oxygène à un potentiel de 0,3V vs SCE soit une

surtension de 400 mV. Cette biocathode conserve 50% de son efficacité catalytique après 8 jours et est inhibée en présence de cyanures.

IV.4.C (iii) *Connexion enzymatique de la BOD*

D'une part, le TEM a été étudié avec diverses molécules organiques tels que l'ABTS^{249,250}, le cytochrome c²⁵¹, ou bien l'utilisation de polymères à base d'osmium²⁵². D'autre part, la connexion directe a été pour la première fois étudiée en 2004 sur électrodes de carbone.²⁵³ Plusieurs techniques ont ensuite été mises en œuvres afin d'atteindre un TED efficace :

- la réticulation de *Mv*BOD avec du glutaraldéhyde et de la BSA sur NTCs ;²⁵³
- l'encapsulation au sein d'un polymère tel qu'une matrice cationique de polylysine,²⁵⁴ dans une encre à base de Vulcan et de nafion,²⁵⁵ ou encore dans un environnement sol-gel ;²⁵⁶
- l'immobilisation par formation d'un lien covalent à partir de fonctions amines ou thiols présentes à la surface de l'enzyme. La BOD a été greffée de façon covalente grâce au couplage EDC/NHS,^{257,258} sur des nanoparticules d'or²⁵⁹ ou des dérivés quinone ;²⁶⁰
- l'utilisation de molécules ayant une structure similaire au substrat bilirubine de l'enzyme telle que la protoporphyrine IX.²⁶¹

L'orientation de l'enzyme est influencée par les groupements chimiques présents à la surface de l'électrode. Ainsi, immobilisée sur une SAM comportant des groupements carboxyliques (surface chargée négativement), *Mv*BOD réduit l'oxygène en eau par un TED entre la surface de l'électrode et le site T1.²⁶² En effet, cette enzyme comporte un moment dipolaire positif qui pointe vers le centre T1, ce qui explique son orientation préférentielle sur une surface chargée négativement (Figure IV-21A). A posteriori, son immobilisation sur une surface positive de NTCs modifiés avec des groupements ammoniums induit la connexion directe du site T2/T3 et une réduction de l'oxygène en eau à un potentiel plus faible (0,3 V vs Ag/AgCl contre 0,55 V vs Ag/AgCl pour le T1), proche du potentiel d'oxydoréduction du site T2/T3 (Figure IV-21B).²⁶³ Récemment, Solomon et Mano²⁶⁴ ont démontré la coexistence de deux états de repos pour *Mv*BOD : (1) la forme RO, dans laquelle un seul centre cuivre est sous la forme oxydée et ne peut pas être réduit par les électrons provenant du T1. Les atomes de cuivre (II) sont réduits grâce au transfert d'électrons du T1 vers le T2/T3 à un potentiel d'environ 0,7 V vs NHE ; (2) la forme AR, dans laquelle deux centres cuivre du TNC sont réduits au degré d'oxydation +1. Cette espèce est activée à un potentiel plus faible de 0,4V vs NHE. Ainsi, la réduction bioélectrocatalytique de l'oxygène pourrait-être effectuée par des formes alternatives réduites de l'enzyme (Figure IV-21A).

Par ailleurs, le moment dipolaire de l'enzyme et les charges en surface varient également en fonction du pH dans lequel l'enzyme a été immobilisée.²⁶⁵ Récemment, Lojou, Mano et Salomon ont démontré que l'exposition de la BOD *Bacillus Pumilus* en

présence d'ions chlorures (inhibiteur de la BOD) engendre la formation d'un état rédox de l'enzyme, dépendant des conditions de pH et de température.²⁶⁶

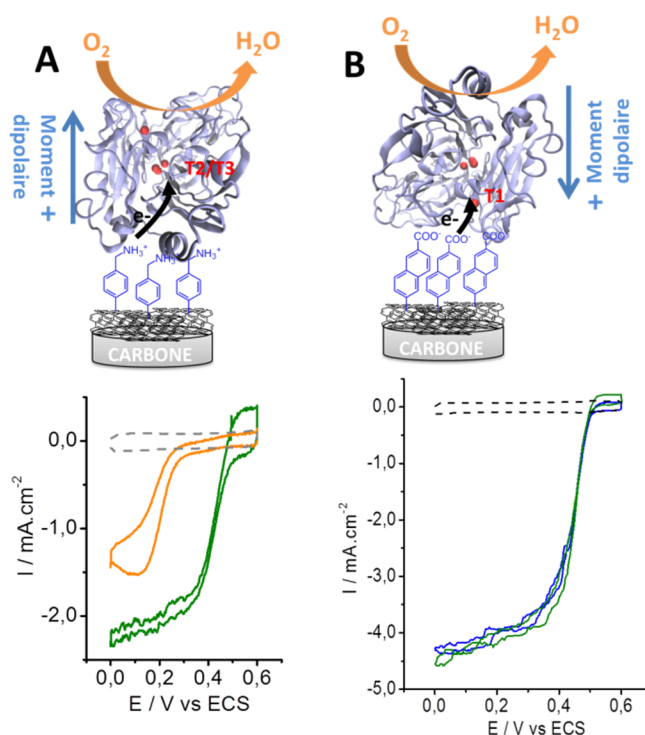


Figure IV-21 : (A) Orientation de *MvBOD* sur une surface de NTC chargée positivement, transfert d'électrons via le TNC. Cyclovoltampérogramme associé sous argon (a), O₂ (orange) (b) et ABTS (vert) (c). (B) Orientation *MvBOD* sur une surface de NTCs chargés négativement, transfert d'électrons via le T1. Voltampérogramme cyclique, associé, sous (a) argon, (b) O₂ (bleu) et (c) ABTS (vert) (10 mV.s⁻¹, pH 7)

IV.4.C (iv) Connexion enzymatique de la laccase

Les stratégies de connexion en TEM sont les mêmes que pour la BOD comme l'encapsulation dans des hydrogels à base d'osmium par exemple.^{267,268} La première connexion de *TvLac* en transfert d'électrons direct pour l'ORR a été publiée par Tarasevich en 1979.²⁶⁹ La laccase a été greffée sur divers matériaux d'électrodes comme des électrodes d'or modifiées²⁷⁰ ou absorbée sur des matériaux carbonés.¹²⁹ Ces méthodes ne permettent pas d'atteindre un TED efficace, puisque le centre T1 est enfoui au sein de la coque protéique.

En 2002, la structure cristalline de *TvLac* est résolue,¹²⁵ montrant que la poche de fixation au substrat se situe à proximité du centre T1. Cette large cavité est riche en acides aminés hydrophobes comme la leucine ou la phénylalanine. En 2007, Armstrong est le premier à tirer avantage de cette poche hydrophobe en immobilisant la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* sur une électrode modifiée par un dérivé anthracène.²⁷¹

L'incorporation de la laccase au sein d'une matrice de NTCs a été largement étudiée. En effet, la simple absorption de l'enzyme sur ces nanofils conducteurs engendre une connexion efficace.¹²⁴ La laccase, piégée au sein d'une forêt de NTC, a

atteint une densité de courant de réduction de -2 mA.cm^{-2} à pH5.²⁷² De plus, la compression directe de l'enzyme au sein d'une pastille de NTC est une stratégie récente, très étudiée pour les piles glucose/ O_2 implantables.²⁷³ Par ailleurs, le greffage covalent de l'enzyme à la surface de NTCs, préalablement modifiés par des fonctions esters activés^{188,274} ou aminophényles,²⁷⁴ a été proposé. D'importantes densités de courant de l'ordre de $-1,5 \text{ mA.cm}^{-2}$ ont été atteintes avec ces différentes méthodes.

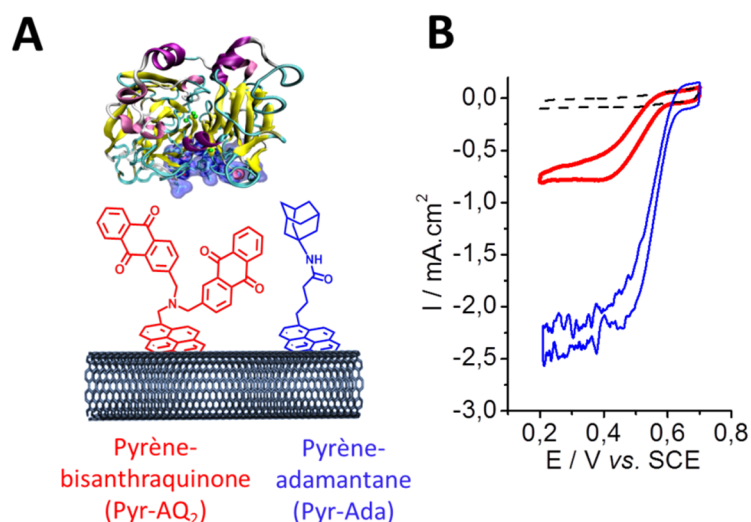


Figure IV-22 : (A) Immobilisation de *TvLac* sur NTC modifié par un dérivé Pyr-AQ₂ et Pyr-Ada (B). Voltampérogramme cyclique, associé, pour l'enzyme orientée sur NTC sous argon (courbe noire pointillée), O_2 pour Pyr-AQ₂ (courbe rouge) et Pyr-Ada (courbe bleue) (10 mV.s^{-1} , pH 5).^{275,218}

De nombreuses stratégies d'immobilisation sur NTCs modifiés par des groupements hydrophobes ont été mises en œuvre. La modification par π -stacking d'une surface de NTCs par un groupement pyrène anthraquinone a permis l'interaction directe avec la poche hydrophobe de *TvLac*. Proche du T1, cette orientation assure un TED avec un courant catalytique plus élevé lorsque deux groupements anthraquinones sont présents à la surface. Dans ce cas, un plateau catalytique se forme autour de $-0,8 \text{ mA.cm}^{-2}$, signe que l'orientation est plus favorable (Figure IV-22A).²⁷⁵ Dans la même lignée, l'insertion d'un groupement adamantane sur la surface d'une électrode de NTCs pour orienter *TvLac* a donné des courants catalytiques plus élevés de l'ordre de 3 mA.cm^{-2} . Des études en chimie théorique ont montré que le groupement adamantane avait une interaction forte avec la cavité hydrophobe de l'enzyme, ce qui permet d'assurer un TED rapide entre le site T1 et l'électrode ainsi que la connexion d'un plus grand nombre d'enzyme que dans l'exemple précédent (Figure IV-21B).²¹⁸

IV.5 IMMOBILISATION DE CATALYSEURS BIO-INSPIRES SUR ELECTRODES

Dans cette partie, nous nous focaliserons sur l'immobilisation de complexes bio-inspirés des hydrogénases et des enzymes à cuivre. Ce travail de thèse s'est focalisé sur l'immobilisation de complexes de DuBois sur NTCs. Ainsi, dans la première partie de cette section, nous nous focaliserons sur les complexes de nickel de première et deuxième génération, c'est à dire avec des bases pendantes organiques, puis acides aminés, qui ont été immobilisées pour l'HER et l'HOR.

Dans un second temps, nous nous intéresserons aux complexes de cuivre mono à plurinucléaire, greffés sur électrodes pour l'ORR, qui, comme nous le verrons, n'ont pas encore la même maturité que les complexes bio-inspirés pour l'HER.

IV.5.A CATALYSEURS BIO-INSPIRES DES HYDROGENASES

Comme nous l'avons décrit en détail dans la partie II.4, les complexes de nickel bis-diphosphine de DuBois, sont bio-inspirés des hydrogénases [FeFe] et [NiFe]. Initialement étudié en catalyse homogène pour leur capacité à oxyder H_2 et réduire les protons, leurs propriétés catalytiques sont facilement modulables en fonction des groupements chimiques ajoutés dans la première ou seconde sphère de coordination. La présence de base pendante joue notamment le rôle de relais de protons et est impliquée dans le clivage hétérolytique de l'hydrogène ou la formation de la liaison H-H.

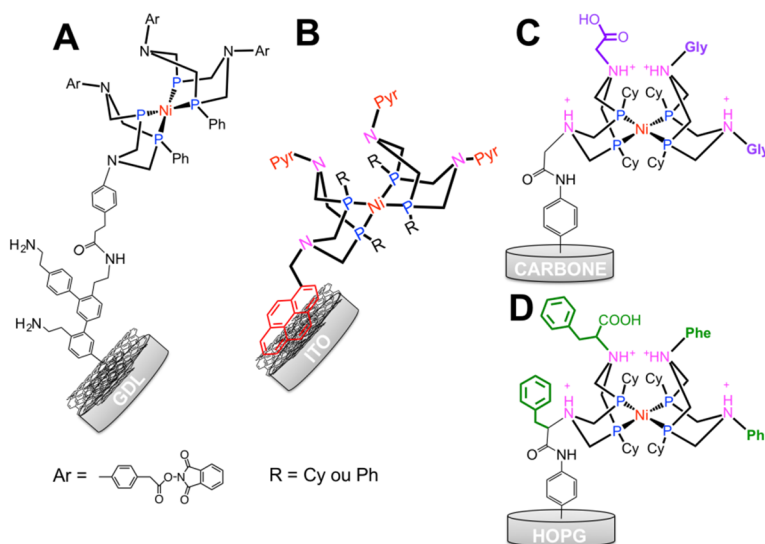


Figure IV-23 : Différents types de complexes de DuBois immobilisés : (A) GDL/MWCNT/[Ni((P₂^{Ph}N₂^{Ar})₂)]²⁷⁶, (B) GDL/MWCNT/[Ni(P₂^RN₂^{Pyr})₂]²⁷⁷, (C) Carbone/[Ni(P₂^{Cy}N₂^{Gly})₂]²⁷⁸, (D) HOPG/[Ni(P₂^{Cy}N₂^{Phe})₂]²⁷⁹

La première immobilisation covalente a été proposée par Le Goff *et al.* en 2009.
²⁷⁶ Dans cette étude, le support d'électrode utilisé est une GDL : il s'agit d'une couche à diffusion de gaz, qui, comme son nom l'indique, permet le transport des gaz au

travers de la surface catalytique. La GDL, modifiée par une surface de NTCs, est fonctionnalisée par des groupements 4-(2-aminophenyle). Un couplage peptidique du complexe de nickel II mononucléaire, $[\text{Ni}[(\text{P}_2^{\text{Ph}}\text{N}_2^{\text{Ar}})_2]^{2+}]$, comportant des fonctions esters activés phthalamide (-Ar) dans la seconde sphère de coordination, conduit à l'immobilisation covalente du catalyseur. (Figure IV-23A).²⁷⁶ Deux ans plus tard, le complexe $[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{R}}\text{N}_2^{\text{Pyr}})_2]^{2+}$ a été greffé par π -stacking entre les pyrènes portés par les bases pendantes et les carbones sp_2 des NTCs (Figure IV-23B).²⁷⁷ A partir de 2015, les complexes de nickel de nouvelles générations comportant des acides aminés glycine²⁷⁸ et phénylalanine²⁷⁹ sur les bases pendantes sont immobilisés coalemment sur électrodes de graphite et de NTCs (Figure IV-23C et D).

Les performances de chacun des catalyseurs sont présentées dans le Tableau IV-2. Ils catalysent la réduction réversible des protons, mais sont majoritairement plus actifs pour l'HER. L'introduction de groupements cyclohexyles sur les phosphores facilite l'oxydation d' H_2 , contrairement aux phényles qui favorisent la réduction des protons. La concentration de surface en catalyseurs est plus élevée sur les supports d'électrodes comportant des NTCs : passant de $20 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$ sur électrode plane à $10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$ sur NTCs. De plus, la quantité de catalyseurs est proportionnelle à la densité de courant : le complexe $[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Cy}}\text{N}_2^{\text{Pyr}})_2]^{2+}$ réduit les protons à -16 mA.cm^{-2} pour des concentrations de surfaces optimales. En 2016, Artero démontre que la nanostructuration des électrodes avec des microfibrilles de carbone permet d'accroître les densités de courant d'un facteur dix pour le complexe $[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Ph}}\text{N}_2^{\text{Ar}})_2]^{2+}$ construit par méthode bottom-up à la surface de l'électrode.²⁸⁰

Les complexes $[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Ph}}\text{N}_2^{\text{Ar}})_2]^{2+}$ et $[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Cy}}\text{N}_2^{\text{Pyr}})_2]^{2+}$ sont actifs et ne se dégradent pas dans $0.5\text{M H}_2\text{SO}_4$ après plusieurs heures d'électrolyse : ce sont des anodes prometteuses pour des applications dans les PEMFC.

Rüdiger immobilise à partir de 2015, deux complexes de nickel $[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Cy}}\text{N}_2^{\text{Gly}})_2]^{n+278}$ et $[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Cy}}\text{N}_2^{\text{Phe}})_2]^{n+279}$ sur électrodes planes. Les performances du catalyseur à base de glycine sont comparées à l'hydrogénase *DvMF* [NiFe] : même si l'enzyme est plus active à pH neutre, l'activité supérieure du complexe à pH acide reste intéressante pour des applications PEMFC. Par ailleurs, ce dernier est plus tolérant au CO que l'hydrogénase.

Le chapitre II détaillera l'immobilisation et les performances catalytiques du complexe de nickel portant un groupement arginine sur les bases pendantes azotées. Ce dernier sera ensuite incorporé dans des piles enzymatiques et biomimétiques.

Complexes	Types d'électrodes	Catalyse	Condi-tions	Performances	Réf.
$[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Ph}}\text{N}_2^{\text{Ar}})_2]^{2+}$ Covalent	GDL/MWCNT /Ni/nafiction	HER, HOR	0.5 M H_2SO_4	- <u>HOR</u> : $\eta = 500$ mV, $2\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ et TON = 30 000 - <u>HER</u> : $\eta = 300$ mV, $-4\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ et TON = 10^5 (10h électrolyse)	2009 ²⁷⁶
$[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Cy}}\text{N}_2^{\text{Pyr}})_2]^{2+}$ Π -stacking	GDL/MWCNT/Ni /nafiction	HER, HOR	0.5 M H_2SO_4	- <u>HOR</u> : $2\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ à $0,2\text{V}$ vs NHE $\eta = 200$ mV Stable en présence de 50 ppm de CO - <u>HER</u> : $-16\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ à $-0,3\text{V}$ vs NHE $\eta = 300$ mV TON = 8.5×10^4 (6h électrolyse)	2011 ²⁷⁷
$[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Cy}}\text{N}_2^{\text{Gly}})_2]^{n+}$ Covalent	Carbone/Ni	HOR HER	0.1M HClO_4 pH = 3	- <u>HOR</u> : $150\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$ à $-0,1\text{V}$ vs NHE $\eta = 174$ mV TOF = 66s^{-1} Actif sur une large gamme de pH Inhibition réversible en présence de CO - <u>HER</u> : non défini	2015 ²⁷⁸
$[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Cy}}\text{N}_2^{\text{Phe}})_2]^{n+}$ Covalent	HOPG/Ni HOPG /NTC/Ni	HOR, HER	0.1M MES/ HEPES pH = 2	- <u>HOR</u> : $5\text{mA}/\text{cm}^2$ à $0,1\text{V}$ vs NHE $\eta = 200$ mV TOF = 34s^{-1} Actif sur une large gamme de pH Stable 8 jours - <u>HER</u> : $-7\text{mA}/\text{cm}^2$ à $-0,35\text{V}$ vs NHE $\eta = 200$ mV TOF = $44\ \text{s}^{-1}$	2016 ²⁷⁹
$[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Ph}}\text{N}_2^{\text{Ar}})_2]^{2+}$ $[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Cy}}\text{N}_2^{\text{Ar}})_2]^{2+}$ Bottom-up	GDL/MWCNT/ microfibre de carbone/Ni/ nafiction	HER, HOR	0.5 M H_2SO_4 85°C	- <u>HOR</u> : $40\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ à $0,3\text{V}$ vs NHE $\eta = 300$ mV - <u>HER</u> : $-38\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ à $-0,1\text{V}$ vs NHE $\eta = 100$ mV TON = 21000 (7h électrolyse)	2016 ²⁸⁰

Tableau IV-2 : Comparaisons des performances catalytiques des différents catalyseurs de DuBois immobilisés sur électrodes

IV.5.B CATALYSEURS BIO-INSPIRÉS DES ENZYMES À CUIVRE

IV.5.B (i) *Introduction*

Les laccases et bilirubines oxydases sont les catalyseurs biologiques qui ont la surtension la plus faible pour l'ORR, environ 200 mV. Même si de nombreuses études démontrent leur connexion sur électrodes, ces dernières fonctionnent dans une gamme de pH étroite et peuvent souffrir de stabilité limitée hors de leurs conditions de fonctionnement optimales (pH, température, présence d'inhibiteurs).

Ainsi, la synthèse de complexes de cuivre bio-inspirés du site actif de ces enzymes permet de mimer les propriétés structurales en essayant de conserver les propriétés catalytiques. Le site actif est composé de quatre cuivres : le site T1 mononucléaire et le cluster trinuécléaire T2/T3. À l'heure actuelle, il n'existe pas de complexe de cuivre tétranuécléaire véritablement bio-inspirés des MCOs de par le challenge apporté par la synthèse d'un complexe tétranuécléaire. De ce fait, la plupart des catalyseurs de cuivre immobilisés sont mono ou di-nuécléaires.

IV.5.B (ii) *Mimes de la cytochrome C oxydases*

Les premiers exemples de mimes de cytochrome C oxydases, catalysant l'ORR, sont apparus au début des années 70 avec les complexes à base de porphyrines métalliques. Initialement observé par Jasinski avec les phtalocyanines de cobalt¹³⁹, l'ORR évolue selon le centre métallique de la façon suivante : Fe(II) > Co(II) > Ni(II) > Cu(II), ce qui s'explique par les lacunes électroniques présentes dans les orbitales d du métal.^{140,281} En solution acide, la réduction de l'oxygène par un complexe de cobalt s'effectue à une surtension beaucoup plus faible que pour une phtalocyanine de cuivre.²⁸² Peu stables, les porphyrines de cuivre ont une activité limitée pour l'ORR. Zhuang *et al.* ont atteint un potentiel de catalyse de 0,44 V vs RHE avec une tétraphénylène porphyrine de cuivre (II) immobilisée sur une électrode de graphite imprégnée de paraffine.²⁸³

Afin d'étudier le mécanisme catalytique de réduction de l'oxygène par la cytochrome C oxydase, Sunderland étudie à partir de 2002 l'immobilisation d'un mime fonctionnel Fe-Cu_B, qui réduit l'oxygène à en eau à 0,71 V vs RHE (pH7). La réaction est totale et une très faible quantité d'H₂O₂ est détectée par RRDE.²⁸⁴ La présence du cuivre est indispensable lorsque les transferts d'électrons entre l'électrode et le catalyseur sont plus faibles que la réaction catalytique. Ainsi, à l'état réduit Cu^I, il agit en tant que source d'électrons.

La génération d'espèces réactives de l'oxygène, telles que des ions superoxydes, peroxydes ou radicaux hydroxydes, est minimisée si la réaction catalytique est plus rapide que le transfert d'électron jusqu'au site actif de l'enzyme. Ceci a été mis en évidence par Collman et Decréau en 2007, lors du greffage d'un complexe Fe-Cu sur deux SAMs avec des constantes de transferts hétérogènes d'électrons différentes.^{285,286}

Plus récemment, l'équipe de Dey a utilisé la spectroélectrochimie pour quantifier les intermédiaires réactionnels formés au cours de la réaction catalytique.²⁸⁷

IV.5.B (iii) Complexes de cuivre mononucléaires

[Cu(trpn)(Im)](ClO₄)₂ (Figure IV-24A) réduit l'oxygène en eau à un potentiel de 0,58 V vs RHE par un mécanisme à 4 électrons, démontrés par analyse Koutechy-Levich. Ce dernier est également capable de réduire le peroxyde d'hydrogène au même potentiel.²⁸⁸ En 2007, Chidsey synthétise une série de complexes de cuivre mononucléaire coordonnés par des phénantrolines portant divers substituants. Le potentiel du couple Cu^{II}/Cu^I est déplacé vers les potentiels positifs pour les complexes portant des substituants électroattracteurs.²⁸⁹ Après une étape de réduction du Cu(II) en Cu(I), l'espèce catalytique, qui fixe le dioxygène, est un cuivre (I). Le complexe alors formé, est ensuite protoné pour libérer une molécule d'eau. En 2011, [Cu(phen)]²⁺ est immobilisé par « chimie click » sur une électrode de carbone vitreux (Figure IV-24B). La variation de la concentration de surface en cuivre permet de démontrer qu'un intermédiaire dinucléaire Cu(I) peroxyde se forme en présence d'O₂ et est responsable des propriétés électrocatalytiques.²⁹⁰

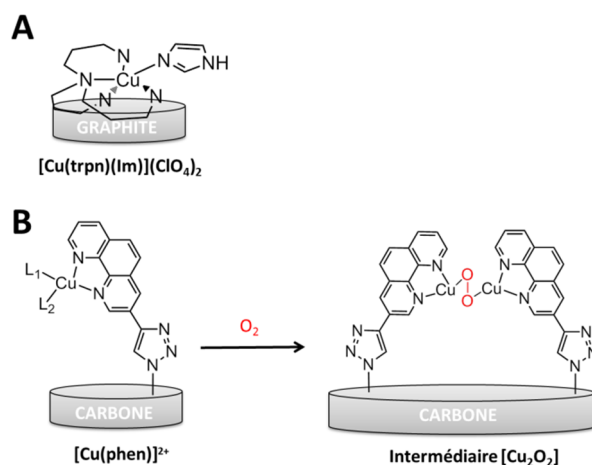


Figure IV-24 : (A) Complexe de cuivre (II) mononucléaire avec des ligands tris(3-aminopropylamine) (trpn) et imidazole (Im) absorbé sur électrode de graphite.²⁸⁸ (B) Complexe de cuivre (II) mononucléaire avec un ligand phénantroline « clické » sur électrode de carbone.²⁹⁰

IV.5.B (iv) Complexes de cuivre dinucléaire

Le complexe [Cu₂(bistripic)(NCMe)₂](PF₆)₂ est mélangé à une encre de carbone vulcan et de nafion puis drop-casté sur électrode de carbone vitreux.²⁹¹ L'ORR a lieu sur une large gamme de pH : 0,4 V vs RHE à pH 1 et 0,73 V vs RHE à pH7. En présence d'O₂, le complexe di-nucléaire passe par la formation d'un intermédiaire peroxyde μ¹-η² : η² comme au cours du mécanisme catalytique de la PPO (Figure IV-24A).

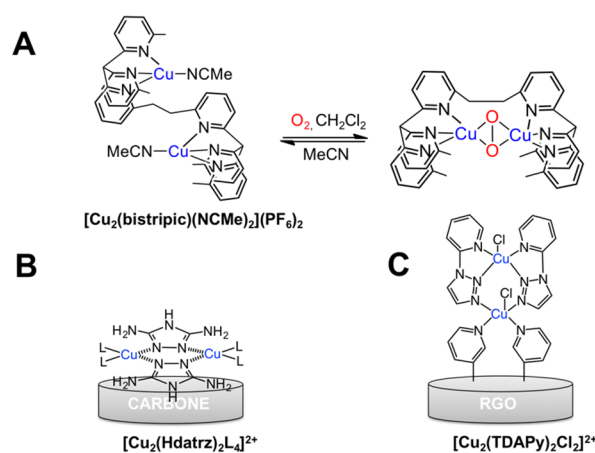


Figure IV-25: (A) Complexe dinucléaire $[\text{Cu}_2(\text{bistripic})(\text{NCMe})_2](\text{PF}_6)_2$ drop-casté sur électrode de carbone vitreux dans une encre de carbone vulcan et de nafion.²⁹¹ (B) Complexe dinucléaire $[\text{Cu}_2(\text{Hdatrz})_2\text{L}_4]^{2+}$ immobilisé sur noir de carbone.²⁹² (C) Complexe $[\text{Cu}_2(\text{TADPy})_4]^{4+}$ clické sur électrode de carbone vitreux modifié avec du graphène oxydé.²⁹³

La structure cristalline de $[\text{Cu}_2(\text{Hdatrz})_2\text{L}_4]^{2+}$ a révélé que la distance de 3,5 Å entre les deux centres métalliques, se rapprochait des valeurs pour les site T3 des PPO et laccases (Figure IV-25B). Absorbé sur noir de carbone, ce complexe réalise l'ORR à 0,73 V vs RHE à pH7 et 0,86 V vs RHE à pH13 et est stable sur une période de 24 heures à pH 7.²⁹² Par ailleurs, il a donné des résultats prometteurs dans une pile microfluidique alcaline H_2/O_2 , malgré des performances fortement limitées par la surtension de la cathode, contrairement à l'anode Pt/C.²⁹⁴ En se basant sur ces précédentes études, Liu *et al.* immobilisent le complexe dinucléaire $[\text{Cu}_2(\text{TADPy})_4]^{4+}$ par approche bottom-up :²⁹³ après fonctionnalisation in situ du graphène par un résidu pyridine-éthynylamine, selon la réaction de James Tour, le ligand 2-azidopyridine est clické à la surface de l'électrode. Enfin, l'incubation d'un sel de cuivre conduit au complexe dinucléaire représenté en Figure IV-25C. Ce dernier réduit le dioxygène en eau à 0,95 V vs RHE à pH14, ce qui est la valeur la plus haute reportée jusqu'à présent pour un complexe de cuivre bio-inspiré, bien que le pH de la catalyse soit élevé.

IV.5.B (v) Complexes de cuivre poly-nucléaires

Formé en solution par équilibre acido-basique après déprotonation de l'imidazole, le complexe tétranucléaire de cuivre (II) $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}$ a été drop-casté sur électrode de carbone vitreux et protégé par une membrane de nafion (Figure IV-26).²⁹⁵ Ce complexe réduit l'oxygène à un potentiel modéré de 0,53V RHE à pH9.

Gewirth²⁹⁶ a récemment travaillé sur l'effet de l'augmentation de nucléarité en connectant plusieurs unités dipicolylamines (DPA) par des linkers. Les différents complexes formés ont ensuite été adsorbés sur carbone vulcan et étudiés en présence d' O_2 . Le complexe trinucéaire ne diminue pas la surtension et a les mêmes performances catalytiques que le complexe mononucléaire CuDPA correspondant. Ainsi, le design de nouveaux ligands plus flexibles est indispensable pour mimer les fonctions catalytiques des laccases et BODs.

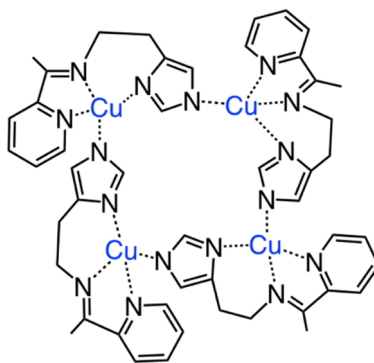


Figure IV-26 : Complexe tétranucléaire $[Cu_4(apyhist)_4]^{4+}$ adsorbé sur électrode de carbone vitreux avec une membrane de nafion.²⁹⁵

IV.5.B (vi) Conclusion

Le Tableau IV-3 récapitule les performances des différents complexes de cuivre décrits dans cette section. La plupart d'entre eux réalisent l'ORR à pH neutre ou basique. Le complexe dinucléaire, $[Cu_2(bistripic)(NCMe)_2](PF_6)_2$, étudié à pH 1 réduit l'oxygène avec une surtension minimale élevée de 700 mV, ce qui ne permet pas son intégration dans une PEMFC.

Pour le moment, tous les tests réalisés avec des complexes poly-nucléaires se sont avérés infructueux, la plupart étant moins actifs que les composés mononucléaires. La synthèse de nouveaux ligands, plus flexibles et plus proches de la structure des acides aminés entourant les sites T1 et T2/T3 reste un champ de recherche encore vaste.

Tableau IV-3 : Performances catalytiques pour l'ORR de différents complexes de cuivre immobilisés sur électrodes.

Catalyseurs	Conditions	$E^{1/2} Cu^I/Cu^{II}$ V vs RHE	E_{onset} V vs RHE	Ref.
$[Cu(trpn)(Im)](ClO_4)_2$	pH 6,4, Tampon Britton-Robinson	0,4	0,58	1997 ²⁸⁸
$[Cu(phen)]^{2+}$	pH 4,8, 50mM NaAcO, 50 mM AcOH, 1M NaClO ₄	0,56	0,39	2011 ²⁹⁰
$[Cu(2,9-Et_2-phen)]^{2+}$	pH 4,8, 50mM NaAcO, 50 mM AcOH, 1M NaClO ₄	0,63	0,59	2007 ²⁸⁹
$[Cu_2(bistripic)(NCMe)_2](PF_6)_2$	pH 1, Tampon Britton-Robinson pH 10	n.d	0,4	2011 ²⁹¹
			0,7	
$[Cu_2(Hdatrz)_2L_4]^{2+}$	pH 7, Tampon Britton-Robinson pH 13	n.d	0,73	2009 ²⁹²
			0,86	
$[Cu_4(apyhist)_4]^{4+}$	pH 9, Tampon phosphate	0,43	0,53	2010 ²⁹⁵
$[Cu_2(TADPy)_4]^{4+}$	pH14, 0.1M KOH	0,795	0,951	2015 ²⁹³

IV.6 CONCLUSION GENERALE

La grande surface spécifique, les propriétés électroniques, mécaniques et thermiques des NTCs en font un candidat idéal pour immobiliser des enzymes ou complexes bio-inspirés. Par ailleurs, la chimie de surface des NTCs étant très riche et bien connue, il reste envisageable de greffer un groupement chimique qui permettra une fonctionnalisation covalente ou non-covalente. Les techniques d'immobilisation des enzymes sur électrodes sont diverses et requièrent un savoir-faire particulier, car le site actif, lieu de la catalyse, est souvent enfoui dans la structure protéique.

Ainsi, l'orientation enzymatique à la surface de l'électrode est un enjeu important pour obtenir des transferts électroniques rapides, efficaces et atteindre la bioélectrocatalyse attendue. La connexion enzymatique sur électrode est un domaine complexe qui nécessite de tenir compte de plusieurs paramètres importants : (1) la localisation du site actif, (2) le pH et la température optimums de l'enzyme, (3) les stratégies TED ou TEM. En général, le TED est favorisé, puisque le potentiel de bioélectrocatalyse est directement lié au potentiel rédox du site actif. Les biocathodes enzymatiques de choix sont celles à base de laccases et BOD, car la réduction de l'oxygène a lieu à haut potentiel (1,1V vs RHE).

Toutefois, l'enzyme doit-être produite dans un organisme (champignons, bactéries) puis être purifiée. La plupart des hydrogénases sont sensibles à l'oxygène, les enzymes à cuivre fonctionnent sur une gamme de pH assez restreinte. Le design de biopiles enzymatiques peut donc s'avérer assez contraignant. De ce fait, l'immobilisation de catalyseurs bio-inspirés sur électrodes est un enjeu important. Cela permet de s'affranchir de la partie de l'enzyme qui n'intervient pas directement dans le mécanisme catalytique. Ainsi, le transfert d'électrons entre le catalyseur et la surface de l'électrode est facilité. Les catalyseurs anodiques et cathodiques seront performants s'ils fonctionnent sur une large gamme de pH, préférentiellement à pH acide, et s'ils sont stables au cours du temps et ne se dégradent pas en présence de CO ou peroxyde d'hydrogène.

Ainsi, les catalyseurs de DuBois, complexes bis-disphosphine de nickel, ont été immobilisés à partir de 2009 sur NTCs. Actifs à la fois pour l'HER et l'HOR, ils fonctionnent avec de très bonnes performances à pH acide. Les complexes de seconde génération comportent des acides aminés dans la sphère de coordination externe, qui jouent un rôle de relais de protons. Le chapitre 2 détaillera l'immobilisation, sur matrice de NTCs, du catalyseur de nickel coordonné par 2 ligands diphosphine arginine, ainsi que ses performances en termes d'oxydation d'H₂ pour des applications en PEMFC.

Les complexes de cuivre, référencés dans ce chapitre, catalysent l'ORR à des pH basiques. Peu d'entre eux sont suffisamment efficaces à pH acide et ont des surtensions qui restent assez importantes. Dans le chapitre 4, nous décrirons l'utilisation de complexes de cuivre mono- et dinucléaires bio-inspirés de la galactose oxydase et de la polyphénol oxydase.

L'une des applications de la catalyse hétérogène est l'intégration des anodes et cathodes dans une pile afin de transformer l'énergie chimique en énergie électrique. La section suivante traitera de l'intégration des enzymes et complexes bio-inspirés dans des biopiles enzymatiques et piles biomimétiques à hydrogène.

V. LES PILES A HYDROGENE A BASE D'ENZYMES ET DE CATALYSEURS MOLECULAIRES

V.1 INTRODUCTION

Les biopiles à combustible fonctionnent de la même façon que les PACs mais utilisent une enzyme ou un organisme entier à la cathode et à l'anode pour transformer l'énergie chimique en énergie électrique. Différents types de biopiles à combustible existent en fonction de l'espèce immobilisée. Le Tableau V-1 récapitule les avantages et inconvénients de trois catégories de biopiles à combustible.

Les biopiles microbiennes²⁹⁷ font appel à l'immobilisation d'une levure ou bactérie à l'anode ou à la cathode pour oxyder une large variété de matières organiques et réduire l'oxygène. Ces dernières ont l'avantage d'avoir une durée de vie assez longue, due à la régénération du métabolisme enzymatique par la bactérie. Cependant, elles nécessitent une période initiale de croissance bactérienne pour créer un biofilm, qui leur permettra d'être fonctionnelles. Par ailleurs, la taille des piles est souvent très importante et les performances des électrodes sont souvent caractérisées en A/m². Le transport limité de matière et les transferts électroniques assez faibles sont responsables des faibles puissances engendrées par ces dispositifs.

Les biopiles à mitochondrie sont un compromis entre l'utilisation d'une protéine et d'une cellule. Cette organelle, présente dans les cellules eucaryotes, est responsable de la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate). Elle contient de nombreuses enzymes lui permettant de transformer un panel de substrats organiques, ces dernières ne sont pas régénérées comme dans le cas des biopiles microbiennes. Cette génération de biopiles fût mise en place en 2008 par le groupe de Minter.²⁹⁸ Le but est d'oxyder des substrats comme le pyruvate ou la cystéine. Ceci permet de générer un nombre d'électrons beaucoup plus important qui à terme permettrait d'accroître les densités de puissance. A l'heure actuelle, les puissances générées sont de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{W}/\text{cm}^{-2}$.²⁹⁹

Les biopiles enzymatiques utilisent des enzymes pour oxyder le glucose ou le dihydrogène à l'anode et réduire le dioxygène à la cathode. Les enzymes, beaucoup plus petites que les bactéries ou mitochondries, permettent d'atteindre de très bons transferts électroniques avec des densités de puissance de l'ordre du mW/cm². Leur principe de fonctionnement est détaillé dans le paragraphe suivant.

Dans cette section, nous nous intéresserons aux biopiles enzymatiques H₂/O₂ qui associent une hydrogénase à l'anode et une laccase ou BOD à la cathode. Dans un second temps, nous nous intéresserons aux piles biomimétiques qui fonctionnent de la même façon, mais avec des complexes bio-inspirés.

Types de Biopiles	Anode	Cathode	Avantages	Inconvénients
Microbiennes	Levure ou bactérie	Levure ou bactérie Enzyme	Longue durée de vie Régénération des enzymes ou cofacteurs Large gamme de substrats à l'anode	Puissance développée faible Transport de matière limité Transfert électronique faible
Mitochondries	Mitochondrie	Platine	Large gamme de substrats transformés	Pas de régénération de la mitochondrie Organisme Puissance faible ($\mu\text{W}\cdot\text{cm}^2$)
Enzymatiques	Glucose oxydase Glucose déshydrogénase Hydrogénases	Laccases BOD	Puissance élevée ($\text{mW}\cdot\text{cm}^2$) Bons TEDs	Stabilité Pas de régénération Substrats spécifiques

Tableau V-1 : Différents types de biopiles à combustibles.

V.2 LES BIOPILES ENZYMATIQUES

V.2.A INTRODUCTION

Il existe deux types majeurs de biopiles enzymatiques :

- **Les biopiles glucose/O₂** associent la glucose oxydase à l'anode pour l'oxydation du glucose en gluconolactone et les laccases ou BODs à la cathode pour la réduction de l'O₂. L'anode est souvent limitante, car la glucose oxydase n'est pas active en TED. Elle nécessite donc un médiateur pour fonctionner, comme la 1,4-naphtoquinone. Ainsi, les OCV attendues pour ce type de biopiles sont assez faibles, de l'ordre de 0,76 V. Les densités de puissances sont comprises entre 1 et 2 mW/cm^2 .^{273,300} Par ailleurs, la production de peroxyde d'hydrogène par la glucose oxydase est responsable de l'inhibition enzymatique de la cathode.
- **Les biopiles H₂/O₂** associent une hydrogénase à l'anode pour l'oxydation du dihydrogène en protons et une laccase ou BOD à la cathode pour la réduction de l'O₂ en H₂O. Ces dernières ont l'avantage de pouvoir être connectées en TED, au potentiel du centre rédox actif. L'inconvénient majeur est la sensibilité des hydrogénases à l'oxygène, ce qui nécessite des dispositifs particuliers pour que l'oxygène, présent à la cathode, ne diffuse pas vers l'anode. Les OCVs attendues sont de l'ordre de 1V avec des densités de puissance maximales d'environ 1,5 mW/cm^2 .²⁵⁸

Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les biopiles enzymatiques H₂/O₂, en énonçant leur principe de fonctionnement, puis en comparant leurs performances, grâce à des exemples concrets.

V.2.B PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UNE BIOPILE ENZYMATIQUE H₂/O₂

Les biopiles enzymatiques H₂/O₂ fonctionnent sur le même principe que les PACs (Figure V-1). A l'anode, une hydrogénase est responsable de l'oxydation d'H₂ en protons. Les électrons générés transitent vers la cathode, où une MCO réduit l'oxygène en eau. Une membrane peut parfois être présente entre les compartiments anodiques et cathodiques, afin d'éviter la contamination de l'hydrogénase par l'oxygène.

La plupart de ces biopiles nécessitent un électrolyte qui devra fixer le pH optimum propre à chaque enzyme. Ce dernier influencera notamment le transport de matière au sein du matériau d'électrode, si les gaz sont dissous. Dans le cas idéal, les enzymes sont immobilisées sur un feutre de carbone (GDL pour « gaz diffusion layer » en anglais), dans lequel les gaz diffusent à travers l'électrode, comme schématisés dans la Figure V-1. Ainsi, la diffusion des substrats ne fait plus partie du phénomène limitant les performances de la pile. Le premier exemple de biopile enzymatique à base d'enzymes immobilisées dans un tel système sera décrit dans ce manuscrit.

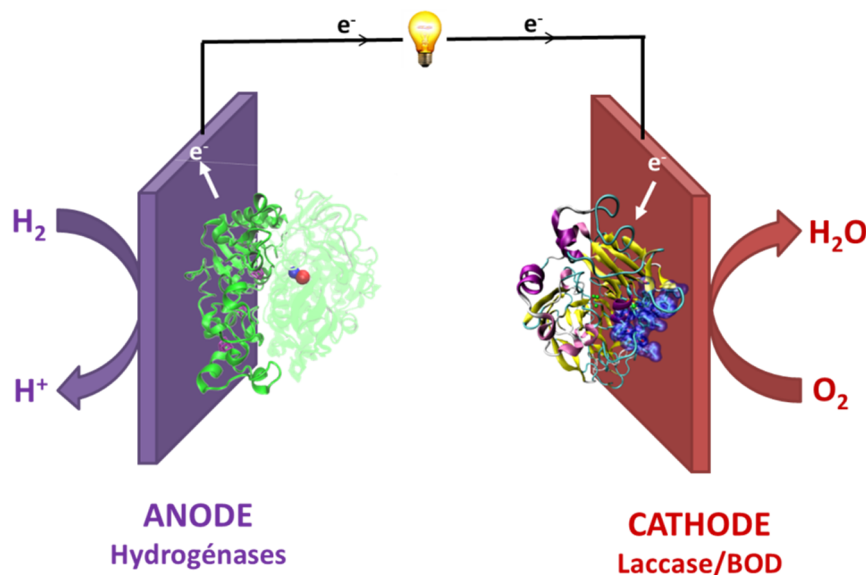


Figure V-1 : Principe de fonctionnement d'une biopile enzymatique H₂/O₂.

La force électromotrice de la pile est définie par la différence de potentiel entre l'anode et la cathode. La Figure V-2 représente le diagramme de potentiel-intensité dans le cas d'un TED ou TEM. En TED, le potentiel électrochimique, de la cathode ou de l'anode, est fixé par le potentiel d'oxydoréduction du site actif de l'enzyme. Ainsi, la f.e.m est maximale. Lorsqu'un médiateur agit en tant que navette électronique, le potentiel de l'électrode est fixé par ce dernier et la f.e.m est plus faible. Toutefois, un grand nombre d'enzymes sont connectées et le courant maximal est élevé. Le cas idéal serait que toutes les enzymes soient orientées en TED, et que le courant débité soit équivalent à celui obtenu en TEM.

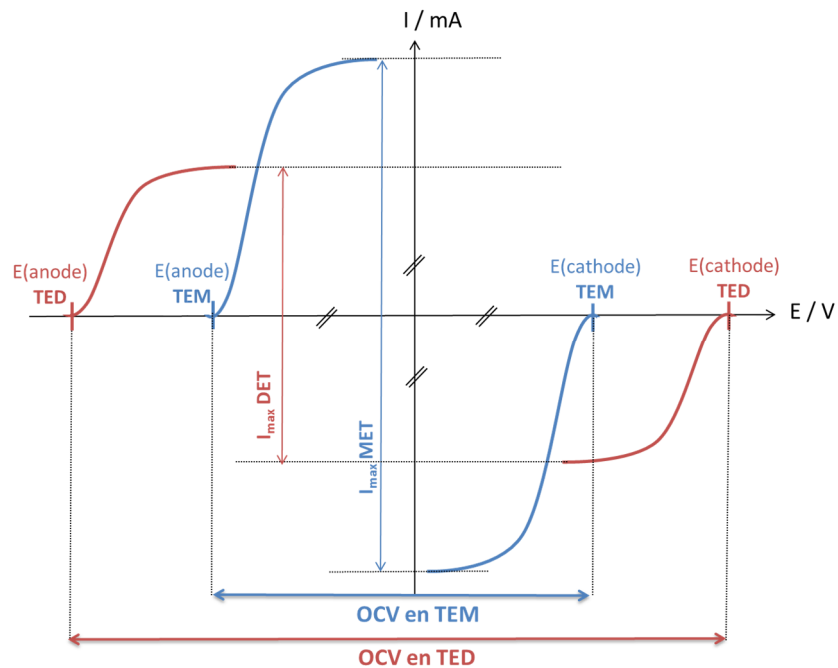


Figure V-2 : Diagramme potentiel-intensité pour l'influence de l'utilisation d'un médiateur sur l'OCV et le courant débité d'une pile par rapport à des enzymes connectées en TED. Les biopiles enzymatiques H_2/O_2

V.2.C LES BIOPILES ENZYMATIQUES H_2/O_2

V.2.C (i) Des exemples de biopiles enzymatiques

La première biopile enzymatique H_2/O_2 a été expérimentée en 2001.³⁰¹ A la cathode, la laccase est immobilisée sur électrodes de carbone et l'anode est constituée d'une cellule entière de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Ainsi, la machinerie enzymatique, composée de plusieurs hydrogénases, est responsable de l'oxydation d' H_2 . Les deux électrodes, comportant les médiateurs ABTS et méthylviologène, sont séparées par une membrane de nafion. En 2005, Armstrong réalise une biopile, avec l'hydrogénase *R. Eutropha*, tolérante à l'oxygène, à l'anode.³⁰² Cette dernière oxyde H_2 en présence d'un taux important de CO (13% H_2 , 87% CO). Branchée en tandem avec la *TvLac*, une résistance, connectée entre les deux électrodes, démontre que le courant circule pour atteindre une puissance de 5 μW et une OCV de 0.97V.

En 2006, 3 biopiles contenant l'Hydrogénase *Ralstonia metallidurans* et *TvLac*, sont branchées en série pour atteindre une OCV de 2,7V et faire fonctionner une montre pendant 24 heures.³⁰³ En 2010, Armstrong³⁰⁴ réalise une pile H_2/O_2 *E.coli*/Mv BOD dans différentes conditions :

- En présence de 100% O_2 et 100% H_2 , une membrane de nafion est présente entre l'anode et la cathode, ce qui empêche fortement la diffusion de l'oxygène vers l'anode, puisque l'hydrogénase est faiblement inactivée à haut potentiel. La puissance maximale est de 63 $\mu W.cm^{-2}$ pour une OCV de 0,99V.

- Sous 96 % H₂ et 4% O₂, la membrane a été supprimée. La cathode est limitante, l'inactivation de l'hydrogénase est plus prononcée. Ainsi, la puissance obtenue est de 13 μW.cm⁻² pour une OCV de 0,99V.
- En présence de 4% d'H₂ dans l'air, l'anode devient limitante, la désactivation à haut potentiel a lieu à partir de + 0,1V vs SHE. La f.e.m, égale à 0,93V, a peu diminué, signe que la réduction non enzymatique d'O₂ se déroule à la surface de l'électrode de graphite. La forme de la courbe de puissance est contrôlée par l'anode : la puissance diminue rapidement lorsque la résistance augmente. L'espèce inactive Ni-B se forme mais n'est pas réactivée en présence d'une faible quantité d'H₂.

Les NTCs sont, pour la première fois utilisée en 2012, avec l'immobilisation covalente d'enzymes sur électrodes de graphite. Ces dernières sont recouvertes par des MWCNTs fonctionnalisées par de l'acide 1-pyrène butyrique. Cette configuration permet d'immobiliser plus de catalyseurs biologiques et d'atteindre ainsi une densité de puissance de 120 μW.cm⁻² et une f.e.m de 1 V.³⁰⁵ La barre symbolique du mW est franchie avec l'immobilisation des enzymes dans une matrice de carbone mésoporeux compacté. Ce système permet de greffer un maximum d'enzyme à la surface et d'améliorer la diffusion des gaz au sein de ce matériau poreux. Ainsi, la biopile délivre 1,67 mW.cm⁻², avec une OCV de 1V dans un environnement constitué de 78% d'H₂ et 22% d'air.³⁰⁶

Un pas est franchi en 2014 avec les travaux de Ogo, qui propose l'intégration de l'hydrogénase [NiFe] de *Citrobacter sp. S77* dans une PEMFC, avec une électrode de platine à la cathode. La pile donne une puissance exceptionnelle de 180 mW.cm⁻² pour une f.e.m de 0,95V.³⁰⁷ Portons un œil critique sur ce résultat :

- Certaines biopiles présentées précédemment comportent une membrane de nafion, afin de limiter la diffusion de l'oxygène vers la cathode. Cependant, un électrolyte tamponné est toujours présent afin d'assurer le fonctionnement de l'enzyme. Dans la pile d'Ogo, l'hydrogénase est directement en contact de la membrane de nafion, et donc soumise à des conditions acides fortes qui peuvent la dénaturer.
- Il a été démontré que l'hydrogénase utilisée n'est pas thermostable, or la pile est réalisée à 60°C et opère sans problème sous O₂.

Des études plus approfondies seront donc nécessaires pour vérifier que ces résultats sont reproductibles et comprendre les mécanismes moléculaires qui permettent à l'enzyme de fonctionner dans de telles conditions. Par ailleurs, les techniques d'immobilisation, permettant d'atteindre une activité aussi importante (TON = 893 000), devront être élucidées.

V.2.C (ii) *Stabilité et limites des biopiles H₂/O₂*

La stabilité des enzymes reste un problème de fond pour la mise au point de biopiles H₂/O₂. Si la cathode enzymatique est robuste, l'hydrogénase est plus sensible. Un potentiel fixe appliqué à l'anode ou bien des balayages en potentiel répétés engendrent la dénaturation du site actif [NiFe]. De plus, la simple adsorption enzymatique ne permet pas de liaisons stables entre l'enzyme et le matériau d'électrode, la fonctionnalisation covalente doit donc être privilégiée.

Les limites actuelles des biopiles H_2/O_2 dépendant de plusieurs facteurs. D'une part, une immobilisation non optimale est le résultat de fréquences catalytiques de cycles faibles. D'autre part, les quantités de substrats disponibles sont fonctions des conditions non explosives des molécules d' H_2 et d' O_2 (fixées à 80% d' H_2 , 20% d'air et 4% d' O_2), la catalyse n'est donc pas optimale. Enfin, en l'absence de membrane, la f.e.m diminue du fait de la réduction non enzymatique de l' O_2 à l'anode.

V.2.C (iii) *Conclusion et Perspective*

Le Tableau V-2 résume les performances des différentes biopiles enzymatiques H_2/O_2 de 2001 à aujourd'hui. Les puissances maximales obtenues sont aujourd'hui de $1,5 \text{ mW.cm}^{-2}$. La f.e.m a atteint une valeur maximale de 1V, soit 200 mV inférieure à la valeur thermodynamique attendue de 1,23V. Les améliorations doivent donc se concentrer sur l'augmentation de la puissance délivrée. Cela passe par l'amélioration des matériaux d'électrodes telles que la nanostructuration en utilisant des NTCs,^{242,305,308} des nanofibres de carbone,³⁰⁹ des carbones mésoporeux³⁰⁶ ou nanoparticules d'or,³¹⁰ afin d'augmenter le nombre de catalyseurs biologiques immobilisés à l'électrode.

Par ailleurs, la sensibilité des hydrogénases à l'oxygène reste un frein. La membrane de nafion, placée entre l'anode et la cathode, engendre des problèmes de diffusion des substrats et limite la puissance générée. Récemment, les travaux de Pluméré^{229,311}, traitant de l'encapsulation d'hydrogénases sensibles à l' O_2 dans un hydrogel de méthylviologène, ouvre une nouvelle voie pour les biopiles enzymatiques sans membrane avec tous types d'hydrogénases.

L'une des perspectives les plus en vogue est la miniaturisation des biopiles en vue de l'alimentation d'appareillages portatifs. En 2016, Armstrong met au point une biopile sur une jonction synaptique dans laquelle Hyd-1 et *MvBOD* sont encapsulée dans une goutte de liquide ionique aprotique.³¹² Ce dernier s'est révélé non-volatile, conducteur et stable thermiquement avec une fenêtre de potentiel suffisamment large pour que son utilisation dans une biopile soit viable. Même si les performances de la biopile restent limitées ($7,3 \text{ } \mu\text{W.cm}^{-2}$ et une OCV de 0,86V), la technologie de miniaturisation reste prometteuse.

V.3 LES PEMFC A BASE DE CATALYSEURS BIO-INSPIRES

V.3.A (i) Introduction

L'intégration de complexes bio-inspirés des enzymes hydrogénases et MCOs dans une pile dite « biomimétique » permettrait de s'astreindre de la faible stabilité des enzymes et de leur fonctionnement dans une gamme de pH étroite. Les complexes de DuBois présentent l'avantage d'avoir une activité catalytique facilement modulable selon le type de groupements chimiques dans la seconde sphère de coordination.

Tout comme les PEMFC classiques, qui intègrent des nanoparticules de platine à l'anode et à la cathode, les complexes utilisés devront répondre à certains critères : (1) avoir un pH optimum commun aux deux électrodes, (2) être stable en présence de monoxyde de carbone ; (3) le complexe cathodique ne devra pas produire de peroxyde d'hydrogène, espèce qui dénature la membrane de nafion, les matériaux supports d'électrodes et les catalyseurs moléculaires.

V.3.A (ii) Exemples de piles biomimétiques

Le Tableau V-2 met en évidence les différentes piles biomimétiques à base de catalyseurs moléculaires mises au point jusqu'à aujourd'hui.

La première d'entre elle a vu le jour en 2011 suite aux travaux de Ogo, qui immobilise un complexe dinucléaire $Ni^{III}-Ru^{II}$ hydruure (Figure V-3A) à l'anode et à la cathode d'une PEMFC.³¹³ La puissance délivrée, assez faible de $11\mu W.cm^2$ et la f.e.m de seulement $0,29V$, démontrent que l'un des deux complexes n'est pas un catalyseur efficace. Testées dans différentes conditions avec Pt/C à l'anode ou à la cathode, les meilleures f.e.ms sont obtenues lorsque $Ni^{II}-Ru^{II}$ est utilisé en tant qu'anode, ce qui suggère que son activité pour la réduction de l'oxygène n'est pas bonne.

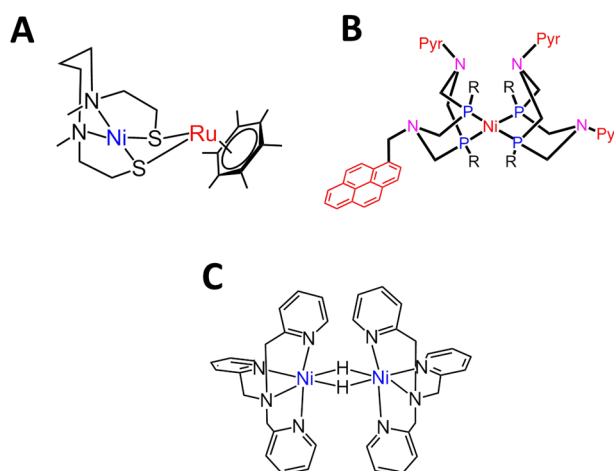


Figure V-3 : (A) $[Ni^{II}LRu^{II}(H)(\eta^6-C_6Me_6)](OTf)_2$ intégré à l'anode et à la cathode dans une PEM. (B) $[NiP_2^{Ph}N_2CH_2Pyr]^{2+}$ associé à une cathode Co-N-C. (C) $[Ni_2(Me_2-tpa)_2(\mu-H)_2]^{2+}$ utilisé en tant que cathode, dans une PEMFC, avec une électrode Pt/C à l'anode.

En 2015, Artero propose pour la première fois l'association d'un complexe de nickel bis-diphosphine pyrène à l'anode et un catalyseur de cobalt dopé à l'azote (Co-N-C) à la cathode. Une encre, composée de nafion et des catalyseurs, a été déposée par spray-coating sur noir de carbone et assemblée dans une PEMFC. Malgré la faible puissance de $23 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, la force électromotrice de $0,74\text{V}$ reste prometteuse. La perte de tension vient de la cathode dont la surtension est de 300 mV par rapport au platine.

Récemment, Ogo propose un nouveau complexe dinucléaire $[\text{Ni}_2(\text{Me}_2\text{-tpa})_2(\mu\text{-H})_2]^{2+}$ en tant que cathode bio-inspirée pour la réduction de l'oxygène. Comme dans le cas des complexes de cuivre dinucléaire, la présence de deux nickels favorise l'ORR. Associé dans une PEMFC avec une électrode de platine à l'anode, une OCV de $0,53\text{V}$ et une densité de puissance de $453 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ sont obtenues.³¹⁴

Anode	Cathode	T / °C	Pmax / $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$	OCV / V	Année	Ref
$[\text{Ni}^{\text{II}}\text{LRu}^{\text{II}}(\text{H})(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)](\text{OTf})_2$	$[\text{Ni}^{\text{II}}\text{LRu}^{\text{II}}(\text{H})(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)](\text{OTf})_2$	60	11	0,29	2011	313
$[\text{NiP}_2^{\text{Ph}}\text{N}_2^{\text{CH}_2\text{Pyr}}]^{2+}$	Co-N-C	60	23	0,74	2015	315
Pt/C	$[\text{Ni}_2(\text{Me}_2\text{-tpa})_2(\mu\text{-H})_2]^{2+}$	60	453	0,53	2016	314

Tableau V-2 : Performances de piles biomimétiques avec des catalyseurs bio-inspirés.

V.3.A (iii) Conclusion

A l'heure actuelle, peu d'exemples de PEMFCs biomimétiques ont été décrits. La raison principale est la difficulté à trouver des catalyseurs aussi performants à l'anode qu'à la cathode. Pour améliorer les performances de ces piles, plusieurs paramètres sont modulables : la charge en catalyseur, les débits de gaz, la composition en nafion ou noir de carbone par rapport à la quantité de catalyseurs, le type de membrane, la température...Le chapitre IV présentera un nouveau type de pile biomimétique mis au point au cours de ce travail de doctorat.

Tableau V-3 : Exemples de biopiles enzymatiques H₂/O₂

Anode	Cathode	Membrane	Matériaux d'électrodes	Conditions opératoires	P _{max}	OCV / V	Année	Ref.
Bactérie <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (Hildenborough) + MV	MvBOD + ABTS	nafion	Feutre de carbone	50 mM phosphate pH 7, température ambiante Bullage O ₂ et H ₂ dans compartiments anodiques et cathodiques	-	1.17	2001	301
<i>Ralstonia eutrophia</i> [NiFe] MBH	Tv Lac	non	Graphite	100 mM citrate pH5, Bullage air et H ₂ dans un bécher contenant les deux électrodes de graphite	5 μW	0,97	2005	302
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34 Hyd	Tv Lac	non	Graphite	100 mM citrate pH5 3% H ₂ dans l'air	5,2 μW.cm ⁻²	0,95	2006	303
<i>E. coli</i> Hyd-1	MvBOD	nafion	Graphite pyrrolitique (PGE)	100% H ₂ et 100% O ₂ / pH5	63 μW.cm ⁻²	0,99	2010	304
		non		96% H ₂ et 4%O ₂ / pH5	13 μW.cm ⁻²	0,99		
		non		4% H ₂ dans l'air / pH5	10 μW.cm ⁻²	0,93		
<i>E. coli</i> Hyd-1	MvBOD	non	Graphite/ MWCNT/ acide-1-pyrenebutyrique	100 mM phosphate pH 5 80%H ₂ + 20% air	120 μW.cm ⁻²	1	2012	305
Aa MBH	MvBOD	non	Graphite/ SWCNT-COOH	50 mM HEPES pH 6,8 100%H ₂ + 100%O ₂ 60°C (anode) et 25°C (cathode)	270 μW.cm ⁻²	1,1	2012	258
<i>E. coli</i> Hyd-1	MvBOD	non	Carbone mésoporeux compacté	Tampon phosphate pH 6, 25°C 78% H ₂ + 22 % air	1.67 mW.cm ⁻²	1	2013	306
<i>Citrobacter sp.77</i> [NiFe] hydrogénase	Pt/C	nafion	Noir de carbone sur GDL	PEMFC, 60°C	180 mW.cm ⁻²	0,95	2014	307
DvMF [Nife]	MvBOD	non	Anode : GC/hydrogel de MV Cathode : GDL	pH7, 40°C 90%H ₂ + 5%O ₂ + 5%N ₂	178 μW.cm ⁻²	0,95	2014	311

<i>Aa</i> [NiFe] MBH	<i>Bp</i> BOD	nafion	Graphite/ nanofibre de carbone	Tampon phosphate pH6 100% H ₂ + 100% O ₂ 60°C	1,5 mW.cm ⁻²	1	2014	309
<i>Aa</i> [NiFe] MBH	<i>Mv</i> BOD	nafion	Electrode d'or+ Np Au	Tampon phosphate pH7 100% H ₂ + 100% O ₂ 60°C	0,2 mW.cm ⁻²	1,1	2015	310
<i>Aa</i> [NiFe] MBH	<i>Bp</i> BOD	non	Anode : GC/MWCNT- nCOOH Cathode : GDL/ MWCNT	Tampon phosphate pH 7,2 45°C	0,72 mW.cm ⁻²	0,95	2015	242
<i>E. coli</i> Hyd-1	<i>Mv</i> BOD	non	Carbone	Liquide ionique aprotique 96% H ₂ + 4% O ₂	5 μW.cm ⁻²	0,8	2016	305

Chapitre II
COMPLEXE DE NICKEL
BIS-DIPHOSPHINE POUR
L'OXYDATION D'H₂

I.	Introduction générale	101
II.	Immobilisation de [Ni(Cy,Arg)₂] sur électrode de nanotubes de carbone.....	103
II.1	Introduction.....	103
II.2	Immobilisation du complexe [Ni(Cy,Arg)₂] par interactions électrostatiques sur nanotubes de carbone modifiés	103
II.2.A	Modification chimique in-situ des nanotubes de carbone et caractérisation.	103
II.2.A (i)	Modifications chimiques in-situ des nanotubes de carbone	104
II.2.A (ii)	Caractérisation de surface des nanotubes de carbone par spectroscopies de résonance Raman et infra-rouge.....	104
II.2.B	Immobilisation et caractérisation du catalyseur a la surface des nanotubes de carbone modifiés.....	106
II.2.B (i)	Immobilisation du catalyseur [Ni(Cy,Arg)₂] sur support d'électrodes de nanotubes de carbone.....	106
II.2.B (ii)	Caractérisation de surface du catalyseur immobilisé par spectroscopie photoélectronique aux rayons X.....	107
II.2.C	Caractérisations électrochimiques	108
II.2.C (i)	En absence d'H₂.....	108
II.2.C (ii)	Electrocatalyse d'oxydation d'H₂ en protons sur GC/MWCNT et GC/SWnCOOH.....	110
II.2.C (iii)	Electrocatalyse d'oxydation d'H₂ en protons sur GDL.....	111
II.2.D	Modélisation de la réponse catalytique.....	112
II.2.D (i)	Principe du modèle cinétique simplifié pour une hydrogénase immobilisée sur électrode	112
II.2.D (ii)	Application du modèle cinétique au complexe [Ni(Cy,Arg)₂]	114
II.2.D (iii)	Modélisation de la réponse catalytique du complexe de nickel immobilisé sur GC/SWnCOOH.....	115
II.3	Approche Bottom-up : formation d'un complexe de nickel asymétrique	117
II.3.A	Synthèse des différents composés sur électrode de nanotubes de carbone ...	117
II.3.B	Caractérisations électrochimiques	118
II.3.B (i)	Caractérisation du complexe asymétrique [Ni(Ph,Pyr)(Cy,Arg)]	118
II.3.B (ii)	Contrôle de la formation du dérivé asymétrique	119
II.4	Conclusion.....	120
III.	Intégration du complexe de nickel dans une PEMFC.....	122
III.1	Introduction.....	122
III.2	Mise en place d'un banc de test pour les PEMFC	123
III.2.A	La PEMFC utilisée au laboratoire	123
III.2.B	Mise en place d'un banc de test au laboratoire	123
III.2.C	Contrôle du Taux d'Humidité.....	124
III.3	Design d'une PEMFC Pt/Pt.....	125
III.3.A	Activation de la membrane de Nafion	125
III.3.B	Performances de la PEMFC Pt/Pt.....	125
III.4	Performances du complexe de nickel [Ni(Cy,Arg)₂] dans la PEMFC.....	127
III.4.A	Performance du complexe de nickel par rapport au platine.....	127
III.4.B	Design d'une PEMFC Ni/Pt.....	128
III.5	Conclusion.....	129
IV.	Conclusion Générale	130

I. INTRODUCTION GENERALE

De nos jours, les énergies fossiles représentent 75% de la consommation mondiale d'énergie et contribuent à la majeure partie de l'émission des gaz à effet de serre. Dans l'optique de les diminuer, des technologies utilisant des vecteurs alternatifs, telles que les piles à combustibles à membrane échangeuses de protons (PEMFC) ont vu le jour. Les piles à hydrogène transforment l'énergie chimique en énergie électrique grâce à l'oxydation de l'hydrogène gazeux en protons à l'anode et à la réduction de l'oxygène de l'air en eau à la cathode. Ces réactions rédox n'étant pas spontanées, les nanoparticules de platine sont utilisées en tant que catalyseurs aux deux électrodes des PEMFCs.

Le platine est un métal noble, dont l'extraction est coûteuse. Même si les quantités utilisées ont fortement diminué à l'anode et à la cathode, son utilisation pour des applications dans le transport par exemple (voiture à hydrogène) ne sera pas viable à long terme. De nombreux groupes de recherche tentent de trouver des alternatives à ce catalyseur. Cela passe par diverses méthodes détaillées dans le chapitre bibliographique (voir Chapitre II.4). Dans ce projet de thèse, nous nous sommes tournés vers la nature pour trouver des solutions moins coûteuses.

Les enzymes hydrogénases³⁴ réduisent réversiblement les protons à des fréquences catalytiques élevées et des surtensions faibles. Ces dernières ont été particulièrement utilisées en tant qu'anode dans les biopiles enzymatiques H₂/O₂^{316,317} (voir Chapitre IV.2.C). Même si les densités de puissance obtenues, de l'ordre de 1,5 mW.cm⁻², restent intéressantes, la sensibilité de ces enzymes à l'oxygène, et les méthodes de purification complexes sont de multiples facteurs qui limitent leur utilisation à grande échelle. De ce fait, la synthèse de mimes structuraux et fonctionnels de ces enzymes a très rapidement vu le jour, non seulement pour s'astreindre des inconvénients cités précédemment, mais également pour comprendre les mécanismes enzymatiques.

Bio-inspirés des hydrogénases [FeFe] et [NiFe], les catalyseurs de DuBois^{91,318}, complexes de nickel (II) mononucléaires, sont parmi les plus actifs pour l'oxydation et la réduction des protons. Ils sont composés d'un centre de nickel mononucléaire coordonné par deux ligands diphosphines P₂N₂, sur lesquels les bases pendantes azotées jouent le rôle de relais de protons jusqu'au centre métallique nickel. Ils sont référencés de la façon suivante [Ni(P₂^RN₂^{R'})₂]ⁿ⁺ (Figure chap.II-1) avec P₂^RN₂^{R'}, ligand 1,5-diaza-3,7-diphosphacyclooctane. Leurs propriétés catalytiques ont été majoritairement étudiées en catalyse homogène dans un mélange de solvants organiques/acides (ou bases). Les groupements R portés par les phosphores modulent l'activité catalytique du complexe.

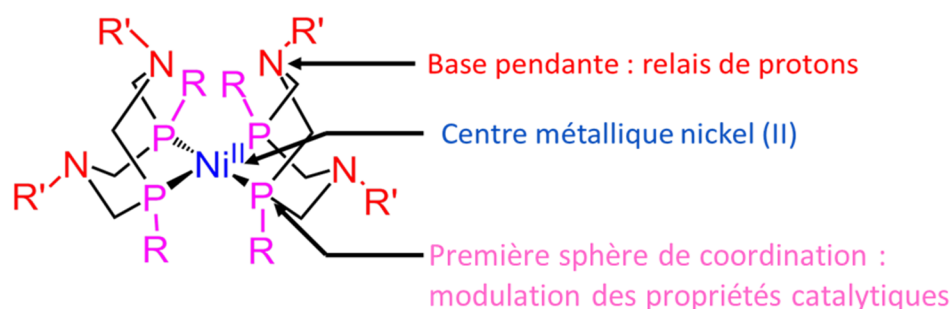


Figure chap.II-1 : Complexe de nickel (II) mononucléaire coordonné par deux ligands diphosphine qui comportent des relais de protons sur les bases pendantes azotées. Les groupements R sur le phosphore modulent l'activité catalytique d'oxydation ou de réduction des protons.

La seconde sphère de coordination s'enrichit à partir de 2014, avec les travaux de Wendy J. Shaw, pour laisser place à des complexes de nickel renfermant des acides aminés. Ces derniers sont pour la première fois étudiés en solvants aqueux et majoritairement actifs pour l'oxydation de H₂. Une série de plusieurs catalyseurs voit le jour : [NiP₂CyN₂R']ⁿ⁺, où R' est un résidu glycine⁹⁹, arginine¹⁰¹ ou tyrosine.¹⁰⁴ [NiP₂CyN₂Arg]⁸⁺ (noté [Ni(Cy,Arg)₂] dans le manuscrit) reste le plus actif des trois pour l'oxydation d'H₂, sur une gamme de pH comprise entre 0 et 14 (Figure chap.II-2). Ainsi, à pH 0,1, le TOF est de 210 s⁻¹ pour une surtension à mi-vague de 180 mV. Ce résultat remarquable nous a incités, en collaboration avec Wendy J. Shaw, à étudier les propriétés de ce complexe en catalyse supportée et à l'intégrer dans une pile à combustible.

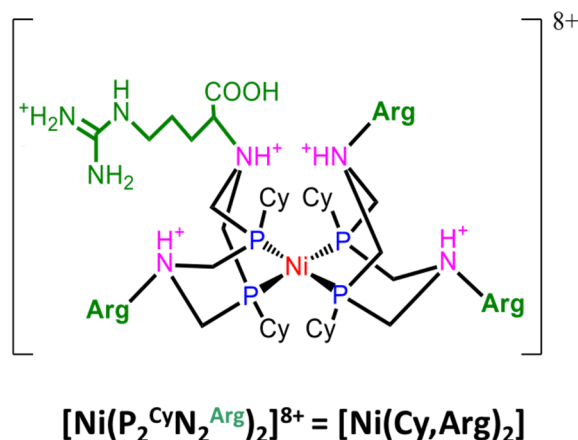


Figure chap.II-2 : Complexe mononucléaire de nickel (II) bis-diphosphine, étudié en catalyse hétérogène, pour l'oxydation d'H₂.

La première partie de ce chapitre sera consacrée aux différentes stratégies d'immobilisation du complexe [Ni(Cy,Arg)₂] sur électrodes de nanotubes de carbone et à la caractérisation de ces nanomatériaux fonctionnalisés en électrochimie, spectroscopie et microscopie. Dans un second temps, nous étudierons ses propriétés catalytiques et modéliserons les réponses électrochimiques obtenues. Enfin, cette anode bio-inspirée sera intégrée dans une pile à membrane échangeuse de protons.

II. IMMOBILISATION DE $[\text{Ni}(\text{Cy},\text{Arg})_2]$ SUR ELECTRODE DE NANOTUBES DE CARBONE

II.1 INTRODUCTION

Les complexes de nickel ont été immobilisés à plusieurs reprises sur électrodes de NTCs. Le Goff, Artero et Jusselme sont les premiers en 2009, à proposer l'immobilisation covalente de $[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Ph}}\text{N}_2^{\text{Ar}})_2]^{2+}$. Cette molécule a démontré des propriétés catalytiques incomparables en terme de réduction des protons et d'oxydation d'H₂ dans H₂SO₄ à 0,5M, tout en étant stable vis-à-vis de la présence de monoxyde de carbone.^{276,277} Plusieurs travaux se sont ensuite succédés dans le but d'augmenter les performances de ces complexes en demi-pile.¹¹

Suite au développement de nouveaux complexes de nickel à base d'acides aminés par l'équipe de Wendy J. Shaw,^{98,99,102-104} notre collaboration nous a amenés à immobiliser le catalyseur $[\text{Ni}(\text{Cy},\text{Arg})_2]$ sur électrodes de NTCs. Plusieurs approches ont été mises en jeu et seront décrites dans cette première partie : (1) une approche « top-down », qui consiste en l'immobilisation du catalyseur via des interactions électrostatiques en se servant de ses nombreuses charges positives et (2) une approche « bottom-up », dans laquelle un complexe asymétrique est synthétisé à la surface de l'électrode.

