



**HAL**  
open science

# Conception et optimisation de piles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub> pour la gestion de puissance

Caroline Abreu

► **To cite this version:**

Caroline Abreu. Conception et optimisation de piles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub> pour la gestion de puissance. Autre. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSEC052 . tel-01827016

**HAL Id: tel-01827016**

**<https://theses.hal.science/tel-01827016>**

Submitted on 1 Jul 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.



ÉCOLE  
**CENTRALE** LYON

N° d'ordre NNT : 2017LYSEC52

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON  
opérée au sein de l'École centrale de Lyon**

**Ecole Doctorale ED 160  
Ecole doctorale Électronique Électrotechnique Automatique**

**Spécialité de doctorat : Physico-Chimie**

Soutenue publiquement le 16/11/2017, par :  
**Caroline ABREU**

---

**Conception et optimisation de piles  
enzymatiques glucose-O<sub>2</sub> pour la gestion de  
puissance**

---

Devant le jury composé de :

<b>Tingry, Sophie</b>	Directrice de Recherche CNRS, Université de Montpellier 2	Présidente, Rapporteure
<b>Arbault, Stéphane</b>	Directeur de Recherche CNRS, Université de Bordeaux	Rapporteur
<b>Barrière, Frédéric</b>	Maître de Conférences, Université de Rennes 1	Examinateur
<b>Buret, François</b>	Professeur, Ecole Centrale de Lyon	Directeur de thèse
<b>Holzinger, Michael</b>	Directeur de Recherche CNRS, Université Grenoble Alpes	Co-directeur de thèse
<b>Ondel, Olivier</b>	Maître de Conférences, Université Lyon 1	Encadrant



# REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse ont été réalisés au Département de Chimie Moléculaire (DCM) de l'Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG) et au sein du Laboratoire Ampère. Je remercie le Docteur Serge Cosnier et le Docteur Bruno Allard, directeurs des laboratoires respectifs, de m'avoir accueillie et permis de travailler dans d'excellentes conditions pendant ces trois années.

Je remercie vivement le Docteur Sophie Tingry, Directrice de Recherche CNRS à l'Université de Montpellier II, d'avoir accepté d'examiner et de juger ce manuscrit en tant que rapporteur mais également d'avoir présidé mon jury de thèse. (Mais aussi) Je remercie également, le Docteur Stéphane Arbault, Directeur de Recherche CNRS à l'Université de Bordeaux d'avoir accepté d'examiner et de juger ce manuscrit en tant que rapporteur.

Je tiens à remercier également le Docteur Frédéric Barrière, Maître de Conférences à l'Université de Rennes I, d'avoir accepté de juger mes travaux.

Je souhaite leur faire part de toute ma gratitude pour l'intérêt qu'ils ont témoigné à ce travail de thèse, pour l'expertise qu'ils ont apportée et pour leurs appréciations.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à mes deux directeurs de thèse, le Docteur François Buret et le Docteur Michael Holzinger, qui m'ont encadrée et qui ont dirigé mes travaux pendant ces trois années au sein des laboratoires Ampère, au sein Département de Chimie Moléculaire, et avec l'équipe Biosystèmes Electrochimiques et Analytiques (BEA). Je les remercie de leur présence attentive et de l'aide apportée durant toute cette période, mais également pour la confiance qu'ils m'ont accordée pour mener à bien ces travaux.

Je tiens par ailleurs à remercier tout particulièrement l'Ingénieur Yannig Nedellec pour toute son aide lors de la confection d'un nouveau système de pile à flux, et pour beaucoup de points d'ordre pratique. Je remercie aussi Alan Le Goff pour le temps qu'il a passé à me transmettre une partie de son immense savoir en électrochimie et d'avoir su me guider suite au départ de son précédent doctorant Bertrand Reuillard qui a également travaillé sur cette thématique.

Je remercie le Docteur Olivier Ondel, qui m'a encadrée au cours des expériences au sein du laboratoire Ampère.

Je remercie le Docteur Hyacinthe Randriamahazaka, qui m'a fait aimer la recherche lors de mes stages de Master et qui m'a soutenue lors de ma recherche de thèse.

Pendant les trois années écoulées, j'ai eu l'occasion de travailler avec de nombreuses personnes au sein de l'équipe BEA et d'autres équipes du DCM. Mes remerciements vont

aussi à tous les membres de l'équipe BEA : cela a été un immense honneur de travailler avec vous, dans des conditions idéales et dans une ambiance très conviviale. Je remercie le Docteur Bertrand Reuillard, qui m'a pris sous leur aile dès mon arrivée au laboratoire, tout particulièrement merci de m'avoir formée sur ce savoir-faire des pastilles de nanotubes. Je leur dois beaucoup quant à mon assimilation rapide des « bases » de l'électrochimie. A Solène et Quentin, avec qui j'ai partagé un bureau pendant plus de trois ans, dans les bons comme dans les mauvais moments, je vous souhaite bon courage et plein succès pour la suite!

Je remercie également les autres membres de l'équipe BEA. Les permanents : Arielle, Chantal, Karine et Fabien, sans qui l'équipe ne tournerait pas aussi bien ! Merci à vous pour votre aide et vos conseils pendant ces trois ans. Merci aussi aux non permanents : Andrew, Chen, Jules, Marie B. et Marie C. et Pierre-Yves qui a trouvé un poste. Mais aussi aux stagiaires avec qui j'ai pu travailler.

Mais aussi Cécile Astruc Simonato pour son aide dans la relecture de ce manuscrit.

Enfin, je souhaite remercier toute ma famille, mes frères et mes parents, David, sans eux je n'aurais pas eu le courage de tenir ces trois années. Leur solide soutien m'a été précieux et je leur dois beaucoup. C'est là l'occasion de le leur dire du fond du coeur.

# RESUME

Ce mémoire est consacré à l'optimisation de la connexion enzymatique pour l'oxydation du glucose et la réduction du dioxygène dans une matrice de nanotubes de carbone (CNTs) sous forme de compression dans les biopiles à glucose, et à l'assemblage de biopiles dans un système à flux.

Dans un premier temps, le transfert électronique indirect de la glucose oxydase (GOx) et de la glucose déshydrogénase FAD-dépendante (FADGDH) est optimisé dans une matrice nanostructurée de CNTs contenant différents médiateurs rédox. Ces bioanodes ont pu être combinées avec des biocathodes similaires à bases d'enzymes à cuivre, la laccase (Lac) et la bilirubine oxydase (BOD). La biopile GOx-NQ/Lac présente une puissance de l'ordre de 150  $\mu\text{W}$  sous 150  $\text{mmol.L}^{-1}$  de glucose et la biopile GOx-NQ/BOD orientée par la PP IX, quant à elle, possède une puissance de l'ordre de 0,5 mW sous 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  de glucose. Cette biopile présente une très bonne alternative à l'implantable ou à l'alimentation d'un appareil électronique à faible demande énergétique.

La partie suivante concerne l'élaboration d'un design de biopile à flux optimisant la diffusion du substrat à l'intérieur de la bioélectrode. De ce fait, plusieurs systèmes de biopiles GOx-NQ/BOD à flux de substrat ont été étudiés. La configuration de flux traversant a permis d'obtenir une puissance de l'ordre de 1 mW sous 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  de glucose et oxygène dissous. La possibilité d'utiliser cette pile en décharge continue ou en cycle de charge/décharge a été étudiée. Ce système de biopile à flux de glucose a permis également d'associer plusieurs biopiles en série ou en parallèle. Ainsi, l'alimentation d'un minuteur et d'un test d'ovulation a pu être réalisée à l'aide de biopiles associées en série. D'autre part, l'utilisation d'un circuit de gestion de l'énergie a permis d'alimenter un capteur de température en stockant l'énergie produite par deux biopiles connectées en série.

Cette partie se consacre également à une biopile basée sur l'association de la HRP à la cathode et la GOx-NQ à l'anode. Ce système est très intéressant puisque grâce à la maîtrise du sens du flux de notre substrat, le peroxyde d'hydrogène formé par l'anode peut être alors consommé par la cathode. Cette pile s'est montrée parfaitement opérationnelle en condition physiologique et a abouti à l'obtention de puissances de l'ordre de 0,8 mW.

Mots clefs : bioélectrocatalyse, biopile enzymatique, nanotubes de carbone, structuration des matériaux, gestion de l'énergie

# ABSTRACT

This work is devoted to the optimization of the enzymatic connection for the oxidation of glucose and the reduction of dioxygen in a matrix of carbon nanotubes (CNTs) in the form of compression in glucose biofuel cells, and the assembly of biofuel cells in a flow system.

First, mediated electron transfer of glucose oxidase (GOx) and FAD-dependent glucose dehydrogenase (FADGDH) is optimized in a nanostructured CNTs matrix containing different redox mediators. These bioanodes could be combined with similar biocathodes with copper enzyme bases, laccase (Lac) and bilirubin oxidase (BOD). The GOx-NQ/Lac biofuel cell has a power of the order of  $150 \mu\text{W}$  under  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  of glucose and the biofuel cell GOx-NQ/BOD oriented by the PP IX, order of  $0.5 \text{ mW}$  under  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  of glucose. This biofuel cell presents a very good alternative to the implantable or to the supply of an electronic device with low energy demand.

The next part concerns the development of a biofuel cell design with flux optimizing the diffusion of the substrate inside the bioelectrode. As a result, several GOx-NQ/BOD flow systems have been studied. The flow-through configuration made it possible to obtain a power of the order of  $1 \text{ mW}$  under  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  of glucose and dissolved oxygen. The possibility of using this battery in continuous discharge or in charge/discharge cycle has been studied. This biofuel cell system with a glucose flow has also made it possible to associate several biofuel cells in series or in parallel. Thus, the power supply of a timer and an ovulation test could be realised using associated biofuel cells in series. The use of an energy management circuit made it possible to supply a temperature sensor by storing the energy produced by two biofuel cells connected in series.

Moreover, this part is about another biofuel cell based on the association of HRP with the cathode and the GOx-NQ at the anode. This system is very interesting because, thanks to the control of the flow direction of our substrate, the hydrogen peroxide formed by the anode can then be consumed by the cathode. This stack was perfectly operational in physiological condition and led to the achievement of powers of the order of  $0.8 \text{ mW}$ .

Key words: bioelectrocatalysis, enzymatic biofuel cell, carbon nanotubes, structured materials, energy management

# SOMMAIRE

<b>CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
<b>I.1. Introduction .....</b>	<b>8</b>
<b>I.2. Les biopiles enzymatiques.....</b>	<b>8</b>
I.2.1. Contexte général .....	8
I.2.2. Les biopiles à combustible.....	9
I.2.3. Les biopiles enzymatiques glucose-O <sub>2</sub> .....	17
<b>I.3. Immobilisation des enzymes et leur connexion sur électrode.....</b>	<b>25</b>
I.3.1. Généralités .....	25
I.3.2. Immobilisation des enzymes.....	26
I.3.3. Transfert électronique protéine-électrode.....	29
<b>I.4. Rôle des nanotubes de carbone dans les biopiles glucose-O<sub>2</sub>.....</b>	<b>37</b>
I.4.1. Structures, propriétés et utilisations des nanotubes de carbone.....	37
I.4.2. Les CNTs pour l'immobilisation et la connexion d'enzymes rédox dans les biopiles enzymatiques glucose-O <sub>2</sub> .....	43
<b>I.5. Les différents design de biopiles et leurs applications .....</b>	<b>45</b>
I.5.1. Les microbiopiles.....	45
I.5.2. Les biopiles flexibles .....	46
I.5.3. Les biopiles microfluidiques.....	46
<b>I.6. Vers la gestion de l'énergie des biopiles .....</b>	<b>47</b>
I.6.1. Alimentation directe .....	47
I.6.2. Alimentation contrôlée via la charge d'un condensateur .....	47
<b>I.7. Vers l'implantation des biopiles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub> .....</b>	<b>48</b>
<b>CHAPITRE II. CONCEPTION DE BIOELECTRODES NANOSTRUCTUREES POUR LES BIOPILES GLUCOSE-O<sub>2</sub> SOUS FORME DE COMPRESSION.....</b>	<b>53</b>
<b>II.1. Introduction .....</b>	<b>56</b>
<b>II.2. Techniques de caractérisation : l'électrochimie .....</b>	<b>58</b>
II.2.1. La voltampérométrie cyclique .....	59
II.2.2. La chronoampérométrie.....	60
II.2.3. La courbe intensité-potentiel (i-E) ou courbe de polarisation .....	61
II.2.4. La courbe de puissance .....	64

<b>II.3.</b>	<b>Détermination d'une constante thermodynamique.....</b>	<b>65</b>
II.3.1.	Théorie enzymatique .....	65
II.3.2.	Constante de Michaelis apparente .....	66
<b>II.4.</b>	<b>Bioanodes nanostructurées à base de glucose oxydase ou glucose déshydrogénase FAD-dépendante par transfert électronique indirect .....</b>	<b>69</b>
II.4.1.	Incorporation d'un médiateur rédox « insoluble » : la 1,4-naphtoquinone ....	69
II.4.2.	Incorporation d'un médiateur rédox : la 1,10-phénanthroline-5,6-dione (PLQ) .....	76
II.4.3.	Autres médiateurs .....	81
<b>II.5.</b>	<b>Cathodes 3D à bases d'enzymes à cuivre .....</b>	<b>88</b>
II.5.1.	Réduction du dioxygène par les oxydases multi cuivres .....	88
II.5.2.	Biocathodes nanostructurées à base d'oxydases multi cuivres en transfert direct .....	89
<b>II.6.</b>	<b>Cathode MWCNTs/Peroxydase en transfert direct .....</b>	<b>94</b>
<b>II.7.</b>	<b>Caractérisation des biopiles enzymatiques en cellule électrochimique .....</b>	<b>95</b>
II.7.1.	Biopile GO <sub>x</sub> -NQ/Lac.....	95
II.7.2.	Biopile GO <sub>x</sub> -NQ/BOD orientée par MWCNTs-PP IX .....	95
<b>II.8.</b>	<b>Conclusion du chapitre II .....</b>	<b>96</b>
<b>CHAPITRE III. CONCEPT D'ASSEMBLAGE DE BIOPILES ENZYMATIQUES DANS UN SYSTEME A FLUX POUR L'ALIMENTATION D'APPAREILS NOMADES .....</b>		<b>99</b>
<b>III.1.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>102</b>
<b>III.2.</b>	<b>Principe de fabrication des biopiles enzymatiques.....</b>	<b>103</b>
III.2.1.	Biopiles GO <sub>x</sub> -NQ/BOD orientée et GO <sub>x</sub> -PLQ/BOD.....	104
III.2.2.	Biopiles FADGDH-NQ/BOD et FADGDH-PLQ/BOD.....	106
III.2.3.	Biopile GO <sub>x</sub> -NQ/HRP .....	107
<b>III.3.</b>	<b>Performances des biopiles enzymatiques .....</b>	<b>108</b>
III.3.1.	Biopile GO <sub>x</sub> -NQ/BOD .....	108
III.3.2.	Biopile GO <sub>x</sub> -PLQ/BOD .....	111
III.3.3.	Biopile FADGDH-NQ/BOD .....	112
III.3.4.	Biopile FADGDH-PLQ/BOD .....	112
III.3.5.	Biopile GO <sub>x</sub> -NQ/HRP .....	113
<b>III.4.</b>	<b>Stabilité en fonctionnement des biopiles enzymatiques .....</b>	<b>114</b>
III.4.1.	Stabilité de la biopile GO <sub>x</sub> -NQ/BOD.....	114

III.4.2. Stabilité de la biopile GO <sub>x</sub> -NQ/HRP .....	117
<b>III.5. Etude de l'influence du débit de solution de glucose.....</b>	<b>118</b>
III.5.1. Biopile GO <sub>x</sub> -PLQ/BOD .....	118
III.5.2. Biopile GO <sub>x</sub> -NQ/HRP .....	119
<b>III.6. Mise en série et/ou en parallèle de biopiles enzymatiques .....</b>	<b>120</b>
III.6.1. Biopiles GO <sub>x</sub> -NQ/BOD.....	120
III.6.2. Biopiles GO <sub>x</sub> -NQ/HRP .....	122
<b>III.7. Alimentation d'un minuteur à l'aide de deux biopiles GO<sub>x</sub>-NQ/BOD connectées en série.....</b>	<b>123</b>
<b>III.8. Vers l'alimentation d'un appareil à usage unique.....</b>	<b>125</b>
III.8.1. Test d'ovulation digital Clearblue .....	126
III.8.2. Test de grossesse digital Clearblue avec estimation de l'âge de la grossesse ....	
.....	129
<b>III.9. Alimentation d'un capteur de température à l'aide d'un circuit électronique associé aux biopiles enzymatiques .....</b>	<b>132</b>
III.9.1. L'Unité de Gestion de l'Energie (UGE).....	132
III.9.2. Alimentation du capteur de température.....	137
<b>III.10. Conclusion du chapitre III.....</b>	<b>142</b>



# LISTE DES ABRÉVIATIONS

1,4-NQ	1,4-naphtoquinone
5-hydroxy-1,4-NQ	5-hydroxy-1,4-naphtoquinone
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ADH	alcool déshydrogénase
AIDH	aldéhyde déshydrogénase
BOD	bilirubine oxydase
BP	bucky paper
CA	chronoampérométrie
Cat	catalase
CDH	cellobiose déshydrogénase
CE	contre-électrode (fil de platine)
CNT	nanotube de carbone
CNTF	forêt de nanotube de carbone
CO <sub>x</sub>	cytochrome c oxydase
CV	voltampérométrie cyclique
DCM	« Discontinuous Conduction Mode » en anglais
DET	transfert électronique direct
DH	déshydrogénase
DWCNT	nanotube de carbone double paroi
ER	électrode de référence (Ag/AgCl, KCl saturé)
ESH	électrode standard à hydrogène
ET	électrode de travail
FAD	flavine adénine dinucléotide
FADGDH	glucose déshydrogénase FAD-dépendante
Fc-MeOH	ferrocène méthanol
FDH	fructose déshydrogénase
f.e.m.	force électromotrice
GES	gaz à effet de serre
GBFC	biopile enzymatique à glucose
GDH	glucose déshydrogénase
GDL	« gas diffusion layer » en anglais

GOx	glucose oxydase
H <sub>2</sub> ase	hydrogénase
HRP	peroxydase de Raifort
i	courant
$K_M$	constante de Michaelis-Menten
$K_M^{app}$	constante de Michaelis-Menten apparente
Lac	laccase
LED	diode électroluminescente
MCO	terme pour désigner les enzymes possédant plusieurs sites actifs à base d'atome de cuivre, « Multi Copper Oxidase » en anglais
MET	transfert d'électron médié (ou indirect)
MO	micro-organismes
MOSFET	« Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor » en anglais
MWCNT	nanotube de carbone multi parois
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NQ	naphthoquinone
OCV	potentiel en circuit ouvert
P	puissance
PAC	pile à combustible
PACE	pile à combustible enzymatique
PACM	pile à combustible microbienne
PB	tampon phosphate
PLQ	1,10-phénanthroline-5,6-dione
PP IX	protoporphyrine IX
PPO	polyphénol oxydase (ou encore Tyrosinase)
PQQ	pyrroloquinoline quinone
PTFE	polytétrafluoroéthylène
PVA	polyvinyle d'alcool
Q	charge
R	résistance
RT	température ambiante
SWCNT	nanotube de carbone mono paroi
TNC	centre trinuécléaire

UGE	Unité de Gestion de l'Energie
ZnO-Fc	nanoparticules d'oxyde de zinc fonctionnalisées par du ferrocène
$\Delta E$	Epa – Epc



# LISTE DES FIGURES

Figure I-1 : Schéma de principe d'une pile à combustible H <sub>2</sub> -O <sub>2</sub> .....	10
Figure I-2 : (A) Schéma représentatif du fonctionnement d'une biopile à combustible. (B) Représentation sur diagramme potentiel-courant des contributions anodique et cathodique permettant l'obtention de la force électromotrice (f.e.m) de la biopile et des courants catalytiques.....	12
Figure I-3 : (A) Biopile glucose-O <sub>2</sub> opérationnelle dans un grain de raisin <sup>38</sup> . (B) Biopile glucose-O <sub>2</sub> alimentant un lecteur MP3 <sup>12</sup> . (C) Biopile glucose-O <sub>2</sub> implantée dans un rat et permettant l'alimentation d'une diode électroluminescente <sup>39</sup> . (D) Biopile implantée dans un cafard alimentant un capteur de température-humidité sans fil <sup>40</sup> .....	17
Figure I-4 : Schéma d'une sous unité constituant le dimère de la GOx contenant le cofacteur organique rédox FAD, formant le couple FAD/FADH <sub>2</sub> .....	19
Figure I-5 : Schéma du monomère de la FADGDH contenant le cofacteur organique rédox FAD, formant le couple FAD/FADH <sub>2</sub> .....	20
Figure I-6 : (A) Structure de la Lac avec les sites cuivre T1 et T2/T3. (B) Schéma du transfert électronique du site T1 au site T2/T3 permettant la réduction du dioxygène au site trinuécléaire .....	23
Figure I-7 : Structure de la HRP avec son site actif enfoui, l'hème .....	24
Figure I-8 : Adsorption des enzymes sur un support .....	26
Figure I-9 : Synthèse simplifiée de l'immobilisation covalente d'enzyme sur surface d'électrode : (A) formation d'un lien amide à partir de la réaction d'un ester activé N-Hydroxysuccinimide (NHS) et une amine de l'enzyme, (B) réaction d'un résidu cystéine sur un groupement maléimide, (C) réaction d'un résidu nucléophile de la protéine avec un groupement époxy sur la surface de l'électrode, (D) réaction « click » catalysée au cuivre entre un alcyne immobilisé et une enzyme fonctionnalisée par une fonction azide, (E) réaction de Diels-Alder entre une surface portant un accepteur et une enzyme .....	27
Figure I-10 : Réticulation et co-réticulation des enzymes.....	28

Figure I-11 : Encapsulation des enzymes.....	29
Figure I-12 : Schéma représentatif d'une bioélectrode enzymatique à base de (A) transfert électronique direct entre la protéine et l'électrode, (B) transfert électronique indirect en présence de médiateur rédox .....	30
Figure I-13 : Représentation graphique, $I = f(E)$ , de l'impact sur le potentiel et l'intensité du courant dans le cas d'un transfert électronique direct (à l'anode et la cathode) ou d'un transfert électronique indirect (à l'anode et la cathode) .....	32
Figure I-14 : Représentations des différentes structures de nanotubes de carbone. (a) Nanotubes de carbone multi-feuillets (MWCNT). (b) Nanotubes de carbone mono-feuillet (SWCNT) conformation chaise « métallisés » (10,10). (c) Semi-conducteur chiral hélicoïdal SWCNT. (d) SWCNT conformation zigzag (15,0). (e) SWCNT conformation fauteuil <sup>148</sup> ....	38
Figure I-15 : schéma représentatif du type d'orientation des CNTs de type « chaise » ou « zigzag » par rapport au plan d'un feuillet de graphène .....	39
Figure I-16 : Différents types de fonctionnalisation des SWCNTs. (a) Une fonctionnalisation exoédrique non covalente avec des polymères. (b) Fonctionnalisation de groupe de défauts. (c) Fonctionnalisation exoédrique non covalente avec des molécules par pi-stacking. (d) Fonctionnalisation de la paroi latérale. (e) Fonctionnalisation endoédrique, dans ce cas C60 <sup>148</sup> .....	41
Figure I-17 : Interaction de $\pi$ -stacking entre des composés polyaromatiques et la paroi des CNTs. (A) dérivé pyrène (B) dérivé anthracène (C) dérivé porphyrine. ....	42
Figure I-18 : Principales méthodes d'immobilisation de protéines sur les CNTs : (A) adsorption non spécifique, (B) encapsulation dans une matrice polymérique, (C) greffage covalent .....	43
Figure I-19 : Evolution du nombre de publications sorties entre 2007 et 2016 concernant l'élaboration de biopiles enzymatiques à base de CNTs. Recherche effectuée avec les mots clefs « enzymatic biofuel cell carbon nanotube ». Source Web Of Knowledge .....	45
Figure I-20 : Frise historique résumant l'avancée des biopiles enzymatiques implantées dans des organismes vivants.....	52

Figure II-1 : (A) Schéma représentatif de la biopile GOx/Lac dans la nanostructure de CNTs. (B) Schéma de la biopile implantée dans l'abdomen d'un rat pour l'alimentation d'une diode et d'un thermomètre électronique <sup>39</sup> .....	57
Figure II-2 : Montage d'une cellule électrochimique à 3 électrodes connectées sur un potentiostat. CE correspond à la contre-électrode, ET à l'électrode de travail et ER à l'électrode de référence .....	59
Figure II-3 : Montage d'une pile : la cathode est l'ET et l'anode est l'association de la CE et de la EF .....	61
Figure II-4 : Allure d'une courbe de polarisation d'une biopile avec les principales pertes de tension de la cellule .....	62
Figure II-5 : Allure d'une courbe de puissance .....	64
Figure II-6 : Courbe représentant la vitesse de réaction d'une enzyme en fonction de la quantité de substrat .....	65
Figure II-7 : Allure d'une courbe d'étalonnage pour une concentration en enzyme .....	68
Figure II-8 : Structure chimique de la 1,4-naphtoquinone .....	69
Figure II-9 : Schéma représentatif de : (A) Dismutation du peroxyde d'hydrogène produit par la GOx par la catalase, (B) Processus de transfert électronique entre la GOx et la matrice de CNTs grâce à la 1,4-NQ en tant que médiateur rédox .....	71
Figure II-10 : (A) Illustration du processus de fabrication d'une bioanode MWCNTs/GOx/Catalase/NQ par compression. (B) Photographie d'une bioélectrode sous forme de compression .....	72
Figure II-11 : Voltampérométrie cyclique de la bioanode MWCNTs/GOx/NQ (noir) sans et (rouge) avec glucose ( $0,16 \text{ mol.L}^{-1}$ ) sous argon ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ , dans tampon PB $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7, RT) .....	73
Figure II-12 : (A) Chronoampérométrie à $0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ de la bioanode MWCNTs/GOx/NQ en fonction des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans PB pH 7, RT et sous agitation à 500 rpm. (B) Courbe d'étalonnage obtenue à partir des mesures de chronoampérométrie à $0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ suivant l'addition de glucose pour la bioanode .....	74

Figure II-13 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de la bioanode MWCNTs/FADGDH/NQ sous argon (courbe noire) et sous argon avec  $0,16 \text{ mol.L}^{-1}$  de glucose (courbe rouge) dans Mc Ilvaine pH 7, RT..... 75

Figure II-14 : (A) Chronoampérométrie à  $0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  de la bioanode MWCNTs/FADGDH/NQ en fonction des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans Mc Ilvaine pH7, RT. (B) Courbe d'étalonnage obtenue à partir des mesures de chronoampérométrie à  $0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  suivant l'addition de glucose pour la bioanode.... 76

Figure II-15 : Structure chimique de la 1,10-phénanthroline-5,6-dione ..... 76

Figure II-16 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de la bioanode MWCNTs/GOx/PLQ sous argon (courbe noire) et sous argon avec  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  de glucose (courbe rouge) dans Mc Ilvaine, pH 7, RT 78

Figure II-17 : (A) Chronoampérométrie à  $0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  de la bioanode MWCNTs/GOx/PLQ en fonction des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans Mc Ilvaine pH 7, RT. (B) Courbe d'étalonnage obtenue à partir des mesures de chronoampérométrie à  $0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  suivant l'addition de glucose pour la bioanode.... 79

Figure II-18 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de la bioanode MWCNTs/FADGDH/PLQ sous argon (courbe noire) et sous argon avec  $0,13 \text{ mol.L}^{-1}$  de glucose (courbe rouge) dans Mc Ilvaine, pH 7, RT..... 79

Figure II-19 : (A) Chronoampérométrie à  $0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  de la bioanode MWCNTs/FADGDH/PLQ en fonction des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans Mc Ilvaine pH 7, RT. (B) Courbe d'étalonnage obtenue à partir des mesures de chronoampérométrie à  $0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  suivant l'addition de glucose pour la bioanode.... 80

Figure II-20 : Structure chimique de la 5-hydroxy-1,4-naphtoquinone ..... 81

Figure II-21 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de la bioanode MWCNTs/GOx/5-hydroxy-1,4-NQ sous argon (courbe noire) et sous argon avec  $0,16 \text{ mol.L}^{-1}$  de glucose (courbe rouge) dans TP pH 7, RT..... 82

Figure II-22 : (A) Chronoampérométrie à  $0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  de la bioanode MWCNTs/GOx/5-hydroxy-1,4-NQ en fonction des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans TP pH 7, RT. (B) Courbe d'étalonnage obtenue à partir des mesures de chronoampérométrie à  $0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  suivant l'addition de glucose pour la bioanode.... 83

Figure II-23 : Structure chimique du ferrocène-méthanol.....	84
Figure II-24 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de la bioanode MWCNTs/GOx/Fc-MeOH sous argon (courbe noire) et sous argon avec $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de glucose (courbe rouge) dans TP pH 7, RT .	84
Figure II-25 : (A) Chronoampérométrie à $0,4 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl de la bioanode MWCNTs/GOx/Fc-MeOH en fonction des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans TP pH 7, RT. (B) Courbe d'étalonnage obtenue à partir des mesures de chronoampérométrie à $0,4 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl suivant l'addition de glucose pour la bioanode....	85
Figure II-26 : Structure chimique des nanoparticules ZnO fonctionnalisées avec un dérivé ferrocène.....	86
Figure II-27 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de la bioanode MWCNTs/GOx/ZnO-Fc sous argon (courbe noire) et sous argon avec $0,16 \text{ mol.L}^{-1}$ de glucose (courbe rouge) dans TP pH 7, RT	86
Figure II-28 : Présentation schématique de l'orientation de la Lac et de la BOD pour la réduction de l'oxygène <sup>96</sup> .....	88
Figure II-29 : (A) CVs de la biocathode MWCNTs/Lac sous argon (courbe noire) et sous bullage d'oxygène (courbe rouge) dans TP $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7, RT ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) (B) CVs de la biocathode MWCNTs/Lac sous argon (courbe noire) et sous bullage d'oxygène (courbe rouge) dans TP $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 5, RT ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ).....	89
Figure II-30 : Chronoampérométrie à $0,2 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl de la biocathode MWCNTs/Lac avec ajout d'un bullage de dioxygène dans TP $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 5, à RT.....	90
Figure II-31 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de la biocathode MWCNTs/BOD sous argon (courbe noire) et sous oxygène (courbe rouge) dans Mc Ilvaine pH 7, RT .....	91
Figure II-32 : Chronoampérométrie à $0,2 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl de la biocathode MWCNTs/BOD avec ajout d'un bullage de dioxygène dans Mc Ilvaine pH 7, à RT .....	91
Figure II-33 : Structure chimique de la protoporphyrine IX.....	92
Figure II-34 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de la biocathode MWCNTs-PP IX/BOD sous argon (courbe noire) et sous oxygène (courbe rouge) dans Mc Ilvaine pH 7, RT .....	93
Figure II-35 : Chronoampérométrie à $0,2 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl de la biocathode MWCNTs-PP IX/BOD avec ajout d'un bullage de dioxygène dans TP $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7, à RT.....	93

Figure II-36 : CA à 0,7 V vs. Ag/AgCl de la biocathode MWCNTs/HRP en fonction des ajouts de concentrations croissantes en peroxyde d'hydrogène dans Mc Ilvaine pH 7, RT .... 94

Figure II-37 : Courbe de puissance pour la biopile GOx-NQ/Lac effectuée dans un TP pH 5 contenant 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose ..... 95

Figure II-38 : Courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir) pour la biopile GOx-NQ/BOD orientée par la PP IX à 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose dans Mc Ilvaine pH 7. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 1,9 mA ..... 96

Figure III-1 : Schéma (A) et photo (B) de la cellule utilisée pour une biopile enzymatique à flux individuelle. Les insertions dans le schéma représentent les composants utilisés pour le bioanode et la biocathode. Les flèches rouges montrent le sens d'écoulement de la solution de glucose dans le système..... 103

Figure III-2 : Schéma de la miniaturisation de la biopile GOx-Med/BOD à flux traversant. 105

Figure III-3 : Schéma de la miniaturisation de la biopile FADGDH-Med/BOD à flux traversant ..... 106

Figure III-4 : Schéma de la miniaturisation de la biopile GOx-NQ/HRP à flux traversant... 108

Figure III-5 : Schémas des différents designs à flux et les performances correspondantes (courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir)) pour les différentes configurations de biopiles enzymatiques GOx-NQ/BOD. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 3,5 mA..... 110

Figure III-6 : Courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir) pour la biopile GOx-PLQ/BOD orientée à 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose dans Mc Ilvaine pH 7. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 3,7 mA..... 111

Figure III-7 : Courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir) pour la biopile FADGDH-NQ/BOD orientée à 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose dans Mc Ilvaine pH 7. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 2,9 mA ..... 112

Figure III-8 : Courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir) pour la biopile FADGDH-PLQ/BOD orientée à 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose dans Mc Ilvaine pH 7. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 2,5 mA ..... 113