II.2 IMMOBILISATION DU COMPLEXE $[\text{Ni}(\text{Cy},\text{Arg})_2]$ PAR INTERACTIONS ELECTROSTATIQUES SUR NANOTUBES DE CARBONE MODIFIES

La première approche a consisté au greffage du complexe $[\text{Ni}(\text{P}_2^{\text{Cy}}\text{N}_2^{\text{Arg}})]^{8+}$ sur une matrice de NTCs portant des charges négatives. Dans un premier temps, nous nous intéresserons à la réaction chimique employée pour modifier les NTCs, puis détaillerons de quelle façon le catalyseur est greffé. Dans un second temps, l'anode bio-inspirée sera caractérisée en absence d'oxygène, puis sous H₂. Enfin, nous modéliserons la réponse catalytique grâce à une méthode déjà employée pour les hydrogénases.

II.2.A MODIFICATION CHIMIQUE IN-SITU DES NANOTUBES DE CARBONE ET CARACTERISATION

Cette section concerne la modification des NTCs en solution et leurs caractérisations par spectroscopies de résonance Raman et infra-rouge. Le principe de ces techniques sera brièvement explicité.

II.2.A (i) *Modifications chimiques in-situ des nanotubes de carbone*

Le complexe **[Ni(Cy,Arg)₂]** ne possède pas de groupements fonctionnels capables de réagir avec une surface modifiée pour être greffé de manière covalente. En profitant de son caractère multicationique, nous avons opté pour une stratégie d'immobilisation sur NTCs, modifiés en surface, par des charges négatives.

Les NTCs monofeuillet (SWCNTs) sont modifiés en solution par la réaction de James Tour. Cette dernière permet de greffer un nombre de groupements fonctionnels grâce à la réactivité élevée des radicaux phényles vis-à-vis des parois des NTCs^{205,206} (Figure chap.II-3). Grâce à de précédentes études réalisées au laboratoire, nous avons opté pour l'utilisation de l'acide 2-amino-naphtoïque, qui permet une excellente fonctionnalisation des NTCs, reproductibles, par des groupements carboxylates.

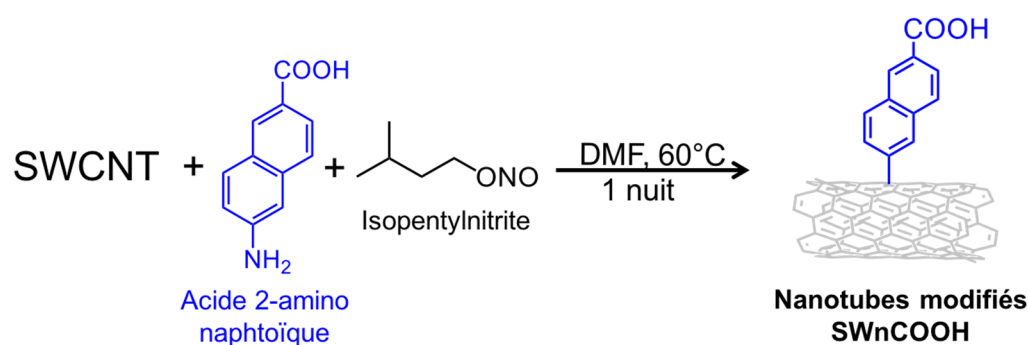


Figure chap.II-3 : *Modification in situ de NTCs monofeuillet par des groupements acide 2-aminonaphtoïque au cours de la réaction de James Tour.*

Les SWCNTs sont soniqués dans une solution de DMF jusqu'à l'obtention d'une suspension noire et homogène. L'ajout des réactifs, isopentyl nitrite et acide 2-aminonaphtoïque, est réalisé une fois que le mélange est porté à reflux sous argon. La réaction chimique se déroule toute la nuit afin d'obtenir des NTCs modifiés par des groupements acide naphtoïque, notés SWnCOOH. La fonctionnalisation chimique obtenue accroît fortement la solubilité (12 µg.cm⁻²) des nanotubes en solvants aqueux par la création de liaisons hydrogènes.²⁴²

II.2.A (ii) *Caractérisation de surface des nanotubes de carbone par spectroscopies de résonance Raman et infra-rouge*

La chimie de surface des NTCs est étudiée en spectroscopie infra-rouge (Figure chap.II-4A). L'apparition de deux bandes spécifiques à 1600 et 1750 cm⁻¹ pour les SWnCOOH correspond aux vibrations de la double liaison C=O. Celles-ci ne sont pas présentes sur les SWCNTs non modifiés (courbe noire).

La spectroscopie de résonance Raman est un outil utilisé en complément de l'infrarouge (Figure chap.II-4B). Elle consiste à envoyer une source de lumière monochromatique, ici une longueur d'onde d'excitation laser de 514,5 nm, et à détecter la lumière diffusée par l'échantillon. Les NTCs ont un signal Raman qui leur est propre

avec l'attribution de deux bandes caractéristiques : (1) la bande G, pour graphite, propre au nombre de couches graphitiques de l'échantillon ; (2) la bande D, pour défaut, qui qualifie les ruptures de liaisons sp₂ en sp₃, fréquentes lors de la modification de surface des NTCs. Enfin, le ratio des intensités des bandes D/G donne une information sur la qualité de l'échantillon.³¹⁹ Ainsi, les bandes D et G ont un nombre d'onde respectif de 1318 cm⁻¹ et 1589 cm⁻¹ pour les nanotubes modifiés (courbe rouge) ou non (courbe noire). L'intensité de la bande D augmente après fonctionnalisation des nanotubes, signe de la création de défauts dans l'échantillon. Ainsi, le ratio d'intensité D/G passe de 0,14 à 0,44 pour les SW_nCOOH.

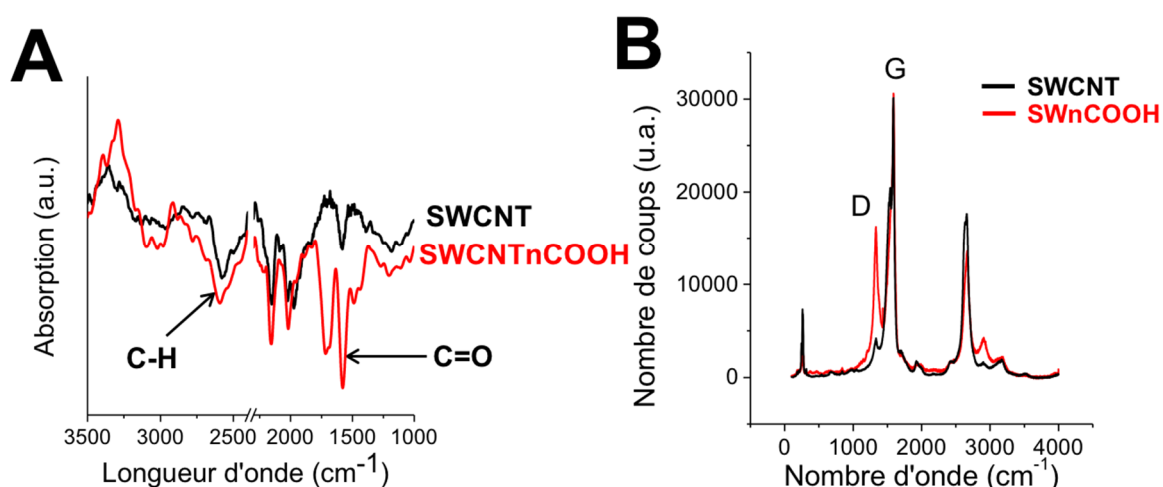


Figure chap.II-4 : (A) Caractérisation des SWCNTs (courbe noire) et SW_nCOOHs (courbe rouge) par spectroscopie infrarouge. (B) Spectre de résonance Raman des SWCNTs (courbe noire) et SW_nCOOHs (courbe rouge). Conditions : Longueur d'onde d'excitation 514.5 nm, source laser ionique argon.

L'association des spectroscopies de résonance infra-rouge et Raman s'est révélée efficace pour qualifier l'état de modification chimique des NTCs. Ceci montre que la surface a été fonctionnalisée par des groupements acides carboxyliques. Ces derniers seront utilisés en tant que support d'électrodes pour greffer le catalyseur de nickel bio-inspiré

II.2.B IMMOBILISATION ET CARACTERISATION DU CATALYSEUR A LA SURFACE DES NANOTUBES DE CARBONE MODIFIES

II.2.B (i) Immobilisation du catalyseur $[Ni(Cy,Arg)_2]$ sur support d'électrodes de nanotubes de carbone.

Après greffage chimique, les SWnCOOHs sont dispersés dans le NMP par sonication dans un bain à ultrason, afin d'obtenir une suspension homogène. La présence de groupements polaires à la surface augmente considérablement la solubilité des SWCNTs, qui sont généralement dispersés en présence de surfactants (SDS). La suspension obtenue est stable pendant plusieurs mois : aucune agrégation des nanotubes n'a été observée. Un film de SWnCOOH est obtenu après drop-casting d'une goutte de suspension sur électrode de carbone vitreux et évaporation sous-vide. L'électrode est plongée pendant une heure dans une solution tampon, contenant 3 mg.mL⁻¹, de complexe de nickel $[Ni(Cy,Arg)_2]$ (0,1M tampon MES/HEPES à pH 6).

Le catalyseur est immobilisé par interactions électrostatiques entre les naphthoates à la surface des NTCs et les nombreuses charges positives présentes sur le complexe : le guanidium C=NH₂⁺ sur la chaîne latérale de l'arginine et/ou les bases pendantes azotées protonées NH⁺ du complexe. Par ailleurs, le squelette π -conjugué des NTCs stabilise le complexe de nickel par des interactions π -cations (Figure chap.II-5).

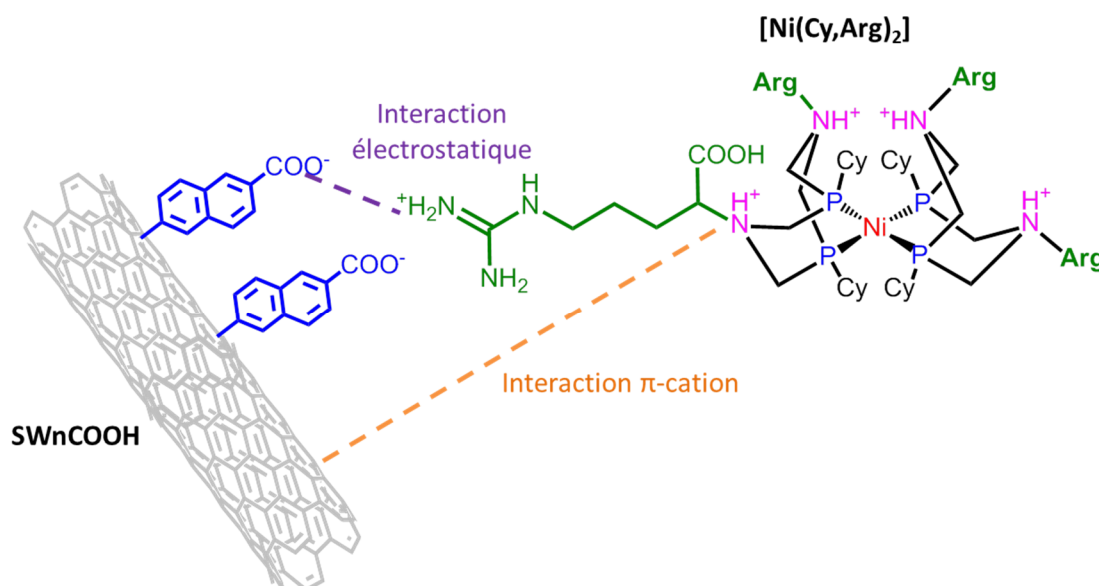


Figure chap.II-5 : Immobilisation du complexe de nickel bio-inspiré $[Ni(P2CyN2Arg)]^{8+}$ par interactions électrostatiques et π -cations sur des NTCs monofeuillettes modifiées par des groupements naphthoates (SWnCOOH).

II.2.B (ii) *Caractérisation de surface du catalyseur immobilisé par spectroscopie photoélectronique aux rayons X*

La surface des NTCs, modifiée par le complexe de nickel, est caractérisée par microscopie électronique à balayage (Figure chap.II-6A) donnant accès à la morphologie des SWnCOOHs. Ils forment un réseau dense de nanotubes enchevêtrés d'un diamètre d'environ 10 nm. La porosité des NTCs induit l'immobilisation d'un grand nombre de catalyseurs et assure un bon transport de masse de l'hydrogène jusqu'aux sites catalytiques.

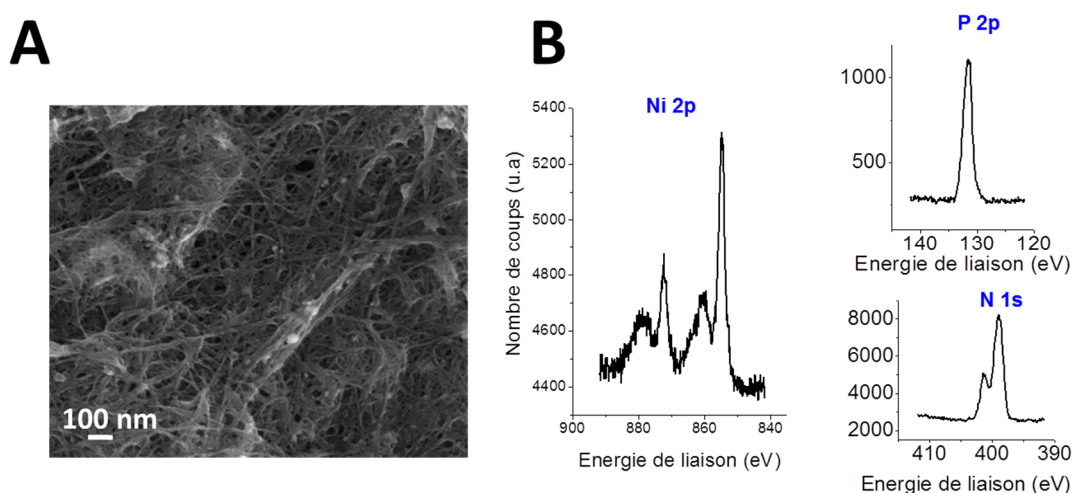


Figure chap.II-6 : (A) Microscopie électronique à balayage de l'électrode de SWnCOOH/[Ni(Cy,Arg)₂]. (B) Spectres XPS de l'électrode SWnCOOH/[Ni(Cy,Arg)₂] pour les niveaux d'énergies des noyaux Ni2p, P2p et N1s. Condition : source monochromatique Al-Kα hν = 1486.6 eV.

La présence du complexe sur l'électrode est confirmée par spectrométrie photoélectronique en rayons X (XPS pour « X-ray photoelectron spectroscopy » en anglais).³²⁰ L'irradiation de l'échantillon par une source rayon X monochromatique ionise les atomes par effet photoélectrique pour conduire à l'éjection d'un photoélectron présent dans les électrons de cœur (couche électronique K). L'énergie cinétique (E_c) de l'électron éjecté peut-être mise en relation avec l'énergie de liaison (E_L) de ce dernier au noyau atomique. Le spectre XPS donne le nombre de coups (ou intensité électronique sans unité) en fonction de l'énergie de liaison du photoélectron émis. Cette valeur, intrinsèque à l'échantillon, ne varie pas en fonction de la source monochromatique d'excitation. Elle peut changer en fonction de l'environnement chimique de l'atome et de son degré d'oxydation. Ainsi, des tables XPS des électrons de cœur de chaque élément chimique permettent d'assigner chaque pic mesuré.

La Figure chap.II-6B décrit les spectres XPS obtenus pour le complexe de nickel immobilisé sur SWnCOOH. Les énergies de liaison pour chaque atome sont reportées dans le Tableau chap.II-1. Le complexe de nickel se trouve à l'état d'oxydation Ni(II) au vu de la présence de deux orbitales de cœur Ni 2p^{3/2} et Ni 2p^{1/2}, et des pics satellites correspondants. Les pics à 131,5 eV et 401,2 eV sont caractéristiques des orbitales P 2p et N 1s. Une analyse semi-quantitative est également possible par calcul du ratio de

l'aire des pics Ni 2p^{3/2} et P 2p. Ceci donne une valeur de 4/1, confirmant la coordination du nickel par deux ligands diphosphines.

Eléments	Orbitales de cœur	Energies de liaisons / eV
Ni	Ni 2p ^{3/2}	854,67
	Ni 2p ^{3/2} satellite	859,96
	Ni 2p ^{1/2}	872,20
	Ni 2p ^{1/2} satellite	878,95
P	P 2p	131,51
N	N1s	398,97
	N1s satellite	401,24

Tableau chap.II-1 : Energies de liaison pour chaque élément observé sur les spectres XPS

II.2.C CARACTERISATIONS ELECTROCHIMIQUES

II.2.C (i) *En absence d'H₂*

Avant de juger des performances catalytiques du complexe bio-inspiré, l'étude électrochimique en absence d'H₂ nous a permis de caractériser les propriétés rédox du complexe de nickel mononucléaire.

L'évolution des courants de réduction et d'oxydation en fonction de la vitesse de balayage est représentée en Figure chap.II-7A. La tendance linéaire confirme que le complexe de nickel est immobilisé à la surface de l'électrode de NTCs. Les voltampérogrammes réalisés à divers pH sous argon (Figure chap.II-7B) donnent des pics rédox réversibles bien définis. La différence de courant capacitif observée est liée à l'utilisation d'une électrode différente par pH pour réaliser cette étude. En effet, plus l'épaisseur des NTCs est importante, plus le courant capacitif est élevé. Une différence de potentiel pic-à-pic ΔE_p de 5 mV, caractéristique d'une espèce greffée, est mesurée à pH 0,3.

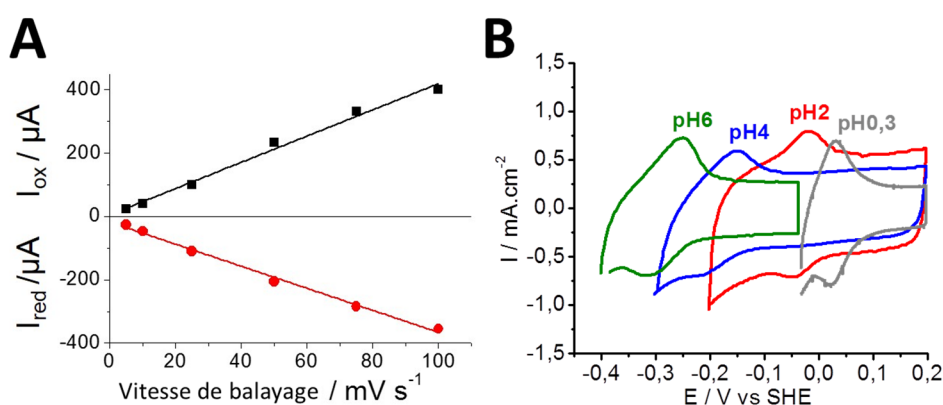


Figure chap.II-7 : (A) Evolution des courants d'oxydation et de réduction en fonction de la vitesse de balayage pour le complexe immobilisé (pH 4, 25°C). (B) Voltampérométrie cyclique de l'électrode SWnCOOH/[Ni(Cy,Arg)₂] à différents pHs sous argon (0,2M tampon Britton-Robinson, 10 mV.s⁻¹, 25°C).

Grâce à l'intégration de l'aire sous les pics, il est possible de déterminer la concentration surfacique en catalyseur σ (mol.cm⁻²) selon l'équation (1) suivante :

$$\sigma = \frac{q}{n \times F \times A} \quad (1)$$

où q est la charge (coulomb) obtenue après intégration du pic faradique, n le nombre d'électrons (2 électrons), F le Faraday (96500 C.mol⁻¹), et A l'aire de l'électrode de travail (0,071 cm²). L'intégration de la charge sous le pic cathodique donne une concentration de surface de l'ordre de 0,2 nmol.cm⁻². Cette valeur est inférieure d'un ordre de grandeur, par rapport à l'immobilisation par interactions covalente ou π - π , de complexes de nickel de DuBois du même type, étudiés dans notre équipe.^{276,277}.

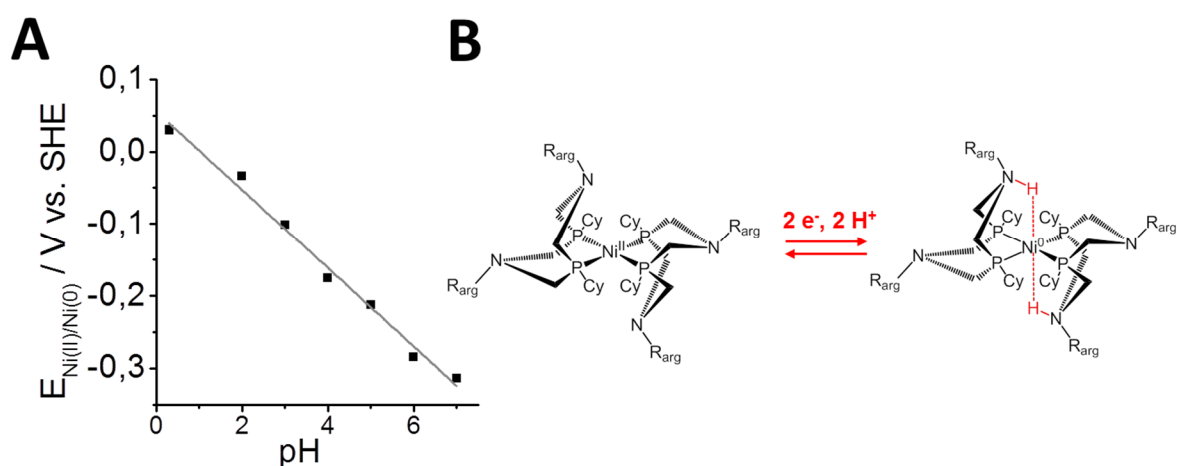
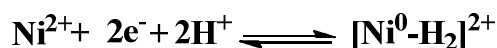


Figure chap.II-8 : (A) Evolution du potentiel électrochimique du couple Ni(II)/Ni(0)-H₂ en fonction du pH. (B) Réduction du Ni(II) en Ni(0) couplée à la fixation de deux protons entre le nickel et les bases pendantes azotées.

Le potentiel rédox du centre métallique évolue en fonction du pH comme représenté sur la Figure chap.II-8A. Le potentiel électrochimique $E_{1/2}$ diminue vers les potentiels négatifs lorsque le pH devient basique. Cette dépendance est caractérisée grâce à l'équation de Nernst suivante :

$$\text{ox}^x + n\text{e}^- \rightleftharpoons \text{red}^y \quad E = E^\circ - \frac{0.059}{n} \log \frac{[\text{red}]^y}{[\text{ox}]^x}$$

En considérant l'équation rédox suivante, d'après la littérature,^{101,276,277}



on peut écrire :

$$E = E_{1/2} - \frac{0.059}{2} \log \frac{[\text{Ni}^0\text{-H}_2]^{2+}}{[\text{Ni}^{2+}][\text{H}^+]^2} \quad (2)$$

Comme $[\text{Ni}^{2+}] = [\text{Ni}^0\text{-H}_2^{2+}]$ et $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$, l'équation (2) devient :

$$E = E_{1/2} - \frac{0.059}{2} \log \frac{1}{[\text{H}^+]^2} \quad (3)$$

$$E = E_{1/2} - 0,059pH \quad (4)$$

Ceci correspond à l'équation de la droite présentée en Figure chap.II-8A.

Ainsi, une dépendance de -59mV/unité de pH est calculée, en accord avec un mécanisme de transfert de protons et d'électrons couplés. L'étude en solution du catalyseur **[Ni(Cy,Arg)₂]** reflète le même comportement et met en évidence un caractère bi-électronique pour la réduction de nickel (II) en nickel (0).¹⁰¹ Ce processus est décrit en Figure chap.II-8B. La réduction du nickel (II) conduirait à la formation d'une espèce Ni(0) dihydruure endo-endo, dans laquelle les deux protons pontent entre le nickel et une base pendante azotée. Une autre possibilité serait la protonation des groupements carboxyliques ou amines.³²¹

II.2.C (ii) *Electrocatalyse d'oxydation d'H₂ en protons sur GC/MWCNT et GC/SWnCOOH*

Le greffage du complexe de nickel a été réalisé à la fois sur MWCNT et SWnCOOH : ces deux techniques sont comparées par voltampérométrie cyclique sous argon et H₂ dans la Figure chap.II-9. D'une part, les voltampérogrammes sous argon montrent deux points importants : (1) le courant capacitif développé par les SWnCOOH est environ deux fois plus faible que pour les MWCNTs (0,5 mA.cm⁻² vs 1 mA.cm⁻²), ce qui est lié à l'épaisseur du film de NTC ; (2) le potentiel d'oxydoréduction ne varie pas en fonction du film de NTC. D'autre part, le barbotage continu d'H₂ dans l'électrolyte à pH 4 contribue à la formation d'une vague d'oxydation catalytique au potentiel rédox du couple [Ni⁰H₂]/Ni^{II} (-0,18V vs SHE). La nature du film de NTC influence le courant catalytique d'oxydation d'H₂ en protons. Ce dernier varie de 2,5 mA.cm⁻², lorsque le catalyseur est absorbé sur le film de MWCNT, à 4,5 mA.cm⁻² pour l'immobilisation sur SWnCOOH.

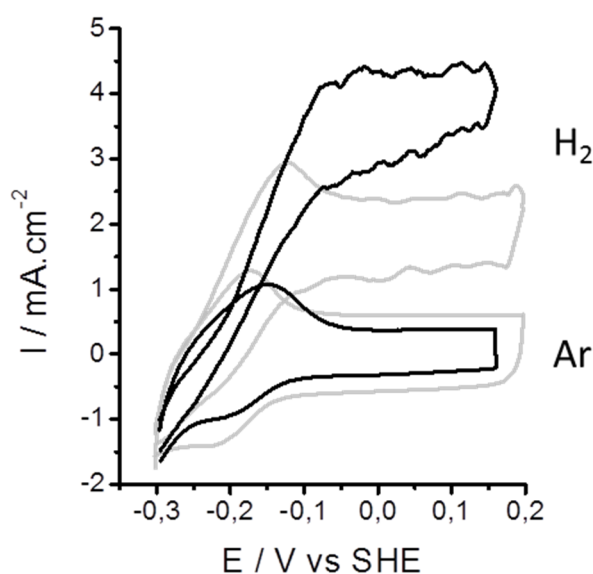


Figure chap.II-9 : Voltampérométries cycliques sous argon et H₂ du complexe de nickel immobilisé sur une électrode de MWCNT (courbes grises) et sur SWnCOOH (courbes noires) à pH 4 (0,2M tampon Britton-Robinson, 10mV.s⁻¹, 25°C).

Par ailleurs, la forme du voltampérogramme sous H₂ évolue également en fonction du film de NTC. Dans le cas des MWCNTs, un pic d'oxydation apparaît à un potentiel de -0,15V vs SHE, assigné à la quantité de catalyseur de nickel greffé qui n'intervient pas dans la catalyse. Cette signature rédox n'est pas observée sur le film de SWnCOOH. Finalement, les groupements naphthoates optimisent fortement la catalyse d'oxydation d'H₂ par [Ni(Cy,Arg)₂], en augmentant la densité de courant d'oxydation d'un facteur 1,8, le nombre de molécule impliqué dans la catalyse et mettent en jeu deux formes d'interactions, électrostatique et π -cation.

II.2.C (iii) *Electrocatalyse d'oxydation d'H₂ en protons sur GDL*

Afin de s'affranchir de la limite de diffusion de l'hydrogène en solution, un nouveau type de support d'électrode a été utilisé (Figure chap.II-10A). Qualifié de GDL pour (« gas diffusion layer » en anglais), il s'agit d'un feutre de carbone d'une épaisseur de 250 μm recouvert par une couche microporeuse. Utilisées en tant que support d'électrodes dans les piles à combustible, elles permettent aux gaz H₂ et O₂ de diffuser à travers la surface catalytique, comme représenté par les flèches rouges sur la Figure chap.II-10B. La surface de la GDL est recouverte par un film de NTCs, obtenu après drop-casting d'une goutte de suspension de SWnCOOH et séchage sous vide. La photographie ci-dessous représente le film de SWnCOOH, d'une surface de 0,071 cm².

L'électrode GDL permet aux catalyseurs de fonctionner dans un environnement triphasique, schématisé en Figure chap.II-10B : (1) gazeux, gouverné par la diffusion d'H₂ à travers l'électrode ; (2) solide, représenté par la surface catalytique ; (3) aqueux, avec l'électrolyte. Ceci permet de s'affranchir des limites de transport de masse du substrat, rencontrées au cours des études catalytiques sur électrode de carbone vitreux. Dans cette configuration, le catalyseur travaille de façon optimale et la diffusion n'est plus le facteur limitant.

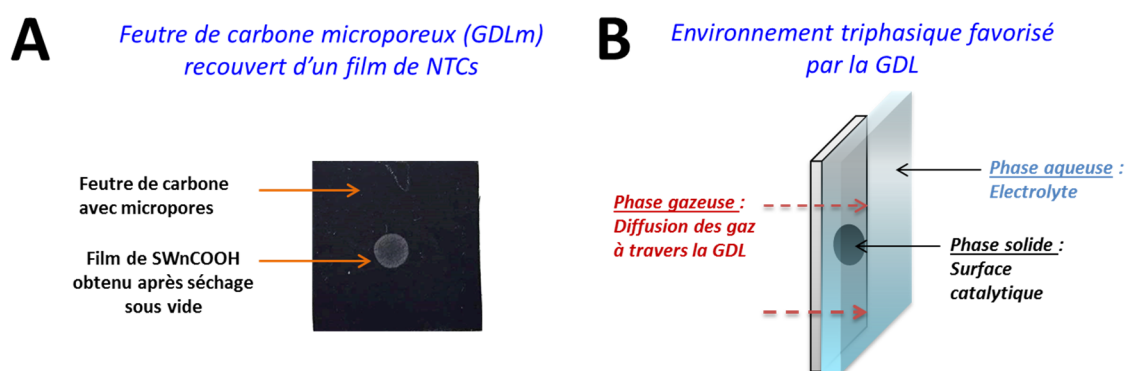


Figure chap.II-10 : (A) Photographie d'un feutre de carbone microporeux recouvert par un film de SWnCOOH. (B) Schéma de l'environnement triphasique assuré par la GDL.

Les performances catalytiques d'une électrode de GDL/SWnCOOH/[Ni(Cy,Arg)₂] ont été étudiées par voltampérométrie cyclique à différents pH sous argon et H₂ (Figure chap.II-11A). Dans une solution de 0,5M d'acide sulfurique, une densité de courant de 16 mA.cm⁻² à 0.4 V vs SHE a été atteinte. Le

Le catalyseur fonctionne de façon bidirectionnelle à un potentiel de catalyse proche du couple H⁺/H₂. La réduction des protons engendre un courant de -14 mA.cm⁻² à -0,1 V vs SHE.

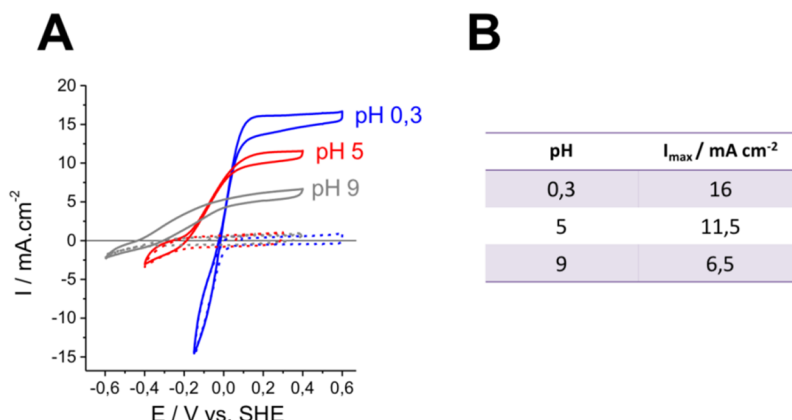


Figure chap.II-11 : (A) Voltampérométrie cyclique du complexe [Ni(Cy,Arg)₂] immobilisé sur une GDL modifiée par un film de SWnCOOH sous argon (courbe discontinue) et H₂ à pH 0,3 (courbe bleue), pH 5 (courbe rouge) et pH 9 (courbe grise) (0,5M H₂SO₄ pour le pH 0,3 et 0,2M tampon Britton-Robinson pour les pH 5 et 9, 10 mV.s⁻¹, 25°C). (B) Tableau récapitulatif des densités de courant maximales pour chaque pH.

Alors que la densité de courant d'oxydation est de 11 mA.cm⁻² à pH 5, la réduction des protons est moindre, due à une concentration en protons plus faible à pH neutre. Le voltampérogramme a une pente plus prononcée à pH 5 et 9. Le complexe de nickel adopte le même comportement en catalyse homogène avec une activité élevée entre pH 0 et 2 (TOF compris entre 50 et 200 s⁻¹), qui diminue ensuite progressivement entre pH 2 et 14.¹⁰¹

II.2.D MODELISATION DE LA REPONSE CATALYTIQUE

II.2.D (i) Principe du modèle cinétique simplifié pour une hydrogénase immobilisée sur électrode

Afin de mieux comprendre l'évolution du biais catalytique en fonction du pH, la réponse catalytique a été modélisée en adaptant les travaux de F. Armstrong initiés pour les hydrogénases immobilisées par PFV.^{322,323}

Le modèle simplifié prend en compte les paramètres suivants :

- l'enzyme adopte une même conformation à la surface de l'électrode et ne change pas d'état en fonction du potentiel appliqué à l'électrode ;
- l'enzyme est greffée sur une électrode à disque tournant afin de minimiser les limites de transport de masse ;
- un seul électron à la fois entre et quitte le site catalytique ;
- l'enzyme est toujours saturée en substrat.

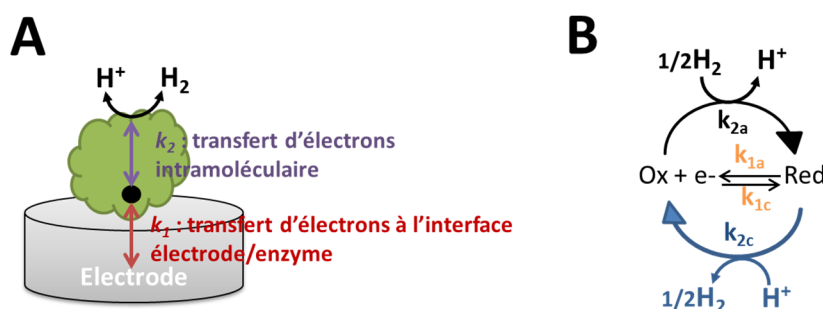


Figure chap.II-12 : (A) Schéma des transferts d'électrons intervenant lorsqu'une hydrogénase est greffée à la surface d'une électrode. (B) Modèle cinétique utilisée dans le cas d'une électrocatalyse réversible. Adapté de ³²³

La Figure chap.II-12A illustre les transferts d'électrons intervenant lorsqu'une hydrogénase est greffée à la surface de l'électrode. Comme le site actif de l'enzyme est enfoui au sein de la structure protéique, un relais d'électrons est nécessaire afin de les transférer au site catalytique. Dans le cas des hydrogénases, les clusters [FeS] jouent ce rôle. Dans le modèle, le transfert d'électrons est divisé en deux étapes : (1) la constante cinétique k_1 , représente les transferts d'électrons à l'interface entre l'électrode et le cluster [FeS] le plus proche de la surface protéique ; (2) k_2 est lié aux transferts d'électrons intramoléculaires des clusters [FeS] au site catalytique, où a lieu la réduction réversible des protons.

Dans le cas où l'enzyme adopte une seule conformation à la surface de l'électrode, le modèle cinétique, présenté en Figure chap.II-12B, est utilisé. Les constantes k_{1a} et k_{1c} sont dépendantes du potentiel de l'électrode et représente les transferts d'électrons interfaciaux lorsqu'un électron entre (k_{1a}) ou quitte l'enzyme (k_{1c}). Par ailleurs, les fréquences catalytiques de cycles (TOF) sont définies par les constantes k_{2a} pour l'oxydation d'H₂ et k_{2c} pour la réduction des protons. Si le catalyseur est très actif, ces valeurs seront très élevées.

Les constantes cinétiques présentées ci-dessus sont dépendantes de l'équation (5) suivante :

$$j = j_{lim} \frac{e_1 - e_2}{1 + e_1 + p e_1^\alpha} \quad (5)$$

Les valeurs de e_1 , e_2 , p , j_{lim} et α sont définies ci-dessous :

- e_1 est lié aux transferts d'électrons interfaciaux et est défini par l'équation (6) :

$$e_1 = \frac{k_{1a}}{k_{1c}} = \exp \left[\frac{F}{RT} (E - E_{Ox/Red}^0) \right] \quad (6)$$

avec E , le potentiel de l'électrode et $E_{Ox/Red}^0$ est le potentiel standard du site actif de l'enzyme impliquée dans la catalyse, F le Faraday, R la constante des gaz parfaits.

- e_2 est le biais catalytique, qui regroupe les transferts d'électrons intramoléculaires nécessaires à la catalyse d'oxydation d'H₂ et de réduction des protons. Cette grandeur est définie suivant l'équation (7) :

$$e_2 = \frac{k_{2c}}{k_{2a}} = \exp \left[-\frac{2F}{RT} (E_{Ox/Red}^0 - E_{H^+/H_2}) \right] \quad (7)$$

avec E_{H^+/H_2} le potentiel d'équilibre du couple H⁺/H₂ qui varie avec le pH et la pression partielle en H₂.

- p est le rapport de la somme des constantes catalytiques k_{2a} et k_{2c} sur k_0 , la constante hétérogène de transfert d'électrons. p est donné dans l'équation (8) :

$$p = \frac{k_{2a} + k_{2c}}{k_0} \quad (8)$$

- j_{lim} est la densité de courant maximale d'oxydation ou de réduction, décrite dans l'équation (9) pour une catalyse d'oxydation d'H₂ :

$$j_{lim} = F\Gamma k_{2a} \quad (9)$$

où Γ est la concentration surfacique en catalyseur.

- α est le coefficient de transfert égal à 0,5.

Ainsi, ce modèle a servi à l'étude des procédés réversibles de réduction des protons dans le cas où une hydrogénase est absorbée à la surface d'une électrode. Pour la première fois, il a été adapté pour un catalyseur moléculaire immobilisé sur surface.

II.2.D (ii) Application du modèle cinétique au complexe [Ni(Cy,Arg)₂]

Le modèle simplifié de F. Armstrong a été adapté pour le complexe [Ni(Cy,Arg)₂] immobilisé sur une électrode de carbone vitreux modifiée par un film de SWnCOOH. Dans ce cas, le transfert d'électron interfacial implique la mise en jeu simultanée de deux électrons afin de réduire l'espèce Ni(II) en [Ni(O)-H₂].

Le modèle cinétique propre au complexe de nickel est présenté en Figure chap.II-13.

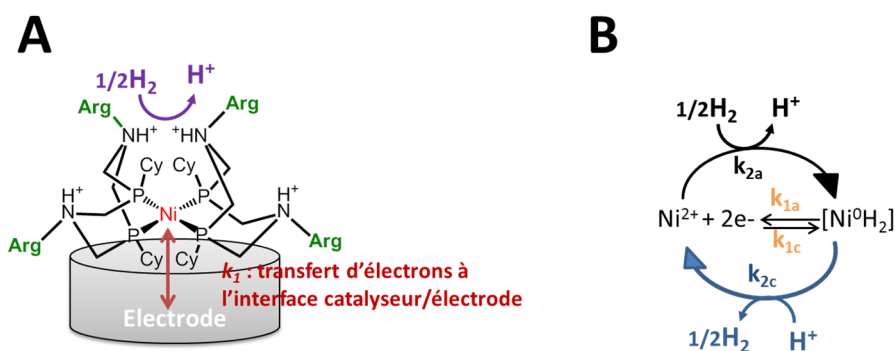


Figure chap.II-13 : (A) Transferts d'électrons intervenant lorsque le complexe de nickel est immobilisé sur électrode. (B) Modèle cinétique adapté au complexe de nickel réduit par un mécanisme à 2 électrons.

L'équation (5) devient donc :

$$j = j_{lim} \frac{\exp \left[\frac{2F}{RT} (E - E_{Ni^{II}/Ni^0H_2}^0) \right] - e_2}{1 + \exp \left[\frac{2F}{RT} (E - E_{Ni^{II}/Ni^0H_2}^0) \right] + p \left[\exp \left[\frac{2F}{RT} (E - E_{Ni^{II}/Ni^0H_2}^0) \right] \right]^{0,5}} \quad (10)$$

avec $e_2 = \exp\left[-\frac{2F}{RT}\left(E_{Ni^{II}/Ni^0H_2}^0 - E_{H^+/H_2}\right)\right]$ (11) et $j_{lim} = 2F\sigma k_{2a}$ (12).

La modélisation a été réalisée avec le logiciel Origin à partir de voltampérogrammes mesurés sous H₂ à différents pH. Les valeurs de j_{lim} , E_{H^+/H_2} , e_2 et p sont ajustées grâce au modèle de l'équation (10).

Malgré l'agitation de la solution par un barbotage continu en H₂ dans l'électrolyte, une limite de transport de masses peut intervenir à cause de la surface spécifique et de la porosité du film de NTCs. Ceci est parfois corrélé par l'observation d'un plateau de diffusion pour des courants catalytiques élevés. Dans ce cas, la modélisation est moins précise pour les potentiels éloignés des potentiels d'équilibre du complexe de nickel et les valeurs de k_{2a} (TOF) sont sous-estimées.

II.2.D (iii) Modélisation de la réponse catalytique du complexe de nickel immobilisé sur GC/SWnCOOH

Le complexe de nickel, immobilisé sur électrode de GC/SWnCOOH, a été étudié par voltampérométrie cyclique à différents pH (Figure chap.II-14A). La soustraction du courant capacitif des NTCs permet d'obtenir une réponse catalytique faradique pour chaque pH et facilite la modélisation. Les courbes en pointillés représentent l'allure du modèle, qui reproduit de manière fidèle la réponse catalytique expérimentale avec une valeur de R² égale à 0,99 pour chaque pH (Figure chap.II-14B). Ainsi, le modèle cinétique est applicable aux catalyseurs moléculaires.

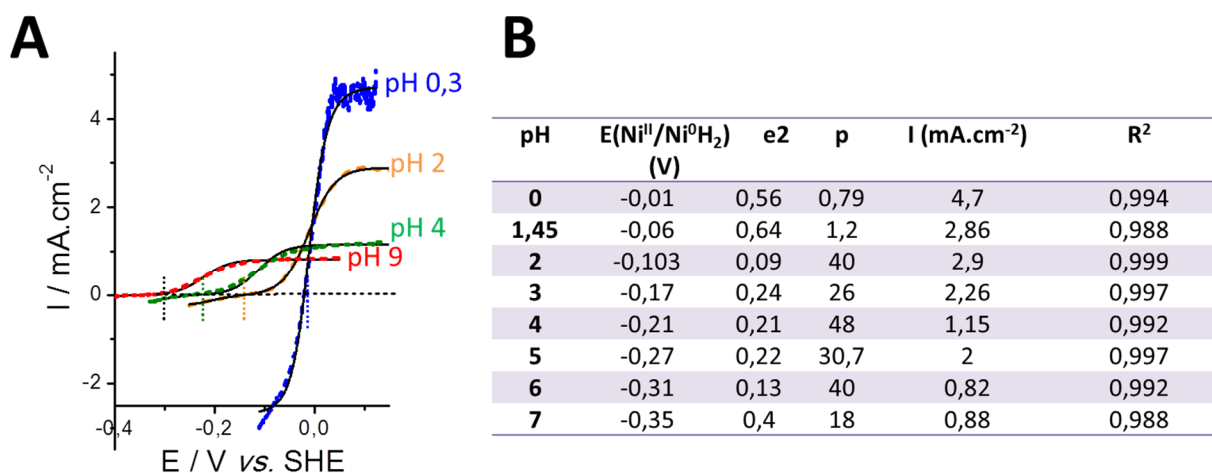


Figure chap.II-14 : (A) Voltampérométrie cyclique expérimentale (trait continu) et modélisée (trait discontinu) de l'électrode GC/SWnCOOH/[Ni(Cy,Arg)₂] réalisée à pH 0,3 ; 2 ; 4 et 9 sous H₂ après soustraction du courant capacitif des NTCs (0,2M tampon Britton-Robinson, 10 mV.s⁻¹, 25°C). (B) Paramètres calculés, pour chaque pH, après modélisation.

La modélisation nous a permis d'estimer des paramètres importants (Figure chap.II-14B) tels que le potentiel électrochimique du couple Ni^{II}/Ni⁰H₂ et le biais

catalytique e_2 , défini par l'équation 11. La surtension à différents pH est estimée à partir de l'équation suivante :

$$e_2 = \exp \left[-\frac{2F}{RT} \left(E_{Ni^{II}/Ni^0H_2}^0 - E_{H^+/H_2} \right) \right]$$

$$\Leftrightarrow E_{Ni^{II}/Ni^0H_2}^0 - E_{H^+/H_2} = \frac{RT}{2F} \ln(e_2) \quad (13)$$

La Figure chap.II-15A présente l'évolution du potentiel électrochimique estimée par le modèle en fonction du pH (trait gris). Cette dépendance est très proche de celle observée expérimentalement sous argon (triangle noir) et suit le même modèle de Nernst. La surtension en fonction du pH est tracée en Figure chap.II-15B à partir de l'équation 13. En dessous de pH 2, la surtension est inférieure à 10 mV. Lorsque le pH est compris entre pH 2 et 7, la surtension oscille entre 20 et 30 mV. En solution, une surtension minimale de 120 mV a été mesurée à pH 0,3.¹⁰¹ L'immobilisation du catalyseur nous rapproche des performances catalytiques de l'hydrogénase, qui fonctionne avec une surtension minimale proche de 0 mV. La catalyse hétérogène supportée améliore considérablement les transferts d'électrons et de protons jusqu'au centre métallique nickel.

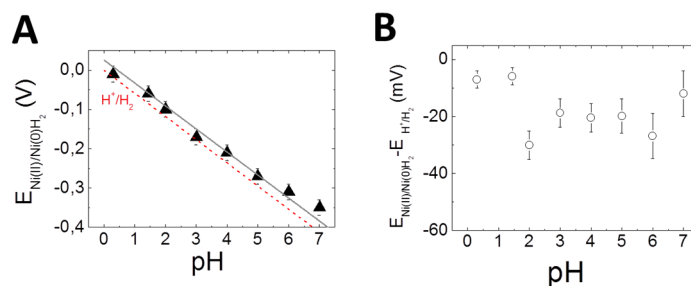


Figure chap.II-15 : (A) Dépendance du potentiel électrochimique expérimental du couple Ni(II)/Ni(0)H₂ en fonction du pH (triangle noir), fit obtenu à partir du modèle cinétique (trait gris) et superposition de l'évolution du potentiel redox du couple H⁺/H₂ (trait rouge discontinu). (B) Evolution de la surtension en fonction du pH obtenue à partir de l'équation 13.

La dépendance de la fréquence catalytique (TOF) en fonction du pH est présentée en Figure chap.II-16A. Un TOF maximal de 121 s⁻¹ est obtenu à pH 0,3. Les valeurs diminuent avec l'augmentation du pH pour atteindre 22 s⁻¹ à pH 7. Une tendance similaire a été mesurée en solution avec des TOF de 210 s⁻¹ et 40 s⁻¹ à pH 0 et 7 respectivement.¹⁰¹ Ces fréquences catalytiques de cycle sont de deux ordres de grandeurs plus faibles que les valeurs calculées pour les hydrogénases [NiFe].³⁴

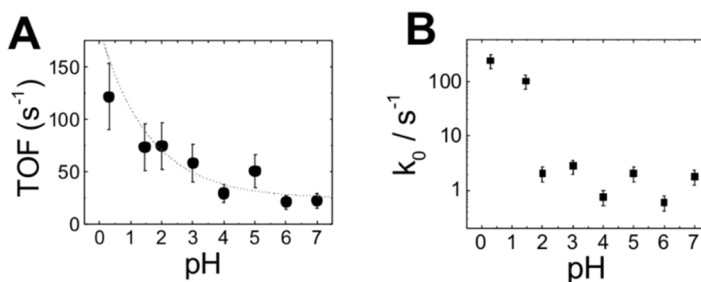


Figure chap.II-16 : (A) Evolution de la fréquence catalytique de cycle en fonction du pH. (B) Dépendance logarithmique de k_0 en fonction du pH.

Des densités de courant importantes ont été mesurées grâce à la nanostructuration de l'électrode, la concentration surfacique élevée et des transferts d'électrons hétérogènes (k_0) rapides (Figure chap.II-16B). A un pH inférieur à 2, les valeurs de k_0 augmentent de deux ordres de grandeur, tendance déjà observée sous argon (Figure II-16B). Ce résultat coïncide avec la catalyse réversible à pH acide, qui se déroule au potentiel d'équilibre du couple H⁺/H₂ (Figure chap.II-11A). Il a été mis en évidence que l'état de protonation de la molécule influence le biais catalytique. Les valeurs de pK_a, calculées par titration, sont les suivantes : 2,5 pour les groupements –COOH, 7 pour les bases pendantes amines et 12,5 pour le guanidium.¹⁰¹ Ainsi, plus le pH augmente, plus la molécule passe d'un état protoné à déprotoné et les sources de relais de protons, portées par les arginines, ne sont plus alimentées. Ceci pourrait expliquer les densités de courants d'oxydations plus faibles à pH neutre et basique. Comme postulé en solution,^{101,102,104} la protonation des acides carboxyliques (pK_a = 2,5) à pH acide favorise les mécanismes PCET et augmente les performances catalytiques du complexe dans ces conditions. A contrario, lorsque le pH est supérieur au pK_a, les acides carboxyliques sont déprotonés en carboxylate, ce qui conduit à une diminution de l'activité catalytique.

II.3 APPROCHE BOTTOM-UP : FORMATION D'UN COMPLEXE DE NICKEL ASYMETRIQUE

II.3.A SYNTHÈSE DES DIFFÉRENTS COMPOSÉS SUR ÉLECTRODE DE NANOTUBES DE CARBONE

L'approche bottom-up a été validée très récemment par Huan *et al.*²⁸⁰ Dérivé des nanosciences pour l'assemblage de nano-objets, elle consiste à synthétiser le catalyseur directement sur un substrat donné en ajoutant les ligands et le métal en plusieurs étapes. Ceci a pour avantage de s'affranchir des étapes de synthèse du catalyseur et d'avoir accès de manière simple à de nouvelles espèces asymétriques par synthèse supportée. La Figure chap.II-17 schématise la complexation multi-étape d'un complexe de nickel asymétrique sur électrode de NTCs multifeuillets (MWCNT).

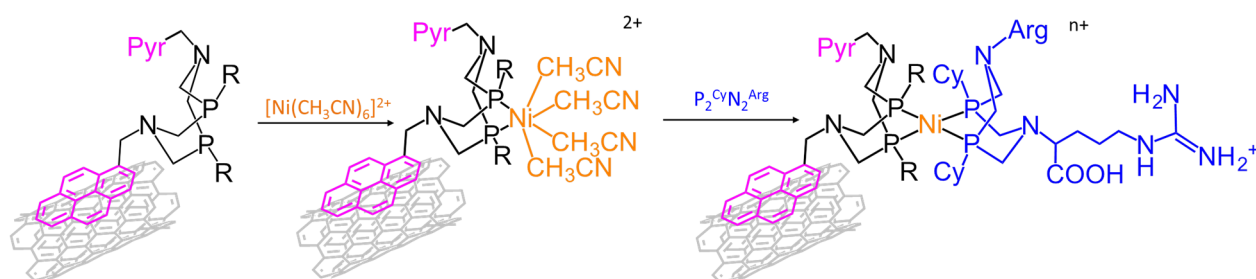


Figure chap.II-17 : Synthèse bottom-up du complexe de nickel asymétrique $[Ni(P_2^{Ph}N_2^{CH_2Pyr})(P_2^{Cy}N_2^{Arg})]^{n+}$, noté $[Ni(Ph,Pyr)(Cy,Arg)]^{n+}$, sur électrode de NTCs.

Une électrode de carbone vitreux est modifiée par un film de nanotubes de carbone multifeuillet (MWCNT), d'une épaisseur d'environ 400 nm, obtenu par drop-

coating après séchage sous-vide. L'électrode de MWCNT est plongée, pendant 45 minutes, dans une solution à 3 mM de ligand $P_2^{Ph}N_2^{CH_2Pyr}$. Après rinçage, l'électrode est ensuite plongée dans une solution à 0,3 mM en précurseur de nickel hexa-acétonitrile pour conduire à la formation du complexe $[Ni(Ph,Pyr)(CH_3CN)_4]$. Enfin, une dernière étape de complexation avec le ligand bisphosphine arginine $P_2^{Cy}N_2^{Arg}$ (3 mM dans du DMF) permet la synthèse du complexe asymétrique $[Ni(Ph,Pyr)(Cy,Arg)]$.

II.3.B CARACTERISATIONS ELECTROCHIMIQUES

Après synthèse bottom-up, chaque catalyseur est étudié par analyse électrochimique dans un tampon Britton-Robinson à 0,2M, sous argon, puis en présence d'H₂ par barbotage continu dans la solution.

II.3.B (i) *Caractérisation du complexe asymétrique $[Ni(Ph,Pyr)(Cy,Arg)]$*

Le complexe asymétrique $[Ni(Ph,Pyr)(Cy,Arg)]$ est étudié par voltampérométrie cyclique à pH4 (Figure chap.II-18A). En présence d'argon, deux pics rédox réversibles apparaissent autour de -0,15 V vs SHE correspondant au système rédox Ni(II)/Ni(0)H₂ vu précédemment. Sous H₂, une vague catalytique d'oxydation apparaît au potentiel rédox de cette espèce, démontrant sa capacité à oxyder H₂ en protons. Le plateau catalytique obtenu à partir de 0 V permet de déterminer la densité de courant d'oxydation maximale, I_{max} , égale à 2400 $\mu A.cm^{-2}$ à pH4.

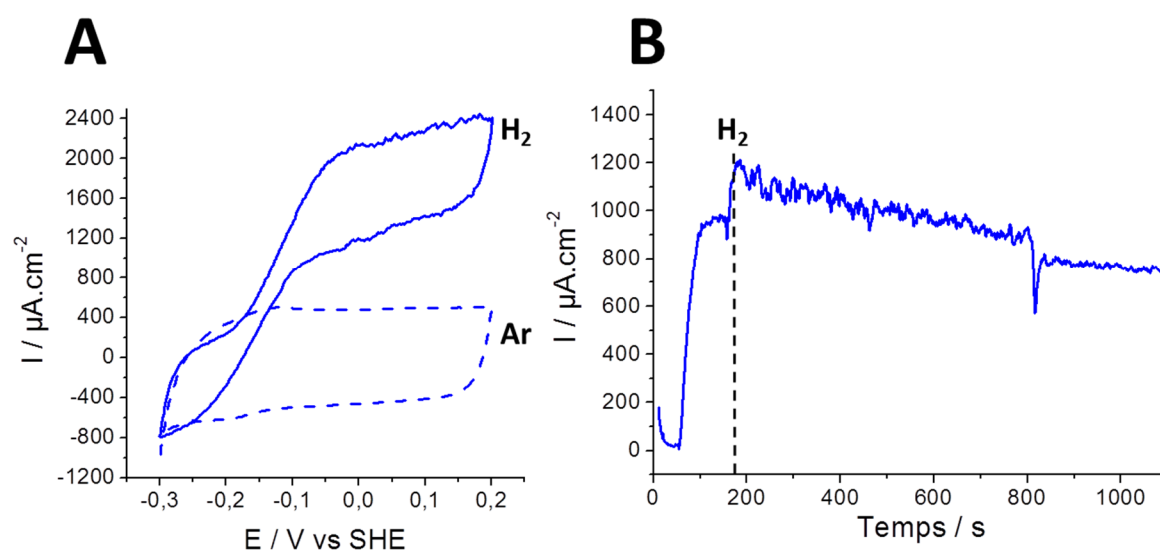


Figure chap.II-18 : (A) Voltampérogramme cyclique du complexe CNT/[Ni(Ph,Pyr)(Cy,Arg)] sous argon (courbe discontinue bleue) et H₂ (trait plein bleu) dans un tampon BR à pH 4 (25°C, 10mV/s). (B) Chronoampérométrie à 0,1V vs SHE dans un tampon BR à pH 4 sous argon, puis H₂. L'ajout d'H₂, après 100 secondes, est indiqué par un trait noir discontinu.

Afin de s'assurer de la stabilité du catalyseur, une chronoampérométrie est effectuée à un potentiel fixe de 0,1V vs SHE pendant 1000 secondes (Figure chap.II-118

18B). En présence d'H₂, **[Ni(Ph,Pyr)(Cy,Arg)]** atteint un courant catalytique de l'ordre de 800 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ après 1000 secondes. Les performances de ce complexe sont du même ordre de grandeur que le catalyseur **[Ni(Cy,Arg)₂]** présenté précédemment.

II.3.B (ii) *Contrôle de la formation du dérivé asymétrique*

Afin de réaliser un contrôle de la formation du dérivé asymétrique, nous avons également réalisé la fonctionnalisation de l'électrode de NTCs en présence de précurseur **[Ni(CH₃CN)₆]²⁺**, puis du ligand bisarginine **P₂CyN₂Arg**, c'est-à-dire sans l'étape d'incubation du ligand pyrène. Ainsi, deux structures possibles peuvent se former à la surface, suivant la Figure chap.II-19 : le complexe homoleptique **[Ni(Cy,Arg)₂]** et le complexe hétéroleptique **[Ni(Cy,Arg)(CH₃CN)₄]ⁿ⁺**.

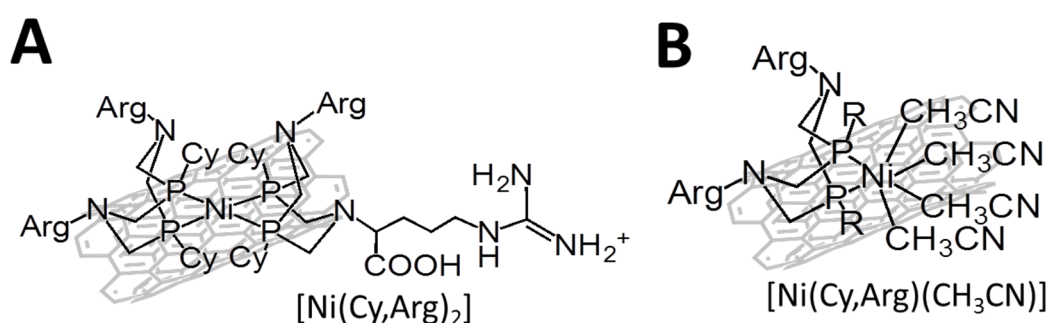


Figure chap.II-19 : Structures possibles formées sur l'électrode de MWCNTs après incubation du ligand **P₂CyN₂Arg** et du précurseur **[Ni(CH₃CN)₆]²⁺** : (A) le complexe homoleptique **[Ni(Cy,Arg)₂]ⁿ⁺** ; (B) le complexe hétéroleptique **[Ni(Cy,Arg)(CH₃CN)₄]ⁿ⁺**.

De manière surprenante, les voltampérométries cycliques sous argon et H₂ sont très similaires (Figure chap.II-20A). Sous argon, deux pics rédox réversibles pour l'oxydation de Ni(o)H₂ en Ni(II) et la réduction de Ni(II) en Ni(o)H₂ sont décrits à un potentiel électrochimique de -0.11V vs SHE pour le dérivé phényle pyrène et -0.10 V vs SHE pour le dérivé monosubstitué. Ces valeurs, très proches, montrent que la sphère de coordination du nickel est similaire.

Grâce à l'intégration de l'aire sous les pics, il est possible de déterminer les concentrations surfaciques σ . Une faible vague de réduction des protons autour de -0,3 V vs SHE est produite, ce qui conduit à une aire plus importante pour le pic d'oxydation comparé au pic de réduction. Pour plus de précision, les concentrations surfaciques seront donc calculées à partir des courants faradiques de réduction. Ainsi, une concentration de 14 $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ est obtenue pour **[Ni(Ph,Pyr)(Cy,Arg)]** contre 7 $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour **[Ni(Cy,Arg)(CH₃CN)₄]** (Figure chap.II-20C).

Le barbotage d'H₂ dans l'électrolyte conduit à une vague d'oxydation d'H₂ quasiment superposable pour les deux complexes (Figure chap.II-20B). Ainsi, les études électrochimiques démontrent que ces molécules ont des comportements proches avec des $E_{1/2}$ et E_{onset} identiques, ainsi que des performances catalytiques

similaires. La formation du complexe asymétrique par approche bottom-up n'est donc pas confirmée. Des expériences contrôles ont montré que les précurseurs **CNT/[Ni(Ph,Pyr)(CH₃CN)₄]** et **CNT/[Ni(CH₃CN)₆]** ne sont pas actifs en présence d'H₂. Des analyses de caractérisations de surface par XPS ou EXAFS détermineraient la structure de l'espèce catalytique formée par bottom-up.

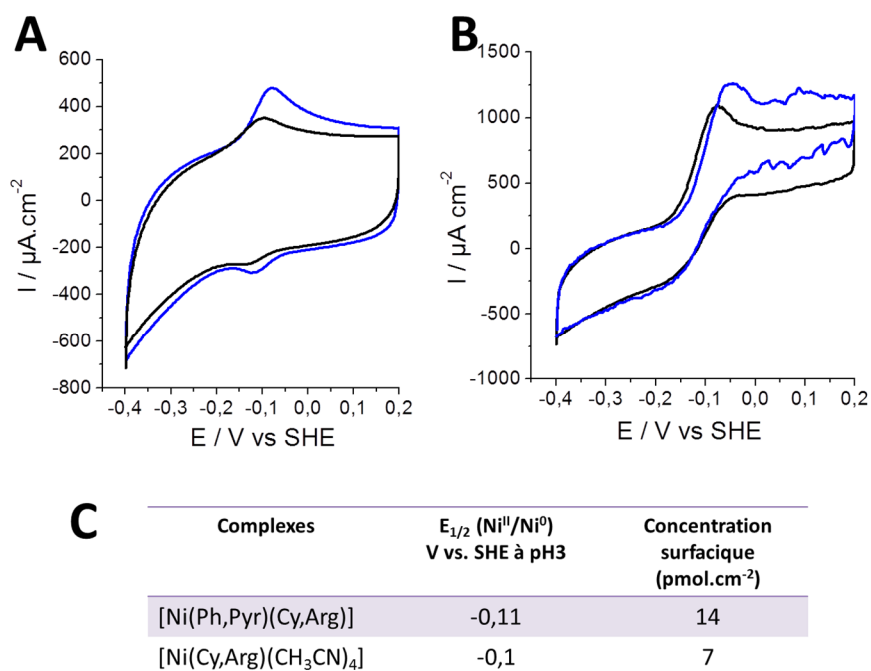


Figure chap.II-20 : (A) Voltampérométries cycliques sous argon des complexes CNT/[Ni(Ph,Pyr)(Cy,Arg)] (courbe bleue) et CNT/[Ni(Cy,Arg)(CH₃CN)₄] (courbe noire) dans un tampon Britton-Robinson à pH 4 sous argon et (B) H₂. (C) Tableau récapitulatif des potentiels électrochimiques et concentrations surfaciques pour chaque catalyseur immobilisé

II.4 CONCLUSION

Deux techniques d'immobilisations ont été mises en avant. La synthèse bottom-up du complexe asymétrique **[Ni(Ph,Pyr)(Cy,Arg)]** a révélé des caractérisations électrochimiques similaires à la formation d'un catalyseur de nickel ne comportant pas de groupements pyrènes. Ces résultats suggèrent que le complexe de nickel bis-arginine **[Ni(Cy,Arg)₂]** est formée à la surface de l'électrode de NTCs.

Le complexe bio-inspiré **[Ni(Cy,Arg)₂]**, catalyseur d'oxydation d'H₂, a été immobilisé par interactions électrostatiques sur SWCNT modifiées par un groupement acide 2-aminonaphtoïque. L'étude du complexe immobilisé, sous argon, a révélé que la réduction du Ni^{II} en Ni⁰ est associée aux transferts de deux protons afin de former une espèce diprotonée Ni⁰-H₂. En présence d'H₂, la catalyse d'oxydation s'est révélée beaucoup plus efficace à des valeurs de pH < 2. Une densité de courant de 16 mA.cm⁻² a été mesurée dans ces conditions. Les performances du complexe immobilisé

ont été modélisées en adaptant le modèle de F. Armstrong, décrit pour les hydrogénases. Ceci nous a permis d'estimer un TOF de 121 s⁻¹ et une surtension inférieure à 10 mV pour l'oxydation d'H₂ à pH 0,3. L'activité exceptionnelle du catalyseur dans ces conditions semble liée à la protonation des groupements acides carboxyliques à pH < 2,5, qui jouent un rôle prépondérant de relais de protons.

L'activité de **[Ni(Cy,Arg)₂]** dans des conditions acides fortes, le révèle comme un candidat idéal pour son intégration dans une pile à combustible à membrane échangeuse de protons. Les résultats sont présentés dans la section suivante.

III. INTEGRATION DU COMPLEXE DE NICKEL DANS UNE PEMFC

III.1 INTRODUCTION

Les PEMFCs faibles températures, sont un type de piles à combustible qui fonctionnent à une température inférieure à 120°C. L'anode et la cathode sont composées d'électrodes de type GDL à base de Pt/C. L'oxydation de l'hydrogène en protons (HOR) se produit à l'anode. Les électrons produits transitent vers la cathode, où a lieu la réduction de l'oxygène en eau (ORR). Le flux de protons passe de l'anode vers la cathode via la membrane échangeuse de protons (Figure chap.II-21). Cet électrolyte solide est souvent composé d'une membrane de Nafion, qui est un polymère de tétrafluoroéthylène sulfonate. La compression de l'anode, la membrane et la cathode forme l'assemblage membrane/électrodes (AME). Dans l'industrie, plusieurs AMEs sont empilés les uns sur les autres pour former un stack. Dans notre étude, la pile sera composée d'un unique AME.

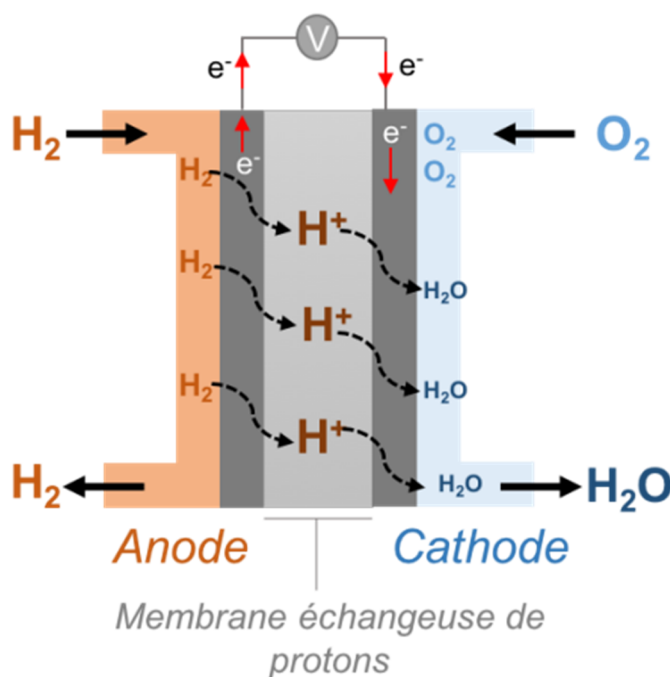


Figure chap.II-21 : Schéma d'une pile à combustible à membrane échangeuse de protons (PEMFC).

Afin de tester les performances de notre PEMFC dans les meilleures conditions, nous avons mis en place un banc de tests au laboratoire. Ce dernier a été évalué grâce à l'élaboration d'une première pile Pt/Pt, qui a servi de référence pour les expériences à venir. Quant au complexe de nickel $[\text{Ni}(\text{Cy},\text{Arg})_2]$, il a été intégré en tant qu'anode dans la PEMFC avec une électrode de Pt/C à la cathode.

III.2 MISE EN PLACE D'UN BANC DE TEST POUR LES PEMFC

III.2.A LA PEMFC UTILISEE AU LABORATOIRE

Une pile à combustible de 5 cm², représentée en Figure chap.II-22, a été utilisée pour toutes les expériences de PEMFC. Elle est composée :

- de deux plaques terminales en acier ;
- de deux collecteurs de courant, qui servent à prendre le contact électrique au niveau de l'anode et de la cathode ;
- de deux plaques bipolaires en graphite, sur lesquelles reposent les électrodes. La présence de serpentins assure la diffusion des gaz à travers la surface catalytique ;
- d'une entrée et sortie de gaz de chaque côté de la pile, indépendante du gaz introduit.

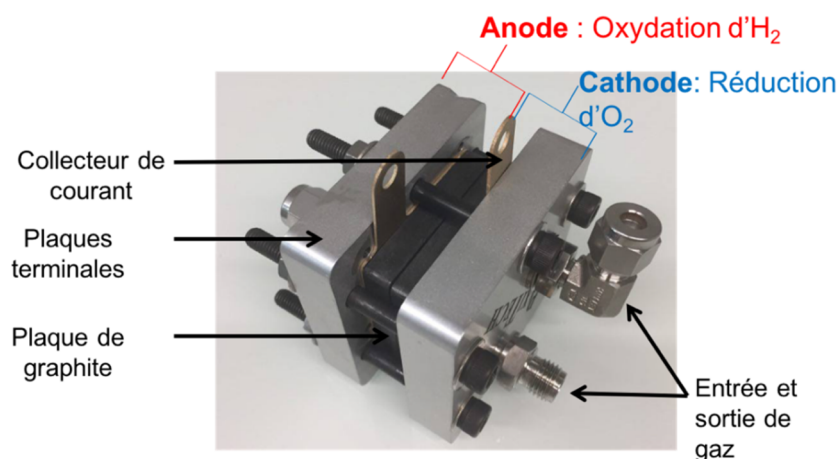


Figure chap.II-22 : Photographie de la PEMFC, de 5 cm² de côté, utilisée au laboratoire.

Les performances de la pile dépendent de plusieurs facteurs : (1) la pression en gaz entrante ; (2) l'activité catalytique ; (3) la force de serrage de la pile, généralement fixée à 4 newtons ; (4) la compression à chaud de l'assemblage membrane électrode ; (5) l'activation de la membrane de Nafion par un procédé chimique ; (6) le taux d'humidité en gaz dans la pile.

III.2.B MISE EN PLACE D'UN BANC DE TEST AU LABORATOIRE

Afin de contrôler le taux d'humidité, nous utilisons un barboteur qui humidifie le gaz avant son entrée dans la pile (Figure chap.II-23A). Rempli d'eau, le barboteur est placé dans un bain thermostaté afin de chauffer le gaz entrant, ce qui permettra de garder la température de la pile constante après l'entrée du gaz.

La mise en place d'un banc de test au laboratoire (Figure chap.II-23B) nous permet de contrôler des paramètres importants qui peuvent influencer les

performances de la pile à combustible. Il est composé d'un barboteur pour chaque gaz : l'air comprimé et l'hydrogène. Le panneau de contrôle assure la régulation du débit fixé à 100 mL.mn⁻¹ pour l'anode et la cathode. La pression des gaz est égale à 1 atmosphère car les sorties de gaz sont ouvertes.

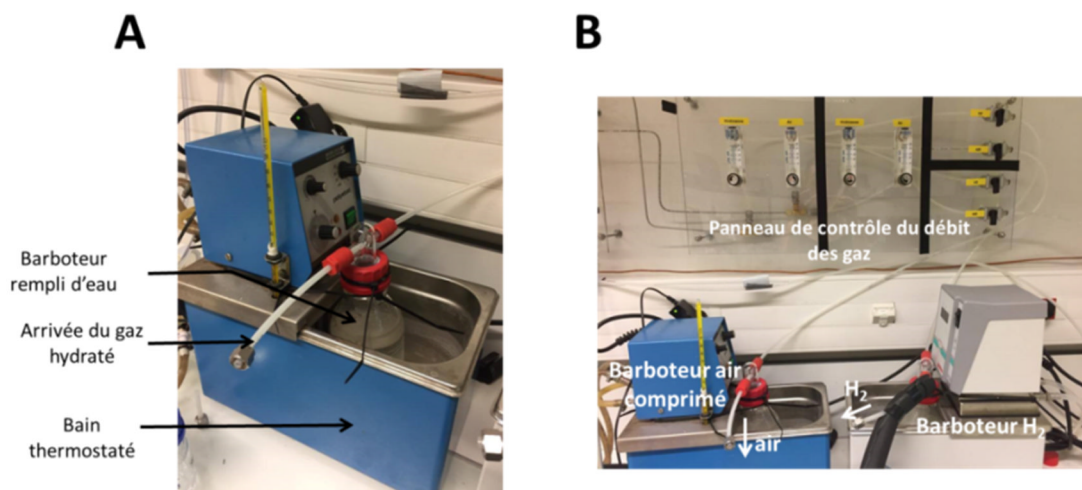


Figure chap.II-23 : (A) Barboteur pour hydrater les gaz. (B) Banc de test pour pile à combustible installé au laboratoire.

III.2.C CONTROLE DU TAUX D'HUMIDITE

Dans la PEMFC, les gaz entrants nécessitent d'être d'hydratés afin d'assurer un minimum d'humidité au niveau de la membrane de Nafion et permettre à la pile de produire une quantité d'eau suffisamment importante pour avoir de bons rendements énergétiques.