- Figure III-9 : Courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir) pour la biopile GOx-NQ/HRP à 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose dans Mc Ilvaine pH 7. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 2,3 mA..... 114
- Figure III-10 : Schéma expliquant le mode opératoire pour étudier la stabilité d'une biopile glucose-O<sub>2</sub> en décharge/charge ..... 115
- Figure III-11 : (A) Photo d'un sac à perfusion contenant une solution de glucose remplaçant la pompe péristaltique pour alimenter la biopile à glucose-O<sub>2</sub> GOx-NQ/BOD. (B) Cycles de charge/décharge entre 0,55 V et 0,35 V à 3 kΩ durant 24 heures (a, noir) et l'énergie générée (b, bleu); Décharge continue à 6 kΩ pendant 48 heures (c, rouge) et l'énergie produite (d, vert). (C) Cycles de décharge/charge à 500 Ω (a, noir) et 3 kΩ (c, bleu) au début de l'expérience et après 48 heures (b, d, respectivement)<sup>222</sup> ..... 116
- Figure III-12 : (A) Décharge continue à une résistance de 6000 Ω (noir) et l'énergie produite (bleu). (B) Cycles de charge/décharge entre 0,5 et 0,4 V à une résistance de 500 Ω (a, noir) et l'énergie produite (b, bleu), de 3000 Ω (c, rouge) et l'énergie produite (d, vert). (C) Zoom d'un cycle de décharge-charge à 500 Ω (noir) et 3000 Ω (bleu) au début de l'expérience et après 48 heures (noir et vert respectivement)..... 117
- Figure III-13 : Courbe montrant le potentiel de stabilisation de la biopile GOx-PLQ/BOD en fonction du débit d'électrolyte à base de glucose 5 mmol.L<sup>-1</sup> en appliquant une décharge continue de 6 kΩ ..... 119
- Figure III-14 : Étude de la dépendance du flux dans la biopile GOx-NQ/HRP en appliquant une décharge continue à 12 kΩ dans une solution de 5 mmol L<sup>-1</sup> de glucose et saturée en oxygène ..... 119
- Figure III-15 : (A) Schéma décrivant la direction du flux pour la solution de glucose 5 mmol.L<sup>-1</sup> pour l'association de deux biopiles à glucose. Circuit appliqué décrivant l'association de deux biopiles (B) en série et (C) en parallèle ..... 120
- Figure III-16 : Courbe de puissance correspondante (bleu), et courbe de polarisation (noir) de la connexion de deux biopiles à glucose GOx-NQ/BOD en série (A) et en parallèle (B).. 121
- Figure III-17 : (A) Courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir) pour deux biopiles GOx-NQ/HRP connectées en série. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 2,8 mA. (B) Courbe de puissance (bleu) et courbe de

polarisation (noir) pour deux biopiles GOx-NQ/HRP connectées en parallèle. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 5.2 mA. .... 122

Figure III-18 : (A) Photo de deux biopiles GOx-NQ/BOD connectées en série avec un apport de solution de glucose 5 mmol.L<sup>-1</sup> par un sac de perfusion et alimentant un minuteur. (B) Evolution de la tension en fonction du temps lors de l'alimentation directe d'un minuteur . 124

Figure III-19 : Photo du test d'ovulation ouvert présentant de la gauche vers la droite, son système d'éjection du bâtonnet test, sa pile d'origine CR1220 et son circuit électronique... 126

Figure III-20 : (A) Schéma des différents affichages sur l'appareil lors de la mesure du taux de LH. (B) Courbe de suivi de la tension de la pile en fonction du temps durant une mesure... 127

Figure III-21 : Photographie de l'expérience d'alimentation du test d'ovulation à partir de 5 biopiles GOx-NQ/BOD connectées en série ..... 128

Figure III-22 : Courbe de suivi de la tension des cinq piles connectées en série en fonction du temps durant une mesure..... 129

Figure III-23 : Courbe de suivi de la tension de la pile en fonction du temps durant une mesure du test de grossesse..... 130

Figure III-24 : Courbe de suivi de la tension des cinq piles connectées en série en fonction du temps durant une mesure..... 131

Figure III-25 : Schéma d'un système de gestion de l'énergie avec une biopile microbienne 132

Figure III-26 : Schéma de principe de l'UGE..... 133

Figure III-27 : (A) Schéma de l'unité de gestion de l'énergie. (B) Photographie de l'UGE . 135

Figure III-28 : Suivi de  $E_{out}$  et  $P_{out}$  en fonction du temps pour deux biopiles GOx-NQ/BOD associées en série..... 140

Figure III-29 : Représentation schématique de l'énergie et de la tension en fonction du temps lors de l'alimentation d'un capteur de température ..... 140

Figure III-30 : (A) Photo du capteur de température « Temp101A Data Logger, MadgeTech, Inc., Contoocook, NH, USA » alimenté. (B) Suivi de la température en fonction du temps

avec un pas de 10 secondes entre chaque acquisition, à l'aide d'un capteur de température alimenté par l'énergie générée par deux biopiles GOx-NQ/BOD connectées en série..... 141



# LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1 : Couples oxydant/enzymes majoritairement utilisés dans la conception de cathode pour les biopiles enzymatiques .....	14
Tableau I-2 : Principales enzymes utilisées à l'anode de biopiles enzymatiques .....	15
Tableau I-3 : Tableau récapitulatif des implantations de biopiles glucose-O <sub>2</sub> .....	51
Tableau II-1 : Tableau récapitulatif des médiateurs testés avec la GOx et la FADGDH et les valeurs de E <sub>1/2</sub> et i <sub>max</sub> obtenues .....	87
Tableau III-1 : Caractéristiques du transformateur 78601/9C utilisé.....	136
Tableau III-2 : Composants du convertisseur Flyback.....	137
Tableau III-3 : Récapitulatif des biopiles enzymatiques étudiées et leurs performances .....	142



# INTRODUCTION GENERALE

Cette thèse vise le développement d'un bio-générateur d'électricité mobile à partir de la biomasse à même d'alimenter un dispositif nomade (de différents secteurs du marché mobile mondial, du monde médical, en passant par celui du jouet et autres domaines tels que les réseaux de capteurs). Ce programme de recherche pluridisciplinaire projette d'améliorer les performances des biopiles et de développer des circuits électroniques permettant de récupérer l'énergie à partir de plusieurs biopiles connectées en série ou en parallèle. Ainsi, cette thèse a pour ambition de fédérer autour du projet de biopile glucose-O<sub>2</sub> deux laboratoires, l'un basé à Lyon (Laboratoire Ampère – UMR CNRS 5005) et l'autre à Grenoble (Département de Chimie Moléculaire – UMR CNRS 5250). La combinaison des savoir-faire de l'équipe BEA dans le domaine des biocapteurs et des biopiles enzymatiques et ceux du laboratoire Ampère dans le domaine du génie électrique et en particulier l'électronique de puissance et du grappillage d'énergie a pour objectif d'établir un lien fort entre ces deux équipes dans le domaine de la bioélectronique.

Le travail de thèse sera articulé autour de trois axes principaux : la formation de biocathodes et bioanodes, le design de nos biopiles, et l'alimentation de petits objets en direct ou via l'utilisation d'un circuit électronique alliant le stockage et la récupération d'énergie. Ce sujet fait donc appel à la physico-chimie, l'électrochimie et la fonctionnalisation de surfaces. Des connaissances de base sur les systèmes de récupération d'énergie faible puissance et/ou sur le stockage de l'énergie électrique seront développées.

L'objectif final de la thèse est de réaliser un circuit de gestion de l'énergie (partie active et passive) capable de connecter le nombre nécessaire de biopiles (optimisées) en série pour réaliser un démonstrateur avec une puissance de sortie suffisante pour alimenter un appareil électrique de faible consommation d'énergie (ex : capteur de température). De plus, l'alimentation d'autres objets en alimentation directe sera développée. Concernant la fabrication des bioélectrodes, l'optimisation de la connexion entre le site actif rédox de l'enzyme et l'électrode à base d'une matrice poreuse de nanostructures de carbone (nanotubes, graphène, fibres de carbone, vulcan) sera à réaliser. Le greffage d'enzymes à ces nanomatériaux conducteurs dans un polymère ou un liant biocompatible agissant comme médiateur, permettra d'augmenter la vitesse et l'efficacité du transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode et d'améliorer la stabilité du matériau, tout en conservant une architecture tridimensionnelle nanostructurée extrêmement poreuse. Ces travaux de thèse comprendront, dans un premier temps, la reproduction et la caractérisation électrochimique de bioélectrodes développées par l'équipe BEA du DCM.

L'objectif fondamental sera d'optimiser la reproductibilité de ces électrodes où le développement de la forme macroscopique optimale de ces bioélectrodes sera particulièrement ciblé. En effet, la forme d'une bioélectrode est importante pour la connecter à un circuit électrique externe ou l'intégrer dans un packaging d'une biopile. La forme de la bioélectrode déterminera également l'accessibilité des enzymes immobilisées à son environnement, et donc l'alimentation avec du glucose à l'anode et de l'oxygène à la cathode. Ces bioélectrodes seront ensuite utilisées pour développer le design d'un circuit électronique de récupération. Afin d'être utilisée dans des applications basse puissance (alimentation de capteurs), l'énergie des biopiles doit être capturée et mise en forme par un circuit dédié appelé unité de gestion de l'énergie (UGE).

Le travail de thèse s'intéressera particulièrement à des circuits qui permettent de récupérer l'énergie à partir de plusieurs biopiles connectées en série. Dans un premier temps, une étude approfondie devra être faite pour savoir quelle association (série ou parallèle) est la plus appropriée. Les critères seront : le rendement énergétique, la simplicité du système et le rendement économique (rapport coût/énergie). Une association série permet d'augmenter les niveaux de tension (chaque tension délivrée par une pile s'additionne) et ainsi de diminuer les contraintes sur le circuit de gestion de l'énergie (et donc diminuer le coût). En parallèle, les contraintes se porteront sur l'architecture du convertisseur qui devra pouvoir démarrer malgré des tensions d'entrée faibles. Ainsi un circuit de démarrage basse tension (type oscillateur d'Amstrong ou pompe de charge) devra être intégré à la structure du convertisseur. En revanche, en série, l'avantage est de pouvoir augmenter la tension (chaque tension délivrée par une pile s'additionne), par conséquent de pouvoir augmenter la puissance délivrée.

Le premier chapitre constitue une étude bibliographique qui se divise en quatre sous parties. Dans la première, le contexte général de développement des biopiles à combustibles est présenté. Une revue plus précise des classes d'enzymes utilisées pour les réactions d'oxydation du glucose et de réduction du dioxygène est détaillée. La deuxième partie se concentre sur les différentes méthodes d'immobilisation généralement employées pour greffer l'entité biologique à la surface d'une électrode. Les mécanismes de transfert électronique direct ou médié sont également présentés et détaillés plus précisément dans le cas des enzymes utilisées dans la conception de biopiles glucose-O<sub>2</sub>. La troisième partie sera la présentation des nanotubes de carbone comme matériau adapté à l'immobilisation et à la connexion d'enzymes rédox. L'élaboration de biopiles glucose-O<sub>2</sub> à base de nanotubes de carbone est décrite suivie par les derniers résultats marquants d'implantations de biopiles

opérationnelles dans des organismes vivants. La quatrième partie présentera quant à elle, les différents types de design pour les biopiles à combustibles en vue d'introduire le dépôt de brevet réalisé durant cette thèse.

Le deuxième chapitre est consacré au développement et à la fabrication, par compression mécanique, de bioélectrodes nanostructurées pour l'élaboration de biopiles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub> puissantes en vue de l'alimentation d'un dispositif nomade. La possibilité d'inclure une large quantité de biocatalyseurs (glucose oxydase, glucose déshydrogénase, laccase, bilirubine oxydase) dans un volume restreint est étudiée.

Le troisième chapitre repose sur l'assemblage de biopiles enzymatiques. Différentes combinaisons d'anode/cathode ont été effectuées. De plus, l'étude du design du système et l'assemblage de plusieurs biopiles en série ou en parallèle seront détaillés. D'autre part, une description des différents appareils électriques alimentés sera développée via l'utilisation ou non d'un circuit électronique adapté. Ce chapitre se consacre également sur le développement d'une biopile à glucose-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilisant le système à flux développé, ainsi que l'étude de l'association de plusieurs biopiles. Ce système serait un bon compromis pour une application implantable.

# **CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
<b>I.1. Introduction .....</b>	<b>8</b>
<b>I.2. Les biopiles enzymatiques.....</b>	<b>8</b>
I.2.1. Contexte général .....	8
I.2.2. Les biopiles à combustible.....	9
I.2.2.1. Principe d'une pile à combustible.....	9
I.2.2.2. Les différents types de biopiles à combustible .....	11
I.2.2.2.a. Fonctionnement d'une biopile.....	11
I.2.2.2.b. Les biopiles microbiennes.....	12
I.2.2.2.c. Les biopiles à mitochondrie.....	13
I.2.2.2.d. Les biopiles enzymatiques .....	13
I.2.2.2.e. Les biopiles hybrides.....	16
I.2.2.2.f. Les piles biomimétiques .....	16
I.2.3. Les biopiles enzymatiques glucose-O <sub>2</sub> .....	17
I.2.3.1. Principe et applications .....	17
I.2.3.2. Les systèmes enzymatiques pour biopiles glucose-O <sub>2</sub> .....	18
I.2.3.2.a. Enzymes pour l'oxydation du glucose à l'anode .....	18
I.2.3.2.b. Enzymes pour la réduction du dioxygène à la cathode.....	22
I.2.3.2.c. Enzymes pour la réduction du peroxyde d'hydrogène à la cathode .....	24
<b>I.3. Immobilisation des enzymes et leur connexion sur électrode.....</b>	<b>25</b>
I.3.1. Généralités .....	25
I.3.2. Immobilisation des enzymes.....	26
I.3.2.1. Immobilisation par adsorption .....	26
I.3.2.2. Immobilisation par greffage covalent .....	27
I.3.2.3. Immobilisation par réticulation.....	28
I.3.2.4. Immobilisation par encapsulation .....	28
I.3.3. Transfert électronique protéine-électrode .....	29
I.3.3.1. Transfert électronique direct/indirect.....	29
I.3.3.2. DET et MET à la biocathode pour la réduction du dioxygène .....	33
I.3.3.2.a. La Laccase.....	33
I.3.3.2.b. La Bilirubine oxydase .....	34

I.3.3.2.c. DET et MET à la biocathode pour la réduction du peroxyde d'hydrogène .....	35
I.3.3.3. DET et MET à la bioanode pour l'oxydation du glucose .....	35
I.3.3.3.a. La Glucose oxydase .....	36
I.3.3.3.b. La Glucose déshydrogénase FAD-dépendante .....	37
<b>I.4. Rôle des nanotubes de carbone dans les biopiles glucose-O<sub>2</sub>.....</b>	<b>37</b>
I.4.1. Structures, propriétés et utilisations des nanotubes de carbone.....	37
I.4.1.1. Structures et propriétés .....	37
I.4.1.2. Les nanotubes de carbone comme matériau d'électrode .....	40
I.4.1.3. Modification et fonctionnalisation des CNTs .....	40
I.4.1.3.a. Fonctionnalisation covalente.....	41
I.4.1.3.b. Fonctionnalisation non covalente.....	42
I.4.2. Les CNTs pour l'immobilisation et la connexion d'enzymes rédox dans les biopiles enzymatiques glucose-O <sub>2</sub> .....	43
I.4.2.1. Electrodes à base de CNTs pour la connexion enzymatique .....	43
I.4.2.2. Biopiles enzymatiques glucose-O <sub>2</sub> à base de CNTs .....	44
<b>I.5. Les différents design de biopiles et leurs applications .....</b>	<b>45</b>
I.5.1. Les microbiopiles.....	45
I.5.2. Les biopiles flexibles .....	46
I.5.3. Les biopiles microfluidiques.....	46
<b>I.6. Vers la gestion de l'énergie des biopiles .....</b>	<b>47</b>
I.6.1. Alimentation directe .....	47
I.6.2. Alimentation contrôlée via la charge d'un condensateur .....	47
<b>I.7. Vers l'implantation des biopiles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub> .....</b>	<b>48</b>

## I.1. Introduction

Aujourd'hui, de nombreuses recherches sont axées sur le développement des piles à combustibles. Une brève description de son fonctionnement et des différents types de biopiles à combustible seront détaillés. Cette thèse porte sur les biopiles enzymatiques à glucose- $O_2$  utilisant des protéines qui vont être capables d'oxyder ou de réduire un substrat. A l'anode, il s'agit d'un processus d'oxydation du glucose et à la cathode, la réduction du dioxygène. Ces enzymes vont pouvoir être immobilisées, suivant différentes méthodes qui seront décrites et se connecter à l'électrode soit par un transfert direct d'électron, soit par un transfert indirect. A ces enzymes vont être associés des nanotubes de carbone qui présentent des propriétés très intéressantes pour cette application des biopiles enzymatiques. Le design d'une biopile est également très important que ce soit pour les performances ou encore les applications que l'on vise. Derrière tout cela se cache une gestion de l'énergie nécessaire pour l'alimentation de divers dispositifs à faible demande énergétique, en passant par l'implantable.

## I.2. Les biopiles enzymatiques

### I.2.1. Contexte général

La production d'énergie, principalement d'origine fossile (pétrole, gaz, charbon) connaît une demande mondiale croissante et cela devrait s'accroître dans les prochaines années selon l'Agence Internationale de l'Énergie. Cette croissance de demande en énergie intervient à une période où le réchauffement climatique est plus que reconnu et cela impose une réduction de la production énergétique, tout au moins de la composante la plus génératrice de gaz à effet de serre (GES). Pour pallier à cela, de nouvelles alternatives sont proposées, comme la production d'énergie nucléaire ou encore d'énergies renouvelables. Cependant, un des secteurs générant le plus de GES est celui des transports. Pour diminuer cet accroissement de l'effet de serre, la recherche d'un vecteur énergétique produit à partir de différentes sources d'énergies primaires « propres », transportables, stockables et distribuables, est en pleine extension. Une des thématiques les plus étudiées aujourd'hui est la pile à combustible (PAC), qui est un moyen de produire de l'électricité, avec un concept prometteur pour l'avenir. Découverte en 1839, elle a été mise de côté durant près de cent ans suite à la découverte des énergies fossiles. A ce jour, les PACs sont utilisées dans de nombreux domaines tels que

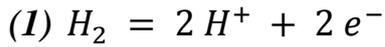
l'automobile hybride et électrique, la production délocalisée d'électricité ou encore des applications portables. Ce système présente de nombreux avantages, tels que de bons rendements énergétiques, pas d'impact négatif sur l'environnement. Cependant, la durée de vie de ces PACs est encore limitée, leur taille est encore trop importante et le coût des matières est beaucoup trop élevé. Aujourd'hui de nouvelles études de PACs sont en expansion, utilisant des catalyseurs biologiques, afin de remédier à ces problèmes. En effet, ces catalyseurs biologiques sont actuellement utilisés pour la production d'énergie propre pour des applications de niches, des applications à faible consommation dans des milieux difficiles d'accès. Pour cela, la recherche s'axe sur la récupération d'énergie (« energy harvesting » en anglais) qui vise à subvenir aux besoins de ces appareils à faible consommation, en grappillant (« energy scavenging » en anglais) une certaine quantité de l'énergie ambiante disponible (de quelques  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-3}$  à des dizaines de  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ ).

## I.2.2. Les biopiles à combustible

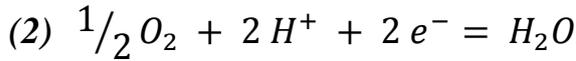
### I.2.2.1. Principe d'une pile à combustible

Une pile à combustible (PAC) est un dispositif capable de générer de l'énergie électrique à partir d'énergie chimique. Ce processus de conversion d'énergie se base sur la transformation électrochimique d'une substance chimique par des processus d'oxydation et de réduction. Plus précisément, les PACs reposent sur le simple principe de la circulation d'électrons entre l'anode, là où va se produire une réaction d'oxydation d'un réducteur, c'est-à-dire une perte d'un ou plusieurs électrons, et la cathode, où une réaction de réduction d'un oxydant a lieu, avec un gain d'électron(s). Ces deux réactions, d'oxydation et de réduction permettent alors la circulation d'électrons (ou courant électrique) lorsque les deux électrodes sont connectées par un circuit externe. Le matériau d'électrode joue aussi un rôle ; en effet, il doit être suffisamment stable pour perpétuer la réaction.

En 1839, Grove and Schoebein réalisèrent les premières PACs à dihydrogène-dioxygène<sup>1,2</sup>. Ce système de pile  $\text{H}_2\text{-O}_2$  est aujourd'hui toujours particulièrement étudié. Dans ce cas, le dihydrogène joue le rôle de carburant et est oxydé à l'anode pour produire des protons ( $\text{H}^+$ ) et  $\text{O}_2$  est l'oxydant réduit à la cathode pour produire de l'eau (Figure I-1). Les protons assurent le transport au travers des membranes. La pile met donc en jeu deux demi-réactions rédox :

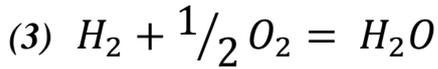


$$E^\circ H_2/H^+ = 0 V \text{ vs. ESH}$$



$$E^\circ O_2/H_2O = 1,229 V \text{ vs. ESH}$$

Globalement, la réaction de la pile peut alors s'écrire :



A noter que la différence de potentiel théorique maximal de la pile peut être de 1,229 V.

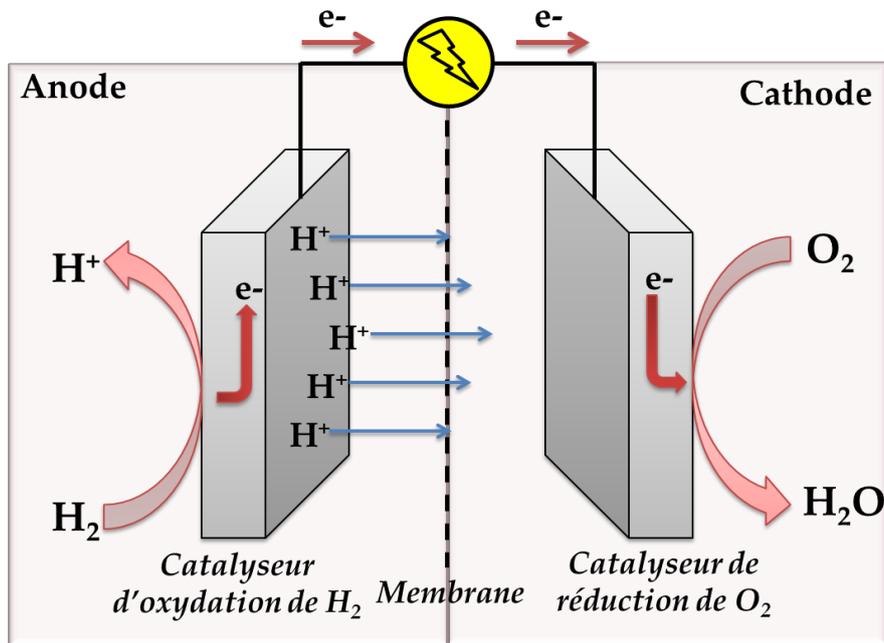


Figure I-1 : Schéma de principe d'une pile à combustible  $H_2-O_2$

Une grande majorité des PACs  $H_2-O_2$  utilise des catalyseurs métalliques, mais, ces catalyseurs couramment utilisés aux électrodes, comme le platine par exemple, sont des matériaux particulièrement coûteux et limitent donc la fabrication et l'utilisation à grande échelle de ces PACs. La présence d'espèces telles que CO,  $CO_2$  ou encore  $Cl_2$  & diminue les performances de la PAC dans le temps<sup>3,4</sup>. Les catalyseurs naturels, les enzymes, sont des protéines capables de réaliser toutes sortes de réactions complexes tout en étant constituées d'atomes abondants, tels que le carbone, l'oxygène, l'azote pour la matière organique et un certain nombre d'entre elles utilisent des métaux non nobles particulièrement abondants comme le fer, le cuivre, le nickel. Les catalyseurs moléculaires sont souvent de type chimique, impliquant

exclusivement des complexes de métaux de transition. Essentiellement, deux métaux, le ruthénium et le manganèse ont été utilisés, disposés dans des configurations dimériques dans l'espoir de favoriser la formation de la liaison O-O<sup>5</sup>. Les enzymes rédox réalisent une très grande variété de réactions d'oxydo-réduction sur de nombreux substrats naturels. Ce n'est qu'en 1964 que la démonstration de l'utilisation de ces enzymes rédox pour générer un courant électrique a été faite par Yahiro, Lee et Kimble en utilisant la glucose oxydase (GOx) et le D-amino acide oxydase afin d'obtenir un courant électrique<sup>6</sup>. Ainsi la première « biopile enzymatique » avait alors été décrite. Ce n'est que depuis une vingtaine d'années, avec l'essor de la technologie des biocapteurs et l'arrivée de nouveaux matériaux d'électrodes, que l'utilisation de ces biocatalyseurs se développe plus largement.

---

#### I.2.2.2. Les différents types de biopiles à combustible

##### I.2.2.2.a. Fonctionnement d'une biopile

---

De la même manière que les piles à combustibles abiotiques, les biopiles consistent en l'association de biocatalyseurs permettant d'effectuer une réaction d'oxydation d'un combustible (dihydrogène<sup>7,8</sup>, alcools<sup>9-11</sup>, glucose<sup>12,13</sup>...) à l'anode et la réduction d'un oxydant (majoritairement le dioxygène) à la cathode<sup>14</sup>. Plus précisément, on peut dire que l'électrode joue le rôle d'un des substrats naturels impliqué dans la réaction rédox en tant que donneur (biocathode) ou accepteur (bioanode) d'électrons (Figure I-2A). Les potentiels des deux électrodes sont alors fixés par la valeur des potentiels rédox mis en jeu dans la catalyse. Les courants mesurés pour chacune des bioélectrodes seront dépendants de l'activité du matériel biologique vis-à-vis d'un substrat donné et de nombreuses autres conditions (vitesses de transfert d'électron à l'interface, diffusions, température, salinité...) (Figure I-2B).

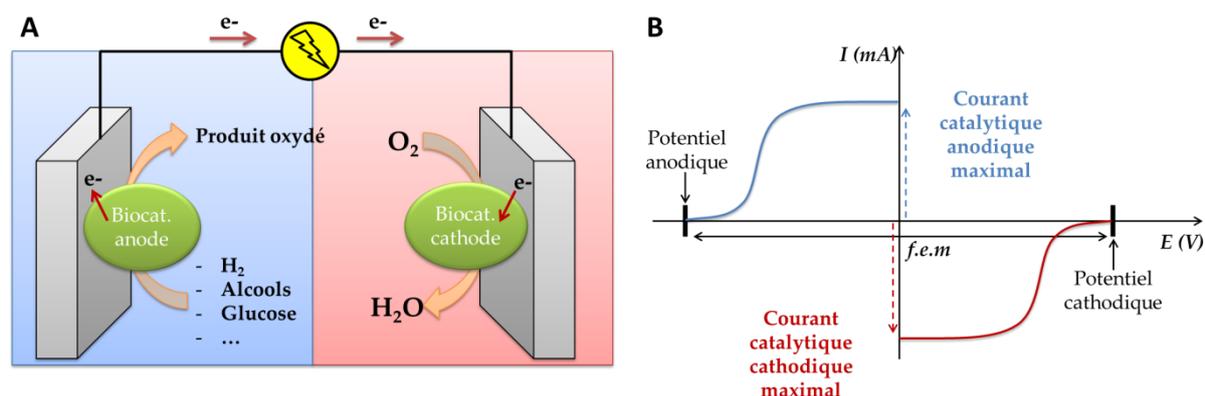


Figure I-2 : (A) Schéma représentatif du fonctionnement d'une biopile à combustible. (B) Représentation sur diagramme potentiel-courant des contributions anodique et cathodique permettant l'obtention de la force électromotrice (f.e.m) de la biopile et des courants catalytiques

A ce jour, les puissances obtenues avec les biopiles ne permettent pas d'envisager l'alimentation électrique de dispositifs à haute demande énergétique. En effet, l'objectif de ces biopiles est de se substituer aux piles dites « classiques » et aux batteries utilisées pour des appareils à faibles demandes énergétiques tels que des petits appareils portables (téléphone portable, MP3) ou encore des dispositifs biomédicaux (capteurs à glucose, stimulateur cardiaque, etc.) pour l'implantable. Concernant les puissances des biopiles, les microbiennes donnent des puissances de l'ordre de 0,1 à 1 W.m<sup>-2</sup>, tandis que pour les biopiles enzymatiques cela est de l'ordre de 1 à 10 W.m<sup>-2</sup> soit une puissance dix fois plus importante. Cependant, la durée de vie d'une biopile microbienne en fonctionnement continu est bien plus importante qu'une biopile enzymatique.

#### I.2.2.2.b. Les biopiles microbiennes

Les biopiles, ou piles à combustibles microbiennes (PACM), permettent de produire de l'électricité lors de la dégradation de molécules organiques par les bactéries. En 1911, Potter a observé que la bactérie *Escherichia Coli* produisait de l'électricité. Il a ensuite été démontré que bon nombre de bactéries communes produisaient de l'électricité par catabolisme naturel des sucres, c'est-à-dire par dégradation de certaines molécules organiques en libérant des électrons qui peuvent être récupérés par l'anode de la pile<sup>15</sup>. Puis au début des années 1980, l'équipe de Bennetto a ajouté un médiateur afin d'augmenter le rendement de ces piles bactériennes<sup>16</sup>. La pile en elle-même était assez semblable à n'importe quelle pile à

combustible, avec sa membrane séparant l'anode de la cathode. Dans une pile bactérienne, le rendement électrique dépend à la fois du nombre de bactéries, de l'efficacité de leur métabolisme et de la surface des électrodes qui collectent les électrons. Ces biopiles ont connu un développement depuis une dizaine d'années. De nombreux travaux ont montré les possibilités de génération d'un courant électrique par des microorganismes fixés sous forme de biofilm sur des électrodes. Les applications de ces dispositifs restent toutefois limitées en raison des particularités de mise en œuvre liées à l'utilisation de cultures microbiennes.

#### I.2.2.2.c. Les biopiles à mitochondrie

---

Cette nouvelle catégorie de biopile utilise des organites entiers comme catalyseurs<sup>17</sup>. Ces mitochondries présentes dans les cellules eucaryotes sont composées d'enzymes et de coenzymes qui seront capables d'oxyder des biocarburants<sup>18</sup>. Celles-ci ne peuvent pas se reproduire, tout comme les enzymes, contrairement aux bactéries présentes dans les biopiles microbiennes. Cela va donc avoir une influence sur leur stabilité. Le groupe de Minteer s'est intéressé à ce type de biopile et plus précisément à l'oxydation complète du pyruvate<sup>19</sup>. Arechederra *et al.* ont démontré le transfert direct des électrons sur le papier de carbone pour les organites. Egalement, la capacité de cette anode à base de COx à oxyder une multitude d'acides gras a été décrite<sup>17</sup>.

#### I.2.2.2.d. Les biopiles enzymatiques

---

Les biopiles à combustible enzymatiques sont parmi les plus étudiées à ce jour avec les piles microbiennes<sup>20-23</sup>. Les densités de courants et de puissances obtenues grâce à l'utilisation de ces protéines rédox sont bien souvent supérieures à celles obtenues dans le cadre des PACMs. Dans le cas de ces bioélectrodes, la diffusion des substrats est facilitée par rapport aux électrodes à micro-organismes (MOs), telles que les bactéries ou levures, par exemple, grâce à l'absence de biofilm et de membrane cellulaire, c'est-à-dire que les enzymes sont spécifiques de leurs substrats, et que l'on peut s'affranchir de membrane séparatrice entre les deux bioélectrodes, à l'inverse des autres types de piles à combustibles. Par ailleurs, la charge en biocatalyseur ne se renouvelle pas au sein de la bioélectrode qui possède une stabilité limitée dans le temps. Pour cette raison, tout comme les PACMs, les performances de biopiles

enzymatiques (densité de courant, stabilité) restent pour le moment inférieures aux PACs classiques et ont ralenti leur développement. Cependant, depuis une dizaine d'années, le nombre de travaux décrivant l'élaboration de biopiles enzymatiques n'a cessé de croître. L'objectif de ces biopiles enzymatiques est de pouvoir fournir de l'énergie à de petits dispositifs à faible demande énergétique pour l'implantable ou encore l'électronique nomade<sup>24,25</sup>. Dans toutes ces biopiles enzymatiques, les protéines utilisées sont des oxydoréductases, capables de catalyser une réaction chimique, d'oxydation ou de réduction, faisant intervenir le transfert d'un certain nombre d'électrons. A ce stade, on connaît un certain nombre de protéines rédox étant capables de réaliser la réaction d'oxydation d'une grande variété de combustibles à l'anode et la réduction d'un oxydant à la cathode.

Comme les PACs classiques, la majorité des biopiles enzymatiques est basée sur la réduction bioélectrocatalytique du dioxygène, à la cathode. Les enzymes rédox utilisées pour la réduction à 4 électrons du dioxygène en eau sont pour la plupart des enzymes dites à multi cuivres (ou MultiCopperOxidase, MCOs en anglais). La réduction prend place au sein du site actif métallique comprenant plusieurs atomes de cuivre<sup>26</sup>. On peut citer la laccase<sup>27</sup> et la bilirubine oxydase<sup>28</sup> comme biocathodes enzymatiques très utilisées. Il existe aussi des exemples de biocathode incorporant la polyphénol oxydase (PPO ou Tyrosinase)<sup>29</sup> ou encore le cytochrome oxydase (COx)<sup>30</sup>.

Le peroxyde d'hydrogène a également été utilisé à la cathode. Dans ce cas, la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau ne fait intervenir que 2 électrons. Les enzymes permettant son électroréduction font partie de la classe des peroxydases et sont composées d'un atome de fer, souvent coordonné à une porphyrine, le tout appelé hème. Cet ensemble constitue le site catalytique.

Les différents systèmes enzymes/oxydants sont résumés dans le Tableau I-1 avec les demi-réactions rédox mises en jeu dans le processus catalytique.

Oxydant	Enzymes	Métal	Demi-réaction
<b>O<sub>2</sub></b>	Laccase (Lac)	Cu	$O_2 + 4 H^+ + 4 e^- \rightarrow 2 H_2O$
	Bilirubine Oxydase (BOD)	Cu	
	Polyphénol Oxydase (PPO)	Cu	
	Cytochrome Oxydase (COx)	Cu/Fe/Hème	
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Horseradish peroxydase (HRP)	Fe/Hème	$H_2O_2 + 2 H^+ + 2 e^- \rightarrow 2 H_2O$

Tableau I-1 : Couples oxydant/enzymes majoritairement utilisés dans la conception de cathode pour les biopiles enzymatiques

L'un des intérêts des biopiles enzymatiques est de permettre l'utilisation d'un grand nombre de combustibles à oxyder pour la collecte d'électrons à l'anode. Les systèmes enzymatiques varient donc en fonction du carburant choisi à la bioanode. Cela ouvre de nombreuses alternatives selon les applications visées par les biopiles enzymatiques. Comme pour les PACs, le dihydrogène demeure le combustible le plus attractif. Dans la nature, les systèmes protéiques responsables de catalyse réversibles des protons en dihydrogène sont les hydrogénases<sup>7</sup>. Ces enzymes sont capables d'oxyder le dihydrogène à de très faibles surtensions. Comme les MCOs, les hydrogénases sont des métalloenzymes composés de centres Fer-Fer ou Fer-Nickel capables de réduire les protons ou d'oxyder le dihydrogène. La force électromotrice d'une biopile composée d'une bioanode à dihydrogène et d'une biocathode à MCOs serait proche de celle observée pour les PACs H<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>. Gros inconvénient, la plupart de ces protéines sont désactivées totalement en présence de monoxyde de carbone et surtout en présence de dioxygène<sup>31</sup>. De nombreux combustibles, autres que le dihydrogène, peuvent également être utilisés à la bioanode. Une liste représentative d'autres combustibles utilisés à la bioanode est présentée dans le Tableau I-2.

<b>Combustible</b>	<b>Enzymes</b>	<b>Cofacteur</b>	<b>Demi-réaction</b>
<b>Hydrogène</b>	Hydrogénase (H <sub>2</sub> ase)	Fe/Fe ou Ni/Fe	H <sub>2</sub> → 2 H <sup>+</sup> + 2 e <sup>-</sup>
<b>Cellobiose</b>	Cellobiose déshydrogénase (CDH)	FAD/Hème	Lactose → lactone
<b>Glucose</b>	Glucose oxydase (GOx) Glucose déshydrogénase	FAD FAD ou NAD <sup>+</sup> ou PQQ	D-glucose → acide gluconique
<b>Fructose</b>	Fructose déshydrogénase (FDH)	FAD/Hème	D-fructose → 5-céto-fructose
<b>Ethanol</b> <b>Méthanol</b>	Alcool DH (ADH)	NAD <sup>+</sup>	Alcool → aldéhyde
<b>Aldéhydes</b>	Aldéhyde DH (AIDH)	NAD <sup>+</sup>	Aldéhyde → acide
<b>Acides</b>	Formate DH	NAD <sup>+</sup>	Acide formique → CO <sub>2</sub>

Tableau I-2 : Principales enzymes utilisées à l'anode de biopiles enzymatiques

#### I.2.2.2.e. Les biopiles hybrides

---

Les biopiles hybrides consistent en l'association d'une demi-pile à catalyseur abiotique (catalyseur métallique ou bio-inspiré) et d'une autre demi-pile à catalyseur enzymatique. Cette configuration permet d'augmenter la durée de vie de ces biopiles puisqu'il est possible de travailler à pH et température optimums pour l'enzyme impliquée et on peut ainsi limiter le nombre de protéines impliquées dans les réactions. La stabilité de ce type de biopile est nettement améliorée grâce au catalyseur abiotique. De nombreux travaux sont en cours dans cette thématique, par exemple Starck *et al.*<sup>32</sup> ont confectionné une biopile à combustible biologique hybride dans un environnement marin. A l'anode s'effectue l'oxydation microbienne du lactate et à la cathode, il s'agit encore de la BOD pour la réduction du dioxygène. Cette biopile a été maintenue dans de l'eau de mer brute durant plus d'une semaine. On peut également citer les travaux de Le Goff *et al.* présentant une biocathode à base de BOD et une bioanode composée d'un catalyseur abiotique en nickel pour l'oxydation du dihydrogène. Ce système donne une densité de puissance de l'ordre de  $2 \text{ mW.cm}^{-2}$ <sup>33</sup>.

#### I.2.2.2.f. Les piles biomimétiques

---

La durée de vie des biopiles étant un verrou majeur, une nouvelle génération de biopiles est alors apparue : ce sont les piles bio-inspirées. Elles fonctionnent par l'oxydation catalytique du glucose associée à la réduction de l'oxygène en utilisant des macrocycles de métaux de transition qui vont mimer la structure ou l'activité de sites prosthétiques d'enzymes. La suppression totale des enzymes conduit à une forte longévité de ces piles bio-inspirées. En 2015, Artero *et al.*<sup>34</sup> ont élaboré une pile combinant à l'anode un complexe de nickel bisdisphosphine inspiré des sites actifs Ni-Fe et Fe-Fe des hydrogénases pour l'oxydation du dihydrogène et à la cathode un complexe de cobalt (Co-N-C) pour la réduction du dioxygène. Cette pile bio-inspirée a une puissance maximale de  $23 \text{ } \mu\text{W.cm}^{-2}$ .

## I.2.3. Les biopiles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub>

### I.2.3.1. Principe et applications

Les biopiles glucose-O<sub>2</sub> sont parmi les systèmes de biopiles enzymatiques les plus étudiés à l'heure actuelle. Elles sont basées sur l'oxydation du D-glucose à l'anode et la réduction du dioxygène à la cathode. Leur attractivité provient du fait que les deux substrats utilisés sont présents dans de nombreux milieux physiologiques animaux et végétaux<sup>35</sup>. En effet, le glucose et le dioxygène sont présents en concentrations normalement régulées et sans cesse renouvelées. Ceci rend donc possible la conversion de l'énergie chimique présente chez un animal en énergie électrique. La génération *in vivo* d'un courant électrique ouvre alors la voie à de nombreuses applications désormais envisageables dans le secteur biomédical<sup>36,37</sup>. L'objectif visé par cette technologie se concentre principalement sur l'alimentation de dispositifs implantables dit à « faibles » demandes énergétiques comme des pacemakers, des organes artificiels (sphincter (300 μW), reins (10 mW)) ou encore des capteurs autoalimentés pour la détection de la glycémie par exemple. Les puissances nécessaires peuvent varier de la dizaine de μW pour un pacemaker par exemple au mW voir la dizaine de mW pour l'alimentation de dispositifs plus exigeants (sphincter artificiel, pompe à insuline (< 1 mW), rein artificiel).

N. Mano *et al.* ont décrit en 2003 une des premières biopiles glucose-O<sub>2</sub> fonctionnant dans un grain de raisin et délivrant une puissance de l'ordre de quelques μW (Figure I-3A)<sup>38</sup>. Puis, en 2008, le groupe de Sony a par exemple publié une biopile enzymatique qui, constituée de plusieurs éléments en série, a été capable de générer suffisamment d'énergie pour faire fonctionner un lecteur mp3 et une petite voiture radiocommandée (Figure I-3B)<sup>12</sup>.

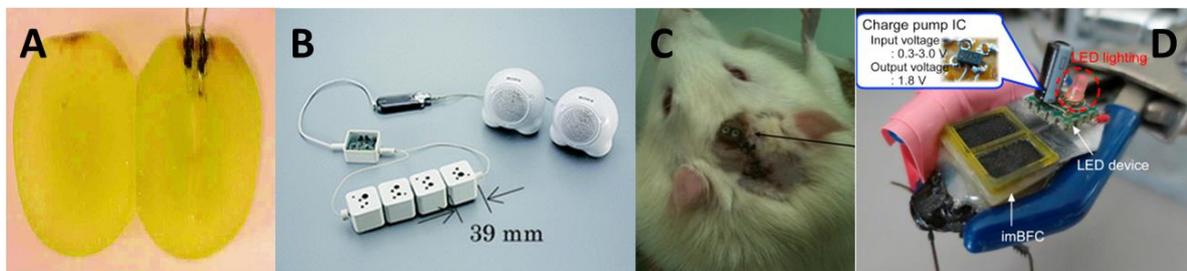


Figure I-3 : (A) Biopile glucose-O<sub>2</sub> opérationnelle dans un grain de raisin<sup>38</sup>. (B) Biopile glucose-O<sub>2</sub> alimentant un lecteur MP3<sup>12</sup>. (C) Biopile glucose-O<sub>2</sub> implantée dans un rat et permettant l'alimentation d'une diode électroluminescente<sup>39</sup>. (D) Biopile implantée dans un cafard alimentant un capteur de température-humidité sans fil<sup>40</sup>

Les premiers résultats probants décrivant les implantations de biopiles glucose-O<sub>2</sub> dans des animaux ont surtout été obtenus au cours des cinq dernières années. Notamment, un des résultats les plus marquants a été réalisé par Zebda *et al.* où une biopile implantée dans un rat a permis l'alimentation d'une diode électroluminescente (Figure I-3C)<sup>39</sup>. Tous ces travaux ont pu démontrer la faisabilité du principe de la biopile à glucose pouvant convertir de l'énergie chimique, à partir d'organismes vivants, en courant électrique. Des efforts sont à faire concernant la biocompatibilité, la stabilité et la puissance de ces biopiles glucose-O<sub>2</sub>. Ces deux derniers paramètres dépendent grandement des systèmes enzymatiques et des architectures d'électrodes envisagées. En 2016, l'équipe de Shoji a implanté une biopile au sein d'un cafard permettant d'alimenter une LED ou encore un capteur de température-humidité sans fil (Figure I-3D)<sup>40</sup> à base de noir de carbone (Ketjen black).

### I.2.3.2. Les systèmes enzymatiques pour biopiles glucose-O<sub>2</sub>

#### I.2.3.2.a. Enzymes pour l'oxydation du glucose à l'anode

- La glucose oxydase (GOx) d'*Aspergillus niger*

La glucose oxydase est probablement l'enzyme la plus utilisée pour l'oxydation du glucose à l'anode des biopiles glucose-O<sub>2</sub>. L'une des raisons principales découle du développement des biocapteurs métaboliques à glucose depuis plusieurs dizaines d'années dans lesquels la GOx a été très largement employée<sup>41,42</sup>. Cette enzyme est constituée de deux sous unités identiques (homodimère) à l'intérieur desquelles est enfoui le cofacteur organique rédox responsable de l'oxydation du glucose : la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) (Figure I-4)<sup>43</sup>.

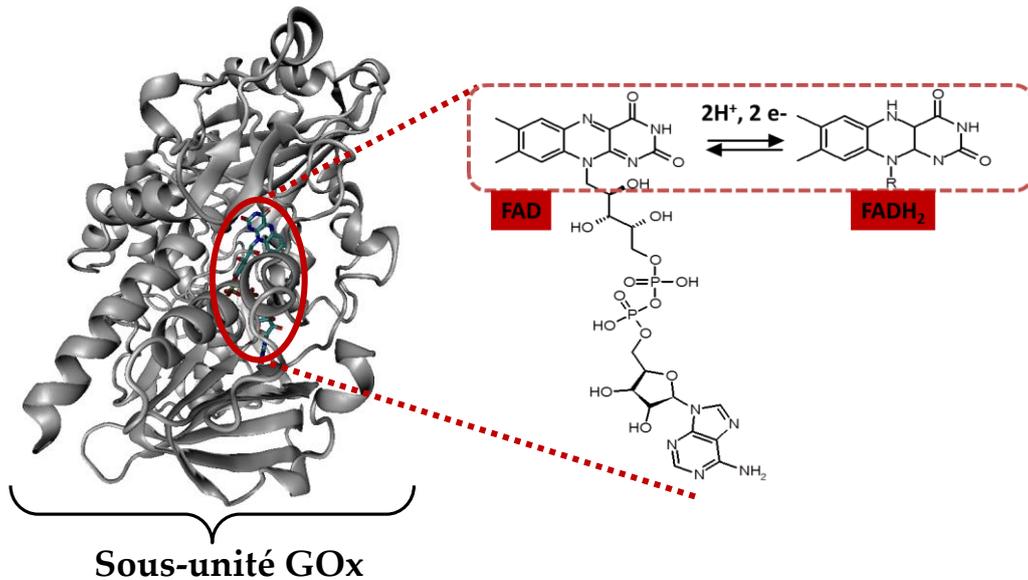
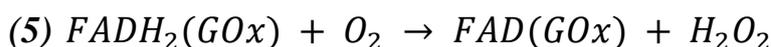


Figure I-4 : Schéma d'une sous unité constituant le dimère de la GOx contenant le cofacteur organique rédox FAD, formant le couple FAD/FADH<sub>2</sub>

La GOx présente une très forte sélectivité pour le β-D-glucose (par rapport au α-D-glucose). Grâce à son cofacteur organique rédox et l'environnement protéique de ce dernier, la GOx réalise, par un processus à 2 e<sup>-</sup> et 2 H<sup>+</sup>, l'oxydation du glucose en gluconolactone, qui s'hydrolyse spontanément en acide gluconique :



Cette protéine a également l'avantage d'être particulièrement active dans les conditions physiologiques (37°C et pH 7,4) ce qui en fait une excellente candidate pour l'élaboration d'anode pour biopile glucose-O<sub>2</sub> pour les applications implantables. En revanche, l'accepteur d'électrons naturel de la forme réduite (FADH<sub>2</sub>) de l'enzyme est le dioxygène<sup>44</sup>. Cette réaction limite donc la possibilité de transfert électronique entre la protéine rédox et l'électrode. En outre, cette réaction entraîne la formation de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui est un oxydant fort :



La stabilité de la GOx lui est conférée par l'enfouissement du cofacteur organique rédox profondément à l'intérieur de l'enveloppe protéique de l'enzyme et par son degré de glycosylation élevé (de 16 % à 25 % de son poids moléculaire)<sup>45</sup>. De ce fait, le transfert d'électrons est plus difficile.

- La glucose déshydrogénase FAD-dépendante (FADGDH) d'*Aspergillus sp.*

Cette enzyme, comme la GOx est une enzyme dont le site actif est la FAD (Figure I-5) avec un poids moléculaire de 97 kDa. Cette enzyme est spécifique à de nombreux sucres tels que le D-glucose, le 2-deoxy-D-glucose ou encore le D-xylose préférentiellement.

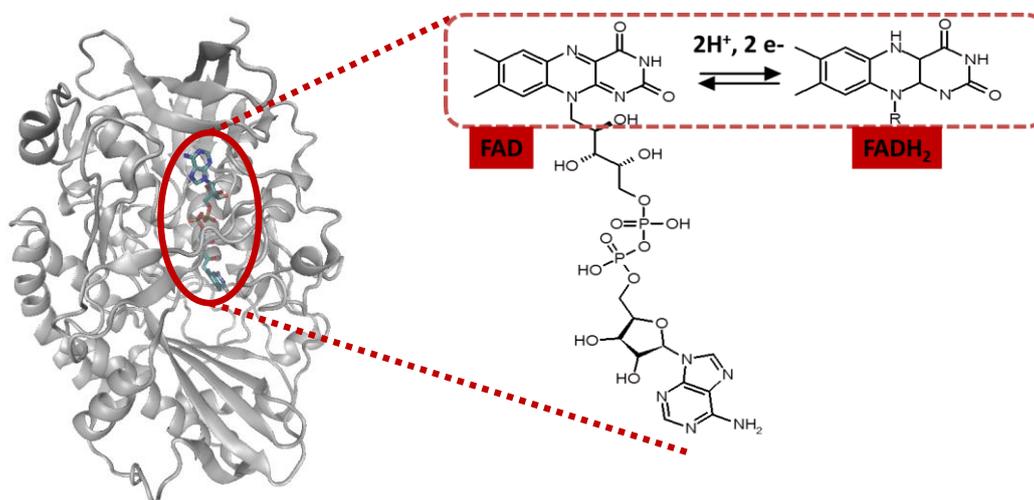


Figure I-5 : Schéma du monomère de la FADGDH contenant le cofacteur organique rédox FAD, formant le couple FAD/FADH<sub>2</sub>

Cette enzyme est très étudiée actuellement pour des applications de capteurs, comme dans les glycomètres (Self-monitoring of blood glucose). Celle-ci, à la différence de la GOx, ne peut avoir l'oxygène comme accepteur d'électron<sup>46</sup>. Cela présente plutôt un avantage pour l'utilisation dans l'implantable car il n'y aura pas de peroxyde d'hydrogène produit. Minter *et al.*<sup>47</sup> ont montré l'influence du peroxyde d'hydrogène produit par la GOx pour une cathode à base de Lac et ont proposé la FADGDH comme alternative. A cette enzyme a été associé un même médiateur, la 1,4-NQ, ou encore la 1,10-phénanthroline-5,6-dione (PLQ).

Il existe également deux autres classes de GDH, avec des cofacteurs différents : la PyrroloQuinoline Quinone (PQQ), et la Nicotine Adénine Dinucléotide (NAD) avec ou sans phosphate (P). La PQQ-GDH se compose de deux sous-unités identiques chacune avec des liaisons PQQ fortes et trois ions calcium<sup>48</sup>. Tanne *et al.* ont fonctionnalisé des CNTs sur des électrodes d'or avec la PQQ et couplée de manière covalente à une apo-GDH reconstituée. Les auteurs pouvaient ainsi réaliser le MET via la couche PQQ intermittente<sup>49</sup>. Il y a quelques années, la même équipe de recherche a réalisé un transfert direct d'électrons avec cette apo-GDH reconstituée en utilisant du poly (acide 3-aminobenzoïque-co-2-méthoxyaniline-5-acide

sulfonique) - PABMSA, une polyaniline sulfonée qui semble former des interactions favorisées avec la PQQ-GDH pour le DET<sup>50,51</sup>. Le DET pourrait également être obtenu grâce à un simple couplage d'amide en utilisant un ester succinimidylique d'acide 1-pyrénébutanoïque avec la PQQ-GDH sur un buckypaper à base de CNTs<sup>52</sup>. Les auteurs ont expliqué ce phénomène de transfert d'électrons par la structure 3D poreuse de buckypaper où la distance des enzymes intégrées à la matrice CNT est en moyenne assez courte pour le DET. Ce phénomène a également été observé par Ivnicki *et al.*<sup>53</sup>. Une biopile enzymatique à glucose à base d'électrodes sous forme de buckypaper a pu être insérée avec succès dans un escargot<sup>52</sup>, dans des palourdes<sup>54</sup>, sur des tissus crématisques de rat exposés<sup>55</sup> et dans des homards<sup>56</sup>.

La GDH NAD-dépendante (NAD-GDH) est composée de quatre sous-unités identiques où le cofacteur NAD n'est pas confiné dans la structure protéique<sup>57</sup>. Afin d'obtenir un transfert d'électrons à partir de l'enzyme, ce cofacteur doit être inclus avec un catalyseur qui réoxyde le NADH généré et un médiateur redox. Même lorsque de nombreux composés sont nécessaires à cette configuration, le potentiel excessif de NAD pour l'oxydation du glucose semble être assez intéressant pour faire face aux problèmes de l'ingénierie moléculaire multiple. En outre, il existe une large série d'enzymes dépendantes de NAD qui peuvent être utilisées comme catalyseur anodique de l'oxydation des biocarburants comme le glucose<sup>58</sup>, les alcools<sup>11</sup> ou le L-lactate<sup>59</sup>. Par conséquent, une fois que la stratégie optimale est déterminée pour la régénération de NAD, elle peut servir à de nombreuses applications de biocarburants différentes. Lalaoui *et al.* ont étudié différentes configurations pour l'oxydation électrocatalytique de NADH à l'aide des défauts multiples sur les MWCNTs, de diaphorases immobilisées et de complexes de ruthénium immobilisés<sup>60</sup> où le composé à base de ruthénium a fourni le meilleur compromis entre la densité de courant et le potentiel excessif.

Un autre exemple original pour une approche moléculaire pour oxyder le NADH a été proposé par Giroud *et al.* utilisant un dérivé de pyrène modifié par dithiobis(acide nitrobenzoïque) à cette fin et ont utilisé cette molécule en même temps pour l'immobilisation orientée des enzymes multi-cuivre à la cathode<sup>61</sup>. Cependant, pour ces exemples et d'autres<sup>62</sup>, NAD doit être dissous en solution pour obtenir les performances signalées, ce qui est plutôt gênant pour une application pratique. Pour contourner cette question, Sakai *et al.* ont proposé le dépôt ultérieur de poly-L-lysine comme couche de sol cationique suivi de l'enzyme NAD-GDH, NAD, de la diaphorase pour une oxydation efficace du NADH, le médiateur 2-méthyl-1,4-naphtoquinone, et enfin l'acide polyacrylique pour former un complexe de polyion avec la

couche de sol fixant étroitement les différents composants entre<sup>12</sup>. Avec cette conception, une densité de puissance de  $1,4 \pm 0,24 \text{ mW.cm}^{-2}$  à 0,3 V avec une tension de circuit ouvert de 0,8 V pourrait être obtenue. Sur la base de ce principe, une conception originale des cellules de biocarburant a été proposée combinant deux piles à combustible qui étaient connectées en parallèle et pouvaient fournir des sorties de puissance doublées. Une autre stratégie impliquait l'immobilisation de NADH sur des électrodes à base de CNT utilisant des dérivés de pyrène modifiés<sup>63</sup> ou des polymères<sup>64</sup>.

#### I.2.3.2.b. Enzymes pour la réduction du dioxygène à la cathode

---

Des biocathodes pour la réduction du dioxygène à partir d'enzyme comprenant des centres cuivres, les MCOs ont été utilisées pour l'élaboration de biocathode à oxygène<sup>8</sup>. Deux de ces enzymes ont été plus particulièrement étudiées.

- La Laccase (Lac) de *Trametes versicolor*

Il s'agit d'une petite enzyme à cuivre (60 kDa) possédant donc 3 sites mono et dinucléaires : T1, T2 et T3. Au niveau du site T1, situé en périphérie de l'enveloppe protéique<sup>65,66</sup>, sont collectés les électrons pour réduire le dioxygène au niveau du site T2/T3. Il s'agit d'une des protéines rédox les plus utilisées dans les biopiles à la biocathode grâce à sa faculté de réduction totale de l'oxygène à  $4 \text{ H}^+$  et  $4 \text{ e}^-$  à de hauts potentiels (dépendants de l'organisme d'origine de l'enzyme).

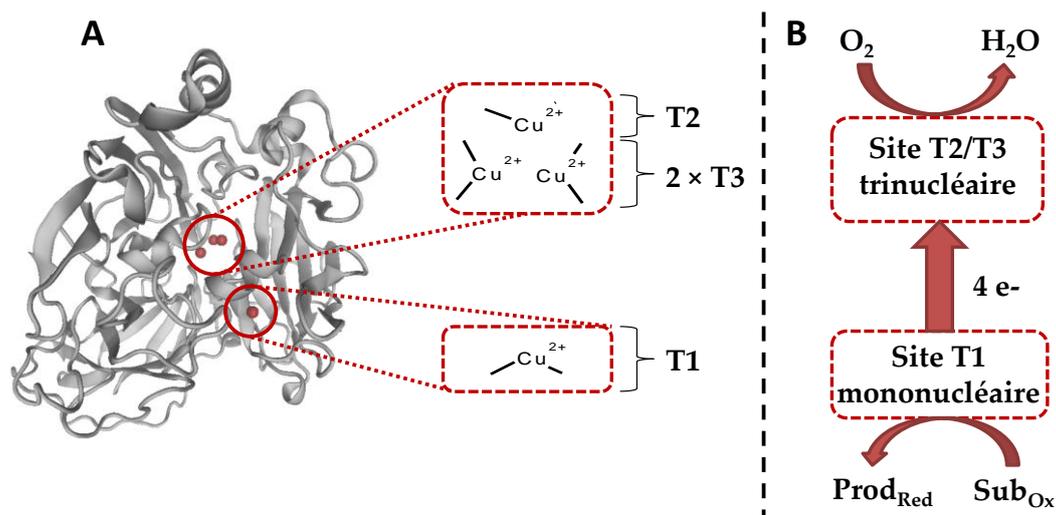


Figure I-6 : (A) Structure de la Lac avec les sites cuivre T1 et T2/T3. (B) Schéma du transfert électronique du site T1 au site T2/T3 permettant la réduction du dioxygène au site trinucéaire

Deux désavantages majeurs subsistent quant à l'utilisation de la laccase en milieu physiologique : son inhibition par les ions Cl<sup>-</sup> et ses propriétés acidophiles qui ne lui permettent pas d'être aussi active à pH neutre. Cependant, celle-ci peut être réactivée en milieu acide (pH 5)<sup>67</sup>. Celle-ci a pu fonctionner dans des sodas ou encore des jus de fruits qui ont un pH acide<sup>68</sup>. Un recours possible pour le milieu physiologique est donc la bilirubine oxydase.

- La Bilirubine oxydase (BOD) de *Myrothecium verrucaria*

Comme la Lac, la BOD est une MCO. Elle est du même type et comporte donc les mêmes sites catalytiques, un site T1 et un site T2/T3<sup>69</sup>. Elle oxyde naturellement la bilirubine, son substrat avec la réduction concomitante du dioxygène. Elle est, comme la laccase, fréquemment utilisée dans la conception de biocathode pour biopile glucose-O<sub>2</sub><sup>70</sup>. De plus, elle présente l'avantage de ne pas être inhibée par les Cl<sup>-</sup> et est active en condition physiologique à pH neutre. Son seul inconvénient reste d'être désactivée par la présence de produits de dégradation de l'urate<sup>71</sup>. Néanmoins, Edembe *et al.* ont récemment publié une étude présentant une BOD (de *Bacillus Pumillus*) faisant preuve d'une très bonne activité catalytique de réduction du dioxygène dans du sérum physiologique<sup>72</sup>.

### I.2.3.2.c. Enzymes pour la réduction du peroxyde d'hydrogène à la cathode

- La Peroxydase de raifort (HRP)

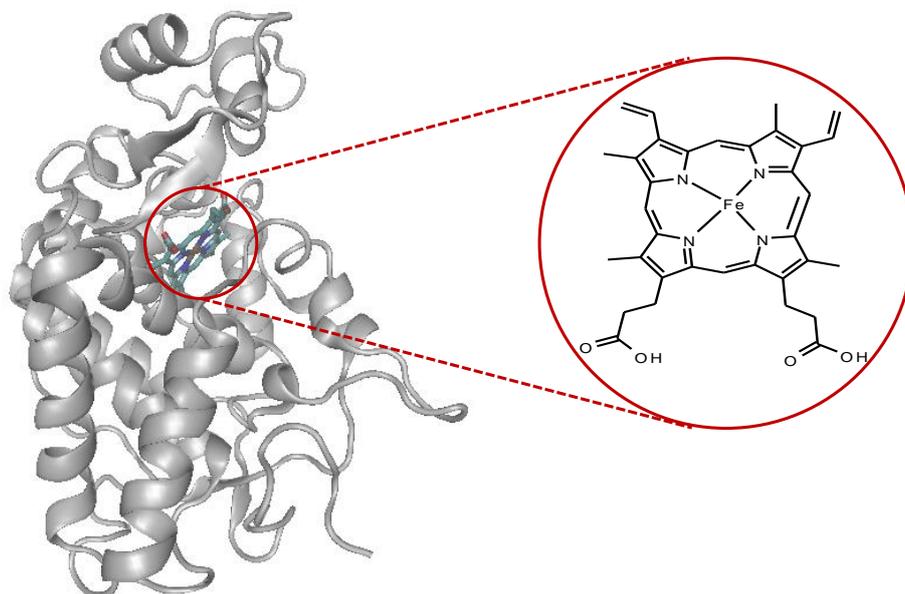
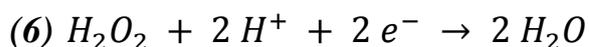


Figure I-7 : Structure de la HRP avec son site actif enfoui, l'hème

Cette petite enzyme de poids moléculaire de 43 kDA fait partie de la classe des peroxydases et permet la réduction du peroxyde d'hydrogène. Elle se compose d'un atome de fer et d'une porphyrine, l'ensemble formant un hème qui constitue le site catalytique de cette enzyme (Figure I-7). Celui-ci est facilement accessible, ce qui favorisera le DET<sup>73</sup>. Dans ce cas, la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau ne comporte que 2 électrons.



Cette enzyme est stable à pH 7 et permet une alternative à la consommation du peroxyde formé par la GOx<sup>74</sup>. Néanmoins, une approche originale a été démontrée en profitant de cette production de peroxyde d'hydrogène par la GOx pour le développement de biocathodes utilisant un système bisenzymatique avec de la peroxydase de raifort (HRP) comme catalyseur pour la réduction du peroxyde d'hydrogène. Dans cette configuration, la GOx a réduit l'oxygène en peroxyde d'hydrogène qui est ensuite réduit en eau par la HRP. En 2013, l'équipe de Cosnier a combiné GOx et HRP dans la même biocathode basée sur DWCNT afin que HRP consomme le peroxyde d'hydrogène produit par la GOx<sup>75</sup>. En outre, cette enzyme pourrait être orientée en utilisant des dérivés de porphyrine ou de pyrène<sup>76</sup>.

En 2015, Ramanavicius *et al.* ont élaboré une biopile GOx/HRP avec deux compartiments indépendants. A l'anode, la 1,10-phénanthroline-5,6-dione (PLQ) est le médiateur rédox. Sous  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  de glucose à l'anode et  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de peroxyde d'hydrogène à la cathode, une puissance de  $4,2 \mu\text{W.cm}^{-2}$  a été générée<sup>77</sup>.

L'inconvénient de ces biocathodes est l'utilisation accrue des enzymes et la consommation supplémentaire de glucose.

## I.3. Immobilisation des enzymes et leur connexion sur électrode

### I.3.1. Généralités

Les biopiles enzymatiques sont donc basées sur l'utilisation de la biocatalyse. Une réaction d'oxydation est réalisée à l'anode et une réaction de réduction à la cathode. Pour générer un courant électrique à partir de ces deux réactions, les électrodes doivent se substituer au cosubstrat de l'enzyme pour pouvoir collecter les électrons à l'anode et les distribuer à la cathode. Depuis les études pionnières réalisées depuis les années soixante, la « bioélectrochimie » a permis de comprendre de nombreux phénomènes faisant intervenir les échanges entre protéines rédox et les électrodes<sup>78</sup>. Pour parvenir à étudier ces systèmes biologiques, l'interaction entre l'électrode et l'entité à étudier est d'une importance capitale. Dans les applications en biopiles et biocapteurs enzymatiques, une attention particulière est apportée à l'immobilisation de la protéine sur la surface. Cette étape n'est pas un procédé nouveau mais reste fondamentale dans l'optique de développer des dispositifs efficaces et stables dans le temps. La durabilité du système est en effet un enjeu majeur pour leur éventuelle commercialisation. En outre, la bioélectrocatalyse mise en jeu dans la conception de biopiles enzymatiques consiste en des transferts d'électrons entre la protéine et l'électrode. Ces échanges sont capitaux et dicteront l'efficacité catalytique du dispositif. Il existe deux types de transfert électroniques : le transfert électronique direct (Direct Electron Transfer, DET en anglais) ou le transfert électronique indirect (Mediated Electron Transfer, MET en anglais).

Les conditions d'obtention de bioélectrodes pour biopiles enzymatiques reposent donc sur l'immobilisation de la biomolécule sur la surface de l'électrode et sur les propriétés de transfert électronique du système.

### I.3.2. Immobilisation des enzymes

Les enzymes sont très intéressantes pour le domaine de la biocatalyse. Cependant, leur coût élevé et leur stabilité dans le temps sont des points faibles pour leur utilisation dans l'industrie. Pour remédier à cela, la stratégie développée est l'immobilisation des enzymes qui permet de les stabiliser mais aussi de séparer l'enzyme des produits de la réaction enzymatique. En 1916, il a été démontré qu'une enzyme conserve son activité catalytique après avoir été immobilisée sur du charbon actif<sup>79</sup>. Quelques années plus tard, différentes techniques d'immobilisation physiques ou chimiques vont être décrites.

#### I.3.2.1. Immobilisation par adsorption

Cette technique très simple repose sur la capacité de certains corps minéraux ou organiques à fixer une molécule donnée à leur surface grâce à des interactions faibles de type Van der Waals, liaisons hydrogène, transfert de charges (liaisons ioniques), échanges d'ions ou encore à des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles) (Figure I-8).

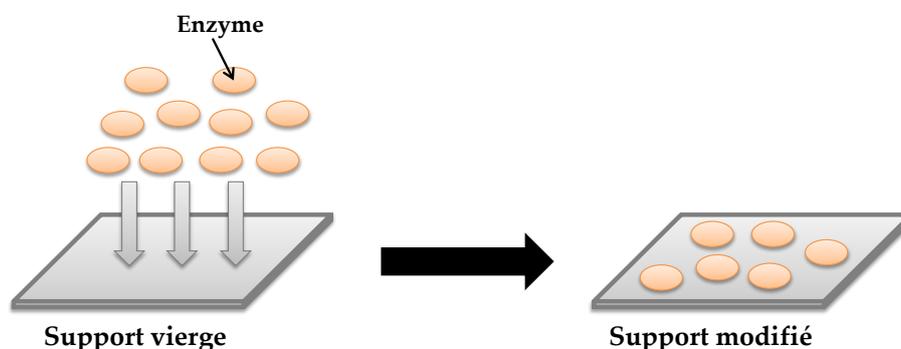


Figure I-8 : Adsorption des enzymes sur un support

L'enzyme va pouvoir s'adsorber sur la surface par maîtrise de plusieurs paramètres tels que le pH, la température, et la force ionique. Cette technique présente de nombreux avantages comme l'élimination des molécules non adsorbées par simple rinçage, une bonne accessibilité au site actif des biomolécules. Un désavantage principal est le phénomène de désorption dû aux interactions faibles et cela influe sur la stabilité dans le temps de notre système enzymatique<sup>80</sup>.

### I.3.2.2. Immobilisation par greffage covalent

Cette méthode d'immobilisation<sup>81</sup> consiste à faire réagir un groupement fonctionnel libre de l'enzyme, qui n'intervient pas dans la catalyse, avec un groupement fonctionnel du réactif, qui est bien souvent une fonction carboxylique, hydroxyle, thiol, aldéhyde ou encore amine (Figure I-9). Ces groupements doivent être activés dans des conditions douces afin de réagir avec l'enzyme et sans la dénaturer.