Le taux d'humidité relative (RH), valable à n'importe quelle pression et température, est défini comme le ratio de la pression de vapeur d'eau (P_{H_2O}) sur la pression de vapeur saturante de l'eau ($P_{S_{H_2O}}$) à la température du gaz entrant :

$$RH (\%) = \frac{P_{H_2O}}{P_{S_{H_2O}}} \times 100 \quad (14)$$

Dans notre cas, la pression des gaz est fixée à 1 atmosphère. Par ailleurs, la température des barboteurs est toujours à la même température que la pile : l'humidité relative est donc toujours égale à 100 %.

Les valeurs de RH pour les PEMFC industriels sont comprises entre 30 et 100 %. Elles dépendent essentiellement de la compacité de la pile : une taille réduite nécessite des systèmes d'évacuations d'eau peu encombrant, l'humidité relative sera donc faible.

III.3 DESIGN D'UNE PEMFC Pt/Pt

III.3.A ACTIVATION DE LA MEMBRANE DE NAFION

La formule chimique du Nafion est représentée en Figure chap.II-24A. Les différents types de membrane sont définis suivant des propriétés de taille, de quantité d'eau contenue dans la membrane, et d'absorption. Nous avons travaillé avec du Nafion 212 (Figure chap.II-24B), qui a une épaisseur de 50 µm. La quantité de molécules d'eau présente dans cette membrane est de 5%. Soumis à un flux de gaz hydraté, le Nafion 212 aura tendance à s'étirer de façon latérale et longitudinale pour atteindre un facteur de grandissement de 15%, si son taux d'absorption en eau, égale à 50%, est maximal. Ainsi, une membrane de Nafion trop épaisse, augmente la distance entre l'anode et la cathode et donc la chute ohmique. A contrario, une membrane de Nafion fine est difficile à manipuler. Si le taux d'absorption est trop important, des phénomènes de cassures membranaires peuvent apparaître et rendre le transport des protons totalement inefficace.

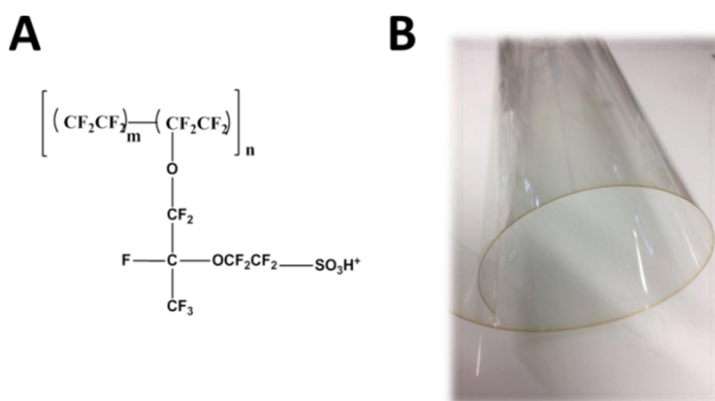


Figure chap.II-24 : (A) Formule chimie du polymère de nafion. (B) Photographie d'un rouleau de membrane de nafion 212.

Pour fonctionner de façon optimale, la membrane de nafion est préalablement activée. Elle est plongée dans plusieurs bains successifs : (1) 5% H₂O₂, (2) eau ultra-pure, (3) 8% H₂SO₄ à une température de 80°C, afin d'être dopée en protons. Une fois le traitement effectué, elle est conservée dans un bain d'eau ultra-pure pour éviter qu'elle ne sèche.

III.3.B PERFORMANCES DE LA PEMFC Pt/Pt

Deux électrodes de GDE Pt/C (0,5 mg.cm⁻²), commerciales provenant de chez Paxitech, d'une surface de 2 cm², ont été introduites dans la pile à combustible. La membrane de Nafion a été préalablement dopée à l'acide sulfurique en suivant le protocole décrit précédemment. Ne disposant pas d'une presse chauffante, l'assemblage membrane/électrode a été réalisé à froid. La montée en température

progressive de la pile a permis de le fixer au mieux. La température des barboteurs, fixée à la même température que la PEMFC, est de 60°C. Ainsi, le taux d'humidité RH est de 100%. Les débits en gaz de l'ordre de 100 mL.mn⁻¹ sont les mêmes à l'anode et à la cathode (Figure chap.II-25A).

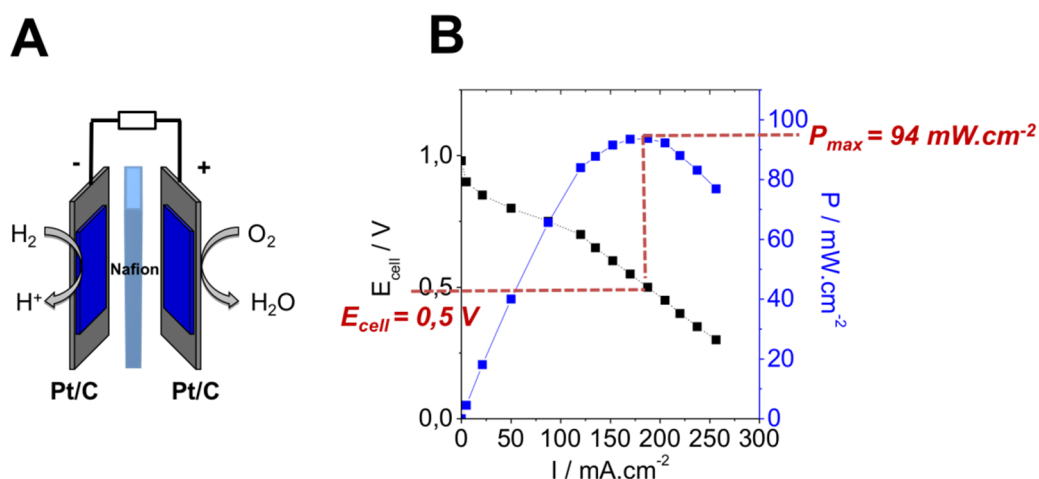


Figure chap.II-25 : (A) Schéma d'une PEMFC classique. (B) Courbes de puissance (bleu) et de polarisation (noir) d'une PEMFC Pt/Pt sous H₂ et air comprimé, réalisées à 60°C. Conditions : Température des barboteurs de gaz fixée à 60°C, composition en Pt de 0.5 mg.cm⁻², débit en gaz : 100 mL.mn⁻¹, pression en gaz : 1 atm

Les courbes de puissance et polarisation ont été tracées par décharges galvanostatiques constantes, c'est à dire qu'un courant a été appliqué entre l'anode et la cathode afin de mesurer la tension résiduelle. La force électromotrice égale à 1,0V, est proche de la valeur thermodynamique de 1,23 V attendue. Une puissance maximale de 94 mW.cm⁻² à une tension de 0,51 V est obtenue (Figure chap.II-25B). L'allure de la courbe de polarisation nous donne des informations concernant les facteurs limitant les performances de la PEMFC :

- à faible densité de courant, la pente de la courbe de polarisation est importante, ce qui signifie qu'une énergie d'activation est nécessaire afin d'activer les surfaces catalytiques à l'anode et à la cathode ;
- dans la région de polarisation ohmique, comprise entre 25 et 200 mA.cm⁻², la tension chute rapidement : le système est résistif. Les flux d'ions et d'électrons dans la PEMFC ne sont donc pas optimales ;
- la zone de transfert de masse, initialement située à des densités de courants importantes, est confondue avec la zone de chute ohmique. Dans notre cas, nous la définissons pour des densités de courant supérieures à 200 mA.cm⁻², valeur à partir de laquelle la densité de puissance de la pile commence à chuter. Ainsi, le transport de matière sur les sites catalytiques devient limitant.

Ces valeurs rendent compte des performances maximales obtenues avec notre banc de test, la PEMFC, la membrane de Nafion et avec du platine en tant que catalyseur. Elles serviront de références pour les futures expériences.

III.4 PERFORMANCES DU COMPLEXE DE NICKEL [Ni(Cy,Arg)₂] DANS LA PEMFC

III.4.A PERFORMANCE DU COMPLEXE DE NICKEL PAR RAPPORT AU PLATINE

Le complexe de nickel oxyde l'hydrogène en protons à une densité de courant de 20 mA.cm⁻¹ dans une solution d'acide sulfurique à 0,5M. Ce résultat a été comparé avec une électrode de Pt/C (0,5 mg.cm⁻²), qui oxyde H₂ dans les mêmes conditions (courbe noire, Figure chap.II-26A). La catalyse réversible, à -0,014 V vs SHE, conduit à une densité de courant d'oxydation d'environ 100 mA.cm⁻² à 0V vs SHE. Cette valeur est cinq fois supérieure à celle obtenue pour le complexe de nickel.

La charge en complexe de nickel, estimée à 0,3 µg.cm⁻², est 3 × 10³ fois plus faible que la quantité de nanoparticules de platine, de l'ordre de 1 mg.cm⁻². Afin de juger au mieux des performances, une échelle logarithmique du ratio de la densité de courant à pH 0,3 en fonction de la charge en catalyseur est présentée en Figure chap.II-26B. La conclusion évidente est que l'activité catalytique du complexe de nickel est plus importante. Une concentration très faible en catalyseur permet d'atteindre des densités de courant très élevées. Ce dernier est 1,5 fois plus actif pour l'oxydation d'H₂ que l'électrode de Pt/C, fortement chargée en catalyseur.

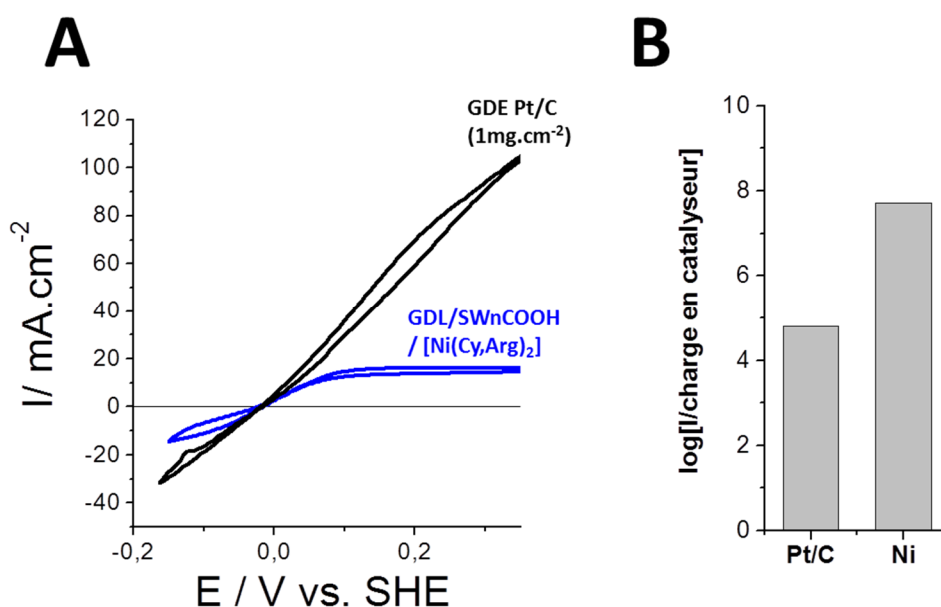


Figure chap.II-26 : (A) Voltampérométrie cyclique des électrodes de GDL/SWnCOOH/[Ni(Cy,Arg)₂] (courbe bleue) et Pt/C (courbe noire) sous H₂ à pH 0,3 (0,5M H₂SO₄, 10 mV.s⁻¹, 25°C). (B) Echelle logarithmique du courant généré en fonction de la charge en catalyseur pour l'oxydation d'H₂ à pH 0,3 pour Pt/C et le complexe de nickel.

Les recherches actuelles se concentrent sur la réduction de la quantité de platine à l'anode et à la cathode, afin de réduire les coûts. Cette expérience démontre que le complexe de nickel répond parfaitement à ce critère. Ainsi, son utilisation dans des proportions optimales pourrait permettre d'égaliser les performances catalytiques du platine.

III.4.B DESIGN D'UNE PEMFC Ni/PT

Après immobilisation sur une électrode de GDL modifiée par un film de SWnCOOH, le complexe de nickel **[Ni(Cy,Arg)₂]** a été intégré dans la PEMFC. La cathode est une électrode de Pt/C (1 mg.cm⁻²) (Figure chap.II-27A). Les températures de fonctionnement de la pile et des barboteurs, fixées à 60°C, assurent un taux d'humidité de 100%.

La Figure chap.II-27B présente les résultats obtenus pour la PEMFC Pt/Ni. La force électromotrice de 0,90V est 100 mV plus faible que celle mesurée avec la pile Pt/Pt. Une densité de puissance maximale de 14 mW.cm⁻² a été obtenue à une tension de 0,45V. La zone de polarisation ohmique, qui s'étend de 5 à 30 mA.cm⁻², révèle une résistivité importante. En effet, la réalisation de l'AME à froid n'est pas optimale pour le contact électrique entre l'anode et la cathode. De plus, la température de la pile de 60°C se révèle assez faible : le Nafion transporte les protons de façon optimale à une température supérieure à 100°C. De plus, l'anode est l'électrode limitante.

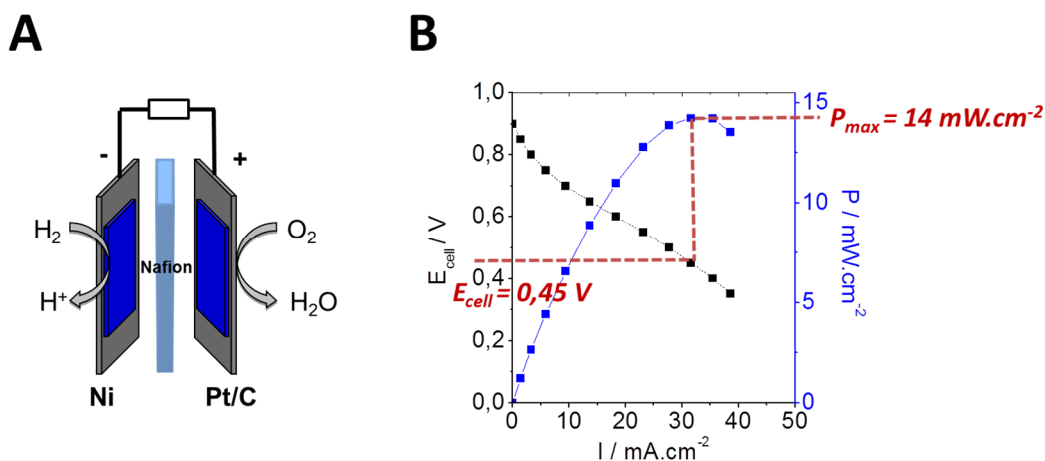


Figure chap.II-27 : (A) Schéma de la PEMFC avec le complexe de nickel à l'anode et une électrode de Pt/C (1mg.cm⁻²) à la cathode. (B) Courbes de puissance (bleu) et de polarisation (noir) d'une PEMFC Ni/Pt sous H₂ et air comprimé, réalisées à 60°C. Conditions : température des barboteurs de gaz fixée à 60°C, composition en Pt de 0.5 mg.cm⁻², débit en gaz : 100 mL.mn⁻¹, pression en gaz : 1 atm.

Afin d'évaluer la stabilité de la pile dans la zone ohmique, nous avons effectué des décharges potentiostatiques, en appliquant une tension de 0,75V aux bornes pendant 2000 secondes, sur trois jours consécutifs (Figure chap.II-28). La densité de courant générée chute de 4 à 3 mA.cm⁻² après le troisième jour. Le complexe de nickel est donc relativement stable en présence d'un électrolyte solide.

Finalement, la densité de puissance obtenue pour la pile Pt/nafion est seulement cinq fois inférieure à la valeur mesurée avec la PEMFC Pt/Pt. La stabilité du complexe de nickel, en absence d'électrolyte liquide, rend viable son utilisation à plus grande échelle dans des PEMFCs avec une surface supérieure à 5 cm². Par ailleurs, sa concentration surfacique inférieure au μg.cm⁻² donne de bonnes perspectives pour augmenter le ratio rendement/concentration

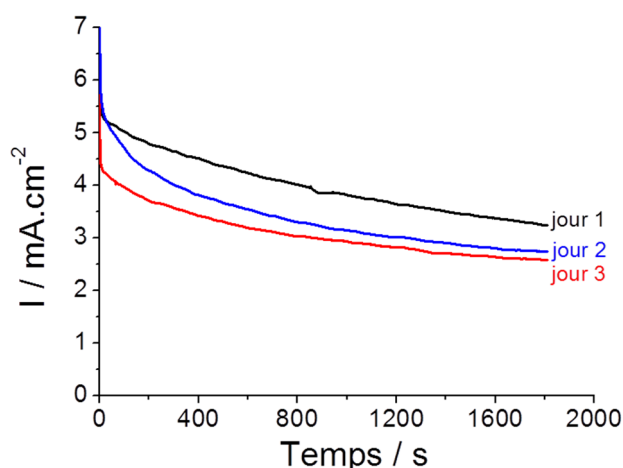


Figure chap.II-28 : Chronopotentiométrie, appliquée aux bornes de la pile Ni/Pt, à une tension de 0,75V et réalisée pendant trois jours consécutifs.

III.5 CONCLUSION

Une PEMFC de 5cm^2 a été utilisée pour réaliser des tests avec deux électrodes de Pt/C, d'une concentration en platine de $1\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$, à l'anode et à la cathode. Une densité de puissance de $100\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ et une f.e.m de 1V ont alors été obtenues à 60°C . Dans les mêmes conditions, le complexe de nickel a été placé à l'anode. Une densité de puissance de $14\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ et une f.e.m de 0,8V ont alors été mesurées. Cette valeur, seulement cinq fois inférieure à la puissance obtenue avec la pile Pt/Pt, confirme que le catalyseur de nickel serait une très bonne alternative au platine. Par ailleurs, la comparaison de la charge en catalyseur par rapport aux densités de courant, démontrent que le complexe de nickel est deux fois plus performant que le platine à pH 0,3.

IV. CONCLUSION GENERALE

La collaboration menée avec l'équipe de Wendy J. Shaw nous a permis de tester les performances du complexe **[Ni(Cy,Arg)₂]** en catalyse hétérogène supportée sur NTCs pour l'oxydation d'H₂. Deux techniques d'immobilisation ont été développées.

La première méthode d'immobilisation a permis de greffer le complexe **[Ni(Cy,Arg)₂]** sur électrode de NTCs monofeuillets modifiés par un groupement acide 2-aminonaphtoïque. Sous argon, un système rédox réversible est observé correspondant à la réduction de l'espèce nickel (II) en nickel (0) couplée au transfert de deux protons. D'après une étude effectuée sur une large gamme de pH, les performances catalytiques optimales ont été observées à pH acide. En effet, à pH 0,3, la densité de courant maximale est de 16 mA.cm⁻² avec une fréquence catalytique de cycle de 121 s⁻¹ et une surtension inférieure à 10 mV. La modélisation de la réponse électrochimique sous H₂ nous a permis de rationaliser le comportement du catalyseur immobilisé : la fréquence catalytique de cycle et la constante hétérogène de transfert d'électrons sont particulièrement élevées à pH acide. Cette valeur de pH correspondrait à la protonation des groupements carboxyliques, qui serait donc à l'origine de la catalyse plus efficace lorsque le pH < 2. L'approche bottom-up a permis la synthèse d'un complexe asymétrique **[Ni(Ph,Pyr)(Cy,Arg)]** à la surface d'une électrode de NTCs. Ce dernier, stable en chronoampérométrie, oxyde H₂ à des densités de courant de l'ordre de 1 mA.cm⁻² à pH4. Cependant, le complexe monosubstitué **[Ni(Cy,Arg)(CH₃CN)₄]**, synthétisé par la même méthode, a révélé un comportement électrochimique similaire au complexe asymétrique. Ceci laisse subsister un doute quant à la réelle formation de ce catalyseur à la surface de l'électrode. Des études de caractérisation de surface, de type EXAFS, pourrait permettre de confirmer ou d'infirmer la présence d'un catalyseur asymétrique et de déterminer la nature de l'espèce catalytique. Enfin, l'intégration du complexe de nickel, en tant qu'anode, dans une PEMFC a permis d'obtenir des densités de puissance élevée proche de 15 mA.cm⁻² avec une force électromotrice de 0,8V. La puissance obtenue avec une pile Pt/Pt dans les mêmes conditions, proche de 100 mW.cm⁻², est seulement cinq fois supérieure. La comparaison des performances catalytiques par rapport à la charge en catalyseur (0,3 µg.cm⁻² pour le nickel et 1 mg.cm⁻² pour le platine), démontre que le complexe de nickel est deux fois plus actif pour l'oxydation d'H₂ que le platine à pH 0,3.

Dans ce chapitre 2, nous avons démontré qu'un catalyseur moléculaire bio-inspiré pouvait approcher les performances catalytiques du platine pour l'oxydation d'H₂. La pile présentée utilise du platine à la cathode. L'une des perspectives serait de la remplacer par un complexe bio-inspiré des oxydases à cuivre, de type laccase ou BOD, afin de réaliser une pile biomimétique H₂/air. Par ailleurs, le complexe de nickel étant actif sur une large gamme de pH, avec des densités de courant proche de 10 mA.cm⁻² à pH 5, nous pourrions également l'associer avec une enzyme à la cathode

Chapitre III
DES BIOCATHODES
ENZYMATIQUES POUR LA
REDUCTION DE
L'OXYGENE A HAUT
POTENTIEL

I. Introduction Générale	134
I.1 Contexte.....	134
I.2 Immobilisations de LAC3 et de son mutant UNIK161 sur électrodes de nanotubes de carbone.....	136
I.3 Greffage sur nanotubes de carbone par une approche covalente	137
I.3.A Elaboration de plateformes « RAFT » et dendrimère	137
I.3.B Objectifs du chapitre	139
II. Stratégies d'immobilisations des laccases UniK et Lac3 sur Electrodes de nanotubes de carbone	140
II.1 Introduction.....	140
II.2 Elaboration d'électrodes à base de groupements azotures.....	141
II.2.A Techniques d'immobilisations mises-en-œuvres.....	141
II.2.A (i) Greffage de TABD sur électrodes de NTCs et carbones vitreux	141
II.2.A (ii) Greffage de TFBD sur électrodes de NTCs et carbone vitreux	142
II.2.B Cycloaddition de Huisgen pour le greffage d'une espèce Ethynylferrocène sur les différentes surfaces	143
II.2.B (i) Elaboration d'électrodes à base d'éthynylferrocène.....	143
II.2.B (ii) Caractérisations électrochimiques sur électrodes de carbone vitreux	144
II.2.B (iii) Caractérisations électrochimiques des électrodes de NTCs.....	147
II.2.C Conclusion.....	148
II.3 Cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen pour le greffage covalent d'enzymes modifiées par un groupement alcyne.....	148
II.3.A Elaboration de biocathodes à base d'enzymes Lac3 immobilisées par liaison covalente sur NTCs modifiés par TABD	148
II.3.A (i) Immobilisations des enzymes UniK161-alcyne et Lac3-alcyne sur Ph-N ₃	148
II.3.A (ii) Réduction bioélectrocatalytique de l'O ₂	149
II.3.A (iii) Modélisation de la réponse catalytique d'ORR.....	152
II.3.A (iv) Conclusion	155
II.3.B Elaboration de Biocathodes à base de Laccase immobilisées, par liaison covalente	156
II.3.C Quantification par microbalance a cristal de quartz (MCQ)	158
II.3.C (i) Principe.....	158
II.3.C (ii) Suivi de la formation de la couche de TABD	159
II.3.C (iii) Suivi du greffage covalent des enzymes.....	161
II.4 Conclusion.....	164
III. Vers le design de biopiles enzymatiques H₂/O₂	166
III.1 Introduction.....	166
III.2 La bilirubine oxydase en tant que bio-cathode enzymatique.....	166
III.2.A Les différents types de Bods utilisées.....	166
III.2.B Réduction bio-electrocatalytique de l'Oxygène	167
III.3 Design d'une pile hybride H₂/air [Ni(Cy,Arg)₂]/MνBOD.....	168
III.3.A Présentation de la pile.....	168
III.3.B Performances obtenues pour la pile hybride H ₂ / air.....	170
III.3.C Comparaison à une pile Pt/Pt a pH 5	170
III.4 Biopiles enzymatiques Hydrogenase/BOD.....	172
III.4.A Présentation de l'hydrogenase membranaire [NiFe] <i>aquifex aeolicus</i>	172

III.4.B	L'hydrogenase aquifex aeolicus en tant que bioanode enzymatique	173
III.4.C	Performances de la biopile enzymatique H ₂ /air	174
III.4.D	Comparaisons des performances de chaque catalyseur étudié	175
IV.	Conclusion générale	177

I. INTRODUCTION GENERALE

I.1 CONTEXTE

A la cathode des PEMFCs, la réduction de l'oxygène en eau est catalysée par des nanoparticules de platine. La charge catalytique d'environ $0,2 \text{ mg.cm}^{-2}$ est cinq fois plus importante qu'à l'anode. Le département de l'énergie des Etats-Unis a estimé que cette quantité devra être réduite d'un facteur 2 d'ici 2020 pour faire fonctionner une pile de 90 kW. Ainsi, les champs de recherche se concentrent majoritairement autour de la diminution de la quantité de platine ou son remplacement total à la cathode.

La réaction de réduction de l'oxygène en eau implique un mécanisme à $4\text{H}^+/4\text{e}^-$ et a lieu à un potentiel d'équilibre de $1,23 \text{ V}$ vs RHE. Dans la nature, les enzymes à cuivre sont impliquées dans diverses réactions métaboliques impliquant le dioxygène. Les oxydases à centre cuivres multiples, que nous nommerons MCOs pour « multicopper oxydases », réalisent la réduction irréversible du dioxygène à un potentiel rédox de $1,1\text{V}$ vs RHE pour les plus performantes.^{105,118,324} Leur capacité à fonctionner à des surtensions inférieures à 200 mV est essentiellement liée à leur site actif, qui est composé de quatre atomes de cuivre. Le site T1, centre mononucléaire de cuivre II, et lieu d'oxydation des substrats polyphénols, collecte les électrons pour les transférer au site trinuécléaire T2/T3. Ce dernier est le lieu de la réduction de l'oxygène en eau (Figure chap.III-1).

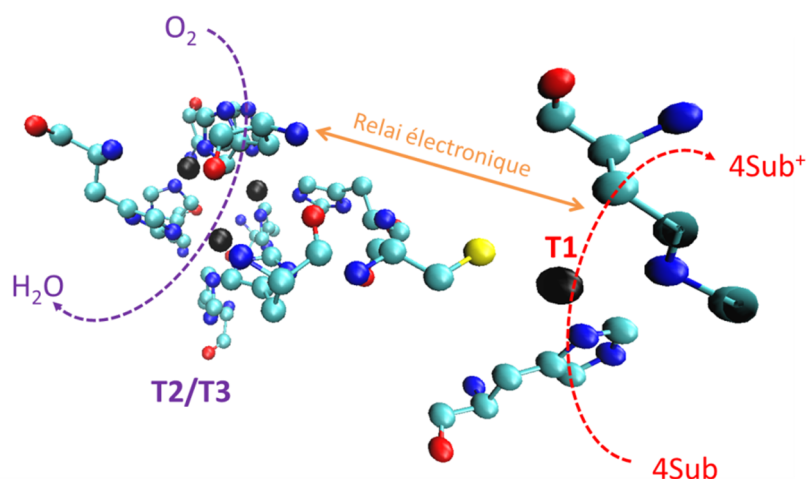


Figure chap.III-1 : Site actif commun aux MCOs.

Deux types de MCOs ont été largement étudiés en tant que biocathodes enzymatiques dans la littérature : (1) les laccases ; (2) les bilirubines oxydases. Le potentiel du centre cuivre T1 varie en fonction de l'organisme dans lequel l'enzyme est exprimée : $+ 1,08 \text{ V}$ vs RHE pour la laccase de *Trametes versicolor* (**TvLac**),^{116,125} ou $+ 0,99 \text{ V}$ vs RHE pour la bilirubine oxydase de *Myrothecium verrucaria* (**MvBOD**).²⁴⁴ Ainsi, le potentiel de la bioélectrode sera égal au potentiel d'équilibre

du site T1, si l'enzyme est connectée par TED à la surface de l'électrode. L'utilisation d'un médiateur pour réaliser un transfert électronique médié (TEM) engendre l'augmentation de la surtension, le potentiel de la bioélectrode est alors imposé par le potentiel rédox du médiateur.

L'orientation enzymatique amène le site actif de l'enzyme au plus proche de la surface de l'électrode afin d'atteindre un TED. Comme évoqué au cours du chapitre 1 (voir Chapitre IIV.4.C (iv)), la laccase de *Trametes versicolor* (Figure chap.III-2) a été connectée par de nombreuses approches covalentes ou non sur électrode de NTCs.¹²⁴ L'une des méthodes les plus employées consiste à l'utilisation de sa poche d'acides aminés hydrophobes proche du site T1. En effet, son orientation est facilitée grâce à la fonctionnalisation de l'électrode par des groupements hydrophobes de type anthracène²⁷¹, pyrène-adamantane²¹⁸ ou pyrène-anthraquinone.²⁷⁵ Ces différentes techniques de greffage ont permis d'atteindre des densités de courants d'oxydation de l'ordre de plusieurs mA.cm⁻² en TED.

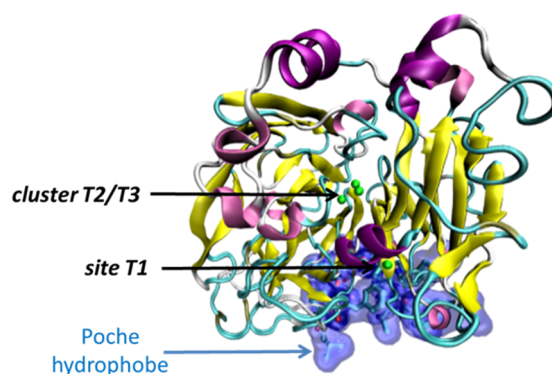


Figure chap.III-2 : Schéma de la laccase de *Trametes versicolor*

Afin de connecter au plus proche le centre T1 de la surface de l'électrode, une nouvelle approche a été envisagée, en collaboration avec Thierry Tron et Pierre Rousselot-Pailley, qui travaillent à l'institut des Sciences Moléculaires de Marseille. L'ingénierie mise en place dans leur laboratoire permet la mutation de certains acides aminés de l'enzyme **Lac3 de *Trametes sp.C30*** afin de greffer des groupements chimiques à la surface de l'enzyme. Ceci a pour but de faciliter sa connexion enzymatique sur électrodes.

L'enzyme **Lac3** est une laccase fongique, découverte et purifiée en 2004, par l'équipe de Thierry Tron. Cette enzyme oxyde l'ABTS avec une constante cinétique de catalyse k_{cat} égale à 60 mn⁻¹ et le potentiel du site T1 est de 0,53V vs NHE (pH 5,5-6).³²⁵ Sa séquence peptidique ne contient naturellement que deux lysines K₄₀ et K₇₁ situées à la surface du domaine N-terminal (Figure chap.III-3A). La mutation de ces deux acides aminés par la méthionine M₄₀ et l'histidine H₇₁, ainsi que la substitution de l'arginine R₁₆₁ par la lysine K₁₆₁ conduisent à la formation d'une enzyme mutante de Lac3 que nous appellerons UniK161 (Figure chap.III-3B). Les structures cristallines de ces enzymes n'étant pas encore connues, les conformations présentées en sont des modèles moléculaires.

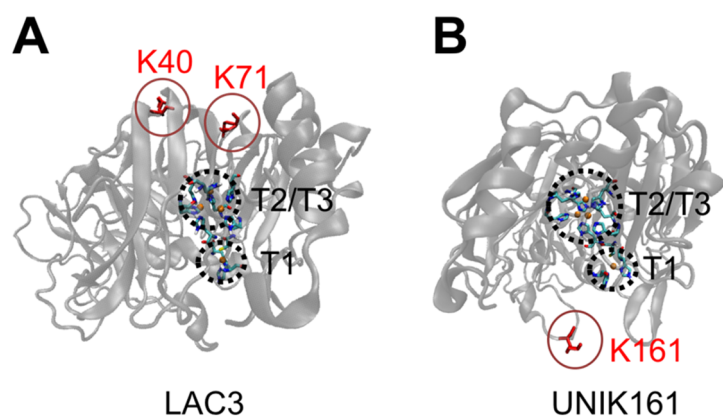


Figure chap.III-3 : (A) Structure protéique de l'enzyme Lac 3 sp.C30 qui comporte 2 lysines K40 et K71. (B) Structure protéique du mutant UniK161 qui comporte une seule lysine K161.

Le greffage de groupements chimiques à la surface de ces enzymes est effectué par amination réductrice sur les résidus lysine.³²⁶ Ainsi, la bioélectrocatalyse de réduction de l'oxygène par cette enzyme a été pour la première fois étudiée sur électrodes de NTCs dans l'équipe en 2016.³²⁷ Les résultats sont présentés dans la section suivante.

I.2 IMMOBILISATIONS DE LAC3 ET DE SON MUTANT UNIK161 SUR ELECTRODES DE NANOTUBES DE CARBONE

L'amination réductrice a permis l'addition d'un groupement pyrène sur la lysine 161 de l'enzyme Unik161. Le π -stacking de l'enzyme à la surface d'un film de NTCs a permis son immobilisation simple (Figure chap.III-4B). De plus, l'utilisation d'une plateforme pyrène-adamantane, interagissant par interactions hydrophobes avec des nanoparticules d'or, décorées par des cyclodextrines, donne accès à une nouvelle méthode de greffage pour cette enzyme jamais exploitée auparavant. En effet, les pyrènes, en surface de l'enzyme, sont piégés dans la cavité de la cyclodextrine par interaction hôte-invité (Figure chap.III-4A).

La bioélectrocatalyse de réduction de l'oxygène est étudiée dans chaque cas. Le courant de réduction atteint un plateau catalytique de -3 mA.cm^{-2} dans le cas où la surface est modifiée par des nanoparticules (Figure chap.III-4C). Cette méthode de fonctionnalisation bicouche augmente le nombre d'enzymes greffées à la surface de l'électrode, facilite considérablement le TED et assure une bonne orientation enzymatique. Ainsi, la réduction a lieu à un potentiel de $0,6\text{V}$ vs ECS à pH 5, valeur proche du potentiel électrochimique du site T1.³²⁷

Outre le fait de favoriser l'orientation enzymatique, les nanoparticules d'or greffées sur le film de MWCNT ont permis d'obtenir de remarquables images de la surface de l'électrode par microscopie électronique à balayage. Ainsi, la position des NPs et par défaut des enzymes s'est révélée très homogène au sein du film de NTC.

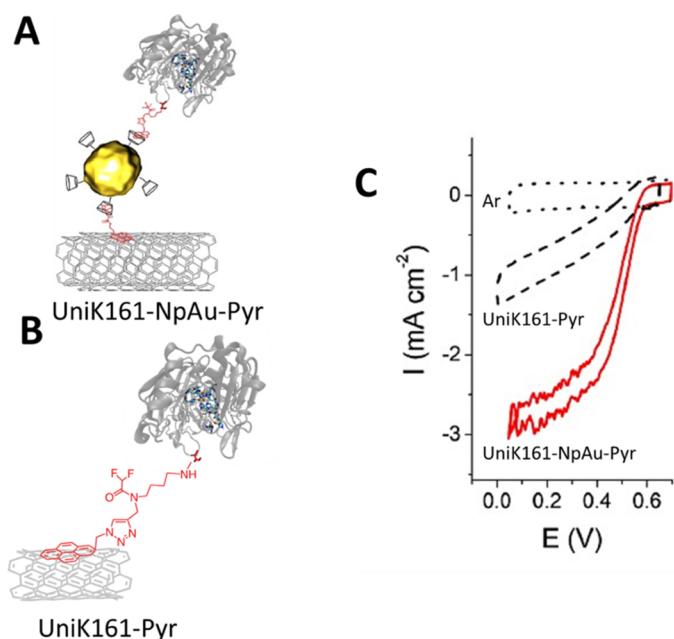


Figure chap.III-4 : (A) UniK 161, modifiée par un groupement pyrène, greffée sur NTCs-pyrène adamantane par interactions hydrophobes entre des NPs d'or cyclodextrines, le pyrène de l'enzyme et l'adamantane (UniK161-NpAu-Pyr). (B) UniK161-pyrène greffée par « π -stacking » sur NTCs. (C) Voltampérométries cycliques réalisées sous argon et O_2 pour l'enzyme UniK161-Pyr (courbe noir pointillée) et UniK-161-Np-Au-Pyr (courbe rouge). Adapté de ³²⁷. Conditions : 10 $mV.s^{-1}$, RT, pH5, électrode de référence : électrode au calomel saturé

I.3 GREFFAGE SUR NANOTUBES DE CARBONE PAR UNE APPROCHE COVALENTE

I.3.A ELABORATION DE PLATEFORMES « RAFT » ET DENDRIMERE

Le système RAFT, dont les acronymes signifient « Regioselectively Addressable Functionalised Template », ³²⁸ a été initialement décrit par Mutter pour la conception de protéines artificielles. ^{329,330} Il s'agit d'un cyclodécapeptide composé de deux coudes proline-glycine, en conformation feuillet β antiparallèle. Ainsi, les chaînes latérales des six autres acides aminés sont orientées de part et d'autre du plan du cycle.

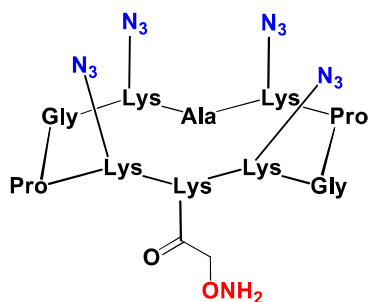


Figure chap.III-5 : Schéma de la plateforme RAFT- N_3 utilisée pour le greffage covalent de l'enzyme Lac3.

La conformation de la plateforme permet d'obtenir deux domaines distincts en partie supérieure et inférieure, afin de greffer différents types de molécules. Les RAFTs sont initialement étudiés par l'équipe I2BM pour la synthèse de vaccins anti-tumoraux.

Nous avons collaboré avec Carlo Pifferi et le Dr. Olivier Renaudet, en dérivant l'utilisation initiale du RAFT, pour d'obtenir une plateforme greffable par lien covalent. Ainsi, la molécule, présentée en Figure chap.III-5, comporte deux groupements chimiques facilement modifiables. La fonction $-ONH_2$ permet l'ancrage de la molécule sur une électrode modifiée par un groupement aldéhyde par la réaction covalente de clickoxyme (Figure chap.III-6). Par ailleurs, la fonction azoture $-N_3$ sera modifiée par cycloaddition de Huisgen pour conduire au greffage covalent d'une entité comportant une fonction alcène terminale.

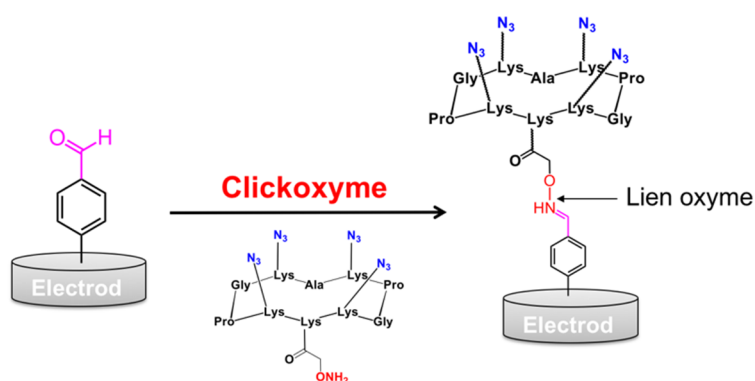


Figure chap.III-6 : Réaction covalente de clickoxyme de surface entre une électrode modifiée par un benzaldéhyde et la plateforme RAFT- N_3 .

Dans la même optique, un autre type de plateforme dite « dendrimère »,³³¹ également appliquée au design de nouveaux vaccins, a été exploitée (Figure chap.III-7A). Elle comporte également des fonctions $-ONH_2$ et $-N_3$ pour le greffage covalent par clickoxyme et cycloaddition de Huisgen. Cette structure branchée a été obtenue par élongation successive d'unités polyfonctionnelles autour d'un élément central exposant en bout de chaînes un nombre variable de fonctions $-N_3$. Contrairement au RAFT, sa conformation est globulaire et désorganisée pour conduire à un autre type de structuration à la surface de l'électrode (Figure chap.III-7B).

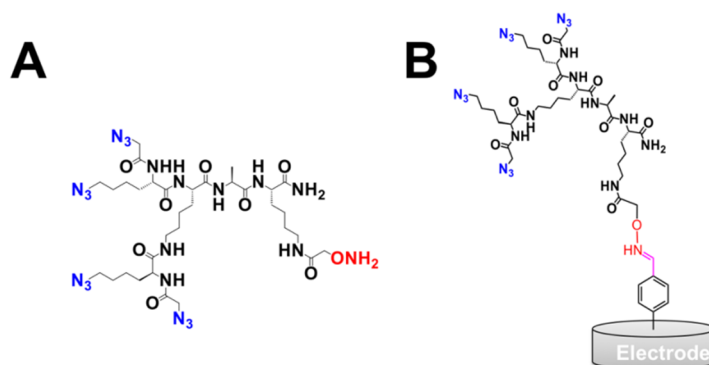


Figure chap.III-7 : (A) Schéma de la plateforme dendrimère- N_3 utilisée pour le greffage covalent de l'enzyme Lac3. (B) Electrode obtenue après la clickoxyme du dendrimère- N_3 sur une électrode modifiée par un benzaldéhyde.

I.3.B OBJECTIFS DU CHAPITRE

En se basant sur ces précédents travaux, nous avons travaillé sur de nouvelles techniques d'immobilisations covalentes des enzymes Lac3 et UniK161 portant des fonctions alcynes sur les lysines. Dans un premier temps, nous présenterons les différentes stratégies de modification de surface des NTCs, en validant notre approche grâce au greffage d'une espèce modèle rédox active. Dans un second temps, nous présenterons les résultats obtenus avec le mutant de l'enzyme et quantifierons les interactions chimiques sur la surface par microbalance à cristal de quartz (MCQ). Enfin, nous proposerons un nouveau type de piles H₂/air hydride à base du complexe bio-inspiré, [Ni(Cy,Arg)₂], à l'anode et d'une MCO à la cathode.

II. STRATEGIES D'IMMOBILISATIONS DES LACCASES UNIK ET LAC3 SUR ELECTRODES DE NANOTUBES DE CARBONE

II.1 INTRODUCTION

Nos collaborateurs marseillais ont produit deux nouvelles enzymes modifiées par des groupements 1-aminoéthyl-benzène-éthynyle sur les résidus lysine : Lac-3 alcyne et UniK161- alcyne (Figure chap.III-8). Le but est d'immobiliser ces laccases par cyclo-addition-1,3-dipolaire de Huisgen sur électrode modifiée par des groupements azotures

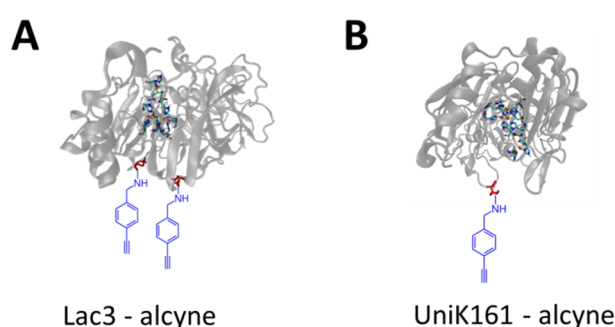
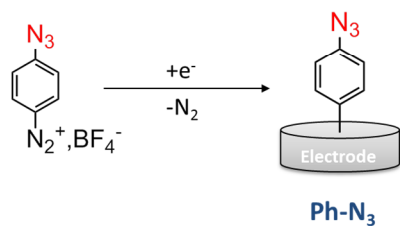


Figure chap.III-8 : (A) Enzyme Lac3 modifiée par deux groupements alcyne sur les lysines 40 et 71. (B) Enzyme UniK161 modifiée par un groupement alcyne sur la lysine 161.

Deux stratégies ont été mises en place pour fonctionnaliser les électrodes de NTCs par des groupements azotures (Figure chap.III-9). La première approche est la plus simple, puisqu'elle consiste en l'électroréduction du tétrafluoroborate de 4-azidobenzènediazonim (TABD), par voltampérométrie cyclique. La seconde stratégie se déroule en deux étapes. Dans un premier temps, le tétrafluoroborate de 4-Formylbenzène diazonium (TFBD) est électroréduit à la surface de l'électrode. Dans un second temps, les molécules de **RAFT-N₃** et **dendrimère-N₃** sont greffés par clickoxyde. L'électrode modifiée par le groupement benzaldéhyde est plongée dans une solution contenant 8µM de RAFT-N₃ ou dendrimère-N₃ pendant 45 minutes à 37°C, suivie de plusieurs étapes de rinçage à l'eau distillée. Ainsi, deux nouvelles architectures d'électrodes sont obtenues : (1) le RAFT apporte un environnement tridimensionnel dans lequel les fonctions azotures pointent à la surface de l'électrode ; (2) le dendrimère engendre un substrat moins structuré, comportant également 4 fonctions azotures.

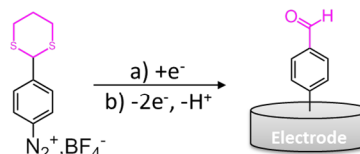
Ainsi, ces deux stratégies ont été validées via la cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen de l'espèce électro-active 1-éthynylferrocène. Enfin, les enzymes **Lac3-alcyne** et **UniK161-alcyne** ont été greffées sur ces électrodes fonctionnalisées.

Stratégie 1 : Electrogreffage de sel de diazonium tétrafluoroborate 4-azidobenzène



Stratégie 2 : Clickoxyme d'un dendrimère-N₃ et d'un RAFT-N₃

A/ Fonctionnalisation de la surface par un aldéhyde



B/ Clickoxyme : Ph-CHO + R-ONH₂ → Ph-C=NH-O-R

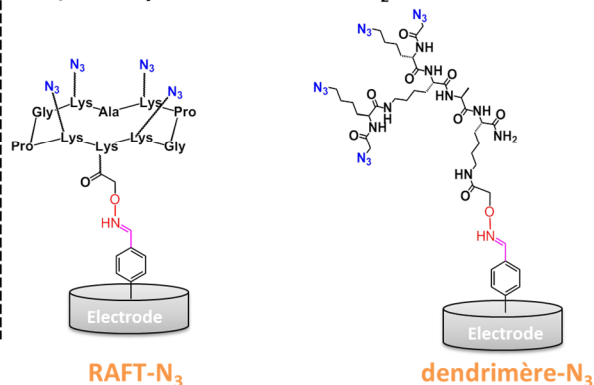


Figure chap.III-9 : Différentes stratégies mises en place pour fonctionnaliser les électrodes par des fonctions azotures -N₃

II.2 ELABORATION D'ÉLECTRODES A BASE DE GROUPEMENTS AZOTURES

II.2.A TECHNIQUES D'IMMOBILISATIONS MISES-EN-ŒUVRES

II.2.A (i) Greffage de TABD sur électrodes de NTCs et carbones vitreux

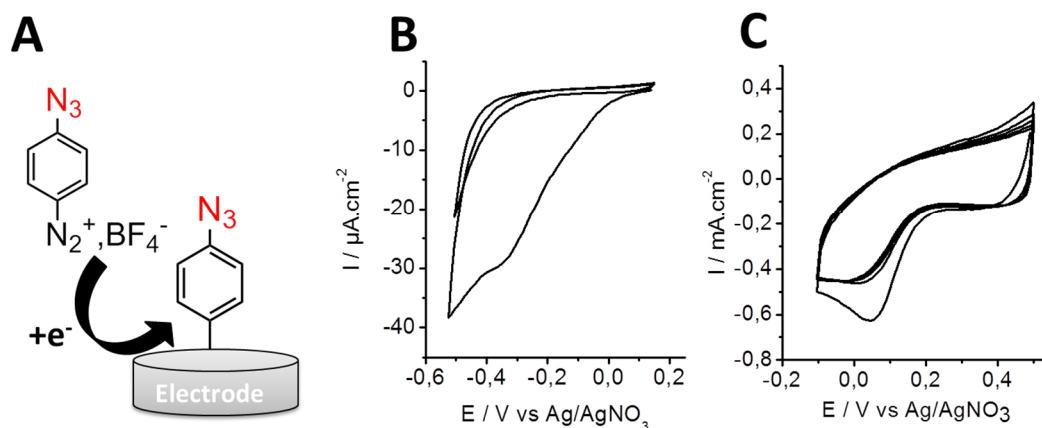


Figure chap.III-10 : (A) Electro-réduction de TABD à la surface de l'électrode. (B) Voltampérométrie cyclique pour la réduction de 2 mM d'ADAB à la surface d'une électrode de carbone vitreux (20 mV.s⁻¹ ; 0,1M MeCN/TBAP ; 2 cycles). (C) Voltampérométrie cyclique pour la réduction de 2 mM d'ADAB à la surface d'une électrode de NTCs multifeuillets (20 mV.s⁻¹ ; 0,1M MeCN/TBAP ; 5 cycles)

TADB a été isolé chimiquement selon un protocole décrit par Limoges en 2008.³³² L'électrogreffage consiste à la réduction électrochimique irréversible du sel de diazonium à la surface pour conduire à la formation d'un lien covalent carbone-carbone et d'un polymère de type polyphénylène (Figure chap.III-10A). En fonction des paramètres choisis (nombre de cycle, vitesse de balayage, fenêtre de potentiel, temps, charge), l'épaisseur du film de polymère varie, conduisant à une électrode plus ou moins passivée par la couche organique.

L'électro-réduction d'une solution à 2mM de TADB à la surface des électrodes de carbone vitreux et de NTCs a été réalisée par voltampérométrie cyclique dans 0,1M d'une solution organique MeCN/TBAP (Figure chap.III-10B et C). Sur électrode de carbone vitreux, un pic de réduction irréversible apparaît à un potentiel de -0,35 V vs Ag/AgNO₃. Celui-ci n'est plus présent dès le second cycle, du fait de la passivation de l'électrode par la couche de polyphénylène. L'électroréduction sur NTCs intervient à 0,05 V vs Ag/AgNO₃. Comme l'indique la présence du pic irréversible, la nanostructuration de l'électrode rend difficile son recouvrement total par le polymère. Afin de s'assurer que le transfert d'électron entre l'espèce rédox active et l'électrode restera efficace, nous avons limité le nombre de cycle à deux sur l'électrode de carbone vitreux et cinq sur le film de NTC.

II.2.A (ii) Greffage de TFBD sur électrodes de NTCs et carbone vitreux

Le tétrafluoroborate de 4-(1,3-dithiane-2-yle)benzène diazonium (TDBD) a été synthétisé en trois étapes d'après une procédure décrite par Kim à partir de 2009.^{333,334} L'électro-réduction est réalisée par voltampérométrie cyclique sur électrodes de carbone vitreux et NTCs dans une solution à 2mM en TFBD (0,1M MeCN/TBAP) (Figure chap.III-11). La réduction irréversible se produit à -0,4V vs Ag/AgNO₃ sur électrode de carbone vitreux et 0,05 V vs Ag/AgNO₃ sur électrode de NTCs.

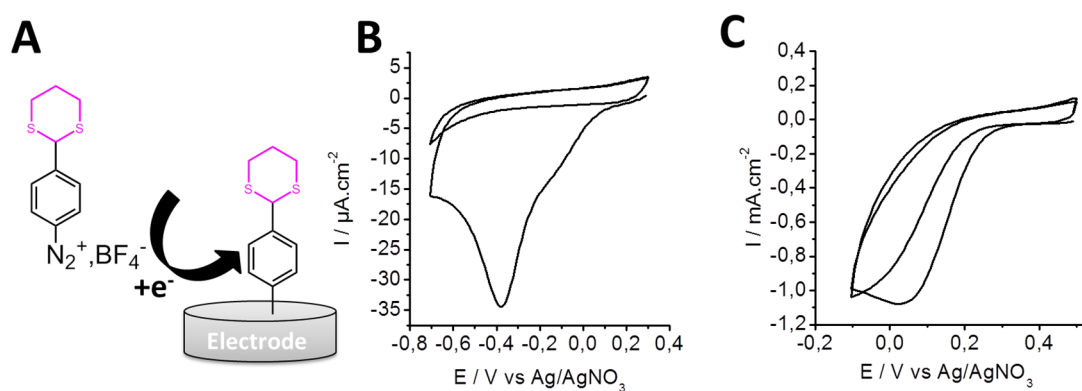


Figure chap.III-11 : A) Electro-réduction de TDBD à la surface de l'électrode. (B) Voltampérométrie cyclique pour la réduction de 2 mM de sels de diazonium à la surface d'une électrode de carbone vitreux (20 mV.s⁻¹ ; 0,1M MeCN/TBAP ; 2 cycles). (C) Voltampérométrie cyclique pour la réduction de 2 mM de TDBD à la surface d'une électrode de NTCs multifeuillets (20 mV.s⁻¹ ; 0,1M MeCN/

La fonction dithiane a été insérée dès la première étape de synthèse en tant que groupement protecteur de la fonction aldéhyde afin d'empêcher les réactions chimiques de réduction de la fonction aldéhyde. La déprotection du groupement dithiane est réalisée par électrochimie.³³⁴ L'oxydation électrochimique irréversible par un mécanisme à $2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ conduit à la libération du dithiane et la formation d'une fonction benzaldéhyde à la surface de l'électrode (Figure chap.III-12A). La déprotection électrochimique a lieu par voltampérométrie cyclique entre 0 et 1V vs Ag/AgNO₃. Un pic d'oxydation irréversible apparaît au premier cycle à un potentiel de 0,87V vs Ag/AgNO₃ sur électrode de carbone vitreux et 0,75V vs Ag/AgNO₃ sur électrode de NTCs (Figure chap.III-12B et C). La déprotection est totale sur électrode de carbone vitreux, puisque aucun pic n'est présent au deuxième cycle. Sur électrode de NTCs, une espèce rédox réversible ($E_{1/2} = 0,7 \text{ V vs Ag/AgNO}_3$) est produite à partir du deuxième cycle, attribuée à la formation d'une espèce rédox active engendrée à haut potentiel. Cette dernière n'a pour le moment pas été identifiée.

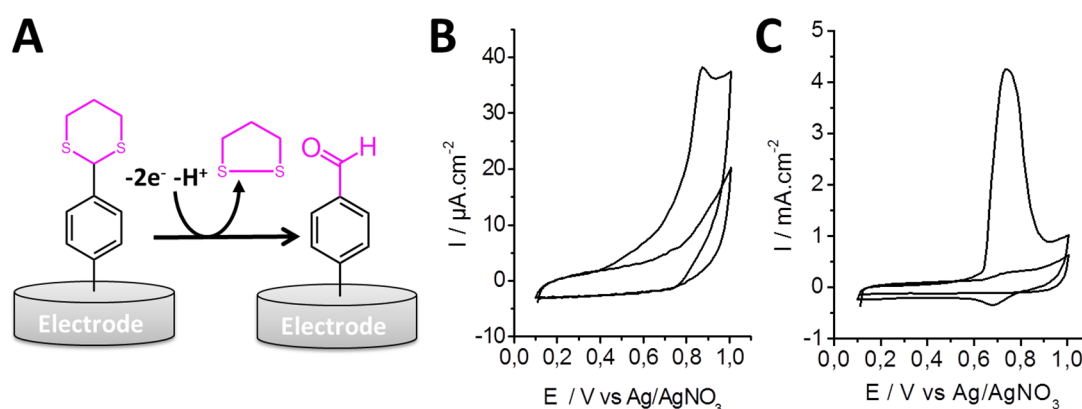


Figure chap.III-12 : (A) Déprotection électrochimique du groupement 4-(1,3 dithiane-2-yle) via un mécanisme d'oxydation à $2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ pour former une fonction benzaldéhyde. (B) Voltampérométrie cyclique de l'électrode de carbone vitreux modifiée par le 4-(1,3 dithiane-2-yle)benzène ($20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $0,1\text{M MeCN/TBAP}$; 2 cycles). (C) Voltampérométrie cyclique de l'électrode de NTC modifiée par le 4-(1,3 dithiane-2-yle)benzène ($20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $0,1\text{M MeCN/TBAP}$; 2 cycles).

II.2.B CYCLOADDITION DE HUISGEN POUR LE GREFFAGE D'UNE ESPECE ETHYNYLFERROCENE SUR LES DIFFERENTES SURFACES

Afin d'optimiser la réaction de cyclo-addition de Huisgen et déterminer si la structuration de l'électrode influence le transfert électronique, nous avons travaillé avec une espèce électro-active modèle, l'éthynylferrocène (EF), qui a été greffée sur les trois types d'électrodes

II.2.B (i) Elaboration d'électrodes à base d'éthynylferrocène

Les électrodes de carbone vitreux et NTCs modifiées avec les fonctions azidobenzène, le RAFT-N₃ et le dendrimère-N₃ ont été traitées par cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen afin d'immobiliser l'EF par un lien covalent triazole (Figure chap.III-13).

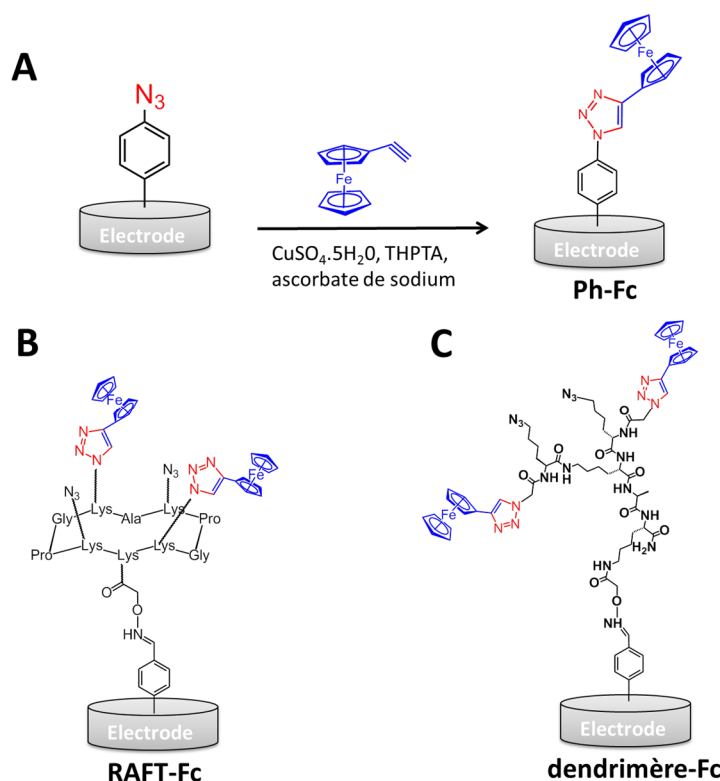


Figure chap.III-13 : (A) Réaction de cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen entre une électrode de carbone vitreux ou NTC modifiée par un azidobenzène plongée dans la solution de cycloaddition contenant l'EF, le THPTA, le sulfate de cuivre et l'ascorbate de sodium. L'espèce Ph-Fc est alors formée. (B) RAFT-Fc et (C) Dendrimère-Fc obtenus dans les mêmes conditions.

La solution de cycloaddition contient 1,5 mM d'EF; 2,5 mM de catalyseur $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 5 mM d'ascorbate de sodium et 2,5 mM de THPTA dans un mélange de MeCN/ H_2O (1:1). Après dégazage, 40 μL de solution sont déposés sur chaque électrode à température ambiante pendant une heure. A la fin de la réaction, les électrodes sont rincées plusieurs fois avec de l'acétonitrile, puis de l'eau ultra-pure.

Trois types d'électrodes sont formées : (1) **Ph-Fc** (Figure chap.III-13A) ; (2) **RAFT-Fc** (Figure chap.III-13B) ; (3) **dendrimère-Fc** (Figure chap.III-13C).

II.2.B (ii) *Caractérisations électrochimiques sur électrodes de carbone vitreux*

Dans un premier temps, l'immobilisation de la sonde ferrocène a été caractérisée par voltampérométrie cyclique sur carbone vitreux, puis les concentrations surfaciques et constantes de transferts d'électrons hétérogènes ont été déterminées. La Figure chap.III-14 présente les voltampérogrammes à différentes vitesses de balayage pour le **dendrimère-Fc** (A) et le **RAFT-Fc** (C) à pH7.

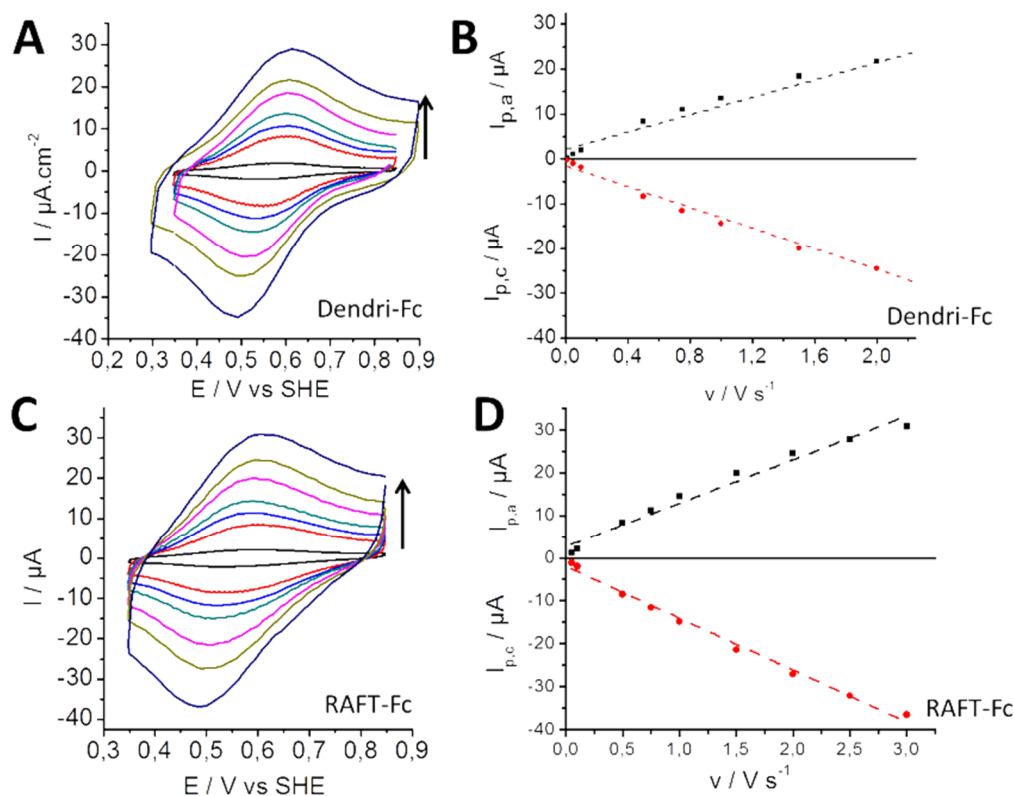


Figure chap.III-14 : (A) Voltampérométrie cyclique à différentes vitesses de balayage pour de l'électrode carbone vitreux/dendrimère-Fc (0,01 à 1 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$; 0,2M tampon phosphate pH 7). (B) Evolution des courants d'oxydation et de réduction en fonction de la vitesse de balayage pour l'électrode carbone vitreux/dendrimère-Fc. (C) Voltampérométrie cyclique à différentes vitesses de balayage pour l'électrode carbone vitreux/RAFT-Fc (0,01 à 1 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$; 0,2M tampon phosphate pH 7).(D) Evolution des courants d'oxydation et de réduction en fonction de la vitesse de balayage pour l'électrode carbone vitreux/RAFT-Fc.

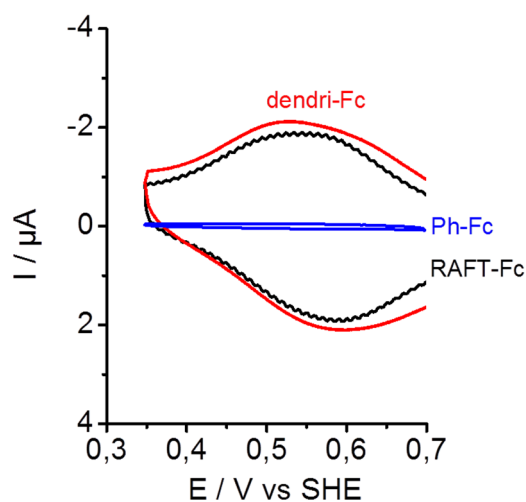


Figure chap.III-15 : Voltampérométrie cycliques des électrodes de carbones vitreux/ dendrimère-Fc (rouge), RAFT-Fc (noir), Ph-Fc (bleu) Conditions : 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$; 0,2M tampon phosphate pH 7.

L'évolution linéaire des courants d'oxydation et de réduction en fonction de la vitesse de balayage (Figure chap.III-14B et D) démontre que les espèces sont bien immobilisées à la surface de l'électrode de carbone vitreux. Les potentiels

électrochimiques calculés (Tableau chap.III-1), sont sensiblement différents de ceux mesurés lorsque l'électrode est une matrice de NTCs. Les concentrations surfaciques, égales à 0,29 ; 0,85 et 0,016 nmol.cm⁻² pour les espèces **RAFT-Fc**, **dendrimère-Fc** et **Ph-Fc** respectivement, sont comparables au greffage de la molécule **RAFT-Fc** sur SAM.³³⁵ La Figure chap.III-15 superpose les voltampérogrammes des différentes électrodes à pH7 et 10 mV.s⁻¹. La quantité de ferrocène immobilisée sur TABD est très faible, comparée au RAFT et dendrimère. Ceci corrèle avec la présence d'un plus grand nombre de fonctions azotures sur ces deux molécules.

Systèmes	E _{1/2} (Fc/Fc ⁺) pH7 / V	Concentration surfacique / nmol.cm ⁻²	k _s / s ⁻¹
CV/RAFT-Fc	0,56	0,29	30
CV/dendri-Fc	0,57	0,85	30
CV/Ph-Fc	0,52	0,016	20

Tableau chap.III-1 : Récapitulatif des potentiels électrochimiques, concentrations surfaciques et constantes de transferts d'électrons pour chaque espèce immobilisée sur électrode de carbone vitreux.

La constante de transfert d'électrons hétérogène k_s a été calculée grâce au modèle de Laviron pour une espèce rédox immobilisée sur surface, dont la différence de potentiel pic-à-pic ΔE_p < 200 mV.³³⁶ k_s est définie selon l'équation suivante :

$$k_s = \frac{mFnv}{RT}$$

avec m la constante d'intégration (calculée dans les tables)³³⁶, F la constante de Faraday, n le nombre d'électron, v la vitesse de balayage, R la constante des gaz parfaits et T la température.

Les valeurs de k_s ont été estimées à 20 s⁻¹ pour le **Ph-Fc** et 30s⁻¹ pour le **RAFT-Fc** et le **dendrimère-Fc**. En 2005, Gooding a comparé les valeurs de k_s sur électrodes d'or et de carbone vitreux, modifiées par un sel d'aryle diazonium couplé à un ferrocène.³³⁷ Dans son étude, k_s varie entre 17 et 28 s⁻¹ sur électrode de carbone vitreux et entre 100 et 500 s⁻¹ sur électrode d'or. Ces observations sont dues à une meilleure organisation de la couche de de diazonium sur électrodes d'or. Les valeurs obtenues pour nos différentes électrodes sont similaires : la surface de polyphénylène, qui est plus épaisse qu'une monocouche, limite le transfert d'électrons hétérogène.

II.2.B (iii) *Caractérisations électrochimiques des électrodes de NTCs*

Après cycloaddition de Huisgen, chaque électrode de NTC modifiée par l'EF est caractérisée par voltampérométrie cyclique à pH7 (Figure chap.III-16A). L'électrode dendrimère- N_3 a été plongée dans une solution de cycloaddition ne contenant pas de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Sur le voltampérogramme (courbe bleue), seul le courant capacitif propre au film de NTCs est observé. Ainsi, le ferrocène n'a pas été absorbé à la surface des NTCs et la réaction de cycloaddition est spécifique.

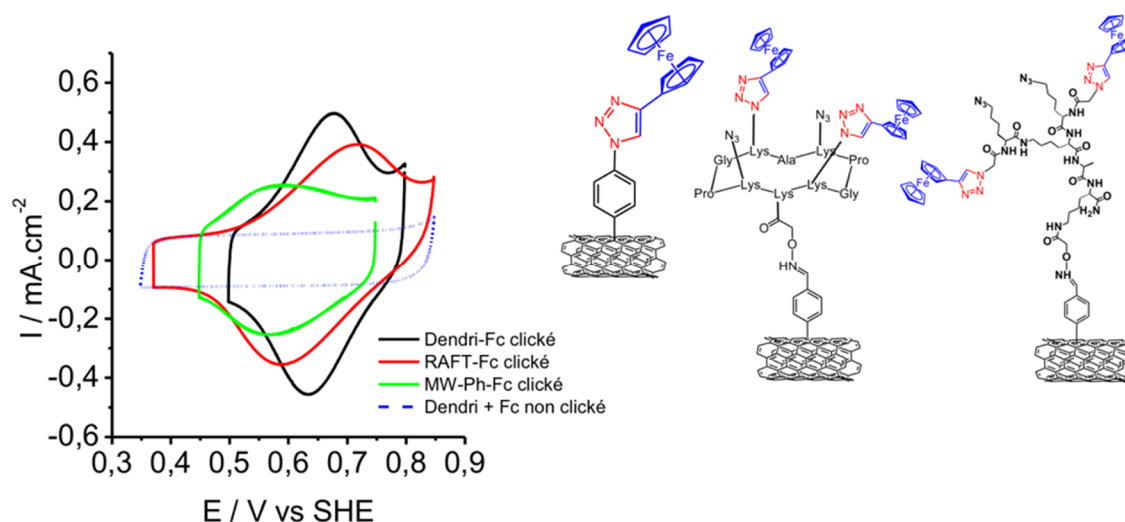


Figure chap.III-16 : (A) Voltampérométries cycliques des électrodes de NTCs modifiées par le Ph-Fc (courbe verte) ; le RAFT-Fc (courbe rouge) ; le dendrimère-Fc (courbe noire) et d'une électrode de NTCs modifiées par le dendrimère- N_3 et le ferrocène non greffé (courbe bleue). Conditions : 10 mV.s^{-1} ; $0,2 \text{ M}$ tampon phosphate à pH7.

En présence de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, des pics d'oxydation et de réduction caractéristiques de l'oxydation réversible du ferrocène en cation ferrocénium sont observés pour chaque espèce. Les potentiels électrochimiques ont été calculés pour chaque espèce rédox : $+0,54 \text{ V}$ vs SHE pour le **Ph-Fc**, $+0,62 \text{ V}$ vs SHE pour le **RAFT-Fc** et enfin $+0,64 \text{ V}$ vs SHE pour le **dendrimère-Fc** (Figure chap.III-16B). Finalement, ces résultats sont très proches : la différence de potentiel pic-à-pic observée pour le **RAFT-Fc** est un artefact propre au film de NTC, dont la morphologie peut varier d'une électrode à l'autre. Ces valeurs concordent avec celle calculée pour une espèce **RAFT-Fc** immobilisée sur SAM, qui a un potentiel électrochimique de $+0,76 \text{ V}$ vs NHE ($70\% \text{ MeCN} + 30\% \text{ H}_2\text{O} + 0,1 \text{ M TBAP}$).³³⁵

Les concentrations surfaciques ont été estimées à partir de l'intégration du courant faradique d'oxydation. Les valeurs varient de 9 nmol.cm^{-2} pour le **Ph-Fc** à 28 et 17 nmol.cm^{-2} pour le **RAFT-Fc** et le **dendrimère-Fc** respectivement (Tableau chap.III-2 Tableau chap.III-2 : Récapitulatif des valeurs de potentiels électrochimiques et concentrations surfaciques en ferrocène pour chaque espèce immobilisée sur électrode de NTC.). Les concentrations supérieures obtenues pour le RAFT et le dendrimère sont relatives au plus grand nombre de fonctions azotures accessibles à la surface de l'électrode. Ces valeurs sont en adéquation avec l'immobilisation d'espèce rédox sur électrodes de NTCs.³³⁸ De plus, une concentration surfacique de $6,2$

pmol.cm⁻² a été calculée pour le RAFT-Fc immobilisée sur SAM.³³⁵ Dans notre étude, l'espèce **RAFT-Fc** a une concentration surfacique de deux ordres de grandeurs supérieurs. Ceci s'explique par la porosité et la surface spécifique du film de NTCs.

Systèmes	E _{1/2} (Fc/Fc ⁺) pH7 / V vs SHE	Concentrations surfaciques / nmol.cm ⁻²
NTC/Ph-Fc	0,54	9
NTC/RAFT-Fc	0,62	28
NTC/dendrimère- Fc	0,64	17

Tableau chap.III-2 : Récapitulatif des valeurs de potentiels électrochimiques et concentrations surfaciques en ferrocène pour chaque espèce immobilisée sur électrode de NTC.

II.2.C CONCLUSION

Nous avons mis au point deux stratégies d'immobilisation pour modifier la surface d'électrodes de carbone vitreux et de NTCs par une ou plusieurs fonctions -N₃. Ces techniques ont été validées, par l'immobilisation covalente d'une molécule d'éthynylferrocène, sur une surface d'azidobenzène, de **RAFT-N₃** et de **dendrimère-N₃**. La surface spécifique nanométrique des NTCs a permis d'immobiliser cent fois plus d'espèces rédox que sur carbone vitreux. Les constantes de transfert d'électrons hétérogènes calculées (entre 20 et 30 s⁻¹), suggèrent que, même si aucune monocouche n'est formée, les électrodes ne sont pas passivées. Ainsi, elles seront utilisées, en tant que bioélectrodes pour immobiliser les mutants **UniK161-alcyne** et **Lac3-alcyne**.