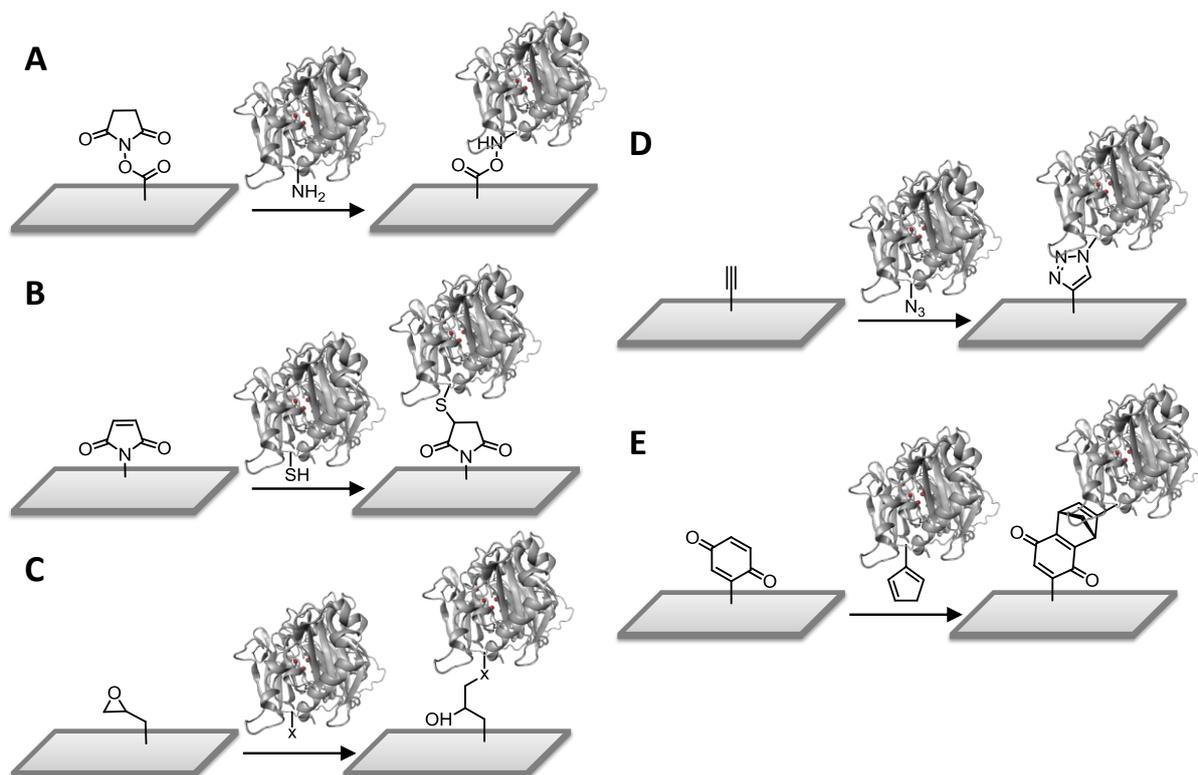


Figure I-9 : Synthèse simplifiée de l'immobilisation covalente d'enzyme sur surface d'électrode : (A) formation d'un lien amide à partir de la réaction d'un ester activé N-Hydroxysuccinimide (NHS) et une amine de l'enzyme, (B) réaction d'un résidu cystéine sur un groupement maléimide, (C) réaction d'un résidu nucléophile de la protéine avec un groupement époxy sur la surface de l'électrode, (D) réaction « click » catalysée au cuivre entre un alcyne immobilisé et une enzyme fonctionnalisée par une fonction azide, (E) réaction de Diels-Alder entre une surface portant un accepteur et une enzyme

Cette technique a pour point fort d'assurer une très bonne stabilité de l'enzyme grâce à sa fixation de manière permanente et ainsi avoir une durée de vie plus longue.

### I.3.2.3. Immobilisation par réticulation

Cela repose sur l'usage d'agents bi- ou multifonctionnels dits réticulants qui va permettre le couplage intermoléculaire entre les enzymes par des liaisons chimiques. On différencie deux modes de réticulation (Figure I-10) :

- La réticulation qui relie les enzymes entre elles par des agents réticulants de façon directe
- La co-réticulation qui elle va utiliser en plus une protéine inerte afin de faciliter et/ou améliorer la réticulation.

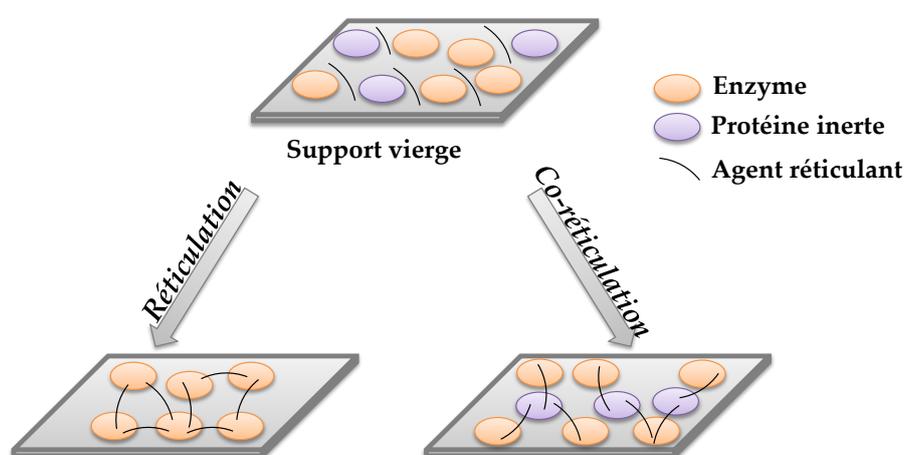


Figure I-10 : Réticulation et co-réticulation des enzymes

De nombreux agents réticulants ont été utilisés tels que le glutaraldéhyde<sup>82</sup>, ou encore des époxydes ou des esters activés<sup>83</sup>. Cette technique est plus stable qu'une simple adsorption grâce aux liaisons chimiques créées. Cependant, une perte d'activité enzymatique peut survenir avec cette méthode d'immobilisation due à la modification de la surface qui peut affecter le centre catalytique.

### I.3.2.4. Immobilisation par encapsulation

L'encapsulation permet le piégeage d'une espèce dans un espace tridimensionnel. Cette technique utilise bien souvent des polymères pour capturer l'enzyme. On peut citer des biopolymères tels que le chitosan, la chitine ou encore des polymères de synthèse, comme le Nafion<sup>®84</sup>. On peut aussi électrogénérer des polymères par oxydation (chimique ou électrochimique) d'un monomère donnant lieu à un polymère conducteur. Dans cette

catégorie on peut nommer le *poly*-pyrrole, la *poly*-aniline ou encore le *poly*-thiophène très fréquemment utilisés. Avec ce système on va pouvoir mélanger l'enzyme et le monomère et polymériser ensuite. Ainsi l'entité biologique sera encapsulée dans le polymère et sera également protégée pour sa dénaturation<sup>85-87</sup>.

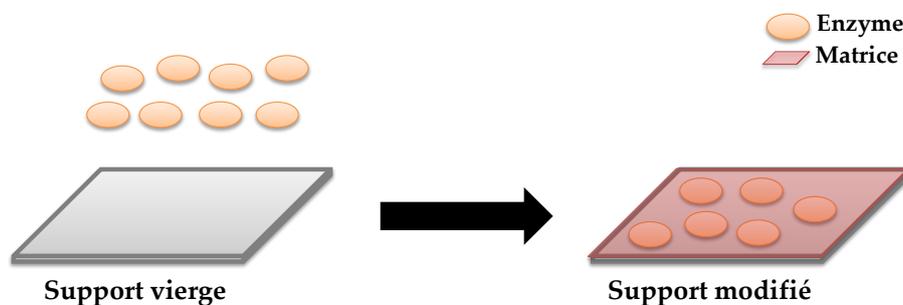


Figure I-11 : Encapsulation des enzymes

Cela donne lieu à une structure 3D ce qui permet d'immobiliser une grande quantité d'enzymes et de les laisser accessibles. Par ailleurs, cette matrice va limiter la diffusion du substrat ou de l'analyte et ainsi réduire les performances de notre bioélectrode.

Il existe également des matrices inorganiques telles que le gel de silice par exemple, ou encore des matériaux composites comme la pâte de carbone.

### I.3.3. Transfert électronique protéine-électrode

#### I.3.3.1. Transfert électronique direct/indirect

Les enzymes rédox possèdent une structure protéique (apoenzyme) comprenant un cofacteur rédox actif capable de transférer les électrons du substrat au cosubstrat. Dans le cas où la protéine rédox est capable d'échanger ces électrons avec l'électrode, remplaçant alors le substrat ou cosubstrat, on parle alors de processus de transfert électronique direct (DET) (Figure I-12A). Ce DET peut se faire directement depuis le site actif de l'enzyme, sinon il existe également un relais d'électrons tel que dans les MCOs, où le site T1 va être relais de 4 électrons entre l'électrode et le site T2/T3 de l'enzyme.

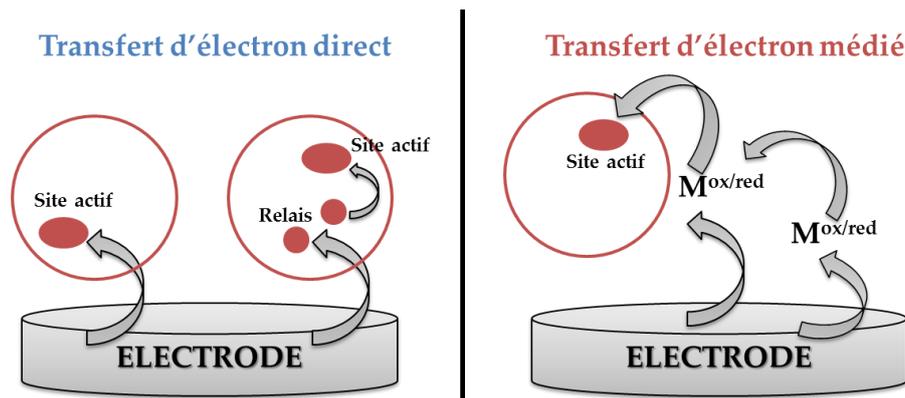


Figure I-12 : Schéma représentatif d'une bioélectrode enzymatique à base de (A) transfert électronique direct entre la protéine et l'électrode, (B) transfert électronique indirect en présence de médiateur rédox

Ce phénomène est connu depuis plus de 30 ans<sup>88-90</sup> et observé pour de nombreuses protéines, cependant, il n'est pas toujours possible d'observer ce DET<sup>21,23</sup>. En effet, selon les protéines rédox étudiées et en fonction du matériau d'électrode, l'échange électronique direct n'est pas toujours favorisé. Afin de pouvoir observer le phénomène bioélectrocatalytique, il faut alors ajouter une molécule rédox (souvent à faible poids moléculaire) qui aura le rôle de transporteur électronique. Il s'agit ici de transfert électronique médié (MET) et la molécule utilisée comme « navette » est communément appelée médiateur rédox (Figure I-12B). Le mode de transfert électronique (DET ou MET) est bien souvent inhérent à la biomolécule utilisée et au matériau d'électrode.

Le groupe de Gorton a pu démontrer la possibilité de connecter efficacement sur électrode un grand nombre de protéines rédox contenant des cofacteurs de type inorganiques (hèmes, centres cuivres, cluster fer-soufre). Ces enzymes de petite taille possèdent un site actif relativement accessible<sup>73,91</sup>. En fonction de leur orientation sur l'électrode il est donc possible d'effectuer un transfert direct. A l'inverse, peu de DET ont pu être observés pour des enzymes contenant des cofacteurs de type organique, car ils sont enfouis dans la protéine, rendant plus difficile l'échange électronique enzyme/électrode. Cela conduit alors au MET. De même, la structure du matériau d'électrode utilisé a une influence sur ce transfert électronique. Le cas des nanotubes de carbone sera décrit puisqu'il s'agit du matériau principalement utilisé durant ces travaux.

Ces deux méthodes de transfert d'électrons présentent des avantages et des inconvénients. Dans le cas d'une bioélectrode destinée à l'élaboration d'une biopile, un DET efficace permet

d'obtenir une bioélectrocatalyse au potentiel rédox de l'enzyme. Ce potentiel est bien souvent très proche des valeurs thermodynamiques d'oxydation ou de réduction des substrats. Il est difficile de connecter toutes les protéines qui ont été immobilisées sur l'électrode ; du coup, une certaine quantité des enzymes utilisées n'est pas impliquée dans le cycle d'électrocatalyse. A contrario, le médiateur rédox va permettre d'optimiser le nombre de protéines transférant les électrons. Cependant, lors d'un MET, la catalyse se fera au potentiel rédox de ce médiateur diminuant ainsi la force électromotrice de notre biopile. Il existe également un mélange entre MET et DET<sup>92</sup>.

Une biopile enzymatique ayant un DET aux deux bioélectrodes permettra d'avoir une force électromotrice (f.e.m) de pile plus importante (Figure I-13)<sup>93</sup>. La f.e.m correspond à la tension ou à une différence de potentiel entre deux points capable de faire circuler du courant dans un circuit. La f.e.m. des biopiles enzymatiques correspond à leur tension d'abandon. Inversement, dans le cas de l'utilisation du MET aux deux bioélectrodes, le médiateur rédox permettra d'optimiser les courants catalytiques obtenus en connectant un maximum de protéines, en revanche la f.e.m sera diminuée car celle-ci sera limitée par les potentiels rédox des navettes utilisées à la bioanode et à la biocathode. A noter ici, l'importance du choix du médiateur en fonction de son potentiel rédox. Pour les biopiles, la configuration idéale serait de connecter la totalité des enzymes par DET aussi bien à l'anode qu'à la cathode, afin de maximiser à la fois le courant et la f.e.m de la pile, et cela en vue d'avoir de meilleures puissances. Cependant, le DET dépend du système enzymatique utilisé, et n'est donc pas toujours possible sur l'anode et/ou la cathode. En effet, si certaines enzymes sont facilement connectées sur électrode, d'autres en revanche nécessitent la présence d'un médiateur pour transférer les électrons.

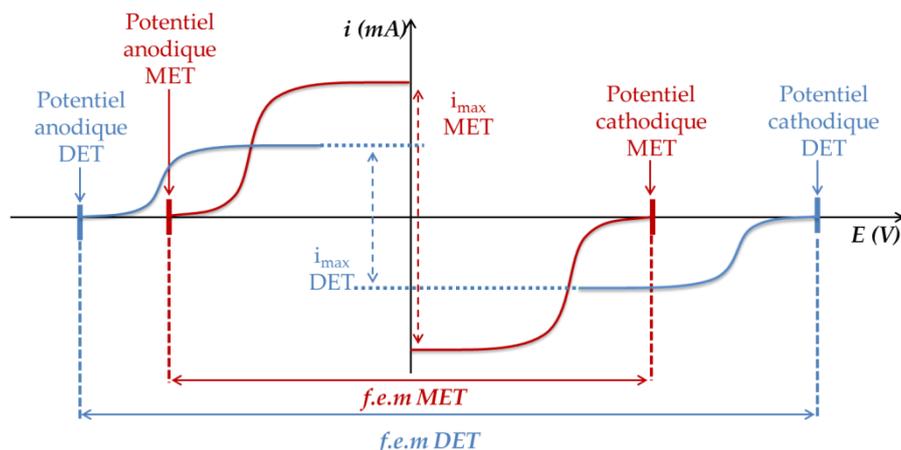


Figure I-13 : Représentation graphique,  $I = f(E)$ , de l'impact sur le potentiel et l'intensité du courant dans le cas d'un transfert électronique direct (à l'anode et la cathode) ou d'un transfert électronique indirect (à l'anode et la cathode)

Il existe une très grande variété de médiateurs rédox couramment utilisés dans l'élaboration de biopiles. Parmi les plus connus, on retrouve des complexes métalliques (complexes d'osmium, ferrocène), des dérivés de types quinones, azines ou encore viologène. La médiation peut s'opérer avec les deux espèces (enzyme et médiateur) en solution, mais à présent on cherche à immobiliser les deux entités afin de ne plus avoir à isoler les deux compartiments anodiques et cathodiques de la pile. Pour être un bon candidat en tant que médiateur rédox, la sonde rédox doit donc répondre à plusieurs critères<sup>94</sup> :

- Le potentiel de ce médiateur doit favoriser thermodynamiquement la réaction de biocatalyse. C'est-à-dire que son potentiel doit être supérieur à celui de l'enzyme à l'anode, et à contrario, inférieur à celui de l'enzyme à la cathode.
- Son système rédox doit être réversible
- Le transfert électronique enzyme/médiateur doit être efficace pour permettre une bonne électrocatalyse
- La structure chimique de la sonde rédox doit respecter une certaine taille<sup>95</sup> afin de pouvoir « accéder » au site actif de l'enzyme, qui est enfoui dans la structure protéique afin de pouvoir effectuer son rôle de médiateur entre l'enzyme et l'électrode.

Dans la thématique des biopiles glucose- $O_2$ , il existe de nombreux exemples de DET ou MET utilisant différentes enzymes à l'anode, pour l'oxydation du glucose, de même à la biocathode pour la réduction du dioxygène<sup>96</sup>.

### I.3.3.2. DET et MET à la biocathode pour la réduction du dioxygène

Les différentes enzymes utilisées pour la conception de biopile glucose-O<sub>2</sub> sont détaillées dans la partie I.2.3.2.b. Il s'agit donc de la Laccase et de la Bilirubine oxydase.

#### I.3.3.2.a. La Laccase

---

##### ➤ DET

La Lac est l'une des plus anciennes protéines ayant présenté un DET pour la réduction du dioxygène<sup>32</sup>. Depuis les travaux de Tasarevich *et al.*, de nombreuses études ont démontré que la Lac adsorbée sur la surface de l'électrode permet de réduire le dioxygène à haut potentiel (0,64 V vs. Ag/AgCl). Etant donné sa petite taille, cette enzyme reste relativement facile à connecter par orientation « statistique » sur de nombreux matériaux<sup>97-99</sup>, c'est-à-dire que plus le site T1 sera proche de l'électrode plus le transfert sera simple à effectuer. Par ailleurs, cette orientation est caractérisée par une dispersion des constantes de transfert d'électrons interfaciales particulièrement influencées par la distance entre le T1 et l'électrode<sup>100</sup>.

Bertrand *et al.* ont démontré l'existence d'une poche hydrophobe à proximité du site T1 de la Lac<sup>101</sup>, puis l'équipe de Armstrong a décrit la possibilité d'orienter le site T1 sur la surface de l'électrode<sup>102</sup>. En modifiant la surface de leur électrode à l'aide d'un groupement anthracène, un composé aromatique hydrophobe, ils se sont aperçu que ce dérivé mimant le substrat de la protéine permettait de connecter très efficacement la métalloenzyme. Les courants obtenus par cette méthode d'orientation étaient de l'ordre de 0,65 mA.cm<sup>-2</sup>, quatre fois plus importants qu'une immobilisation « statistique », avec une persistance de ces courants catalytiques sur plusieurs dizaines de jours. En 2012, Schuhmann et Bartlett ont confirmé ce résultat et ont montré que, grâce à la modification de la surface avec un dérivé anthraquinone, il était possible d'orienter et de connecter la totalité des enzymes immobilisées sur la surface et de n'être alors limité que par la diffusion du dioxygène<sup>103</sup>. Cela a été montré également en 2013 par le groupe de Cosnier<sup>104</sup>. Depuis, un bon nombre de travaux ont décrit la modification de surface avec plusieurs dérivés aromatiques hydrophobes (pyrène, naphthalène) permettant l'obtention d'un DET accru<sup>105,106</sup>.

➤ MET

Lorsque le DET n'est pas optimal, le MET est donc une alternative à l'obtention de forts courants catalytiques de réduction du dioxygène. Pour cette enzyme, le médiateur rédox majoritairement connu est le 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique), dit ABTS. Ses propriétés de médiation ont été décrites aussi bien en solution qu'immobilisé sur surface<sup>107-109</sup>. On peut également utiliser des polymères à base de complexes d'osmium qui sont sous forme d'hydrogel<sup>110-112</sup>.

### I.3.3.2.b. La Bilirubine oxydase

---

➤ DET

Cette enzyme fait partie de la même classe que la Lac et possède également un site T1 et un site T2/T3. Comme mentionné précédemment, cette enzyme fonctionne à pH neutre et n'est pas inhibée par les ions chlorure. Depuis quelques années, elle est connue pour être une nouvelle alternative à la Lac et sa connexion directe a été décrite<sup>113-115</sup>. Tout comme la Lac, il faut veiller à minimiser la distance entre le site T1 et l'électrode afin de faciliter le transfert d'électrons. En 2008, Ramirez *et al.* ont décrit le DET de cette enzyme sur des électrodes de graphite et d'or<sup>116</sup>. Les potentiels des deux sites catalytiques ont pu être observés : 0,45 V vs. ESH pour le site T1 et 0,39 V vs. ESH pour le site T2/T3. En 2015, Lalaoui *et al.* ont démontré également l'orientation préférentielle de la BOD via des électrodes de CNTs fonctionnalisés avec des porphyrines<sup>117</sup>.

➤ MET

Comme précisé ultérieurement, la BOD est très proche de la Lac. De ce fait, pour effectuer un transfert d'électrons médié, Tsujimura a utilisé également l'ABTS<sup>118</sup>. Lalaoui *et al.* ont eux-aussi utilisé des complexes d'osmium<sup>28,72,119</sup>.

Cette enzyme est très utilisée à ce jour pour les biopiles enzymatiques implantables de par sa stabilité et son pH.

### I.3.3.2.c. DET et MET à la biocathode pour la réduction du peroxyde d'hydrogène

---

L'enzyme utilisée pour la conception d'une biopile glucose-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la peroxydase est détaillée dans la partie I.2.3.2.c. Cette enzyme est une alternative à la consommation du peroxyde d'hydrogène produit par la GOx. De plus, elle pourrait remplacer la BOD pour l'implantable car celle-ci est sensible à l'urate présent en milieu physiologique.

#### ➤ DET

Cette enzyme de petite taille possède un hème en tant que site actif. Celui-ci est facilement accessible ce qui va favoriser le DET<sup>73</sup>. Cela a été montré en utilisant différents matériaux d'électrodes tels que le noir de carbone en premier<sup>120</sup>, puis les CNTs<sup>121</sup>, le graphite<sup>122</sup> et l'or<sup>123</sup>. Une alternative prometteuse, récemment initiée par W. Schuhmann *et al.*, consiste à remplacer l'utilisation conventionnelle de la laccase ou de la bilirubine oxydase par un système bisenzymatique basé sur la combinaison de la glucose oxydase (GOx) et de la peroxydase de raifort (HRP) pour l'élaboration d'une biocathode<sup>124</sup>. En 2013, l'équipe de Cosnier a combiné la GOx et la HRP dans une même biocathode à base de DWCNTs afin que la HRP consomme le peroxyde d'hydrogène produit par la GOx, avec une bioanode à base de GOx et la 1,4-NQ comme médiateur rédox<sup>75</sup>. Egalement, cette enzyme a pu être orientée à l'aide de dérivés de porphyrine ou de pyrène<sup>76</sup>.

#### ➤ MET

Concernant le transfert d'électron médié, on peut considérer deux cas, soit on transfère un seul électron, soit deux<sup>125</sup>. Dans le premier cas, les médiateurs fréquemment utilisés sont des ferrocènes, hexacyanoferrate(II), Os(bpy)<sub>2</sub>(py)Cl<sub>2</sub> et nickelocène. Pour le second, on peut prendre des hydroquinones, du catéchol, ou du bleu de méthylène par exemple.

### I.3.3.3. DET et MET à la bioanode pour l'oxydation du glucose

Les différentes enzymes utilisées pour la conception de biopile glucose-O<sub>2</sub> sont détaillées dans la partie I.2.3.2.a. Il s'agit de la Glucose oxydase (GOx) et de la Glucose déshydrogénase FAD dépendante (FADGDH).

### I.3.3.3.a. La Glucose oxydase

---

#### ➤ DET

Cette enzyme a d'abord été très utilisée initialement dans le domaine des biotechnologies, en particulier les biocapteurs. En quelques années elle a pris sa place dans la thématique des biopiles glucose-O<sub>2</sub>. En effet, il a été très vite démontré qu'il est possible d'effectuer un DET avec cette enzyme en utilisant différents matériaux d'électrodes (nanotubes de carbone<sup>126</sup>, nanoparticules<sup>127</sup>, graphène<sup>128</sup>, nanofibres<sup>129</sup>). Cependant, à ce jour il est encore difficile d'obtenir un DET avec cette enzyme de par sa taille et son site actif FAD/FADH<sub>2</sub> peu accessible. En 2013, Goran a démontré que la FAD que l'on pouvait observer électrochimiquement était celle qui était non active<sup>130</sup>. En 2013, une biopile glucose-O<sub>2</sub> ayant une anode à base de GOx effectuant un DET a pu être implantée dans un rat et alimenter une LED<sup>39</sup>.

#### ➤ MET

Etant donnée la difficulté d'obtenir un DET avec la GOx sans modifier la protéine, de nombreux travaux se sont axés sur le transfert d'électron utilisant un médiateur rédox depuis la fin des années 80. Les travaux d'Heller, notamment, ont été novateurs dans le développement du transfert médié de la GOx. Ces auteurs ont décrit la possibilité d'utiliser le ferrocène ou encore des hydrogels d'osmium pour connecter électriquement la protéine sur électrode<sup>131-133</sup>. Les biopiles utilisant notamment, les hydrogels d'osmium comme médiateurs de la GOx sont particulièrement étudiés, encore aujourd'hui<sup>134-136</sup>. En 2010, Gao *et al.* ont décrit une biopile puissante combinant à l'anode, la GOx et un hydrogel d'osmium à longue chaîne<sup>137</sup>. De plus, avec le récent développement des nanomatériaux carbonés, les densités de courant des bioanodes incorporant ces hydrogels sur des nanostructures sont très proches des valeurs requises pour certaines applications<sup>138</sup>.

En 2012, Giroud *et al.* ont également rapporté l'utilisation de différentes quinones pour la médiation de la GOx à l'anode de biopiles glucose oxygène pour l'implantation animale<sup>29</sup>. En 2013, Reuillard *et al.* ont associé une biocathode à base de Lac effectuant un DET et une bioanode à base de GOx avec un médiateur rédox, la *p*-naphthoquinone, obtenant ainsi une densité de puissance de 1,54 mW.cm<sup>-2</sup><sup>139</sup>.

### I.3.3.3.b. La Glucose déshydrogénase FAD-dépendante

Cette enzyme possède le même site actif que la GOx, c'est-à-dire la FAD. Cependant, cette enzyme peut être un moyen de remplacer l'enzyme modèle GOx, pour les applications implantables. En effet, celle-ci n'a pas besoin de présence de dioxygène et ne produit donc pas de peroxyde d'hydrogène lors de l'oxydation du glucose. A ce jour, le DET pour cette enzyme n'a pas été démontré.

Par ailleurs, quelques études pour le transfert d'électrons médiés avec la FADGDH ont été menées et sont principalement basées sur les polymères redox d'osmium<sup>58</sup>, ruthénium<sup>140</sup> et ferrocene<sup>47,141</sup>. Ces complexes présentent cependant des potentiels redox élevés, un échange lent de médiateur en raison de la rigidité structurale et nécessitent une synthèse compliquée à partir de précurseurs toxiques. Par rapport aux médiateurs basés sur des métaux, les petits médiateurs organiques avec un échange rapide de médiateurs sont attrayants. Les naphthoquinones 1,2 et 1,4<sup>142,143</sup>, et les phénothiazines<sup>144</sup>, ont été exploitées et donnent des courants catalytiques élevés à des potentiels redox attractifs. Un inconvénient majeur de ces médiateurs est leur stabilité limitée en raison de réactions secondaires avec des amines aliphatiques dans des conditions douces.

## I.4. Rôle des nanotubes de carbone dans les biopiles glucose-O<sub>2</sub>

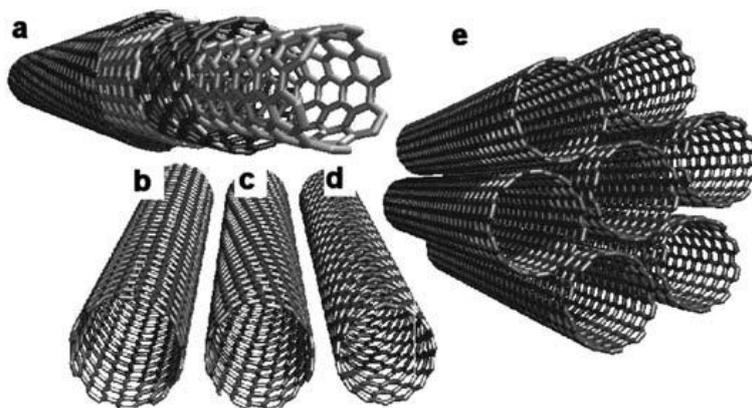
### I.4.1. Structures, propriétés et utilisations des nanotubes de carbone

#### I.4.1.1. Structures et propriétés

Les nanomatériaux carbonés sont depuis plusieurs décennies en pleine expansion et leurs domaines d'applications sont variés comme par exemple, les sondes de balayage, les systèmes pour le stockage de l'énergie ou les systèmes de stockage d'hydrogène, les dispositifs nanoélectriques. Ces matériaux à base de carbone présentent de nombreux avantages en matière de coût, de fenêtre de potentiel.

Parmi cette famille de nanomatériaux carbonés, les nanotubes de carbones (Carbon Nanotubes, CNTs en anglais) sont de plus en plus utilisés dans de nombreux et divers domaines, des applications médicales à l'électrocatalyse par exemple. Les nanotubes de

carbone multi-parois (MWCNT), présentés en Figure I-14a, ont été décrits pour la première fois en 1991 par Iijima qui démontra la possibilité de former, grâce à un arc électrique utilisé habituellement pour la fabrication des fullerènes, des tubes de carbone « needle-like »<sup>145</sup>. Puis, deux ans plus tard, par le même processus, les nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNT) ont été synthétisés<sup>146,147</sup>.



*Figure I-14 : Représentations des différentes structures de nanotubes de carbone. (a) Nanotubes de carbone multi-feuillets (MWCNT). (b) Nanotubes de carbone mono-feuillet (SWCNT) conformation chaise « métallisés » (10,10). (c) Semi-conducteur chiral hélicoïdal SWCNT. (d) SWCNT conformation zigzag (15,0). (e) SWCNT conformation fauteuil<sup>148</sup>*

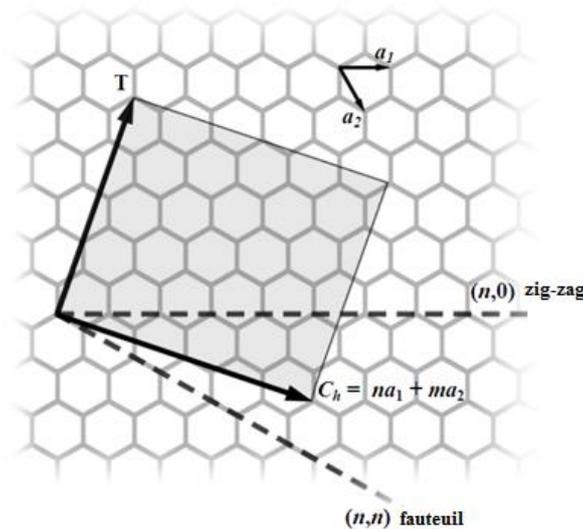
Les propriétés des SWCNTs peuvent varier en fonction de différents facteurs comme leur chiralité, leur pureté et la quantité de défauts qu'ils contiennent<sup>149</sup>. En effet, en fonction de l'orientation de l'axe du tube par rapport au réseau carboné aromatique, différents types de CNTs peuvent être obtenus (Figure I-14b-e) et sont décrits par les indices de leur vecteur chiral  $n$  et  $m$  (Figure I-15). Le nanotube monofeuillet peut être modélisé par l'enroulement d'une feuille de graphène sur elle-même. Cette feuille de graphène présente une structure de type nid d'abeille, dont on peut donner 2 vecteurs directeurs,  $a_1$  et  $a_2$ . On définit ensuite le vecteur de chiralité,  $C_h$ , axe selon lequel le graphène s'enroule pour former le nanotube. Ce vecteur peut donc être décomposé en deux composantes, selon les vecteurs  $a_1$  et  $a_2$ . Soient  $m$  et  $n$  les scalaires tels que  $C_h = n a_1 + m a_2$ .

Selon la valeur de ces 2 scalaires, 3 types d'enroulements, donc trois types de nanotubes peuvent être décrits :

- Si  $m = 0$ , on dira que le nanotube a une structure de type « zig-zag »
- Si  $m = n$ , on dira que le nanotube a une structure de type « chaise »

- Dans tous les autres cas, on dira que le nanotube est « chiral ».

Ces différences de chiralité donneront aux nanotubes de carbone des propriétés différentes, notamment, en ce qui concerne les propriétés électriques. Un nanotube de carbone de type « chaise » possède un comportement électrique métallique. Toutes les autres chiralités ont des comportements semi-conducteurs.



*Figure I-15 : schéma représentatif du type d'orientation des CNTs de type « chaise » ou « zigzag » par rapport au plan d'un feuillet de graphène*

Les MWCNTs, composés de plusieurs SWCNTs sont quant à eux des conducteurs métalliques due à leur chiralité. En effet, l'existence de plusieurs parois contourne les contraintes de conduction électronique engendrées par la chiralité du SWCNT, par son diamètre ainsi que par ses éventuels défauts. Dans le cas de MWCNTs, les propriétés de conduction de la nanostructure sont accrues.

De par leur composition chimique très simple, les CNTs ont une très grande diversité de structures mais aussi des propriétés différentes<sup>150</sup>. Les CNTs possèdent donc de nombreuses propriétés : conductivité, large surface spécifique, excellente stabilité thermique et mécanique, possibilité de les modifier chimiquement, les rendant particulièrement attractifs dans de nombreux domaines scientifiques<sup>151</sup>. Néanmoins, leur caractère hydrophobe les rend insolubles dans un très grand nombre de solvants, aqueux et organiques, ce qui ne facilite pas leur manipulation<sup>152</sup>. L'utilisation de surfactants ou la modification chimique des CNTs peut dans certains cas améliorer leur solvatation<sup>153</sup>.

#### I.4.1.2. Les nanotubes de carbone comme matériau d'électrode

Depuis plusieurs décennies, l'utilisation des CNTs dans diverses applications a progressé. Ces nanotubes sont très largement utilisés dans des domaines liés à l'électrochimie comme par exemple les piles à combustible, les batteries Lithium-ion, les capteurs électrochimiques, ou encore les super condensateurs<sup>149</sup>. Ces nanotubes sont principalement utilisés en tant que matériau d'électrode. Ils ont comme propriété de conduire les électrons et leurs larges surfaces électroactives font d'eux une matrice impliquée dans toutes les technologies de transferts électroniques<sup>154</sup>. De ce fait, leur utilisation sera très prisée pour les applications de conversion et de stockage d'énergie. L'application que nous en avons faite dans les biopiles enzymatiques sera détaillée dans le Chapitre III.