II.3 CYCLOADDITION-1,3-DIPOLAIRE DE HUISGEN POUR LE GREFFAGE COVALENT D'ENZYMES MODIFIEES PAR UN GROUPEMENT ALCYNE

II.3.A ELABORATION DE BIOCATHODES A BASE D'ENZYMES LAC3 IMMOBILISEES PAR LIAISON COVALENTE SUR NTCs MODIFIES PAR TABD

II.3.A (i) Immobilisations des enzymes UniK161-alcyne et Lac3-alcyne sur Ph-N₃

L'électroréduction par voltampérométrie cyclique, de TABD à la surface des NTCs conduit à la formation d'un film de poly(azidophénylène) (**Ph-N₃**). **Lac3-alcyne** et **UniK161-alcyne** sont alors greffés par cycloaddition de Huisgen (Figure chap.III-17). Cette réaction est réalisée pendant une heure à température ambiante par trempage des électrodes de NTCs dans la solution de cycloaddition. Cette dernière,

préalablement dégazée sous argon, contient 75 μM d'enzyme, 125 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 417 μM d'ascorbate de sodium et 694 μM de THPTA. Après 1 heure de réaction, les électrodes sont rincées avec le tampon acétate à pH5 afin d'éliminer toutes traces d'espèces absorbées.

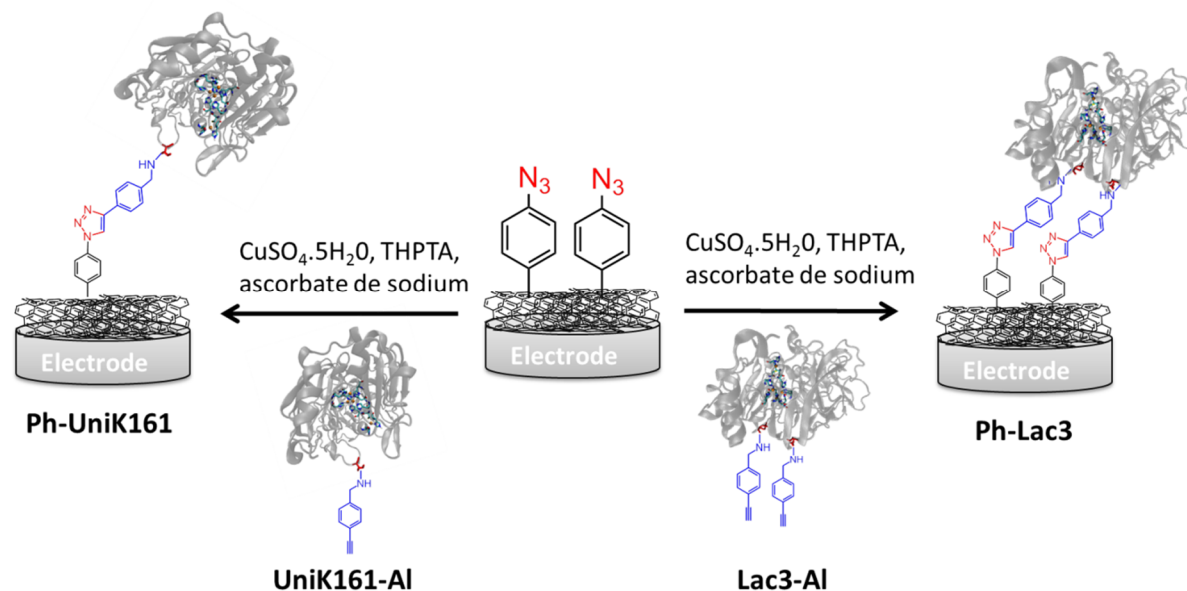


Figure chap.III-17 : Schéma de la réaction de cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen après greffage covalent des enzymes UniK161-alcyne et Lac3-alcyne sur surface de NTCs modifiée par des groupements azidobenzènes.

Dans la biocathode **Ph-UniK161**, l'enzyme est immobilisée par une seule fonction alcynyle, proche du site T1. En revanche, dans l'électrode **Ph-Lac3**, l'enzyme est greffée par deux fonctions alcynyles à proximité du cluster trinuécléaire T2/T3. L'influence de ces différentes orientations enzymatiques sur l'électrocatalyse de réduction d' O_2 est étudiée ci-dessous.

II.3.A (ii) Réduction bioélectrocatalytique de l' O_2

La réduction bioélectrocatalytique de l'oxygène est analysée par voltampérométrie cyclique. Dans un premier temps, nous avons optimisé les conditions d'électrogreffage afin d'éviter les phénomènes de passivation. Dans un second temps, les deux biocathodes ont été comparées en termes de performances et de concentrations surfaciques.

La réduction d'un sel d'aryle diazonium à la surface d'électrode fait appel à plusieurs techniques électrochimiques, qui influencent l'épaisseur de la couche de polymère formée.³³⁹ Dans cette section, deux techniques sont mises en avant. Dans un premier temps, l'électrode de NTCs, plongée une solution de 2 mM de TABD (0,1M MeCN/TBAP), est électro-réduite entre 0,45 et -0,1V vs Ag/AgNO₃, pendant 5 cycles. Cette réduction électrochimique engendre la formation d'une couche de polymère plus ou moins épaisse. Dans un second temps, une électrode de NTC est plongée, pendant

15 minutes, dans la solution de TABD, afin de conduire à sa réduction spontanée in-situ à la surface de l'électrode. L'objectif d'un greffage spontané est la génération d'une couche organique plus mince que dans le cas de l'électrogreffage.³⁴⁰

La réponse bioélectrocatalytique, de l'enzyme Lac3-alcyne, immobilisée par lien covalent sur un film de **Ph-N₃** électrogréffé, est représentée sur le voltampérogramme en Figure chap.III-18A. La présence de l'oxygène dans la solution engendre un TED quasiment négligeable, de l'ordre de 15 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0,4 V vs SHE. L'ajout de 0,3 mM d'ABTS dans la solution tampon (courbe verte), en présence d'O₂, conduit à l'apparition d'une vague catalytique de réduction à 0,7 V vs SHE. Cela indique que les enzymes sont bien immobilisées de façon covalente à la surface de l'électrode mais que le TED est impossible à cause de la passivation de l'électrode par le polymère organique formé.

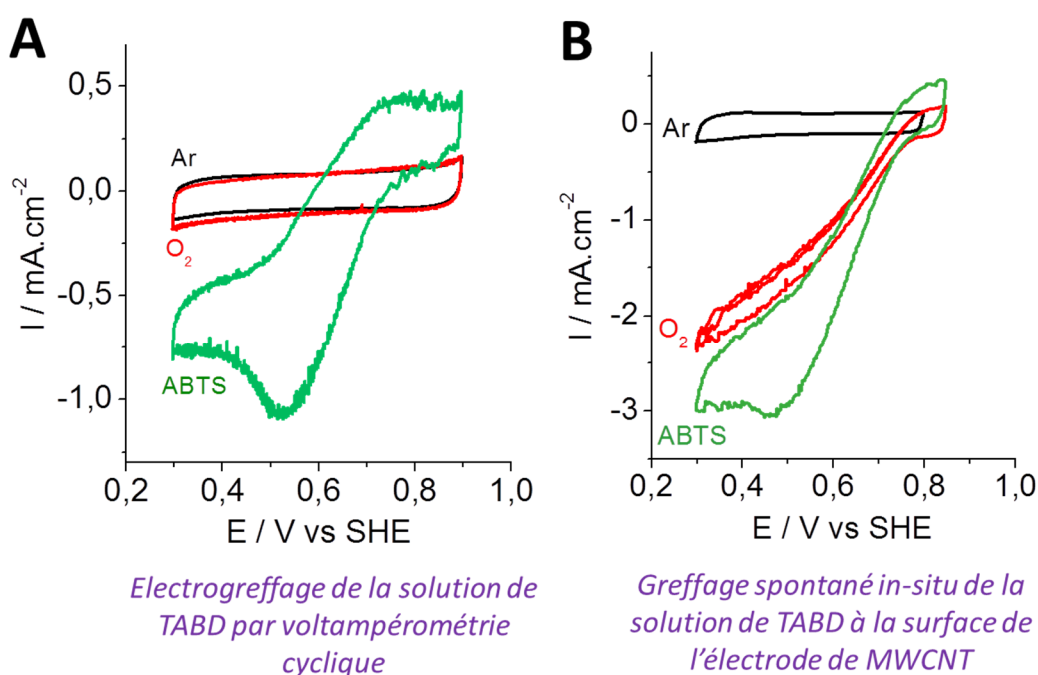


Figure chap.III-18 : Voltampérométries cycliques de l'électrode de NTCs-Ph-Lac3 sous argon (courbes noires), O₂ (courbes rouges) et O₂ + 0,3 mM d'ABTS après électrogreffage de TABD par voltampérométrie cyclique (A) et greffage spontané (B). Conditions : 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$; 50 mM tampon acétate à pH5, RT

Ces résultats diffèrent de ceux obtenus pour le greffage spontané de **Ph-N₃** (Figure chap.III-18B). Après greffage de l'enzyme, une vague d'électrocatalyse est obtenue sous O₂ avec une densité de courant de -2,2 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0,1 V vs SHE. La densité de courant en présence d'ABTS atteint -3 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, ce qui montre que 73% des enzymes immobilisées sont connectées par TED. Ce pourcentage ne tient pas compte de la diffusion limitée de l'O₂ dans le film de NTC. La cycloaddition de Huisgen est donc efficace lorsque TABD est réduit spontanément. Par ailleurs, lorsque la cycloaddition est réalisée en absence de CuSO₄·5H₂O, catalyseur indispensable à cette réaction chimique, aucune enzyme n'est immobilisée. Finalement, le greffage spontané a été définitivement adopté pour l'immobilisation de Ph-N₃ à la surface des NTCs.

Les deux biocathodes enzymatiques sont étudiées par voltampérométrie cyclique sous argon (Figure chap.III-19). Dans les deux cas, un pic rédox réversible d'oxydation et de réduction apparaît à un potentiel $E_{1/2}$ de 0,6V vs SHE, attribué au site T1 Cu(II)/Cu(I).^{341,342} L'intégration des pics d'oxydation donne accès à des concentrations surfaciques respectives de 1 pmol.cm⁻² pour **Ph-Lac3** et 0,54 pmol.cm⁻² pour **Ph-UniK161**. Ces résultats sont en adéquation avec la présence de deux fonctions alcynes sur Lac3, contre une seule sur UniK161, ce qui permet d'immobiliser deux fois plus d'enzymes.

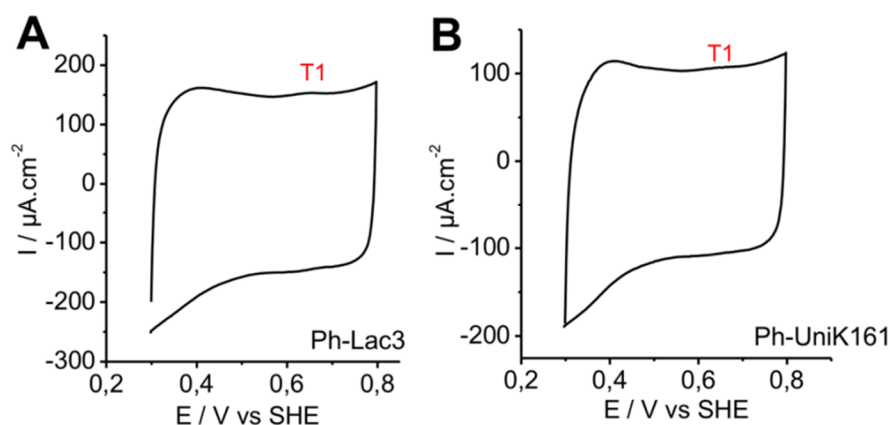


Figure chap.III-19 : Voltampérométries cycliques des biocathodes NTCs-Ph-Lac3 (A) et NTCs-Ph-UniK161 (B) sous argon à pH5. Conditions : 10 mV.s⁻¹ ; 50 mM tampon acétate à pH5 ; RT ; greffage spontané de Ph-N₃.

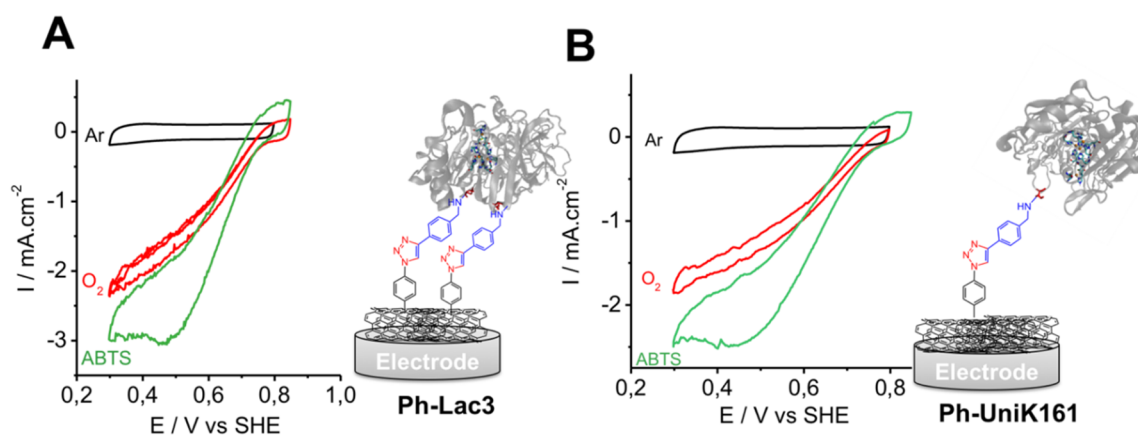


Figure chap.III-20 : Voltampérométries cycliques des électrodes de NTCs-Ph-Lac3 (A) et de NTCs-Ph-UniK161 (B) sous argon (courbes noires), O₂ (courbes rouges) et O₂ + 0,3 mM d'ABTS (courbe verte). Conditions : 10 mV.s⁻¹ ; 50 mM tampon acétate à pH5, RT ; greffage spontané de Ph-N₃.

L'observation d'un signal non catalytique au potentiel du T1 est généralement difficile à obtenir ; cette observation souligne une bonne orientation et une connexion enzymatique par TED. En effet, sous O₂, les biocathodes réduisent l'oxygène en eau au potentiel rédox du site T1, avec une densité de courant de -2,2 mA.cm⁻² pour **Ph-Lac3** et -1,8 mA.cm⁻² pour **Ph-UniK161** à 0,3 V vs SHE (Figure chap.III-20). Les résultats

obtenus sont résumés dans le

Biocathodes	$E_{1/2}(\text{Cu}^{II}/\text{Cu}^I) / \text{V vs SHE (pH 5)}$	Concentrations surfaciques/ pmol.cm^{-2}	$I_{\text{max}}(\text{O}_2) / \text{mA.cm}^{-2} (\text{pH 5})$	$I_{\text{max}}(\text{O}_2 + 0,3 \text{ mM ABTS}) / \text{mA.cm}^{-2} (\text{pH 5})$
Ph-Lac3	0,6	1	-2,2	-3
Ph-UniK161	0,6	0,54	-1,8	-2,5

Tableau chap.III-3.

Biocathodes	$E_{1/2}(\text{Cu}^{II}/\text{Cu}^I) / \text{V vs SHE (pH 5)}$	Concentrations surfaciques/ pmol.cm^{-2}	$I_{\text{max}}(\text{O}_2) / \text{mA.cm}^{-2} (\text{pH 5})$	$I_{\text{max}}(\text{O}_2 + 0,3 \text{ mM ABTS}) / \text{mA.cm}^{-2} (\text{pH 5})$
Ph-Lac3	0,6	1	-2,2	-3
Ph-UniK161	0,6	0,54	-1,8	-2,5

Tableau chap.III-3 : Récapitulatif des valeurs de potentiels électrochimiques, concentrations surfaciques et courants maximaux pour les biocathodes Ph-Lac3 et Ph-UniK161.

L'influence du pH sur la réduction bioélectrocatalytique de l'oxygène a été étudiée par voltampérométrie cyclique (Figure chap.III-21A). Comme toutes les laccases, cette enzyme travaille à un pH optimal compris entre 4 et 5 et est inactivée réversiblement à pH acide. Une expérience de chronoampérométrie a permis de démontrer la stabilité des deux enzymes en appliquant un potentiel de 0,4 V vs SHE à l'électrode de travail. Ainsi, les densités de courant de réduction restent constantes, après une heure de décharge, atteignant respectivement $-1,3 \text{ mA.cm}^{-2}$ pour Ph-Lac3 et $-1,5 \text{ mA.cm}^{-2}$ pour Ph-UniK161 (Figure chap.III-21B).

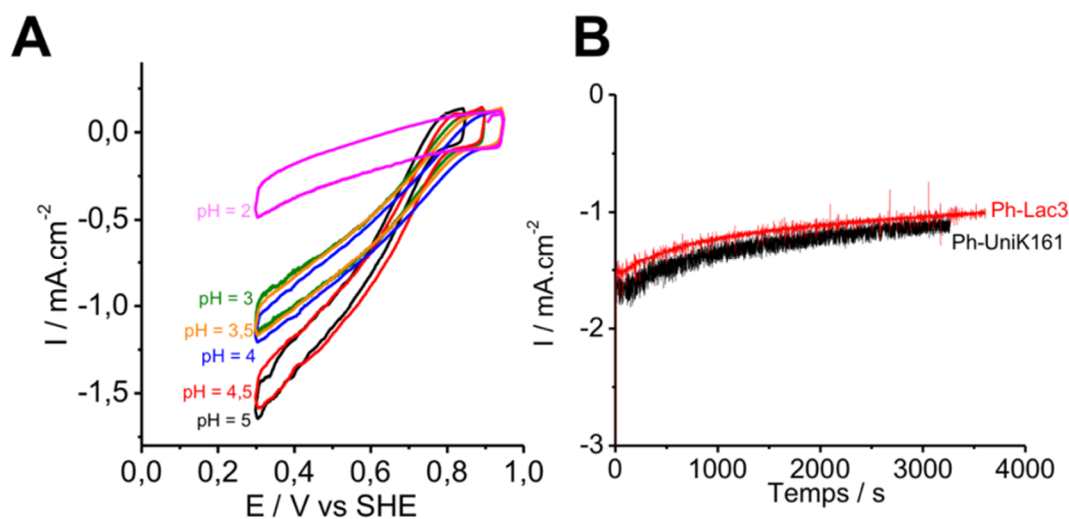


Figure chap.III-21 : (A) Voltampérométrie cyclique sous O_2 de l'électrode NTCs-Ph-Lac3 à différents pH (10 mV.s^{-1} ; $0,2 \text{ M}$ tampon Britton-Robinson, RT). (B) Chronoampérométrie, des biocathodes enzymatiques Ph-Lac3 et Ph-UniK161, réalisée pendant 1h à un potentiel de $0,4 \text{ V vs SHE}$ dans un tampon acétate à 50 mM à pH5.

II.3.A (iii) Modélisation de la réponse catalytique d'ORR

Dans le chapitre 2, nous avons décrit en détail l'utilisation du modèle d'Armstrong, initialement utilisé pour comprendre les transferts d'électrons intervenant lorsqu'une hydrogénase est absorbée sur électrode de graphite.^{322,323} Le modèle simplifiée a été utilisée pour modéliser la réponse catalytique du complexe bio-inspiré $[\text{Ni}(\text{Cy},\text{Arg})_2]$. Lorsque qu'une enzyme est greffée à la surface d'une électrode, plusieurs orientations sont possibles et doivent être prises en considération dans les équations.³⁴³

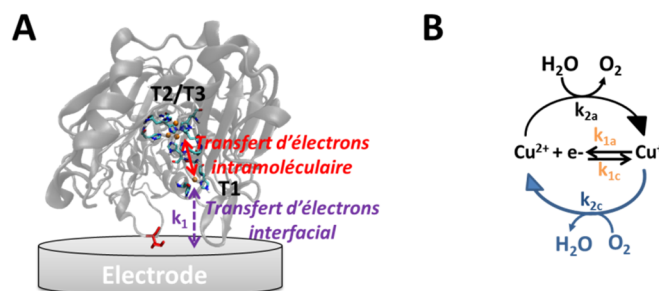


Figure chap.III-22 : (A) Schéma des transferts d'électrons interfaciaux et intramoléculeaires intervenant lorsque l'enzyme est immobilisée à la surface de l'électrode. (B) Modèle cinétique de l'électrocatalyse réversible de réduction de l'oxygène en eau.

Les transferts d'électrons, intervenant lorsque les enzymes Lac3 et UniK161 sont immobilisées, sont représentés en Figure chap.III-22A. Ainsi, le centre T1 est connecté à la surface de l'électrode par un transfert d'électron interfacial (k_1). Le transfert monoélectronique, de quatre électrons successifs au site T2/T3, est assuré par un transfert d'électron intramoléculeaire. Dans ce modèle, l'oxydation du Cu(I) en Cu(II) (site T1), est couplée à la réduction de l'oxygène en eau. La vague d'électrocatalyse obtenue est limitée par la cinétique et non pas le transport de masse, puisque l'enzyme est toujours saturée en substrat (Figure chap.III-22B).

Le modèle décrit les transferts monoélectroniques successifs de l'électrode au site T1. Selon l'orientation enzymatique, le T1 est localisé à des distances variables de l'électrode. Le courant catalytique obtenu obéit à l'équation 1 suivante :

$$j = \frac{j_{lim}}{\beta d_0} \times \frac{e_1 - e_2}{1 + e_1} \ln \left(\frac{pe_1^\alpha + 1 + e_1}{pe_1^\alpha + (1 + e_1)\exp(-\beta d_0)} \right) \quad (1)$$

Le facteur βd_0 prend en compte les différentes orientations adoptées par la laccase à la surface de l'électrode. De ce fait, le terme $\exp(-\beta d_0)$ fluctue en fonction des différentes constantes de transfert d'électron interfacial. Il varie entre $k_{min} = k^0 \exp(-\beta d_0)$ et $k_{max} = k^0$. k^0 est la constante standard de transfert interfacial d'électron, β est la constante de décroissance du milieu et d_0 la distance entre le site T1 et l'électrode. e_1 est la force électromotrice du transfert d'électron interfacial, définie par l'équation (2) :

$$e_1 = \exp \left[\left(\frac{-F}{RT} \right) \times (E - E_{Cu(T1)}^0) \right] = \frac{k_{1a}}{k_{1c}} \quad (2)$$

$E_{Cu(T1)}^0$ est le potentiel électrochimique standard du cuivre T1. Les constantes de transfert d'électrons, k_{1a} et k_{1c} , entre l'électrode et le centre T1, sont dépendantes du potentiel de l'électrode de travail E .

e_2 est le biais catalytique, qui décrit la tendance de l'enzyme à oxyder ou réduire l'oxygène en eau, selon la formule (3) suivante :

$$e_2 = \exp \left[\left(\frac{-4F}{RT} \right) \times (E_{Cu(T1)}^0 - E_{O_2/H_2O}^0) \right] = \frac{k_{2c}}{k_{2a}} \quad (3)$$

Les constantes de vitesses k_{2c} et k_{2a} correspondent aux fréquences catalytiques pour l'oxydation de l'eau et la réduction de l'oxygène. Indépendantes du potentiel de l'électrode de travail, elles prennent en compte les transferts intramoléculaires tels que le transfert d'électron entre le T1 et le T2/T3, les transferts de protons, la fixation du substrat et la libération du produit. Nous considérerons dans cette étude que la réaction catalytique est largement déplacée vers l'ORR. Par défaut, le potentiel d'équilibre standard du couple O_2/H_2O , E_{O_2/H_2O}^0 , est fixée à 0,79 V vs SHE à pH5.

p est le ratio entre la somme des constantes k_{2c} et k_{2a} sur la constante standard de transfert d'électrons. Il est défini par l'équation (4) suivante :

$$p = \frac{k_{2a} + k_{2c}}{k^0} \quad (4)$$

j_{lim} est la densité de courant limite de catalyse, lorsque O_2 est réduit en H_2O . L'équation (5) correspondante est :

$$j_{lim} = 4F\sigma_{enzyme}k_{2c} \quad (5)$$

Les vagues d'ORR pour les électrodes **Ph-Lac3** et **Ph-UniK161** ont été modélisées en suivant l'équation (1), les résultats sont présentés sur le voltampérogramme de la Figure chap.III-23A. La vague bioélectrocatalytique, modélisée pour un nombre d'électron égal à 1, se superpose très bien avec la courbe expérimentale. Les simulations donnent accès aux valeurs théoriques résumées dans la Figure chap.III-23B. $E_{Cu(T1)}^0$ est de 0,7 vs NHE pour **Ph-Lac3** et **Ph-UniK161**, en accord avec la littérature.³³² Les valeurs de βd_0 , environ 9,4 pour les deux enzymes, sont plus faibles que celles calculées lorsque **UniK161** et **Lac3** ont été immobilisées par « π -stacking » sur électrodes de NTCs ($\beta d_0 = 13$).³²⁷ Le greffage covalent diminue donc les orientations possibles à la surface de l'électrode, ce qui est logique puisque une seule fonction chimique est présente à la surface des enzymes. De plus, les valeurs de p sont similaires à ce qui a été calculé précédemment.³²⁷

UniK161 et **Lac3** se comportent de la même manière à la surface de l'électrode. La différence majeure est le courant catalytique de réduction, qui est globalement plus élevée pour **Lac3** (-2,23 mA.cm⁻² vs -1,33 mA.cm⁻²). Ceci s'explique par la plus grande concentration surfacique en enzyme **Lac3**, dont le nombre de point d'ancrage aux **NTCs-Ph-N3** est deux fois plus important. Par ailleurs, les constantes catalytiques k_{2c} ont été estimées à 58 s⁻¹ pour **Lac3** et 69 s⁻¹ pour **UniK161** à partir de la quantité d'enzymes immobilisées et actives pour l'ORR. Ces constantes sont proches de celles

mesurées en solution en présence d'ABTS, $k_{cat} = 128$ et $122s^{-1}$ pour **Lac3** et **UniK161** respectivement.³⁴⁴

L'objectif de la mutation de la lysine 161 était de rapprocher le site T1 au plus proche de la surface de l'électrode, afin d'obtenir un TED efficace. Au contraire, dans l'enzyme native, les lysines sont proches du T2/T3. Des études précédentes sur Lac3 ont montré que le potentiel rédox du T3 n'était que de 6 mV inférieur au site T1.³⁴⁵ Ces résultats sembleraient montrer qu'une connexion directe au niveau du T2/T3 a lieu dans le cas de **Lac3-alcyne**, conduisant à un comportement en électrocatalyse quasi-identique à l'enzyme **UniK161-alcyne** dont le greffage positionne le T1 à proximité de la surface. Une autre hypothèse serait que le TED passe par le site T1 dans tous les cas, que l'orientation de l'enzyme à la surface de l'électrode soit forcée ou non. Des études récentes sur les enzymes **MvBOD**²⁶³ et la **laccase de *Didymocrea sp. J6***³⁴⁶ ont montré que le TED via le site T2/T3 était possible. De plus, le signal électrochimique serait influencé par le pH d'immobilisation de l'enzyme à la surface de l'électrode ainsi que la présence d'une certaine concentration en inhibiteurs de type fluorure ou chlorure.²⁶⁶

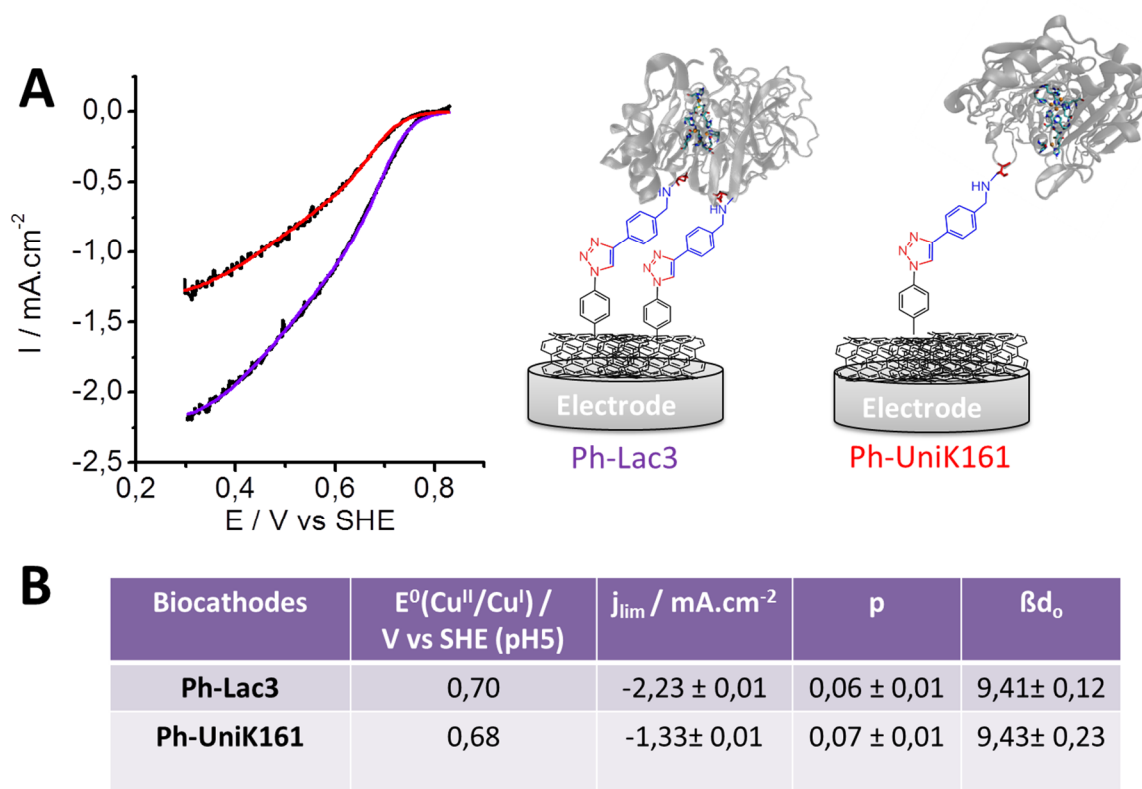


Figure chap.III-23 : (A) Voltampérométrie des électrodes de NTCs Ph-Lac3 et Ph-UniK161, sous O_2 , après soustraction du courant capacitif des NTCs (courbes noires), et modélisation de la réponse catalytique en appliquant le modèle d'Amstrong (courbe violette pour Ph-Lac3 et rouge pour UniK161). (B) Tableau récapitulatif des paramètres calculées grâce au modèle.

II.3.A (iv) Conclusion

Le greffage spontané de TABD a permis d'atteindre un TED efficace des enzymes **Ph-Lac3** et **Ph-UniK161** après greffage covalent par cycloaddition-1,3-

dipolaire de Huisgen. En s'astreignant des limites de diffusion de l'O₂ et de l'ABTS dans le film de NTC et de polymère organique, il a été estimé que 70% des enzymes immobilisées sont connectées en TED. De plus, une bonne densité de courant de réduction égale à -2,5 mA.cm⁻² a été obtenue avec l'enzyme **Lac3**.

La modélisation de la réponse électrocatalytique par le modèle d'Armstrong a révélé une parfaite corrélation avec nos résultats expérimentaux. Les dispersions de transfert d'électrons interfaciaux à la surface de l'électrode ont été restreintes par rapport à l'immobilisation des enzymes par interactions hydrophobes. En effet, le greffage covalent diminue le nombre d'orientations possibles à la surface de l'électrode.

De la même manière, le greffage covalent des enzymes **Lac3** et **UniK161** va être étudiée sur les structures de dendrimère-N₃ et RAFT-N₃. Le but est de voir si le nombre de fonctions -N₃ et la structuration de l'électrode influencent la bio-électrocatalyse

II.3.B ELABORATION DE BIOCATHODES A BASE DE LACCASE IMMOBILISEES, PAR LIAISON COVALENTE

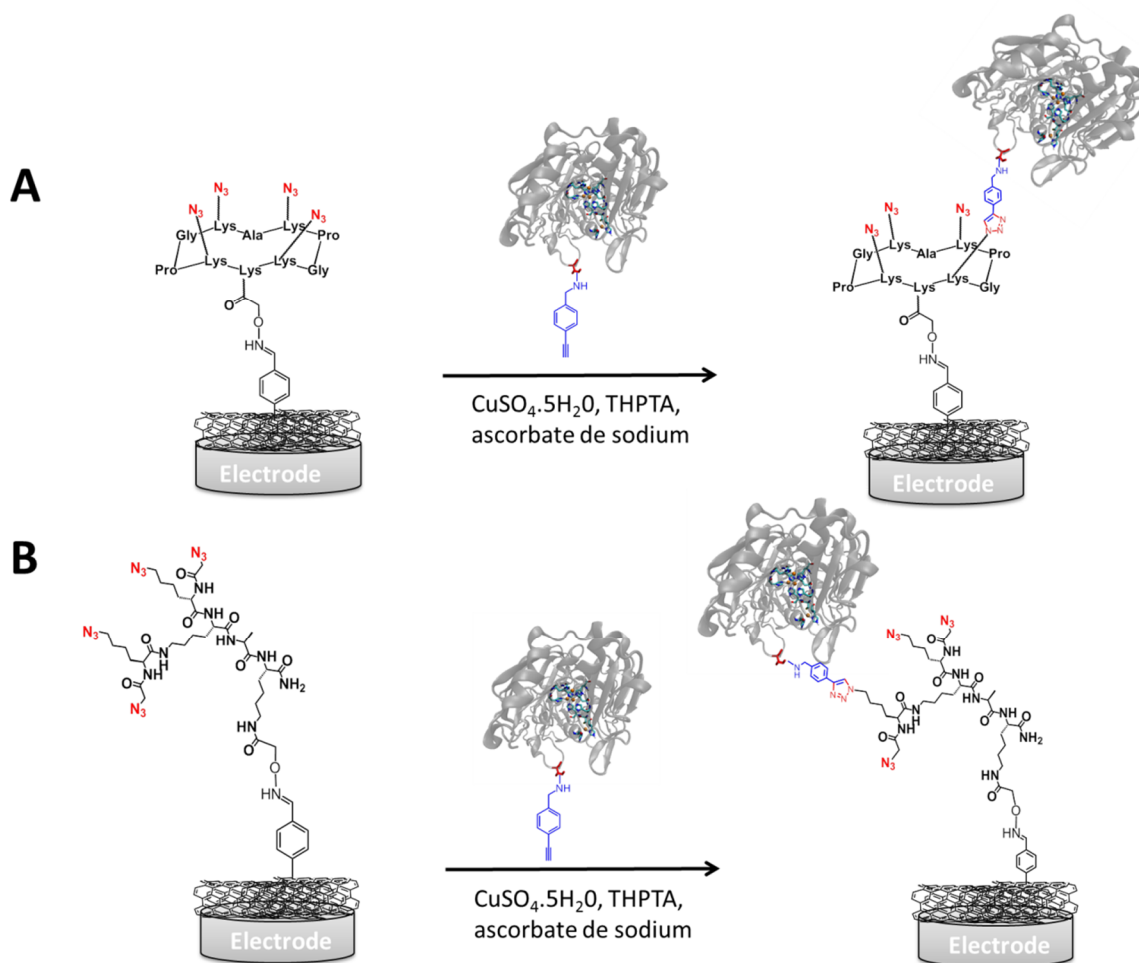


Figure chap.III-24 : Schémas des réactions de cycloaddition-1,3-dipolaire mises en jeu sur l'enzyme UniK161 sur les électrodes de (A) NTC-RAFT-N₃ et (B) NTC-dendrimère-N₃. Pour rappel, TFBD est préalablement électrogreffé à la surface de l'électrode de NTC, puis la clickoxyme de RAFT-N₃ et dendrimère-N₃ est réalisée.

Comme précédemment, **Lac3-alcyne** et **UniK161-alcyne** ont été immobilisées par cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen sur des électrodes de NTCs modifiées par les molécules RAFT- N_3 et dendrimère- N_3 (Figure chap.III-24). Quatre bioélectrodes enzymatiques sont obtenues : (1) **dendrimère-Lac3** ; (2) **dendrimère-UniK161** ; (3) **RAFT-Lac3** ; (4) **RAFT-UniK161**. Chaque électrode est analysée par voltampérométrie cyclique sous argon, O_2 et en présence de 0,3mM d'ABTS dans un tampon acétate à pH 5 (Figure chap.III-24).

Sous argon (courbes noires), les voltampérogrammes sont similaires pour toutes les électrodes : le cycle obtenu décrit le courant capacitif, influencé par l'épaisseur du film de NTCs. La présence d'oxygène dans l'électrolyte (courbes rouges) ne conduit à aucune vague catalytique de réduction de l'oxygène, signe qu'aucun TED ne s'effectue entre le site actif de l'enzyme et l'électrode.

Afin de vérifier l'immobilisation covalente des enzymes à la surface de l'électrode, 0,3 mM d'ABTS sont ajoutés dans l'électrolyte en présence d' O_2 . L'ABTS agit en tant que médiateur rédox entre le site actif de l'enzyme et la surface de l'électrode. Une vague catalytique de réduction de l'oxygène apparaît dans ces conditions (courbes vertes). Ainsi, **Lac3-alcyne** et **UniK161-alcyne** ont été immobilisées par interaction covalente, mais la connexion enzymatique, sur le **RAFT- N_3** et le **dendrimère- N_3** , n'est pas efficace.

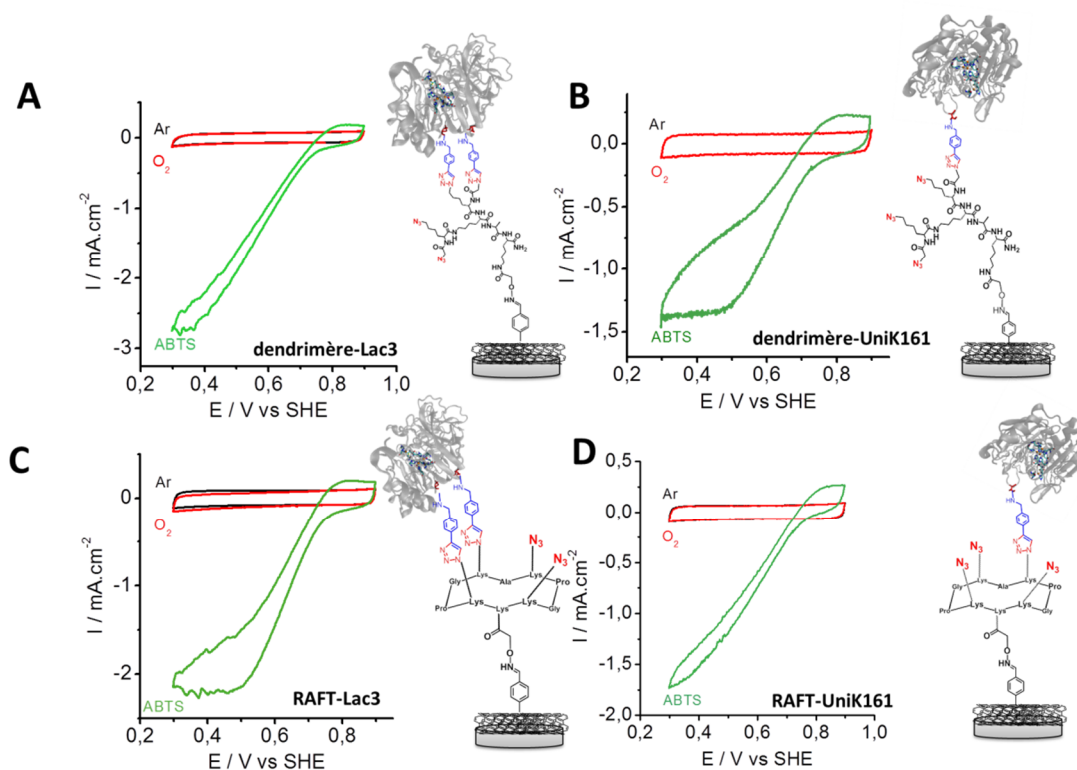


Figure chap.III-25 : Voltampérométries cycliques, après cycloaddition de Huisgen, des électrodes de NTCs modifiées par les enzymes dendrimère-Lac3 (A), dendrimère-UniK161(B), RAFT-Lac3 (C), RAFT-UniK161 (D) sous argon (coube noire), O_2 (courbe rouge) et O_2 + 0,3 mM ABTS (courbe verte). Conditions : 50 mM tampon acétate à pH5, $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, RT ; électrode de TFBD.

La densité de courant de réduction obtenue, sous ABTS, est proportionnelle à l'efficacité catalytique de l'enzyme et à la concentration de surface. **Lac3-alcyne** (Figure chap.III-25A et C) réduit l'oxygène par TEM, à des densités de courant respectives de $-2,5 \text{ mA.cm}^{-2}$ et -2 mA.cm^{-2} , lorsqu'elle est greffée sur le dendrimère et le RAFT. Par ailleurs, l'efficacité catalytique d'**UniK161-alcyne** est deux fois moins importante : les densités de courant sont égales à $-1,5 \text{ mA.cm}^{-2}$ pour les deux types de bioélectrodes (Figure chap.III-25B et D). Ces résultats suggèrent que la quantité d'enzyme **Lac3-alcyne** greffée est supérieure d'un facteur deux à **UniK161-alcyne**. Ceci est en accord avec la présence de deux fonctions alcynes sur Lac3, contre une seule sur UniK161.

Malgré un grand nombre de fonctions azotures accessibles à la surface des bioélectrodes et à l'immobilisation efficace d'entités ferrocène, le TED de réduction de l'oxygène n'a pas été observé par voltampérométrie cyclique. L'une des explications les plus plausibles est que la distance entre le site actif de l'enzyme et l'électrode est trop éloignée.

II.3.C QUANTIFICATION PAR MICROBALANCE A CRISTAL DE QUARTZ (MCQ)

II.3.C (i) Principe

La microbalance à cristal de quartz³⁴⁷ est généralement mise en œuvre pour étudier une prise de masse à la surface d'une électrode, ainsi que les contraintes dans les films (viscosité,...). La sensibilité, inférieure au μg , est liée aux propriétés piézoélectriques du quartz. Le capteur, appelé résonateur à cristal de quartz, est un disque de quelques centaines de micromètres d'épaisseur, dont les deux faces sont recouvertes par deux électrodes métalliques en or ou en platine. Une différence de potentiel, appliquée entre les deux électrodes, maintient le quartz en vibration.

En 1955, Sauerbrey fût le premier à développer le principe de la microbalance à cristal de quartz pour la mesure de la prise de masse.³⁴⁸ Son équation, utilisée pour un dépôt rigide de faible épaisseur, est la suivante :

$$\Delta f_m = -N \frac{2f_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \times \frac{\Delta m}{S}$$

La variation de masse Δm (g.cm^{-2}) se traduit par une variation de fréquence d'oscillation Δf_m (Hz). La formation d'une couche sur la surface de l'électrode sera caractérisée par une diminution de fréquence. A contrario, la dissolution d'une espèce engendre l'augmentation de la fréquence.

Le ratio $\frac{2f_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}}$ est la sensibilité, propre au quartz, et dépendante des paramètres suivants : f_0 , la fréquence de résonance fondamentale du quartz (Hz), ρ_q la masse

volumique du quartz (g.cm^{-3}), μ_q le module de cisaillement ($\text{g.cm}^{-1}.\text{s}^{-1}$). La sensibilité est égale à $56,6 \text{ Hz.cm}^2.\mu\text{g}^{-1}$ si $f_0 = 5 \text{ MHz}$ et $226,4 \text{ Hz.cm}^2.\mu\text{g}^{-1}$ si $f_0 = 10 \text{ MHz}$. L'augmentation de la sensibilité du résonateur varie avec la fréquence de résonance et le rang de l'harmonique de la fréquence fondamentale N ($N = 1, 3, 5, 7, \dots$). De ce fait, plus l'harmonique est élevée, plus la surface analysée par le capteur, S (cm^2), diminue.

Une technique plus poussée, appelée microbalance à cristal de quartz dispersive permet de suivre l'évolution de la dissipation du film formé (D) à la surface du quartz en fonction du temps. Cette méthode donne des informations sur la viscosité du film. Ainsi, une couche rigide aura une valeur de D proche de 0, tandis qu'un film visqueux aura une dissipation élevée.

Les mesures de variation de fréquence et de dispersion en fonction du temps sont reportées sur un profil de MCQ. Le logiciel de traitement des données permet de calculer automatiquement la variation de la masse en fonction du temps pour chaque harmonique. Nos mesures ont été réalisées avec un quartz en or placé dans un module de MCQ. Ce dernier est relié à une pompe péristaltique, qui fait circuler les différents analytes au sein du module. Dans un premier temps, nous avons suivi la formation de TABD à la surface du quartz. Dans un second temps, le greffage de l'enzyme par cycloaddition de Huisgen a été analysé. Enfin, nous avons quantifié le taux de recouvrement, Δm , de chaque espèce à la surface d'électrode d'or nu, puis recouverte par un film de NTCs.

II.3.C (ii) *Suivi de la formation de la couche de TABD*

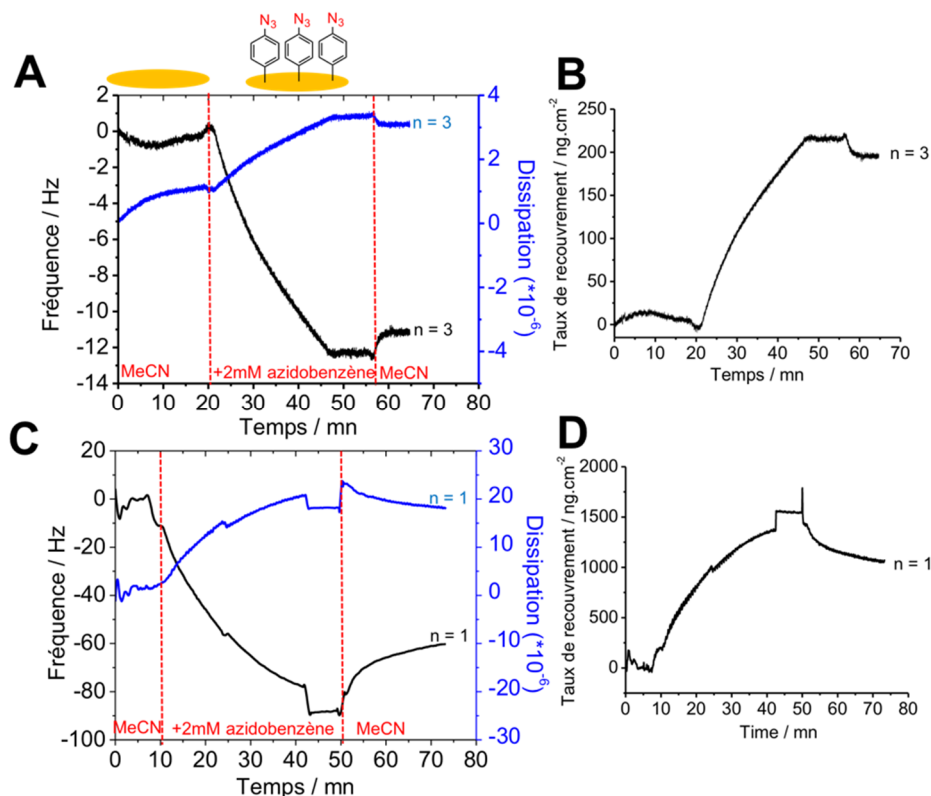


Figure chap.III-26 : (A) Profil de MCQ obtenu au cours du greffage de 2 mM d'ADAB sur quartz d'or et (B) taux de recouvrement correspondant. (C) Profil obtenu au cours du greffage de 2 mM d'ADAB sur quartz d'or modifié par un film de NTC et (D) taux de recouvrement correspondant. Conditions : débit pompe péristaltique : 10 $\mu\text{L}\cdot\text{mn}^{-1}$; électrolyte MeCN.

Avant son utilisation en MCQ, le quartz doré est préalablement traité par UV-ozone pendant 15 minutes, puis placé sous agitation dans une solution d'éthanol absolue pendant 30 minutes. Le traitement UV-ozone sert à éliminer toutes espèces absorbées, conduisant à la formation d'une couche d'or oxydée Au-OH, ensuite réduite en Au⁰ après agitation dans la solution d'éthanol.

La fonctionnalisation du quartz doré par le film de NTCs est réalisée par transfert de membrane. La dispersion de NTCs multifeuillets, une solution aqueuse concentrée à 5 mg.L⁻¹, est filtrée sur une membrane de cellulose afin d'obtenir un film homogène de NTCs. La membrane est ensuite déposée sur le quartz doré et la cellulose est ensuite dissoute, à la surface de l'électrode d'or, grâce à un mélange de solvants éthanol/acétone (1:1).

Le suivi de la formation d'aryle diazonium sur électrodes d'or a été étudié en 2005 par Bélanger.³⁴⁹ La réduction de diverses molécules organiques à la surface de l'électrode est engendrée par voltampérométrie cyclique couplée à une mesure de MCQ (E-MCQ) pour conduire à des taux de recouvrement compris entre 150 et 200 ng.cm⁻². Nous avons suivi par MCQ la réduction spontanée de TABD à la surface d'une électrode d'or et d'un film de NTC (Figure chap.III-26).

Dans un premier temps, le quartz est recouvert par l'électrolyte pur sans analyte : le solvant acétonitrile. La dissipation et la fréquence reste proche de zéro. Lorsque la solution à 2mM de TABD est injectée dans le module de MCQ, la variation de fréquence Δf diminue à la fois sur l'électrode d'or et le film de NTC. La réaction dure environ 40 minutes dans les deux cas. Après stabilisation de la fréquence, la surface de l'électrode est rincée avec la solution d'acétonitrile afin d'éliminer les espèces non greffées.

Sur électrode d'or, la variation de fréquence moyenne conduit à un taux de recouvrement moyen de 159 ng.cm⁻² (Figure chap.III-26B et Tableau chap.III-4). La dissipation, égale à $3\cdot 10^{-6}$, indique que la couche formée est plutôt rigide. Cependant, cette faible augmentation suggère la présence d'une couche de solvant à la surface du film d'azidopolyphénylène.

L'épaisseur du film de NTC influence fortement la fréquence de résonance du quartz. Les harmoniques 1 et 3 sont les seules exploitables, ce qui indique que la sensibilité du résonateur est plus faible (Figure chap.III-26D). Toutefois, un taux de recouvrement égal à 767 ng.cm⁻² a été calculé. Cette valeur est cinq fois plus importante que sur électrode d'or, ce qui confirme la plus grande surface spécifique des NTCs. Par ailleurs, la déviation standard élevée de 230 ng.cm⁻² est essentiellement liée à la faible sensibilité du résonateur (Tableau chap.III-4).

Surfaces	Δf (Hz)	Δm (ng.cm ⁻²)
Au/TABD	-9 ± 1,3	159 ± 18
Au/NTC/TABD	-42 ± 20	767 ± 230

Tableau chap.III-4 : Récapitulatif des variations de fréquence et masse suite au dépôt de 2 mM de TABD sur électrodes d'or et de NTC.

Pour la première fois, la réduction spontanée de sels d'aryle diazonium a été suivie par MCQ-dispersive à la fois sur or et électrode de NTCs. La variation de masse obtenue sur or est en accord avec les précédents travaux de Bélanger.³⁴⁹ Malgré la faible sensibilité du résonateur lorsqu'il est recouvert par un film de NTC, nous avons obtenu un taux de recouvrement en TABD cinq fois supérieur à l'électrode nue. Les quartzs, fonctionnalisés par des groupements azotures, sont prêts à être utilisés pour la réaction de cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen avec les enzymes Lac3-alcyne et UniK161-alcyne.

II.3.C (iii) *Suivi du greffage covalent des enzymes*

Afin d'éliminer les traces de solvants organiques à la surface du film de TABD, le quartz est rincé abondamment avec 50 mM de tampon acétate à pH5. La cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen est suivie en MCQ sur électrodes d'or et de NTCs pour les enzymes **Lac3-alcyne**, **UniK161-alcyne** et **Lac3**.

La Figure chap.III-27 présente les profils de MCQ pour le greffage des enzymes Lac3-alcyne et Lac3 sur électrode d'or fonctionnalisé par une couche d'azidobenzène.

Après l'injection du tampon et la stabilisation des fréquences de résonance, une solution à 1%(g/v) de protéine albumine de sérum bovin (BSA) est déposée à la surface de l'électrode. Cette molécule est fréquemment utilisée en biologie pour bloquer les sites d'adsorptions non spécifiques.³⁵⁰ Dans notre cas, elle s'adsorbe sur la surface d'or non fonctionnalisée par TABD. Le rinçage de l'électrode par le tampon élimine environ un tiers de BSA non absorbée. Son taux de recouvrement varie ainsi entre 320 et 680 ng.cm⁻² (Tableau chap.III-5).

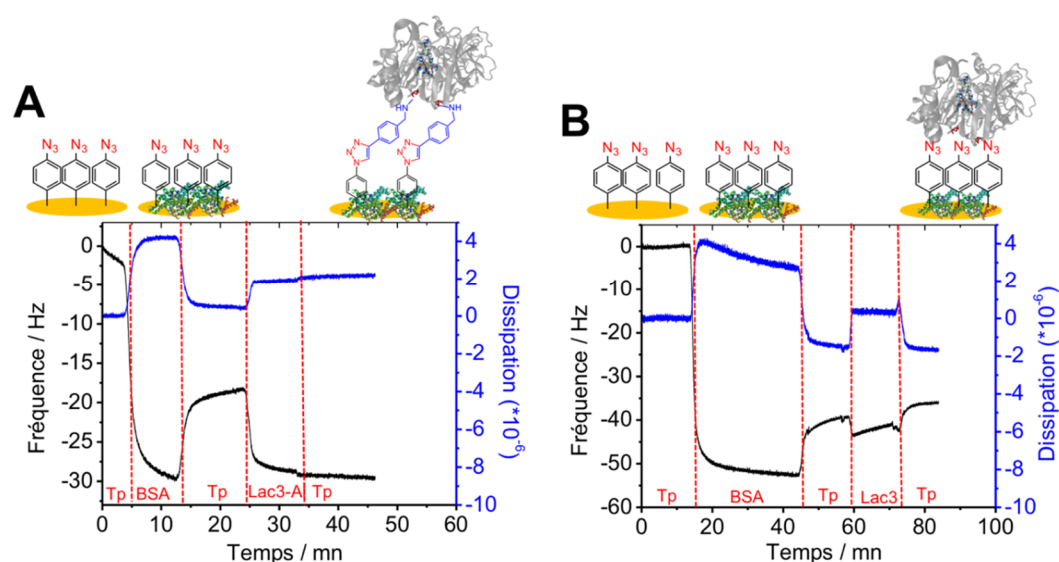


Figure chap.III-27 : (A) Profil de MCQ obtenu au cours du greffage de 1% de BSA, suivi par la cycloaddition-1,3-dipolaire de l'enzyme Lac3-alcyne sur quartz d'or-ADAB. (B) Profil de MCQ obtenu au cours du greffage de 1% de BSA, suivi par la cycloaddition-1,3-dipolaire de l'enzyme Lac3 sur quartz d'or-ADAB. Conditions : débit pompe péristaltique : 10 $\mu\text{L}\cdot\text{mn}^{-1}$, électrolyte 50 mM tampon acétate à pH 5, [enzyme] = 75 μM , $n = 3$.

La cycloaddition-1,3-dipolaire est réalisée avec l'enzyme **Lac3-alcyne** et le catalyseur natif **Lac3** à une concentration de 75 μM . Le greffage de covalent de **Lac3-alcyne** se révèle très efficace avec une diminution rapide de la fréquence ($\Delta f = -4,5$ Hz) et une durée de réaction égale à 10 minutes. Suite au rinçage de la surface par le tampon, la fréquence n'augmente pas, ce qui confirme la stabilité de l'immobilisation de l'enzyme (Figure chap.III-27A). Par ailleurs, l'injection de l'enzyme Lac3 (sans fonction alcyne) conduit à une variation de fréquence négligeable, ce qui indique que la fonction alcyne est indispensable pour le greffage de l'enzyme (Figure chap.III-27B). De plus, la BSA joue son rôle en bloquant tous les sites non spécifiques, puisqu'aucune augmentation de masse n'est détectée avec l'enzyme Lac3. Enfin, la dissipation, proche de 0 dans les deux cas, indique qu'il n'y a pas de changement de rigidité de la surface après immobilisation.

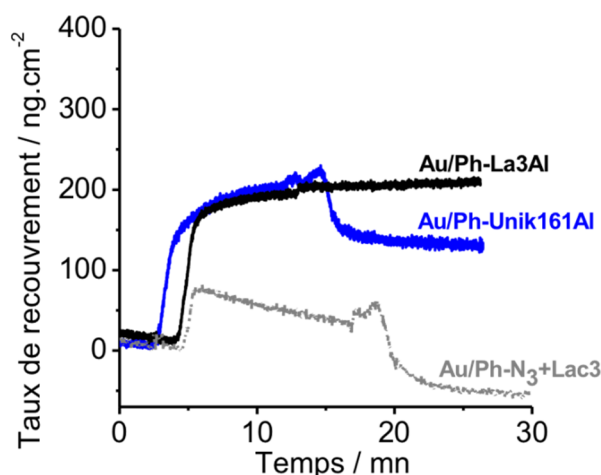


Figure chap.III-28 : Taux de recouvrement pour les enzymes Lac3 (courbe grise), UniK161-alcyne (courbe bleue), et Lac3-alcyne (courbe noire) au cours de la réaction de cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen sur électrode d'or modifiée par le Ph-N₃.

Surfaces	Espèces	Δf (Hz)	Δm (ng.cm ⁻²)
Au + BSA + Lac3-alcyne	1% BSA	-3,83 ± 0,11	322 ± 6
	75 μM Lac3-alcyne	-4,5 ± 0,2	167 ± 6
Au + BSA + UniK161-alcyne	1% BSA	-33 ± 1	583 ± 1
	75 μM UniK161-alcyne	-7 ± 1	119 ± 3
Au + BSA + Lac3	1% BSA	-49 ± 2	675 ± 13
	75 μM Lac3	0	0

Tableau chap.III-5 : Récapitulatif des variations de fréquence et masse suite au greffage de 75μM d'enzymes Lac3-alcyne, UniK161-alcyne et Lac3 sur électrodes d'or-Ph-N₃

La Figure chap.III-28 indique les masses de Sauerbrey (ng.cm⁻²) obtenues pour les différentes enzymes au cours de la réaction de cycloaddition-1,3-dipolaire. Des taux de recouvrements de 167 ng.cm⁻² et 119 ng.cm⁻² sont calculées pour les enzymes **Lac3-alcyne** et **UniK161-alcyne** respectivement (Tableau chap.III-5), en accord avec les variations de masse obtenues pour des enzymes immobilisées.³⁵¹⁻³⁵³ Le greffage de **Lac3-alcyne** est 1,5 fois plus important, comme on pouvait s'y attendre avec la présence de deux fonctions alcyne sur Lac3. Comme espéré, la masse d'enzyme Lac3 est égale à zéro après rinçage par le tampon acétate, ce qui signifie que la protéine ne s'adsorbe pas à la surface de l'électrode si aucune fonction alcyne n'est présente à la surface de sa couche protéique.

La Figure chap.III-29 présente les profils de MCQ pour le greffage des enzymes **Lac3-alcyne** et **Lac3** sur électrode d'or fonctionnalisée par un film de NTC-Ph-N₃. Comme précédemment, la BSA est injectée afin de bloquer les sites d'adsorptions aspécifiques : ces derniers sont plus nombreux dus à la porosité importante du film de NTC. Ainsi, le taux de recouvrement de la BSA sur NTCs est de trois à six fois plus

important que sur or avec des variations de masse comprises entre 950 et 1200 ng.cm⁻² (Tableau chap.III-6).

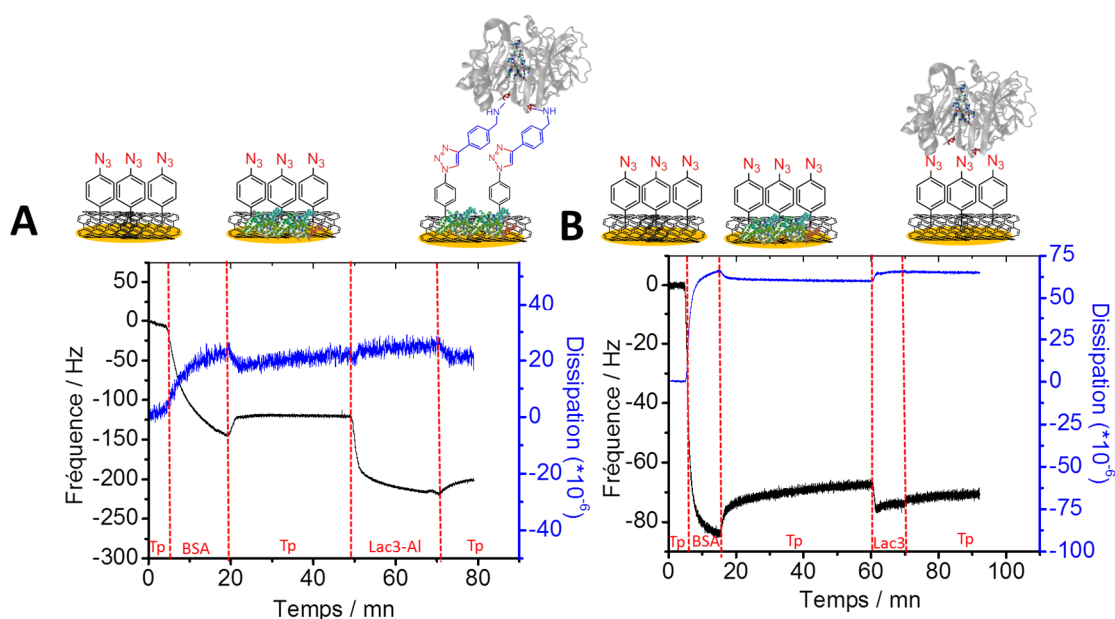


Figure chap.III-29 : (A) Profil de MCQ obtenu au cours du greffage de 1% de BSA, suivi par la cycloaddition-1,3-dipolaire de l'enzyme Lac3-alcyne sur film de NTCs-Ph-N₃ ;(B) Profil de MCQ obtenu au cours du greffage greffage de 1% de BSA, suivi par la cycloaddition-1,3-dipolaire de l'enzyme Lac3 sur film de NTCs-Ph-N₃. Conditions : harmonique = 3 ; débit pompe péristaltique : 10 µL.mn⁻¹ ; électrolyte 50 mM tampon acétate à pH 5 ; [enzyme] = 75 µM

L'injection de **Lac3-alcyne** dans le module conduit à une variation de fréquence de -90Hz et un taux de recouvrement moyen de 1770 ng.cm⁻². A contrario, le greffage de **Lac3** donne une variation de fréquence 60 fois moins élevée ($\Delta f = -1,5$ Hz), conduisant à un taux de recouvrement négligeable de 32 ng.cm⁻², correspondant à des enzymes simplement physisorbées (Figure chap.III-30).

La concentration surfacique calculée suite aux analyses électrochimiques est de 1 pmol.cm⁻² pour l'enzyme **Lac3-alcyne**. En tenant compte d'un degré d'hydratation de l'enzyme de 50 %, ³⁵⁴ la MCQ conduit à des concentrations de surface en **Lac3** de 20 pmol.cm⁻² (pour un poids moléculaire de 60 kDa). Les valeurs plus élevées obtenues en MCQ s'expliquent par la prise en compte de toutes les enzymes immobilisées, actives et connectées en TED ou non.

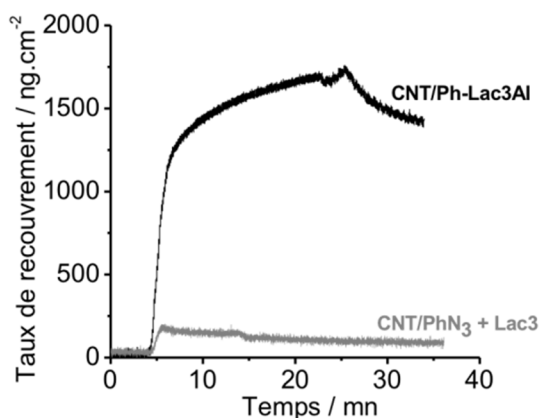


Figure chap.III-30 : Taux de recouvrement pour les enzymes Lac3 (courbe grise), et Lac3-alcyne (courbe noire) au cours de la réaction de cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen sur électrode d'or, recouverte par un film de NTC-Ph-N₃.

Surfaces	Espèces	Δf (Hz)	Δm (ng cm ⁻²)
Au-CNT + BSA + Lac3-alcyne	1% BSA	-110 ± 10	1180 ± 147
	75 μ M Lac3-alcyne	-90 ± 7	1770 ± 145
Au-CNT + BSA + Lac3	1% BSA	-47 ± 15	962 ± 158
	75 μ M Lac3	-1,5 ± 0,3	32 ± 9

Tableau chap.III-6 : Récapitulatif des variations de fréquence et masse suite au greffage de 75 μ M d'enzymes Lac3-alcyne, UniK161-alcyne et Lac3 sur électrodes d'or modifiées par un film de NTC-Ph-N₃.

II.4 CONCLUSION

En collaboration avec l'équipe de Thierry Tron à Marseille, nous avons travaillé avec l'enzyme Lac3 sp.30 et son mutant UniK161. Le premier, **Lac3-alcyne**, comporte deux fonctions alcynes sur les lysines 40 et 71, proche du cluster trinuéculaire T2/T3. Le mutant **UniK161-alcyne** est composé d'une seule fonction alcyne, présente sur la lysine 161, à proximité du cuivre T1. Ce projet de recherche vise à étudier l'influence de l'immobilisation de l'enzyme, au niveau de groupements chimiques situés de part et d'autre de la coque protéique, sur la connexion enzymatique. Afin de réaliser le greffage covalent des enzymes sur électrodes nous avons employé la réaction de cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre. Pour ce faire, la surface a été préalablement fonctionnalisée avec des fonctions azotures - N₃.

Dans un premier temps, une nouvelle architecture d'électrode a été développée grâce au greffage, par clickoxime, de molécules de **RAFT-N₃** et **dendrimère-N₃**, à la surface d'électrode modifiée par un benzaldéhyde. L'utilisation de l'EF en tant qu'espèce rédox active modèle, a permis de calculer les constantes de transfert

d'électrons hétérogènes lorsque les molécules d'intérêts sont immobilisées sur électrode plane. Les constantes calculées sont égales à 30s^{-1} dans les deux cas, soulignant une certaine passivation de l'électrode lors de l'électrogreffage de TABD. Par ailleurs, l'immobilisation des mutants **Lac3-alcyne** et **UniK161-alcyne** sur ces bioélectrodes n'a révélée aucun TED, même si une vague de réduction catalytique proche de -2 mA.cm^{-2} est observée en présence d'ABTS en solution. Bien que les enzymes aient été greffées par lien covalent à la surface, l'éloignement certain entre le site actif et l'électrode rend le TED impossible.

Dans un second temps, TABD a été immobilisé par réduction spontanée sur un film de NTC. Le greffage covalent des mutants de laccase s'est révélé très efficace ; dans les deux cas, un TED est observé à des densités de courant variant entre $-2,2\text{ mA.cm}^{-2}$ et $-1,3\text{ mA.cm}^{-2}$ pour **Lac3-alcyne** et **UniK161-alcyne**, respectivement. La modélisation de la réponse catalytique, à l'aide des équations développées par F. Armstrong, a permis de montrer que l'immobilisation covalente diminue les orientations possibles de l'enzyme à la surface de l'électrode par rapport au greffage par « π -stacking ». De plus, la connexion enzymatique de ces mutants ne diffère en rien, mis à part la densité de courant obtenue qui est de manière générale 1,5 fois plus élevée pour **Lac3-alcyne**. Ceci est en accord avec la présence de deux sites d'accroche sur cette enzyme. La cycloaddition de Huisgen est aussi efficace sur or que sur NTCs. La MCQ permet d'affirmer que la cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen est spécifique. Par ailleurs, cette méthode est rapide, spontanée et ne nécessite pas une concentration en matière importante. Ce dernier paramètre est notable, puisque les catalyseurs biologiques avec lesquels nous avons travaillé, sont produits en faible quantité.

La connexion en TED de l'enzyme Lac3 donne d'excellentes propriétés catalytiques via la connexion par la lysine 161, proche du centre T1. De manière surprenante, les lysines de l'enzyme native, proches des centres T2/T3, conduisent à comportement bioélectrocatalytique similaire. Il pourrait s'expliquer par la proximité des centres T2/T3 de la lysine 71 et par la valeur du potentiel électrochimique du site T2/T3, de 6 mV inférieur à celui du T1. D'autre part, les signatures spectroscopiques des cuivres T1 et T2/T3 étant significativement différentes, la spectroélectrochimie est envisageable pour discriminer l'orientation enzymatique via les sites T1 et T2/T3. Ces expériences sont à mettre en relation avec les résultats récents obtenus dans la connexion de *MvBOD* et de laccases via un TED au niveau du T2/T3, exposé dans le chapitre I (Chapitre IIV.4.C).^{244,263}

Dans cette section, l'ingénierie enzymatique a été utilisée afin de produire des biocathodes enzymatiques efficaces, greffées de façon covalente sur électrodes de NTCs. L'application principale est le design de biopiles enzymatiques, qui utilisent des catalyseurs biologiques à l'anode et à la cathode pour produire de l'énergie. Cette thématique est développée dans la dernière partie de ce chapitre

III. VERS LE DESIGN DE BIOPILES ENZYMATIQUES H₂/O₂

III.1 INTRODUCTION

Les biopiles enzymatiques H₂/O₂ associent une hydrogénase à l'anode et une MCO à la cathode, pour respectivement, oxyder H₂ en protons et réduire l'oxygène en eau. Avec le développement des hydrogénases tolérantes à l'oxygène au début des années 2000, le champ de recherche dans ce domaine s'est accru.³¹⁷ Aujourd'hui, les biopiles H₂/O₂ les plus performantes atteignent des densités de puissance de l'ordre de 1,5 mA.cm⁻².^{4,242,306} Pour de plus amples informations, un paragraphe leur est entièrement consacré dans le chapitre bibliographique dans le Chapitre IV.2.C.

Dans cette section, nous proposons un nouveau type de pile hybride H₂/air, réalisée à partir de la connexion du complexe de nickel [Ni(Cy,Arg)₂], bio-inspirée des hydrogénases et de l'enzyme **Bilirubine Oxydase de *Myrothecium verrucaria* (MvBOD)**. Ces catalyseurs ont été étudiés dans un système conventionnel de pile à combustible à diffusion de gaz. A titre de comparaison, nous avons également étudié dans le même système, une pile entièrement enzymatique, intégrant à l'anode, une hydrogénase [NiFe] membranaire, tolérante à l'oxygène et la cathode par l'enzyme thermostable **Bilirubine Oxydase de *Bacillus pumilus* (BpBOD)**. Dans un premier temps, nous présenterons les différents types de BODs utilisées dans ces biopiles, ainsi que les diverses stratégies mises en places pour les orienter par TED à la surface d'électrodes de NTCs. Dans un second temps, nous traiterons des résultats obtenus pour deux types de piles H₂/air.

III.2 LA BILIRUBINE OXYDASE EN TANT QUE BIO-CATHODE ENZYMATIQUE

III.2.A LES DIFFERENTS TYPES DE BODS UTILISEES

Les Bilirubines oxydases, qui font parties de la famille des MCOs, possèdent les mêmes centres cuivre T1, T2 et T3 que les laccases. Ils en existent plusieurs types en fonction des organismes dans lesquels elles sont produites, ce qui leur confèrent des propriétés physico-chimiques distinctes. Nous nous sommes intéressés à **MvBOD**, l'une des plus utilisées via sa disponibilité commerciale et à **BpBOD** produite dans l'équipe du Dr Nicolas Mano à Bordeaux.³⁵⁵

Possédant le potentiel électrochimique du cuivre T1 le plus élevé pour une BOD (Tableau chap.III-7), l'utilisation de **MvBOD** en tant que biocathode enzymatique a été largement étudiée depuis le début des années 2000.^{250,261,263} Elle fonctionne sur une gamme de pH variant de 5 à 7 et à des températures qui ne doivent pas excéder 35

°C. Cette dernière a été utilisée à température ambiante et pH5 dans la pile hydride H₂/air.

Organismes	Poids moléculaire / kDa	Potentiel électrochimique du cuivre T1 (V vs NHE)	Point isoélectrique
Myrothecium verrucaria	66	0,8	4,2
Bacillus Pumilus	59	0,62	5,29

Tableau chap.III-7 : Comparaison des propriétés physico-chimiques des enzymes BODs produites dans deux organismes différents.¹³²

Isolé d'une bactérie, **BpBOD** présente des caractéristiques sensiblement différentes de sa consœur. L'un des inconvénients pouvant freiner son utilisation est le potentiel électrochimique du cuivre T1, qui a une valeur de 180 mV inférieure à **MvBOD**. Purifiée dans un organisme thermophile, **BpBOD** a révélé une très bonne stabilité thermique à des températures allant jusqu'à 80°C et des pHs compris entre 4 et 7.³⁵⁶ Sa thermostabilité nous a particulièrement intéressés pour son association avec l'hydrogénase [NiFe] thermophile **Aquifex aeolicus** dans une biopile enzymatique H₂/air.

III.2.B REDUCTION BIO-ELECTROCATALYTIQUE DE L'OXYGENE

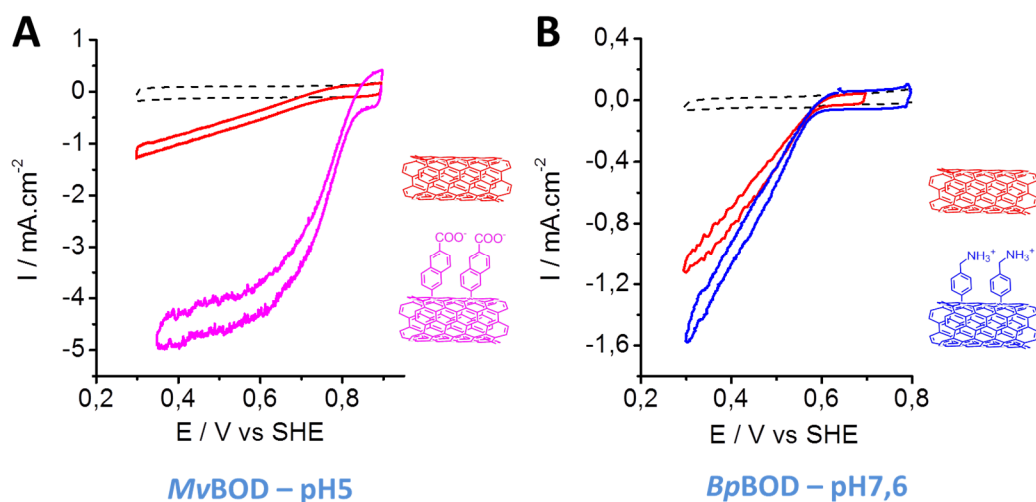


Figure chap.III-31 : (A) Voltampérométrie cyclique de la biocathode enzymatique **MvBOD** immobilisée sur différentes électrodes à base de NTCs fonctionnalisées ou non sous argon (courbe noire discontinue) et O₂ (courbes rouge et violette). Conditions : [**MvBOD**] = 2,5 mg.mL⁻¹ ; 0,2M tampon acétate à pH5 ; 10 mV.s⁻¹ ; RT. (B) Voltampérométrie cyclique de la biocathode enzymatique **BpBOD** immobilisée sur différentes électrodes à base de NTCs fonctionnalisées ou non sous argon (courbe noire discontinue) et O₂ (courbes rouge et bleue). Conditions : [**BpBOD**] = 10 μM ; 50 mM tampon acétate à pH7,6 ; 10 mV.s⁻¹ ; RT.