Il existe de nombreuses méthodes afin d'élaborer des nanostructures de CNTs comme la fabrication de films fins, par CVD, ou encore par déposition sur substrat utilisant un surfactant ou un polymère (interactions pi-pi). On peut également créer des matrices 3D de nanotubes qui vont être réalisées par simple compression de ces CNTs<sup>155</sup>.

Ces CNTs présentent donc de nombreux avantages pour la conception de matériaux d'électrode. De plus, ces nanotubes peuvent être fonctionnalisés, ce qui rend cela encore plus attrayant et donne encore plus de possibilités pour la connexion facilitée et orientée des enzymes par exemple<sup>105,117</sup>.

#### I.4.1.3. Modification et fonctionnalisation des CNTs

Les CNTs sont considérés comme des macromolécules. Ils se composent d'une succession de cycles aromatiques et d'une certaine quantité de fonctions réactives telles que des carbonyles ou encore des acides carboxyliques. Il est donc possible de les modifier, de les fonctionnaliser chimiquement ou électrochimiquement en tirant avantage de leur système  $\pi$ -conjugué et des fonctions chimiques qu'ils présentent à leur surface<sup>148</sup>. Depuis une dizaine d'années, de nombreuses méthodologies ont été mises en place pour permettre d'introduire de nouvelles propriétés à ces CNTs<sup>156,157</sup>. De ce fait, on peut donc les fonctionnaliser de manière covalente ou non covalente. Il est également possible d'inclure des motifs à l'intérieur des CNTs ou encore de « décorer » les CNTs avec des nanoparticules. La Figure I-16 montre les différents types de fonctionnalisation possibles.

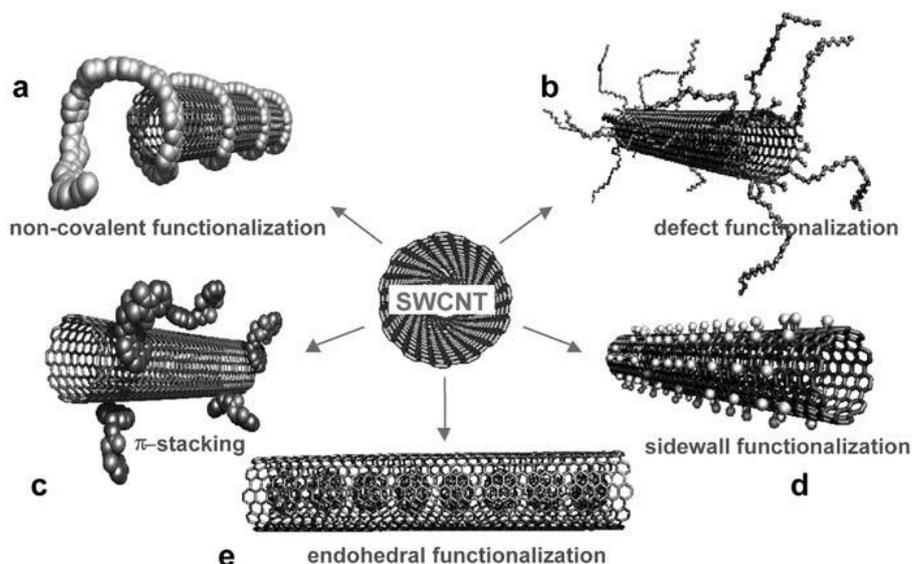


Figure I-16 : Différents types de fonctionnalisation des SWCNTs. (a) Une fonctionnalisation exoédrique non covalente avec des polymères. (b) Fonctionnalisation de groupe de défauts. (c) Fonctionnalisation exoédrique non covalente avec des molécules par  $\pi$ -stacking. (d) Fonctionnalisation de la paroi latérale. (e) Fonctionnalisation endoédrique, dans ce cas C60<sup>148</sup>

#### I.4.1.3.a. Fonctionnalisation covalente

La fonctionnalisation covalente est basée sur une liaison covalente d'entités fonctionnelles sur la structure des CNTs. Elle peut être effectuée à la fin des tubes ou à leurs flancs. La fonctionnalisation de la paroi latérale covalente directe est associée à un changement d'hybridation de  $sp^2$  à  $sp^3$  et à une perte de conjugaison simultanée. La fonctionnalisation des défauts profite des transformations chimiques des sites défectueux déjà présents. Les sites défectueux peuvent être les extrémités ouvertes et les trous dans les parois latérales, par exemple par groupes carboxyliques, et les irrégularités du pentagone et de l'heptagone dans le cadre de graphène hexagonal. Les sites oxygénés, formés par purification oxydative, doivent aussi être considérés comme des défauts. Il existe de nombreux types de fonctionnalisation covalente : la purification oxydative ou carboxylation des CNTs, la fonctionnalisation des défauts (amidation, estérification, thiolation), halogénéation, cycloaddition, etc<sup>158</sup>.

### I.4.1.3.b. Fonctionnalisation non covalente

- Fonctionnalisation non covalente exoédrique

La fonctionnalisation non-covalente est basée sur la complexation supramoléculaire utilisant différentes forces d'adsorption, comme les interactions de van der Waals et le pi-stacking. Cette complexation supramoléculaire conduit à des dérivations exoédriques. Celles-ci ont pour but de rendre soluble les CNTs ou encore leur ajouter des fonctionnalités. Ce type de fonctionnalisation ne va pas modifier les propriétés des CNTs. (conducteur métallique ou semi-conducteur). L'utilisation de petites molécules aromatiques, avec un système électronique conjugué, va pouvoir favoriser les interactions  $\pi$ - $\pi$ , comme par exemple des dérivés d'anthracène, de pyrène ou encore de porphyrine (Figure I-17).

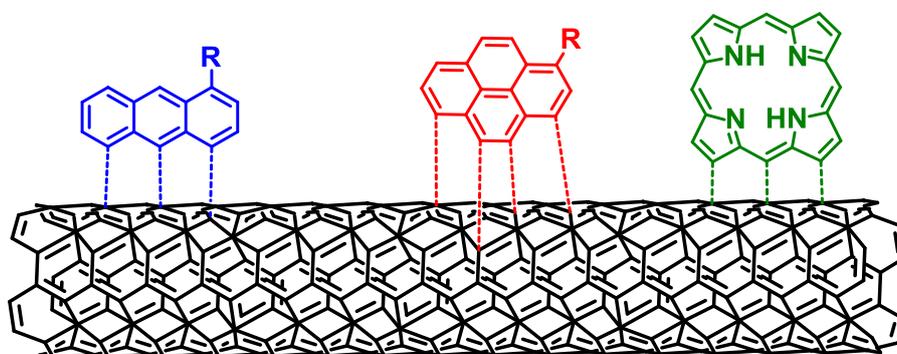


Figure I-17 : Interaction de  $\pi$ -stacking entre des composés polyaromatiques et la paroi des CNTs. (A) dérivé pyrène (B) dérivé anthracène (C) dérivé porphyrine.

Dans cette catégorie de fonctionnalisation on peut donc citer la fonctionnalisation des CNTs par la protoporphyrine IX que l'on aura utilisée pour l'orientation de l'enzyme : la BOD à la cathode<sup>117</sup>. Cette technique est donc adaptée à l'élaboration de bioélectrodes pour les biopiles afin de greffer soit le médiateur redox, soit des molécules qui vont pouvoir orienter préférentiellement les enzymes. Il existe également une autre méthode pour modifier les CNTs, il s'agit de l'utilisation de polymères organiques ou inorganiques. Cela va permettre aux CNTs d'avoir de nouvelles propriétés physicochimiques, électrochimiques et catalytiques, qui nous intéressent pour nos biopiles enzymatiques. On peut partir directement de polymères ou encore d'un polymère qui sera électrogénéré à partir de son monomère. Dans l'application des biopiles, les hydrogels d'osmium est un exemple pour cette catégorie de CNTs/polymère<sup>119,136</sup>.

- Fonctionnalisation non covalente endoédrique

Un cas particulier est la fonctionnalisation endoédrique des CNTs, c'est-à-dire, le remplissage des tubes avec des atomes ou petites molécules (Figure I-16e). La cavité des nanotubes offre un espace permettant à de petites molécules d'être stockées. L'insertion se fait souvent au niveau de défauts mais aussi par l'extrémité du nanotube. A ce jour, de petites protéines ont été insérées dans le canal intérieur d'un nanotube ouvert par adsorption simple, formant ainsi des tubes nano-test naturels<sup>159</sup>.

## I.4.2. Les CNTs pour l'immobilisation et la connexion d'enzymes rédox dans les biopiles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub>

### I.4.2.1. Electrodes à base de CNTs pour la connexion enzymatique

L'immobilisation et la connexion sur électrodes des enzymes rédox utilisées dans la conception de biopiles glucose-O<sub>2</sub> sont deux paramètres cruciaux afin d'obtenir les meilleures performances possibles en matière de puissance, stabilité et biocompatibilité<sup>160</sup>.

L'immobilisation de la protéine va en effet influencer de nombreux paramètres. La méthode choisie pour greffer l'enzyme à la surface doit à la fois permettre une bonne diffusion du substrat jusqu'au site actif, ne pas engendrer de dénaturation de la protéine et enfin être stable dans le temps en empêchant la perte du matériel biologique de l'électrode.

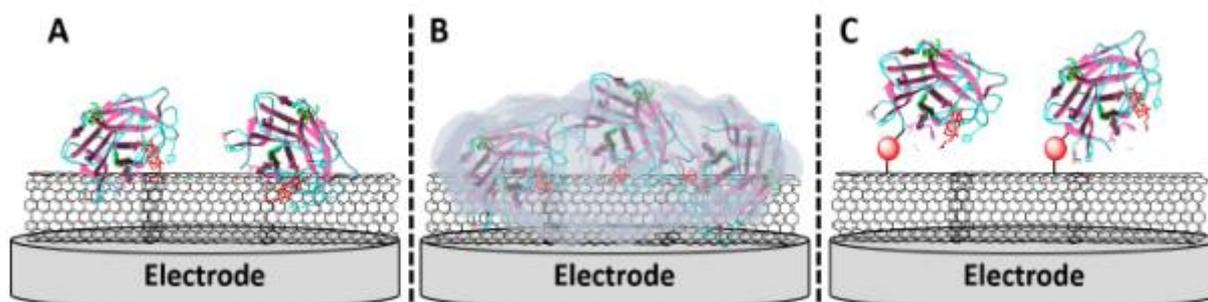


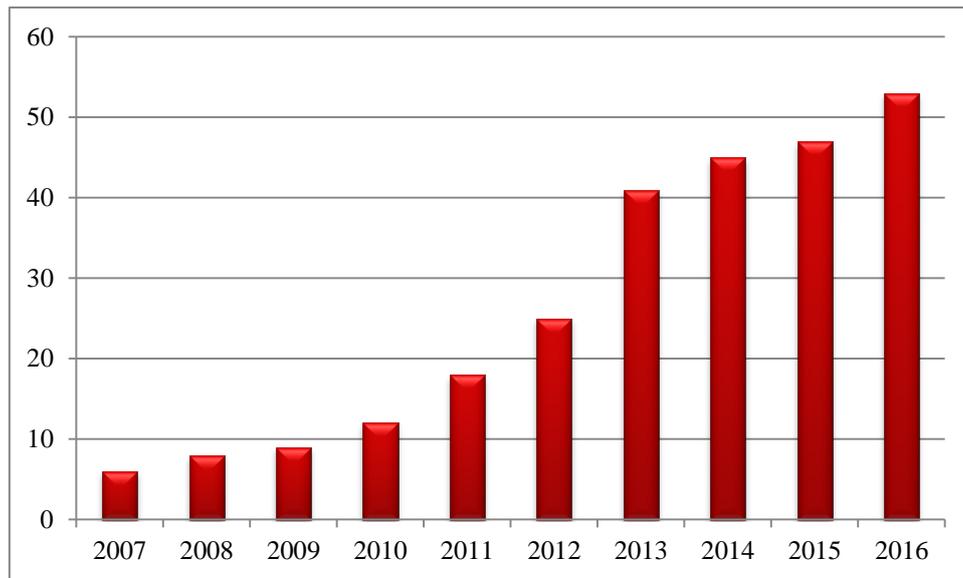
Figure I-18 : Principales méthodes d'immobilisation de protéines sur les CNTs : (A) adsorption non spécifique, (B) encapsulation dans une matrice polymérique, (C) greffage covalent

Parmi ces dernières, plusieurs sont fréquemment employées pour immobiliser des protéines à la surface de différents types de matériaux et plus particulièrement sur les CNTs (Figure I-18)<sup>161</sup>.

L'adsorption non spécifique de l'enzyme représente la plus simple alternative consistant à tirer avantage de l'hydrophobicité des CNTs pour déposer l'enzyme. Malgré sa simplicité, elle est limitée en matière de stabilité et peut éventuellement avoir un impact sur la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Une seconde méthode souvent employée consiste en l'encapsulation de la protéine à l'intérieur de matrices polymériques. Elle est souvent plus stable et permet la rétention d'un plus grand nombre de protéines qu'une simple adsorption mais peut avoir un impact sur la bonne diffusion des substrats et sur la structure de la biomolécule. La dernière, également très étudiée, consiste à greffer de manière non covalente l'enzyme sur les CNTs. L'immobilisation de la protéine est un paramètre prépondérant qui aura un impact majeur sur la durée de vie des bioélectrodes enzymatiques. Quelle que soit la méthode d'immobilisation, les CNTs permettent d'immobiliser de très grandes quantités de biocatalyseurs grâce à leur importante surface développée. Nous avons utilisé en majorité la méthode d'adsorption.

#### I.4.2.2. Biopiles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub> à base de CNTs

Les propriétés des matrices de CNTs de pouvoir intégrer de larges quantités de matériel biologique tout en maximisant les chances de transfert électronique (direct ou indirect) ont fait d'elles un matériau de choix pour l'élaboration de biopiles enzymatiques. Le nombre de publications scientifiques se concentrant sur la conception de biopile enzymatique glucose-O<sub>2</sub> à base de CNTs est en pleine expansion ces dernières années.



*Figure I-19 : Evolution du nombre de publications sorties entre 2007 et 2016 concernant l'élaboration de biopiles enzymatiques à base de CNTs. Recherche effectuée avec les mots clefs « enzymatic biofuel cell carbon nanotube ». Source Web Of Knowledge*

Depuis une dizaine d'années, de nombreux travaux se sont focalisés sur l'amélioration des performances des biopiles glucose-O<sub>2</sub>. L'utilisation des CNTs a permis d'accroître très nettement les puissances de ces dispositifs. Les enzymes oxydant le glucose et réduisant le dioxygène sont désormais intégrées dans des matrices de CNTs de plus en plus sophistiquées garantissant un excellent confinement de la protéine et un transfert électronique direct ou indirect optimisé. Une grande majorité des biopiles les plus puissantes à l'heure actuelle sont constituées de bioélectrodes à base de CNTs.

## I.5. Les différents design de biopiles et leurs applications

### I.5.1. Les microbiopiles

Les microbiopiles ont été étudiées depuis les années 70<sup>162</sup>. En 2010, Minter détaille les avantages de ces microbiopiles, comme par exemple de hautes densités, une longue durée de fonctionnement ou encore leurs vertus non toxiques et respectueuses de l'environnement<sup>163</sup>. Ammam décrit une nouvelle procédure, facile, rapide et pas chère pour fabriquer une microbiopile enzymatique à base de GOx et Lac<sup>164</sup>. En 2013, le groupe de Crespilho a implanté dans un rat, en intraveineux, une microbiopile flexible glucose-O<sub>2</sub> à base de fibres de

carbone<sup>165</sup>. *In vivo*, une densité de puissance de l'ordre de  $95 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , soit 9,5 nW a été obtenue, contre  $200 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  (20 nW) *in vitro*.

---

### I.5.2. Les biopiles flexibles

L'étude des biopiles flexibles est en grande émergence étant donné les applications qui sont recherchées, comme l'implantable. En 2012, le groupe de Dong a créé une biopile sur un papier sur lequel sont déposés des nanotubes de carbone fonctionnalisés par des liquides ioniques, puis les enzymes<sup>166</sup>. Ces biopiles ont été testées à partir de boissons sucrées commerciales. Un autre matériau utilisé est le buckypaper (BP)<sup>167</sup> qui est un papier de nanotubes de carbone qui possède ainsi toutes les caractéristiques des nanotubes. On peut citer les travaux de Johnson par exemple<sup>168</sup>, qui compare les performances de ces différentes anodes à base de PQQ-GDH et BP réalisés à partir de MWCNT, SWCNT. D'autre part, Nishizawa *et al.* ont élaboré un stack de biopiles flexibles à partir de tissu de fibres carbone et d'hydrogel permettant la conduction ionique<sup>169</sup>. Avec ce système ils ont pu alimenter une LED.

---

### I.5.3. Les biopiles microfluidiques

Les piles à combustible microfluidiques peuvent fournir une voie alternative vers des alimentations miniaturisées. Dans de tels systèmes, des flux de carburant et d'oxydant s'écoulent en parallèle dans le microcanal en éliminant la nécessité d'une membrane. Les réactions électrochimiques se produisent à l'anode et à la cathode situées dans les flux respectifs. Diverses piles à combustible microfluidiques travaillant avec de l'hydrogène, du méthanol ou de l'acide formique comme carburant ont récemment attiré une attention significative<sup>170-173</sup>. L'approche microfluidique offre plusieurs avantages par rapport aux systèmes macro, notamment l'utilisation de moins de réactifs. Des travaux théoriques et expérimentaux intéressants ont été publiés précédemment décrivant l'effet du débit, de la géométrie des microcanaux et de l'emplacement des électrodes dans les systèmes microfluidiques sur leur performance<sup>174-176</sup>. Des biopiles enzymatiques microfluidiques ont été développées en fonction de l'écoulement laminaire dans une microcavité et des stratégies enzymatiques biologiques. Palmore *et al.*<sup>177</sup> ont développé une pile à combustible

microfluidique fonctionnant à partir d'une cathode utilisant la laccase en présence de l'ABTS. Un modèle de transport a été élaboré pour décrire et optimiser les conditions et la quantité de carburant utilisé. Une densité de puissance de  $26 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  a été obtenue pour un flux de  $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Le groupe de Nishizawa a élaboré une biopile combinant la GDH et la BOD<sup>178</sup>. L'originalité de ce travail se situe dans l'arrangement d'électrodes dans un seul canal d'écoulement. Le dioxygène dissous a été pré-réduit à une cathode en amont pour protéger l'anode en aval de l'environnement oxydant. La densité de courant maximal était de  $160 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  à un débit de  $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

## I.6. Vers la gestion de l'énergie des biopiles

La capacité des systèmes à alimenter des dispositifs réels a dans certains cas été évaluée. Pour cela, il faut associer à la fois des biopiles en série et en parallèle. La mise en série va permettre d'augmenter la tension du système et la mise en parallèle pourra quant à elle, augmenter le courant. Ces deux types d'association vont permettre également d'augmenter la puissance.

### I.6.1. Alimentation directe

L'alimentation directe nécessite généralement, pour obtenir une tension suffisante, la mise en série de plusieurs biopiles. Ainsi la mise en série de quatre biopiles fructose- $\text{O}_2$  permet le fonctionnement de LEDs de 1,8 V pendant une soixantaine de jours<sup>179</sup> ; ou encore la mise en série de trois biopiles fructose- $\text{O}_2$  flexibles conduit à un système délivrant une puissance maximale de 0,64 mW ( $2,6 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) à 1,21 V capable d'allumer une LED<sup>169</sup>.

### I.6.2. Alimentation contrôlée *via* la charge d'un condensateur

L'alimentation d'un appareil électronique peut se faire indirectement, par l'intermédiaire par exemple d'un condensateur chargé par la biopile qui, lors de sa décharge alimente un dispositif électronique.

En 2008, Donovan *et al.* ont étudié l'usage d'un système électronique de récolte d'énergie impliquant un condensateur qui disposera de sa charge de manière intermittente et contrôlée sur des biopiles microbiennes sédimentaires (biopiles benthiques). Ce condensateur une fois chargé pourra transmettre son énergie à un appareil par le biais d'un convertisseur de courant continue DC-DC<sup>180</sup>. Degrenne *et al.* ont étudié trois architectures de convertisseur pour la récupération d'énergie de biopiles microbiennes faible tension et faible puissance<sup>181</sup>. En 2013, le groupe de Cosnier a décrit l'alimentation d'une LED *via* le chargement d'un condensateur à partir d'une biopile enzymatique glucose-O<sub>2</sub> sous forme de compression<sup>139</sup>. La même année, Khaled *et al.* ont associé plusieurs biopiles microbiennes non-uniformes en série à un circuit de condensateur commuté qui permet d'équilibrer les potentiels entre chaque biopile et donc accroître l'énergie produite<sup>182</sup>.

### I.7. Vers l'implantation des biopiles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub>

A ce jour, de nombreux verrous sont connus concernant les applications *in vivo* de ces biopiles enzymatiques. En effet, la stérilisation, la biocompatibilité et la durée de vie faible de ces biopiles poussent à s'orienter vers le développement de biopiles non envahissantes ou faiblement. L'activité de recherche est intense dans ce domaine depuis quelques années<sup>183</sup>. Les biopiles enzymatiques utilisant des métabolites tels le glucose, le lactate, le pyruvate ou encore l'ascorbate provenant de la sueur humaine, des fluides lacrymaux et de la salive ont été développées et décrites récemment<sup>184</sup>. Wang *et al.* détaillent le développement de biopiles utilisant le lactate provenant de la sueur<sup>59</sup>, et le groupe de Shleev travaille quant à lui sur des biopiles à base de lentilles de contact pour alimenter des capteurs à glucose ou lactate<sup>185</sup>. Dans cette même optique, Minter a également décrit une biopile enzymatique intégrée dans une lentille de contact<sup>186</sup>. Malgré de grosses avancées sur les biopiles flexibles, élastiques et portables, et le fait que la concentration de l'oxygène ne constitue pas un paramètre limitant, il reste des inconvénients majeurs concernant la faible puissance, la biocompatibilité et la fabrication de l'appareil. De ce fait, cette approche n'est pas viable pour alimenter les dispositifs médicaux implantés dans le corps, car la peau constitue une barrière mécanique aux microorganismes (bactéries, virus, protozoaires ou champignons) et ne doit pas être altérée ou traversée par des fils. Pour remédier à ces problèmes de contamination due à des

microorganismes infectieux entrant à travers un épithélium, l'implantation complète de la cellule de biocarburant à l'intérieur du corps est une solution.

L'application la plus enthousiasmante à ce jour de ces biopiles à glucose-O<sub>2</sub> est son implantation dans des mammifères pour alimenter des appareils médicaux grâce à la présence de glucose et d'oxygène dans les liquides extracellulaires (sang et liquide interstitiel). En 2010, le groupe de Cosnier a élaboré la première configuration indépendante de biopile enzymatique à glucose pour être implantée dans un mammifère, et cela en collaboration avec le groupe de Cinquin<sup>155</sup>. Cette configuration, avec une biocathode à base de polyphénol oxydase, a une activité maximale à pH 7 et est compatible avec les liquides physiologiques. Cette enzyme a été exploitée de nombreuses fois par le groupe de Cosnier pour le développement de microbiocapteurs implantés dans le cerveau du rat<sup>187</sup>. Ce type d'électrode possède une très bonne stabilité de stockage à long terme, 80 % de sa valeur initiale, après un an de stockage en solution tampon<sup>188</sup>. Cette biopile enzymatique implantée dans l'espace retro péritonéal d'un rat a pu montrer pour la première fois la possibilité de récupérer de l'énergie en dehors du liquide physiologique de l'animal. Bien que la puissance en sortie de la biopile était de 1,8  $\mu$ W et stable durant 11 jours après l'implantation, cela reste très nettement insuffisant pour alimenter des dispositifs implantés. A la suite de cela, de nombreux designs de matériaux nanostructurés ont été conçus et différents types de biopiles ont été partiellement implantés dans des organismes vivants tels que les escargots<sup>52</sup>, les insectes<sup>40,189,190</sup>, les palourdes<sup>54</sup>, les homards<sup>56</sup>, les rats<sup>55,165,191</sup>, et les lapins<sup>192</sup>. Ces biopiles représentent une très grande progression concernant la connexion enzymatique *via* les nanotubes de carbone. Par ailleurs, la puissance réelle délivrée par des biopiles implantées dans des mammifères est très faible (0,0095 – 2,75  $\mu$ W, selon la surface d'électrode) et insuffisante pour activer un appareil biomédical implanté.

Katz *et al.* ont pu montrer qu'en associant plusieurs biopiles, en série ou en parallèle, à plusieurs palourdes ou homards, la puissance fournie est suffisante pour alimenter de l'électronique à faible puissance, comme par exemple, une montre, un moteur électrique, et un pacemaker<sup>54,193</sup>. A noter que l'association de plusieurs biopiles sur un même animal ne peut être possible à cause de la conductivité du tissu qui crée des courts-circuits. De ce fait, l'intérêt est donc d'augmenter les performances d'une seule biopile. C'est à partir de cela que l'équipe de Cosnier a breveté un nouveau type de fabrication d'électrode à partir d'une compression composée d'un mélange de nanotubes de carbone et d'enzyme. Cette compression permet l'immobilisation et la connexion enzymatique<sup>13</sup>. Une biopile à base de

glucose oxydase (GOx) et laccase (Lac) avec un potentiel de circuit ouvert de 0,95 V délivre une puissance de 1,69 mW. L'association de deux biopiles donne un OCV de 1,9 V et une puissance maximale de 3,25 mW. En 2013, ce type de biopile a de nouveau été implanté<sup>39</sup>. Après chirurgie, la biopile a été entièrement implantée dans un rat libre et a délivré 38,7  $\mu$ W avec un OCV dans la gamme de 0,51 - 0,66 V. En connectant un convertisseur externe, la biopile a pu alimenter une diode électroluminescente (LED) et un thermomètre électronique. Cependant, la durée de vie de cette biopile implantée n'excède pas 9 jours. Une autre solution pour augmenter la puissance des biopiles est d'associer les biopiles avec des supercondensateurs. Les groupes de Cosnier et Shleev ont prototypé des supercondensateurs hybrides/biopiles qui utilisent les propriétés capacitives des nanotubes de carbone ou des nanotubes de carbone modifiés par la polyaniline pour stocker des densités énergétiques élevées avec des cycles de charge/décharge<sup>194,195</sup>.

A noter que la puissance des biopiles est généralement liée à la quantité d'enzyme immobilisée sur l'électrode, à la connexion avec le site actif de l'enzyme et à un approvisionnement en carburant efficace dans la cellule. Les faibles concentrations de dioxygène et de glucose ( $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  et  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , respectivement) dans le sang sont également significatives et limitent la performance des biopiles. De plus, ces biopiles sont constituées d'au moins deux systèmes enzymatiques qui doivent fonctionner au même pH (pH 7,4). De plus, il faut stériliser ces biopiles avant de pouvoir les implanter dans le corps pour éviter toute contamination ou infection. Un autre paramètre très important reste la biocompatibilité de ces biopiles. En effet, cette biocompatibilité permet de ne pas causer de réactions inflammatoires, ou encore éviter toute toxicité dans les tissus. Pour vaincre cela, des études ont été réalisées en utilisant des membranes de dialyse et en isolant la biopile dans un sac de Dacron<sup>®39,155</sup>. Ce système diminue la diffusion du glucose et de l'oxygène dans les bioélectrodes. Aussi, l'utilisation de films de polymères biocompatibles, tels que le Nafion<sup>®</sup>, le chitosan, a été étudiée. Cela réduit également les performances de ces biopiles.

Organisme	Matériau	Biopile	$P_{max}$ ( $\mu W.cm^{-2}$ )	Dispositif	Stabilité	Réf
<b>Raisin</b>	Fibre de carbone	GOx (MET) BOD (MET)	430	/	1 semaine	39
<b>Raisin</b>	CNTF	GOx (MET) BOD (DET)	1,75	Diode	NC	196
<b>Rat</b>	Graphite	GOx (MET) PPO (MET)	1,5	/	11 jours	155
<b>Lapin</b>	Ketjen black	GDH (MET) BOD (DET)	1,31	/	NC	192
<b>Blatte</b>	Tige de carbone	TOx/GOx (MET) BOD (MET)	55	/	2,5 heures	189
<b>Escargot</b>	CNTs	GDH-PQQ (DET) Lac (DET)	30	/	2 semaines	52
<b>4 Palourdes</b>	CNTs	GDH-PQQ (DET) Lac (DET)	5,2 40	Petit moteur	NC	54
<b>2 Homards</b>	CNTs	GDH-PQQ (DET) Lac (DET)	640	Montre digitale	NC	56
<b>Rat</b>	CNTs	GOx (DET) Lac (DET)	193	Diode	9 jours	39
<b>Rat</b>	CNTs	GDH-PQQ (DET) Lac (DET)	0,17	/	NC	55
<b>Cafard</b>	Ketjen black	GDH-NADH (MET) BOD (DET)	285	LED Capteur sans fil	54 minutes	40

Tableau I-3 : Tableau récapitulatif des implantations de biopiles glucose- $O_2$ 

Le dernier point primordial pour ces biopiles implantables est la stabilité dans le temps. Celles-ci sont dans un système avec des conditions température, pH, humidité constantes et cela peut mener à désactivation et/ou dénaturation de l'enzyme. Néanmoins, la stabilité à long terme des biopiles glucose- $O_2$  a été étudiée *in vitro*. Par exemple, la stabilité opérationnelle d'une biopile micro-aiguille a été examinée en permanence dans un liquide interstitiel artificiel. Cette biopile a délivré 75 % de sa densité de puissance initiale après 60 heures

d'opération<sup>197</sup>. Dans la sueur humaine, une biopile miniature a délivré sa puissance maximale en continu pendant 10 h, et présentait une puissance de 65 % de sa valeur initiale après cette période<sup>198</sup>. Bilewicz et al ont quant à eux une décroissance de 20 % de la puissance initiale ( $131 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) après 24 h de décharge continue pour biopile à base de nanotubes de carbone fonctionnalisés avec le naphthalène<sup>106</sup>. Di Lorenzo et ses collègues ont décrit une biopile miniature à flux traversant à base d'or poreux, qui fonctionnait en permanence durant 30 jours et ayant une demi-vie opérationnelle d'environ 8 jours<sup>199</sup>.

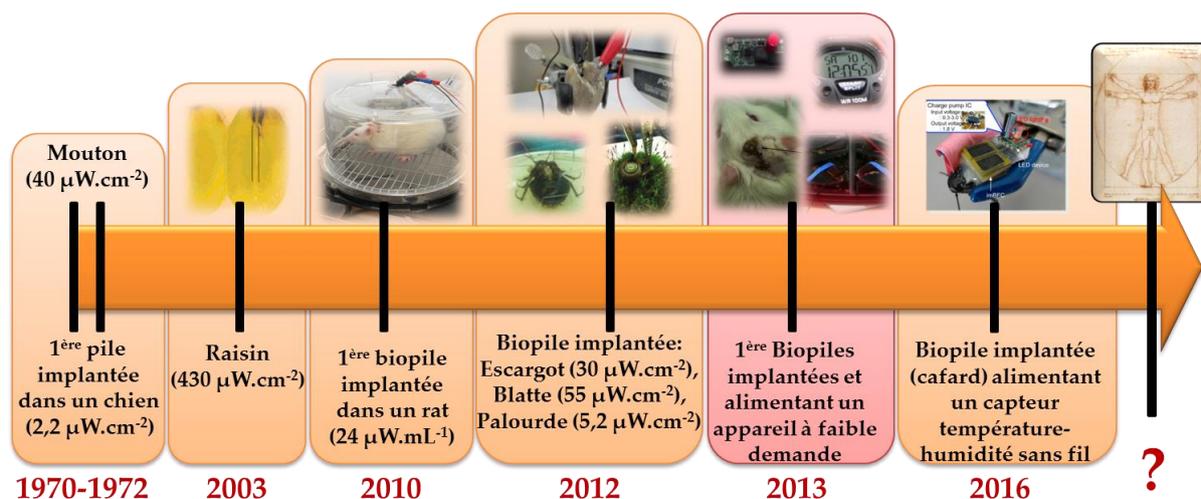


Figure I-20 : Frise historique résumant l'avancée des biopiles enzymatiques implantées dans des organismes vivants

Tous ces travaux montrent l'avancée des biopiles enzymatiques glucose- $\text{O}_2$  en fonctionnement à l'intérieur d'un organisme vivant et surmontent une barrière technologique (Figure I-20). De plus, cela permet d'envisager dans l'avenir l'alimentation de dispositifs à faibles demandes énergétiques et peut-être même conduire vers d'éventuelles applications biomédicales. Cependant, les performances doivent encore être améliorées du point de vue de la stabilité, c'est-à-dire, être de l'ordre de l'année, afin que l'on puisse réellement envisager une alternative aux batteries rechargeables. Mais aussi, comme cela a été signalé auparavant, la nécessité de ces biopiles d'être en contact avec les fluides physiologiques représente également un challenge au niveau de la biocompatibilité de ces dispositifs.