L'orientation enzymatique des enzymes **MvBOD** et **BpBOD** a été étudiée sur diverses électrodes de NTCs fonctionnalisées chimiquement ou non. Différents types

de dérivés aryldiazonium ont été électrogreffés sur électrodes de NTCs. A la suite des travaux réalisés, dans l'équipe, l'utilisation de groupement chargés négativement ou positivement permet de contrôler l'orientation de ces deux enzymes, via des dérivés 2-aminoéthylbenzène ou acide 2-aminonaphtoïque (Figure chap.III-31).^{263,344} La réduction bio-électrocatalytique de l'oxygène a été étudiée à pH 5 et 7,6 pour **MvBOD** et **BpBOD** respectivement, dans les mêmes conditions que les biopiles enzymatiques.

Comme indiqué sur les voltampérométries cycliques de la Figure chap.III-31A, la réduction de l'oxygène par **MvBOD** est la plus favorable lorsque cette dernière est immobilisée sur une surface chargée négativement par le groupement acide 2-aminonaphtoïque. Le plateau catalytique, ainsi que la pente de la vague de réduction indiquent que l'orientation de l'enzyme est idéale, comparée à son immobilisation sur NTC. Une excellente densité de courant maximal de -5 mA.cm^{-2} à pH5 est obtenue à $0,35\text{V}$ vs SHE.

La connexion enzymatique de **BpBOD** a été réalisée sur NTCs et sur NTCs modifiés par le groupement 2-aminoéthylbenzène, chargé positivement. Contrairement à **MvBOD**, aucun plateau catalytique n'est observé et la différence principale entre les deux bioélectrodes est le courant maximal obtenu. Le meilleur TED est atteint sur l'électrode chargée positivement avec une densité de courant de $-1,6 \text{ mA.cm}^{-2}$ à pH 7,6.

MvBOD présente un moment dipolaire positif qui pointe vers le site T1, ce qui explique son orientation idéale sur une surface chargée négativement.²⁶³ **BpBOD** n'a que 26% d'homologie de séquence en acides aminés avec **MvBOD** et n'a jamais été cristallisée. La meilleure densité de courant obtenue sur l'électrode positive, indique que des acides aminés chargés négativement, sont à l'origine du greffage par interactions électrostatiques, d'une grande quantité d'enzymes. Toutefois, son orientation n'est pas optimale et de nouvelles stratégies devront être développées.

III.3 DESIGN D'UNE PILE HYBRIDE H₂/AIR [Ni(Cy,Arg)₂]/MvBOD

Nous allons intégrer le complexe de nickel [Ni(Cy,Arg)₂]⁸⁺ décrit dans le chapitre 2, à l'anode de la pile hybride. A la cathode, l'enzyme **MvBOD**, décrite ci-dessus et plus stable que **BpBOD**, sera utilisée. Les résultats sont présentés ci-dessous.

III.3.A PRESENTATION DE LA PILE

L'anode et la cathode sont composées d'électrodes de GDL fonctionnalisées avec un film de NTCs modifié chimiquement par un groupement 2-amino-naphtoïque. Les deux catalyseurs sont greffés à des concentrations respectives de 3 mg.mL^{-1} et $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ pour le complexe de nickel et l'enzyme. Cette dernière catalyse l'ORR à un pH

optimal de 5. Ainsi, nous avons adapté le montage d'une PEMFC en plaçant une chambre en téflon entre les deux plaques graphites afin de contenir l'électrolyte liquide (Figure chap.III-32).

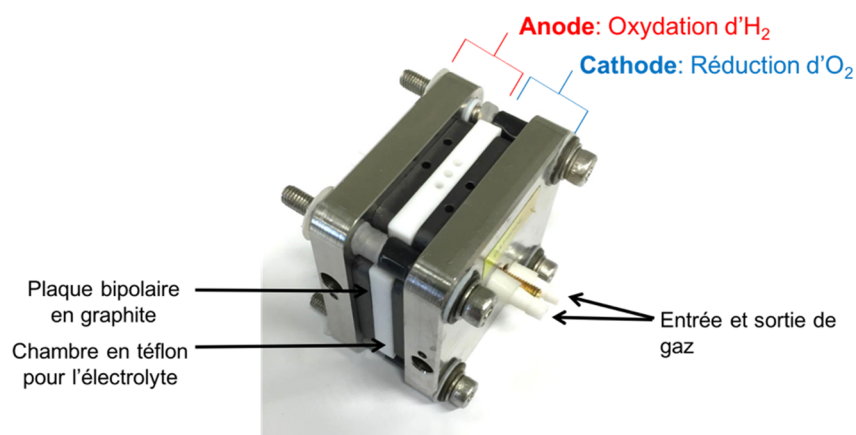


Figure chap.III-32 : Photographie d'une PEMFC adaptée pour les mesures des performances des piles H₂/air avec un électrolyte liquide.

Chaque électrode est étudiée séparément, en demi-pile, par voltampérométrie cyclique à pH5 (Figure chap.III-33). Sous H₂, [Ni(Cy,Arg)₂] atteint une excellente densité de courant d'oxydation de l'ordre de 18 mA.cm⁻² à 0,4 V vs SHE. L'enzyme quant-à-elle réduit le dioxygène en eau à un courant maximal de -5,5 mA.cm⁻² à 0,25 V vs SHE. Les performances de la pile hybride seront donc limitées par la cathode.

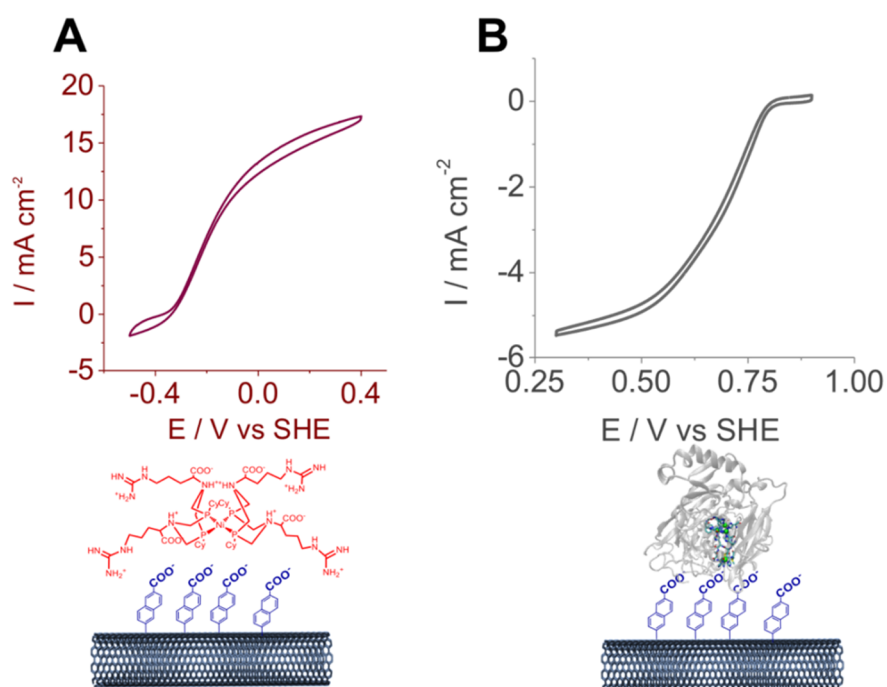


Figure chap.III-33 : (A) Voltampérométrie cyclique de l'électrode de GDL/SWnCOOH/[Ni(Cy,Arg)]₂ sous H₂. (B) Voltampérométrie cyclique de l'électrode de GDL/MWnCOOH/M_vBOD sous O₂. Conditions : 10 mV.s⁻¹ ; 0,2M tampon phosphate pH5 ; RT

III.3.B PERFORMANCES OBTENUES POUR LA PILE HYDRIDE H₂/AIR

Les courbes de polarisation et puissance, mesurées à température ambiante et pH 5, sont présentées en Figure chap.III-34B. La force électromotrice (f.e.m), ou tension à courant nul, est égale à 1 V. Cette valeur correspond à la somme des potentiels à courant nul des deux électrodes et est proche de la différence de potentielle thermodynamique attendue de 1,23V. La courbe de polarisation présente 3 zones distinctes définies :

- la zone d'activation, propre à l'activation catalytique des deux catalyseurs à faible densité de courant ;
- la région de chute ohmique, qui s'étend de 0,5 à 3,5 mA.cm⁻², démontre une certaine résistivité ;
- la zone de transfert de masse, entre 3,5 et 4 mA.cm⁻², qui correspond à un transport, d'air comprimé et d'hydrogène, limitant.

Une densité de puissance maximale de 1,8 mW.cm⁻² à 0,6 V est obtenue à une tension de 0,6 V.

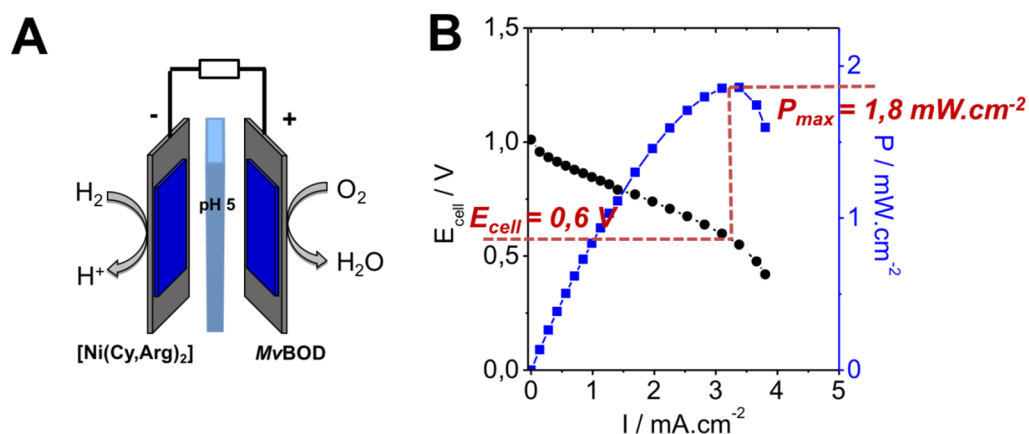


Figure chap.III-34 : (A) Schéma de la pile hybride H₂/air [Ni(Cy,Arg)₂]/MvBOD. (B) Courbes de polarisation et de puissance mesurées à pH5 et température ambiante.

III.3.C COMPARAISON A UNE PILE PT/PT A PH 5

A titre de comparaison, nous avons réalisé une pile avec deux électrodes Pt/C (1 mg.cm⁻²) à l'anode et à la cathode dans un électrolyte à pH5 (Figure chap.III- 35). La densité de puissance maximale est de 2,5 mW.cm⁻² à une tension maximale de 0,3V, deux fois plus faible que la pile hybride. La force électromotrice, égale à 0,8V, est de 200 mV inférieure. La pente importante de la courbe de polarisation dans les zones d'activation et ohmique, montre une forte résistivité. L'utilisation des catalyseurs, avec un électrolyte liquide à pH5, n'est donc pas optimale.

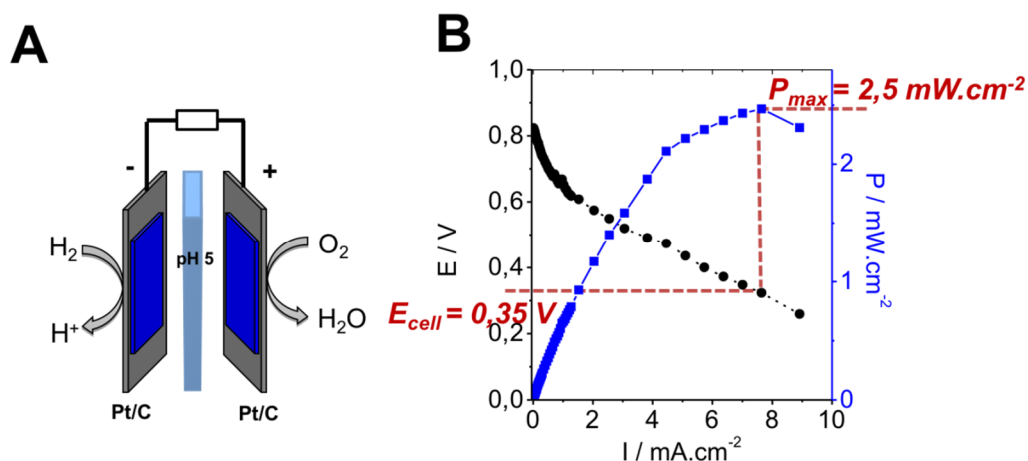


Figure chap.III- 35 : (A) Schéma de la pile Pt/C-Pt/C réalisé dans un électrolyte liquide à pH5. (B) Courbes de polarisation et de puissance mesurées à pH5 et température ambiante.

Les performances de chaque électrode sont comparées en fonction de la densité de courant et de la charge en catalyseur (Figure chap.III-36). L'oxydation de H₂ par l'électrode de Pt/C donne une densité de courant cinq fois plus importante que le catalyseur de nickel. Dans le cas de l'ORR, l'enzyme reste la plus performante avec une densité de courant globalement plus élevée entre 0,75 et 0,25V vs SHE.

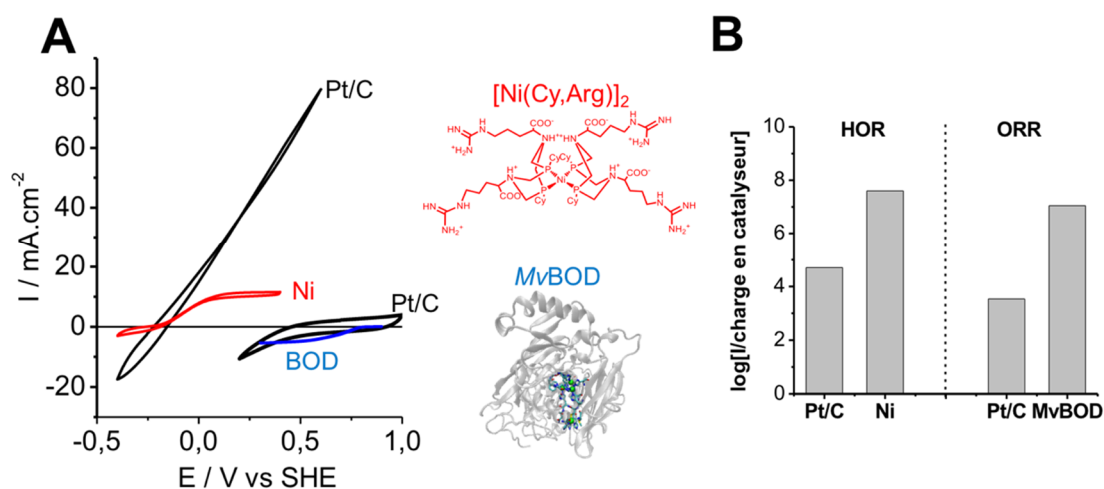


Figure chap.III-36 : (A) Voltampérométries cycliques de l'anode bio-inspirée (courbe rouge) et de la cathode enzymatique (courbe bleue), comparés à deux électrodes Pt/C (courbes noires) sous H₂ (densité de courant positive) et air comprimé (densité de courant négative). Conditions : 10 mV.s⁻¹ ; 0,2M tampon phosphate à pH5, RT. (B) Evolution du logarithme du courant sur la charge en catalyseur pour l'HOR et l'ORR.

Les quantités en Pt/C et catalyseurs bio-inspirés sont respectivement égales à 1 mg.cm⁻² et 0,3 µg.cm⁻². Les ratios de la densité de courant maximal sur la concentration massique sont reportés sur l'échelle logarithmique de la Figure chap.III-36B. Ainsi, l'enzyme et le complexe de nickel sont beaucoup plus performants que les électrodes de Pt/C par rapport à la faible charge en catalyseur requise pour atteindre de telles densités de courant.

III.4 BIOPILES ENZYMATIQUES HYDROGENASE/BOD

III.4.A PRESENTATION DE L'HYDROGENASE MEMBRANAIRE [NiFe] *AQUIFEX AEOLICUS*

Aquifex aeolicus est une bactérie thermophile cultivée à 85°C et dont le métabolisme produit l'hydrogénase [NiFe] I notée MbH1 (Figure chap.III-37). Cette enzyme membranaire appartient à la chaîne respiratoire, qui couple l'oxydation d'H₂ et la réduction d'O₂ en eau. Sa structure cristalline n'a pas encore été résolue, mais elle possède une structure commune aux hydrogénases [NiFe]. Dans le périplasma de la bactérie, la grande sous-unité contient le site actif [NiFe] et la petite sous-unité comporte trois relais d'électrons [FeS]. La partie cytochrome b1 est présente dans le cytoplasme de la bactérie : son hélice transmembranaire assure l'ancrage de l'hydrogénase.⁴⁶

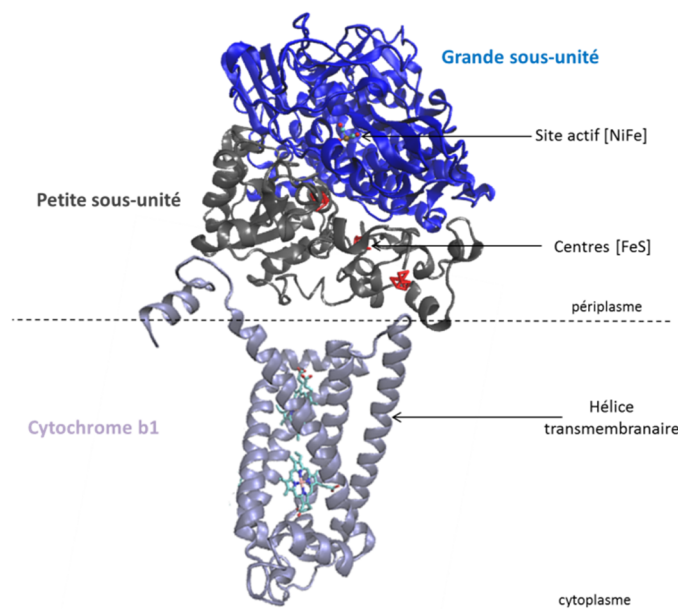


Figure chap.III-37 : Modèle de l'hydrogénase MbH1 *Aa* associé à partir de l'hydrogénase [NiFe] de *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (pdb : 1WUJ) et de la sous-unité du cytochrome b1 de *wolinellasuccinogenes* (pdb : 2BS2). Adapté de ⁴⁶

MbHI est tolérante au dioxygène, ce qui lui permet d'oxyder H₂ en présence d'O₂ ; mais également au monoxyde de carbone.³⁵⁷ Immobilisée sur une électrode de graphite pyrolytique ou sur des nanofibres de carbone, les courants d'oxydations augmentent de 25°C à 70°C.^{309,358} Cette enzyme a été produite et purifiée en collaboration avec le Dr. Elisabeth Lojou, qui travaille au BIP de Marseille.

III.4.B L'HYDROGENASE AQUIFEX AEOLICUS EN TANT QUE BIOANODE ENZYMATIQUE

L'hydrogénase **MbH1** a été utilisée en tant que bioanode enzymatique dans notre biopile H₂/air. Elle a été immobilisée sur une électrode de GDL modifiée par un film de MWCNT sur lequel repose une couche de SWnCOOH (Figure chap.III-38B). L'association de ces deux films de NTCs assure une certaine porosité à l'électrode et permet le greffage d'un maximum d'enzyme. L'électrode de NTCs est plongée, pendant trois heures à température ambiante, dans une solution d'hydrogénases à 5 μM, puis rincée avec 50 mM de solution tampon phosphate à pH 7,6.

La réponse électrocatalytique d'oxydation d'H₂ est présentée en Figure chap.III-38A. Un TED est observé avec un courant maximal d'oxydation d'H₂ égale à 4,5 mA.cm⁻² à 0,1V vs SHE à pH 7,6 et 45°C. La valeur de E_{switch}, égale à -0,1V, définit le potentiel à partir duquel l'enzyme est inactivée : le courant d'oxydation diminue jusqu'à 2 mA.cm⁻² puis augmente à nouveau vers les potentiels cathodiques. Ce phénomène est caractéristique des hydrogénases quand l'activité catalytique est limitée par la cinétique et non pas le transport de masse.

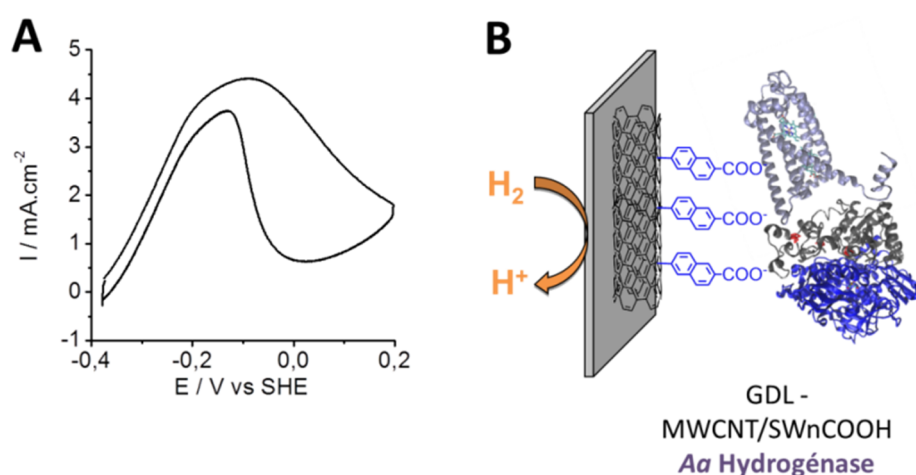


Figure chap.III-38 : (A) Voltampérométrie cyclique sous H₂ de l'Hydrogénase MbH1 Aa, immobilisée sur une électrode de GDL modifiée par une couche de MWCNT et une deuxième couche de SWnCOOH. Conditions : 10 mV.s⁻¹ ; 50 mM tampon phosphate à pH 7,6 ; [Enzyme] = 5 μM ; 45°C. (B) Schéma de la bioanode.

Malgré l'inactivation à haut potentiel, c'est la première fois qu'une telle densité de courant est observée pour **MbH1**. En effet, les meilleures connexions enzymatiques reportées en TED donnent des densités de courant de l'ordre de 2,5 mA.cm⁻².^{242,309,317} Dans ce cas, la catalyse est limitée par le transport de masse puisque l'enzyme est greffée sur une électrode de carbone vitreux modifiée par une couche de MWCNT modifiée par un groupement naphthoate (MWnCOOH).²⁴² La GDL permet ainsi de s'affranchir de la limitation par le transport de matière.

III.4.C PERFORMANCES DE LA BIPILE ENZYMATIQUE H₂/AIR

Nous avons construit une biopile enzymatique H₂/air associant l'hydrogénase **MbH1** à l'anode et **BpBOD** à la cathode. Comme présenté précédemment, cette dernière est orientée sur une électrode de GDL modifiée par un film de NTCs chargé positivement. Les courbes de puissance et polarisation sont tracées après chronopotentiométrie en appliquant diverses valeurs de courant, pendant trente secondes, aux bornes de la pile (Figure chap.III-39A). Les meilleures performances sont obtenues à 45°C dans un tampon phosphate à pH 7,6.

Ceci nous permet de tracer les courbes de polarisation et puissance pour chaque valeur de tension obtenue après 30 secondes. La force électromotrice est égale à 0,95V. Une densité de puissance maximale de 1,84 mW.cm⁻² à une tension de 0,55V a été mesurée (Figure chap.III-39B).

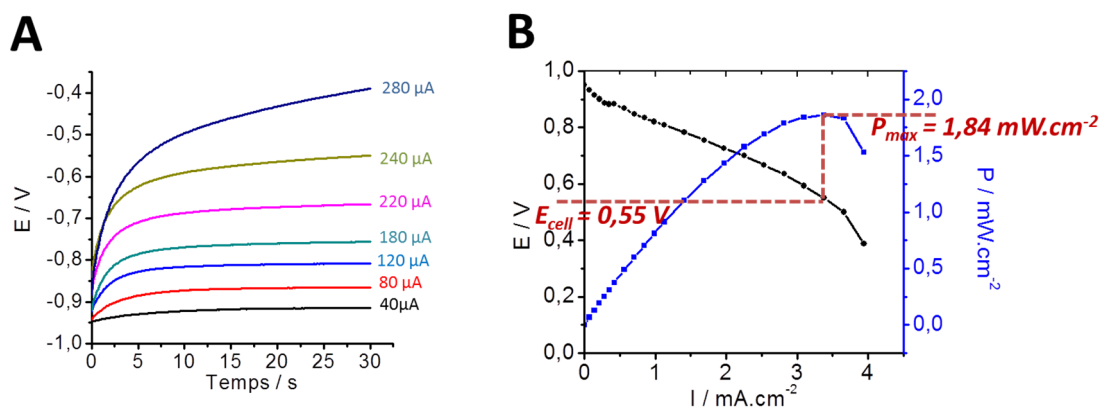


Figure chap.III-39 : (A) Chronopotentiométrie mesurée aux bornes de la pile **AaMbH1/BpBOD** en appliquant un courant de 40 à 280 µA pendant 30 secondes. (B) Courbes de puissance et polarisation obtenues après la mesure de chronopotentiométrie. Conditions : 45°C ; 50 mM tampon phosphate à pH 7,6 ; [AaMbH1] = 5 µM ; [BpBOD] = 645 µM

Ceci nous permet de tracer les courbes de polarisation et puissance pour chaque valeur de tension obtenue après 30 secondes. La force électromotrice est égale à 0,95V. Une densité de puissance maximale de 1,84 mW.cm⁻² à une tension de 0,55V a été mesurée (Figure chap.III-39B).

III.4.D COMPARAISONS DES PERFORMANCES DE CHAQUE CATALYSEUR ETUDIÉ

Nous avons étudié différents types de catalyseurs pour réaliser deux piles H₂/air. Dans les deux cas, les f.e.m.s et les densités de puissances maximales sont proches. Afin de se rendre compte des résultats obtenus avec chaque catalyseur en demi-pile en s'affranchissant du pH, chaque voltampérogramme cyclique a été tracé sur le même graphique en V vs. RHE (Figure chap.III-40).

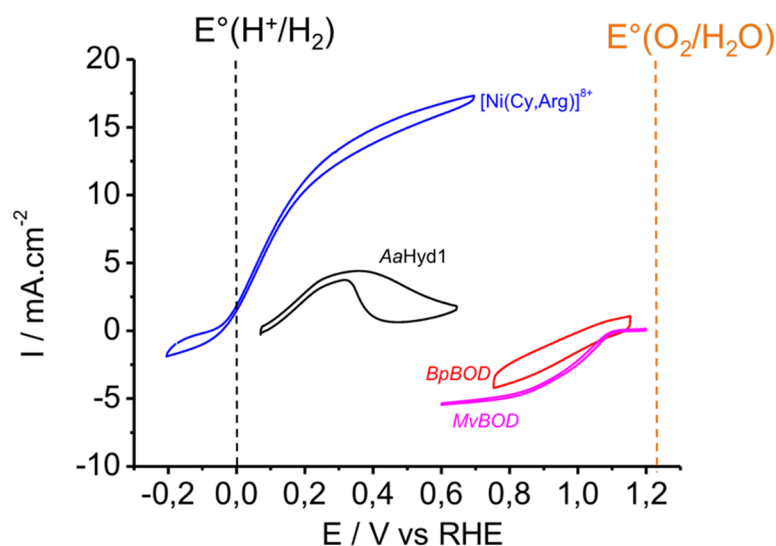


Figure chap.III-40 : Voltampérométries cycliques des différents catalyseurs utilisés dans les piles H₂/air présentées : [Ni(Cy,Arg)]⁸⁺ (courbe bleue) et AaHyd1 sous H₂ ; BpBOD (courbe rouge) et MvBOD (courbe violette) sous air comprimé. Les potentiels standards des couples (H⁺/H₂) et (O₂/H₂O) sont indiqués sur le graphique.

Le complexe de nickel [Ni(Cy,Arg)₂] a une surtension de l'ordre de 15 mV et est capable d'oxyder H₂ sur une large gamme de potentiel pour atteindre une densité de courant maximal de 15 mA.cm⁻². A contrario, l'hydrogénase MbH1, avec une surtension minimale supérieure, égale à 100 mV, est inactivée réversiblement à 0,3V vs RHE et atteint une densité de courant maximale 3 fois inférieure. Ces résultats nous montrent clairement que le complexe bio-inspiré est largement plus performant que l'enzyme pour l'oxydation d'H₂.

Du côté de l'ORR, les deux enzymes ont des surtensions minimales assez proches de l'ordre de 120 et 220 mV pour MvBOD et BpBOD respectivement. Les MCOs sont capables de réduire l'oxygène en eau à haut potentiel. La difficulté majeure est de les connecter en TED sur électrodes afin d'obtenir les meilleures performances possibles. Ainsi, un plateau catalytique intervient pour MvBOD avec une densité de courant de réduction maximale de -5,5 mA.cm⁻². La connexion enzymatique est donc optimale et la limite de diffusion est propre au support d'électrode. Dans le cas de BpBOD, aucun plateau catalytique n'est observé, ce qui traduit une orientation non optimale. Par ailleurs, pour obtenir une densité de courant de -5 mA.cm⁻², une concentration en enzyme élevée de 650 μM a été utilisée, contre seulement 42 μM pour MvBOD. Cette forte différence montre que l'activité enzymatique des deux enzymes n'est pas la même.

L'association du complexe de nickel et de l'enzyme **MvBOD** a permis d'imaginer un nouveau concept de pile hybride H₂/air enzymatique/bio-inspirée sans métaux nobles. Cette dernière atteint une densité de puissance maximale de l'ordre de 1,8 mW.cm⁻² à pH5 et une f.e.m importante de 1V. Dans les mêmes conditions, la pile à base de Pt s'est révélée plus instable : la pente de la courbe de polarisation est importante aux faibles valeurs de densité de courant, zone dans laquelle la pile délivre de l'énergie. Les performances de la pile hybride et de la biopile enzymatique sont très proches, du fait de la limitation de ces deux piles par la biocathode. Cependant, l'utilisation de l'hydrogénase nécessite un chauffage continu de la pile et des barboteurs d'entrée d'H₂ et d'air comprimé, à 45°C. Ceci est donc une perte énergétique importante.

Le Tableau chap.III-8 met en avant les résultats des piles présentées dans ce chapitre, ainsi que les performances des dernières biopiles enzymatiques de la littérature. Notre biopile enzymatique est la première dans laquelle les deux catalyseurs biologiques sont immobilisés sur GDL et insérés dans une pile à combustible, sans membrane empêchant la contamination de l'anode par l'oxygène. En 2015, Lalaoui *et. al*²⁴² a réalisé une biopile sans membrane mais les performances de l'anode étaient limitées par la diffusion d'H₂, l'hydrogénase étant immobilisée sur une électrode de carbone vitreux, modifiée par un film de NTC et plongeant dans un électrolyte uniquement saturée en H₂. En 2014, une densité de puissance de 1,5 mW.cm⁻² est obtenue avec **MvBOD** et **MbH1** à une température de 60°C et en présence d'un atmosphère saturé à 100% en H₂ et 60% en O₂, ces deux environnements étant séparés par une membrane de nafion.³⁰⁹ Ce sont les conditions optimales dans lesquelles l'anode fonctionne, ce qui nous laisse de belles perspectives pour améliorer la densité de puissance de notre biopile enzymatique.

La pile hybride est donc une approche compétitive vis-à-vis des biopiles enzymatiques. Elle démontre des performances remarquables à température ambiante. Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, la recherche d'un catalyseur bio-inspiré compétitif à la cathode nous permettrait d'envisager des piles sans métaux nobles à base de complexes bio-inspirés.

Types de pile	Conditions	f.e.m / V	P _{max} / mW.cm ⁻²	E _{max} /V	Ref.
Pt/C : Pt/C	pH5 ; 25°C, H ₂ , air comprimé	0,8	2,5	0,35	thèse
[Ni(Cy,Arg) ₂] : MvBOD	pH5 ; 25°C, H ₂ , air comprimé	1	1,8	0,60	thèse
AaMbH1 : BpBOD	pH 7,6 ; 45°C, H ₂ , air comprimé	0,95	1,8	0,55	thèse
AaMbH1 : BpBOD	pH 7,2 ; 45 °C, H ₂ , barbotage O ₂	0,95	0,72	0,55	2015, ²⁴²
AaMbH1 : MvBOD	pH7 ; 60°C ; 100% H ₂ + 60% O ₂ avec barbotage continu	1	1,5	0,6	2014, ³⁰⁹

Tableau chap.III-8 : Performances des piles H₂/air mises en œuvre et comparaison à la littérature

IV. CONCLUSION GENERALE

Dans ce chapitre III, nous nous sommes intéressés à la connexion enzymatique de MCOs, enzymes catalysant l'ORR à des potentiels très élevés. Dans le but d'orienter au mieux la laccase de *Trametes* sp C30 afin de réaliser la connexion du site T1, responsable du transfert d'électron au site trinuécléaire T2/T3, l'équipe de Thierry Tron a mis au point Lac3 et un mutant UniK161 modifiés par des groupements alcyne. **Lac3-alcyne** et **UniK161-alcyne**, qui comportent respectivement deux et une seule fonction d'accroche alcyne, ont été immobilisées de façon covalente sur électrodes de NTCs. Après fonctionnalisation des NTCs par réduction spontanée de TABD, les enzymes ont été greffées à la surface des électrodes par cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen. En présence d'O₂, un excellent TED a été observé avec une densité de courant maximal de l'ordre de -2,2 mA.cm⁻² pour l'enzyme **Lac3-alcyne**. La présence de deux fonctions d'accroche à la surface de sa coque protéique rend sa concentration surfacique ainsi que ses performances, deux fois plus importantes qu'UniK161. Par ailleurs, la modélisation de la réponse électrocatalytique a permis de montrer que le greffage covalent diminue les orientations possibles par rapport à une immobilisation non-covalente. Cependant, dans les deux cas, la nature de l'orientation enzymatique reste à élucider afin de confirmer le TED au niveau du site T2/T3 dans le cas de l'enzyme native. Des techniques plus poussées telles que la spectroélectrochimie pourraient nous permettre de confirmer l'orientation des enzymes à la surface de l'électrode.

Dans un second temps, un nouveau type de pile hybride H₂/air enzymatique/bio-inspirée a été proposé. Le complexe de nickel **[Ni(Cy,Arg)₂]**, étudié en détail dans le chapitre II, a été associé avec l'enzyme **MvBOD** à la cathode. Pour cela, la PEMFC a été adaptée avec une chambre en téflon, entre les deux plaques graphites, qui permet d'ajouter un électrolyte liquide entre les deux électrodes. La pile hybride, dont les performances sont limitées par la cathode enzymatique, a démontré une densité de puissance maximale de 1,8 mW.cm⁻² à pH5 et une f.e.m élevée de 1V, à pH5 et température ambiante. De faibles quantités en catalyseurs égales à 0,3 µg.cm⁻² ont été requises pour obtenir de telles performances. Ces dernières ont été comparées à une pile à base d'électrodes de Pt/C à l'anode et à la cathode, qui s'est révélée moins stable. Finalement, une biopile enzymatique H₂/air, composée de l'hydrogénase **MbH1** et de la **BpBOD** a été réalisée. Des valeurs de puissances et de f.e.m similaires à la pile hybride ont été mesurées à pH 7,6 et 45°C. Cette température est requise pour obtenir de telles performances, celles-ci étant divisées par 2 à température ambiante.

Un tel concept de pile hybride est innovant et requiert des catalyseurs en quantité très faible. Cependant, elle ne fonctionne pas si une membrane de nafion est placée entre l'anode et la cathode. Dans ces conditions, aucune f.e.m n'a été mesurée, ce qui signifie que le contact électrique entre les deux électrodes est inexistant. L'enzyme nécessite un environnement aqueux pour fonctionner. Dans le dernier chapitre, nous nous intéresserons aux complexes bio-inspirés des enzymes à cuivre afin de remplacer l'enzyme à la

Chapitre IV
COMPLEXES DE CUIVRE
BIO-INSPIRES POUR LA
REACTION DE
REDUCTION DE
L'OXYGENE

I. Introduction Générale	182
I.1 Contexte	182
I.1.A Vers la synthèse de complexes biomimétiques des enzymes a cuivres	182
I.1.B La Galactose oxydase	182
I.1.B (i) Connexion directe de la galactose oxydase sur électrode d'or	182
I.1.B (ii) Complexes bio-inspirés de la galactose oxydase	183
I.1.C La polyphenol oxydase	183
I.1.C (i) Connexion directe de la polyphénol oxydase dans une matrice de NTCs	183
I.1.C (ii) Complexes bio-inspirés de la PPO	184
I.1.D Greffage de complexes de cuivre bio-inspirés sur électrodes pour l'ORR	184
I.2 Objectifs	185
I.2.A Cadre du projet de recherche	185
I.2.B Les différents ligands synthétisés	185
I.2.C Objectifs	186
II. Immobilisation de complexes de cuivre mononucléaire pour l'ORR	187
II.1 Introduction	187
II.2 Caractérisation de surface	188
II.2.A Microscopie électronique a balayage et edx	188
II.2.B Spectrométrie photoélectronique X	189
II.2.C Spectrométrie par résonance paramagnétique électronique (RPE).....	190
II.2.C (i) Principe.....	190
II.2.C (ii) Résultats obtenus	191
II.3 Caractérisations électrochimiques en absence d'oxygène	192
II.3.A Influence du pH.....	192
II.3.A (i) Complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{Me})]^{2+}$	192
II.3.A (ii) Complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{CF}_3)]^{2+}$	193
II.3.B Influence de la vitesse de balayage.....	194
II.3.B (i) Complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{Me})]^{2+}$	194
II.3.B (ii) Complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{CF}_3)]^{2+}$	196
+	196
II.4 Caractérisations électrochimiques en présence d'oxygène	197
II.4.A Electrocatalyse de réduction de l'oxygène.....	197
II.4.B Calcul du nombre d'électrons par expérience d'électrode a disque tournant.....	198
II.4.B (i) Principe.....	198
II.4.B (ii) Résultats obtenus	198
II.4.C Détection de la quantité d'intermédiaire réactionnel formée	199
II.4.C (i) Principe.....	199
II.4.C (ii) Résultats obtenus	200
II.5 Comparaison des deux complexes et discussion	201
III. Immobilisation de complexes de cuivre dinucléaires sur NTCs pour l'ORR	203
III.1 Introduction	203
III.2 Caractérisation de surface	204
III.3 Caractérisations électrochimiques en absence d'oxygène	205
III.3.A Influence du pH.....	205
III.3.A (i) Complexe $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$	205

III.3.A (ii) Complexe [Cu(H,Me)] ²⁺	206
III.3.B Influence de la vitesse de balayage.....	207
III.4 Caractérisations électrochimiques en présence d'oxygène	208
III.4.A Electrocatalyse de réduction d'O ₂	208
III.4.B Calcul du nombre d'électrons par expérience d'électrode a disque tournant.....	209
III.4.C Détection de la quantité d'intermédiaires réactionnels formées	210
III.5 Comparaison des catalyseurs bio-inspirés et discussion.....	211
IV. Elaboration d'une pile biomimétique	213
IV.1 Introduction.....	213
IV.2 Cathode bio-inspirée à base de complexes de cuivre dinucléaires.....	213
IV.3 Résultats obtenus	214
V. Conclusions et perspectives	216

I. INTRODUCTION GENERALE

I.1 CONTEXTE

I.1.A VERS LA SYNTHÈSE DE COMPLEXES BIOMIMÉTIQUES DES ENZYMES À CUIVRES

Dans le chapitre 3, nous avons travaillé sur la connexion enzymatique directe par liens covalents d'enzymes Lac3 sp.30 sur électrode de nanotubes de carbone, afin de réaliser la réduction de l'oxygène en eau. Même si leur activité catalytique est excellente, ces enzymes sont produites dans un champignon, puis purifiées : la concentration finale obtenue est souvent inférieure au millimolaire et la stabilité de la solution enzymatique est de l'ordre d'un ou deux mois. De ce fait, la synthèse de complexes biomimétiques des MCOs, présentant une activité comparable, mais pouvant être produit rapidement en plus grande quantité, est un enjeu majeur.

Dans le but de concevoir de nouvelles cathodes sans platine, actives vis-à-vis de l'ORR, nous avons cherché à développer de nouveaux catalyseurs à base d'un ou de deux centres cuivre, bio-inspirés des enzymes galactose oxydase (GaOx) et polyphénol oxydase (PPO). Bien que les MCOs aient des performances catalytiques supérieures, la complexité de leur site actif reste encore un frein à la synthèse de mimes fonctionnels. Immobilisées sur électrodes, la GaOx et la PPO ont démontré une activité vis-à-vis de l'ORR.^{245,248} Nous avons donc cherché à développer des catalyseurs mono- et bimétalliques bio-inspirés de ces enzymes et possédant un ligand phénoxo.

I.1.B LA GALACTOSE OXYDASE

I.1.B (i) *Connexion directe de la galactose oxydase sur électrode d'or*

Le site actif de la GaOx est composé d'un centre cuivre (II) mononucléaire coordonné par deux histidines et deux tyrosines (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**A). Son potentiel est de l'ordre de +0,45 V vs SHE.¹¹³ Cette enzyme catalyse l'oxydation stéréospécifique des alcools primaires en aldéhydes couplée à la réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène.

La seule évidence de TED a été publiée en 2009 par Schiffrin.²⁴⁵ L'enzyme a été immobilisée sur une SAM, comportant des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des groupements carboxylates, directement coordonnés au cuivre II mononucléaire. Le potentiel électrochimique du couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ a été mesuré par voltampérométrie cyclique à -0,1V vs SCE. La réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène est

observée à un potentiel de 0,2V vs SCE. Toutefois, l'enzyme immobilisée n'oxyde pas les alcools primaires en aldéhyde.

I.1.B (ii) Complexes bio-inspirés de la galactose oxydase

De par la simplicité du site actif de la galactose oxydase, de nombreux complexes bio-inspirés ont été étudiés, afin de proposer un mécanisme catalytique (voir Chapitre I/III.2.B.). Le premier a été synthétisé par de Whittaker en 1993.^{114,156}

En 2002, notre collaborateur sur ce projet de recherche, le Pr. Fabrice Thomas, synthétise l'un des premiers modèle structural et fonctionnel (Figure chap.IV-1B) capable d'oxyder l'alcool benzylique en présence d'O₂ et d'une quantité catalytique de KOH.¹⁵⁷ Des analogues structuraux de ce complexe de cuivre (II) mononucléaire ont été synthétisés au cours de ce projet de recherche, afin d'être greffés sur électrodes de NTCs.

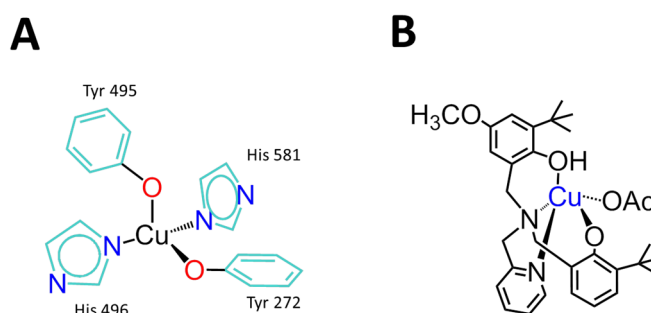


Figure chap.IV-1 : (A) Site actif de la Galactose Oxydase (GaOx). (B) Exemple de complexe de cuivre (II) mononucléaire, [Cu^{II}(LH)(OAc)], mimant le site actif de la GaOx.¹⁵⁷

I.1.C LA POLYPHENOL OXYDASE

I.1.C (i) Connexion directe de la polyphénol oxydase dans une matrice de NTCs

La polyphénol oxydase (PPO) ou tyrosinase comporte un site actif, dont la structure est proche du site T3 des MCOs. Il s'agit d'un complexe dinucléaire, comportant deux cuivres (II), Cu_A et Cu_B, chacun coordonné à trois histidines, selon la nature de l'enzyme (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**A). Le potentiel redox du centre métallique est de +0,36V vs NHE.¹⁰⁶ La PPO oxyde les substrats phénols en quinone en présence d'oxygène, qui est alors réduit en eau. Le mécanisme catalytique est complexe et est présenté dans le chapitre I (voir section III.2.A)

L'utilisation de la PPO en tant que biocathode enzymatique est peu étudiée. En effet, le potentiel redox est d'environ 400 mV plus faible que pour les MCOs et

l'observation d'un TED reste difficile à cause de l'enfouissement de son site actif. Récemment, la connexion directe de cette enzyme au sein d'une pastille de NTCs a été mise en évidence. La biocathode réduit le dioxygène en eau à un potentiel de 0,3 V vs SCE et conserve 50 % de son efficacité catalytique après 8 jours.²⁴⁸

I.1.C (ii) Complexes bio-inspirés de la PPO

Des modèles structuraux de divers états d'oxydations du site actif ont été proposés depuis plus d'une trentaine d'années.^{160–162}

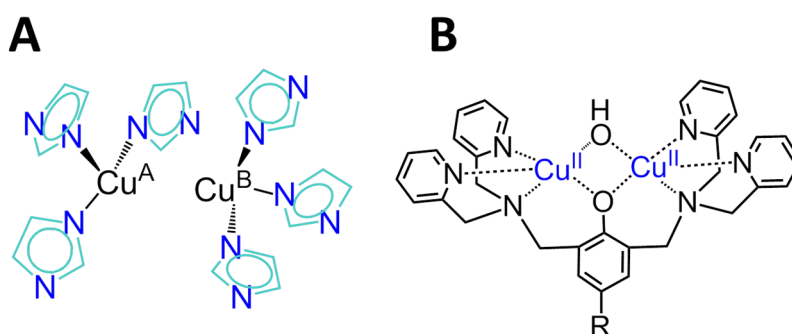


Figure chap.IV-2 : (A) Site actif de la PPO. (B) Exemple de complexe de cuivre (II) dinucléaire, mimant le site actif de la PPO.³⁵⁹

En 2002, notre collaboratrice le Dr. Catherine Belle synthétise plusieurs complexes dinucléaires Cu(II) : le dérivé μ -OH, présenté en Figure chap.IV-2B, est le seul à oxyder les catéchols en présence d' O_2 . De la même manière que pour le complexe mononucléaire, un analogue de ce dernier a été synthétisé afin d'être immobilisé sur électrode de NTCs et étudié en présence d' O_2 .

I.1.D GREFFAGE DE COMPLEXES DE CUIVRE BIO-INSPIRES SUR ELECTRODES POUR L'ORR

L'utilisation de complexes de cuivre mono- et dinucléaires en catalyse supportée a été étudiée à partir de la fin des années 2000.²⁸⁸ Les supports d'électrodes sont variés, allant de la simple adsorption sur électrode de graphite pyrolytique à l'immobilisation covalente sur graphène oxydé. Ces catalyseurs réduisent l'oxygène en eau dans des conditions neutres et basiques (pH5 à 14) à des surtensions comprises entre 300 et 800 mV.^{289–291,293,295,296} A l'heure actuelle et malgré un pH de catalyse élevé (pH = 14), le complexe dinucléaire $[Cu_2(TADPy)_4]^{4+}$, synthétisé par Liu en 2015 et immobilisé sur électrode de graphène oxydé, présente la surtension minimale la plus faible, de l'ordre de 300 mV ($E_{onset} = 0,94$ V vs RHE).²⁹³ Par ailleurs, en 2011, le complexe dinucléaire $[Cu_2(bistripic)(NCMe)_2](PF_6)$ immobilisé dans une encre de carbone vulcan et de nafion, est l'un des premiers complexes bio-inspiré à réduire l'oxygène en eau à pH1, mais à une surtension minimale élevée de 900 mV ($E_{onset} = 0,4$ V vs RHE).²⁹¹ Pour de

plus amples informations, la section IV.5.B du chapitre I est consacrée à ces catalyseurs.

Afin d'essayer d'améliorer les performances catalytiques en diminuant le pH optimum et la surtension, nous avons étudié pour la première fois l'immobilisation, par une méthode de synthèse « bottom-up » sur NTCs, de nouveaux complexes de cuivre mono- et dinucléaires, bio-inspirés respectivement du site actif de la GaOx et de la PPO.

I.2 OBJECTIFS

I.2.A CADRE DU PROJET DE RECHERCHE

Le projet de recherche décrit dans ce chapitre a été réalisé en collaboration avec l'équipe CIRE de notre institut (DCM) grâce au travail de Doti Serre, du Dr. Jennifer Molloy, du Dr. Catherine Belle et enfin du Pr. Fabrice Thomas. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur leurs précédents travaux.^{157,158,359} Ces derniers ont été impliqués dans la synthèse et la caractérisation spectroscopique des différents ligands, qui ne seront pas détaillés ici (pour de plus amples informations, se reporter à la partie expérimentale de ce manuscrit).

I.2.B LES DIFFERENTS LIGANDS SYNTHETISES

Les différents ligands étudiés dans ce manuscrit sont présentés en Figure chap.IV-4. Dans chaque cas, le groupement N¹-(pyrène-1-ylméthyl)butane-1,4-diamine a été additionné par amination réductrice au précurseur tripode aldéhyde ^{CHO}LH (Figure chap.IV-3). Différents dérivés ^{CHO}LH ont ensuite été synthétisés pour conduire aux ligands (t-Bu,Me), (t-Bu,CF₃) et (H,Me).

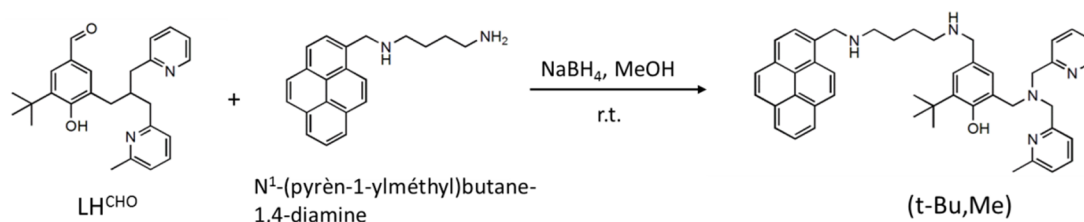


Figure chap.IV-3 : Amination réductrice entre le groupement aldéhyde de LH^{CHO} et amine du pyrène pour former le ligand (t-Bu,Me).³⁶⁰

La variation de ces différents groupements chimiques a pour objectif de modifier : (1) la contribution électronique au niveau de la sphère de coordination du

cuivre (II) ; (2) l'encombrement stérique des ligands afin de générer des espèces dinucléaires. En effet, la gêne stérique au niveau du ligand phénol a une influence sur la dimérisation de ce type de complexes.^{157,158} Ceci peut engendrer des comportements électrochimiques différents et sera étudié en détail dans ce manuscrit. Les ligands A, B et C conduisent à des complexes analogues à la molécule $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{LH})(\text{OAc})]^{157}$, bio-inspirés du site actif de la galactose oxydase. Le ligand D comporte deux entités tripodes en ortho du phénol, ce qui promeut la formation d'un complexe de cuivre dinucléaire, bio-inspiré du site actif de la PPO.

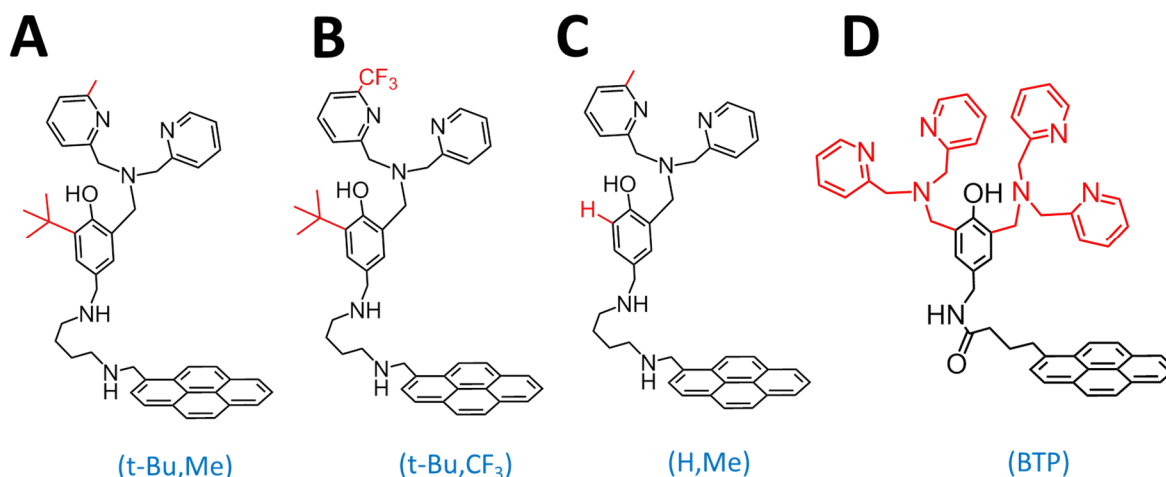


Figure chap.IV-4 : Différents ligands synthétisés. (A) à (C) les structures chimiques varient en ortho du phénol et de l'une des pyridines du ligand tripode. (D) Deux entités tripodes sont présentes en ortho du phénol, d'où la nomenclature bis-tripode (BTP), utilisée. Les atomes correspondants sont en rouges et définissent la nomenclature utilisée dans le manuscrit pour chaque dérivé.

La complexation de ces différents ligands avec un sel de cuivre de type $[\text{CuCl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou $[\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ permet l'obtention de complexes de cuivre immobilisés sur NTCs, que ce soit par synthèse bottom-up, après greffage du ligand pyrène sur électrode de NTCs ou par greffage du complexe préalablement formé en solution

I.2.C OBJECTIFS

Dans un premier temps, l'immobilisation des complexes de cuivre mononucléaires $[\text{Cu}(\text{t-Bu,Me})]^{2+}$ et $[\text{Cu}(\text{t-Bu,CF}_3)]^{2+}$ sur électrodes de NTCs sera réalisée par synthèse « bottom up ». Ces derniers seront caractérisés par une étude électrochimique approfondie sous argon et O_2 . Dans un second temps, le complexe dinucléaire $[\text{Cu}_2(\text{BPT})]^{4+}$ sera construit de la même manière, puis les résultats électrochimiques obtenus seront comparés au complexe $[\text{Cu}(\text{H,Me})]^{2+}$. Enfin la première pile bio-inspirée H_2/air à base de catalyseurs moléculaires sera présentée.

II. IMMOBILISATION DE COMPLEXES DE CUIVRE MONONUCLEAIRE POUR L'ORR

II.1 INTRODUCTION

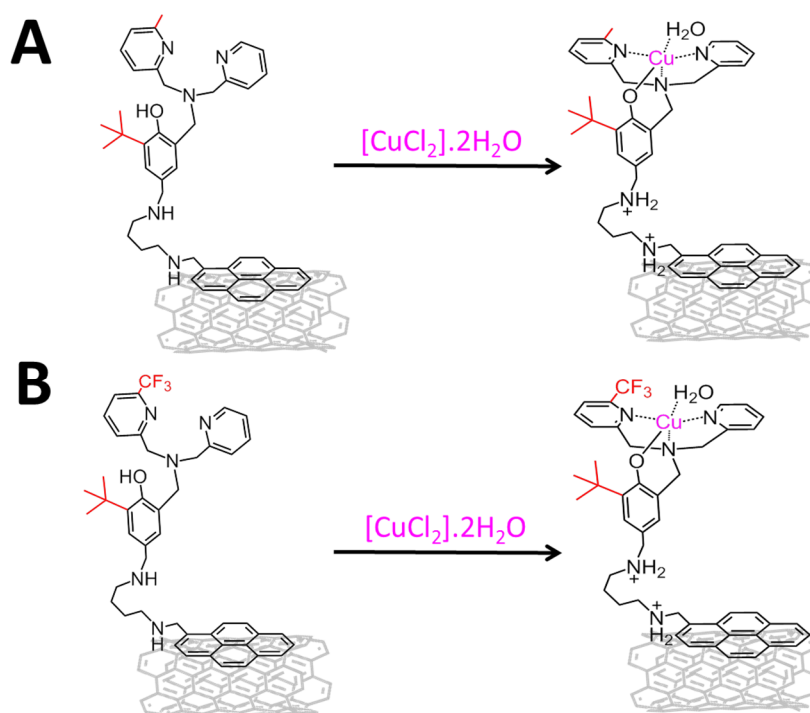


Figure chap.IV-5 : Synthèse bottom-up des complexes mononucléaires (A) $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{Me})]^{2+}$ et (B) $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{CF}_3)]^{2+}$ après modification des électrodes NTC/(t-Bu,Me) et NTC/(t-Bu,CF₃) par le sel de cuivre $[\text{CuCl}_2].2\text{H}_2\text{O}$.

Les électrodes de carbone vitreux sont modifiées par un film de NTC multifeuillet selon la procédure décrite dans les précédents chapitres. Les ligands (t-Bu,Me) et (t-Bu,CF₃) (3 mM dans MeCN) ont été immobilisés grâce à l'interaction π - π entre les systèmes π -conjugués du pyrène et des NTCs. Après rinçage, l'électrode est plongée dans une solution aqueuse de sel de cuivre $[\text{CuCl}_2].2\text{H}_2\text{O}$ (0,3 mM) pendant 45 minutes, puis rincée à l'eau ultra-pure. Les deux complexes mononucléaires, $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{Me})]^{2+}$ et $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{CF}_3)]^{2+}$ sont ainsi obtenus (Figure chap.IV-5). D'après les précédents travaux sur ce type de complexes,^{157,158} le cuivre forme un complexe pyramide à base carrée entre les 3 atomes d'azotes du ligand tripode, le radical phénoxy et une molécule de solvant.

Dans un premier temps, les électrodes de NTCs seront caractérisées par diverses techniques microscopiques et spectroscopiques. Dans un second temps, une étude électrochimique approfondie en absence et en présence d'oxygène sera menée. Enfin, les résultats obtenus pour les deux catalyseurs seront discutés.

II.2 CARACTERISATION DE SURFACE

Les électrodes de NTCs fonctionnalisées par le complexe de cuivre mononucléaire sont analysées par diverses techniques de caractérisation de surface : MEB, RPE et XPS. Etant donné que la seule différence entre les deux catalyseurs est la substitution du groupement $-Me$ et par le $-CF_3$ en ortho de la pyridine, les résultats seront présentés pour un seul des deux catalyseurs.

II.2.A MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE ET EDX

La microscopie électronique à balayage du film de NTC multifeuillet (Figure chap.IV-6A) démontre un réseau nanométrique dense, homogène et poreux. Afin de déterminer la présence du complexe $[Cu(t-Bu,Me)]^{2+}$ à la surface, la spectrométrie à dispersion d'énergie X a été utilisée. Cette technique consiste à analyser qualitativement la composition chimique de la surface en détectant les rayons X émis par l'échantillon, soumis au faisceau d'électrons du microscope électronique. Ce phénomène est traduit sous forme de spectre dans lequel chaque variation d'énergie est attribuée à un élément chimique (Figure chap.IV-6B).

Sur le spectre du film de NTC, les pics des éléments oxygène et carbone sont détectés respectivement autour de 0,5 et 0,25 keV. Lorsque le complexe $[Cu(t-Bu,Me)]^{2+}$ est présent à la surface, les pics caractéristiques du cuivre et de l'azote apparaissent à 1 et 0,75 keV. Cette méthode est une manière simple de détecter des éléments atomiques, mais ne renseigne pas sur l'environnement chimique autour du cuivre, pouvant être libre ou coordonné.

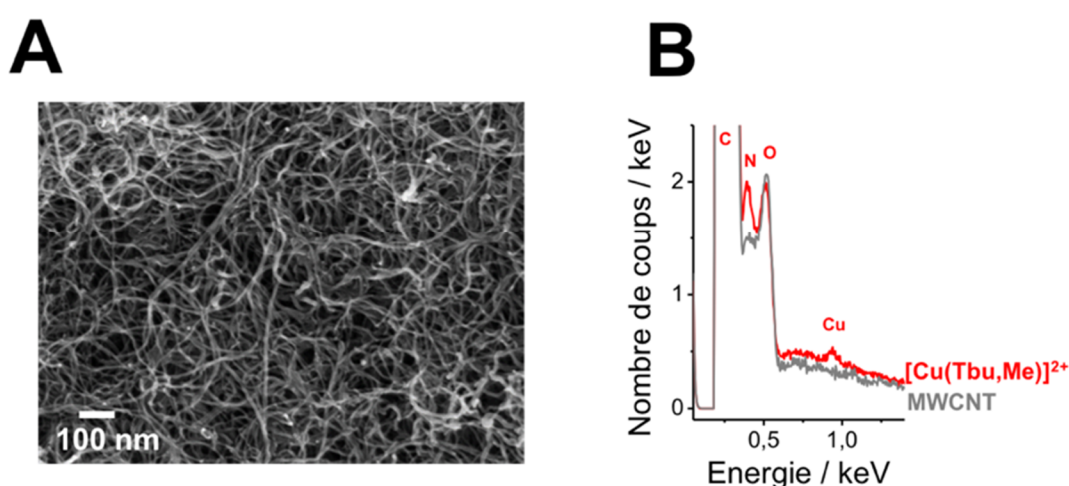


Figure chap.IV-6 : (A) Microscopie électronique à balayage de l'électrode NTC/ $[Cu(t-Bu,Me)]^{2+}$, (B) couplée à la spectrométrie à dispersion d'énergie X (EDX) du film de NTC fonctionnalisé (courbe rouge) ou non (courbe grise).

II.2.B SPECTROMETRIE PHOTOELECTRONIQUE X

Les échantillons ont été obtenus par filtration d'une suspension de MWCNT dans l'EtOH absolue sur une électrode de GDL. De fines bandelettes de 1*2cm sont ensuite découpées afin que le ligand, puis le sel de cuivre soient immobilisés par synthèse bottom-up. Les résultats de spectrométrie photoélectronique X ont été obtenus et traités au sein de l'ICMG de l'Université de Montpellier 2 par Valérie Flaud.

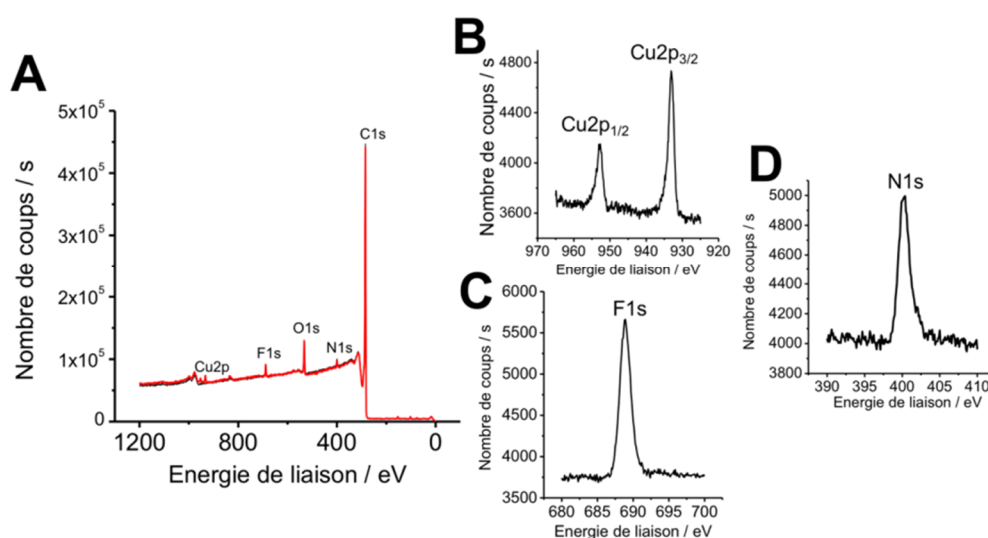


Figure chap.IV-7 : (A) Spectre de spectrométrie photoélectronique X complet de l'électrode NTC/[Cu(t-Bu,CF₃)]²⁺. Zoom sur les spectres des orbitales (B) Cu2p, (C) F1s, (D) N1s

Le spectre complet de l'électrode NTC/[Cu(t-Bu,CF₃)]²⁺ est présenté en Figure chap.IV-7A. Ce dernier révèle qu'aucune impureté métallique n'est présente dans le film de NTC. Ainsi, les éléments chimiques les plus abondants sont le carbone et l'oxygène : la paroi des nanotubes de carbone est en effet souvent oxydée, ce qui entraîne la formation de résidus de type quinone, phénol, cétone ou acide carboxylique.³⁶¹

Une signature est obtenue pour les orbitales 2p du cuivre. Ainsi, les orbitales Cu2p_{1/2} et Cu2p_{3/2} observées respectivement à 965 et 935 eV correspondent à un degré d'oxydation (I). Il est courant qu'en cas de faible abondance de l'élément chimique à la surface, le cuivre II soit réduit en cuivre I ou cuivre (0) par le faisceau d'électrons X. Par ailleurs, les pics obtenus respectivement à 690 et 400 eV correspondent aux orbitales F1s et N1s. La très faible quantité de cuivre à la surface du film de NTC, ainsi que la réduction du Cu(II) en Cu(I) par le faisceau d'électrons, empêchent de calculer un ratio Cu/N favorable. Au même titre que la spectrométrie à dispersion d'énergie X, les résultats XPS obtenus ne nous permettent pas de conclure quant à la nature de l'état de coordination du centre métallique.

II.2.C SPECTROMETRIE PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE)

II.2.C (i) Principe

La spectrométrie par résonance paramagnétique électronique s'applique aux électrons non appariés (= électrons célibataires) présents dans une molécule, telles que les espèces radicalaires ou les métaux de transition. Un électron célibataire possède un spin électronique, qui placé dans un champ magnétique B subit une interaction suivant l'effet Zeeman, conduisant à deux niveaux énergétiques avec un nombre quantique de spin m_s égale à $+1/2$ ou $-1/2$ (Figure chap.IV-8).

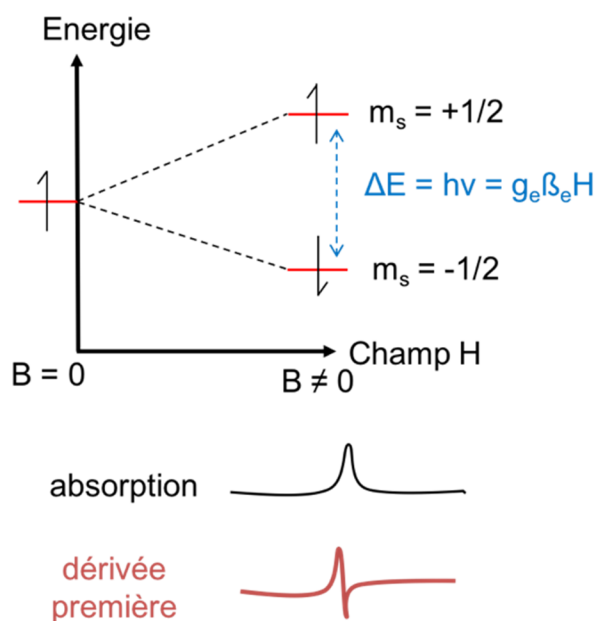


Figure chap.IV-8 : Transition entre deux niveaux Zeeman.

La RPE induit une transition entre ces deux niveaux lorsque le photon est absorbé à une énergie $h\nu$, égale à la différence d'énergie ΔE entre les deux niveaux quantiques $m_s = +1/2$ et $m_s = -1/2$. Le signal RPE enregistré n'est pas le signal d'adsorption comme en UV ou RMN, mais sa dérivée première. La mesure d'un spectre se fait par variation de la valeur du champ magnétique B (en gauss ou tesla), représenté en abscisse sur le spectre. De plus, la fréquence de résonance du spectromètre reste stable, on parle de bande X à 9,4 GHz et Q à 35 GHz. Le facteur de Landé, g , est caractéristique de l'élément magnétique, donc d'un atome donné.

Si l'électron célibataire est au voisinage d'un ou plusieurs noyaux dont le spin nucléaire $I \neq 0$, un champ magnétique local est émis entre le moment magnétique électronique et le moment magnétique nucléaire. Cela se traduit par un couplage hyperfin, modifiant l'allure du spectre RPE. Ainsi, plusieurs raies apparaissent et sont quantifiées selon l'équation suivante : $2nI + 1$ avec n le nombre de noyaux de spin nucléaire I avec le(s)quel(s) l'électron interagit.

II.2.C (ii) *Résultats obtenus*

Le complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu,Me})]^{2+}$ a été caractérisé par RPE en solution et immobilisé sur les NTCs (Figure chap.IV-9). Le cuivre (II) ayant une structure électronique $[\text{Ar}] 4s^0 d^9$, il possède un électron non apparié $S = 1/2$, cette espèce paramagnétique a donc un signal RPE qui lui est propre.

Le spectre d'une solution à 0,5 mM de complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu,Me})]^{2+}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ 90 :10, pH5) a été enregistré en bande X (courbe (a) noire). Les valeurs de g calculées ($g_{\perp} = 2,051$ et $g_{\parallel} = 2,248$) indiquent que le cuivre est dans une géométrie pyramide à base carrée tordue. Le couplage hyperfin obtenu est également typique d'une espèce cuivre (II) mononucléaire (avec $n = 1$ pour les isotopes ^{63}Cu et ^{65}Cu et $I = 3/2$ pour le cuivre avec : $2 \times 1 \times 3/2 + 1 = 4$ raies).

Le spectre RPE à l'état solide des NTCs fonctionnalisés est représenté sur la courbe rouge (b). Même si la charge en catalyseur est relativement faible, un signal superposable à celui obtenu en solution a été mesuré. Le couplage hyperfin est bien défini, ce qui indique que les spins électroniques sont magnétiquement isolés à la surface et qu'aucun dimère de cuivre n'est présent. Si c'était le cas, on aurait une espèce diamagnétique, silencieuse en RPE.

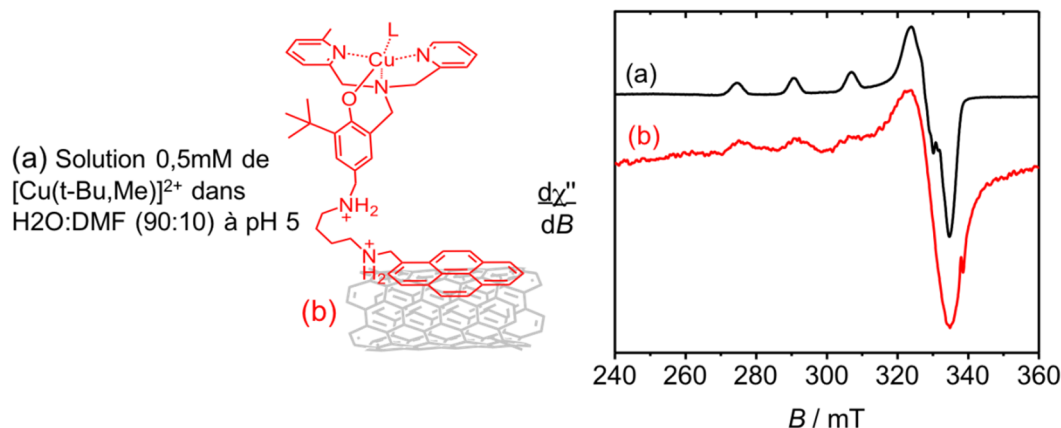


Figure chap.IV-9 : Spectres de résonance paramagnétique électronique pour le complexe de cuivre mononucléaire dérivé aldéhyde $[\text{Cu}(\text{LH}^{\text{CHO}})]^{2+}$ en solution ((a) courbe noire) et le complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu,Me})]^{2+}$ immobilisé sur électrode de NTC ((b) courbe rouge). Conditions : fréquence = 9,46 GHz ; puissance = 4,4 mW pour (a) et 5,5 mW pour (b) ; modulation de l'amplitude = 0,4 mT pour (a) et 0,5 mT pour (b) ; modulation de la fréquence = 100 kHz ; $T = 100$ K.

Contrairement aux autres techniques de caractérisation utilisés, la RPE renseigne sur l'environnement chimique du cuivre (II), qui est parfaitement coordonnée au ligand (t-Bu,Me) à la surface des NTCs. La synthèse bottom-up est donc un moyen simple et efficace de construire ce catalyseur moléculaire à la surface d'une électrode.

II.3 CARACTERISATIONS ELECTROCHIMIQUES EN ABSENCE D'OXYGENE

Immobilisés sur un film de NTC sur électrodes de carbone vitreux, les complexes $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{Me})]^{2+}$ et $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{CF}_3)]^{2+}$ sont étudiés par voltampérométrie cyclique à différents pH et différentes vitesses de balayage. L'électrolyte, un tampon Britton-Robinson, est dégazé par barbotage d'argon pendant 10 minutes, afin d'éliminer toutes traces d' O_2 et étudier le signal rédox du cuivre.

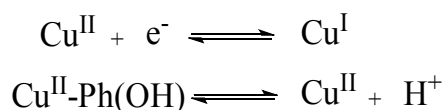
II.3.A INFLUENCE DU PH

II.3.A (i) Complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{Me})]^{2+}$

Sous argon, un système rédox réversible est observé à différents pH pour le complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{Me})]^{2+}$, que l'on peut attribuer au couple redox $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$. La faible différence de potentiel pic à pic de l'ordre de 40 mV indique que l'espèce catalytique est bien immobilisée à la surface de l'électrode (Figure chap.IV-10A). A pH3, un pic d'oxydation irréversible est observé à $E_{\text{p,ox}} = 0,25 \text{ V}$ vs SHE. Son origine sera discutée dans l'étude à différentes vitesses de balayage. Par ailleurs, l'intégration de la charge sous le pic de réduction nous permet d'estimer une concentration surfacique en catalyseur égale à $42 \pm 2 \text{ pmol.cm}^{-2}$.