**CHAPITRE II. CONCEPTION  
DE BIOELECTRODES  
NANOSTRUCTUREES POUR  
LES BIOPILES GLUCOSE-O<sub>2</sub>  
SOUS FORME DE  
COMPRESSION**

## CHAPITRE II. CONCEPTION DE BIOELECTRODES NANOSTRUCTUREES POUR LES BIOPILES

### GLUCOSE-O<sub>2</sub> SOUS FORME DE COMPRESSION..... 53

<b>II.1. Introduction .....</b>	<b>56</b>
<b>II.2. Techniques de caractérisation : l'électrochimie .....</b>	<b>58</b>
II.2.1. La voltampérométrie cyclique .....	59
II.2.2. La chronoampérométrie .....	60
II.2.3. La courbe intensité-potentiel (i-E) ou courbe de polarisation .....	61
II.2.4. La courbe de puissance .....	64
<b>II.3. Détermination d'une constante thermodynamique.....</b>	<b>65</b>
II.3.1. Théorie enzymatique .....	65
II.3.2. Constante de Michaelis apparente .....	66
<b>II.4. Bioanodes nanostructurées à base de glucose oxydase ou glucose déshydrogénase FAD-dépendante par transfert électronique indirect .....</b>	<b>69</b>
II.4.1. Incorporation d'un médiateur rédox « insoluble » : la 1,4-naphtoquinone ....	69
II.4.1.1. La glucose oxydase .....	69
II.4.1.2. La glucose déshydrogénase FAD-dépendante .....	74
II.4.2. Incorporation d'un médiateur rédox : la 1,10-phénanthroline-5,6-dione (PLQ) .....	76
II.4.2.1. La glucose oxydase .....	78
II.4.2.2. La glucose déshydrogénase FAD-dépendante .....	79
II.4.3. Autres médiateurs .....	81
II.4.3.1. La 5-hydroxy-1,4-naphtoquinone (5-hydroxy-1,4-NQ) comme médiateur rédox pour la glucose oxydase .....	81
II.4.3.2. Le ferrocène-méthanol (Fc-MeOH) comme médiateur rédox pour la glucose oxydase .....	84
II.4.3.3. Des nanoparticules de ZnO fonctionnalisées avec du ferrocène (ZnO- Fc) comme médiateur rédox pour la glucose oxydase.....	86
<b>II.5. Cathodes 3D à bases d'enzymes à cuivre .....</b>	<b>88</b>
II.5.1. Réduction du dioxygène par les oxydases multi cuivres .....	88
II.5.2. Biocathodes nanostructurées à base d'oxydases multi cuivres en transfert direct .....	89
II.5.2.1. Biocathode à base de laccase .....	89
II.5.2.2. Biocathode à base de bilirubine oxydase en transfert direct.....	90

II.5.2.2.a. Enzyme non orientée .....	91
II.5.2.2.b. Orientation de l'enzyme grâce à la protoporphyrine IX ....	92
<b>II.6. Cathode MWCNTs/Peroxydase en transfert direct .....</b>	<b>94</b>
<b>II.7. Caractérisation des biopiles enzymatiques en cellule électrochimique .....</b>	<b>95</b>
II.7.1. Biopile GOx-NQ/Lac.....	95
II.7.2. Biopile GOx-NQ/BOD orientée par MWCNTs-PP IX .....	95
<b>II.8. Conclusion du chapitre II .....</b>	<b>96</b>

## II.1. Introduction

A l'heure actuelle, de nombreux travaux axés sur la conception de biopiles utilisent comme matériau d'électrode les nanotubes de carbone. Comme décrit dans la partie I.4 ci-dessus, ces CNTs possèdent de très nombreuses propriétés intéressantes comme par exemple une large surface spécifique, une excellente stabilité thermique et mécanique. Ce matériau est donc très favorable pour la connexion enzymatique aux électrodes de biopiles<sup>200</sup>. Avec ces CNTs, il est possible de créer de multiples structures d'électrodes et cela s'avère très intéressant pour les biopiles enzymatiques et leurs possibles applications. Grâce à leurs multiples propriétés, cela va permettre d'améliorer les performances des biopiles enzymatiques à glucose, en optimisant entre autre les transferts électroniques protéine-électrode, en augmentant aussi la surface active des électrodes sur une taille réduite d'électrode.

De nombreuses études récentes ont montré l'intérêt d'utiliser des CNTs et de jouer sur leur organisation sous forme de films ou encore de composites permettant d'améliorer le transfert électronique mais aussi l'immobilisation d'enzymes. Il existe de nombreuses techniques populaires pour former des électrodes à base de CNTs comme la croissance directe des forêts de CNTs sur l'électrode<sup>201</sup>, le dépôt de film de CNTs à l'aide de l'impression par transfert<sup>200</sup> ou par goutte déposée<sup>201</sup>, la liaison covalente des CNTs<sup>202</sup>, le dépôt d'un mélange de CNTs et polymère<sup>201,203</sup>, ou le mélange de CNTs avec un liant suivi du dépôt de la pâte<sup>204</sup>. L'utilisation de forêt de nanotubes a été reprise par le groupe de Nishizawa afin d'élaborer une biopile enzymatique glucose-O<sub>2</sub> à base de GOx et d'un polymère d'osmium comme médiateur rédox<sup>196</sup>. Les « bucky paper » sont aussi une bonne alternative pour les biopiles enzymatiques. Ce papier de nanotubes de carbone possède toutes les caractéristiques des nanotubes. On peut citer les travaux de Johnson<sup>168</sup>, qui compare les performances de différentes anodes à base de PQQ-GDH et BP réalisés à partir de MWCNTs et SWCNTs. Bourourou *et al.* ont pu démontrer le transfert médié de la Lac avec un dérivé bis pyrène ABTS comme médiateur rédox sur un BP<sup>109</sup>. Mac Vittie a également mis en série cinq biopiles enzymatiques à glucose avec ce même matériau afin d'alimenter un pacemaker à visée implantable<sup>56</sup>.

Le mélange de nanotubes de carbone et de polymère sous forme de composite est également très développé. Ce polymère est généré électrochimiquement. En 2010, le groupe de Mano a élaboré une biopile enzymatique glucose-O<sub>2</sub> utilisant des microfils de nanotubes de carbone avec du polyvinyl d'alcool (PVA)<sup>137</sup>. En 2014, Reuillard *et al.*<sup>205</sup> ont synthétisé un composite incluant des MWCNTs et un complexe de ruthénium avec une fonction bipyridine-pyrrole.

Sur cette matrice de polymère électrogénéré a été immobilisée et connectée la GDH NAD-dépendante.

Au laboratoire (DCM-BEA), une alternative à ces technologies a été développée. Celle-ci s'appuie sur le confinement d'enzymes rédox au sein de matrice de CNTs par simple compression mécanique donnant accès à une électrode nano-structurée cylindrique mécaniquement très stable et aisément manipulable en vue d'implantations chez l'animal. Au début, cette compression était faite à base de graphite. Cependant, ce matériau n'étant pas favorable au transfert d'électron direct à partir d'enzyme, il a donc été incorporé directement dans la compression un médiateur rédox afin de réaliser un transfert d'électron médié. En 2010, Cinquin *et al.*<sup>155</sup> ont implanté une biopile enzymatique à glucose dans un rat. Le disque anodique se compose d'un mélange de graphite, GOx et ubiquinone, et la cathode, un mélange de graphite, Polyphénol oxydase (PPO) et quinone. Cette biopile implantée possède une puissance volumique maximale de 24,4  $\mu\text{W}\cdot\text{mL}^{-1}$ . En 2012, Giroud *et al.*<sup>29</sup> ont montré une stabilité de l'ordre de 25 jours d'une biopile GOx/PPO avec des médiateurs différents de celle implantée deux ans plus tôt. Ce type de biopile produit une très faible puissance et sa f.e.m était très petite également ce qui retire tout intérêt pour une application quelconque. Afin d'améliorer ces résultats, le graphite a été remplacé par des CNTs. Cela a permis d'accroître les performances de la biopile de manière significative. Les propriétés de transfert d'électron des CNTs ont permis d'effectuer des DET entre l'enzyme et l'électrode, induisant une augmentation de la f.e.m de la pile. Les surfaces spécifiques de l'ordre de 280  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$  rendent également possible le confinement d'un grand nombre de protéines au sein de la matrice de CNTs, sous forme d'un disque composite CNTs/enzyme (Figure II-1A).

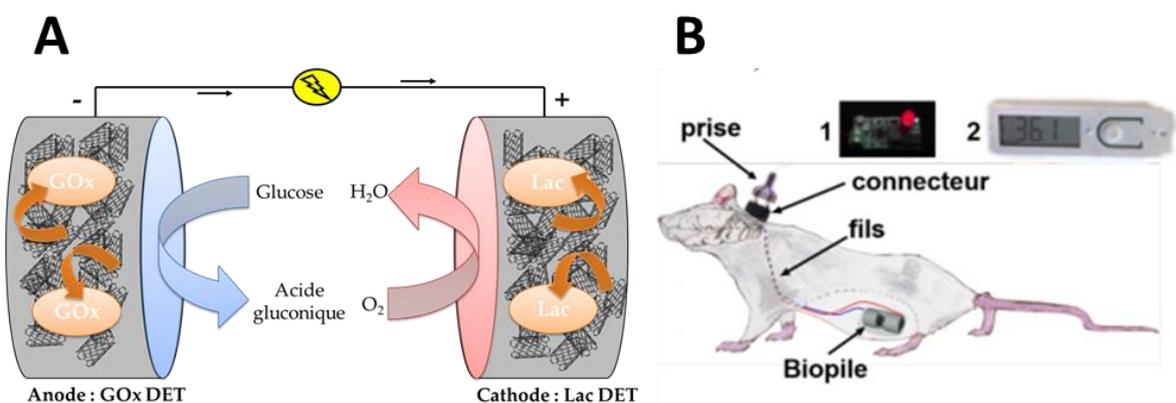


Figure II-1 : (A) Schéma représentatif de la biopile GOx/Lac dans la nanostructure de CNTs. (B) Schéma de la biopile implantée dans l'abdomen d'un rat pour l'alimentation d'une diode et d'un thermomètre électronique<sup>39</sup>

L'association de la GOx à l'anode pour l'oxydation du glucose et de la Lac à la cathode pour la réduction de l'oxygène, a permis l'obtention d'excellentes performances avec un transfert électronique direct aux deux bioélectrodes<sup>13</sup>. En 2013, cette même biopile glucose-O<sub>2</sub> a pu être implantée dans un rat<sup>39</sup>. Celle-ci a atteint une puissance surfacique de 193,5  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  et aucun signe de rejet des bioélectrodes à base CNTs n'a été observé durant 110 jours après l'implantation. Cela démontre une biocompatibilité du système. Cette biopile implantée a notamment permis l'alimentation d'une diode ainsi qu'un thermomètre électronique grâce à la consommation du glucose et de l'oxygène par les enzymes connectées (GOx et Lac) (Figure II-1B).

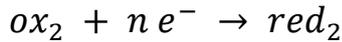
Le DET avec la GOx n'a été que très peu observé. Nos expériences se sont donc focalisées sur l'optimisation de la connexion par MET de la GOx par introduction de médiateurs rédox pour la bioanode. Nous nous sommes intéressés également à une autre enzyme permettant l'oxydation du glucose, la FADGDH, qui possède le même site actif que la GOx et qui elle ne nécessite pas la présence d'oxygène. A la biocathode, différentes oxydases multi cuivres ont été connectées directement sur les matrices nanostructurées de MWCNTs. Nous avons ainsi étudié la connexion de différents types d'enzymes dans ces matrices de CNTs et développé de nouvelles biopiles, en particulier pour avoir accès à des stabilités et des puissances importantes dans l'optique de leur implantation chez l'animal pour l'éventuelle alimentation de dispositifs à faible demande énergétique. La conception de ces macroélectrodes n'a pas qu'une visée implantable. En effet, on peut également penser à l'alimentation de petits appareils électroniques médicaux et digitaux tels que les tests de grossesse et d'ovulation qui sont à usage unique et qui vont alors demander une énergie uniquement sur quelques minutes (temps d'acquisition de la mesure et d'affichage de la réponse) et cela *via* l'association de plusieurs biopiles en série et/ou en parallèle ou par leur association à un élément de stockage d'énergie qui peut être un simple condensateur.

## II.2. Techniques de caractérisation : l'électrochimie

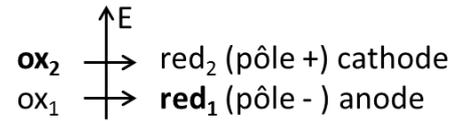
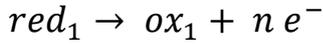
L'électrochimie est une technique ou caractérisation pour le transfert d'un ou plusieurs électrons entre une espèce en solution et une électrode, ou plus simplement la conductivité ionique.

Dans le cas des biopiles enzymatiques, la transformation est dite spontanée.

Au pôle positif, couramment appelé cathode a lieu une réaction de réduction :



Au pôle négatif, appelé anode a lieu une réaction d'oxydation :



### II.2.1. La voltampérométrie cyclique

Cette méthode électrochimique est très utilisée pour caractériser le comportement de systèmes électrochimiques. Cela consiste à enregistrer le courant lorsqu'une électrode est soumise à un balayage linéaire de tension. Les mesures de voltampérométrie cyclique ont été réalisées à partir d'un montage à trois électrodes dans une cellule électrochimique :

- électrode de travail (compression de nanotubes de carbone avec enzyme et médiateur si besoin),
- électrode auxiliaire constituée d'un fil de platine,
- électrode de référence Ag/AgCl dans une solution aqueuse en KCl saturé

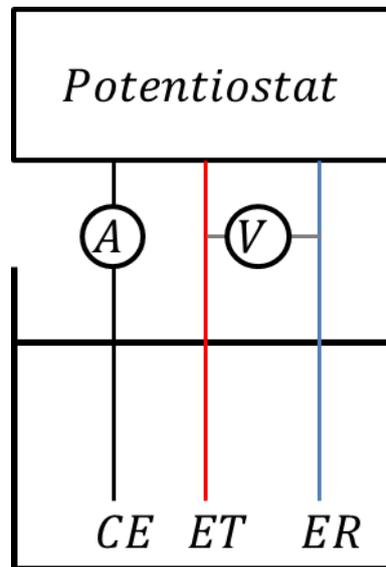


Figure II-2 : Montage d'une cellule électrochimique à 3 électrodes connectées sur un potentiostat. CE correspond à la contre-électrode, ET à l'électrode de travail et ER à l'électrode de référence

Lors des études de catalyse enzymatique, les réponses électrochimiques de l'électrode sont enregistrées à une vitesse de balayage de 0,2 mV.s<sup>-1</sup> afin de minimiser le courant capacitif dû à la quantité importante de CNTs. Il faut différencier l'analyse de l'oxydation du glucose et la réduction du dioxygène ou du peroxyde d'hydrogène :

- Cas de l'oxydation du glucose par la GOx ou la FADGDH

Une CV est réalisée avant et après ajout de solution de glucose (seuil limite de courant anodique déterminé par la CA), sous argon. L'agitation est maintenue durant ces acquisitions (convection hydrodynamique).

- Cas de la réduction du dioxygène par la Lac ou la BOD

Ici, une CV est réalisée sous argon et une à saturation de dioxygène dans la solution afin d'obtenir le courant maximal de réduction.

- Cas de la réduction du peroxyde d'hydrogène par la HRP

Une CV est réalisée avant et après ajout de solution de peroxyde d'hydrogène (seuil limite de courant cathodique déterminé par la CA).

---

### II.2.2. La chronoampérométrie

La chronoampérométrie est une technique qui permet de fixer un potentiel (judicieusement choisi) et de suivre le courant en fonction du temps. Cette technique est dite sélective.

Les mesures de chronoampérométrie ont été réalisées à partir d'un montage à trois électrodes dans une cellule électrochimique comme décrit ci-dessus.

Cette technique permet d'observer le courant de catalyse anodique ou cathodique à une valeur de potentiel donnée.

- Cas de l'oxydation du glucose par la GOx ou la FADGDH

Lors de l'ajout de quantité croissante de glucose, une réponsalytique d'oxydation est observée. Lorsque l'ajout de glucose n'induit pas une augmentation de courant, cela indique que l'activité de l'enzyme est maximale.

- Cas de la réduction du dioxygène par la Lac ou la BOD

Dans ce cas, la CA consiste à observer la réduction de l'oxygène en passant d'un milieu sous argon à un milieu saturé en dioxygène. Un plateau doit être observé montrant l'activité maximale de l'enzyme.

- Cas de la réduction du peroxyde d'hydrogène par la HRP

Lors de l'ajout de quantité croissante de peroxyde d'hydrogène, une réponse catalytique de réduction est observée. De plus, lorsque l'ajout de peroxyde d'hydrogène n'induit pas d'augmentation de courant, cela indique que l'activité de l'enzyme est maximale.

### II.2.3. La courbe intensité-potentiel (i-E) ou courbe de polarisation

La courbe de polarisation est réalisée à partir du montage suivant :

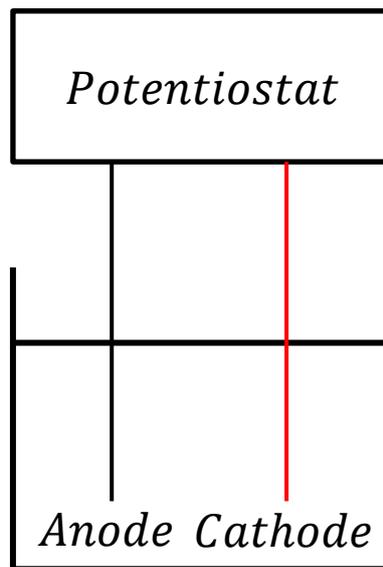


Figure II-3 : Montage d'une pile : la cathode est l'ET et l'anode est l'association de la CE et de la EF

Une courbe de polarisation<sup>206</sup> est obtenue en faisant varier la tension de sortie ou le courant sous une charge variable. En conséquence, un potentiel est obtenu en fonction du courant (Figure II-4). La pente d'une courbe i-E est due à des pertes potentielles différentes liées aux composants de la pile à combustible. La tension de la cellule peut être décrite comme :

$$V_{cell} = \Delta E_{cell} - \eta_{ohm} - \eta_{act} - \eta_{conc} \quad \text{Équation II.1}$$

où  $\Delta E_{cell}$  représente le potentiel thermodynamique idéal entre la pile à combustible et  $\eta_{act}$ ,  $\eta_{ohm}$  et  $\eta_{conc}$  correspondant aux pertes d'activation, ohmique et de transport de masse, respectivement.

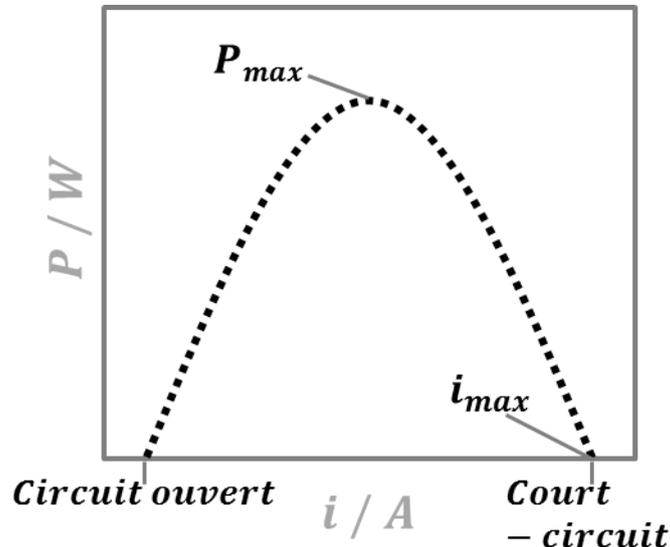


Figure II-4 : Allure d'une courbe de polarisation d'une biopile avec les principales pertes de tension de la cellule

En pratique, le  $V_{cell}$  peut être légèrement inférieur à  $\Delta E_{cell}$  en raison de diverses pertes de tension. Ces facteurs limitants contribuant à la diminution de la performance peuvent être décrits comme ce qui suit :

$\eta_{act}$  ou pertes d'activation sont observées à des courants faibles en raison d'une combinaison  $\eta_{act\ anode}$  et  $\eta_{act\ cathode}$ . Ces pertes sont également appelées perte de transfert de charge et sont causées par la lenteur de la cinétique de réaction aux électrodes. Le choix de l'électrocatalyseur approprié et l'augmentation de la surface active des électrodes sont des méthodes clés pour réduire ces limites. Le choix du milieu électrolytique et du pH peut également influencer la cinétique des électrodes.

$\eta_{ohm}$  ou pertes ohmiques. Au milieu du graphique prédominent les pertes ohmiques.

$$\eta_{ohm} = R \times i \quad \text{Équation II.2}$$

Cela est dû à la résistance du transfert de charge ionique dans l'électrolyte ( $R_{électrolyte}$ ) et la résistance électrique dans les électrodes, les contacts et les fils ( $R_{externe}$ ). La résistance

ohmique pour le transport ionique ( $R_{\text{électrolyte}}$ ) dans la biopile enzymatique peut être exprimée en termes de distance d'écartement anode-cathode ( $d$ ), de la surface de section transversale du transport de charge ( $A$ ) et la résistivité ( $\rho$ ) ;

$$R_{\text{électrolyte}} = \rho \times \frac{d}{A} \quad \text{Équation II.3}$$

Cette équation indique qu'un électrolyte support avec une faible résistivité (ou une conductivité élevée ( $\sigma = \rho^{-1}$ ) et avec une faible distance électrode-électrode réduira au minimum la résistance électrique,  $R$ .

$\eta_{\text{conc}}$  ou pertes de concentration. À des densités de courant élevées, les pertes de concentration dominent en raison de deux facteurs principaux; (i) la formation d'une zone d'appauvrissement sur les électrodes et (ii) le mélange par diffusion transversale des deux courants ( $\delta_{\text{mix}}$ );

(i) La zone d'appauvrissement est le résultat de la consommation de carburant et d'oxydant sur l'électrode correspondante alors que les réactions d'oxydation ou de réduction se produisent. Cela se produit sur l'épaisseur de l'électrode et il peut être motivé par un apport lent des réactifs sur les électrodes.

(ii) Le mélange par diffusion croisée à travers la limite liquide-liquide conduisant à la réduction des concentrations de carburant/flux d'oxydants.

Les deux contributions peuvent être abaissées en augmentant la vitesse d'écoulement des réactifs et/ou leurs concentrations. En dehors de cela, on sait que la performance de la biopile enzymatique fonctionnant sous dioxygène dissous sera limitée par le côté de la cathode. Il en est ainsi car l'oxygène dans les milieux aqueux est présent en faible concentration en raison de sa faible solubilité dans les électrolytes à base d'eau. La teneur en oxygène est de 2,2 mmol.L<sup>-1</sup> à saturation, à température ambiante et à conditions de pression standard. En outre, le dioxygène dissous dans des milieux aqueux présente une bonne diffusivité ( $\approx 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). L'accès à une plus grande quantité d'oxygène dans la cellule peut être obtenu grâce à une cathode respirante. En fait, le contenu de l'oxygène dans l'air est d'environ 10 mmol.L<sup>-1</sup> avec une diffusivité de 0,2 cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> (ordre de grandeur 4 fois supérieur à celui des milieux aqueux).

Dans nos biopiles enzymatiques réalisées par compression, ce seront les chutes ohmiques  $\eta_{\text{ohm}}$  qui prédominent. Le  $\eta_{\text{conc}}$  sera très peu observé car on ne va pas dans des courants

élevés, c'est-à-dire qu'on arrête l'expérience peu après la valeur  $P_{max}$  atteinte afin de ne pas atteindre le court-circuit et détruire nos biopiles.

#### II.2.4. La courbe de puissance

La courbe de puissance est une mesure globale de la performance de la biopile et elle est obtenue en multipliant la tension de la cellule et le courant :

$$P_{cell} = V_{cell} \times i \quad \text{Équation II.4}$$

La plupart du temps, la puissance est exprimée en densité de puissance afin de donner une valeur comparable à celle d'autres électrodes utilisant différentes zones actives. Il est obtenu en normalisant la puissance par rapport à la surface apparente de l'électrode (A) en coupe transversale :

$$\text{Densité de puissance} = \frac{P_{cell}}{A} \quad \text{Équation II.5}$$

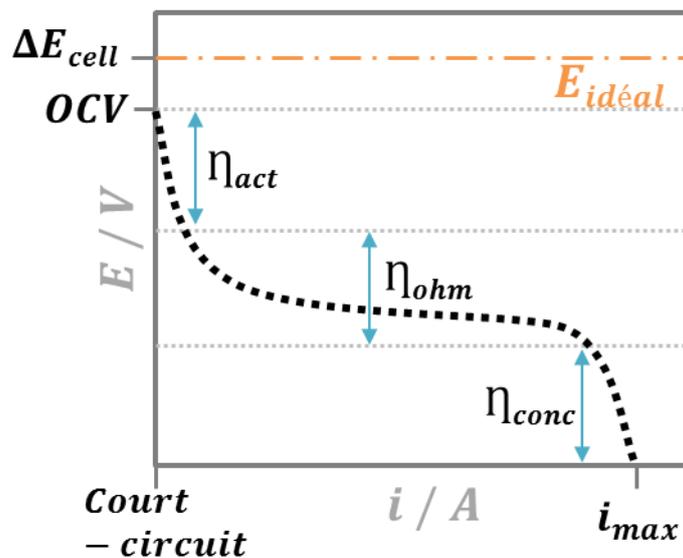


Figure II-5 : Allure d'une courbe de puissance

La Figure II-5 présente le profil caractéristique de la puissance en fonction du courant. La courbe est définie par le circuit ouvert et la tension de court-circuit et permet de déterminer la puissance maximale générée par la pile à combustible et le potentiel auquel elle se produit. Les sorties de puissance habituelles pour les piles à combustible enzymatiques sont de l'ordre de plusieurs centaines de microwatts à des tensions entre 0,8-0,2 V. En outre, les biopiles

enzymatiques peuvent être empilées et mises à l'échelle pour obtenir une tension et une puissance plus élevées et répondre aux exigences de l'application.

## II.3. Détermination d'une constante thermodynamique

### II.3.1. Théorie enzymatique

Une enzyme augmente la vitesse d'une réaction en abaissant l'énergie d'activation nécessaire à cette réaction. L'enzyme peut accomplir cette fonction car elle a un site actif à la surface de la protéine où se lie le substrat. L'interaction entre le site actif et le substrat affaiblit la structure du substrat facilitant ainsi sa dégradation. Le graphique ci-dessous représente la vitesse de réaction d'une enzyme en fonction de la quantité de substrat.

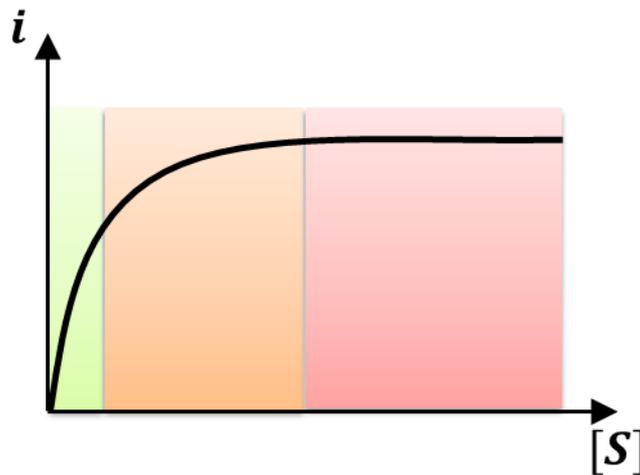


Figure II-6 : Courbe représentant la vitesse de réaction d'une enzyme en fonction de la quantité de substrat

On peut en tirer les conclusions suivantes :

- À faible concentration de substrat (zone verte), toutes les molécules peuvent atteindre le site actif en même temps. La réaction est donc proportionnelle à la concentration de substrat.
- Plus la concentration du substrat augmente (zone orange), moins de sites actifs sont disponibles et la vitesse de réaction n'augmente pas proportionnellement avec la concentration de substrat.

- À forte concentration de substrat (zone rouge), la vitesse de réaction n'augmente plus et se stabilise car tous les sites actifs sont occupés (saturation).

### II.3.2. Constante de Michaelis apparente

La constante de Michaelis,  $K_M$  est constante caractérisant une réaction enzymatique. Sa valeur correspond à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de la réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale  $v_{max}$ . La cinétique enzymatique a été modélisée en 1913 par Michaelis-Menten. Le substrat  $S$  forme un complexe  $ES$  avec l'enzyme  $E$ . Le complexe se décompose ensuite en produit  $P$  et en enzyme libre  $E$ . Cette modélisation a été établie pour des enzymes libres en solution. La réaction s'écrit alors :



Les paramètres  $k_1$  (sens direct) et  $k_{-1}$  (sens indirect) sont les constantes cinétiques de la première étape, et  $k_2$  (ou  $k_{cat}$ , car il s'agit de la réaction catalytique), celle de la seconde étape. La vitesse initiale de la réaction enzymatique s'écrit

$$v_r = k_2 [ES] \quad \text{Équation II.7}$$

La concentration totale en enzyme est

$$[E]_{tot} = [E] + [ES] \quad \text{Équation II.8}$$

Lorsque la quantité de substrat est suffisante pour saturer l'enzyme et la transformer totalement en complexe  $ES$ , la vitesse devient alors insensible à une augmentation de la concentration en substrat et elle vaut

$$v_{max} = k_2 [E]_{tot} \quad \text{Équation II.9}$$

La vitesse globale de production du complexe  $ES$  est la différence entre la vitesse de sa formation et de sa décomposition, soit

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad \text{Équation II.10}$$

Après la phase transitoire de mélange dans la solution, pour une concentration donnée en substrat, la concentration en complexe demeure constante, soit

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad \text{Équation II.11}$$

En combinant ces dernières équations, on obtient

$$[ES] = \frac{[E]_{tot}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Équation II.12}$$

$$\text{avec } K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Dès lors, la vitesse initiale peut s'écrire

$$v_r = \frac{k_2[E]_{tot}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Équation II.13}$$

Ce qui donne l'équation de Michaelis-Menten

$$v_r = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Équation II.14}$$

Le paramètre  $K_M$  est la constante de Michaelis-Menten et correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse est égale à  $\frac{v_{max}}{2}$ . Cette constante s'exprime en mol.L<sup>-1</sup>. Sa valeur est propre à chaque enzyme et à la nature du substrat. Par ailleurs, elle est fonction de la température et du pH.

Lors de l'avancement de la réaction,  $P$  est consommé à l'électrode au fur et à mesure qu'il est produit et que l'on peut l'atteindre, par un choix de la tension, un régime limite où la concentration  $[P]$  à la surface de l'électrode devient nulle. Le courant limite est proportionnel à la vitesse  $v_r$  et la réponse de  $i = f([S])$  est alors de type hyperbolique.

$$i = \alpha_{corr} \frac{zFv_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Équation II.15}$$

avec  $\alpha_{corr}$ , le facteur de correction,  $z$ , le nombre de charges, et  $F$ , la constante de Faraday.

Une courbe d'étalonnage est obtenue à partir d'une chronoampérométrie avec ajout de glucose. La valeur réelle de l'asymptote,  $i_{max}$ , est inférieure à  $zFv_{max}$  (facteur de correction  $\alpha_{corr} \leq 1$ ), car les espèces  $P$  diffusent à priori dans les trois dimensions de l'espace (bioélectrode sous forme de compression 3D). De plus, dans le cas des biopiles enzymatiques, les enzymes ne sont pas en solution mais elles sont immobilisées sur les nanotubes de carbone et le site actif est plus ou moins accessible (transfert médié pour les bioanodes). De cette façon, on parle de  $K_M$  apparent ( $K_M^{app}$ ).

Lorsque  $[S] = K_M$ , le courant est égal à  $\frac{i_{max}}{2}$ . C'est ainsi qu'il est possible de déterminer les valeurs de  $K_M^{app}$  pour les différentes bioélectrodes étudiées (Figure II-7).

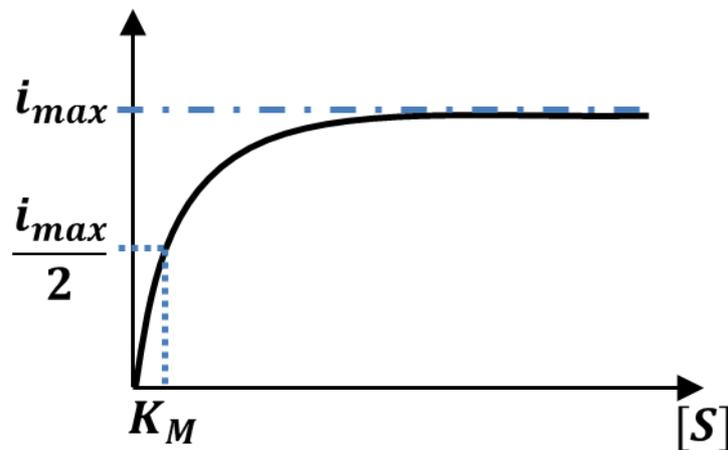


Figure II-7 : Allure d'une courbe d'étalonnage pour une concentration en enzyme

Plus sa valeur est élevée, plus la concentration de substrat nécessaire à une activité importante de l'enzyme est élevée. Par ailleurs, si cette valeur est faible, cela signifie que l'affinité de l'enzyme pour le substrat est forte.

$v_{max}$  va pouvoir être déterminé graphiquement en inversant la loi de vitesse initiale

$$\frac{1}{v_r} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max}[S]} \quad \text{Équation II.16}$$

L'ordonnée à l'origine de cette droite est l'inverse de  $v_{max}$  et la pente permet de trouver  $K_M$ .

## II.4. Bioanodes nanostructurées à base de glucose oxydase ou glucose déshydrogénase FAD-dépendante par transfert électronique indirect

### II.4.1. Incorporation d'un médiateur rédox « insoluble » : la 1,4-naphtoquinone

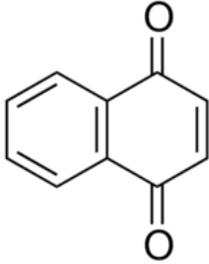


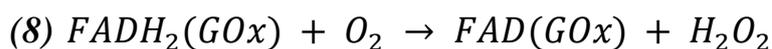
Figure II-8 : Structure chimique de la 1,4-naphtoquinone

La 1,4-naphtoquinone (NQ), est une *p*-quinone possédant une structure tout à fait intéressante. Elle est composée du noyau benzoquinone, responsable de son activité rédox et un noyau aromatique. Ce dernier lui confère une très faible solubilité en milieu aqueux (90 mg.L<sup>-1</sup> dans l'eau) ainsi qu'une aromaticité importante rendant possible les interactions de «  $\pi$ -stacking » sur la paroi des CNTs. Ses propriétés rédox ainsi que sa structure en font donc un excellent candidat pour la médiation et pour son incorporation au sein de bioanodes nanostructurées à base GOx ou FADGDH et de MWCNTs. Le médiateur a pour but de connecter indirectement un maximum d'enzymes. Cependant, dans ces nanostructures, il est peu probable que la totalité des enzymes immobilisées échangent leurs électrons avec la sonde rédox.