L'étude du signal rédox partiellement réversible à différents pH permet de tracer le diagramme de dépendance potentiel/pH (Figure chap.IV-10B). La titration spectrophotométrique du complexe en solution (DMF/ H_2O) a révélé une valeur de $\text{pK}_a = 3,93 \pm 0,02$, attribuée à l'espèce phénol/phénolate.³⁶⁰ Afin de déterminer la valeur de pK_a par électrochimie, la courbe potentiel/pH a été simulée grâce au logiciel Origin (courbe rouge pointillée).

Considérons les équations redox et acido-basiques suivantes :



L'équation de Nernst s'écrit alors :

$$E = E_{\frac{1}{2}}(\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}) - 0,059 \log \frac{[\text{Cu}^{\text{I}}]}{[\text{Cu}^{\text{II}}] + [\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ph(OH)}]} \quad (1)$$

or : $K_{\text{ox}} = \frac{[\text{Cu}^{\text{II}}] \times [\text{H}^+]}{[\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ph(OH)}]}$ (2). L'équation (1) devient :

$$E = E_{1/2} \left(\text{Cu}^{\text{II}}\text{Ph(OH)}/\text{Cu}^{\text{I}} \right) - 0,059 \log \frac{[\text{Cu}^{\text{I}}]}{[\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ph(OH)}] \left(1 + \frac{K_{\text{ox}}}{[\text{H}^+]} \right)} \quad (3)$$

$$E = E_{1/2} \left(\text{Cu}^{\text{II}}\text{Ph}(\text{OH}) / \text{Cu}^{\text{I}} \right) + 0,059 \log \left(1 + K_{\text{ox}} / [\text{H}^+] \right) \quad (4)$$

L'équation (4) nous permet d'estimer une valeur de $\text{p}K_{\text{ox}}$ égale à $2,6 \pm 0,1$ pour le couple acido-basique $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Ph}(\text{OH}) / \text{Cu}^{\text{I}}$, dont le proton est porté par le phénol. Finalement, cette valeur est d'une unité de pH inférieure à celle observée en solution, qui s'explique essentiellement par l'immobilisation du catalyseur. Les espèces prédominantes sont représentées sur le diagramme potentiel/pH. Ainsi, la réduction du cuivre (II) en cuivre (I) est couplée à la protonation du phénoxy. Ceci se manifeste par la dépendance linéaire entre pH 2,6 et 8 avec une pente de 60mV/pH. Lorsque $\text{pH} < \text{p}K_{\text{ox}}$, le potentiel est indépendant du pH et les espèces redox prédominantes sont $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Ph}(\text{OH}) / \text{Cu}^{\text{I}}(\text{OH})$.

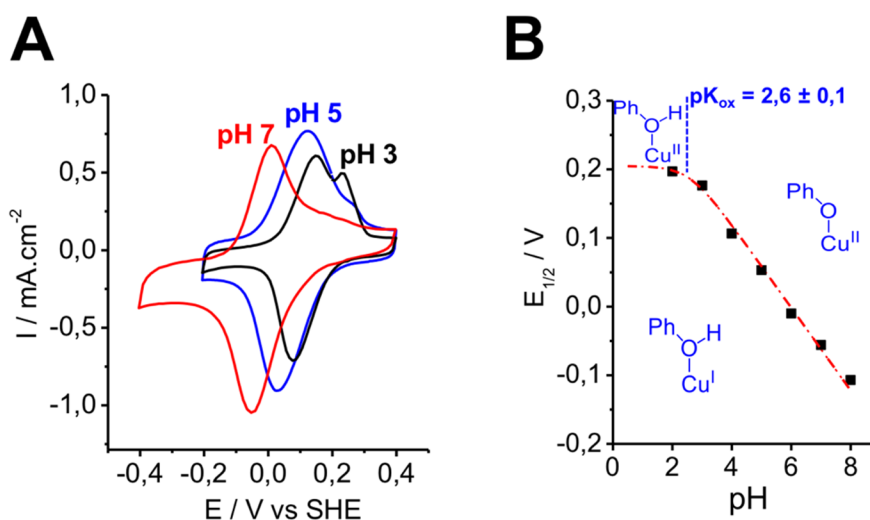


Figure chap.IV-10 : (A) Voltampérométrie cyclique de l'électrode NTC/[Cu(t-Bu,Me)]²⁺, sous argon, à différents pH. (B) Evolution du potentiel électrochimique du couple redox (Cu^{II}/Cu^I) en fonction du pH (points noirs) et simulation réalisée à l'aide du logiciel Origin (courbe rouge pointillée). Conditions : 10 mV.s⁻¹ ; 0,1 M tampon Britton-Robinson.

II.3.A (ii) Complexe [Cu(t-Bu,CF₃)]²⁺

Les voltampérogrammes cycliques, à différents pHs, du complexe **[Cu(t-Bu,CF₃)]²⁺** immobilisé, sont présentés en Figure chap.IV-11A. Un pic d'oxydation irréversible, dont l'intensité diminue en allant vers les pH basiques, est observée à $E_{\text{p,ox}} = 0,25$ V vs SHE. Son origine est la même que pour le complexe **[Cu(t-Bu,Me)]²⁺**. Cependant, l'irréversibilité est plus importante pour ce catalyseur, ce qui peut s'expliquer par le fort effet inducteur $-I$ du CF₃, dû à l'électronégativité élevée des atomes de fluor. La polarisation de cette liaison chimique déstabilise fortement la sphère de coordination du cuivre(II) qui peut alors se trouver dans une géométrie différente. Pour vérifier cette hypothèse, la structure cristalline du complexe devra être élucidée.

Le potentiel électrochimique $E_{1/2}$ du $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$, partiellement réversible, a été calculé à différents pH en travaillant à des vitesses de balayage élevées, permettant d'obtenir un pic réversible. Le diagramme E/pH correspondant est présenté en Figure chap.IV-11B. Comme attendu, une dépendance similaire au complexe **[Cu(t-**

Bu,Me)]²⁺ est observée avec un pK_{ox} égale à $3,2 \pm 0,1$. Par ailleurs, le potentiel électrochimique est d'environ 50 mV supérieure à **[Cu(t-Bu,Me)]²⁺**, ce qui est lié encore une fois à l'effet inductif du groupement -CF₃. L'intégration de la charge sous le pic de réduction nous permet d'estimer une concentration surfacique en catalyseur égale à $36 \pm 2 \text{ pmol.cm}^{-2}$.

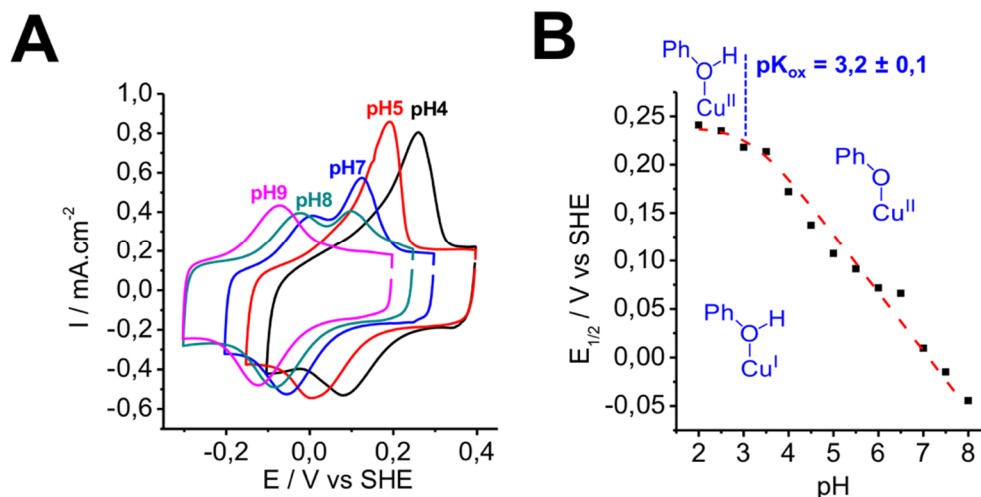


Figure chap.IV-11 : (A) Voltampérométrie cyclique de l'électrode NTC/[Cu(t-Bu,CF₃)]²⁺, sous argon, à différents pH. (B) Evolution du potentiel électrochimique du couple redox (Cu^{II}/Cu^I) en fonction du pH (points noirs) et simulation réalisée à l'aide du logiciel Origin (courbe rouge pointillée). Conditions : 10 mV.s⁻¹; 0,1 M tampon Britton-Robinson.

II.3.B INFLUENCE DE LA VITESSE DE BALAYAGE

Afin de mieux comprendre l'origine du pic d'oxydation irréversible, des voltampérométries cycliques à différentes vitesses de balayage ont été mesurées à pH5.

II.3.B (i) Complexe [Cu(t-Bu,Me)]²⁺

Lorsque la vitesse de balayage est faible ($< 100 \text{ mV.s}^{-1}$), deux pics d'oxydation sont clairement identifiables, notés $I_{p^{ox1}}$ et $I_{p^{ox2}}$ (**Erreur ! Source du renvoi introuvable**). Le ratio du courant maximal d'oxydation sur le courant maximal de réduction est calculé et reporté sur la Figure chap.IV-12B. A vitesse de balayage faible, un ratio proche de 1 est obtenu pour le couple ox_2/red , à contrario du couple ox_1/red dont le ratio tend vers 1 à vitesse de balayage élevée. Ainsi, les espèces ox_1 et ox_2 sont dépendantes l'une de l'autre : un mécanisme électrochimique couplé à une réaction chimique (mécanisme EC) transforme ox_1 en ox_2 . En général, la réaction chimique est lente et intervient plus facilement à faible vitesse de balayage, comme dans le cas du couple ox_2/red .

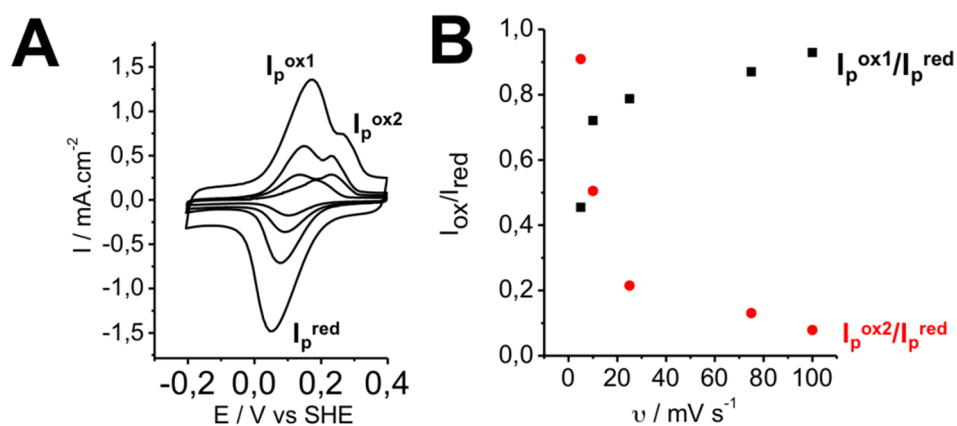


Figure chap.IV-12 : (A) Voltampérométrie cyclique de l'électrode NTC/[Cu(t-Bu,Me)]²⁺, sous argon, à différentes vitesses de balayage. (B) Ratio des courants maximaux d'oxydation et de réduction en fonction de la vitesse de balayage. Conditions : 5 à 100 mV.s⁻¹; 0,1 M tampon Britton-Robinson à pH = 5.

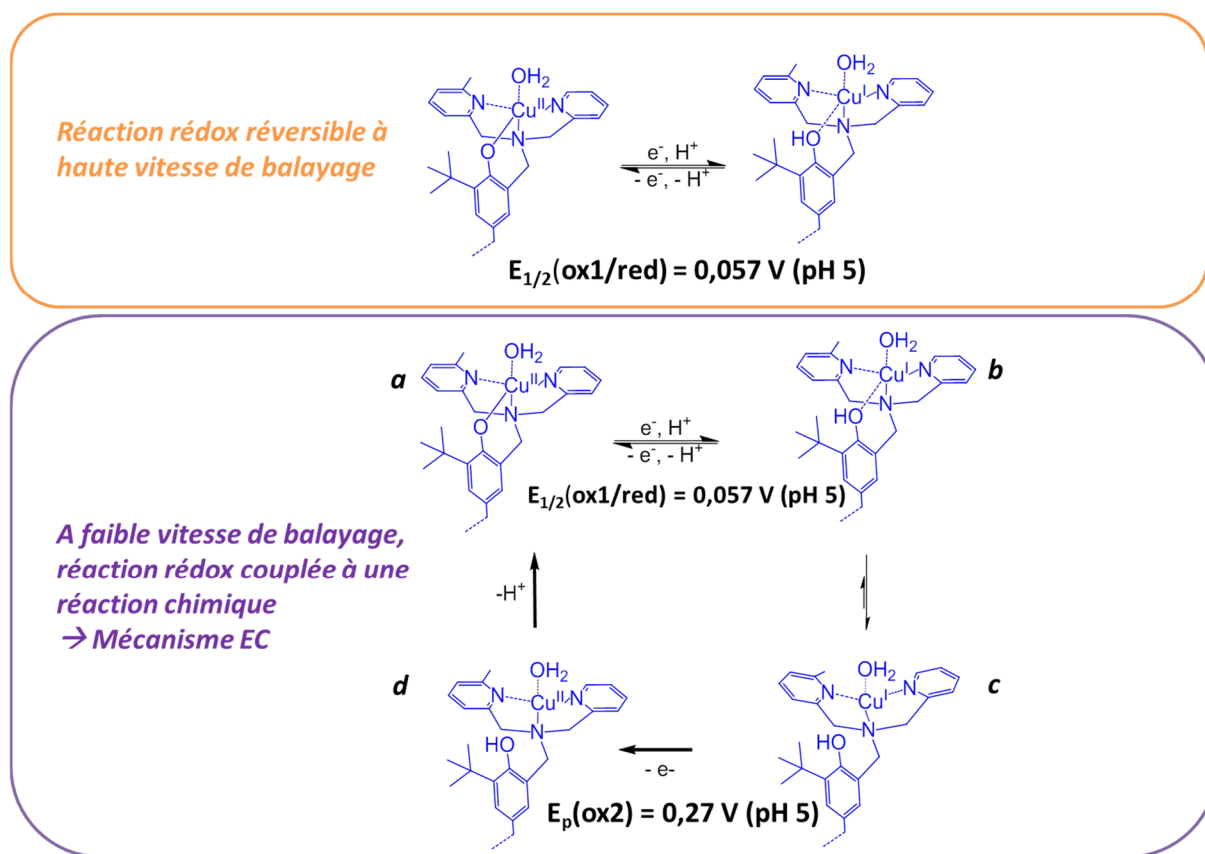


Figure chap.IV-13 : Espèces en prédominances à haute et basse vitesses de balayage.

Comme illustré sur la Figure chap.IV-13, à haute vitesse de balayage (100 mV.s⁻¹), les pics réversibles d'oxydation et de réduction ($I_p^{\text{ox1}}/I_p^{\text{red}}$) font intervenir un mécanisme à $1e^-/1H^+$, attribué au système rédox Cu^{II}-Ph(OH)/Cu^I à un potentiel $E_{1/2} = 0,057 \text{ V vs SHE (pH5)}$. A faible vitesse de balayage (10 mV.s⁻¹), lorsque le cuivre (II) passe à l'état d'oxydation (I), l'hypothèse la plus probable est la décoordination du ligand phénol pour conduire à l'espèce c. Son oxydation en cuivre (II) (espèce d) régénère le complexe de départ, par coordination du ligand phénol et perte d'un proton (un processus rapide non observé en électrochimie) Ce mécanisme faisant intervenir

une étape de protonation est également corroboré par le fait que la réaction chimique est plus rapide à vitesse de balayage constante, à mesure que le pH diminue.

II.3.B (ii) Complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{CF}_3)]^2$

+

Le complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{CF}_3)]^{2+}$ a un comportement similaire au catalyseur précédent. Cependant, à faible vitesse de balayage, seul les pics $I_{\text{p}}^{\text{ox1}}$ et $I_{\text{p}}^{\text{red}}$ sont présents. A haute vitesse de balayage, le pic $I_{\text{p}}^{\text{ox1}}$ apparaît et le système redox devient réversible (Figure chap.IV-14). Ce comportement est également observé pour les pHs basiques à vitesse de balayage constante. Ceci peut s'expliquer par un changement de l'environnement du centre métallique, via l'électronégativité du CF_3 .

Afin de vérifier ces hypothèses, la structure cristalline du complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{CF}_3)]^{2+}$ donnerait des informations intéressantes, mais pour le moment aucun cristal n'a été obtenu. En effet, l'hygroscopicité due au motif amine présent sur le groupement pyrène, rend ce processus difficile.

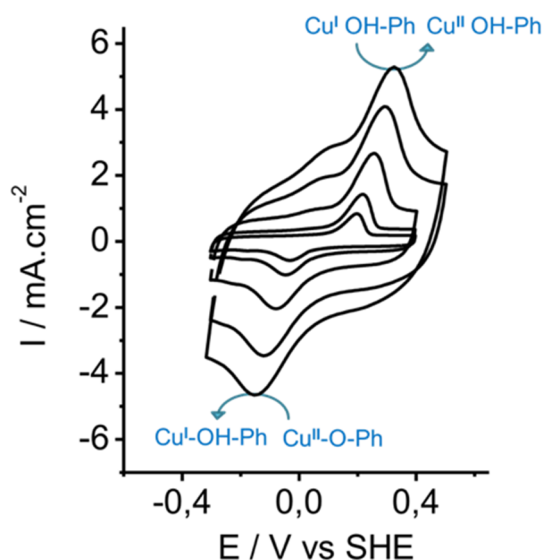


Figure chap.IV-14 : Voltampérométrie cyclique de l'électrode NTC/ $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{CF}_3)]^{2+}$, sous argon, à différentes vitesses de balayage. Conditions : 5 à $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $0,1\text{ M}$ tampon Britton-Robinson à $\text{pH} = 6$.

II.4 CARACTERISATIONS ELECTROCHIMIQUES EN PRESENCE D'OXYGENE

Les deux complexes mononucléaires étudiés sont des mimes de l'enzyme galactose oxydase, capable d'oxyder les alcools primaires en aldéhydes via la réduction d'O₂ en H₂O₂. Dans cette section, nous allons étudier le comportement des catalyseurs en présence d'O₂.

II.4.A ELECTROCATALYSE DE REDUCTION DE L'OXYGENE

Le comportement des deux catalyseurs **[Cu(t-Bu,Me)]²⁺** et **[Cu(t-Bu,CF₃)]²⁺**, sous O₂, est caractérisé par voltampérométrie cyclique à pH5 (Figure chap.IV-15A). Une vague de réduction catalytique est observée à un potentiel de catalyse de l'ordre de 0,3 V vs SHE pour les deux complexes. Les densités de courant maximales enregistrées sont de $-5 \pm 0,5 \text{ mA.cm}^{-2}$ et $-4 \pm 0,5 \text{ mA.cm}^{-2}$, respectivement pour **[Cu(t-Bu,Me)]²⁺** et **[Cu(t-Bu,CF₃)]²⁺**. La barre d'erreur assez importante est attribuée à deux phénomènes : (1) le transport d'oxygène dans le film de NTCs, plus ou moins efficace, en fonction de la porosité ; (2) la quantité de catalyseurs immobilisés, qui est plus ou moins différente. Par ailleurs, il n'est pas surprenant d'observer une vague catalytique de réduction pour les NTCs, qui intervient à un courant maximal deux à trois fois plus faible que pour les complexes de cuivre (courbe grise pointillée).

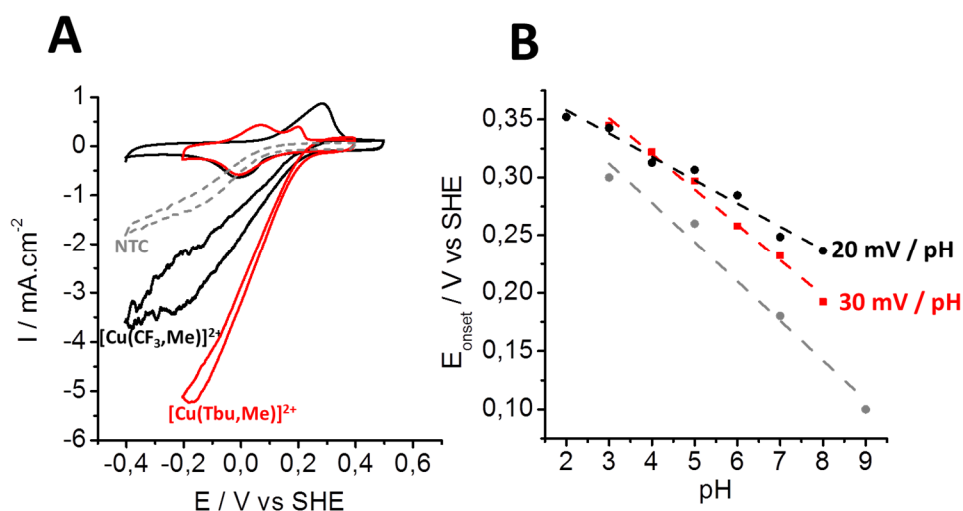


Figure chap.IV-15 : (A) Voltampérométrie cyclique des électrodes NTC/[Cu(t-Bu,CF₃)]²⁺(courbe noire) et NTC/[Cu(t-Bu,Me)]²⁺(courbe rouge) sous argon et O₂ à pH5. (B) Evolution du potentiel de catalyse, E_{onset}, en fonction du pH et estimation de la pente de la dépendance linéaire pour chaque complexe. Conditions : 10mV.s⁻¹; 0,1 M tampon Britton-Robinson à pH = 5.

Quel que soit le catalyseur, la densité de courant catalytique maximale évolue peu en fonction du pH. En revanche, le potentiel électrochimique du cuivre étant dépendant du pH, il en est de même pour E_{onset}, comme indiqué sur la Figure chap.IV-15B. Une corrélation linéaire est ainsi observée avec une pente de 30 mV/pH pour **[Cu(t-Bu,Me)]²⁺** et 20 mV/pH pour **[Cu(t-Bu,CF₃)]²⁺**. Ceci est en accord avec une

étape limitante à $2\text{H}^+/\text{1e}^-$ pour la réaction catalytique, qui implique formation d'une espèce hydroperoxo, en accord avec ce qui a déjà été observé pour d'autres complexes biomimétiques.^{291,362} De plus, le potentiel de catalyse des complexes de cuivre est environ 50 mV plus élevé que celui des NTCs.

II.4.B CALCUL DU NOMBRE D'ÉLECTRONS PAR EXPERIENCE D'ÉLECTRODE A DISQUE TOURNANT

II.4.B (i) *Principe*

Afin de s'affranchir des limites de transport de masse d'oxygène à la surface de l'électrode de travail, nous travaillons avec une électrode à disque tournant. Cette électrode de carbone vitreux tourne à une vitesse de rotation (rpm) plus ou moins élevée, suivant les paramètres définis. Les équations de Koutecky-Levich permettent de calculer le nombre d'électrons impliqués dans l'électrocatalyse.³⁶³

L'équation couramment utilisée est la suivante :

$$I = 0,201nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C \quad (5)$$

avec I le courant maximal (A), n le nombre d'électrons impliqués dans la réaction catalytique, F le nombre de Faraday (C.mol^{-1}), A la surface de l'électrode tournante (cm^2), D le coefficient de diffusion ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$), ω la vitesse de rotation de l'électrode tournante (rad.s^{-1}), ν la viscosité cinématique et C la concentration en analyte (mol.cm^{-3}).

Le courant catalytique croît avec la vitesse de rotation de l'électrode jusqu'à atteindre une saturation, lorsque la réaction est limitée par la cinétique. Ce comportement permet de tracer la droite de Koutecky-Levich, $1/I = f(\omega^{-1/2})$, dont la pente donne accès au nombre d'électrons.

II.4.B (ii) *Résultats obtenus*

Afin de déterminer si l' O_2 est réduit en H_2O ou en H_2O_2 , le complexe **[Cu(t-Bu,Me)]²⁺** a été immobilisé sur une électrode tournante modifiée par un film de NTC. Le voltampérogramme sous O_2 à différentes vitesses de rotation est présenté en Figure chap.IV-16A. La densité de courant catalytique maximale augmente de 25 à 400 rpm. En général, l'équation de Koutecky-Levich est utilisée pour des vitesses de rotation pouvant aller jusque 3000 rpm. Dans notre cas, la limite cinétique est rapidement atteinte, ce qui signifie que le catalyseur est lent et que la diffusion de l'oxygène dans le film poreux de NTC n'est pas optimale. La pente de la droite de Koutecky-Levich (Figure chap.IV-16B) donne un nombre d'électron égal à $3,05 \pm 0,2$. La réduction de l'oxygène en eau ne serait donc pas totale.

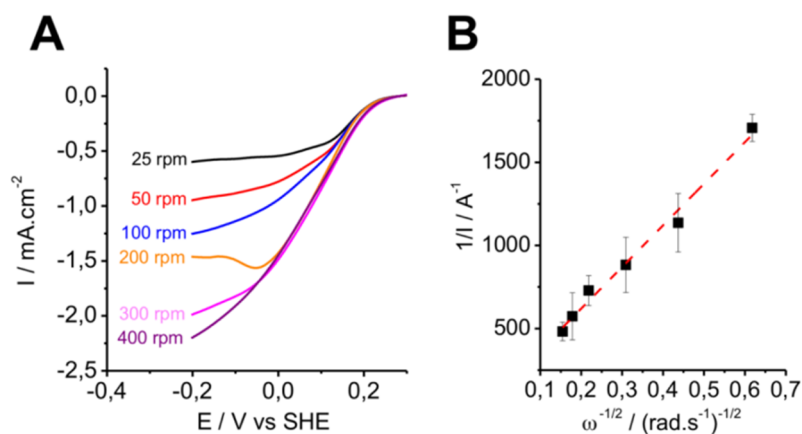


Figure chap.IV-16 : (A) Voltampérométrie de l'électrode tournante NTC/ $[\text{Cu}(\text{t-Bu,Me})]^{2+}$ sous O_2 , à pH5 et différentes vitesses de rotation. (B) Diagramme de Koutecky-Levich associé. Conditions : $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; 0,1M de tampon Britton-Robinson à pH 5.

La même expérience réalisée avec le complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu,CF}_3)]^{2+}$ donne un nombre d'électrons égale à $2,35 \pm 0,5$ avec une cinétique aussi lente (saturation autour de 400 rpm). Avec un nombre d'électrons légèrement inférieur à celui calculé précédemment, le complexe $[\text{Cu}(\text{t-Bu,CF}_3)]^{2+}$ se révèle donc moins efficace face à la réduction de l'oxygène en eau.

II.4.C DETECTION DE LA QUANTITE D'INTERMÉDIAIRE RÉACTIONNEL FORMÉE

Dans les deux cas, la réaction d'ORR n'est pas totale, puisque le nombre d'électrons n'est pas égal à 4. Afin de détecter si une quantité significative de peroxyde d'hydrogène est formée, nous avons travaillé avec une électrode à disque et à anneau tournante.

II.4.C (i) Principe

Le catalyseur, immobilisé sur le disque de carbone vitreux, réduit l'oxygène par un mécanisme à $4e^- + 4H^+$ pour former de l'eau ou à $2e^- + 2H^+$ pour former du peroxyde d'hydrogène. Cette espèce est alors oxydée en eau au niveau de l'anneau de platine, auquel un potentiel de 1,2 V vs RHE est appliqué.³⁶⁴ Afin de s'affranchir des limites de diffusion, l'électrode tourne à une vitesse élevée de l'ordre de 1500 à 2000 rpm (Figure chap.IV-17A).

En pratique, une voltampérométrie au disque et une chronoampérométrie à l'anneau sont enregistrées simultanément. Un courant d'oxydation est donc observé à l'anneau si du peroxyde d'hydrogène est formé au cours de la réduction de l'oxygène au disque. Le pourcentage d' H_2O_2 produit est calculé grâce à l'équation présentée en Figure chap.IV-17B : N est le collecteur efficacité, constante propre à chaque électrode et estimée à 0,265 ; I_R et I_D sont respectivement les densités de courant maximales à l'anneau et au disque.³⁶⁴

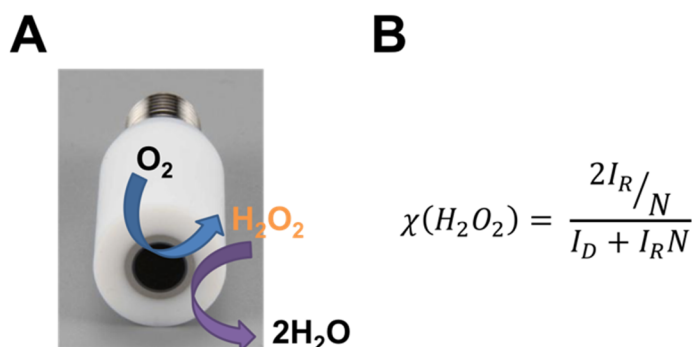


Figure chap.IV-17 : (A) Photographie de l'électrode disque-anneau tournante et réactions redox associées à chaque électrode. (B) Formule permettant de calculer la quantité d'intermédiaires peroxyde d'hydrogène formée au cours de la réaction de réduction de l'oxygène.

II.4.C (ii) Résultats obtenus

Les résultats obtenus en électrode disque-anneau tournante pour un film de NTC et pour les deux catalyseurs sont présentés en Figure chap.IV-18A. Comme évoqué précédemment la réduction de l'O₂ par les NTCs n'est pas négligeable intervenant à un potentiel de l'ordre de 0,26 V vs SHE, contre 0,31V vs SHE pour [Cu(t-Bu,CF₃)]²⁺ et 0,29V vs SHE pour [Cu(t-Bu,Me)]²⁺. La formation simultanée de peroxyde d'hydrogène à l'anneau est reportée en Figure chap.IV-18B. Le courant à l'anneau est environ 4 fois plus élevé pour les NTCs que pour les deux complexes de cuivre : 48 % d'H₂O₂ sont produits par les NTCs, contre respectivement 5 et 1% pour [Cu(t-Bu,CF₃)]²⁺ et [Cu(t-Bu,Me)]²⁺. Les NTCs sont donc un mauvais catalyseur d'ORR, puis que la réduction n'est pas totale. [Cu(t-Bu,Me)]²⁺ est le catalyseur le plus efficace, puisque seulement 1 % de H₂O₂ est généré. Ces valeurs sont excellentes comparées à la littérature, dans laquelle la plupart des catalyseurs mononucléaires produisent entre 10 et 20 % d'H₂O₂.^{289,290,365}

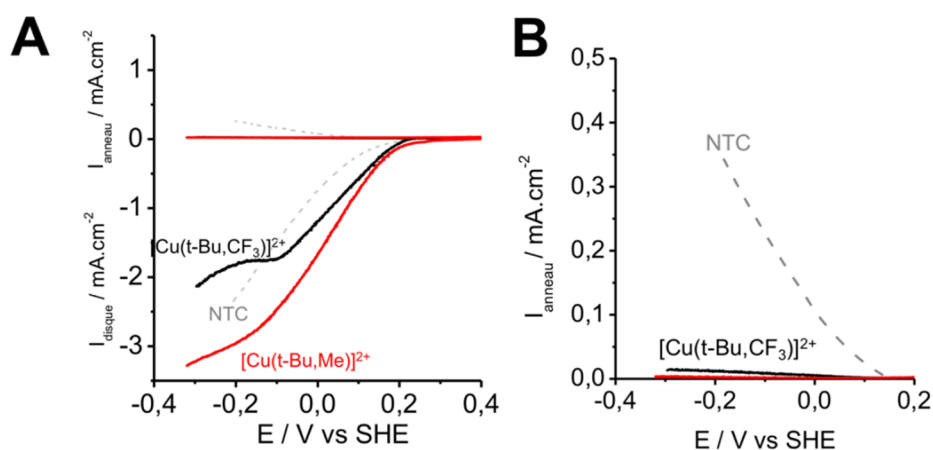


Figure chap.IV-18 : (A) Expérience d'électrode disque-anneau tournante réalisée à pH5 et 1500 rpm pour les électrodes de NTC (courbe grises pointillée), de NTC/[Cu(t-bu,Me)]²⁺ (courbe rouge) et NTC/[Cu(t-bu,CF₃)]²⁺ (courbe noire) (B) Zoom sur le résultat obtenu à l'anneau. Conditions : 10 mV.s⁻¹ ; 0,1M tampon Britton-Robinson à pH5, potentiel appliquée à l'anneau 0,903 V vs SHE.

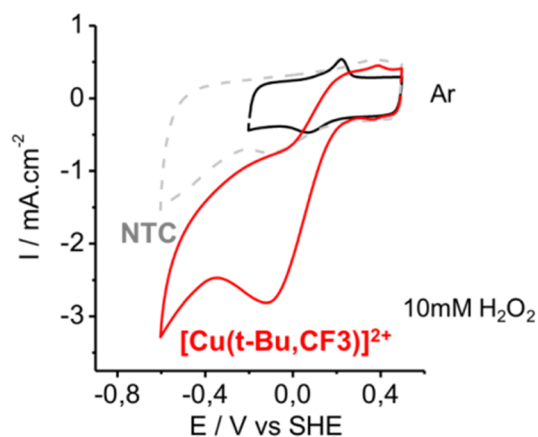


Figure chap.IV-19 : Voltampérométrie cyclique de l'électrode NTC (gris pointillé) et NTC/(t-Bu,CF₃)²⁺sous argon (courbe noire) et 10 mM H₂O₂. Conditions : 10 mV.s⁻¹; 0,1M tampon Britton-Robinson pH4.

Afin d'appuyer ce résultat, nous avons mis les deux catalyseurs et les NTCs en présence de 10 mM d'H₂O₂ dans un électrolyte à pH4 (Figure chap.IV-19). La vague de réduction catalytique est très peu intense lorsque l'électrode de carbone vitreux est recouverte par un film de NTCs. Cependant, le complexe **[Cu(t-Bu,CF₃)²⁺** réduit H₂O₂ en H₂O à un potentiel de 0,2V vs SHE, proche de celui observé pour l'ORR.

II.5 COMPARAISON DES DEUX COMPLEXES ET DISCUSSION

Les deux catalyseurs étudiés sont des mimes de l'enzyme galactose oxydase. Leur construction par synthèse bottom-up sur électrodes de NTCs permet de greffer une grande quantité de catalyseurs sur l'électrode (40 nmol.cm⁻²). Le complexe **[Cu(t-Bu,Me)²⁺** a été le premier étudié³⁶⁰ : le signal électrochimique de l'espèce Cu^{II}-Ph(OH)/Cu^I est remarquablement stable après de multiples cyclages avec un ΔE inférieur à 40 mV. Son homologue **[Cu(t-Bu,CF₃)²⁺** a été synthétisé dans le but d'augmenter le potentiel du cuivre (donc diminuer la surtension), via la présence du groupement électroattracteur -CF₃ en ortho de la pyridine. Son potentiel rédox est 50 mV plus élevé que dans le cas du complexe **[Cu(t-Bu,Me)²⁺**.

En présence d'oxygène, les potentiels de catalyse sont similaires. Il en est de même pour le nombre d'électrons (proche de 3) et la quantité d'intermédiaire H₂O₂ formée (1-20%). De plus, l'évolution du E_{onset} en fonction du pH donne une pente de 30 mV/pH. Ces résultats suggèrent que la réaction de réduction de l'oxygène en eau s'effectue par un mécanisme à 2+2e⁻. D'après de précédentes études, ²⁹⁰ on peut émettre l'hypothèse que la formation d'un intermédiaire hydropéroxo serait l'étape limitante dans le mécanisme d'ORR. Les résultats sont résumés dans le Tableau chap.IV- 1

Complexes	Concentration surfacique / nmol.cm ⁻²	pK _{ox}	E _{1/2} (Cu ^{II} /Cu ^I) V vs SHE (pH5)	E _{onset} / V vs SHE (pH5)	Nombre d'électrons impliqués dans la catalyse (pH5)	%(H ₂ O ₂) formé à pH5
[Cu(tBu-Me)] ²⁺	42	2,6	0,05	0,29	3,05 ± 0,2	1
[Cu(tBu-CF ₃)] ²⁺	36	3,2	0,1	0,31	2,35 ± 0,5	5

Tableau chap.IV- 1 : Récapitulatif des différents résultats obtenus pour les deux catalyseurs mononucléaires.

La vague de réduction catalytique débute, dans les deux cas, à un potentiel proche du second pic d'oxydation. Ceci pourrait indiquer que l'espèce impliquée dans le mécanisme de réduction d'O₂ est issu de la décoordination du ligand phénol après une étape à 1H⁺/1e⁻, qui laisserait une vacance libre pour la fixation de l'oxygène. De plus, Chidsey a mis en évidence que la réduction de l'oxygène par un complexe mononucléaire de Cu(I) possédant un ligand phénanthroline passerait par la formation d'un intermédiaire dinucléaire Cu₂O₂.²⁸⁹ Une étape similaire pourrait également avoir lieu dans notre cas, suite à la décoordination du ligand phénol.

Contrairement à l'enzyme et aux autres complexes bio-inspirés étudiés en solution, ces catalyseurs ne sont pas capables d'oxyder les alcools primaires (tests réalisés avec l'alcool benzylique). Le potentiel de catalyse de ces complexes mononucléaire est de l'ordre de 0,6V vs SHE. Ce résultat est proche de celui mesuré pour l'enzyme galactose oxydase immobilisée par DET sur électrode d'or (+0,76V vs RHE²⁴⁵) ou pour d'autres molécules du même type immobilisées dans une encre de nafion (+0,67 V vs RHE²⁹¹). Le point négatif est la surtension qui reste tout de même très élevée, de l'ordre de 630 mV (+0,6 V vs RHE) par rapport au potentiel thermodynamique du couple (O₂/H₂O). Dans la section suivante, nous avons cherché à évaluer les performances d'analogues dinucléaires de cette famille de complexes à ligand phénoxy en immobilisant deux types de ligands capables de générer des complexes de cuivre dinucléaires.

III. IMMOBILISATION DE COMPLEXES DE CUIVRE DINUCLEAIRES SUR NTCs POUR L'ORR

III.1 INTRODUCTION

La polyphénol oxydase oxyde les substrats polyphénols en utilisant l'oxygène, réduit en eau, en tant que cofacteur. Son site actif, composé d'un complexe de cuivre dinucléaire, a un potentiel de +0,36V vs NHE. Nous allons étudier deux catalyseurs : (1) le complexe $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$ oxyde les catéchols en solution, et est un mime structural et fonctionnel de la PPO (Figure chap.IV-20); (2) le complexe $[\text{Cu}(\text{H,Me})]^{2+}$ est dérivé des précédentes molécules mais à la capacité de dimériser grâce à un faible encombrement stérique autour du ligand phénoxy. Ainsi, deux structures sont possibles comme schématisé sur la Figure chap.IV-21

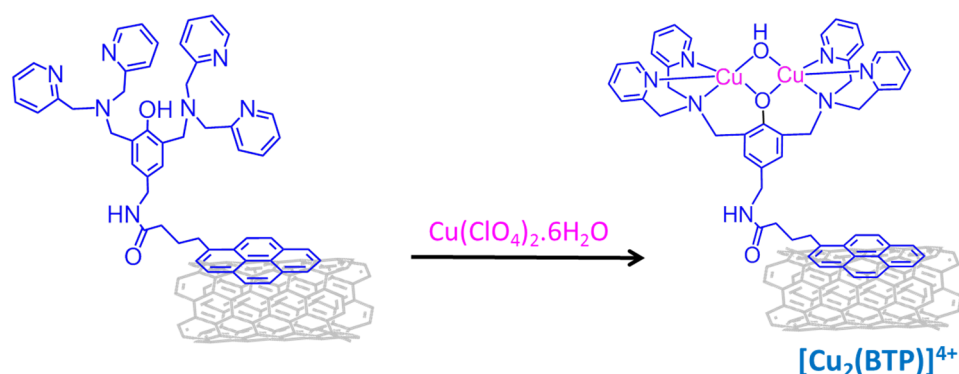


Figure chap.IV-20 : Synthèse bottom-up du complexe de cuivre dinucléaire, mime de la polyphénol oxydase.

Les complexes dinucléaires étudiés dans la littérature ont en général un potentiel de catalyse de 50 à 300 mV plus élevé que leur analogue mononucléaire. Ils catalysent l'ORR majoritairement à pH basique. Le plus performant est le complexe $[\text{Cu}_2(\text{TADPy})_4]^{4+}$, qui réduit l'oxygène à pH14, à un potentiel de catalyse de 0,95 V vs RHE.²⁹³

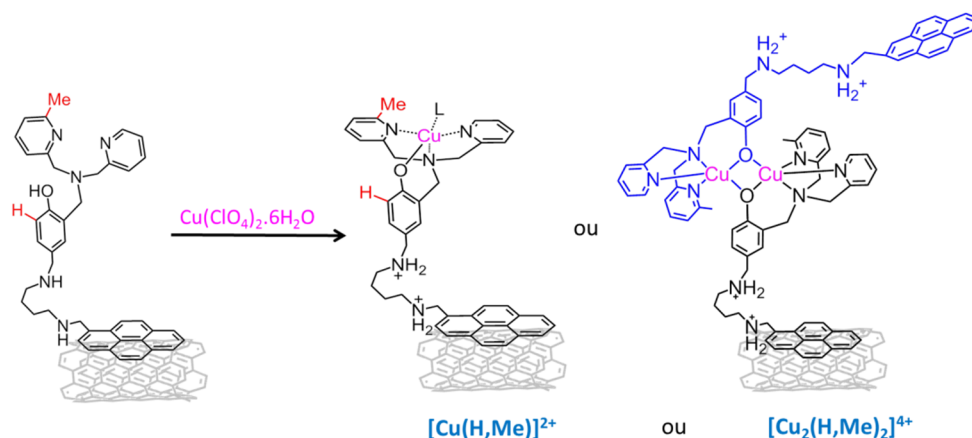


Figure chap.IV-21 : Synthèse bottom-up du complexe mononucléaire ou dimère de cuivre.

Nous avons voulu mettre en évidence cette propriété en étudiant ces deux complexes par électrochimie. Pour plus de clarté, la démarche scientifique sera similaire à celle utilisée pour les complexes mononucléaires. Les 4 catalyseurs bio-inspirés présentés dans ce chapitre seront ensuite comparés et nous déterminerons lequel sera intégré dans la pile biomimétique.

III.2 CARACTERISATION DE SURFACE

La seule technique de caractérisation de surface employée a été la spectrométrie photoélectronique X. Des études de résonance paramagnétique électronique à l'état solide n'ont pas été envisageables du fait du couplage de spin nucléaire entre les deux centres cuivre, rendant ces molécules silencieuses en RPE.

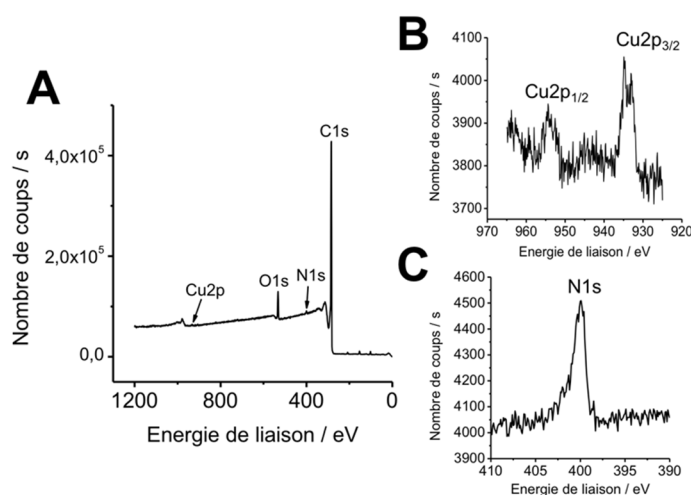


Figure chap.IV-22 : (A) Spectre de spectrométrie photoélectronique X complet de l'électrode NTC/[Cu₂(BTP)]⁴⁺. Zoom sur les spectres des orbitales (B) Cu₂p, (C) F1s, (D) N1s.

Le spectre de spectrométrie photoélectronique X du complexe [Cu₂(BTP)]⁴⁺ immobilisé sur NTC est présenté en Figure chap.IV-22. Ce dernier a des signaux similaires aux complexes mononucléaires. Comme précédemment, le complexe de cuivre, initialement à l'état d'oxydation +II, a été réduit par le faisceau d'électrons X. Ainsi, les pics des orbitales Cu₂p_{1/2} et Cu₂p_{3/2} correspondent à un état d'oxydation +I ou 0. Le signal est bruité et de nombreuses accumulations ont été nécessaires pour détecter cet élément, peu concentré à la surface de l'électrode. Il n'est donc pas possible d'avoir une valeur pertinente pour le ratio exact Cu/N qui nous aurait renseigné sur le rapport métal/ligand. Enfin, les orbitales 1s de l'azote ont une énergie de liaison égale à 400 eV

III.3 CARACTERISATIONS ELECTROCHIMIQUES EN ABSENCE D'OXYGENE

Les deux molécules $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$ et $[\text{Cu}(\text{H},\text{Me})]^{2+}$ sont étudiées par voltampérométrie cyclique à différents pH et vitesses de balayage en condition désoxygénée. Ces expériences vont nous permettre de confirmer ou infirmer la présence de deux centres métalliques

III.3.A INFLUENCE DU PH

III.3.A (i) Complexe $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$

L'électrode NTC/ $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$ est étudiée entre pH 2 et 9 en Figure chap.IV-23A à $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Un pic d'oxydation irréversible apparaît à un potentiel de $0,3 \text{ V}$ vs SHE à pH2, puis son intensité diminue en allant vers les pH basiques. Un système rédox réversible est présent à tous les pH : sa dépendance $E_{1/2} = f(\text{pH})$ est tracée en Figure chap.IV-23B.

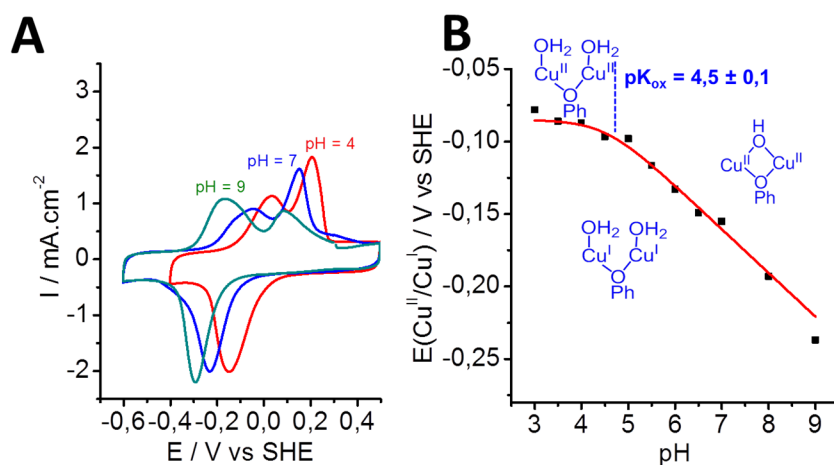


Figure chap.IV-23 : (A) Voltampérométrie cyclique de l'électrode NTC/ $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$, sous argon, à différents pH. (B) Evolution du potentiel électrochimique du couple rédox $(\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}})$ en fonction du pH (points noirs) et simulation réalisée à l'aide du logiciel Origin (courbe rouge pointillée). Conditions : $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $0,1 \text{ M}$ tampon Britton-Robinson.

La courbe obtenue a été simulée à l'aide du logiciel Origin (courbe rouge), d'après l'équation suivante (5) :

$$E = E_{1/2} \left(\frac{\text{Cu}^{\text{II}}\mu(\text{OPh})}{\text{Cu}^{\text{I}}\mu(\text{OPh})} \right) + 0,03 \log \left(1 + \frac{K_{\text{ox}}}{[\text{H}^+]} \right)$$

Deux centres métalliques sont impliqués dans la réduction du Cu^{II} en Cu^{I} : une pente de $30 \text{ mV}/\text{pH}$ est alors mesurée dans la partie linéaire de la droite (entre pH 4,5 et 9). Ce résultat est attribué à un ratio 2 : 1 correspondant à un mécanisme à $2e^-/1\text{H}^+$. Une valeur de $\text{p}K_{\text{ox}}$, égale à $4,5 \pm 0,1$ est obtenue et correspond à la déprotonation

de l'espèce $[\text{Cu}(\text{II})-\mu(\text{O}^-\text{Ph})-(\text{OH})_2]_2$ en $[\text{Cu}(\text{II})-\mu(\text{O}^-\text{Ph})-\mu(\text{OH})]$, valeur similaire au pKa calculé en solution par titration spectrophotométrique (pKa = 5). Ceci confirme la présence d'une espèce dinucléaire à la surface de l'électrode dont la double réduction en Cu (I) est accompagnée d'une protonation au-delà de pH 4,5. La structure du dérivé di-réduit pourrait correspondre à deux centres Cu(I) dans un environnement tétrahédrique et séparé par un ligand μ -hydroxo ou μ -phenolato.

III.3.A (ii) Complexe $[\text{Cu}(\text{H},\text{Me})]^{2+}$

L'électrode **NTC**/ $[\text{Cu}(\text{H},\text{Me})]^{2+}$ est étudiée entre pH 2 et 9 (Figure chap.IV-24A) à $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ par voltampérométrie cyclique. Un système redox réversible à un potentiel $E_{p,\text{ox}} = 0,25 \text{ V}$ vs SHE (pH2) apparaît, puis le système devient totalement réversible à pH9 ($E_{1/2} = -0,2 \text{ V}$ vs SHE). La dépendance, potentiel électrochimique/pH, du couple Cu(II)/Cu(I) est présentée en Figure chap.IV-24B.

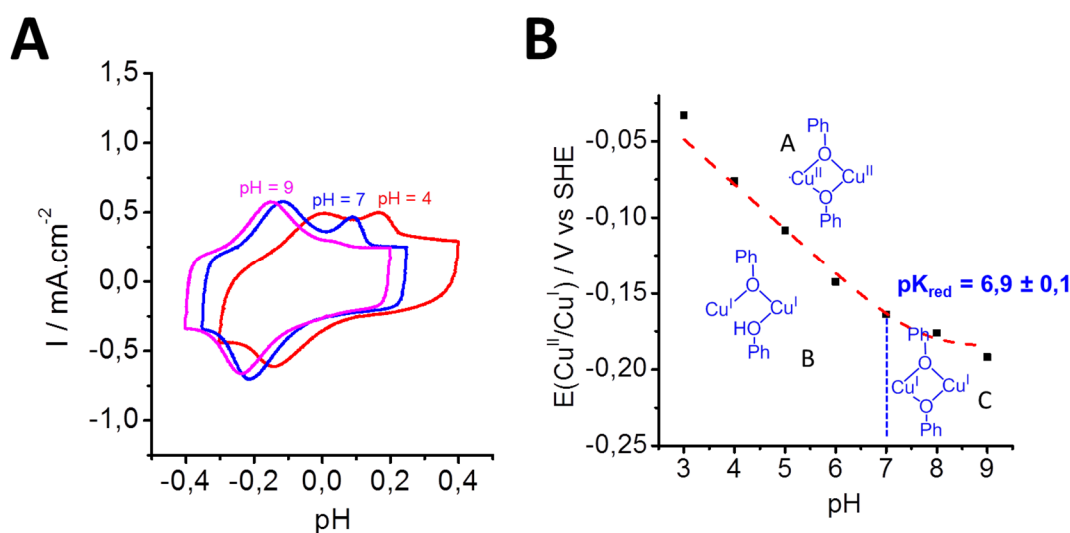


Figure chap.IV-24 : (A) Voltampérométrie cyclique de l'électrode NTC/ $[\text{Cu}_x(\text{H},\text{Me})_x]^{x+}$, sous argon, à différents pH. (B) Evolution du potentiel électrochimique du couple redox $(\text{Cu}^{II}/\text{Cu}^I)$ en fonction du pH (points noirs) et simulation réalisée à l'aide du logiciel Origin (courbe rouge pointillée). Conditions : $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $0,1 \text{ M}$ tampon Britton-Robinson.

La courbe potentiel/pH est modélisée de la même manière que précédemment. Elle décrit l'évolution d'une réduction à deux électrons. Cette dépendance confirme la présence du dimère attendu à la surface des NTCs : deux ligands (H,Me) sont coordonnés à deux atomes de cuivre pontants entre les deux phénols (espèce $[\text{Cu}_2(\text{H},\text{Me})_2]^{4+}$ sur la Figure chap.IV-21). Le dimère Cu(II) est stable sur toute la gamme de pH. Sa double réduction est accompagnée d'une étape de protonation, qui a vraisemblablement lieu au niveau de l'un des ligands (H,Me), dont l'équilibre acide-base a un $\text{pK}_{\text{red}} = 6,9 \pm 0,1$. Au vu de ces résultats, ce catalyseur sera désormais noté $[\text{Cu}_2(\text{H},\text{Me})_2]^{4+}$.

III.3.B INFLUENCE DE LA VITESSE DE BALAYAGE

Afin d'étudier en détail le processus d'oxydation irréversible, le catalyseur $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$ est étudié par voltampérométrie cyclique à différentes vitesses de balayage (Figure chap.IV-25).

A faible vitesse de balayage ($< 25 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$), deux pics d'oxydation sont clairement visibles. A haute vitesse de balayage, ils se recouvrent sous un seul et même pic. Ce comportement est typique d'un mécanisme EC, comme décrit sur le schéma de la Figure chap.IV-26 La réduction réversible à $2e^-/1\text{H}^+$ du cuivre (II) (A) en cuivre (I) (B) a lieu à un potentiel $E_{1/2} = -0,09\text{V}$ vs SHE.

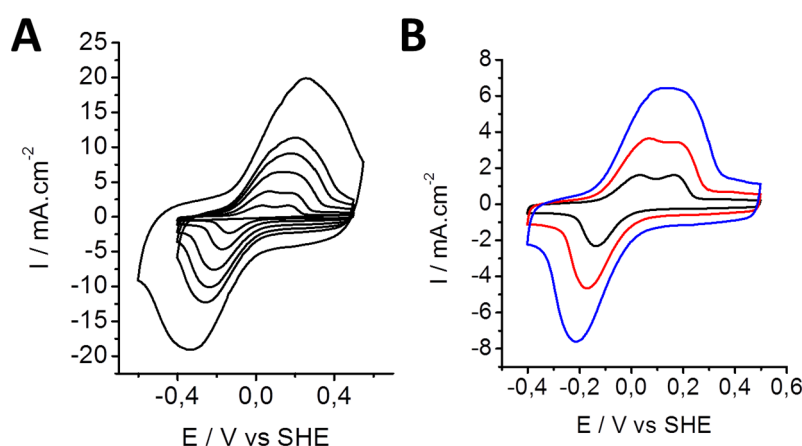


Figure chap.IV-25 : (A) Voltampérométrie cyclique de l'électrode NTC/ $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$, sous argon, à différentes vitesses de balayage. (B) Voltampérométrie cyclique aux vitesses de balayage les plus faibles : 5, 10, 25 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Conditions : 5 à 200 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$; 0,1 M tampon Britton-Robinson à pH = 5.

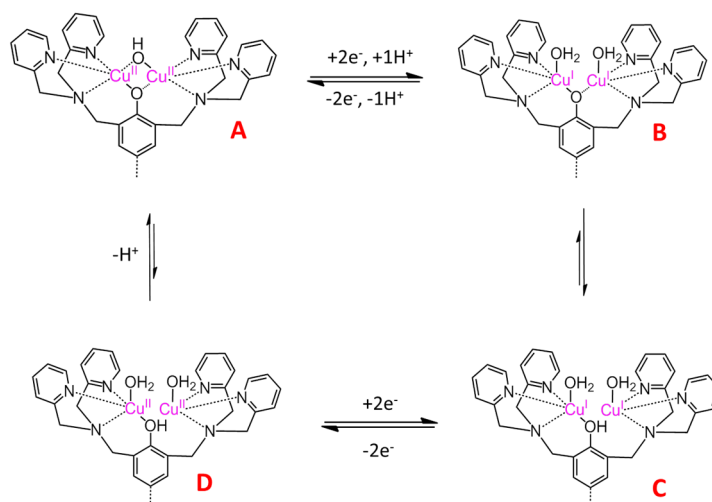


Figure chap.IV-26 : Mécanisme EC pour le complexe dinucléaire $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$.

Ce mécanisme EC devrait être appuyé par des expériences de spectroscopie afin de déterminer la structure des intermédiaires impliqués. Toutefois, nous pouvons postuler que le ligand phénolate, de l'espèce Cu(I) formé après réduction subit une protonation. Cette dernière pourrait conduire à sa décoordination pour former la molécule C, dans laquelle les centres Cu(I) se retrouveraient en géométrie

tétrahédrique. Enfin, l'oxydation de la molécule C en cuivre (II), pour former la molécule D, correspondrait au pic d'oxydation irréversible observé à faible vitesse de balayage à un potentiel $E_{p,ox} = 0,2V$ vs SHE (Figure chap.IV-26).

Ce mécanisme est plus lent à pH basique et donc observé uniquement à faible vitesse de balayage, comme décrit pour le complexe mononucléaire **[Cu(t-Bu,Me)]²⁺**.

III.4 CARACTERISATIONS ELECTROCHIMIQUES EN PRESENCE D'OXYGENE

Nous avons étudié le comportement électrochimique des deux complexes par voltampérométrie cyclique sous argon. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que la formation d'un complexe dinucléaire et d'un dimère de cuivre avait bien lieu à la surface du film de NTC.

Dans cette section, l'électrocatalyse de réduction de l'oxygène sera détaillée pour chaque molécule, avec des expériences d'électrodes à disque tournant et de détection d'intermédiaires réactionnels de type H₂O₂.

III.4.A ELECTROCATALYSE DE REDUCTION D'O₂

La réponse électrochimique observée sous argon pour les deux catalyseurs démontre que les potentiels électrochimiques restent proches, bien que le complexe **[Cu₂(H,Me)₂]⁴⁺** soit plus réversible que **[Cu₂(BTP)]⁴⁺** (Figure chap.IV-27A). De plus, la concentration surfacique calculée est quatre fois plus importante pour le complexe dinucléaire (135 pmol.cm⁻² contre 30 pmol.cm⁻² pour le dimère).

Le comportement catalytique de chaque complexe est mesuré par voltampérométrie cyclique, par barbotage continu d'O₂, dans un électrolyte aqueux à pH5 (Figure chap.IV-27A). La réponse des deux catalyseurs de cuivre est très proche avec des densités de courant maximales de réduction élevées de l'ordre de -5 mA.cm⁻² pour **[Cu₂(BTP)]⁴⁺** et -6 mA.cm⁻² pour **[Cu₂(H,Me)₂]⁴⁺** à -0,4V vs SHE. Les NTCs réduisent également l'oxygène, toutefois le courant est environ deux fois plus faible et le E_{onset} inférieur de 70 mV.

Par ailleurs, l'évolution du potentiel de catalyse en fonction du pH (Figure chap.IV-27B) permet de calculer une dépendance linéaire proche de 30 mV/pH pour chacun des catalyseurs. Ceci est en accord avec une étape de réduction limitante à 2e⁻/1H⁺, comme dans le cas des complexes mononucléaires.

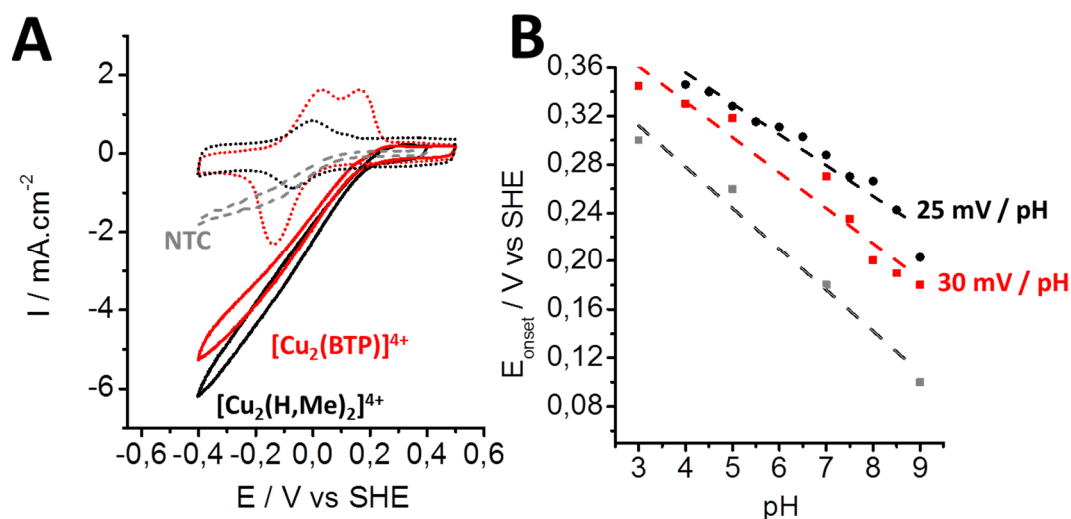


Figure chap.IV-27 : (A) Voltampérométrie cyclique des électrodes de NTC (courbe grise pointillée), NTC/ $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$ (courbe rouge pointillée) et NTC/ $[\text{Cu}_2(\text{H,Me})_2]^{4+}$ (courbe noire pointillée) sous argon et O_2 à pH5 (B) Evolution du potentiel de catalyse, E_{onset} , en fonction du pH et estimation de la pente de la dépendance linéaire pour chaque électrode. Conditions : $10 \text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$; $0,1 \text{M}$ tampon Britton-Robinson à pH = 5.

III.4.B CALCUL DU NOMBRE D'ÉLECTRONS PAR EXPERIENCE D'ÉLECTRODE A DISQUE TOURNANT

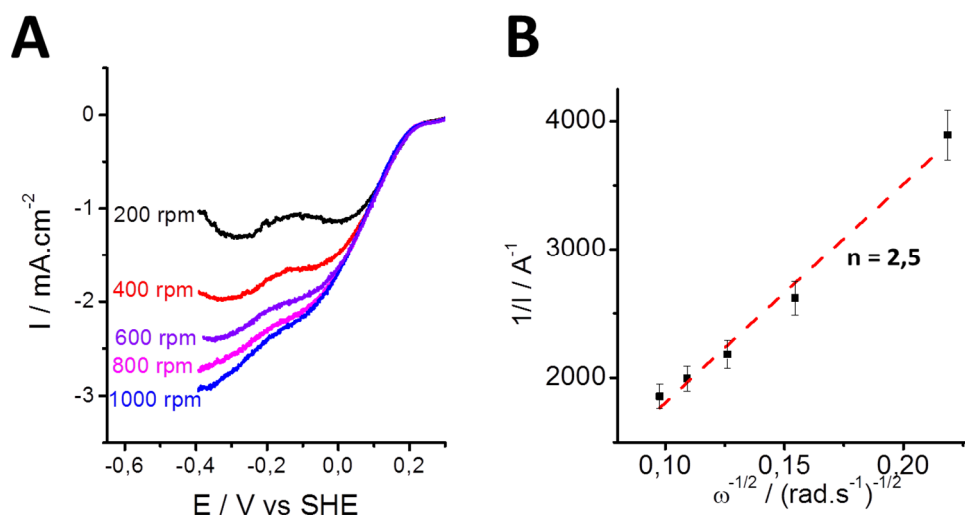


Figure chap.IV-28 : (A) Voltampérométrie de l'électrode tournante NTC/ $[\text{Cu}_2(\text{H,Me})_2]^{4+}$ sous O_2 , à pH5 et différentes vitesses de rotation. (B) Diagramme de Koutecky-Levich associé. Conditions : $10 \text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$; $0,1 \text{M}$ de tampon Britton-Robinson à pH 5.

Afin de déterminer le nombre d'électrons impliqués dans la catalyse, le complexe $\text{NTC}/[\text{Cu}_2(\text{H,Me})_2]^{4+}$ a été immobilisé sur une électrode à disque tournant modifiée par un film de NTC. Le voltampérogramme sous O_2 , présenté en Figure chap.IV-28A, démontre une saturation de la densité de courant catalytique de réduction à $-3 \text{mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ à partir de 1000 rpm. Ainsi, la cinétique est plus rapide que pour les complexes mononucléaires avec lesquels la vitesse maximale atteinte est de

400 rpm. Ceci pourrait notamment s'expliquer par l'implication de deux centres métalliques dans le mécanisme catalytique. La pente de la droite de Koutecky-Levich (Figure chap.IV-28B) permet de calculer un nombre d'électron égal à $2,5 \pm 0,12$.

Concernant le complexe $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$, la saturation intervient à une vitesse de rotation de 1000 rpm à une densité de courant égale. Le nombre d'électrons calculé est de $2,96 \pm 0,25$. Ces valeurs sont similaires à celles obtenues pour les complexes mononucléaires, soulignant un mécanisme d'ORR partiel impliquant $4e^-/4\text{H}^+$.

III.4.C DETECTION DE LA QUANTITE D'INTERMEDIAIRES REACTIONNELS FORMEES

La formation éventuelle de peroxyde d'hydrogène est détectée par électrode à disque-anneau tournante pour les deux complexes (Figure chap.IV-29A). La réduction de l'oxygène au disque engendre la formation d' H_2O_2 , puisque un courant d'oxydation est mesuré à l'anneau (Figure chap.IV-29B). Comme attendu, il est plus élevé pour les NTCs, qui produisent 48% d' H_2O_2 contre 22 % pour le dimère $[\text{Cu}_2(\text{H,Me})_2]^{4+}$ et seulement 6% pour le complexe dinucléaire $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$.

Le complexe $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$ catalyse l'ORR avec un rendement plus élevé que celui de $[\text{Cu}_2(\text{H,Me})_2]^{4+}$. Ce dernier semble moins efficace que les complexes mononucléaires. Ceci pourrait être induit par un encombrement stérique plus important autour des deux centres cuivre via la présence des deux ligands pontants phénolate

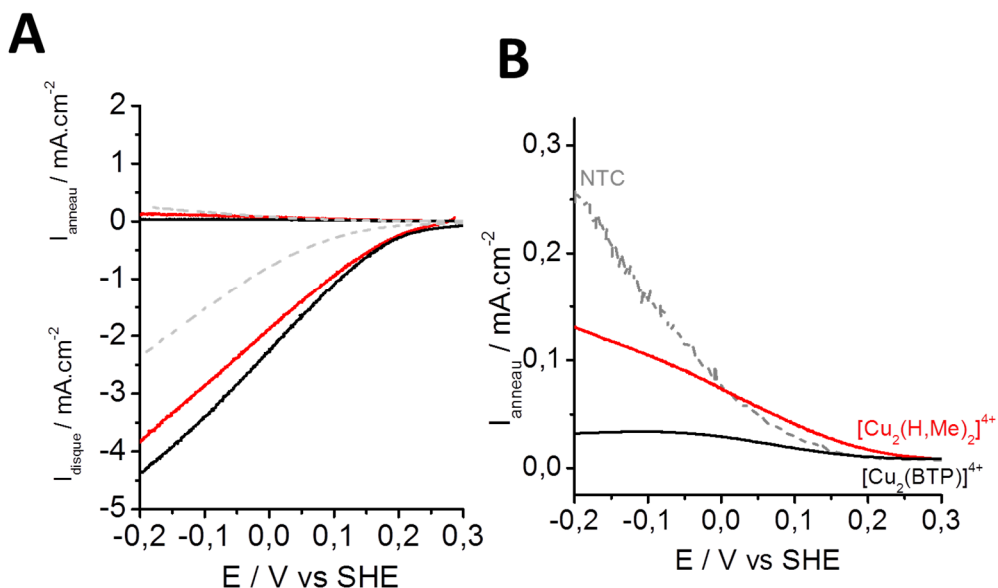


Figure chap.IV-29 : (A) Expérience d'électrode disque-anneau tournante réalisée à pH5 et 1500 rpm pour les électrodes de NTCs (courbe grises pointillée), de NTC/ $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$ (courbe noire) et NTC/ $[\text{Cu}_2(\text{H,Me})_2]^{4+}$ (courbe rouge) (B) Zoom sur le résultat obtenu à l'anneau. Conditions : 10 mV.s^{-1} ; $0,1 \text{ M}$ tampon Britton-Robinson à pH5, potentiel appliqué à l'anneau $0,903 \text{ V}$ vs SHE.

III.5 COMPARAISON DES CATALYSEURS BIO-INSPIRES ET DISCUSSION

Le Tableau chap.IV-2 récapitule les résultats obtenus pour les complexes mono- et dinucléaires.

Complexes	Concentration surfacique / nmol.cm ⁻²	pKa	E _{1/2} (Cu ^{II} /Cu ^I) V vs SHE (pH5)	E _{onset} / V vs SHE (pH5)	Nombre d'électrons impliqués dans la catalyse (pH5)	%(H ₂ O ₂) formé à pH5
[Cu(tBu-Me)] ²⁺	42	2,6	0,05	0,29	3,05 ± 0,20	1
[Cu(tBu-CF ₃)] ²⁺	36	3,2	0,10	0,30	2,35 ± 0,50	5
[Cu ₂ (H,Me) ₂] ⁴⁺	35	6,9	-0,01	0,33	2,50 ± 0,15	22
[Cu ₂ (BTP)] ⁴⁺	130	4,5	-0,11	0,32	2,96 ± 0,25	6,1

Tableau chap.IV-2 : Récapitulatif des différents résultats obtenus pour les deux catalyseurs mononucléaires et dinucléaires ainsi que pour les NTCs.

La concentration surfacique est 3 fois plus importante pour le complexe dinucléaire [Cu₂(BTP)]⁴⁺. Ceci est en accord avec le fait que la présence de deux sites de coordination sur le ligand BTP induit une plus grande affinité de liaison pour le Cu(II) en solution dont l'adsorption suit vraisemblablement un isotherme de Langmuir.

Le potentiel électrochimique, E_{1/2} du couple Cu^{II}/Cu^I, est influencé par la sphère de coordination du métal (Figure chap.IV-30A). Un groupement électroattracteur aura tendance à augmenter le E_{1/2} vers les potentiels positifs et inversement. Ainsi, le complexe [Cu(t-Bu,CF₃)]²⁺ a le potentiel électrochimique le plus élevé après son homologue [Cu(t-Bu,Me)]²⁺. Avec le ligand (H,Me), les effets stériques et électrodonneurs du t-Bu en ortho du phénol sont supprimés, un dimère stable est formé, et le potentiel de réduction diminue. Enfin cette évolution vers les potentiels négatifs s'accroît avec le complexe dinucléaire [Cu₂(BTP)]⁴⁺.

Le potentiel de catalyse E_{onset} semble peu dépendant du nombre de centres métalliques, il est compris entre 0,32 et 0,33 V vs SHE (0,62-0,63 V vs RHE) pour le dimère et le dinucléaire et entre 0,29 et 0,30 V vs SHE (0,59-0,60 V vs RHE) pour les complexes mononucléaires (Figure chap.IV-30B). Ainsi, la présence de deux atomes de cuivre a une influence légère sur la surtension minimale, liée à une sphère de coordination assez similaire. Par ailleurs, E_{onset} est de 300 à 400 mV plus élevée que E_{1/2} dans le cas des complexes dinucléaires, ce qui signifie que l'espèce catalytique ne semble pas être le système redox réversible observé en voltampérométrie cyclique. Dans les quatre cas, la vague de réduction catalytique de l'oxygène débute à un potentiel proche du pic d'oxydation

Comparé à la littérature, le potentiel de catalyse de [Cu₂(BTP)]⁴⁺ est faible. En effet, un complexe dinucléaire composé de ligands tris(2-pyridyl-méthyl)amine réalise l'ORR à

+ 0,86V vs RHE ; un complexe de cuivre tétranucléaire immobilisé sur oxyde de graphène réduit O₂ à +0,95V vs RHE.²⁹³ Toutefois, ces derniers fonctionnent à un pH optimal de 14, ce qui est trop élevé pour envisager leur intégration dans une PEMFC.

La concentration surfacique est 3 fois plus importante pour le complexe dinucléaire **[Cu₂(BTP)]⁴⁺**, ce qui corrèle avec la présence de deux atomes de cuivre par ligand à la surface de l'électrode de NTC. Les pK_a sont du même ordre de grandeur pour les deux complexes mononucléaires : la valeur la plus élevée pour le complexe **[Cu(t-Bu,CF₃)]²⁺** est liée à l'effet inductif électroattracteur -I porté par le -CF₃.

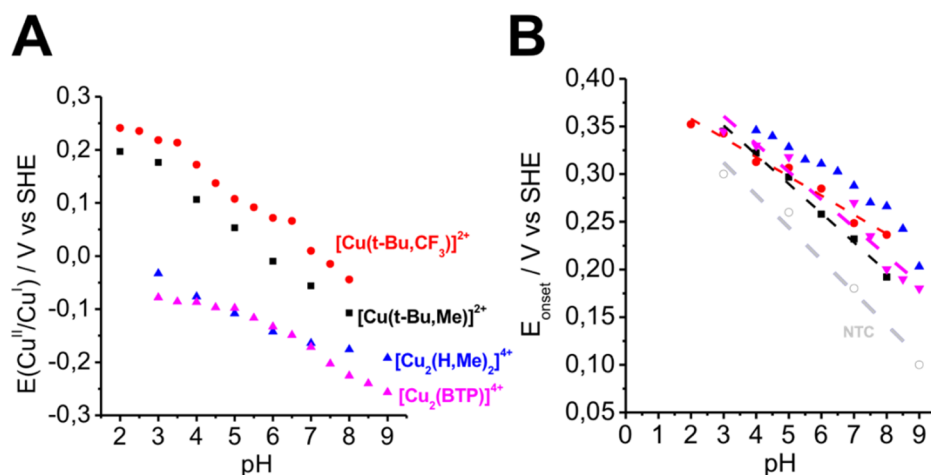


Figure chap.IV-30 : Evolution du potentiel électrochimique (A) et du potentiel de catalyse (B) en fonction du pH pour les 4 catalyseurs bio-inspirés.

Le nombre d'électrons impliqués dans la catalyse a été obtenu par électrode à disque tournant. Il est compris entre 2,3 et 3, ce qui corrèle avec une réaction limitante à $2e^- + 1H^+$ passant par la formation d'un intermédiaire peroxyde sur le centre métallique. Enfin, la production d'H₂O₂ reste assez faible dans les quatre cas. Finalement, les quatre catalyseurs réduisent l'oxygène en eau et la surtension minimale varie de 600 mV pour les espèces dinucléaires à 630 mV pour les mononucléaires.

Ces différentes caractérisations tendent à montrer que l'espèce catalytique est proche que ce soit pour les mono- ou les dinucléaires. Ceci va dans le sens de la formation d'une espèce intermédiaire dinucléaire, même dans le cas des complexes **[Cu(t-bu,CF₃)]²⁺** et **[Cu(t-Bu,Me)]²⁺**. Ceci a déjà été démontré par Chidsey et al. pour des catalyseurs de Cu(II) à base de ligands phénanthrolines.²⁹⁰ Les performances catalytiques supérieures dans le cas des espèces dinucléaires pourraient être ainsi induites par la position favorable à la surface des NTCs de deux centres cuivre pour former un intermédiaire catalytique de type μ -peroxy. Finalement, le complexe dinucléaire **[Cu₂(BTP)]⁴⁺** réduit l'oxygène en eau avec une densité de courant de réduction maximale 1,5 fois plus élevée, au potentiel de catalyse le plus important. Ce catalyseur a donc été choisi pour être intégré dans la première pile biomimétique à base de catalyseurs moléculaires.

IV. ELABORATION D'UNE PILE BIOMIMETIQUE

IV.1 INTRODUCTION

Dans les précédents chapitres, nous avons mis en évidence l'importance du remplacement des catalyseurs à base de platine dans les PEMFCs. Le complexe de nickel mononucléaire $[\text{Ni}(\text{Cy}, \text{Arg})]^{8+}$,¹⁰¹ bio-inspiré des hydrogénases, est un excellent catalyseur d'oxydation d' H_2 sur une large gamme de pH. Il a révélé des performances exceptionnelles lors de son intégration dans une PEMFC et dans une pile hybride bio-inspirée, associée à une cathode enzymatique. Ainsi, le remplacement du platine et de l'enzyme à la cathode passent par l'utilisation d'un catalyseur moléculaire bio-inspiré du site actif des enzymes à cuivre

Dans un premier temps, nous caractériserons le complexe de cuivre dinucléaire en demi-pile lorsqu'il est immobilisé sur un feutre de carbone recouvert par un film de NTC. Dans un second temps, les résultats obtenus pour la pile biomimétique seront décrits, puis comparés à la littérature.

IV.2 CATHODE BIO-INSPIREE A BASE DE COMPLEXES DE CUIVRE DINUCLEAIRES

Comme énoncé dans le chapitre 2, le feutre de carbone est modifié par un film de NTC après drop-coating d'une goutte de suspension sur l'électrode et séchage sous vide. Une surface d'active de $0,071 \text{ cm}^2$ est ainsi obtenue. Le complexe de cuivre dinucléaire $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$ est construit par synthèse bottom-up à la surface de l'électrode (Figure chap.IV-31A).

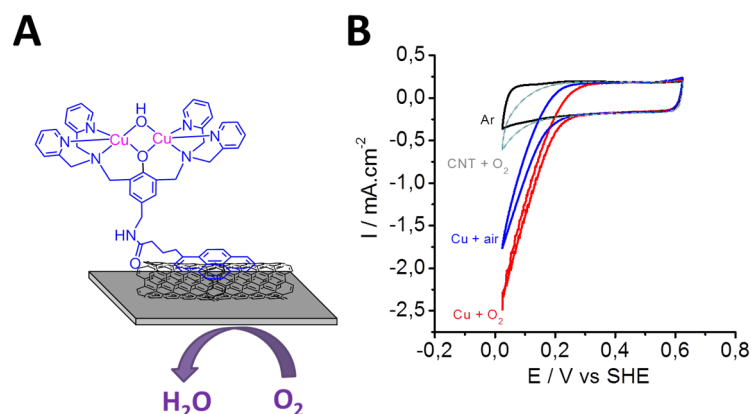


Figure chap.IV-31 : (A) Schéma de la cathode bio-inspirée, complexe $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$ immobilisé sur un feutre de carbone, modifié par un film de NTC, catalysant la réduction de l'oxygène en eau. (B) Voltampérométrie cyclique de l'électrode GDL/NTC/ $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$ sous argon (courbe noire), air (courbe bleue) et O_2 (courbe rouge) et de l'électrode GDL/NTC sous O_2 . Conditions : $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; 0.1 M tampon Britton-Robinson à pH4 ; flux continu d' O_2 et d'air comprimé avec une pression constante de 3 bar.

La réponse électrochimique obtenue est présentée sur le voltampérogramme cyclique de la Figure chap.IV-31B. Sous flux continu d'O₂, une densité de courant de réduction maximale de -2,5 mA.cm⁻² est obtenue à 0V vs SHE, pH4 et température ambiante. Afin d'éviter les risques de mélange de gaz explosifs, la pile sera alimentée par un flux d'air comprimé. Dans ces conditions, le courant diminue pour atteindre une valeur de -1,75 mA.cm⁻² à 0 V vs SHE La réponse obtenue pour l'électrode de NTC seule est très limitée, puisque la vague catalytique de réduction n'excède pas -0,5 mA.cm⁻² à 0 V vs SHE La cathode sera l'électrode limitant les performances de la pile, puisque le courant d'oxydation maximal à l'anode est de 4 mA.cm⁻².

IV.3 RESULTATS OBTENUS

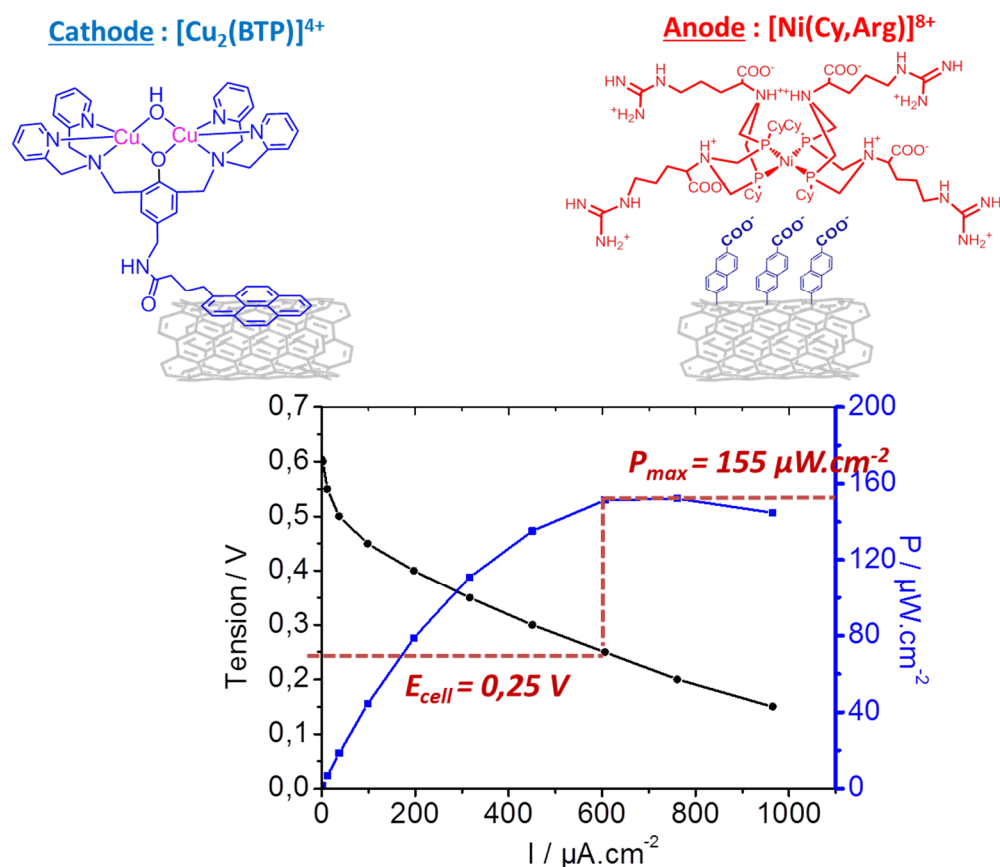


Figure chap.IV-32 : Courbes de polarisation et de puissance obtenues pour la pile biomimétique H₂/Air [Ni(Cy,Arg)]⁸⁺/[Cu₂(BTP)]⁴⁺ à pH4 et température ambiante. Conditions : décharge galvanostatique pendant 30s, flux continu d'air comprimé et d'H₂ avec des pressions constantes respectives de 3 et 1,5bar.

Les courbes de polarisation et puissance pour la pile biomimétique H₂/air sont présentées en Figure chap.IV-32. Les deux catalyseurs sont immobilisés sur des électrodes de GDL modifiées par un film de NTC, placés dans la pile à combustible et séparés par un tampon Britton-Robinson à pH4. Comme dans le cas de la pile hydride [Ni(Cy,Arg)₂]:MvBOD, une chambre en téflon entre l'anode et la cathode est remplie avec l'électrolyte. La force électromotrice, égale à 0,6V, est relativement faible,

due à la surtension importante du complexe de cuivre (environ 600 mV). Par ailleurs, la pente de la courbe de polarisation est élevée dans la zone d'activation, comprise entre 0 et 100 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, attribuée à une perte énergétique importante. La puissance maximale est de 155 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à une tension de 0,25V. La pile n'est pas limitée par le transport de masse, puisque cette zone n'est pas atteinte sur la courbe de polarisation

Même si les NTCs réduisent l' O_2 , leur utilisation en tant que cathode ne s'est pas révélée concluante, une puissance maximale sept fois plus faible est obtenue (23 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$). Les performances de notre pile biomimétique ne sont donc pas portées par le film de NTC. La pile sans aucun catalyseur à l'anode et à la cathode donne une puissance proche de 0 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Tableau chap.IV-3).

Piles à pH4	f.e.m (V)	Pmax / $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$	Tension / V
NTC:NTC	0,28	0,15	0,15
NTC:[Ni(Cy,Arg)] ²⁺	0,44	23	0,15
[Cu ₂ (BTP)] ⁴⁺ :NTC	0,40	16	0,20
[Cu ₂ (BTP)] ⁴⁺ :[Ni(Cy,Arg)] ²⁺	0,6	160	0,25

Tableau chap.IV-3 : Récapitulatif des résultats obtenus avec plusieurs types de piles à pH4.

Lorsqu'une membrane de nafion est placée entre l'anode et la cathode, aucune f.e.m n'est obtenue sur le potentiostat, ce qui signifie qu'il n'y a aucun contact entre les deux électrodes. Contrairement à [Ni(Cy,Arg)]⁸⁺, le complexe de cuivre n'est pas stable en présence d'un électrolyte solide. Dans le cas du catalyseur cathodique, l'ORR est régi par des échanges avec l'électrolyte de type échange de ligands par exemple, ou stabilisation d'intermédiaires réactionnels via la formation de liaisons hydrogènes.

Malgré ces performances, cette pile biomimétique H₂/air est l'une des premières composées uniquement de catalyseurs moléculaires à l'anode et à la cathode, surpassant les performances des précédentes piles moléculaires. Une pile composée de catalyseurs de Ni/Ru délivre une faible puissance maximale de 11 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ avec une f.e.m de 0,3V.³¹³ De plus, une PEMFC à base d'un complexe de Dubois à l'anode et d'une cathode de Co/N-C donne une puissance maximale de 23 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ avec une f.e.m de 0,74V.³¹⁵

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ce chapitre, nous avons immobilisé deux complexes de cuivre mononucléaire, mime de la galactose oxydase, et dinucléaires bio-inspirés de la PPO, sur électrodes de NTCs. Leur étude par électrochimie en absence d'oxygène a révélé un système rédox réversible, pour le couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$, dont $E_{1/2}$ évolue avec la première sphère de coordination. Ainsi, le potentiel électrochimique du complexe mononucléaire $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{CF}_3)]^{2+}$ est 200 mV supérieur au $E_{1/2}$ de $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$. En présence d'oxygène, ces complexes réduisent l'oxygène en eau par un mécanisme à $2+2e^-$. Le potentiel de catalyse est légèrement plus élevé pour les complexes dinucléaires (+0,63V vs SHE), mais leur grande surtension minimale (600 mV) rend ces catalyseurs peu efficaces. Cependant, les quantités de peroxyde d'hydrogène formées (1-20%) sont très faibles, comparées aux complexes de cuivre de la littérature.

L'intégration du complexe de cuivre dinucléaire dans une pile H_2/air bio-inspirée a permis d'atteindre une puissance maximale de $160 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, valeur jamais rapportée jusqu'à présent. Un gap reste encore à franchir avant de se rapprocher des performances des MCOs, qui ont la particularité de réduire O_2 avec une surtension minimale inférieure à 150 mV. La synthèse de nouveaux complexes tri- ou tétranucléaires, bio-inspirés du cluster trinucéaire des MCOs, pourrait permettre de se rapprocher des performances de ces enzymes et de proposer une véritable alternative.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'hydrogène et l'oxygène sont deux gaz dont les réactions d'oxydation et de réduction sont mises en jeu dans une pile à combustible à hydrogène afin de transformer l'énergie chimique en énergie électrique. De nos jours, les PEMFC ont des applications stationnaires et dans le transport avec les voitures à hydrogène. A terme, l'utilisation du platine, métal noble et coûteux en tant que catalyseur, devra être repensée afin de diminuer les coûts de production à grande échelle de ces piles. Aujourd'hui, les alternatives au platine sont nombreuses, mais la plupart d'entre elles font appel à d'autres métaux nobles, notamment pour l'élaboration de certains alliages.

L'objectif de ce travail de doctorat était de proposer de nouveaux concepts de piles à combustible H₂/air associant des enzymes et des catalyseurs moléculaires bio-inspirés à l'anode et à la cathode. Cette thèse s'est articulée autour de deux axes distincts : (1) l'oxydation d'H₂ par un complexe de nickel bio-inspiré des enzymes hydrogénases ; (2) la réduction de l'oxygène par les laccases et des complexes de cuivre mono- et dinucléaires bio-inspirés. Pour mener à bien ces travaux, j'ai mis en œuvre mes compétences en électrochimie et chimie des NTCs, afin de proposer de nouvelles méthodes de fonctionnalisation de surface via des interactions électrostatiques, hydrophobes et covalentes. A la fin de chaque chapitre, une pile H₂/air a été proposée en fonction des éléments développés en amont.

Le chapitre I est une étude bibliographique traitant des piles à combustible à hydrogène et des différentes alternatives au platine, autres que les catalyseurs moléculaires. La quantité de platine utilisée à la cathode étant cinq fois plus importante qu'à l'anode, les recherches se focalisent sur les catalyseurs pour l'ORR. Malgré une surtension de l'ordre de 300 mV, les matériaux carbonés dopés à l'azote et aux métaux (M-N/C) de type Fe-N/C ou Co-N/C, formés par pyrolyse, restent les plus prometteurs.

Dans un second temps, j'ai choisi de développer séparément les enzymes et catalyseurs bio-inspirés pour l'oxydation d'H₂ et la réduction de l'oxygène. Les hydrogénases oxydent réversiblement H₂ en protons à des surtensions faibles et fréquences catalytiques de cycles élevées. Les chimistes ont tiré profit de leurs fonctions en proposant des catalyseurs biomimétiques et bio-inspirés de leur site actif. Un certain nombre d'entre eux ont été présentés dans ce premier chapitre : le premier constat est qu'ils catalysent majoritairement la réduction des protons, mais que peu effectuent la réaction inverse. De plus, ils sont insolubles en solvant aqueux. Toutefois, les complexes de nickel mononucléaires de DuBois se démarquent par la possibilité de moduler le biais catalytique en fonction des groupements chimiques présents dans la sphère de coordination interne et externe. Par ailleurs, l'équipe de Wendy Shaw, avec qui nous avons collaboré, a mis récemment au point des complexes de nickel entourés d'acides aminés capables d'oxyder H₂ en solvant aqueux à des surtensions inférieures à 200 mV. Parmi eux, je me suis intéressée au complexe **[Ni(Cy,Arg)₂]**, dont les deux ligands diphosphines comprenant deux résidus arginines qui jouent le rôle de relais de protons jusqu'au centre métallique nickel.

Pour cela, j'ai tenu à décrire les techniques de fonctionnalisation spécifiques aux NTCs et les problématiques de connexions et orientations enzymatiques sur électrodes, avant

de détailler un certain nombre de références bibliographiques de catalyseurs bio-inspirés immobilisés catalysant l'ORR et l'HOR.

Le chapitre II a été consacré à l'immobilisation du catalyseur de nickel $[\text{Ni}(\text{Cy},\text{Arg})_2]$ sur électrodes de NTCs. Ces nanomatériaux carbonés ont été choisis en tant que support d'électrodes grâce à : (1) leur grande surface spécifique permettant d'immobiliser un grand nombre de molécules ; (2) la faisabilité de fonctionnalisation de la paroi des NTCs, afin de greffer les catalyseurs via diverses interactions covalentes ou non ; (3) au dépôt du film de NTCs par drop-casting sur tout type de substrats (or, carbone vitreux...). Ainsi, le complexe de nickel a été immobilisé par interactions électrostatiques sur un film de NTCs monofeuillet, modifié par des groupements acide 2-naphtöique (SWnCOOH). Les charges négatives à la surface des NTCs interagissent avec les nombreuses charges positives présentes sur le complexe de nickel. Ce dernier est capable d'oxyder H_2 sur une large gamme de pH, avec une activité optimale à pH 0,3 atteignant des densités de courant de l'ordre de $18 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$. Par ailleurs, le modèle de F.Armstrong, initialement décrit pour l'adsorption d'hydrogénases, a été adapté à ce catalyseur moléculaire. Les résultats expérimentaux corrént parfaitement avec le modèle, ce qui a permis de calculer des fréquences catalytiques de cycle pour chaque pH (121 s^{-1} à pH 0,3). Un banc de tests pour les piles à combustible a été mis au point au laboratoire avec l'aide de notre ingénieur d'étude Yannig Nedellec. Composé de barboteurs, les gaz d' H_2 et d'air comprimé sont chauffés et humidifiés avant leur entrée dans la pile à hydrogène. Ainsi, une PEMFC composée d'électrodes de Pt/C à l'anode et à la cathode a été mise au point : une densité de puissance de $94 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ et une f.e.m de 1V ont été mesurées. Lorsque le complexe de nickel est présent à l'anode (avec une électrode de platine à la cathode), la densité de puissance est de $14 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, valeur seulement six fois inférieure à la pile Pt/Pt. Cela valide l'utilisation de ce catalyseur en tant qu'alternative au platine dans les PEMFC, avec une quantité en complexe de nickel moindre égale à $0,3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (contre $1 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ de platine dans les électrodes Pt/C).

Le chapitre III est focalisé sur l'étude de biocathodes enzymatiques pour la réduction du dioxygène en eau. Les enzymes à cuivre de la famille des « multicopper oxydases » possèdent un site actif dit T1 et T2/T3, composé de quatre cuivres de degré d'oxydation +II. La réduction de l'oxygène s'effectue au niveau du T2/T3 à un potentiel de l'ordre de 1,1 V vs RHE pour les MCOs les plus performantes. J'ai travaillé, en collaboration avec l'équipe du Dr. Thierry Tron à Marseille, sur la connexion enzymatique par greffage covalent de la **laccase *Trametes sp. 30*** et de son mutant **UniK161**. Les deux enzymes étudiées, Lac3-alcyne et UniK161-alcyne, possèdent respectivement deux fonctions alcynes proches du site T2/T3 et une seule fonction proche du site T1. Les protéines ont été greffées par cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen sur électrodes de NTCs modifiés par des fonctions azidobenzènes. L'enjeu était de comprendre les mécanismes régissant l'orientation enzymatique en faisant varier les acides aminés et en ajoutant des groupements chimiques autour du site actif. Lorsque la couche d'azido(polyphénylène) est greffée de façon spontanée à la surface de l'électrode, un transfert électronique direct entre le site actif de l'enzyme et de l'électrode est observé. En présence d' O_2 , l'enzyme **Lac3-alcyne** réduit l'oxygène en

eau. avec une bonne densité de courant de l'ordre de $-2,2 \text{ mA.cm}^{-2}$ à $1,1\text{V}$ vs RHE, contre $-1,8 \text{ mA.cm}^{-2}$ pour **UniK161-alcyne**. Par ailleurs, le nombre de fonction alcyne présente dans la coque protéique influence la quantité d'enzyme à la surface de l'électrode. Ceci a été mis en évidence grâce au calcul de la concentration surfacique en enzyme en intégrant le courant faradique du pic d'oxydation correspondant au T1, mais également par microbalance à cristal de quartz. Globalement, environ 1,5 fois plus d'enzymes **Lac3-alcyne** sont présentes à la surface de l'électrode, ce qui peut expliquer sa plus grande efficacité catalytique. Les techniques électrochimiques dont nous disposons ne nous ont pas permis de trancher quant à l'orientation enzymatique préférentielle vers le T1 ou le T2/T3. Pour ce faire, des techniques de caractérisations plus poussées telles que la spectroélectrochimie devront être envisagées.

En parallèle, j'ai travaillé sur l'élaboration de deux biocathodes enzymatiques H_2/air . La première associe l'hydrogénase thermophile **Aquifex aeolicus MbH1** et la **bilirubine oxydase** thermostable de **Bacillus Pumilus**, toutes deux immobilisées sur électrodes de feutre de carbone recouvertes par un film de NTC. C'est la première fois que cette configuration, ayant pour vocation de s'astreindre des limites de diffusion par le transport de masse, est utilisée pour une telle biopile. Ainsi, une densité de puissance de $1,8 \text{ mW.cm}^{-2}$ avec une f.e.m de $0,95\text{V}$ a été mesurée à 45°C et à $\text{pH}7.6$. La seconde pile est un nouveau concept de pile hybride enzymatique/bio-inspirée, qui intègre le complexe de nickel $[\text{Ni}(\text{Cy},\text{Arg})]^{8+}$ à l'anode et l'enzyme **bilirubine oxydase de Myrothecium verrucaria** à la cathode. Une densité de puissance de $1,85 \text{ mW.cm}^{-2}$ et une f.e.m de 1V sont ainsi obtenues à $\text{pH}5$ et température ambiante. Ces deux piles sont parmi les plus puissances de la littérature à ce jour. L'utilisation d'un complexe bio-inspiré à la place de l'hydrogénase permet notamment de travailler sur une plus grande gamme de pH sans chauffer la pile. L'étude de chaque électrode en demi-pile met en évidence le fait que la surtension est uniquement de 10 mV pour le complexe de nickel contre 150 mV pour l'hydrogénase **MbH1**, ce qui confirme l'un des avantages de l'utilisation de complexes bio-inspirés.

Le chapitre IV a concerné l'élaboration de cathodes bio-inspirées à base de complexes de cuivre mono- et dinucléaires, mime du site actif de la galactose oxydase et de la polyphénol oxydase, pour la réduction de l'oxygène. Trois complexes mononucléaires, composés d'un centre métallique de cuivre (II) coordonné à un ligand tripode 2-pyridylméthylamine et à un ligand phénolate ont été étudiés : $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{Me})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{t-Bu},\text{CF}_3)]^{2+}$ et $[\text{Cu}_2(\text{H},\text{Me})_2]^{4+}$. La variation de la sphère de coordination en ortho du ligand phénoxy et sur une des pyridines du ligand tripode a permis : (1) de moduler le potentiel électrochimique du couple $\text{Cu(II)}/\text{Cu(I)}$ en fonction des effets donneurs et attracteurs d'électrons ; (2) la formation d'un dimère de cuivre via la substitution du t-Bu en ortho du phénol par un hydrogène. Un complexe dinucléaire de cuivre, noté $[\text{Cu}_2(\text{BTP})]^{4+}$ a également été caractérisé. Chacun des catalyseurs a été construit par synthèse bottom-up sur électrode de NTCs puis caractérisé en présence d' O_2 . Leur comportement catalytique reste assez proche. Des expériences de RDE et RRDE ont permis de confirmer qu'ils réduisent tous l'oxygène en eau par un mécanisme à $2+2e^-$ avec une surtension assez élevée de l'ordre de 600 mV . La réduction n'est donc pas totale et passerait par la formation d'un

intermédiaire réactionnel, de type hydropéroxo-, puisqu'une certaine quantité de peroxyde d'hydrogène (1 à 20 %) est libérée. De plus, l'espèce catalytique serait une espèce cuivre (I) coordonné à un ligand phénoxy, ce qui laisserait une vacance libre pour la liaison de la molécule d'O₂ au centre métallique. Ces hypothèses devront être élucidées en vue de proposer un mécanisme catalytique fiable, grâce à des expériences de spectroélectrochimie. En outre, il serait intéressant d'étudier le comportement de ces différents complexes en solution afin de voir si la présence d'oxygène régit la formation d'un dimère de cuivre (I)

Le complexe dinucléaire [Cu₂(BTP)]⁴⁺a été intégré à la cathode de la première pile H₂/air à base de catalyseurs moléculaires, l'anode étant composée du complexe de nickel [Ni(Cy,Arg)₂]. Une densité de puissance de 160 μW.cm⁻² et une f.e.m de 0,7V ont été mesurées à pH4 et température ambiante. Ces résultats semblent faibles par rapport aux précédentes piles proposées, dus en grande partie au complexe de cuivre, qui a une surtension élevée de 600 mV.

En résumé, ce travail de thèse démontre que les catalyseurs moléculaires sont compétitifs vis-à-vis des réactions d'HOR et d'ORR. Contrairement aux enzymes, ils assurent une plus grande stabilité et peuvent être plus facilement synthétisés à grande échelle. Ce point s'applique principalement au complexe de nickel qui s'est révélé beaucoup plus performant que l'hydrogénase *Aquifex aeolicus* en termes de densité de courant maximale, stabilité et surtension. Néanmoins, un travail d'optimisation reste à faire pour élaborer des catalyseurs bio-inspirés des MCOs qui fonctionneront à des surtensions aussi faibles. En effet, l'ORR implique un mécanisme à 4H⁺ + 4e⁻, parfaitement rôdé dans l'enzyme qui fait appel à quatre cuivres pour catalyser cette réaction. De nombreux complexes tétranucléaires ont été décrits dans la littérature mais aucun d'entre eux n'a une réactivité égalable aux MCOs.

Les perspectives viseront principalement la réaction de réduction de l'oxygène afin de diminuer cette surtension de 600 mV. Nous avons mis en évidence que la substitution d'un groupement chimique dans la sphère de coordination et que l'utilisation d'un complexe dinucléaire n'étaient pas suffisantes. C'est pourquoi, l'élaboration de nouveaux ligands et complexes devra être entreprise. Ce travail de doctorat a mis en avant que la synthèse bottom-up de complexes métalliques pouvait facilement être réalisée à la surface d'électrodes de NTCs. Cette technique laisse un nombre incalculable de possibilités pour élaborer tous types de catalyseurs avec d'autres métaux non-nobles tels que le fer, le cobalt et d'autres ligands plus complexes. De plus, cette méthode évite la purification du complexe métallique, étape pouvant s'avérer difficile au cours de la synthèse chimique. Par ailleurs, l'élaboration de structures d'électrodes à base de plateformes RAFT avec des ligands positionnés de façon optimale conduirait au contrôle de la sphère de coordination sur la surface.

En ce qui concerne le greffage covalent de la **laccase *Trametes sp. 30*** et la compréhension de l'orientation de l'enzyme via les sites T1 ou T2/T3, l'ingénierie mise en place par le Dr. Thierry Tron permettra bientôt de purifier des mutants avec des acides aminés modifiés autour du T1 et T2/T3 dans le but de moduler le potentiel rédox

de l'enzyme. Ceci permettrait de comprendre plus en détails les mécanismes de transferts d'électrons. Par ailleurs, des études théoriques sont actuellement en cours.

Enfin, l'amélioration des performances de la pile hybride enzymatique/bio-inspirée passera par la nanostructuration encore plus complexe du support d'électrodes, afin de repousser les limites de diffusion au sein de la surface catalytique. En s'inspirant des techniques de gravure en microélectronique, il serait envisageable d'élaborer un substrat avec une taille de pores contrôlée. Les nanotubes de carbone, ou tous autres matériaux conducteurs, seraient alors déposés par impression jet d'encre sur cette surface poreuse. Une autre solution serait l'association de nanofibres et microfibrilles de carbone pour former un film conducteur poreux.

Références

- (1) Nation Unies. Protocole de Kyoto à la convention-cadre des nations unies sur les changements climatiques; 1998.
- (2) Réseau de transport d'électricité. 2015 Bilan électrique; 2015.
- (3) Centre National de la Recherche Scientifique. Focus L'énergie; 2015; p 16.
- (4) De Poulpiquet, Anne. Biopiles enzymatiques H₂-O₂ : Nanostructuration de l'interface électrochimique pour l'immobilisation des enzymes rédox, Université Aix Marseilles, 2014.
- (5) Conversion du gaz naturel <http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/Axes-de-recherche/Hydrocarbures-responsables/Raffinage-petrochimie-un-secteur-en-pleine-mutation/Conversion-du-gaz-naturel> (accessed Apr 4, 2017).
- (6) Université de Corse, Laboratoire Sciences pour l'environnement. La plateforme MYRTE http://myrte.univ-corse.fr/La-plateforme_a4.html (accessed Feb 25, 2017).
- (7) Schönbein, C. F. *Philos. Mag. Ser. 3* **1839**, 14 (85), 43.
- (8) Grove, W. R. *Philos. Mag. Ser. 3* **1839**, 14 (86–87), 127.
- (9) SymbioFcell. Kangoo H₂ ZE http://www.symbiofcell.com/vehicules_fr/kangooze-h2-fr/ (accessed Feb 27, 2017).
- (10) Jaouen, F.; Proietti, E.; Lefèvre, M.; Chenitz, R.; Dodelet, J.-P.; Wu, G.; Chung, H. T.; Johnston, C. M.; Zelenay, P. *Energy Env. Sci* **2011**, 4 (1), 114.
- (11) Holton, O. T.; Stevenson, J. W. *Platin. Met. Rev.* **2013**, 57 (4), 259.
- (12) Kongkanand, A.; Mathias, M. F. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, 7 (7), 1127.
- (13) Jaksic, J. M.; Ristic, N. M.; Krstajic, N. V.; Jaksic, M. M. *Int. J. Hydrog. Energy* **1998**, 23 (12), 1121.
- (14) Seh, Z. W.; Kibsgaard, J.; Dickens, C. F.; Chorkendorff, I.; Nørskov, J. K.; Jaramillo, T. F. *Science* **2017**, 355 (6321), eaad4998.
- (15) Greeley, J.; Stephens, I. E. L.; Bondarenko, A. S.; Johansson, T. P.; Hansen, H. A.; Jaramillo, T. F.; Rossmeisl, J.; Chorkendorff, I.; Nørskov, J. K. *Nat. Chem.* **2009**, 1 (7), 552.
- (16) Gasteiger, H. A.; Kocha, S. S.; Sompalli, B.; Wagner, F. T. *Appl. Catal. B Environ.* **2005**, 56 (1–2), 9.
- (17) Stephens, I. E. L.; Bondarenko, A. S.; Perez-Alonso, F. J.; Calle-Vallejo, F.; Bech, L.; Johansson, T. P.; Jepsen, A. K.; Frydendal, R.; Knudsen, B. P.; Rossmeisl, J.; Chorkendorff, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (14), 5485.
- (18) Zhang, J.; Lima, F. H. B.; Shao, M. H.; Sasaki, K.; Wang, J. X.; Hanson, J.; Adzic, R. R. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109 (48), 22701.
- (19) Antolini, E. *Energy Environ. Sci.* **2009**, 2 (9), 915.
- (20) Tigreat, D. Les techniques de production de l'hydrogène et les risques associés; Rapport d'étude DRA-08-95313-07833B; Ineris: Verneuil en Halatte, 2008.
- (21) Böhm, H.; Pohl, F. A. *Wiss Ber AEG-Telefunken* **1968**, 41, 46.
- (22) Ham, D. J.; Lee, J. S. *Energies* **2009**, 2 (4), 873.
- (23) Nagai, M.; Yoshida, M.; Tominaga, H. *Electrochimica Acta* **2007**, 52 (17), 5430.
- (24) Izhar, S.; Yoshida, M.; Nagai, M. *Electrochimica Acta* **2009**, 54 (4), 1255.
- (25) Izhar, S.; Nagai, M. *J. Power Sources* **2008**, 182 (1), 52.
- (26) Shao, M.; Chang, Q.; Dodelet, J.-P.; Chenitz, R. *Chem. Rev.* **2016**, 116 (6), 3594.
- (27) Jaouen, F.; Herranz, J.; Lefèvre, M.; Dodelet, J.-P.; Kramm, U. I.; Herrmann, I.; Bogdanoff, P.; Maruyama, J.; Nagaoka, T.; Garsuch, A.; Dahn, J. R.; Olson, T.; Pylypenko, S.; Atanassov, P.; Ustinov, E. A. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, 1 (8), 1623.
- (28) Lefèvre, M.; Proietti, E.; Jaouen, F.; Dodelet, J.-P. *Science* **2009**, 324 (5923), 71.
- (29) Wood, T. E.; Tan, Z.; Schmoeckel, A. K.; O'Neill, D.; Atanasoski, R. J. *Power Sources* **2008**, 178 (2), 510.

- (30) Barkholtz, H. M.; Chong, L.; Kaiser, Z. B.; Xu, T.; Liu, D.-J. *Int. J. Hydrog. Energy* **2016**, 41 (47), 22598.
- (31) Wu, G.; More, K. L.; Johnston, C. M.; Zelenay, P. *Science* **2011**, 332 (6028), 443.
- (32) Holby, E. F.; Zelenay, P. *Nano Energy* **2016**, 29, 54.
- (33) Vignais, P. M.; Billoud, B.; Meyer, J. *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, 25 (4), 455.
- (34) Lubitz, W.; Ogata, H.; Rüdiger, O.; Reijerse, E. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (8), 4081.
- (35) Artero, V.; Fontecave, M. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, 249 (15–16), 1518.
- (36) Albracht, S. P. J. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1994**, 1188 (3), 167.
- (37) Higuchi, Y.; Yasuoka, N.; Kakudo, M.; Katsube, Y.; Yagi, T.; Inokuchi, H. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262 (6), 2823.
- (38) Volbeda, A.; Charon, M.-H.; Piras, C.; Hatchikian, E. C.; Frey, M.; Fontecilla-Camps, J. C. *Nature* **1995**.
- (39) Murphy, B. J.; Hidalgo, R.; Roessler, M. M.; Evans, R. M.; Ash, P. A.; Myers, W. K.; Vincent, K. A.; Armstrong, F. A. J. *Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (26), 8484.
- (40) Hidalgo, R.; Ash, P. A.; Healy, A. J.; Vincent, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54 (24), 7110.
- (41) Brazzolotto, Deborah. *Activation des petites molécules par des complexes bio-inspirés à liaison métal-thiol.*, Université Grenoble Alpes, 2016.
- (42) Ogata, H.; Mizoguchi, Y.; Mizuno, N.; Miki, K.; Adachi, S.; Yasuoka, N.; Yagi, T.; Yamauchi, O.; Hirota, S.; Higuchi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (39), 11628.
- (43) Pandelia, M.-E.; Ogata, H.; Currell, L. J.; Flores, M.; Lubitz, W. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2010**, 1797 (2), 304.
- (44) Lenz, O.; Ludwig, M.; Schubert, T.; Buerstel, I.; Ganskow, S.; Goris, T.; Schwarze, A.; Friedrich, B. *Chemphyschem* **2010**, 11 (6), 1107.
- (45) Lukey, M. J.; Parkin, A.; Roessler, M. M.; Murphy, B. J.; Harmer, J.; Palmer, T.; Sargent, F.; Armstrong, F. A. J. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285 (6), 3928.
- (46) Pandelia, M.-E.; Fourmond, V.; Tron-Infossi, P.; Lojou, E.; Bertrand, P.; Leger, C.; Giudici-Orticoni, M.-T.; Lubitz, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (20), 6991.
- (47) Volbeda, A. *Int. J. Hydrog. Energy* **2002**, 27 (11–12), 1449.
- (48) Kellers, P.; Ogata, H.; Lubitz, W. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2008**, 64 (8), 719.
- (49) Ogata, H.; Kellers, P.; Lubitz, W. *J. Mol. Biol.* **2010**, 402 (2), 428.
- (50) Liebgott, P.-P.; de Lacey, A. L.; Burlat, B.; Cournac, L.; Richaud, P.; Brugna, M.; Fernandez, V. M.; Guigliarelli, B.; Rousset, M.; Léger, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 133 (4), 986.
- (51) Volbeda, A.; Martin, L.; Barbier, E.; Gutiérrez-Sanz, O.; De Lacey, A. L.; Liebgott, P.-P.; Dementin, S.; Rousset, M.; Fontecilla-Camps, J. C. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, 20 (1), 11.
- (52) Barilone, J. L.; Ogata, H.; Lubitz, W.; van Gastel, M. *Phys Chem Chem Phys* **2015**, 17 (24), 16204.
- (53) Breglia, R.; Ruiz-Rodriguez, M. A.; Vitriolo, A.; González-Laredo, R. F.; De Gioia, L.; Greco, C.; Bruschi, M. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2017**, 22 (1), 137.
- (54) Garcin, E.; Vernede, X.; Hatchikian, E.; Volbeda, A.; Frey, M.; Fontecilla-Camps, J. *Structure* **1999**, 7 (5), 557.
- (55) Volbeda, A.; Amara, P.; Iannello, M.; De Lacey, A. L.; Cavazza, C.; Fontecilla-Camps, J. C. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (63), 7061.
- (56) Peters, J. W.; Lanzilotta, W. N.; Lemon, B. J.; Seefeldt, L. C. *Science* **1998**, 282 (5395), 1853.
- (57) Hong, G.; Cornish, A. J.; Hegg, E. L.; Pachter, R. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2011**, 1807 (5), 510.
- (58) Capon, J.-F.; Gloaguen, F.; Pétilion, F. Y.; Schollhammer, P.; Talarmin, J. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253 (9–10), 1476.

- (59) Swanson, K. D.; Ratzloff, M. W.; Mulder, D. W.; Artz, J. H.; Ghose, S.; Hoffman, A.; White, S.; Zadvornyy, O. A.; Broderick, J. B.; Bothner, B.; King, P. W.; Peters, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (5), 1809.
- (60) Adamska, A.; Silakov, A.; Lambertz, C.; Rüdiger, O.; Happe, T.; Reijerse, E.; Lubitz, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51 (46), 11458.
- (61) Benyus, J. M. *Biomimicry*; William Morrow New York, 1997.
- (62) Origine du projet | CEEBIOS.
- (63) Oudart, Y.; Artero, V.; Pécaut, J.; Fontecave, M. *Inorg. Chem.* **2006**, 45 (11), 4334.
- (64) Canaguier, S.; Fourmond, V.; Perotto, C. U.; Fize, J.; Pecaut, J.; Fontecave, M.; Field, M. J.; Artero, V. *Chem Commun* **2013**, 49 (44), 5004.
- (65) Oudart, Y.; Artero, V.; Norel, L.; Train, C.; Pécaut, J.; Fontecave, M. *Organomet. Energy Convers.* **2009**, 694 (17), 2866.
- (66) Canaguier, S.; Vaccaro, L.; Artero, V.; Ostermann, R.; Pécaut, J.; Field, M. J.; Fontecave, M. *Chem. – Eur. J.* **2009**, 15 (37), 9350.
- (67) Ogo, S.; Kabe, R.; Uehara, K.; Kure, B.; Nishimura, T.; Menon, S. C.; Harada, R.; Fukuzumi, S.; Higuchi, Y.; Ohhara, T.; Tamada, T.; Kuroki, R. *Science* **2007**, 316 (5824), 585.
- (68) Fourmond, V.; Canaguier, S.; Golly, B.; Field, M. J.; Fontecave, M.; Artero, V. *Energy Environ. Sci.* **2011**, 4 (7), 2417.
- (69) Song, L.-C.; Li, J.-P.; Xie, Z.-J.; Song, H.-B. *Inorg. Chem.* **2013**, 52 (19), 11618.
- (70) Lai, C.-H.; Reibenspies, J. H.; Darensbourg, M. Y. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35 (20), 2390.
- (71) Li, Z.; Ohki, Y.; Tatsumi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (25), 8950.
- (72) Canaguier, S.; Artero, V.; Fontecave, M. *Dalton Trans* **2008**, No. 3, 315.
- (73) Barton, B. E.; Whaley, C. M.; Rauchfuss, T. B.; Gray, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (20), 6942.
- (74) Canaguier, S.; Field, M.; Oudart, Y.; Pécaut, J.; Fontecave, M.; Artero, V. *Chem. Commun.* **2010**, 46 (32), 5876.
- (75) Weber, K.; Krämer, T.; Shafaat, H. S.; Weyhermüller, T.; Bill, E.; van Gastel, M.; Neese, F.; Lubitz, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (51), 20745.
- (76) Ogo, S.; Ichikawa, K.; Kishima, T.; Matsumoto, T.; Nakai, H.; Kusaka, K.; Ohhara, T. *Science* **2013**, 339 (6120), 682.
- (77) Manor, B. C.; Rauchfuss, T. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (32), 11895.
- (78) Ulloa, O. A.; Huynh, M. T.; Richers, C. P.; Bertke, J. A.; Nilges, M. J.; Hammes-Schiffer, S.; Rauchfuss, T. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138 (29), 9234.
- (79) Brazzolotto, D.; Gennari, M.; Queyriaux, N.; Simmons, T. R.; Pécaut, J.; Demeshko, S.; Meyer, F.; Orio, M.; Artero, V.; Duboc, C. *Nat. Chem.* **2016**, 8 (11), 1054.
- (80) Camara, J. M.; Rauchfuss, T. B. *Nat. Chem.* **2011**, 4 (1), 26.
- (81) Carroll, M. E.; Barton, B. E.; Rauchfuss, T. B.; Carroll, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (45), 18843.
- (82) Roy, S.; Groy, T. L.; Jones, A. K. *Dalton Trans.* **2013**, 42 (11), 3843.
- (83) Tard, C.; Liu, X.; Ibrahim, S. K.; Bruschi, M.; Gioia, L. D.; Davies, S. C.; Yang, X.; Wang, L.-S.; Sawers, G.; Pickett, C. J. *Nature* **2005**, 433 (7026), 610.
- (84) Barton, B. E.; Rauchfuss, T. B. *Inorg. Chem.* **2008**, 47 (7), 2261.
- (85) Thomas, C. M.; Liu, T.; Hall, M. B.; Darensbourg, M. Y. *Inorg. Chem.* **2008**, 47 (15), 7009.
- (86) Bourrez, M.; Steinmetz, R.; Gloaguen, F. *Inorg. Chem.* **2014**, 53 (19), 10667.
- (87) Shaw, W. J.; Helm, M. L.; DuBois, D. L. *Met. Bioenerg. Biomim. Syst.* **2013**, 1827 (8–9), 1123.

- (88) Wiedner, E. S.; Chambers, M. B.; Pitman, C. L.; Bullock, R. M.; Miller, A. J. M.; Appel, A. M. *Chem. Rev.* **2016**, 116 (15), 8655.
- (89) Curtis, C. J.; Miedaner, A.; Ciancanelli, R.; Ellis, W. W.; Noll, B. C.; Rakowski DuBois, M.; DuBois, D. L. *Inorg. Chem.* **2003**, 42 (1), 216.
- (90) Wilson, A. D.; Newell, R. H.; McNevin, M. J.; Muckerman, J. T.; Rakowski DuBois, M.; DuBois, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (1), 358.
- (91) DuBois, D. L. *Inorg. Chem.* **2014**, 53 (8), 3935.
- (92) Rauegi, S.; Chen, S.; Ho, M.-H.; Ginovska-Pangovska, B.; Rousseau, R. J.; Dupuis, M.; DuBois, D. L.; Bullock, R. M. *Chem. - Eur. J.* **2012**, 18 (21), 6493.
- (93) Dubois, M. R.; Dubois, D. L. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42 (12), 1974.
- (94) Kilgore, U. J.; Roberts, J. A. S.; Pool, D. H.; Appel, A. M.; Stewart, M. P.; DuBois, M. R.; Dougherty, W. G.; Kassel, W. S.; Bullock, R. M.; DuBois, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (15), 5861.
- (95) Jain, A.; Lense, S.; Linehan, J. C.; Rauegi, S.; Cho, H.; DuBois, D. L.; Shaw, W. J. *Inorg. Chem.* **2011**, 50 (9), 4073.
- (96) Lense, S.; Ho, M.-H.; Chen, S.; Jain, A.; Rauegi, S.; Linehan, J. C.; Roberts, J. A. S.; Appel, A. M.; Shaw, W. *Organometallics* **2012**, 31 (19), 6719.
- (97) Lense, S.; Dutta, A.; Roberts, J. A. S.; Shaw, W. J. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (7), 792.
- (98) Reback, M. L.; Buchko, G. W.; Kier, B. L.; Ginovska-Pangovska, B.; Xiong, Y.; Lense, S.; Hou, J.; Roberts, J. A. S.; Sorensen, C. M.; Rauegi, S.; Squier, T. C.; Shaw, W. J. *Chem. – Eur. J.* **2014**, 20 (6), 1510.
- (99) Dutta, A.; Lense, S.; Hou, J.; Engelhard, M. H.; Roberts, J. A.; Shaw, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (49), 18490.
- (100) Yang, J. Y.; Chen, S.; Dougherty, W. G.; Kassel, W. S.; Bullock, R. M.; DuBois, D. L.; Rauegi, S.; Rousseau, R.; Dupuis, M.; DuBois, M. R. *Chem Commun* **2010**, 46 (45), 8618.
- (101) Dutta, A.; Roberts, J. A.; Shaw, W. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**.
- (102) Dutta, A.; Ginovska, B.; Rauegi, S.; Roberts, J. A. S.; Shaw, W. J. *Dalton Trans* **2016**, 45 (24), 9786.
- (103) Dutta, A.; DuBois, D. L.; Roberts, J. A. S.; Shaw, W. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, 111 (46), 16286.
- (104) Priyadarshani, N.; Dutta, A.; Ginovska, B.; Buchko, G. W.; O'Hagan, M.; Rauegi, S.; Shaw, W. J. *ACS Catal.* **2016**, 6 (9), 6037.
- (105) Solomon, E. I.; Heppner, D. E.; Johnston, E. M.; Ginsbach, J. W.; Cirera, J.; Qayyum, M.; Kieber-Emmons, M. T.; Kjaergaard, C. H.; Hadt, R. G.; Tian, L. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (7), 3659.
- (106) Makino, N.; McMahon, P.; Mason, H. S.; Moss, T. H. *J. Biol. Chem.* **1974**, 249 (19), 6062.
- (107) Rodríguez-López, J. N.; Ros, J. R.; Varón, R.; García-Cánovas, F. *Biochem. J.* **1993**, 293 (3), 859.
- (108) Espín, J. C.; García-Ruiz, P. A.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. *Biochem. J.* **1998**, 331 (2), 547.
- (109) Fenoll, L. G.; Rodríguez-López, J. N.; Varón, R.; García-Ruiz, P. A.; García-Cánovas, F.; Tudela, J. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2002**, 34 (12), 1594.
- (110) Duckworth, H. W.; Coleman, J. E. *J. Biol. Chem.* **1970**, 245 (7), 1613.
- (111) Rodríguez-López, J. N.; Fenoll, L. G.; García-Ruiz, P. A.; Varón, R.; Tudela, J.; Thorneley, R. N.; García-Cánovas, F. *Biochemistry (Mosc.)* **2000**, 39 (34), 10497.
- (112) Tepper, A. W. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (14), 13425.
- (113) Whittaker, J. W. *Chem. Rev.* **2003**, 103 (6), 2347.
- (114) Whittaker, M. M.; Whittaker, J. W. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263 (13), 6074.
- (115) Komori, H.; Higuchi, Y. *J. Biochem. (Tokyo)* **2015**, 158 (4), 293.

- (116) Bertrand, T.; Jolival, C.; Briozzo, P.; Caminade, E.; Joly, N.; Madzak, C.; Mougou, C. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, 41 (23), 7325.
- (117) Messerschmidt, A.; Rossi, A.; Ladenstein, R.; Huber, R.; Bolognesi, M.; Gatti, G.; Marchesini, A.; Petruzzelli, R.; Finazzi-Agró, A. *J. Mol. Biol.* **1989**, 206 (3), 513.
- (118) Solomon, E. I.; Augustine, A. J.; Yoon, J. *Dalton Trans.* **2008**, No. 30, 3921.
- (119) Quintanar, L.; Stoj, C.; Wang, T.-P.; Kosman, D. J.; Solomon, E. I. *Biochemistry (Mosc.)* **2005**, 44 (16), 6081.
- (120) Jones, S. M.; Solomon, E. I. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, 72 (5), 869.
- (121) Hildén, K.; Hakala, T. K.; Lundell, T. *Biotechnol. Lett.* **2009**, 31 (8), 1117.
- (122) Bronikowski, A.; Hagedoorn, P.-L.; Koschorreck, K.; Urlacher, V. B. *AMB Express* **2017**, 7 (1).
- (123) Kamei, I. *Curr. Microbiol.* **2017**, 74 (1), 125.
- (124) Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cosnier, S. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, 72 (5), 941.
- (125) Piontek, K. J. *Biol. Chem.* **2002**, 277 (40), 37663.
- (126) Shleev, S.; Tkac, J.; Christenson, A.; Ruzgas, T.; Yaropolov, A. I.; Whittaker, J. W.; Gorton, L. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20 (12), 2517.
- (127) Reinhammar, B. R. M. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1972**, 275 (2), 245.
- (128) Reinhammar, B. R. M.; Vanngad, T. I. *Eur. J. Biochem.* **1971**, 18 (4), 463.
- (129) Vaz-Dominguez, C.; Campuzano, S.; Rüdiger, O.; Pita, M.; Gorbacheva, M.; Shleev, S.; Fernandez, V. M.; De Lacey, A. L. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 24 (4), 531.
- (130) Mizutani, K.; Toyoda, M.; Sagara, K.; Takahashi, N.; Sato, A.; Kamitaka, Y.; Tsujimura, S.; Nakanishi, Y.; Sugiura, T.; Yamaguchi, S.; Kano, K.; Mikami, B. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2010**, 66 (7), 765.
- (131) Xu, F.; Shin, W.; Brown, S. H.; Wahleithner, J. A.; Sundaram, U. M.; Solomon, E. I. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1996**, 1292 (2), 303.
- (132) Mano, N.; Edembe, L. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 50, 478.
- (133) Cracknell, J. A.; McNamara, T. P.; Lowe, E. D.; Blanford, C. F. *Dalton Trans.* **2011**, 40 (25), 6668.
- (134) Tsukahara, T.; Shimokata, K.; Katayama, Y.; Shimada, H.; Muramoto, K.; Aoyama, H.; Mochizuki, M.; Shinzawa-Itoh, K.; Yamashita, E.; Yao, M.; Ishimura, Y.; Yoshikawa, S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100 (26), 15304.
- (135) Nanthakumar, A.; Fox, S.; Murthy, N. N.; Karlin, K. D.; Ravi, N.; Huynh, B. H.; Orosz, R. D.; Day, E. P.; Hagen, K. S.; Blackburn, N. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115 (18), 8513.
- (136) Hematian, S.; Garcia-Bosch, I.; Karlin, K. D. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48 (8), 2462.
- (137) Ghiladi, R. A.; Hatwell, K. R.; Karlin, K. D.; Huang, H.; Munn-Loccoz, P.; Krebs, C.; Huynh, B. H.; Marzilli, L. A.; Cotter, R. J.; Kaderli, S.; Zuberbühler, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (25), 6183.
- (138) Garcia-Bosch, I.; Adam, S. M.; Schaefer, A. W.; Sharma, S. K.; Peterson, R. L.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (3), 1032.
- (139) Jasinski, R. *Nature* **1964**, 201 (4925), 1212.
- (140) Vasudevan, P.; Santosh; Mann, N.; Tyagi, S. *Transit. Met. Chem.* **1990**, 15 (2), 81.
- (141) Collman, J. P.; Marrocco, M.; Denisevich, P.; Koval, C.; Anson, F. C. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1979**, 101 (1), 117.
- (142) Durand Jr, R. R.; Bencosme, C. S.; Collman, J. P.; Anson, F. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105 (9), 2710.

- (143) Gupta, S.; Tryk, D.; Bae, I.; Aldred, W.; Yeager, E. *J. Appl. Electrochem.* **1989**, 19 (1), 19.
- (144) McGuire Jr., R.; Dogutan, D. K.; Teets, T. S.; Suntivich, J.; Shao-Horn, Y.; Nocera, D. G. *Chem. Sci.* **2010**, 1 (3), 411.
- (145) Hijazi, I.; Bourgeteau, T.; Cornut, R.; Morozan, A.; Filoramo, A.; Leroy, J.; Derycke, V.; Jusselme, B.; Campidelli, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (17), 6348.
- (146) Ho, K. H. L.; Jusselme, B.; Campidelli, S. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2016**, 20 (08n11), 1142.
- (147) Ho, K.-H. L.; Hijazi, I.; Rivier, L.; Gautier, C.; Jusselme, B.; de Miguel, G.; Romero-Nieto, C.; Guldi, D. M.; Heinrich, B.; Donnio, B.; Campidelli, S. *Chem. - Eur. J.* **2013**, 19 (34), 11374.
- (148) Bonin, J.; Maurin, A.; Robert, M. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, 334, 184.
- (149) Maurin, A.; Robert, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138 (8), 2492.
- (150) Mase, K.; Aoi, S.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2016**, 20 (08n11), 935.
- (151) Quist, D. A.; Diaz, D. E.; Liu, J. J.; Karlin, K. D. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2017**, 22 (2-3), 253.
- (152) Elwell, C. E.; Gagnon, N. L.; Neisen, B. D.; Dhar, D.; Spaeth, A. D.; Yee, G. M.; Tolman, W. B. *Chem. Rev.* **2017**, 117 (3), 2059.
- (153) Jacobson, R. R.; Tyeklar, Z.; Farooq, A.; Karlin, K. D.; Liu, S.; Zubieta, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110 (11), 3690.
- (154) John, A.; Shaikh, M. M.; Ghosh, P. *Dalton Trans.* **2008**, No. 21, 2815.
- (155) Itoh, S.; Taki, M.; Fukuzumi, S. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 198 (1), 3.
- (156) Whittaker, M. M.; Chuang, Y. Y.; Whittaker, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115 (22), 10029.
- (157) Thomas, F.; Gellon, G.; Gautier-Luneau, I.; Saint-Aman, E.; Pierre, J.-L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41 (16), 3047.
- (158) Philibert, A.; Thomas, F.; Philouze, C.; Hamman, S.; Saint-Aman, E.; Pierre, J.-L. *Chem.- Eur. J.* **2003**, 9 (16), 3803.
- (159) Hamann, J. N.; Herzigkeit, B.; Jurgeleit, R.; Tuzcek, F. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, 334, 54.
- (160) Karlin, K. D.; Gultneh, Y.; Hutchinson, J. P.; Zubieta, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104 (19), 5240.
- (161) Karlin, K. D.; Hayes, J. C.; Gultneh, Y.; Cruse, R. W.; McKown, J. W.; Hutchinson, J. P.; Zubieta, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106 (7), 2121.
- (162) Rolff, M.; Schottenheim, J.; Peters, G.; Tuzcek, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49 (36), 6438.
- (163) Belle, C.; Beguin, C.; Gautier-Luneau, I.; Hamman, S.; Philouze, C.; Pierre, J. L.; Thomas, F.; Torelli, S.; Saint-Aman, E.; Bonin, M. *Inorg. Chem.* **2002**, 41 (3), 479.
- (164) Cole, A. P.; Root, D. E.; Mukherjee, P.; Solomon, E. I.; Stack, T. D. P. *Science* **1996**, 273 (5283), 1848.
- (165) Kirillov, A. M.; Kirillova, M. V.; Pombeiro, A. J. L. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 256 (23-24), 2741.
- (166) Mirica, L. M.; Stack, T. D. P. *Inorg. Chem.* **2005**, 44 (7), 2131.
- (167) Tahsini, L.; Kotani, H.; Lee, Y.-M.; Cho, J.; Nam, W.; Karlin, K. D.; Fukuzumi, S. *Chem. - Eur. J.* **2012**, 18 (4), 1084.
- (168) Iijima, S. *nature* **1991**, 354 (6348), 56.
- (169) Baughman, R. H. *Science* **2002**, 297 (5582), 787.
- (170) Hu, L.; Hecht, D. S.; Grüner, G. *Chem. Rev.* **2010**, 110 (10), 5790.
- (171) Grobert, N. *Mater. Today* **2007**, 10 (1-2), 28.

- (172) Kharisov, B. I.; Kharissova, O. V.; Leija Gutierrez, H.; Ortiz Méndez, U. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48* (2), 572.
- (173) Ausman, K. D.; Piner, R.; Lourie, O.; Ruoff, R. S.; Korobov, M. J. *Phys. Chem. B* **2000**, *104* (38), 8911.
- (174) Bahr, J. L.; Mickelson, E. T.; Bronikowski, M. J.; Smalley, R. E.; Tour, J. M. *Chem. Commun.* **2001**, No. 2, 193.
- (175) Kim, Y.; Minami, N.; Zhu, W.; Kazaoui, S.; Azumi, R.; Matsumoto, M. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2003**, *42* (12R), 7629.
- (176) Rao, S. G.; Huang, L.; Setyawan, W.; Hong, S. *Nature* **2003**, *425* (6953), 36.
- (177) Saran, N.; Parikh, K.; Suh, D.-S.; Muñoz, E.; Kolla, H.; Manohar, S. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (14), 4462.
- (178) Wu, Z. *Science* **2004**, *305* (5688), 1273.
- (179) Zhang, M. *Science* **2005**, *309* (5738), 1215.
- (180) Fuchsberger, K.; Goff, A. L.; Gambazzi, L.; Toma, F. M.; Goldoni, A.; Giugliano, M.; Stelzle, M.; Prato, M. *Small* **2011**, *7* (4), 524.
- (181) Schnorr, J. M.; Swager, T. M. *Chem. Mater.* **2011**, *23* (3), 646.
- (182) Lalaoui, N.; Elouarzaki, K.; Goff, A. L.; Holzinger, M.; Cosnier, S. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (81), 9281.
- (183) Hirsch, A.; Vostrowsky, O. In *Functional Molecular Nanostructures: -/-*; Schlüter, A. D., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2005; pp 193–237.
- (184) Balavoine, F.; Schultz, P.; Richard, C.; Mallouh, V.; Ebbesen, T. W.; Mioskowski, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38* (13/14), 1912.
- (185) Guo, Z.; Sadler, P. J.; Tsang, S. C. *Adv. Mater.* **1998**, *10* (9), 701.
- (186) Zhao, J.; Lu, J. P.; Han, J.; Yang, C.-K. *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82* (21), 3746.
- (187) Chen, R. J.; Zhang, Y.; Wang, D.; Dai, H. J. *Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (16), 3838.
- (188) Ramasamy, R. P.; Luckarift, H. R.; Ivnitski, D. M.; Atanassov, P. B.; Johnson, G. R. *Chem. Commun.* **2010**, 46 (33), 6045.
- (189) Morishita, T.; Matsushita, M.; Katagiri, Y.; Fukumori, K. *Carbon* **2009**, *47* (11), 2716.
- (190) Cosnier, S.; Holzinger, M. *Electrochimica Acta* **2008**, *53* (11), 3948.
- (191) Haddour, N.; Cosnier, S.; Gondran, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (16), 5752.
- (192) Reuillard, B.; Le Goff, A.; Cosnier, S. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (9), 4409.
- (193) MacAodha, D.; Ferrer, M. L.; Conghaile, P. Ó.; Kavanagh, P.; Leech, D. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14* (42), 14667.
- (194) Mallakpour, S.; Soltanian, S. *RSC Adv* **2016**, *6* (111), 109916.
- (195) Singh, P.; Campidelli, S.; Giordani, S.; Bonifazi, D.; Bianco, A.; Prato, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (8), 2214.
- (196) Georgakilas, V.; Kordatos, K.; Prato, M.; Guldi, D. M.; Holzinger, M.; Hirsch, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (5), 760.
- (197) Hirsch, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (11), 1853.
- (198) Holzinger, M.; Hirsch, A.; Bernier, P.; Duesberg, G. S.; Burghard, M. *Appl. Phys. Mater. Sci. Process.* **2000**, *70* (5), 599.
- (199) Sumanasekera, G. U.; Allen, J. L.; Fang, S. L.; Loper, A. L.; Rao, A. M.; Eklund, P. C. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (21), 4292.
- (200) Mawhinney, D. B.; Naumenko, V.; Kuznetsova, A.; Yates, J. T.; Liu, J.; Smalley, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (10), 2383.
- (201) Chen, J. *Science* **1998**, *282* (5386), 95.
- (202) Lim, J. K.; Yun, W. S.; Yoon, M.; Lee, S. K.; Kim, C. H.; Kim, K.; Kim, S. K. *Synth. Met.* **2003**, *139* (2), 521.
- (203) Maggini, M.; Scorrano, G.; Prato, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (21), 9798.

- (204) Delamar, M.; Hitmi, R.; Pinson, J.; Saveant, J. M. J. *Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 (14), 5883.
- (205) Bahr, J. L.; Yang, J.; Kosynkin, D. V.; Bronikowski, M. J.; Smalley, R. E.; Tour, J. M. J. *Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (27), 6536.
- (206) Bahr, J. L.; Tour, J. M. *Chem. Mater.* **2001**, 13 (11), 3823.
- (207) Holzinger, M.; Vostrowsky, O.; Hirsch, A.; Hennrich, F.; Kappes, M.; Weiss, R.; Jellen, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40 (21), 4002.
- (208) Sarma, A. K.; Vatsyayan, P.; Goswami, P.; Minter, S. D. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24 (8), 2313.
- (209) Habeeb, A. F. S. A.; Hiramoto, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, 126 (1), 16.
- (210) Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. *Biotechniques* **2004**, 37 (5), 790.
- (211) de Lumley-Woodyear, T.; Rocca, P.; Lindsay, J.; Dror, Y.; Freeman, A.; Heller, A. *Anal. Chem.* **1995**, 67 (8), 1332.
- (212) Klotzbach, T.; Watt, M.; Ansari, Y.; Minter, S. J. *Membr. Sci.* **2006**, 282 (1–2), 276.
- (213) Lim, J.; Cirigliano, N.; Wang, J.; Dunn, B. *Phys Chem Chem Phys* **2007**, 9 (15), 1809.
- (214) Cosnier, S. *Anal. Lett.* **2007**, 40 (7), 1260.
- (215) Takahashi, S.; Sato, K.; Anzai, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402 (5), 1749.
- (216) Dubacheva, G. V.; Van Der Heyden, A.; Dumy, P.; Kaftan, O.; Auzély-Velty, R.; Coche-Guerente, L.; Labbé, P. *Langmuir* **2010**, 26 (17), 13976.
- (217) Holzinger, M.; Bouffier, L.; Villalonga, R.; Cosnier, S. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24 (5), 1128.
- (218) Lalaoui, N.; David, R.; Jamet, H.; Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. *ACS Catal.* **2016**, 6 (7), 4259.
- (219) Yahiro, A. T.; Lee, S. M.; Kimble, D. O. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Spec. Sect. Biophys. Subj.* **1964**, 88 (2), 375.
- (220) Jeuken, L. J. C. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2003**, 1604 (2), 67.
- (221) Agbo, P.; Heath, J. R.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (39), 13882.
- (222) Heller, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6 (2), 209.
- (223) Tarasevich, M. R.; Bogdanovskaya, V. A.; Bagotskii, V. S.; Varfolomeev, S. D.; Yaropolov, A. I.; Berezin, I. V. *Sov. Electrochem.* **1977**, 13 (6), 755.
- (224) Yaropolov, A. I.; Karyakin, A. A.; Varfolomeev, S. D.; Berezin, I. V. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1984**, 12 (3–4), 267.
- (225) Armstrong, F. A.; Belsey, N. A.; Cracknell, J. A.; Goldet, G.; Parkin, A.; Reisner, E.; Vincent, K. A.; Wait, A. F. *Chem Soc Rev* **2009**, 38 (1), 36.
- (226) Vincent, K. A.; Parkin, A.; Lenz, O.; Albracht, S. P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Cammack, R.; Friedrich, B.; Armstrong, F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (51), 18179.
- (227) Millo, D.; Pandelia, M.-E.; Utesch, T.; Wisitruangsakul, N.; Mroginski, M. A.; Lubitz, W.; Hildebrandt, P.; Zebger, I. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113 (46), 15344.
- (228) Ciaccafava, A.; Infossi, P.; Giudici-Orticoni, M.-T.; Lojou, E. *Langmuir* **2010**, 26 (23), 18534.
- (229) Oughli, A. A.; Conzuelo, F.; Winkler, M.; Happe, T.; Lubitz, W.; Schuhmann, W.; Rüdiger, O.; Plumeré, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54 (42), 12329.
- (230) Qian, D.-J.; Nakamura, C.; Wenk, S.; Wakayama, T.; Zorin, N.; Miyake, J. *Mater. Lett.* **2003**, 57 (5–6), 1130.
- (231) Lojou, E.; Giudici-Orticoni, M.; Bianco, P. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, 579 (2), 199.
- (232) Eng, L. H.; Elmgren, M.; Komlos, P.; Nordling, M.; Lindquist, S.-E.; Neujahr, H. Y. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98 (28), 7068.

- (233) Baur, J.; Le Goff, A.; Dementin, S.; Holzinger, M.; Rousset, M.; Cosnier, S. *Int. J. Hydrog. Energy* **2011**, 36 (19), 12096.
- (234) Karyakin, A. A.; Vinogradova, D. V.; Morozov, S. V.; Karyakina, E. E. *Electrochimica Acta* **2010**, 55 (26), 7696.
- (235) Plumeré, N.; Rüdiger, O.; Oughli, A. A.; Williams, R.; Vivekananthan, J.; Pöller, S.; Schuhmann, W.; Lubitz, W. *Nat. Chem.* **2014**, 6 (9), 822.
- (236) Fourmond, V.; Stapf, S.; Li, H.; Buesen, D.; Birrell, J.; Rüdiger, O.; Lubitz, W.; Schuhmann, W.; Plumeré, N.; Léger, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (16), 5494.
- (237) Rüdiger, O.; Abad, J. M.; Hatchikian, E. C.; Fernandez, V. M.; De Lacey, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (46), 16008.
- (238) Gutiérrez-Sánchez, C.; Olea, D.; Marques, M.; Fernández, V. M.; Pereira, I. A. C.; Vélez, M.; De Lacey, A. L. *Langmuir* **2011**, 27 (10), 6449.
- (239) Liu, A.-R.; Wakayama, T.; Nakamura, C.; Miyake, J.; Zorin, N. A.; Qian, D.-J. *Electrochimica Acta* **2007**, 52 (9), 3222.
- (240) Luo, X.; Brugna, M.; Tron-Infossi, P.; Giudici-Ortoni, M. T.; Lojou, É. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, 14 (8), 1275.
- (241) Monsalve, K.; Mazurenko, I.; Gutierrez-Sanchez, C.; Ilbert, M.; Infossi, P.; Frielingsdorf, S.; Giudici-Ortoni, M. T.; Lenz, O.; Lojou, E. *ChemElectroChem* **2016**, 3 (12), 2179.
- (242) Lalaoui, N.; de Poulpiquet, A.; Haddad, R.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Gounel, S.; Mermoux, M.; Infossi, P.; Mano, N.; Lojou, E.; Cosnier, S. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (35), 7447.
- (243) Alonso-Lomillo, M. A.; Rüdiger, O.; Maroto-Valiente, A.; Velez, M.; Rodríguez-Ramos, I.; Muñoz, F. J.; Fernández, V. M.; De Lacey, A. L. *Nano Lett.* **2007**, 7 (6), 1603.
- (244) Ramírez, P.; Mano, N.; Andreu, R.; Ruzgas, T.; Heller, A.; Gorton, L.; Shleev, S. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2008**, 1777 (10), 1364.
- (245) Abad, J. M.; Gass, M.; Bleloch, A.; Schiffrin, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (29), 10229.
- (246) Tsai, Y.-C.; Chiu, C.-C. *Sens. Actuators B Chem.* **2007**, 125 (1), 10.
- (247) Švitel, J. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32 (6), 828.
- (248) Reuillard, B.; Le Goff, A.; Agnès, C.; Zebda, A.; Holzinger, M.; Cosnier, S. *Electrochem. Commun.* **2012**, 20, 19.
- (249) Tsujimura, S.; Murata, K. *Electrochimica Acta* **2015**, 180, 555.
- (250) Tsujimura, S.; Tatsumi, H.; Ogawa, J.; Shimizu, S.; Kano, K.; Ikeda, T. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 496 (1–2), 69.
- (251) Dronov, R.; Kurth, D. G.; Scheller, F. W.; Lisdat, F. *Electroanalysis* **2007**, 19 (15), 1642.
- (252) Tsujimura, S.; Suraniti, E.; Durand, F.; Mano, N. *Electrochimica Acta* **2014**, 117, 263.
- (253) Zheng, W.; Li, Q.; Su, L.; Yan, Y.; Zhang, J.; Mao, L. *Electroanalysis* **2006**, 18 (6), 587.
- (254) Tsujimura, S.; Kano, K.; Ikeda, T. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, 576 (1), 113.
- (255) Habrioux, A.; Napporn, T.; Servat, K.; Tingry, S.; Kokoh, K. B. *Electrochimica Acta* **2010**, 55 (26), 7701.
- (256) Lim, J.; Cirigliano, N.; Wang, J.; Dunn, B. *Phys Chem Chem Phys* **2007**, 9 (15), 1809.
- (257) Weigel, M. C.; Tritscher, E.; Lisdat, F. *Electrochem. Commun.* **2007**, 9 (4), 689.
- (258) Ciaccafava, A.; De Poulpiquet, A.; Techer, V.; Giudici-Ortoni, M. T.; Tingry, S.; Innocent, C.; Lojou, E. *Electrochem. Commun.* **2012**, 23, 25.
- (259) Gutiérrez-Sánchez, C.; Pita, M.; Toscano, M. D.; De Lacey, A. L. *Electroanalysis* **2013**, 25 (6), 1359.

- (260) Scherbahn, V.; Putze, M. T.; Dietzel, B.; Heinlein, T.; Schneider, J. J.; Lisdat, F. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, 61, 631.
- (261) Lalaoui, N.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cosnier, S. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21 (47), 16868.
- (262) Tominaga, M.; Ohtani, M.; Taniguchi, I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, 10 (46), 6928.
- (263) Lalaoui, N.; Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. *Chem. - Eur. J.* **2016**, 22 (30), 10494.
- (264) Kjaergaard, C. H.; Jones, S. M.; Gounel, S.; Mano, N.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (27), 8783.
- (265) Mazurenko, I.; Monsalve, K.; Rouhana, J.; Parent, P.; Laffon, C.; Goff, A. L.; Szunerits, S.; Boukherroub, R.; Giudici-Ortoni, M.-T.; Mano, N.; Lojou, E. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8 (35), 23074.
- (266) de Poulpiquet, A.; Kjaergaard, C. H.; Rouhana, J.; Mazurenko, I.; Infossi, P.; Gounel, S.; Gadiou, R.; Giudici-Ortoni, M. T.; Solomon, E. I.; Mano, N.; Lojou, E. *ACS Catal.* **2017**, 7 (6), 3916.
- (267) Chen, T.; Barton, S. C.; Binyamin, G.; Gao, Z.; Zhang, Y.; Kim, H.-H.; Heller, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (35), 8630.
- (268) Soukharev, V.; Mano, N.; Heller, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (27), 8368.
- (269) Tarasevich, M. R. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1979**, 104, 587.
- (270) Shleev, S.; Pita, M.; Yaropolov, A. I.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Electroanalysis* **2006**, 18 (19–20), 1901.
- (271) Blanford, C. F.; Heath, R. S.; Armstrong, F. A. *Chem. Commun.* **2007**, No. 17, 1710.
- (272) Miyake, T.; Yoshino, S.; Yamada, T.; Hata, K.; Nishizawa, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (13), 5129.
- (273) Reuillard, B.; Abreu, C.; Lalaoui, N.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Ondel, O.; Buret, F.; Cosnier, S. *Bioelectrochemistry* **2015**, 106, 73.
- (274) Lau, C.; Adkins, E. R.; Ramasamy, R. P.; Luckarift, H. R.; Johnson, G. R.; Atanassov, P. *Adv. Energy Mater.* **2012**, 2 (1), 162.
- (275) Bourourou, M.; Elouarzaki, K.; Lalaoui, N.; Agnès, C.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Maaref, A.; Cosnier, S. *Chem. - Eur. J.* **2013**, 19 (28), 9371.
- (276) Le Goff, A.; Artero, V.; Jusselme, B.; Tran, P. D.; Guillet, N.; Métayé, R.; Fihri, A.; Palacin, S.; Fontecave, M. *Science* **2009**, 326 (5958), 1384.
- (277) Tran, P. D.; Le Goff, A.; Heidkamp, J.; Jusselme, B.; Guillet, N.; Palacin, S.; Dau, H.; Fontecave, M.; Artero, V. *Angew. Chem.* **2011**, 123 (6), 1407.
- (278) Rodríguez-Maciá, P.; Dutta, A.; Lubitz, W.; Shaw, W. J.; Rüdiger, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**.
- (279) Rodríguez-Maciá, P.; Priyadarshani, N.; Dutta, A.; Weidenthaler, C.; Lubitz, W.; Shaw, W. J.; Rüdiger, O. *Electroanalysis* **2016**, 28 (10), 2452.
- (280) Huan, T. N.; Jane, R. T.; Benayad, A.; Guetaz, L.; Tran, P. D.; Artero, V. *Energy Environ. Sci.* **2016**.
- (281) Savy, M.; Andro, P.; Bernard, C.; Magner, G. *Electrochimica Acta* **1973**, 18 (2), 191.
- (282) Özer, M.; Altındal, A.; Özkaya, A. R.; Bekaroğlu, Ö. *Dalton Trans.* **2009**, No. 17, 3175.
- (283) Zhuang, Q.; Scholz, F. J. *Porphy. Phthalocyanines* **2000**, 4 (02), 202.
- (284) Boulatov, R.; Collman, J. P.; Shiryayeva, I. M.; Sunderland, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (40), 11923.
- (285) Collman, J. P.; Décréau, R. A. *Chem. Commun.* **2008**, No. 41, 5065.