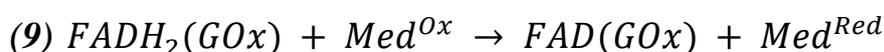
#### II.4.1.1. La glucose oxydase

Le principe de la médiation de la GOx s'appuie sur la substitution du dioxygène, substrat naturel de régénération du cofacteur Flavine Adénine Dinucléotide (FAD), par une espèce rédox active qui sera ensuite ré-oxydée à la surface de l'électrode. En effet, lors de l'oxydation du glucose, la FAD est réduite en FADH<sub>2</sub> qui est alors naturellement oxydée par le dioxygène :

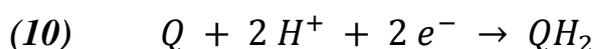




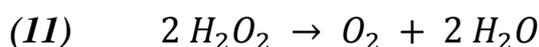
Pour le cas où la connexion de la GOx est obtenue par le biais d'un médiateur



Depuis de nombreuses années l'utilisation de ces molécules relais, en solution ou immobilisées, a permis de contourner la difficulté que représente la connexion directe de la GOx. Les structures de ces relais électroniques sont diverses, allant des complexes de coordination à des médiateurs purement organiques<sup>94</sup>. Les structures chimiques de ces médiateurs vont avoir une influence sur les propriétés de connexion. Le potentiel électrochimique de l'espèce rédox va avoir un rôle prépondérant dans la qualité du transfert d'électron entre le cofacteur réduit et le médiateur<sup>207</sup>. De même, l'encombrement stérique de la sonde est un autre paramètre de taille puisque celle-ci doit accéder au site actif de la GOx<sup>208,209</sup>. Parmi les espèces organiques, les quinones représentent une classe de molécules rédox particulièrement utilisée dans les processus de transfert électronique enzyme-électrode. Leur processus d'oxydo-réduction met en jeu 2 H<sup>+</sup> et 2 e<sup>-</sup> :

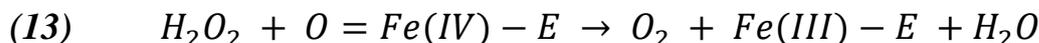
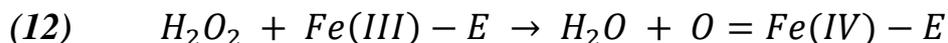


La NQ a un potentiel rédox de  $E_{1/2} = -0,175 \text{ V vs. Ag/AgCl saturé à pH 7}$ . Son potentiel, supérieur à celui du couple FAD/FADH<sub>2</sub> de presque 300 mV est idéalement situé pour permettre un excellent transfert électronique tout en conservant une f.e.m importante lors de son utilisation dans une biopile. Dans ce cas précis, la FADH<sub>2</sub> formée par oxydation du glucose peut être régénérée par le dioxygène, substrat naturel de la GOx pour former du peroxyde d'hydrogène. Pour limiter ce processus la catalase (Cat) est intégrée à la structure. La catalase est une oxydoréductase héminique qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène :



Cette enzyme est formée de quatre chaînes polypeptidiques comportant chacune un groupe hème. Ces hèmes et leurs environnements protéiques sont les sites actifs de cette enzyme. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupement hème de la catalase réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, créant de ce fait une molécule d'eau et un groupement Fe(IV)=O hautement oxydant ; ce dernier peut ensuite

oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène. Ce processus est illustré plus spécifiquement par les équations suivantes :



La protéine joue un rôle doublement positif puisqu'elle élimine le peroxyde d'hydrogène formé et même si il produit du dioxygène, elle n'en produit qu'une demi-mole, pour une mole utilisée lors de l'oxydation de FADH<sub>2</sub> en FAD (Figure II-9).

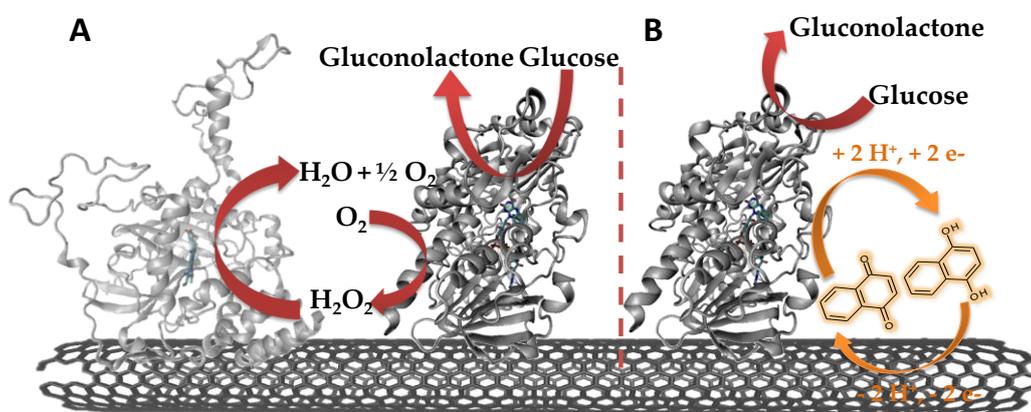


Figure II-9 : Schéma représentatif de : (A) Dismutation du peroxyde d'hydrogène produit par la GOx par la catalase, (B) Processus de transfert électronique entre la GOx et la matrice de CNTs grâce à la 1,4-NQ en tant que médiateur rédox

L'électrode nanostructurée à base de MWCNTs a été réalisée par compression mécanique formant une pâte composite. Cette anode se compose de : 35 mg de MWCNTs, 15 mg de GOx, 10 mg de catalase, 5 mg de NQ et 100 µL d'eau. A noter que la NQ étant peu soluble, la réponse électrochimique que l'on observera sera totalement dû à la NQ solvatée. Une fois la pâte homogénéisée à l'aide d'un mortier, celle-ci est compressée mécaniquement à l'aide d'une presse hydraulique pour donner un disque solide de diamètre et d'épaisseur modulable ainsi qu'aisément manipulable. Dans cette thèse, le diamètre du disque de MWCNTs est de 1,3 cm et son épaisseur de 2 mm. A cette bioanode est fixé un fil de cuivre *via* une pâte de carbone conductrice qui va permettre la connexion à l'électrode. Ce contact est ensuite isolé par du silicone. Seule une face de ce disque sera alors en contact avec l'électrolyte, avec une surface de 1,33 cm<sup>2</sup> (Figure II-10).

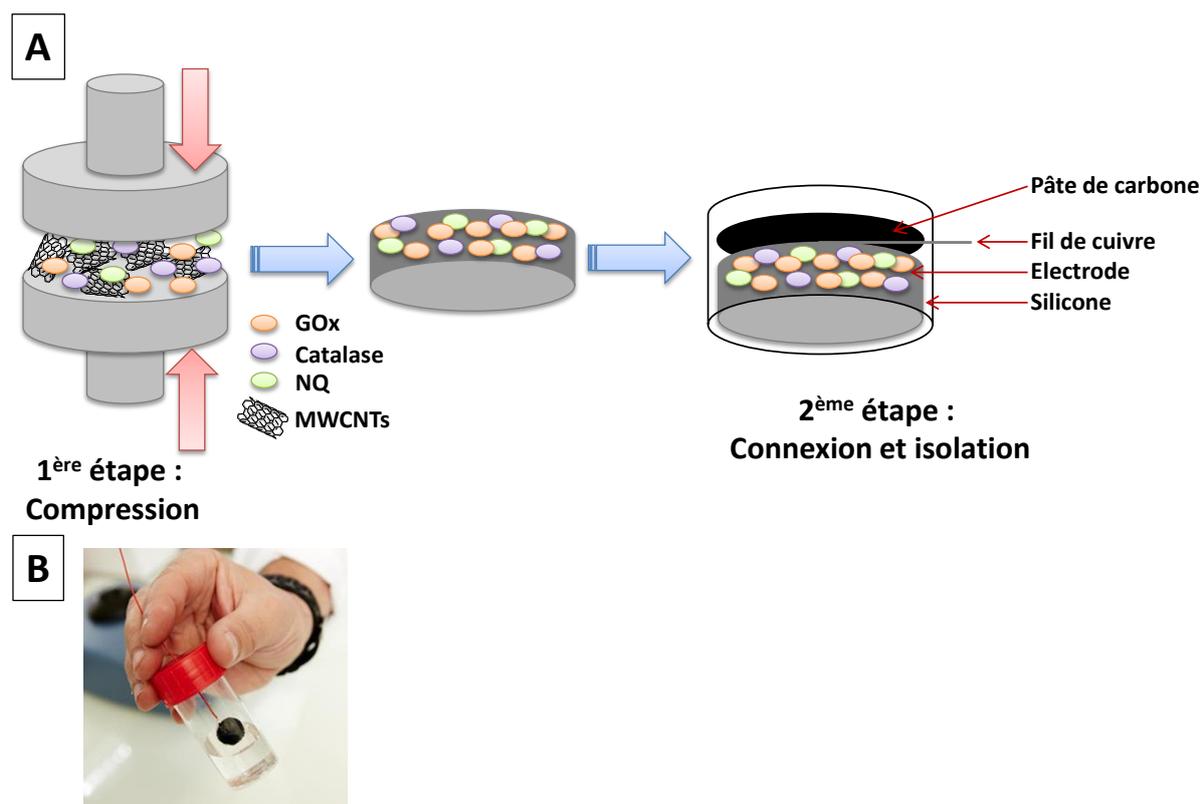


Figure II-10 : (A) Illustration du processus de fabrication d'une bioanode MWCNTs/GOx/Catalase/NQ par compression. (B) Photographie d'une bioélectrode sous forme de compression

Cette technique d'élaboration d'électrode par compression mécanique de MWCNTs et enzymes peut très probablement détériorer une partie des enzymes pendant le processus de fabrication de l'électrode. Il se peut alors que le cofacteur (ou site actif) soit en réalité à l'extérieur de l'enveloppe protéique. En effet, la difficulté d'obtenir un transfert électronique direct entre la GOx et l'électrode lors de l'oxydation du glucose a déjà été soulignée dans le 0 ci-dessus<sup>130</sup>. De ce fait, la FAD visualisée en électrochimie n'est donc pas nécessairement toujours au sein de la protéine active mais éventuellement à l'extérieur de l'enveloppe protéique ou dans l'enzyme dénaturée. De plus, la protéine étant utilisée sans aucune purification la probabilité d'avoir des FAD libres n'est pas négligeable.

La bioanode GOx-NQ peut alors être caractérisée par voltampérométrie cyclique (CV) (Figure II-11) à très faible vitesse de balayage, 0,2 mV.s<sup>-1</sup>, afin de minimiser les courants capacitifs dus à la masse importante de CNTs utilisée lors la conception de l'électrode.

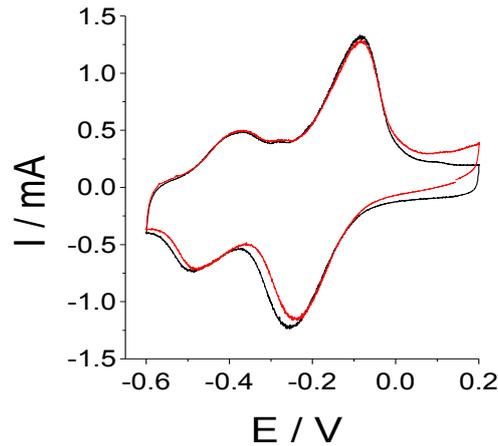


Figure II-11 : Voltampérométrie cyclique de la bioanode MWCNTs/GOx/NQ (noir) sans et (rouge) avec glucose ( $0,16 \text{ mol.L}^{-1}$ ) sous argon ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ , dans tampon PB  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7, RT)

La réponse électrochimique de la bioanode GOx-NQ en l'absence de glucose présente les systèmes rédox réversibles caractéristiques correspondants à la FAD à  $E_{1/2} = -0,44 \text{ V}$  et la NQ à  $E_{1/2} = -0,17 \text{ V}$ . Concernant le système attribué à la FAD de la GOx, le  $\Delta E$  d'une valeur de  $130 \text{ mV}$  et le système attribué à la NQ possède un  $\Delta E$  de  $170 \text{ mV}$ . Ces valeurs sont élevées justifiant que les espèces ne soient pas bien immobilisées mais bien confinées au sein de la structure 3D des nanotubes de carbone. Il est couramment supposé que le pic d'oxydoréduction attribué au couple FAD/FADH<sub>2</sub> correspond aux FAD inactives lors du processus de catalyse. La grande valeur du  $\Delta E$  observé pour la 1,4-NQ peut être expliquée par un transfert électronique lent entre l'espèce et l'électrode. En effet, la sonde rédox étant relativement insoluble, il est possible que la réponse électrochimique de l'espèce non solvatée en milieu aqueux, et d'autant plus dans la nanostructure, ne soit pas un système infiniment rapide. En présence de glucose ( $160 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) et sous argon, on observe une augmentation de la valeur de courant d'oxydation au niveau des pics rédox de la 1,4-NQ. Cette augmentation de courant de  $190 \mu\text{A}$  correspond à la catalyse médiée entre la FADH<sub>2</sub> de la GOx et la 1,4-NQ. Ce faible courant souligne la difficulté de connecter la Glucose oxydase de manière directe et l'avantage relatif à l'utilisation d'un médiateur rédox à la bioanode.

Cette bioanode a également été caractérisée par chronoampérométrie.

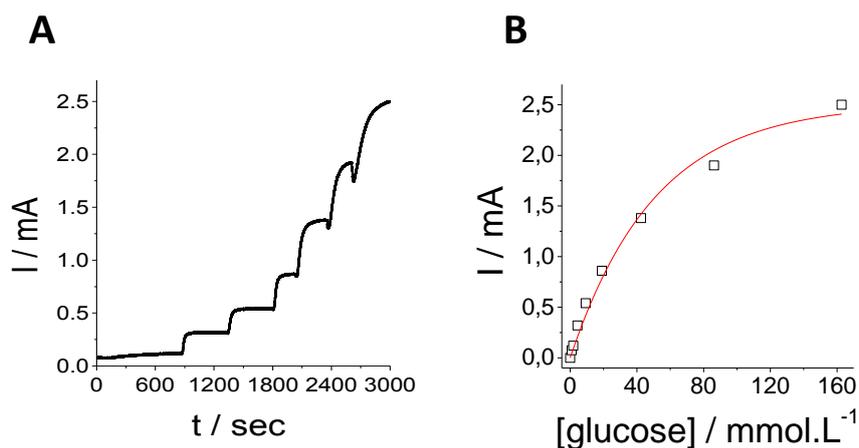


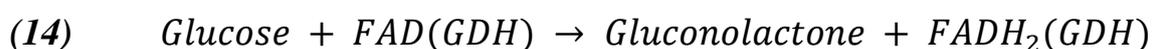
Figure II-12 : (A) Chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl de la bioanode MWCNTs/GOx/NQ en fonction des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans PB pH 7, RT et sous agitation à 500 rpm. (B) Courbe d'étalonnage obtenue à partir des mesures de chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl suivant l'addition de glucose pour la bioanode

La Figure II-12A présente la CA à 0,2 V de la bioanode GOx-NQ lors de l'ajout de quantité croissante de glucose. Une réponse catalytique d'oxydation est observée lorsque la concentration en glucose est supérieure à 2 mmol.L<sup>-1</sup>. L'ajout de quantité supérieure à 160 mmol.L<sup>-1</sup> n'induit pas une augmentation de courant. Ceci indique que l'activité de l'enzyme est maximale et correspond à un courant catalytique de 2,5 mA. Les courants catalytiques observés en CV et en CA ne sont pas du même ordre de grandeur (0,19 mA pour 2,5 mA). Ceci s'explique par un transfert d'électrons très lent. L'électrode possédant un très fort courant capacitif, la vitesse de balayage de 0,2 mV.s<sup>-1</sup> est trop rapide.

La courbe d'étalonnage (Figure II-12B) obtenue à partir de la CA, permet de déduire graphiquement le  $K_M^{app}$  d'une valeur de 35 mmol.L<sup>-1</sup>. Cette valeur est très proche du  $K_M$  théorique relevé pour la GOx en solution soit 30 mmol.L<sup>-1</sup> à 25 °C<sup>210</sup>.

#### II.4.1.2. La glucose déshydrogénase FAD-dépendante

Comme mentionné dans la partie I.2.3.2.a ci-dessus, la FADGDH ne peut avoir l'oxygène comme accepteur d'électron<sup>46</sup> et il n'y aura donc pas de peroxyde d'hydrogène formé. Cette molécule nocive pourrait endommager la biocathode associée.



De même, lorsque la connexion de la GDH est obtenue par le biais d'un médiateur, on a :



Cette enzyme est très intéressante pour l'application implantable. En effet, son pH optimal de 7 et l'absence de la production de peroxyde d'hydrogène sont des points positifs. Toutefois sa connexion directe n'est pas facile à cause de son site actif enfoui, comme dans le cas de la GOx. Etant donné que la NQ est connue pour être un très bon médiateur d'enzymes oxydant le glucose<sup>139,143</sup>, nous l'avons donc utilisée pour voir si elle pouvait également jouer son rôle de médiateur rédox avec cette GDH.

Cette bioanode a été élaborée de la même manière que la bioanode GOx. Elle est composée d'un mélange comprenant 35 mg de MWCNTs, 15 mg de FADGDH, 5 mg de NQ et 100 µL d'eau. La catalase n'est pas nécessaire vu qu'il n'y a pas de peroxyde d'hydrogène généré.

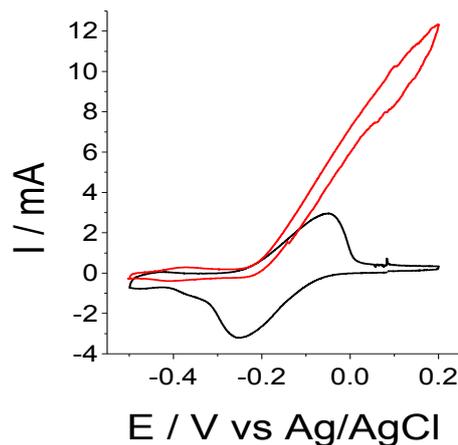


Figure II-13 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de la bioanode MWCNTs/FADGDH/NQ sous argon (courbe noire) et sous argon avec  $0,16 \text{ mol.L}^{-1}$  de glucose (courbe rouge) dans Mc Ilvaine pH 7, RT

Cette bioanode a été caractérisée par CV et par CA.

La réponse électrochimique de la bioanode FADGDH-NQ en l'absence de glucose présente les systèmes rédox réversibles caractéristiques correspondants à la FAD à  $E_{1/2} = -0,45 \text{ V}$  et la NQ à  $E_{1/2} = -0,15 \text{ V}$ . Concernant le système attribué à la FAD de la GDH, le  $\Delta E$  d'une valeur de 45 mV et le système attribué à la NQ est un  $\Delta E$  de 200 mV. Il est couramment supposé que le pic d'oxydoréduction attribué au couple FAD/FADH<sub>2</sub> correspond aux FAD inactives lors du processus de catalyse. La grande valeur du  $\Delta E$  observé pour la 1,4-NQ peut être expliquée par un transfert électronique lent entre l'espèce et l'électrode comme dans le cas de la GOx-

NQ. En présence de glucose (160 mmol.L<sup>-1</sup>) et sous argon, on observe une augmentation de la valeur du courant d'oxydation au niveau des pics rédox de la 1,4-NQ. Cette augmentation de courant de 12 mA correspond à la catalyse médiée entre la FADH<sub>2</sub> de la GDH et la 1,4-NQ.

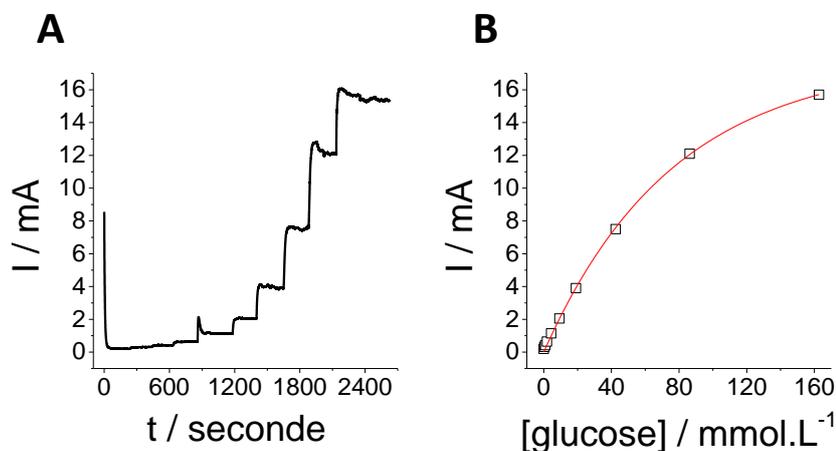


Figure II-14 : (A) Chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl de la bioanode MWCNTs/FADGDH/NQ en fonction des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans Mc Ilvaine pH7, RT. (B) Courbe d'étalonnage obtenue à partir des mesures de chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl suivant l'addition de glucose pour la bioanode

La courbe d'étalonnage (Figure II-14B) obtenue à partir de la CA, permet de déduire graphiquement le  $K_M^{app}$  d'une valeur de 53 mmol.L<sup>-1</sup>. On constate que la valeur du  $K_M^{app}$  est proche de la valeur du  $K_M$  de la FADGDH à 49,5 mmol.L<sup>-1</sup>. Si l'on compare au médiateur Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>, utilisé par Tsujimura, la valeur du  $K_M^{app}$  est de 65 mmol.L<sup>-1</sup> <sup>211</sup>. Ces valeurs peuvent s'expliquer par une faible affinité entre le site actif de la FADGDH et le médiateur, ou encore par la diffusion du substrat qui est plus ou moins facile dans notre compression.

#### II.4.2. Incorporation d'un médiateur rédox : la 1,10-phénanthroline-5,6-dione (PLQ)

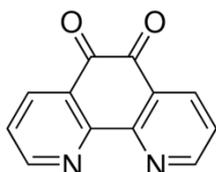
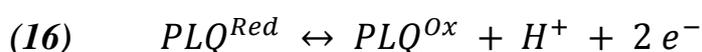


Figure II-15 : Structure chimique de la 1,10-phénanthroline-5,6-dione

Cette molécule est souvent utilisée dans les complexes de métaux de transition<sup>212</sup>. Ce composé est rédox actif en raison de la fonction quinonoïde et il se comporte comme une base de Lewis en raison de la présence des deux atomes d'azote diiminiques. Ce ligand a la capacité de former des complexes stables avec une grande variété d'ions métalliques. En outre, les complexes métalliques de ce ligand permettent potentiellement la variation et le contrôle des propriétés redox sur une large gamme.

Beaucoup d'études ont prouvé sa capacité à être un médiateur rédox pour l'oxydation de NADH<sup>213</sup>. En 2014, Ramanavivius *et al.*<sup>214</sup> ont utilisé cette molécule dans des biocapteurs à base de GOx et de graphite.



Puis, Reuillard *et al.*<sup>215</sup> l'ont associé à un complexe de ruthénium et l'ont utilisé comme médiateur rédox pour la GDH NAD-dépendante en vue de l'utiliser dans les biopiles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub>. En 2017, l'équipe de Cosnier a également élaboré une biopile enzymatique ayant comme anode un BP avec la FADGDH et la PLQ<sup>216</sup>. Cette biopile à base de BPs fournit une puissance de  $0,65 \pm 0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$ .

Les résultats précédents démontrent l'intérêt de l'utilisation d'un médiateur rédox au sein de la matrice tridimensionnelle afin de connecter efficacement la GOx. Cependant, le relargage du médiateur en solution est problématique. Ce facteur limite en effet les quantités de médiateurs pouvant être incorporées à l'électrode. La NQ s'est avérée être un médiateur d'intérêt pour la connexion indirecte de la GOx.

La PLQ présente une structure dérivée de la quinone, c'est pour cela qu'elle offre un grand intérêt. De plus, cette molécule a prouvé sa capacité d'être un bon médiateur rédox pour la GDH NAD-dépendante, de ce fait, la capacité de cette espèce à connecter la GOx et/ou la FADGDH a été évaluée par chronoampérométrie en présence de substrat.

L'objectif ici est de voir si cette espèce est capable de fixer un potentiel d'abandon le plus proche possible du couple FAD/FADH<sub>2</sub> tout en permettant une bonne catalyse d'oxydation du glucose dans un système de compression.

### II.4.2.1. La glucose oxydase

La réponse électrochimique de la bioanode GOx-PLQ en l'absence de glucose présente les systèmes rédox de la FAD à 0,43 V et de la PLQ à  $E_{1/2} = 0,0$  V. Concernant le système attribué à la PLQ, le  $\Delta E$  d'une valeur de 200 mV. Cette valeur élevée justifie que les espèces ne soient pas bien immobilisées mais bien confinées au sein de la structure 3D des nanotubes de carbone et que le transfert électronique soit lent entre l'espèce et l'électrode. En effet, la sonde rédox étant partiellement insoluble, il est possible que la réponse électrochimique de l'espèce non solvatée en milieu aqueux, et d'autant plus dans la nanostructure, ne soit pas un système infiniment rapide. En présence de glucose (200 mmol.L<sup>-1</sup>) et sous argon, on observe une augmentation de la valeur de courant d'oxydation au niveau des pics rédox de la PLQ. Cette augmentation de courant de 7 mA correspond à la catalyse médiée entre la FADH<sub>2</sub> de la GOx et la PLQ (Figure II-16).

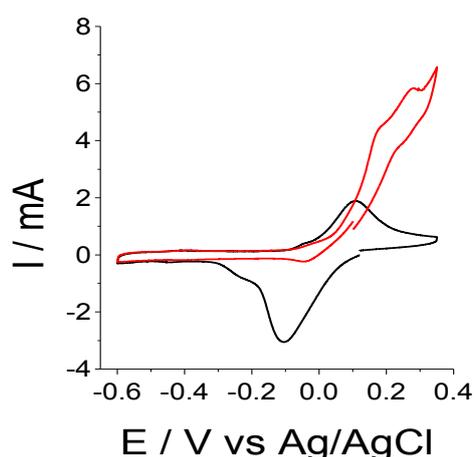


Figure II-16 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de la bioanode MWCNTs/GOx/PLQ sous argon (courbe noire) et sous argon avec  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  de glucose (courbe rouge) dans Mc Ilvaine, pH 7, RT

La Figure II-17A ci-dessous présente la CA à 0,2 V de la bioanode GOx-PLQ lors de l'ajout de quantité croissante de glucose. Une réponse catalytique d'oxydation est observée lorsque la concentration en glucose est supérieure à 1 mmol.L<sup>-1</sup>. L'ajout de quantité supérieure à 100 mmol.L<sup>-1</sup> n'induit pas une augmentation de courant. Ceci indique que l'activité de l'enzyme est maximale et correspond à un courant catalytique de 4,5 mA.

La courbe d'étalonnage (Figure II-17B) obtenue à partir de la CA, permet de déduire graphiquement le  $K_M^{app}$  d'une valeur de 141 mmol.L<sup>-1</sup>.

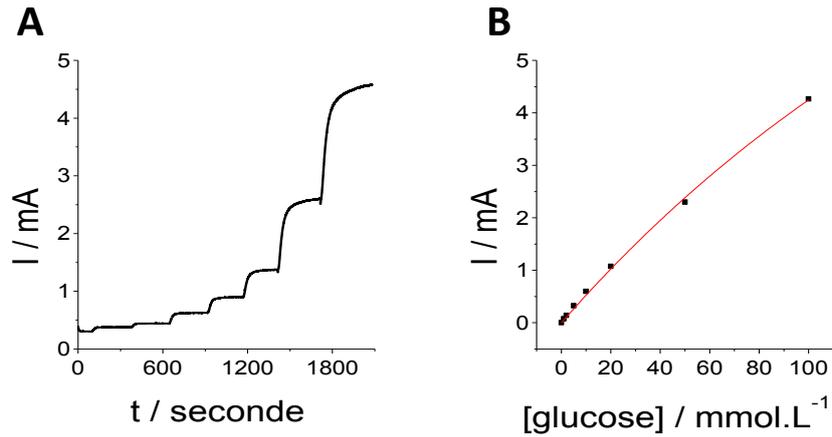


Figure II-17 : (A) Chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl de la bioanode MWCNTs/GOx/PLQ en fonction des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans Mc Ilvaine pH 7, RT. (B) Courbe d'étalonnage obtenue à partir des mesures de chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl suivant l'addition de glucose pour la bioanode

L'allure de la modélisation mathématique ne présente pas d'asymptote ce qui montre que le  $K_M^{app}$  est haut. La GOx a donc moins d'affinités pour le glucose dans ce système rédox.

#### II.4.2.2. La glucose déshydrogénase FAD-dépendante

La bioanode FADGDH-PLQ peut être caractérisée par voltampérométrie cyclique (CV) (Figure II-18) à très faible vitesse de balayage, 0,2 mV.s<sup>-1</sup>, afin de minimiser les courants capacitifs dus à la masse importante de CNTs utilisée lors la conception de l'électrode.

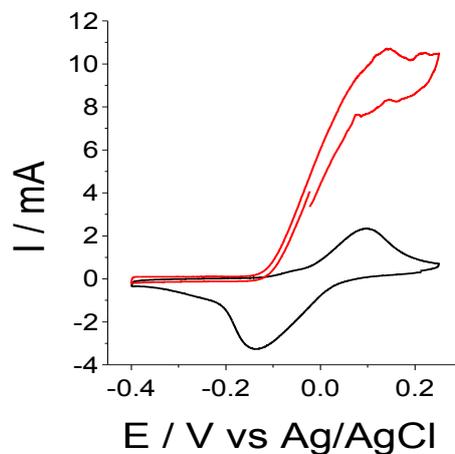


Figure II-18 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de la bioanode MWCNTs/FADGDH/PLQ sous argon (courbe noire) et sous argon avec 0,13 mol.L<sup>-1</sup> de glucose (courbe rouge) dans Mc Ilvaine, pH 7, RT

La réponse électrochimique de la bioanode FADGDH-PLQ en l'absence de glucose présente le système rédox réversible caractéristique correspondant à la PLQ à  $E_{1/2} = -0,02$  V. Concernant le système attribué à la PLQ, le  $\Delta E$  d'une valeur de 240 mV. Cette valeur élevée justifie que les espèces ne soient pas bien immobilisées mais bien confinées au sein de la structure 3D des nanotubes de carbone et que le transfert électronique soit lent entre l'espèce et l'électrode. En effet, la sonde rédox étant partiellement insoluble, il est possible que la réponse électrochimique de l'espèce non solvatée en milieu aqueux, et d'autant plus dans la nanostructure, ne soit pas un système infiniment rapide. En présence de glucose (130 mmol.L<sup>-1</sup>) et sous argon, on observe une augmentation de la valeur de courant d'oxydation au niveau des pics rédox de la PLQ. Cette augmentation de courant de 11 mA correspond à la catalyse médiée entre la FADH<sub>2</sub> de la FADGDH et la PLQ.

Cette bioanode a également été caractérisée par chronoampérométrie.

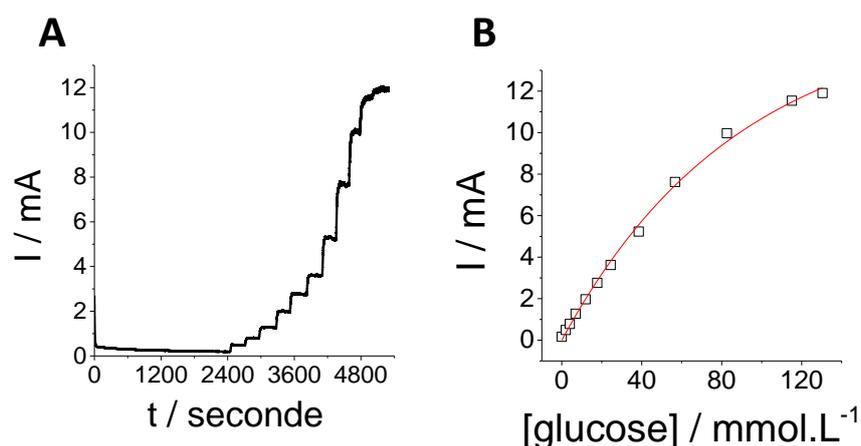


Figure II-19 : (A) Chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl de la bioanode MWCNTs/FADGDH/PLQ en fonction des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans Mc Ilvaine pH 7, RT. (B) Courbe d'étalonnage obtenue à partir des mesures de chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl suivant l'addition de glucose pour la bioanode

La Figure II-19A présente la CA à 0,2 V de la bioanode FADGDH-PLQ lors de l'ajout de quantité croissante de glucose. Une réponse catalytique d'oxydation est observée lorsque la concentration en glucose est supérieure à 2 mmol.L<sup>-1</sup>. L'ajout de quantité supérieure à 130 mmol.L<sup>-1</sup> n'induit pas une augmentation de courant. Ceci indique que l'activité de l'enzyme est maximale et correspond à un courant catalytique de 12 mA.

La courbe d'étalonnage (Figure II-19B) obtenue à partir de la CA, permet de déduire graphiquement le  $K_M^{app}$  d'une valeur de 61 mmol.L<sup>-1</sup>, valeur très proche de celle du Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>.

Cette valeur peut s'expliquer par une faible affinité entre le site actif de la FADGDH et le médiateur, ou encore par la diffusion du substrat qui est plus ou moins facile dans notre compression.

### II.4.3. Autres médiateurs

Les expériences ont été effectuées sur des disques de MWCNTs (35 mg) de 1,33 cm<sup>2</sup> de surface, comprenant 15 mg de GOx, 10 mg de Cat et 3 mmol de médiateur. L'un des avantages de cette technique est la conception d'électrodes ayant des surfaces d'échange avec le milieu plus importantes, les dimensions de ces bioélectrodes sont alors de 1,3 cm de diamètre et de 2 mm d'épaisseur.

Ces électrodes ont été utilisées uniquement dans le but de passer au crible une série de médiateurs afin de déterminer le plus compétitif en vue d'éventuelles modifications chimiques pour l'immobilisation de l'espèce rédox sur la surface de MWCNTs.

Les courants catalytiques ont été mesurés par chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl en fonction de l'addition de glucose jusqu'à saturation.