- (286) Collman, J. P.; Devaraj, N. K.; Decreau, R. A.; Yang, Y.; Yan, Y.-L.; Ebina, W.; Eberspacher, T. A.; Chidsey, C. E. D. *Science* **2007**, 315 (5818), 1565.
- (287) Chatterjee, S.; Sengupta, K.; Hematian, S.; Karlin, K. D.; Dey, A. J. *Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (40), 12897.
- (288) CAI, C. X.; XUE, K. H.; XU, X. Y.; LUO, Q. H. *J. Appl. Electrochem.* **1997**, 27 (7), 793.
- (289) McCrory, C. C. L.; Ottenwaelder, X.; Stack, T. D. P.; Chidsey, C. E. D. *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111 (49), 12641.
- (290) McCrory, C. C. L.; Devadoss, A.; Ottenwaelder, X.; Lowe, R. D.; Stack, T. D. P.; Chidsey, C. E. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (11), 3696.
- (291) Thorseth, M. A.; Letko, C. S.; Rauchfuss, T. B.; Gewirth, A. A. *Inorg. Chem.* **2011**, 50 (13), 6158.
- (292) Thorum, M. S.; Yadav, J.; Gewirth, A. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (1), 165.
- (293) Xi, Y.-T.; Wei, P.-J.; Wang, R.-C.; Liu, J.-G. *Chem Commun* **2015**, 51 (35), 7455.
- (294) Brushett, F. R.; Thorum, M. S.; Lioutas, N. S.; Naughton, M. S.; Tornow, C.; Jhong, H.-R. "Molly"; Gewirth, A. A.; Kenis, P. J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (35), 12185.
- (295) Matos, I. O.; Ferreira, T. L.; Paixão, T. R. L. C.; Lima, A. S.; Bertotti, M.; Alves, W. A. *Electrochimica Acta* **2010**, 55 (18), 5223.
- (296) Tse, E. C. M.; Schilter, D.; Gray, D. L.; Rauchfuss, T. B.; Gewirth, A. A. *Inorg. Chem.* **2014**, 53 (16), 8505.
- (297) Schaetzle, O.; Barrière, F.; Baronian, K. *Energy Environ. Sci.* **2008**, 1 (6), 607.
- (298) Arechederra, R.; Minter, S. D. *Electrochimica Acta* **2008**, 53 (23), 6698.
- (299) Bhatnagar, D.; Xu, S.; Fischer, C.; Arechederra, R. L.; Minter, S. D. *Phys Chem Chem Phys* **2011**, 13 (1), 86.
- (300) Reuillard, B.; Le Goff, A.; Agnès, C.; Holzinger, M.; Zebda, A.; Gondran, C.; Elouarzaki, K.; Cosnier, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15 (14), 4892.
- (301) Tsujimura, S.; Fujita, M.; Tatsumi, H.; Kano, K.; Ikeda, T. *Phys Chem Chem Phys* **2001**, 3 (7), 1331.
- (302) Vincent, K. A.; Cracknell, J. A.; Lenz, O.; Zebger, I.; Friedrich, B.; Armstrong, F. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102 (47), 16951.
- (303) Vincent, K. A.; Cracknell, J. A.; Clark, J. R.; Ludwig, M.; Lenz, O.; Friedrich, B.; Armstrong, F. A. *Chem. Commun.* **2006**, No. 48, 5033.
- (304) Wait, A. F.; Parkin, A.; Morley, G. M.; dos Santos, L.; Armstrong, F. A. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114 (27), 12003.
- (305) Krishnan, S.; Armstrong, F. A. *Chem. Sci.* **2012**, 3 (4), 1015.
- (306) Xu, L.; Armstrong, F. A. *Energy Environ. Sci.* **2013**, 6 (7), 2166.
- (307) Matsumoto, T.; Eguchi, S.; Nakai, H.; Hibino, T.; Yoon, K.-S.; Ogo, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53 (34), 8895.
- (308) De Poulpiquet, A.; Ciaccafava, A.; Szot, K.; Pillain, B.; Infossi, P.; Guiral, M.; Opallo, M.; Giudici-Ortoni, M.-T.; Lojou, E. *Electroanalysis* **2013**, 25 (3), 685.
- (309) de Poulpiquet, A.; Ciaccafava, A.; Gadiou, R.; Gounel, S.; Giudici-Ortoni, M. T.; Mano, N.; Lojou, E. *Electrochem. Commun.* **2014**, 42 (0), 72.
- (310) Monsalve, K.; Roger, M.; Gutierrez-Sanchez, C.; Ilbert, M.; Nitsche, S.; Byrne-Kodjabachian, D.; Marchi, V.; Lojou, E. *Spec. Issue Biol. Fuel Cells* **2015**, 106, Part A, 47.
- (311) Plumeré, N.; Rüdiger, O.; Oughli, A. A.; Williams, R.; Vivekananthan, J.; Pöller, S.; Schuhmann, W.; Lubitz, W. *Nat. Chem.* **2014**, 6 (9), 822.
- (312) Wang, Y.; Esterle, T. F.; Armstrong, F. A. *RSC Adv* **2016**, 6 (50), 44129.
- (313) Matsumoto, T.; Kim, K.; Ogo, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50 (47), 11202.

- (314) Takashita, K.; Matsumoto, T.; Yatabe, T.; Nakai, H.; Ogo, S. *Chem. Lett.* **2016**, 45 (2), 137.
- (315) Tran, P. D.; Morozan, A.; Archambault, S.; Heidkamp, J.; Chenevier, P.; Dau, H.; Fontecave, M.; Martinet, A.; Jousset, B.; Artero, V. *Chem. Sci.* **2015**, 6 (3), 2050.
- (316) Cosnier, S.; J. Gross, A.; Le Goff, A.; Holzinger, M. J. *Power Sources* **2016**, 325, 252.
- (317) Lojou, E. *Electrochimica Acta* **2011**, 56 (28), 10385.
- (318) DuBois, M. R.; DuBois, D. L. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (1), 62.
- (319) Dresselhaus, M. S.; Jorio, A.; Saito, R. *Annu Rev Condens Matter Phys* **2010**, 1 (1), 89.
- (320) Watts, J. F. *Vacuum* **1994**, 45 (6–7), 653.
- (321) Wilson, A. D.; Shoemaker, R. K.; Miedaner, A.; Muckerman, J. T.; DuBois, D. L.; DuBois, M. R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, 104 (17), 6951.
- (322) Hexter, S. V.; Esterle, T. F.; Armstrong, F. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16 (24), 11822.
- (323) Hexter, S. V.; Grey, F.; Happe, T.; Climent, V.; Armstrong, F. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109 (29), 11516.
- (324) Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. E. *Chem. Rev.* **1996**, 96 (7), 2563.
- (325) Klonowska, A.; Gaudin, C.; Asso, M.; Fournel, A.; R?glier, M.; Tron, T. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, 36 (1), 34.
- (326) McFarland, J. M.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (39), 13490.
- (327) Lalaoui, N.; Rousselot-Pailley, P.; Robert, V.; Mekmouche, Y.; Villalonga, R.; Holzinger, M.; Cosnier, S.; Tron, T.; Le Goff, A. *ACS Catal.* **2016**, 6 (3), 1894.
- (328) Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (8), 1255.
- (329) Mutter, M.; Vuilleumier, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28 (5), 535.
- (330) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35 (1314), 1482.
- (331) Rose, K. J. *Am. Chem. Soc.* **1994**, 116 (1), 30.
- (332) Evrard, D.; Lambert, F.; Policar, C.; Balland, V.; Limoges, B. *Chem. – Eur. J.* **2008**, 14 (30), 9286.
- (333) Haque, A.-M. J.; Kim, K. *Langmuir* **2011**, 27 (3), 882.
- (334) Haque, A.-M. J.; Kwon, S.-R.; Park, H.; Kim, T.-H.; Oh, Y.-S.; Choi, S.-Y.; Hong, J.-D.; Kim, K. *Chem. Commun.* **2009**, No. 32, 4865.
- (335) Devillers, C. H.; Boturyn, D.; Bucher, C.; Dumy, P.; Labbé, P.; Moutet, J.-C.; Royal, G.; Saint-Aman, E. *Langmuir* **2006**, 22 (19), 8134.
- (336) Laviron, E. J. *Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1979**, 101 (1), 19.
- (337) Liu, G.; Liu, J.; Böcking, T.; Eggers, P. K.; Gooding, J. J. *Chem. Phys.* **2005**, 319 (1–3), 136.
- (338) Reuillard, B.; Gentil, S.; Carriere, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. *Chem. Sci.* **2015**.
- (339) Mévellec, V.; Roussel, S.; Tessier, L.; Chancelon, J.; Mayne-L’Hermite, M.; Deniau, G.; Viel, P.; Palacin, S. *Chem. Mater.* **2007**, 19 (25), 6323.
- (340) Adenier, A.; Barré, N.; Cabet-Deliry, E.; Chaussé, A.; Griveau, S.; Mercier, F.; Pinson, J.; Vautrin-UL, C. *Surf. Sci.* **2006**, 600 (21), 4801.
- (341) Simaan, A. J.; Mekmouche, Y.; Herrero, C.; Moreno, P.; Aukauloo, A.; Delaire, J. A.; Réglie, M.; Tron, T. *Chem. – Eur. J.* **2011**, 17 (42), 11743.
- (342) Robert, V.; Mekmouche, Y.; R Pailley, P.; Tron, T. *Curr. Genomics* **2011**, 12 (2), 123.

- (343) Gutiérrez-Sánchez, C.; Pita, M.; Vaz-Domínguez, C.; Shleev, S.; De Lacey, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (41), 17212.
- (344) Lalaoui, Noémie. Réduction bioélectrocatalytique du dioxygène par des enzymes à cuivres connectées sur des électrodes nanostructurées et fonctionnalisées : intégration aux biopiles enzymatiques, Université Grenoble Alpes, 2015.
- (345) Lazarides, T.; Sazanovich, I. V.; Simaan, A. J.; Kafentzi, M. C.; Delor, M.; Mekmouche, Y.; Faure, B.; Réglier, M.; Weinstein, J. A.; Coutsolelos, A. G.; Tron, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (8), 3095.
- (346) Dagys, M.; Laurynėnas, A.; Ratautas, D.; Kulys, J.; Vidžiūnaitė, R.; Talaikis, M.; Niaura, G.; Marcinkevičienė, L.; Meškys, R.; Shleev, S. *Energy Env. Sci* **2017**, 10 (2), 498.
- (347) PAUporté Thierry; LINCOT Daniel. *Tech. Ing. Méthodes Electrochim.* **2006**, base documentaire : TIB388DUO (ref. article : p2220).
- (348) Sauerbrey, G. Z. *Z Phys* **1955**, 155, 206.
- (349) Laforgue, A.; Addou, T.; Bélanger, D. *Langmuir* **2005**, 21 (15), 6855.
- (350) Singh, M.; Holzinger, M.; Tabrizian, M.; Winters, S.; Berner, N. C.; Cosnier, S.; Duesberg, G. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (8), 2800.
- (351) Thörn, C.; Gustafsson, H.; Olsson, L. *Microporous Mesoporous Mater.* **2013**, 176, 71.
- (352) Gormally, M. V.; McKibben, R. K.; Johal, M. S.; Selassie, C. R. D. *Langmuir* **2009**, 25 (17), 10014.
- (353) Su, X.; Zong, Y.; Richter, R.; Knoll, W. J. *Colloid Interface Sci.* **2005**, 287 (1), 35.
- (354) Seifert, M.; Rinke, M. T.; Galla, H.-J. *Langmuir* **2010**, 26 (9), 6386.
- (355) Durand, F.; Kjaergaard, C. H.; Suraniti, E.; Gounel, S.; Hadt, R. G.; Solomon, E. I.; Mano, N. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 35 (1), 140.
- (356) Suraniti, E.; Tsujimura, S.; Durand, F.; Mano, N. *Electrochem. Commun.* **2013**, 26, 41.
- (357) Shafaat, H. S.; Rüdiger, O.; Ogata, H.; Lubitz, W. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2013**, 1827 (8–9), 986.
- (358) Brugna-Guiral, M.; Tron, P.; Nitschke, W.; Stetter, K.-O.; Burlat, B.; Guigliarelli, B.; Bruschi, M.; Giudici-Ortoni, M. T. *Extremophiles* **2003**, 7 (2), 145.
- (359) Belle, C.; Beguin, C.; Gautier-Luneau, I.; Hamman, S.; Philouze, C.; Pierre, J. L.; Thomas, F.; Torelli, S.; Saint-Aman, E.; Bonin, M. *Inorg. Chem.* **2002**, 41 (3), 479.
- (360) Gentil, S.; Serre, D.; Philouze, C.; Holzinger, M.; Thomas, F.; Le Goff, A. *Angew. Chem.* **2016**, 128 (7), 2563.
- (361) Datsyuk, V.; Kalyva, M.; Papangelis, K.; Parthenios, J.; Tasis, D.; Siokou, A.; Kallitsis, I.; Galiotis, C. *Carbon* **2008**, 46 (6), 833.
- (362) Thorseth, M. A.; Tornow, C. E.; Tse, E. C. M.; Gewirth, A. A. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, 257 (1), 130.
- (363) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, 2nd ed.; Wiley: New York, 2001.
- (364) Paulus, U. A.; Schmidt, T. J.; Gasteiger, H. A.; Behm, R. J. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 495 (2), 134.
- (365) Wang, F.-F.; Zhao, Y.-M.; Wei, P.-J.; Zhang, Q.-L.; Liu, J.-G. *Chem Commun* **2017**, 53 (9), 1514.
- (366) Shirley, D. A. *Phys. Rev. B* **1972**, 5 (12), 4709.
- (367) Scofield, J. H. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1976**, 8 (2), 129.

- (368) Mermoud, Floriane. Gazéification de charbon de bois à la vapeur d'eau : de la particule isolée au lit fixe continu, Institut Nationale Polytechnique de Toulouse, 2006.
- (369) Passot, Sylvain. Etude expérimentale et par modélisation de l'impact d'impuretés de l'hydrogène sur le fonctionnement des piles à combustible à membrane échangeuse de protons (PEMFC), Université Grenoble Alpes, 2012.
- (370) Besancon, B. M.; Hasanov, V.; Imbault-Lastapis, R.; Benesch, R.; Barrio, M.; Mølnvik, M. J. *Int. J. Hydrog. Energy* **2009**, 34 (5), 2350.
- (371) Li, B.; Qiao, J.; Zheng, J.; Yang, D.; Ma, J. *Int. J. Hydrog. Energy* **2009**, 34 (12), 5144.
- (372) Muhamad, E. N.; Takeguchi, T.; Wang, G.; Anzai, Y.; Ueda, W. J. *Electrochem. Soc.* **2009**, 156 (1), B32.
- (373) Takeguchi, T.; Anzai, Y.; Kikuchi, R.; Eguchi, K.; Ueda, W. J. *Electrochem. Soc.* **2007**, 154 (11), B1132.
- (374) Bhowmik, T.; Kundu, M. K.; Barman, S. *ACS Catal.* **2016**, 6 (3), 1929.
- (375) Jalan, V. M.; Landsman, D. A.; Lee, J. M. Electrochemical cell electrodes incorporating noble metal-base metal alloy catalysts. US Patent No 4,192,907, 1980.
- (376) Landsman, D. A.; Luczak, F. J. Noble metal-chromium alloy catalysts and electrochemical cell. US Patent No 4, 316,944, 1982.
- (377) Jalan, V. M.; Landsman, D. A. Noble metal-refractory metal alloys as catalysts and method for making. US Patent No 4, 186, 110, 1980.
- (378) Toyota. Toyota Mirai: la berline à pile à combustible <https://www.toyota.fr/world-of-toyota/articles-news-events/2014/toyota-mirai.json> (accessed Mar 20, 2017).
- (379) Zhu, Z.; Zhai, Y.; Dong, S. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6 (19), 16721.
- (380) Du, X. X.; He, Y.; Wang, X. X.; Wang, J. N. *Energy Env. Sci* **2016**, 9 (8), 2623.
- (381) Coleman, E. J.; Chowdhury, M. H.; Co, A. C. *ACS Catal.* **2015**, 5 (2), 1245.
- (382) Shao, M.; Shoemaker, K.; Peles, A.; Kaneko, K.; Protsailo, L. J. *Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (27), 9253.
- (383) Hong, W. T.; Risch, M.; Stoerzinger, K. A.; Grimaud, A.; Suntivich, J.; Shao-Horn, Y. *Energy Env. Sci* **2015**, 8 (5), 1404.
- (384) Liu, Y.; Ishihara, A.; Mitsushima, S.; Ota, K. *Electrochimica Acta* **2010**, 55 (3), 1239.
- (385) Liu, Y.; Ishihara, A.; Mitsushima, S.; Kamiya, N.; Ota, K. J. *Electrochem. Soc.* **2007**, 154 (7), B664.
- (386) Takasu, Y.; Oohori, K.; Yoshinaga, N.; Sugimoto, W. *Catal. Today* **2009**, 146 (1–2), 248.
- (387) Takasu, Y.; Suzuki, M.; Yang, H.; Ohashi, T.; Sugimoto, W. *Electrochimica Acta* **2010**, 55 (27), 8220.
- (388) Liu, G.; Zhang, H. M.; Wang, M. R.; Zhong, H. X.; Chen, J. J. *Power Sources* **2007**, 172 (2), 503.
- (389) Chisaka, M.; Ishihara, A.; Ota, K.; Muramoto, H. *Electrochimica Acta* **2013**, 113, 735.
- (390) Kazimierski, P.; Jozwiak, L.; Sielski, J.; Tyczkowski, J. *Thin Solid Films* **2015**, 594, 5.
- (391) Cao, B.; Neuefeind, J. C.; Adzic, R. R.; Khalifah, P. G. *Inorg. Chem.* **2015**, 54 (5), 2128.
- (392) Vante, N. A.; Tributsch, H. *Nature* **1986**, 323 (6087), 431.
- (393) Delacôte, C.; Bonakdarpour, A.; Johnston, C. M.; Zelenay, P.; Wieckowski, A. *Faraday Discuss* **2009**, 140, 269.

- (394) Vayner, E.; Sidik, R. A.; Anderson, A. B.; Popov, B. N. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111 (28), 10508.
- (395) Gamez, A.; Richard, D.; Gallezot, P. *Paris Fr.* **1999**, 401.
- (396) Arroyo-Ramírez, L.; Montano-Serrano, R.; Luna-Pineda, T.; Román, F. R.; Raptis, R. G.; Cabrera, C. R. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5 (22), 11603.
- (397) Fernández, J. L.; Walsh, D. A.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (1), 357.
- (398) Shao, M. H.; Huang, T.; Liu, P.; Zhang, J.; Sasaki, K.; Vukmirovic, M. B.; Adzic, R. R. *Langmuir* **2006**, 22 (25), 10409.
- (399) Kellett, R. M.; Spiro, T. G. *Inorg. Chem.* **1985**, 24 (15), 2373.
- (400) Kellett, R. M.; Spiro, T. G. *Inorg. Chem.* **1985**, 24 (15), 2378.
- (401) Bhugun, I.; Lexa, D.; Savéant, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118 (16), 3982.
- (402) Costentin, C.; Dridi, H.; Savéant, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (39), 13727.
- (403) Bediako, D. K.; Solis, B. H.; Dogutan, D. K.; Roubelakis, M. M.; Maher, A. G.; Lee, C. H.; Chambers, M. B.; Hammes-Schiffer, S.; Nocera, D. G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, 111 (42), 15001.
- (404) Lee, C. H.; Dogutan, D. K.; Nocera, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (23), 8775.
- (405) Roubelakis, M. M.; Bediako, D. K.; Dogutan, D. K.; Nocera, D. G. *Energy Environ. Sci.* **2012**, 5 (7), 7737.
- (406) Beyene, B. B.; Mane, S. B.; Hung, C.-H. *Chem Commun* **2015**, 51 (81), 15067.
- (407) Hawecker, J.; LEHN, J.-M.; Ziessel, R. *ChemInform* **1983**, 14 (40).
- (408) Connolly, P.; Espenson, J. H. *Inorg. Chem.* **1986**, 25 (16), 2684.
- (409) Coutard, N.; Kaeffer, N.; Artero, V. *Chem Commun* **2016**, 52 (95), 13728.
- (410) Bacchi, M.; Berggren, G.; Niklas, J.; Veinberg, E.; Mara, M. W.; Shelby, M. L.; Poluektov, O. G.; Chen, L. X.; Tiede, D. M.; Cavazza, C.; Field, M. J.; Fontecave, M.; Artero, V. *Inorg. Chem.* **2014**, 53 (15), 8071.
- (411) Baffert, C.; Artero, V.; Fontecave, M. *Inorg. Chem.* **2007**, 46 (5), 1817.
- (412) Bhattacharjee, A.; Weiss, A. K. H.; Artero, V.; Field, M. J.; Hofer, T. S. *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118 (20), 5551.
- (413) Wakerley, D. W.; Reisner, E. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16 (12), 5739.
- (414) Costa, G.; Mestroni, G.; de Savognani, E. *Inorganica Chim. Acta* **1969**, 3, 323.
- (415) Kaeffer, N.; Chavarot-Kerlidou, M.; Artero, V. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48 (5), 1286.
- (416) Jacques, P.-A.; Artero, V.; Pécaut, J.; Fontecave, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, 106 (49), 20627.
- (417) Kaeffer, N.; Morozan, A.; Fize, J.; Martinez, E.; Guetaz, L.; Artero, V. *ACS Catal.* **2016**, 6 (6), 3727.
- (418) Cobo, S.; Heidkamp, J.; Jacques, P.-A.; Fize, J.; Fourmond, V.; Guetaz, L.; Jusselme, B.; Ivanova, V.; Dau, H.; Palacin, S.; Fontecave, M.; Artero, V. *Nat. Mater.* **2012**, 11 (9), 802.
- (419) Andreiadis, E. S.; Jacques, P.-A.; Tran, P. D.; Leyris, A.; Chavarot-Kerlidou, M.; Jusselme, B.; Matheron, M.; Pécaut, J.; Palacin, S.; Fontecave, M.; Artero, V. *Nat. Chem.* **2012**, 5 (1), 48.
- (420) Wombwell, C.; Reisner, E. *Chem. - Eur. J.* **2015**, 21 (22), 8096.

Partie expérimentale

Materials and Methods

Solvents

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

Reagents

All the reagents: sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, citric acid, terbutyl ammonium perchlorate (TBAP), acetic acid, boric acid, phosphoric acid, tris(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine (THTPA), sodium chloride, 2-aminoanthraquinone, isopentyl nitrite, 6-amino-2-naphtoic acid, isopentyl nitrite, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), sodium nitrite, 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP), 4-nitrobenzaldehyde, 1,3-propanediol, 4-ethynylaniline were purchased from Sigma-Aldrich and used as received.

Commercial grade MWCNTs (9.5nm diameter, purity > 95%) were obtained from Nanocyl. SWCNTs (produced by HIPCO., purified) were obtained from Unidym Inc. Carbon nanomaterials were used as received without any purification step. Carbon cloth electrodes were purchased from PAXITECH (France).

Enzymes

Bilirubin Oxidase (E.C. 1.3.3.5 from *Myrothecium verrucaria*, 10.8 U mg⁻¹ solid) was used as received from Sigma Aldrich. BOD from *Bacillus pumilus* was expressed in *Escherichia coli* and purified at the CRPP.³⁵⁵ Laccase sp.30 was expressed in *Aspergillus niger* and purified at is2m.^{212,325} Finally, Hydrogenase from *Aquifex aeolicus* (MbH1) was extracted from *Aquifex aeolicus* bacteria and purified at the BIP4 according earlier described procedure.²⁴⁰

Apparatus

- Surface Characterization and chemical analysis

The morphology of the electrodes was investigated by SEM using an ULTRA55 FESEM based on the GEMINI FESEM column with beam booster (Nanotechnology Systems Division, Carl Zeiss NTS GmbH, Germany) and tungsten gun. 3D. Raman spectra were recorded using a Renishaw inVia spectrometer. NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 operating at 400 MHz for ¹H. ESI mass spectra were recorded with a Bruker APEX-Qe ESI FT-ICR mass spectrometer. XPS analysis was performed using a Thermoelectron ESCALAB 250 device (ICGM, France). The X-ray excitation was provided by a monochromatic Al-K α (h ν =1486.6 eV) source. The analyzed area was ~0.15 mm². The background signal was removed using the Shirley method.³⁶⁶ The surface atomic concentrations were determined from photoelectron peaks areas using

the atomic sensitivity factors reported by Scofield.³⁶⁷ Binding energies (BE) of all core levels were referred to the C=C of C1s carbon at 284.4 eV. X-Band EPR spectra were recorded on a BRUKER EMX Plus spectrometer controlled with the Xenon software and equipped with a Bruker teslameter. A Bruker nitrogen flow cryostat connected to a high sensitivity resonant cavity was used for 100K measurements. The spectra were simulated using the SIMFONIA software (BRUKER). QCM-D measurements were performed using E1–E4 instruments (Q-Sense, AB, Göteborg, Sweden) equipped with one (E1) or four (E4) laminar flow chambers and polished AT-cut piezoelectric quartz crystals (diam. 14 mm) covered by a 100 nm thick gold layer (Qsx 301-Q-Sense). f and D were measured at the fundamental resonance frequency (5 MHz) as well as at the third, fifth, seventh, ninth, eleventh, and thirteenth overtones ($n = 3, 5, 7, 9, 11$ and 13).

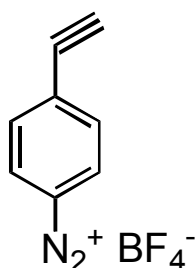
- Electrochemical measurements :

The electrochemical experiments were performed in 0.1M Britton Robinson buffer (v/v 1:1:1 acetic acid, boric acid and phosphoric acid) from pH 2 to 9 and in 0.5 M H₂SO₄ (pH=0.3) in a three-electrode electrochemical cell using a VMP3 Multi Potentiostat (Biologic, France). RRDE experiments were performed in a three electrode electrochemical cell setup connected to a bipotentiostat (SP-300 Bio-Logic) and a MSR rotator (Pine Instruments), composed of Pine rotating ring disk electrode (RRDE) with glassy carbon disk (0.196 cm²) and platinum ring (0.11cm²). The surface of the glassy carbon (GC) electrodes were polished with a 2 μm diamond paste purchased from Presi (France) and rinsed successively with water, acetone, and ethanol. A Pt wire placed in a separated compartment was used as counter electrode, and the Ag/AgCl (saturated KCl) served as a reference electrode ($E_{\text{Ag/AgCl(sat.KCl)}} = 0.197$ vs SHE). Electrochemical Data fitting was performed with OriginPro9. All currents are normalized with the geometric surface of the electrodes (0,071 cm² or 0,196 cm²).

Experimental part

Synthesis

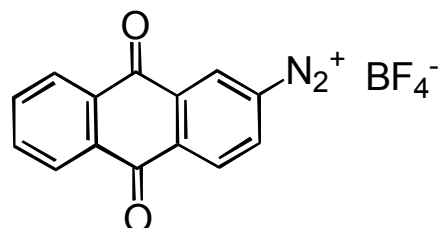
- Synthesis of 4-ethynylbenzene diazonium tetrafluoroborate:



The synthesis was adapted from a work of Limoges *et.al.*³³² A cold solution of NaNO₂ (5,06 mmol, 349 mg) in milliQwater (1.9 mL) was added dropwise to a cold solution (over an ice bath) of 4-ethynylaniline (4.6 mmol, 538 mg) in 1M of HCl (7.8 mL). After adding of NaNO₂, the solution turns from orange to brown. The mixture was left to

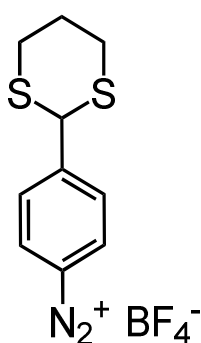
react at 4°C for 1 hours and then 1.25 mL of a saturated NaBF₄ solution in milliQwater was added. Then, the mixture was filtered over a Bücher filtration system and then rinsed with 3*50 mL of cold ether. The crude product was re-dispersed in a small amount of acetonitrile, filtered and rinsed with cold ether several times in order to completely removed the diazonium salts. After drying under vacuum, a claret-colored powder is obtained. yield = 15 %. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm) = 4.22 (s, 1H), 7.94-7.97 (d, 2H, ³J = 8.7 Hz), 8.43-8.45 (d, 2H, ³J = 8.7 Hz). ESI-MS: shows the [M+1]⁺peak at 129.0 M/Z corresponding to the desired specie without BF₄⁻ anion.

- Synthesis of 2-anthraquinone diazonium tetrafluoroborate:



2-aminoanthraquinone (2.2 mmol, 490 mg) are added to a 10 mL solution of acetonitrile under stirring and stream of argon. The mixture is cool down at -40°C. NOBF₄ (2.2 mmol, 257 mg) in 1 mL of MeCN is then added dropwise to the solution. The reaction is left to react at -40°C under a vigorous stirring for 30 minutes and then return at ambient temperature for 30 minutes more. The mixture is washed and trirurated with 70 mL of cold ether until a precipitate is obtained. The crude product is filtrated using a Büchner filtration system, washed with cold ether and then dried under vacuum. Yield = 56 %. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm) = 6.67 (s, 2H), 6.94-7.96 (d, 1H, ³J = 8.7 Hz), 7.3 (s, 1H), 8 (m, 5H). IR (ATR): ν (cm⁻¹)=1040 (BF₄⁻), 1672 (C=O), 2290 (N₂⁺), 3091 (=CH).

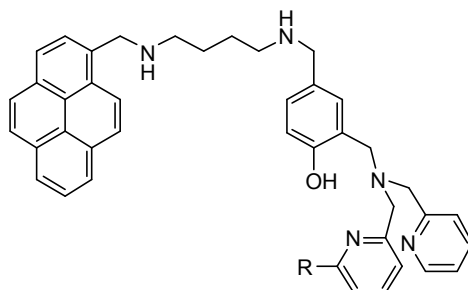
- Synthesis of (1,3-dithiane)benzene diazonium tetrafluoroborate:



2-(4-Aminophenyl)-1,3-dithiane was synthesized as previously described.^{333,334} In a Schlenk tube, 2 mL of an acetonitrile solution are deoxidized under an argon stream for 20 minutes. 2-(4-Aminophenyl)-1,3-dithiane is then dissolved (0.126 mmol, 27 mg). The mixture is cool down at -40 °C. 2 mL of a NOBF₄ solution (0.145 mmol, 17mg) is added dropwise. The solution turns to yellow and a precipitate is formed. The reaction is left to react for 1 hour and then return to ambient temperature for another 1 hour. The product is extracted with 20 mL of ether and the solvent are concentrated under vacuum. A crude red powder is obtained and rinsed with a small amount of diethyl

ether in order to remove the diazonium salts. A white solid is finally obtained. Yield = 15 %. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 1.71 (s, 1H), 2.14 (s, 1H), 2.80 (m, 2H), 2.84 (m, 2H), 5.35 (s, 1H), 7.83-7.86 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz), 8.27-8.29 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz). IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 1040 (BF_4^-), 1576 (aro), 2298 (N_2^+), 3091 (=CH).

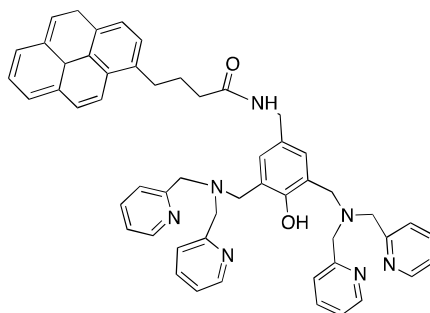
- General procedure for mononuclear ligand synthesis:



N1-(pyrene-1-ylmethyl)butane-1,4-diamine (0.238 g-0.78 mmol) and 1 equivalent of CHOLH were stirred overnight at room temperature in MeOH/THF (3:1). NaBH_4 (0.137 g-2.34 mmol) was then added in small portion and the solution was further stirred for 2 h at room temperature. The reaction was then extracted with dichloromethane and brine. The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. Column chromatography on silica gel with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$ (85:10:5) as an eluent yielded the desired compound as white solid. R = H yield = 60 %. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 8.52 (d, 2H, $^3J = 5.20$ Hz), 8.40-8.00 (m, 9H), 7.58 (td, 2H, $^3J = 10.12$ Hz, $^3J = 1.6$ Hz), 7.28 (s, 2H), 7.11 (dd, 2H, $^3J = 9.72$ Hz, $J = 8.04$ Hz), 6.72 (s, 1H), 6.76 (dd, $^3J = 11.76$ Hz), 4.49 (s, 2H), 3.72 (s, 4H), 3.62 (s, 2H), 3.51 (s, 2H), 2.85 (t, 2H, $^3J = 8.48$ Hz), 2.62 (t, 2H, $^3J = 8.64$ Hz), 1.62 (m, 4H). ESI-MS: shows the $[\text{M}+1]^+$ peak at 622.3 m/z.

R = CH_3 , yield 70 %. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.45 (d, 1H, $^3J = 3.56$ Hz), 8.30-7.90 (m, 9H), 7.52 (td, 1H, $^3J = 6.16$ Hz, $^3J = 1.24$ Hz), 7.4 (t, 1H, $^3J = 6.16$ Hz), 7.25 (d, 1H, $^3J = 6.28$ Hz), 7.04 (td, 1H, $^3J = 5.52$ Hz, $J = 4.36$ Hz), 7 (d, 1H, $^3J = 6.12$ Hz), 6.9 (d, 2H, $^3J = 6.04$ Hz), 6.7 (2H, d, $^3J = 6.52$ Hz), 4.41 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.65 (s, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.52 (m, 2H), 2.76 (t, 2H, $^3J = 5.20$ Hz), 2.54 (t, 2H, $^3J = 5.16$ Hz), 2.47 (s, 3H), 1.53 (m, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 148.82 (CHaro), 136.9 (CHaro), 136.7 (CHaro), 130.43 (CHaro), 129.44 (CHaro), 128.13 (CHaro), 127.48 (CHaro), 127.41 (CHaro), 127.29 (CHaro), 126 (CHaro), 125.27 (CHaro), 125.18 (CHaro), 124.88 (CHaro), 123.10 (CHaro), 122.9 (CHaro), 122.12 (CHaro), 121.68 (CHaro), 119.86 (CHaro), 116.48 (CHaro), 59.04 (CH_2), 58.97 (CH_2), 56.47 (CH_2), 52.37 (CH_2), 51.47 (CH_2), 49.61 (CH_2), 48.17 (CH_2), 28.18 (CH_2), 27.42 (CH_2), 24.15 (CH_3). ESI-MS: shows the $[\text{M}+1]^+$ peak at 636.2 m/z.

- Dinuclear ligand (BTP):



Pyrene butyric acid (0.16 g, 0.000541 moles, 1 eq.) was dissolved with HATU 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium-3-oxid hexafluorophosphate (0.201 g, 0.000529 moles, 1 eq.) in CH_2Cl_2 (20mL) DMF (5mL) and stirred until soluble. Et_3N (0.2 mL, 0.00143 moles, 2.7 eq.) was added and stirred under argon with dropwise addition of the amine in CH_2Cl_2 . The resulting solution was stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated and the product purified on Al_2O_3 gel using DCM/EtOAc/MeOH as eluent to yield a yellow oil, 0.094 g, 0.00011 moles, 22 % yield. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.47 (d, 4H, $J = 4.60$ Hz), 8.25 - 7.80 (m, 9H), 7.50 (m, 4H), 7.41 (d, 4H, $J = 7.76$ Hz), 7.11 (s, 2H), 7.0 (m, 4H), 5.74 (s, 1H), 4.34 (d, 2H, $J = 5.36$ Hz), 3.83 (s, 8H), 3.77 (s, 4H), 3.37 (t, 2H, $J = 7.52$ Hz), 2.3 (m, 2H), 2.22 (m, 2H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 148.85 (CH_{ar}), 136.53 (CH_{ar}), 128.90 (CH_{ar}), 127.46 (CH_{ar}), 127.35 (CH_{ar}), 127.34 (CH_{ar}), 126.65 (CH_{ar}), 125.81 (CH_{ar}), 124.85 (CH_{ar}), 124.76 (CH_{ar}), 127.75 (CH_{ar}), 123.37 (CH_{ar}), 122.96 (CH_{ar}), 121.99 (CH_{ar}), 59.67 (CH₂), 54.67 (CH₂), 43.41 (CH₂), 36.11 (CH₂), 32.77 (CH₂), 27.54 (CH₂). ESI-MS: peak at 817.2 m/z corresponding to $[\text{M}+1]^+$.

- Carbon nanotubes functionalization:

SW_nCOOH and MW_nCOOH

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

Mononuclear nickel bis-diphosphine based anodes

- Preparation of [Ni(Cy,Arg)₂]-modified SWnCOOH electrode:

MWCNT film underlayer was prepared by drop coating 2*20 μL of a 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dispersion of MWCNTs in N-methyl pyrrolidinone (NMP) onto the GC electrode (0.071 cm^2). Then 20 μL of a 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ solution of f-SWCNTs in NMP was deposited and allowed to dry under vacuum. SWnCOOH electrode was finally soaked in a 2 mM solution of nickel complex in 0.1 MES/HEPES pH 6 for 60 min. The electrode was finally rinsed with milliQwater.

- Bottom-up synthesis of nickel derivatives:

The bottom-up synthesis was performed onto MWCNT covered glassy carbon electrodes. 40 μL of $\text{P}_2^{\text{Cy}}\text{N}_2^{\text{Pyr}}$ ligand (3mM) in dried DMF was incubated for 45 min onto the electrode surface. The, 40 μL of $[\text{Ni}(\text{CH}_3\text{CN}_6)].(\text{BF}_4)_2$ in dried acetonitrile (0.3 mM) was incubated onto electrode for 45 minutes. Finally, 40 μL of $\text{P}_2^{\text{Cy}}\text{N}_2^{\text{Arg}}$ ligand in dried methanol (3 mM) was deposited onto the electrode surface for 45 minutes. Several washing step were performed in between each incubation steps. Electrodes were stored at room temperature.

Laccase based biocathodes

- Preparation of carbon nanotubes film:

MWCNT films were prepared by drop-coating 1 layer of 20 μL of a 5 mg mL^{-1} dispersion of MWCNTs in NMP onto glassy carbon electrode surface. The deposit was then allowed to dry under vacuum.

- Electrografting of aryl diazonium salt:

2 mM of aryl diazonium salt were dissolved into a 5 mL MeCN/TBAP solution (0.1M TPAP in MeCN) in the glovebox. CNT electrodes were deep into the electrochemical cell and cyclo voltammetry was performed for 5 scans at 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. The potential window was choosen according to the OCV of the working electrode. After electrografting process, the electrode was thoroughly rinsed with acetonitrile.

- Spontaneous deposition of 4-ethynylbenzene diazonium tetrafluoroborate onto cnt electrode:

The CNT electrode was immersed in a 2 mM solution of 4-ethynylbenzene diazonium tetrafluoroborate in acetonitrile for 15 minutes and then thoroughly rinsed with acetonitrile.

- Clickoxyme procedure for the immobilization of DENDRIMERE-N₃ and RAFT-N₃ derivatives:

20 μL of dendrimere-N₃ (MW = 891.94) or RAFT-N₃ (MW = 1197.31) in 0.1% TFA in water/0.1% TFA in water-MeCN (9:1) solution (1:1) (8mM) are incubated onto the benzaldehyde modified CNT electrode for 45 minutes at 37°C. The electrodes are then thoroughly rinsed with 0.1% TFA in water/0.1% TFA in water-MeCN (9:1) solution (1:1) and acetonitrile.

- 1,3-Dipolar Huisgen Cycloaddition of Lac3-Alcyne and Unik-161 enzyme:

3 solutions A, B and C are prepared in microeppendorf containing 66 μL solutions. 51 μM of Lac3-alkyne or Unik161-alkyne in 50 mM acetate buffer solution (pH5) are placed in eppendorf A. 43 μM of CuSO₄·5H₂O (33 μL) + 900 μM of THPTA (33 μL) are placed in eppendorf B. 180 μM of sodium L ascorbate are placed in eppendorf C. Each eppendorf is separately deoxygenated with argon. Then, solution A is mixed with solution B, and solution A+B is mixed with solution C in order to obtain the final click solution containing 17 μM of enzyme, 7 μM of CuSO₄·5H₂O, 59 μM of sodium L-ascorbate and 148 μM of THPTA. 40 μL of click solution is incubated onto the azide-modified CNT electrode surface for 1 hour at room temperature. The electrode is then thoroughly rinsed with the acetate buffer solution.

- QCM-d experiment:

Experiments were conducted either in a continuous flow of buffer with a flow rate of 50 μL min⁻¹ by using a peristaltic pump (ISM935C, Ismatec, Zurich, Switzerland). Prior to use, the gold-coated crystal sensors (Q-Sense QSX 301) were coated with MWCNT films using a membrane transfer procedure. The functionalized gold quartz crystal was then mounted in the QCM-D flow module and the formation of the biomolecular layer was monitored in the presence of acetate buffer pH 5 as the running buffer.

Copper complexes based cathodes

- Preparation of MWCNT electrodes:

MWCNT films were prepared by drop-coating 2 drops of 20 μL of a 5 mg mL⁻¹ dispersion of MWCNTs in NMP onto glassy carbon electrode surface. The deposit was then allowed to dry under vacuum.

- Bottom-up synthesis of copper derivatives onto CNT electrodes:

40 μL of each ligand (t-Bu,Me ; t-Bu,CF₃ ; H,Me or BTP) in dried acetonitrile (3 mM) was incubated for 45 min on the electrode surface. After several washings, 40 μL of either CuCl₂·2H₂O or Cu(ClO₄)₂·6H₂O (0.3mM) in ultrapure water was incubated for

45 minutes and thoroughly washed. Functionalized electrodes were stored at room temperature.

Fuel cells

- Preparation of the hybrid enzymatic-bio inspired H₂/air fuel cell:

For the anode, two layers of SWnCOOH were first deposited (2×10 μL of $12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ dispersion in NMP with intermediate drying under vacuum) on the microporous side of a GDL followed by soaking in a 2 mM solution of 1 in 0.1 MES/HEPES pH 6 for 60 min. For the cathode, the GDL was first modified by drop-coating 20 μL of a $0.37 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ dispersion of MWnCOOH. After drying under vacuum, the electrode was drop-casted with 20 μL of a solution of *MvBOD* (2.5 mg mL^{-1} in 0.1 M phosphate buffer pH 7). Before use, all electrodes were rinsed with milliQ water. Both GDL electrodes were then placed face-to-face in a locally-developed fuel cell setup. This consists in a 5 cm^2 hydrogen/air fuel cell with graphite bipolar plates and a serpentine gas flow design. Commercial membrane-electrode assemblies (1 mg cm^{-2} Pt loading) were employed at both the cathode and the anode sides for the Pt/C-based fuel cell. Polarization and power curves were obtained by 30 seconds -galvanostatic discharges at room temperature under atmospheric H₂ gas pressure with humidified H₂ and air gas flows of 20 mL min^{-1} . For experiments performed at pH 5, only a 3 mm diameter surface of the GDL is in contact with the electrolyte, giving an equal surface area of 0.071 cm^2 at both the anode and the cathode. A 9 mm diameter and 5 mm thick Teflon chamber, filled with buffer, was used to separate the gas-diffusion electrodes.

- Preparation of the Proton exchange membrane fuel cell (PEMFC):

For the PEMFC setup, nafion membrane 212 was treated according to the standard procedure of 60 min in a 5 % (w.t.) H₂O₂ solution at 80 °C, 60 min in ultra-pure water at 80 °C, and finally 60 min in an 8 % (w.t.) H₂SO₄ solution at 80 °C. After each treatment, the membrane was rinsed three times in ultra-pure water in order to remove H₂O₂ traces. Nafion membrane was stored in ultra-pure water before used. The same electrochemical procedure as the hybrid fuel cell was employed for the measurement of the fuel cell performances. Commercial Pt/C GDE (diameter of 4 cm^2) were used as both cathode and anode.

- Preparation of the biomimetic fuel cell:

The same procedure as the hybrid fuel cell was employed for the fuel cell setup. The anode was composed of the nickel complex immobilized onto SWnCOOH modified GDL. At the cathode side, the dinuclear copper complex was directly synthesized onto the CNT GDL electrode surface, as reported in the experimental section. The fuel cell performances were measured in a 0.1M Britton-Robinson buffer at pH4 and at room temperature.

Annexes

Annexes	249
Annexes I : Les différentes méthodes de production de l'Hydrogène.....	251
A/ Le vaporéformage du méthane.....	251
B/ La gazéification du charbon de bois et la production à partir de la biomasse...	251
C/ L'oxydation partielle du méthane	251
D/ L'électrolyse de l'eau.....	252
E/ Les différentes qualités d'hydrogène obtenues après purification.....	252
Annexes II : Des alternatives au platine, à l'anode et à la cathode, à base de métaux nobles.	253
A/ Les catalyseurs anodiques	253
B/ Les catalyseurs cathodiques	254
1. Les alliages de Pt de type Pt-M/C	254
2. Les structures cœur-coquille.....	254
3. Les oxydes métalliques.....	254
4. Les nitrures et oxynitrures métalliques.....	254
5. Les sulfures et sélénures métalliques	255
6. Les catalyseurs à base de palladium.....	255
Annexes III : Les modèles bio-inspirés pour l'activation ou la production d'H₂.....	256
A/ Les catalyseurs à base de porphyrine	256
B/ Les cobaloximes	257
C/ Les catalyseurs à base de cobalt diimine-dioxime	257

Annexes I : Les différentes méthodes de production de l'Hydrogène

A/ Le vaporéformage du méthane

95 % de l'hydrogène est produit par vaporéformage du méthane. Lors de ce procédé, le méthane, issu du gaz naturel, est combiné à de la vapeur d'eau (chauffée entre 800 et 1000°C) et soumis à une pression comprise entre 13 et 220 bars. Le but est de produire un gaz de synthèse qui contient de l'hydrogène, du monoxyde de carbone. La synthèse, catalysée par le nickel, se déroule en deux étapes :

- 1) L'oxydation du méthane : $\text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{H}_2 + \text{CO}$;
 - 2) L'oxydation du monoxyde de carbone : $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2$;
- pour conduire à l'équation bilan suivante : $\text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}_2 + \text{CO}_2$.

Ainsi, la combustion d'une mole de méthane produit 4 moles d'hydrogène et une mole de dioxyde de carbone. La Figure annexe 1 : Composition du gaz de synthèse après vaporéformage en fonction des sources d'hydrocarbures utilisées²⁰ Figure annexe 1 récapitule la composition des différents gaz de synthèse après vaporéformage. Constitué à 75% d'H₂, il contient des impuretés en quantité non négligeable. Des étapes de purification seront donc nécessaires.

Cette technique est peu chère : 1 kg d'H₂ produit coûte environ 1 euro 50.

Composition (% vol)	Méthane	Gaz Naturel
CH ₄	3,06	2,91
CO	12,16	12,62
CO ₂	9,66	10,40
H ₂	75,12	73,98
N ₂	-	0,09

Figure annexe 1 : Composition du gaz de synthèse après vaporéformage en fonction des sources d'hydrocarbures utilisées²⁰

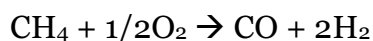
B/ La gazéification du charbon de bois et la production à partir de la biomasse

La gazéification du charbon de bois a lieu à une température élevée comprise entre 1200 et 1500°C. Elle produit un gaz de synthèse composé de 15 % d'H₂ et 30% de CO.

La biomasse vient des sous-produits de l'industrie du bois (déchets, sciures) et de l'agriculture (paille,...). Cette dernière peut être transformée par gazéification. C'est un traitement thermochimique qui transforme les matières organiques en gaz de synthèse (H₂ et CO).³⁶⁸ Cette technique rejette du CO₂, réabsorbée par les processus photosynthétiques terrestres, et ne favorise donc pas l'émission des GES.

C/ L'oxydation partielle du méthane

Cette voie consiste à produire du gaz de synthèse à partir de l'oxydation du méthane sous forme de gaz naturel par l'oxygène de l'air :

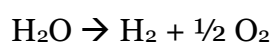


Ainsi, 2 moles d'H₂ par mole de CH₄ sont produites. Ce procédé nécessite cependant l'utilisation de gaz inertes comme l'argon ou l'azote.³⁶⁹

D/ L'électrolyse de l'eau

Toutes les méthodes citées précédemment rejettent du CO₂ et nécessite la purification des gaz de synthèse pour éliminer les impuretés telles que le monoxyde de carbone (CO), le disulfure d'hydrogène (H₂S), l'ammoniaque (NH₃) ou les gaz inertes.³⁷⁰

L'électrolyse de l'eau permet de produire de l'hydrogène par « voie verte ». La molécule d'eau est clivée pour conduire à une mole d'hydrogène et une demi-mole d'oxygène selon la réaction suivante :



Ce procédé peut avoir lieu à haute température (1200°C), par voie alcaline à des températures inférieures à 120°C, ou en conditions acides grâce à une membrane échangeuses de protons. Cependant, il nécessite une source d'énergie qui pourrait provenir de l'énergie renouvelable : sur la plateforme MYRTE, l'électrolyseur est couplée à un panneau photovoltaïque.⁶ Finalement, les impuretés sont des traces d'oxygène et d'eau. Ce processus reste coûteux, environ 5 à 30 euros par kg d'H₂ produit.

E/ Les différentes qualités d'hydrogène obtenues après purification

Afin de diminuer les teneurs en CO et CO₂, plusieurs techniques de purification existent. Elles passent par des étapes de méthanation ou adsorption sélective des impuretés sur des tamis moléculaires (PSA pour « pressure swing adsorption » en anglais). La Figure annexe 2 donne les différentes puretés d'H₂ après purification atteignant ainsi une pureté comprise entre 95% et 99,9%. Le rendement, correspondant au taux de récupération de H₂ dans le gaz de synthèse, est le plus élevé pour le vaporéformage suivi d'une étape de méthanation.²⁰

Méthodes	Vaporéformage + méthanation	Vaporéformage + PSA	Oxydation partielle
Pureté de H ₂	95 à 98%	99,9%	99,9%
Rendement	Env. 98%	85 à 90%	85 à 88%

Figure annexe 2 : Différentes pureté d'H₂ obtenues en fonction des méthodes de production après purification²⁰

Annexes II : Des alternatives au platine, à l'anode et à la cathode, à base de métaux nobles.

A/ Les catalyseurs anodiques

En 2009, Li *et al.*³⁷¹ ont mis au point un nouveau type de catalyseur à base de nanoparticules d'iridium et de vanadium sur support de carbone. Ils ont obtenu une performance remarquable avec une densité de puissance maximale de 1W/cm² dans une PEMFC avec 40% de Pt/C à la cathode pour une stabilité de 100 heures en décharge continue.

Le palladium est un métal noble, situé dans la 10^{ème} colonne du tableau périodique (comme le Pt). Son activité catalytique d'oxydation d'H₂ est faible, cependant l'alliage Pd-Pt (Pt < 5-10%) permet d'obtenir les mêmes performances que le platine.¹⁹ Par ailleurs, la présence de palladium augmente la tolérance du platine au monoxyde de carbone, diminuant fortement les potentiels sites de fixation. Plusieurs types d'alliages sans Pt ont été étudiés. La présence de nanoparticules de SiO₂ et TiO₂ permet d'augmenter la dispersion du palladium et donne de bonnes densités de courants. La forte diminution de la tolérance au CO dans cette configuration compense largement les pertes de performances par rapport au platine.^{372,373} Enfin, les nitrures de palladium sont une nouvelle classe de catalyseurs actif sur une large gamme de pH.³⁷⁴

Catalyseurs	Types	Performances	Avantages	Inconvénients	Ref
Nanoparticules (NP) d'iridium et de vanadium sur support de carbone	40%Ir-10%V/C	OCV = 0.95V P _{max} = 1 W /cm ² à 0.6V avec une cathode Pt/C 40% et 70°C Stable 100h	Bonne dispersion des NPs (2-3nm) Faible quantité utilisée : 0.4 mg.cm ⁻² Stable en milieu acide	Utilisation de métaux nobles	371
A base de palladium	Pd-Pt (avec Pd > 50%) Pd-Pt-Ru/C Pd/TiO ₂ /C Pd/SnO ₂ /C Pd-CN _x (Pd = 0.043 mg cm ⁻²)	Pd/SnO₂/C : j = 0.2 A/cm ² (vs 0.015 pour Pd/C et 0.1 pour Pt/C) Pd-CN_x : j = 10mA cm ⁻² à une faible surtension de 55 mV sur une gamme de pH variant de 0 à 14	Pd moins cher que Pt Présence de Pd dans augmente la tolérance au CO	Nécessité d'une petite quantité de platine pour certains alliages Pd est un métal noble	19 372,373 374

Figure annexe 3 : Différents types de catalyseurs anodiques à base de métaux nobles.

B/ Les catalyseurs cathodiques

1. Les alliages de Pt de type Pt-M/C

Découvert en 1980³⁷⁵⁻³⁷⁷, ils sont utilisés depuis septembre 2015 dans la Toyota Mirai, équipe d'un stack de PEMFC.³⁷⁸ Ils sont dénommés Pt-M/C où M est un métal non-noble ou non : les plus performants sont à base de fer, cobalt ou nickel.^{379,380} Leur activité et stabilité sont plus importantes que le platine pur car la distance Pt-Pt est plus courte, la rugosité est plus élevée et la formation de couches d'oxydes est retardée.³⁸¹

2. Les structures cœur-coquille

Seul 30% des atomes des nanoparticules de platine sont utilisés au cours de la catalyse. Ainsi, une structure cœur-coquille a été envisagée afin de réduire la quantité de Pt : la nanoparticule est composée d'un cœur de faible diamètre d'un élément moins cher (palladium, ruthénium ou rhénium) et recouverte par un film de Pt. En 2010, *Shao et al.*³⁸² ont démontré qu'un cœur de Pd-Cu recouvert de Pt (Pt/Pd-Cu/C) était 14 fois plus actif que Pt/C en termes d'activité massique, pour la réduction de l'oxygène, atteignant ainsi 2,8 A.mg⁻¹Pt.

3. Les oxydes métalliques

Les oxydes métalliques³⁸³ sont connus pour être stables en conditions acides et ont été proposés comme remplaçant des supports de carbone. Cependant, ils sont de mauvais conducteurs électriques et manquent de site d'adsorption de l'oxygène. Plusieurs méthodes permettent de passer outre ces inconvénients : la formation de nanoparticules, la modification de surface ou encore l'utilisation d'alliages. De nombreux exemples, non exhaustifs, dans la littérature ont été étudiés : (1) ZrO_{2-x}³⁸⁴, Co₃O_{4-x}, TiO_{2-x}, Nb₂O_{5-x}³⁸⁵ ; (2) MO_x où M = Ti, Zr, Ta, Ru, Ir.^{386,387} Leurs fabrication induit l'introduction de lacunes électroniques, qui augmentent l'énergie de liaison oxygène-métal et donc la capacité à réduire O₂. De plus, la diminution de la taille cristalline permet d'accroître le nombre de sites catalytiques, de défauts et la conductivité électroniques. Les oxydes métalliques atteignent des OCP supérieures ou égales à 0,9 V vs RHE. ^{388,389}Récemment, *Kazimierski et al.*³⁹⁰ ont mis au point une PEMFC, composé d'un oxyde de cobalt CoO_x à la cathode et d'une électrode de Pt/C à l'anode. Cette pile a une densité de puissance maximale de 5,3 W.m⁻² et d'une f.e.m assez faible de 0,635V.

4. Les nitrures et oxynitrures métalliques

Les nitrures métalliques, de types MN, ont une activité inférieure aux oxydes métalliques. MoN, Mo_xN_z ou Co_xMo_yN_z atteignent des OCP proche de 0,6 V vs RHE et peuvent donc être qualifiés de catalyseurs médiocres.³⁹¹ Les oxynitrures métalliques, MO_xN_y (où M = Ta, Nb, Zr, Ti,...), ont grâce au dopage en azote, une meilleure conductivité électrique, et OCP comprises entre 0,7 et 0,8V.^{388,389}

5. Les sulfures et sélénures métalliques

Les sulfures et sélénures métalliques à base de soufre ou de sélénium sont étudiés depuis que Alonso Vante et Tributsh ont découvert en 1986 que $\text{Ru}_2\text{Mo}_4\text{Se}_8$ était capable de réduire le dioxygène en eau.³⁹² Ceux à base de ruthénium, synthétisés à haute température (1000-1700°C) et pression, sont les plus étudiés. Le potentiel de catalyse de réduction de l'oxygène pour Ru_xSe_y est autour de 0,85V vs RHE dans une solution d' H_2SO_4 à 80°C.³⁹³ Il a été suggéré que la présence de S et Se permet de diminuer l'énergie de liaison de l'oxygène. L'activité des atomes de Ru est dépendante du nombre d'atomes de Se conduisant à une meilleure stabilité quand le nombre d'atomes de Se est élevé.²⁶

Ceux à base de métaux non-nobles comme le cobalt, le nickel ou le fer sont étudiés depuis une quarantaine d'années. Ceux à base de cobalt ont une activité catalytique supérieure : Co_xS_y a une OCP d'environ 0,8 V vs RHE, soit 300 mV supérieure aux catalyseurs de sulfures Co_xSe_y correspondant.³⁹⁴ Même si l'abondance du cobalt sur terre est supérieure, les chalcogénures à base de ruthénium restent les plus performants.

6. Les catalyseurs à base de palladium

Tout comme pour l'oxydation du dihydrogène, les catalyseurs à base de palladium, alliages Pt-Pd/C ou les alliages Pd-M/C (avec $M = \text{Co}, \text{Ni}, \text{Fe}$) sont très étudiés pour la réaction de réduction du dioxygène (ORR). L'inconvénient majeur est que les pertes de surtension cathodiques sont comprises entre 0,3 et 0,4V (pour comparaison 0,2V pour le platine) dues aux limites cinétiques de l'ORR

Les alliages Pt-Pd ont été examinés, pour la première fois, en tant que catalyseurs pour l'ORR par Gamez *et al.*³⁹⁵ Ainsi, une petite quantité de palladium d'environ 9 at% permet d'augmenter les performances catalytiques. Les alliages Pd-M/C, à base de cobalt, restent les plus prometteurs.³⁹⁶ Selon une étude thermodynamique, une quantité de Co de 10 à 30 % permet d'obtenir des performances proches de Pt/C.³⁹⁷ Sur ce principe, Shao *et al.* ont mis au point des nanoparticules de $\text{Pd}_2\text{Co}/\text{C}$ atteignant une OCP de 0.84V vs RHE avec des densités de courant similaires à Pt/C.³⁹⁸ Plus la composition en cobalt augmente, plus la taille des particules diminue, accentuant ainsi la surface active.¹⁹

Annexes III : Les modèles bio-inspirés pour l'activation ou la production d'H₂

A/ Les catalyseurs à base de porphyrine

A l'origine, les porphyrines métallées ont été développées comme modèles des cytochrome c oxydases, enzymes localisées la chaîne respiratoire mitochondriale et impliquées dans la production d'ATP. Les premières métalloporphyrines pour la production d'H₂ ont été introduites par Spiro en 1985 sous forme de porphyrines de cobalt, libres ou immobilisés sur électrodes.^{399,400} Capable de réduire les protons, le centre métallique est un atome de fer^{401,402}, nickel⁴⁰³ ou cobalt^{399,400,404-406}.

Nocéra a développé une série de catalyseurs, possédant une structure « porphyrine de Hangman » [Co(HPX-CO₂H)] (Figure annexe 4B). Ces molécules ont un groupement acide-base (acide sulfonique ou carboxylique), qui permet le transfert intramoléculaire de protons couplé à un transfert d'électrons (PCET : « proton-coupled electron transfer » en anglais). Ainsi, la formation de l'hydrure Co(II)-H correspondant, permet la génération d'H₂.⁴⁰⁵ Ces groupements chimiques particuliers diminuent la surtension et augmentent le TOF.

Le problème majeur des catalyseurs à base de porphyrine est leur stabilité en solvant organique et la surtension élevée pour atteindre des performances importantes. Par exemple, la porphyrine de fer [Fe(TPP)Cl] (Figure annexe 4A), publié par Savéant en 1996⁴⁰¹, réduit les protons dans le DMF avec un TOF de 10⁵-10⁶ s⁻¹ mais supérieure à une surtension de 900 mV. Récemment, une nouvelle classe de porphyrine de cobalt soluble en solvant aqueux, grâce à la présence de groupements sulfonates, a été synthétisée (Figure annexe 4C). Cette dernière réduit les protons avec un TOF de 1,83 s⁻¹ et un TON élevé de 1,9 x 10⁴ après une électrolyse de 72h.⁴⁰⁶ Ainsi, son intégration dans un système hétérogène serait envisageable.

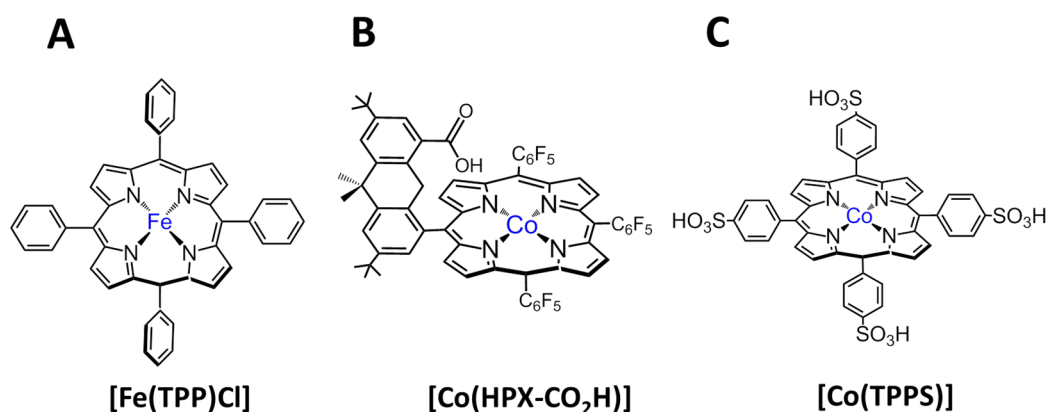


Figure annexe 4 : Exemples de catalyseurs à base de porphyrines.

B/ Les cobaloximes

Les cobaloximes ont été introduites en tant que catalyseurs de réduction des protons par Lehn en 1983⁴⁰⁷ et Espenson en 1986⁴⁰⁸. Elles sont composées d'un centre cobalt coordonné par deux ligands équatoriaux glyoximate et deux autres ligands L et L' en position axiale (Figure annexe 5A). Complexes de type Co(II) ou Co(III), la charge positive est compensée par la déprotonation d'une des oxymes sur chaque ligand pour donner deux liaisons hydrogènes et former un ligand tétradentate pseudo-macrocyclique. Les propriétés rédox sont modulées par les substituants R des glyoximates. Ainsi, un groupement électroattracteur diminue la capacité du centre métallique à réduire les protons. Cette réduction est alors favorisée en présence d'acides forts.⁴⁰⁹

Ces molécules ont été intensivement étudiées par les équipes de Artero^{407,410-412} depuis le début des années 2005, et Reisner⁴¹³ en 2014. Ils sont de très bons catalyseurs de réduction des protons avec des surtensions inférieures à 200-300 mV.

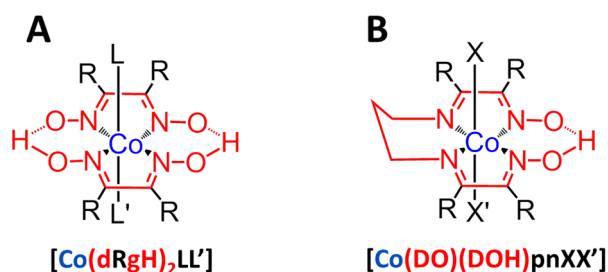


Figure annexe 5 : Structure d'une cobaloxyme (A) et d'une cobalt diimine-dioxime (B).

C/ Les catalyseurs à base de cobalt diimine-dioxime

En 1970, une seconde génération de catalyseurs de type cobalt diimine-dioxime, modèle de la vitamine b12, et notée [Co(DO)(DOH)pnL₂], voit le jour.⁴¹⁴ Ce complexe de géométrie octaédrique possède un ligand diimine et dioxime en position équatoriale, ainsi que deux ligands X et X' en position axiale (Figure annexe 5B). Le mécanisme catalytique de réduction des protons, qui passe par un PCET, a été intensivement étudié par Artero^{415,416} en solvant organique.

Globalement, ils sont plus résistants à l'hydrolyse en conditions acides, que les cobaloximes. Cependant, ces complexes ne sont pas stables en condition réductrices à pH neutre.⁴¹⁷ En effet, la catalyse serait en réalité hétérogène : l'espèce catalytique a été identifiée comme étant un dépôt de nanoparticules de cobalt solide.⁴¹⁸ Cependant, l'immobilisation de ces espèces, directement à l'électrode pour leur utilisation en catalyse hétérogène, éviterait la dégradation et augmenterait la stabilité.⁴¹⁹ Ce postulat s'applique à toute molécule en catalyse homogène, comme démontré récemment par Reisner avec un mime d'hydrogénase [NiFeSe].⁴²⁰

Abréviations

Générales

AME : assemblage membrane-électrode

BODs : Bilirubine Oxydases

CV : électrode de carbone vitreux

*Mv*BOD : Bilirubine Oxydase de *Myrothecium verrucaria*

*Bp*BOD : Bilirubine Oxydase de *Bacillus Pumilus*

ECS : électrode au calomel saturé

f.e.m : force électromotrice

GaOx : galactose oxydase

GC : glassy carbon electrode ou électrode de carbone vitreux

GDL : gas diffusion layer ou électrode à feutre de carbone

GES : gaz à effet de serre

*Tv*Lac : Laccase de *Trametes versicolor*

MCOs : vient de l'anglais « multicopper oxidases » soit oxydases à cuivres

NP : nanoparticule

OCV : open circuit voltage

ORR : oxygen réduction reaction

PAC : pile à combustible

PFV : protein film voltammetry

PCET : mécanisme de transfert de protons couplé à un transfert d'électrons

PEM : pile à membrane échangeuse de protons

PEMFC : proton exchange membrane fuel cell

PRG : potentiel de réchauffement global

PGM : platinum group metal

non-PGM : non-platinum group metal catalyst

NTCs : nanotubes de carbone

MbH₁ : hydrogénase transmembranaire [NiFe] de *Aquifex aeolicus*

Abréviations

MCOs : multicopper oxydases

MCQ : microbalance à crystal de quartz

MWCNT : multi-walled carbon nanotubes ou nanotubes de carbone multi-feuillets

MWnCOOH : nanotubes de carbone multi-feuillets modifiés par un groupement naphthoate

PPOs : polyphénol oxydases

Ref. : référence

RDE : Rotating-disk electrode ou électrode disque-anneau

RRDE : Rotating-ring disk electrode

SWCNT : single-walled carbon nanotubes ou nanotubes de carbone mono-feuillet

SWnCOOH : nanotubes de carbone mono-feuillets modifiés par un groupement naphthoate

TED : transfert électronique direct

TEM : transfert électronique médié

TOF : turnover frequency ou fréquence catalytique de cycle

TON : turnover number ou nombre de cycle catalytique

Ty : tyrosinase

XPS : X-ray photoelectron spectroscopy

Chimie

adt : azadithiolate

ABTS : acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

apyhist : (4-imidazolyl)ethylene-2-amino-1-ethynylpyridine)

bistripic : 1,2-bis(6-(bis(6-méthylepyridin-2-yle)méthyle)pyridin-2-yle)ethane

BSA : bovin serum albumine ou albumine de sérum bovin

DMF : diméthylformamide

DCM : dichlorométhane

dppv : 1,2-bis(diphenylphosphino)ethylene

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EF : éthynylferrocène
Fc* : décaméthylferrocène
HPX : hangman porphyrine
Hdatrz : 3,5-diamino-1,2,4-triazole
L-DOPA : 3,4-dihydroxy-L-phénylalanine
o-L-DOPA quinone : (3,4-dioxocyclohexa-1,5-dien-1-yl)-L-alanine
NHS : N-hydroxysuccinimide
pdt = pentadithiolate
p-TsOH : acide paratoluènesulfonique
P(o-tolyl)₃ : tri(o-tolyl)phosphine
PNP : ligand phosphine
TABD : tétrafluoroborate de 4-azidobenzène diazonium
THPTA : Amine de Tris(3-hydroxypropyltriazolylméthyle)
TDBD : tétrafluoroborate de 4-(1,3-dithiane-2-yle)benzène diazonium
TDAPy : triazole-dipyridine
TFBD : tétrafluoroborate de formylbenzène diazonium
TFA : acide trifluoroacétique
TPPS : tetrakis(p-sulfonatophenyl)porphyrine
TPP : tetraphénylporphyrine
xbsms:1,2bis(4-mercapto-3,3-diméthyl-2-thiabutyl)benzene

Publications

Gentil S, Lalaoui N, Dutta A, Nedellec Y, Cosnier S, Shaw WJ, et al. *Carbon-Nanotube-Supported Bio-Inspired Nickel Catalyst and Its Integration in Hybrid Hydrogen/Air Fuel Cells*. **Angewandte Chemie International Edition**. 2017 Feb 6;56(7):1845–9. (doi : 10.1002/anie.201611532)

Gentil S, Serre D, Philouze C, Holzinger M, Thomas F, Le Goff A. *Electrocatalytic O₂ Reduction at a Bio-inspired Mononuclear Copper Phenolato Complex Immobilized on a Carbon Nanotube Electrode*. **Angewandte Chemie**. 2016 Feb 12;128(7):2563–6.

Reuillard B, **Gentil S**, Carriere M, Le Goff A, Cosnier S. *Biomimetic versus enzymatic high-potential electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide on a functionalized carbon nanotube electrode*. **Chem. Sci.** 2015. (doi : 10.1039/C5SC01473E)

Enzymes et catalyseurs bio-inspirés, immobilisés sur électrodes nanostructurées, pour l'élaboration de piles H₂/air sans métaux nobles.

Le développement de technologies de l'énergie alternatives à la combustion des ressources fossiles est un enjeu majeur pour réduire l'émission des gaz à effet de serre et développer une économie durable. Dans cette optique, les piles à combustible à membrane échangeuses de protons (PEMFC) utilisent le platine en tant que catalyseur pour transformer l'énergie chimique en énergie électrique, en réduisant l'oxygène de l'air en eau et en oxydant l'hydrogène en protons. Dans la nature, les enzymes à cuivre et les hydrogénases catalysent respectivement ces réactions. Ces dernières, ainsi que des complexes bio-inspirés de leur site actif, ont été envisagés en tant qu'alternatives au platine, métal noble et coûteux. Ainsi, un complexe mononucléaire bis-diphosphine de nickel renfermant des acides aminés arginines en troisième sphère de coordination a été immobilisé sur une matrice de nanotubes de carbone (NTCs). Cette anode a démontré d'excellentes performances pour oxyder l'hydrogène avec des densités de courant élevées et sur une large gamme de pH. Son utilisation dans une PEMFC a permis d'obtenir une densité de puissance de 15 mW.cm⁻², seulement cinq fois inférieure à celle d'une pile classique à base de platine préparée dans les mêmes conditions. Concernant la catalyse de réduction de l'oxygène, des méthodes covalentes ont été développées pour réaliser la connexion électronique directe de laccase de *Trametes sp C30*, ainsi qu'un mutant de cette enzyme sur matrice de NTCs. L'association du catalyseur de nickel avec une cathode à base de bilirubine oxydase immobilisée sur NTCs a permis de proposer un nouveau concept de pile hybride enzymatique/bio-inspirée. Une densité de puissance de l'ordre de 1,8 mW.cm⁻² et une force électromotrice proche de 1V ont ainsi été mesurées pour cette pile sans métaux nobles. Le greffage de complexes de cuivre mono- et dinucléaires, bio-inspirés du site actif d'enzymes à cuivre et actifs vis-à-vis de la réduction de l'oxygène a enfin permis d'élaborer la première pile H₂/air ne renfermant que des catalyseurs moléculaires et sans métaux nobles. Cette dernière délivre une densité de puissance de 160 μW.cm⁻².

Mots-clefs : Electrocatalyse, Oxydation de H₂, Réduction de O₂, Enzymes, Fonctionnalisation de nanotubes de carbone, Piles à combustible

Hydrogen oxidation and oxygen reduction reactions catalyzed by bioinspired catalysts and enzymes connected on nanostructured electrodes: design of platinum-free H₂/air fuel cells.

New energy technologies alternative to fossil fuels utilization is a key issue to mitigate greenhouse gases emission and develop a sustainable economy. In this context, platinum-based proton exchange membrane fuel cells use oxygen reduction reaction (ORR) and hydrogen oxidation reaction (HOR) to convert chemical energy into electrical energy. In nature multicopper oxidases and hydrogenases catalyze these two reactions, respectively. These enzymes and corresponding bioinspired catalysts have been used as alternatives to the rare and expensive platinum metal. First, a mononuclear bis-diphosphine nickel complex surrounded by arginine residues was immobilized onto carbon nanotubes (CNTs) and demonstrated excellent performances for HOR developing high current densities over a wide range of pH. This anode was integrated in a PEMFC, which achieved high power densities (15 mW cm⁻²), only five times lower as compared to classical PEMFC prepared under similar conditions. Regarding ORR catalysis, we covalently grafted LLaccases from *Trametes sp C30* multicopper oxidases onto NTCs electrodes and achieved direct electron transfer. Using, bilirubin oxidase deposited on CNTs at the cathode side, we proposed a new concept of hybrid enzymatic/bio-inspired H₂/air fuel cell. This hydrogen fuel cell delivered 1.8 mW.cm⁻² and a high open circuit voltage of 1V. Finally, various copper complexes inspired from the active sites of copper enzymes were assessed for ORR and the first H₂/air fuel cell containing noble metal-free molecular catalysts at both electrodes is reported, achieving 160 μW.cm⁻² power density.

Keywords: Electrocatalysis, Hydrogen Oxidation Reaction, Oxygen Reduction Reaction, Enzymes, Carbon Nanotubes