#### II.4.3.1. La 5-hydroxy-1,4-naphtoquinone (5-hydroxy-1,4-NQ) comme médiateur rédox pour la glucose oxydase

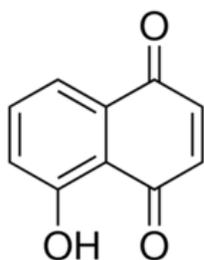
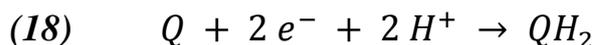


Figure II-20 : Structure chimique de la 5-hydroxy-1,4-naphtoquinone

Il existe une grande variété de structures de type « quinone » présentant des propriétés rédox proches et donc potentiellement intéressantes pour connecter la GOx, dont le système rédox peut être simplifié en :



Cette molécule est une structure dérivée de la naphthoquinone (NQ), c'est pour cela qu'un intérêt lui a été porté.

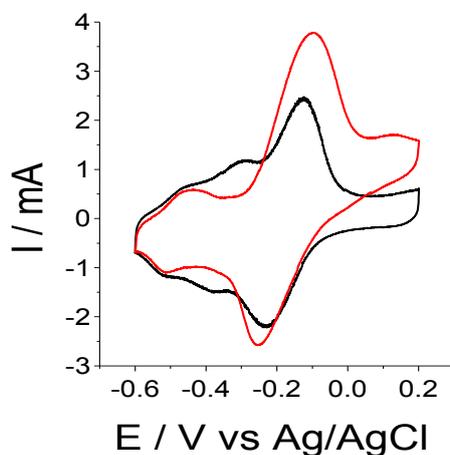


Figure II-21 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de la bioanode MWCNTs/GOx/5-hydroxy-1,4-NQ sous argon (courbe noire) et sous argon avec  $0,16 \text{ mol.L}^{-1}$  de glucose (courbe rouge) dans TP pH 7, RT

La réponse électrochimique de la bioanode GOx/5-hydroxy-1,4-NQ en l'absence de glucose présente les systèmes rédox réversibles caractéristiques correspondants à la FAD à  $E_{1/2} = -0,48 \text{ V}$  et la 5-hydroxy-1,4-NQ à  $E_{1/2} = -0,177 \text{ V}$  (Figure II-21). Concernant le système attribué à la FAD de la GOx, le  $\Delta E$  d'une valeur de 70 mV et le système attribué à la 5-hydroxy-1,4-NQ possède un  $\Delta E$  de 110 mV. La grande valeur du  $\Delta E$  observé pour la 5-hydroxy-1,4-NQ peut être expliquée par un transfert électronique lent entre l'espèce et l'électrode. En effet, la sonde rédox étant relativement insoluble, il est possible que la réponse électrochimique de l'espèce non solvatée en milieu aqueux, et d'autant plus dans la nanostructure, ne soit pas un système infiniment rapide. En présence de glucose ( $160 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) et sous argon, on observe une augmentation de la valeur de courant d'oxydation au niveau des pics rédox de la 5-hydroxy-1,4-NQ. Cette augmentation de courant de 1,8 mA correspond à la catalyse médiée entre la FADH<sub>2</sub> de la GOx et la 5-hydroxy-1,4-NQ.

Cette bioanode a également été caractérisée par chronoampérométrie.

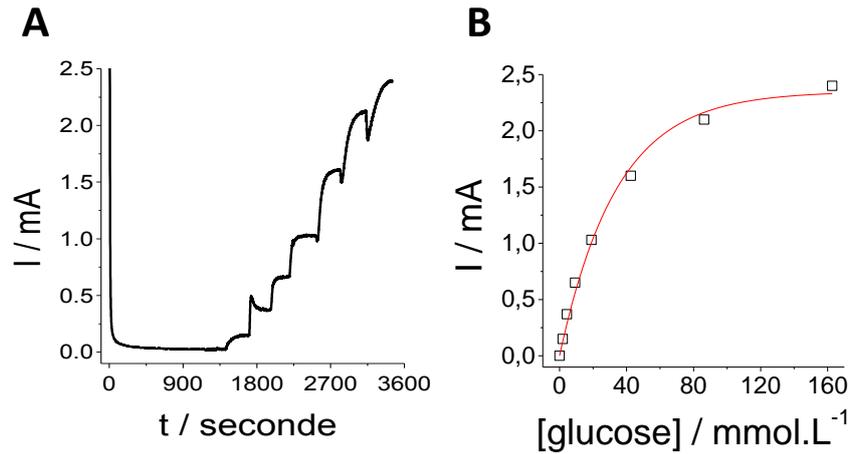


Figure II-22 : (A) Chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl de la bioanode MWCNTs/GOx/5-hydroxy-1,4-NQ en fonction des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans TP pH 7, RT. (B) Courbe d'étalonnage obtenue à partir des mesures de chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl suivant l'addition de glucose pour la bioanode

La Figure II-22A présente la CA à 0,2 V de la bioanode GOx/5-hydroxy-1,4-NQ lors de l'ajout de quantité croissante de glucose. Une réponse catalytique d'oxydation est observée lorsque la concentration en glucose est supérieure à 2 mmol.L<sup>-1</sup>. L'ajout de quantité supérieure à 160 mmol.L<sup>-1</sup> n'induit pas une augmentation de courant. Ceci indique que l'activité de l'enzyme est maximale correspondant à un courant catalytique de 2,3 mA.

La courbe d'étalonnage (Figure II-22B) obtenue à partir de la CA, permet de déduire graphiquement le  $K_M^{app}$  d'une valeur de 24 mmol.L<sup>-1</sup>.

Ce résultat est quasi similaire à la bioanode avec le médiateur 1,4-NQ. Même si le  $K_M^{app}$  est plus bas, la stabilité dans le temps de la bioanode GOx/1,4-NQ est plus importante c'est pour cela que la 1,4-NQ reste le médiateur préférentiel pour la GOx.

### II.4.3.2. Le ferrocène-méthanol (Fc-MeOH) comme médiateur rédox pour la glucose oxydase

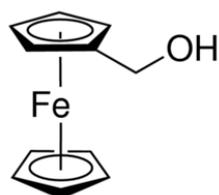


Figure II-23 : Structure chimique du ferrocène-méthanol

Cette molécule est une sonde rédox classiquement utilisée avec un transfert électronique rapide et quasi idéal. Celle-ci sert de référence pour de nombreuses études en électrochimie<sup>209</sup>. De ce fait, une étude a été réalisée afin de voir sa capacité à être un bon médiateur rédox pour l'oxydation du glucose avec la GOx.

La bioanode GOx/Fc-MeOH a pu être caractérisée par voltampérométrie cyclique (CV) (Figure II-24). En l'absence de glucose, on observe le système rédox caractéristique correspondant au Fc-MeOH à  $E_{1/2} = 0,33$  V et un  $\Delta E$  d'une valeur de 20 mV. Cette valeur est très faible justifiant que les espèces sont bien immobilisées au sein de la structure 3D des nanotubes de carbone. De plus, le transfert électronique est rapide entre l'espèce et l'électrode. En présence de glucose (200 mmol.L<sup>-1</sup>) et sous argon, on observe une augmentation de la valeur de courant d'oxydation au niveau des pics rédox du Fc-MeOH. Cette augmentation de courant de 13 mA correspond à la catalyse médiée entre la FADH<sub>2</sub> de la GOx et le Fc-MeOH.

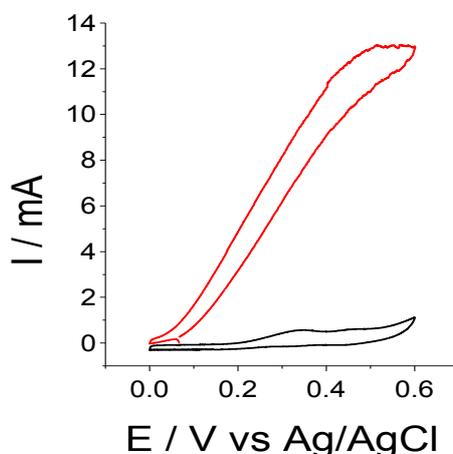


Figure II-24 : CVs ( $v = 0,2$  mV.s<sup>-1</sup>) de la bioanode MWCNTs/GOx/Fc-MeOH sous argon (courbe noire) et sous argon avec 0,2 mol.L<sup>-1</sup> de glucose (courbe rouge) dans TP pH 7, RT

La Figure II-25A présente la CA à 0,4 V de la bioanode GOx/Fc-MeOH lors de l'ajout de quantité croissante de glucose. Une réponse catalytique d'oxydation est observée lorsque la concentration en glucose est supérieure à 1 mmol.L<sup>-1</sup>. L'ajout de quantité supérieure à 200 mmol.L<sup>-1</sup> n'induit pas une augmentation de courant. Ceci indique que l'activité de l'enzyme est maximale, correspondant à un courant catalytique de 10,6 mA.

La courbe d'étalonnage (Figure II-25B) obtenue à partir de la CA, permet de déduire graphiquement le  $K_M^{app}$  d'une valeur de 45 mmol.L<sup>-1</sup>. Cette valeur peut s'expliquer par une faible affinité entre le site actif de la GOx et le médiateur, ou encore par la diffusion du substrat qui est plus ou moins facile dans notre compression.

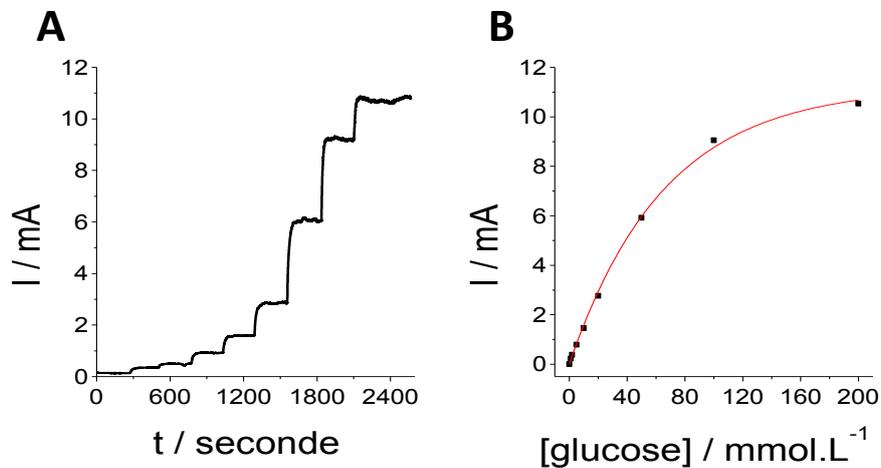


Figure II-25 : (A) Chronoampérométrie à 0,4 V vs. Ag/AgCl de la bioanode MWCNTs/GOx/Fc-MeOH en fonction des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans TP pH 7, RT. (B) Courbe d'étalonnage obtenue à partir des mesures de chronoampérométrie à 0,4 V vs. Ag/AgCl suivant l'addition de glucose pour la bioanode

Les courants catalytiques obtenus en CV et en CA à saturation de glucose sont similaires. Cette bioanode propose un courant catalytique très élevé mais un potentiel de circuit ouvert trop haut pour une bioanode ce qui représente un très gros désavantage pour les applications recherchées. En effet, on cherche à avoir une f.e.m la plus grande possible, or avec cette bioanode celle-ci sera trop petite, environ 0,3 V si on l'associe à la biocathode BOD par exemple.

### II.4.3.3. Des nanoparticules de ZnO fonctionnalisées avec du ferrocène (ZnO-Fc) comme médiateur rédox pour la glucose oxydase

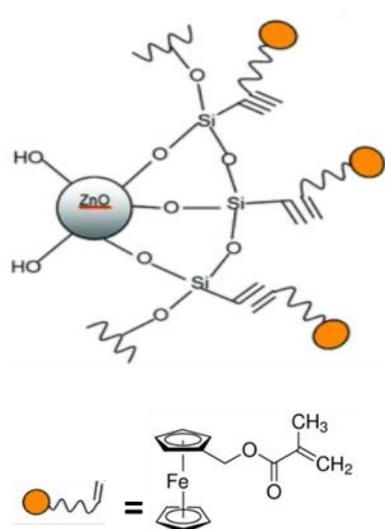


Figure II-26 : Structure chimique des nanoparticules ZnO fonctionnalisées avec un dérivé ferrocène

Haddad *et al.* ont décrit la synthèse de ces nanoparticules<sup>217</sup>. Ces nanoparticules sont intéressantes car elles ont été fonctionnalisées par un dérivé de ferrocène qui est intéressant dans le domaine de l'électrochimie.

La bioanode GOx/ZnO-Fc a pu être caractérisée par voltampérométrie cyclique (CV) (Figure II-27).

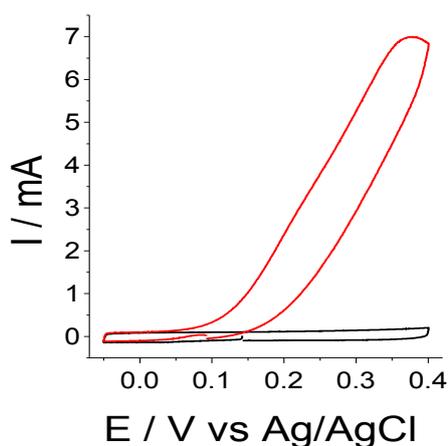


Figure II-27 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) de la bioanode MWCNTs/GOx/ZnO-Fc sous argon (courbe noire) et sous argon avec  $0,16 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucose (courbe rouge) dans TP pH 7, RT

En l'absence de glucose, on observe principalement le courant capacitif des nanotubes de carbone. En présence de glucose (160 mmol.L<sup>-1</sup>) et sous argon, on observe une augmentation de la valeur de courant d'oxydation au niveau des pics rédox des nanoparticules ZnO-Fc. Cette augmentation de courant de 7 mA correspond à la catalyse médiée entre la FADH<sub>2</sub> de la GOx et les nanoparticules ZnO-Fc. Par ailleurs, le potentiel rédox de ce médiateur est trop haut pour pouvoir envisager de réelles applications. En effet, il faudrait une f.e.m la plus grande possible, donc un potentiel rédox anodique dans des valeurs négatives.

		1,4-NQ	PLQ	5-hydroxy-1,4-NQ	Fc-MeOH	ZnO-Fc
GOx	E <sub>1/2</sub> vs. Ag/AgCl (V)	-0,17	0,0	-0,18	0,33	0,18
	i <sub>max</sub> (mA)	2,5	4,5	2,3	10,6	7
FADGDH	E <sub>1/2</sub> vs. Ag/AgCl (V)	-0,15	-0,02	/	/	/
	i <sub>max</sub> (mA)	12	11	/	/	/

Tableau II-1 : Tableau récapitulatif des médiateurs testés avec la GOx et la FADGDH et les valeurs de E<sub>1/2</sub> et i<sub>max</sub> obtenues

Le Tableau II-1 ci-dessus résume les médiateurs utilisés pour la bioanode avec la GOx ou la FADGDH ainsi que les valeurs de E<sub>1/2</sub> et de i<sub>max</sub> obtenues. Concernant la GOx, la 1,4-NQ reste le médiateur préférentiel car son E<sub>1/2</sub> se rapproche au plus de celui du couple FAD/FADH<sub>2</sub> (-0,44 V). De plus, le courant i<sub>max</sub> obtenu est satisfaisant, ainsi que la stabilité de ce médiateur dans notre compression. Pour la FADGDH, la 1,4-NQ est également le médiateur préférentiel parmi les deux étudiés.

Les valeurs de nos K<sub>M</sub><sup>app</sup> sont assez proches les unes des autres et faibles (valeurs entre 24 et 141 mmol.L<sup>-1</sup>) avec les différents médiateurs utilisés ce qui montre que les enzymes GOx et FADGDH ont une grande affinité pour leur substrat, et qu'elles sont peu influencées par les changements de concentrations.

## II.5. Cathodes 3D à bases d'enzymes à cuivre

### II.5.1. Réduction du dioxygène par les oxydases multi cuivres

La plupart des biocathodes réduisant l'oxygène dans la recherche sur les biopiles enzymatiques contiennent des enzymes de la famille des multicopper oxydases (MCO). Ces enzymes ont un ensemble de quatre centres de cuivre. Un centre de cuivre mononucléaire T1 est responsable du transfert d'électrons entre le substrat, ou la surface d'électrode, et un groupe de cuivre trinuécléaire de type 2/type 3 (appelé TNC) où l'oxygène est réduit en eau (Figure II-28). Les récentes études dans la fabrication de bioélectrodes à base de MCO reposent sur l'orientation contrôlée de ces enzymes.

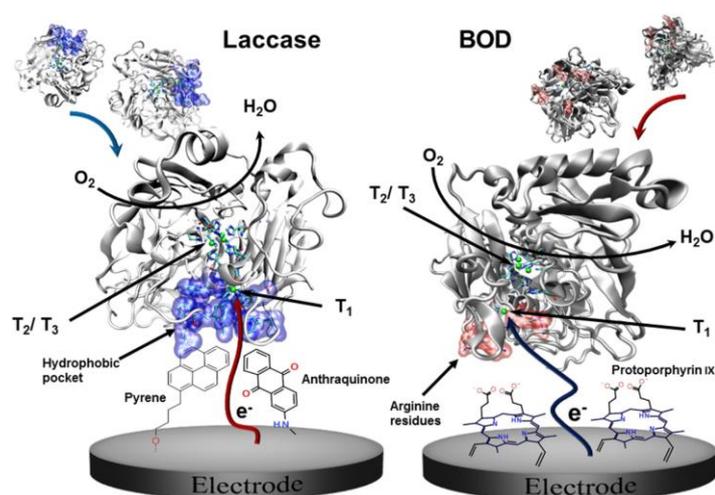


Figure II-28 : Présentation schématique de l'orientation de la Lac et de la BOD pour la réduction de l'oxygène<sup>96</sup>

Le centre cuivre T1 des MCO est responsable de la liaison entre le substrat phénolique et le transfert d'électrons subséquent avec le centre cuivre T2/T3 où l'oxygène est activé et réduit<sup>70,218</sup>. Comme cette unité T1 est située près de la surface de la protéine, des stratégies ont été employées pour favoriser l'orientation des enzymes et pour raccourcir la distance entre l'électrode et le centre T1. L'étude s'est principalement focalisée sur ces deux enzymes, la laccase de *Trametes versicolor* et la bilirubine oxydase de *Myrothecium verrucaria*.

## II.5.2. Biocathodes nanostructurées à base d'oxydases multicuivres en transfert direct

### II.5.2.1. Biocathode à base de laccase

Comme dans le cas des bioanodes, la Laccase de *Trametes versicolor* (15 mg) et les MWCNTs (35 mg) sont mixés afin d'obtenir une pâte composite qui est ensuite compressée pour donner la bioélectrode sous forme d'un disque de MWCNTs de 1,3 cm de diamètre et 0,2 cm d'épaisseur.

Les performances de la biocathode ont dans un premier temps été étudiées par CV pour suivre l'activité catalytique de la laccase vis-à-vis de la réduction du dioxygène à pH 5 ainsi qu'à pH 7 (Figure II-29).

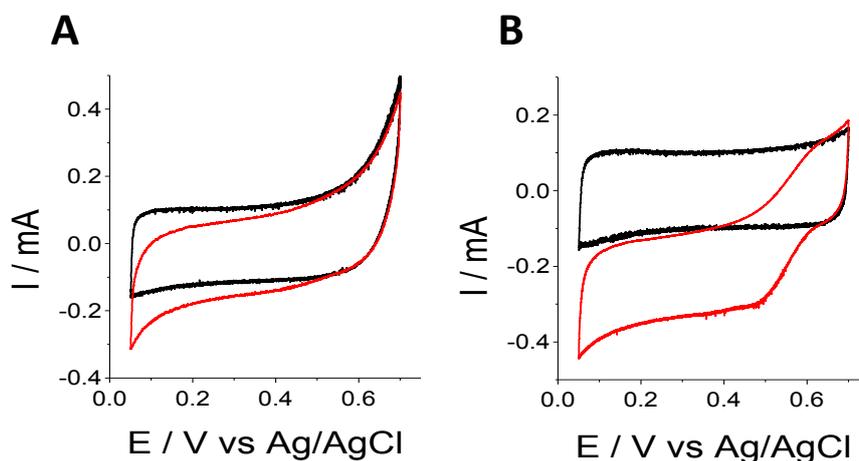


Figure II-29 : (A) CVs de la biocathode MWCNTs/Lac sous argon (courbe noire) et sous bullage d'oxygène (courbe rouge) dans TP 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7, RT ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) (B) CVs de la biocathode MWCNTs/Lac sous argon (courbe noire) et sous bullage d'oxygène (courbe rouge) dans TP 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 5, RT ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ )

Les mesures de CV sont réalisées à faibles vitesses de balayage ( $0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) pour atténuer la contribution de la composante capacitive du composite MWCNTs/Lac. La CV réalisée à pH 7 (Figure II-29A) montre également, en présence de dioxygène, l'apparition d'une vague de réduction électrocatalytique du dioxygène débutant à 0,5 V. En particulier, la stabilisation du courant de réduction est bien moindre qu'à pH 5. Sur la CV effectuée à pH 5 (B), en présence de dioxygène, une vague de réduction catalytique apparaît à 0,55 V, ce qui est très proche des

valeurs théoriques pour le site Cu mononucléaire T1 observées dans la littérature<sup>219</sup>. La catalyse est plus importante que celle observée à pH 7.

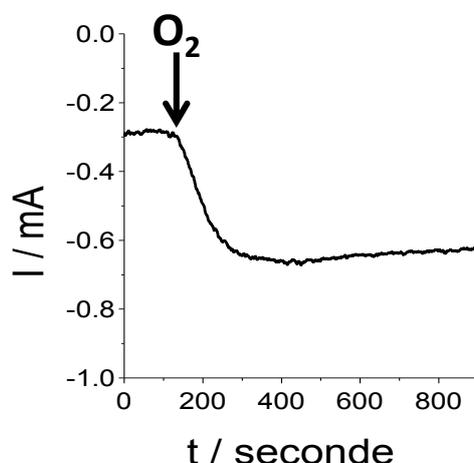


Figure II-30 : Chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl de la biocathode MWCNTs/Lac avec ajout d'un bullage de dioxygène dans TP 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 5, à RT

En parallèle, une chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl à pH 5 a été opérée. Après le bullage d'oxygène dans la cellule, le courant cathodique passe de -0,3 mA à -0,65 mA en quelques minutes (Figure II-30). Néanmoins, le courant est du même ordre de grandeur que celui observé par CV.

#### II.5.2.2. Biocathode à base de bilirubine oxydase en transfert direct

Le processus de fabrication de cette biocathode est similaire au mode opératoire décrit précédemment pour la bioanode. La Bilirubine oxydase de *Myrothecium verrucaria* (15 mg) et les MWCNTs fonctionnalisés ou non (35 mg) sont mixés afin d'obtenir une pâte composite qui est ensuite compressée pour donner la bioélectrode sous forme d'un disque de MWCNTs de 1,3 cm de diamètre et 0,2 cm d'épaisseur.

Les performances de la biocathode avec l'enzyme orientée ou non par la PP IX ont dans un premier temps été étudiées par CV pour suivre l'activité catalytique de la BOD vis-à-vis de la réduction du dioxygène à pH 7.

### II.5.2.2.a. Enzyme non orientée

Les mesures de CV sont réalisées à faibles vitesses de balayage ( $0,2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) pour atténuer la contribution de la composante capacitive du composite MWCNTs/BOD.

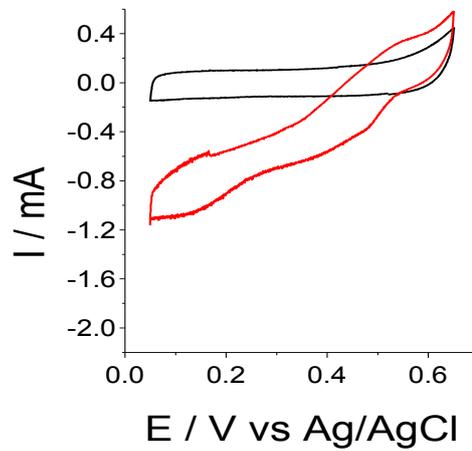


Figure II-31 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) de la biocathode MWCNTs/BOD sous argon (courbe noire) et sous oxygène (courbe rouge) dans Mc Ilvaine pH 7, RT

La CV réalisée à pH 7 (Figure II-31) montre en présence de dioxygène, l'apparition d'une vague de réduction électrocatalytique du dioxygène débutant à 0,52 V. La stabilisation du courant de réduction est moindre, c'est-à-dire, qu'il n'y a pas l'apparition d'un plateau.

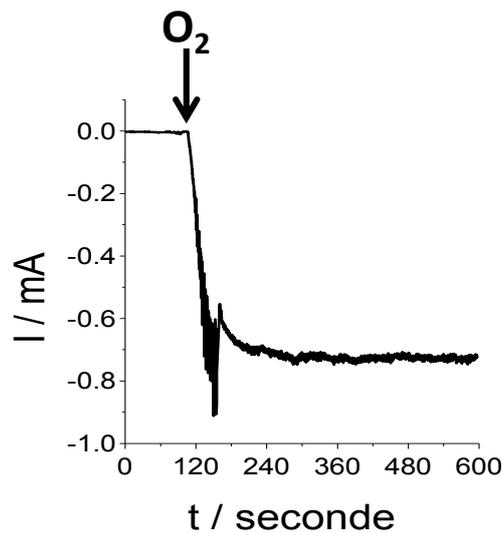


Figure II-32 : Chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl de la biocathode MWCNTs/BOD avec ajout d'un bullage de dioxygène dans Mc Ilvaine pH 7, à RT

En parallèle, une chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl à pH 7 a été opérée. Après le bullage d'oxygène dans la cellule, le courant cathodique passe de 0 mA à -0,7 mA en quelques secondes (Figure II-32). Néanmoins, le courant est du même ordre de grandeur que celui observé par CV.

#### II.5.2.2.b. Orientation de l'enzyme grâce à la protoporphyrine IX

---

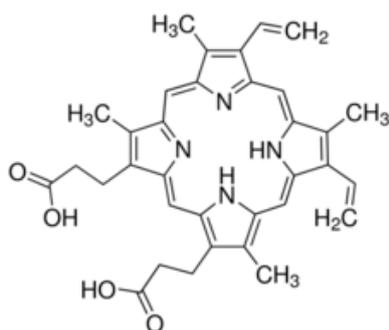


Figure II-33 : Structure chimique de la protoporphyrine IX

Des macrocycles aromatiques, telles que les porphyrines ont montré leur capacité à interagir avec les nanotubes de carbone par  $\pi$ -stacking afin de former des matériaux hybrides<sup>220</sup>. De ce fait, des MWCNTs ont été fonctionnalisés par la protoporphyrine IX (PP IX) afin d'observer leur capacité à immobiliser et orienter de façon préférentielle la *Mv*BOD. En effet, la PP IX possède une structure très proche du tétrapyrrole linéaire, substrat naturel de l'enzyme. Pour fonctionnaliser les MWCNTs, un montage à reflux a été mis en place avec un mélange de MWCNTs, PP IX et DMF. L'ensemble a été porté à 80 °C durant une nuit. Après filtration et de multiples rinçages à l'eau, les MWCNTs fonctionnalisés par la PP IX ont été obtenus.

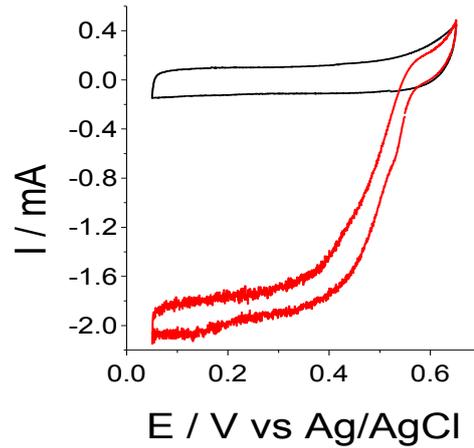


Figure II-34 : CVs ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) de la biocathode MWCNTs-PP IX/BOD sous argon (courbe noire) et sous oxygène (courbe rouge) dans Mc Ilvaine pH 7, RT

Les CVs de la bioélectrode ont été effectuées dans du tampon saturé en argon puis en oxygène (Figure II-34). Sous argon, on observe uniquement le courant capacitif des nanotubes. Sous oxygène, l'électrode catalyse la réduction du dioxygène à un potentiel de départ de 0,57 V vs. Ag/AgCl. On observe que cette catalyse est bien plus efficace avec les nanotubes fonctionnalisés. Un courant catalytique de -2 mA est observé à 0,05 V vs. Ag/AgCl. De plus, on peut voir que l'allure de la CV est proche d'un plateau ce qui justifie bien l'orientation par interactions électrostatiques entre la PP IX et la BOD et plus précisément des interactions  $\pi$ - $\pi$  entre la PP IX et les CNTs, montrant ainsi l'immobilisation préférentielle de l'enzyme.

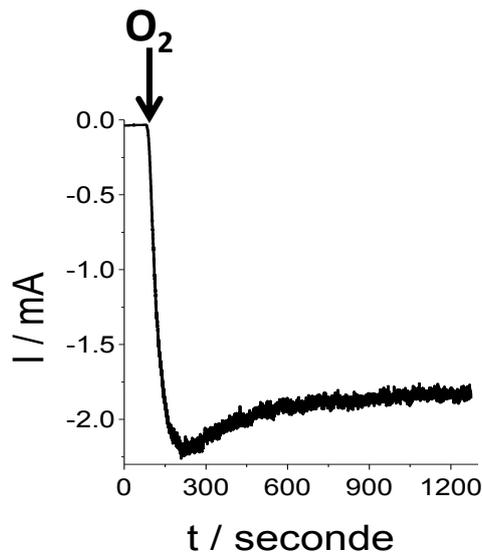


Figure II-35 : Chronoampérométrie à 0,2 V vs. Ag/AgCl de la biocathode MWCNTs-PP IX/BOD avec ajout d'un bullage de dioxygène dans TP 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7, à RT

Dans l'analyse par CA, après le bullage d'oxygène dans la cellule, le courant cathodique passe de 0 mA à -1,8 mA en quelques minutes (Figure II-35). Ce courant obtenu est du même ordre de grandeur que celui observé par CV et quasiment 3 fois plus important que pour la biocathode avec l'enzyme non orientée.

Pour la suite des expériences, lors de l'utilisation de la BOD, celle-ci sera toujours orientée par la PP IX.

## II.6. Cathode MWCNTs/Peroxydase en transfert direct

La Figure II-36 présente la courbe d'étalonnage de la biocathode HRP lors de l'ajout de quantité croissante de peroxyde d'hydrogène. Une réponse catalytique d'oxydation du peroxyde d'hydrogène en eau est observée. L'ajout de quantité supérieure à 300 mmol.L<sup>-1</sup> n'induit pas une augmentation de courant. Ceci indique que l'activité de l'enzyme est maximale, correspondant à un courant catalytique de 350 µA.

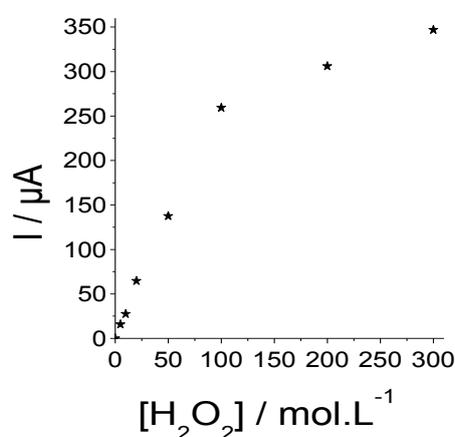


Figure II-36 : CA à 0,7 V vs. Ag/AgCl de la biocathode MWCNTs/HRP en fonction des ajouts de concentrations croissantes en peroxyde d'hydrogène dans Mc Ilvaine pH 7, RT

Cette biocathode a été étudiée en vue de la combiner avec la bioanode GOx-NQ dans notre biopile à flux de combustible qui sera décrit dans le Chapitre III ci-dessous. En effet, cette biocathode fonctionnera grâce à la consommation du peroxyde d'hydrogène formé par la bioanode, qui s'avère mauvais pour l'implantation. Cette biopile fonctionnera avec 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose donc 5 mmol.L<sup>-1</sup> de peroxyde d'hydrogène sera généré au maximum. De ce fait, notre biocathode sera limitante.

## II.7. Caractérisation des biopiles enzymatiques en cellule électrochimique

### II.7.1. Biopile GO<sub>x</sub>-NQ/Lac

Ces bioélectrodes sous forme de pastilles ont le grand avantage de fournir un réseau dense de CNTs permettant une connexion d'une grande quantité d'enzymes. De plus, la structure de la pastille fournit des ressources élevées pour des expériences à long terme<sup>67</sup>. Pour ce même système, la densité de puissance maximale a été obtenue à 50 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose sous oxygène, atteignant 1,54 mW.cm<sup>-2</sup><sup>139</sup>.

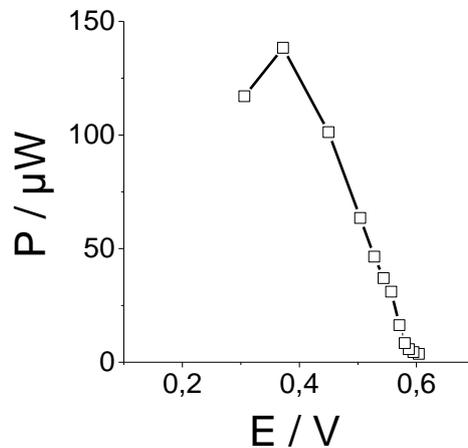


Figure II-37 : Courbe de puissance pour la biopile GO<sub>x</sub>-NQ/Lac effectuée dans un TP pH 5 contenant 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose

Ici, la densité de puissance et le fonctionnement de cette GBFC ont été mesurés dans un Tampon phosphate pH 5 contenant 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose. Dans ces conditions, la GBFC présente une puissance de l'ordre de 150 μW (Figure II-37). La puissance obtenue n'est pas très élevée. En effet, le pH n'est pas optimal pour la bioanode et la concentration en glucose est faible. Pour les applications recherchées, dans un système physiologique, la laccase à la biocathode s'est avérée ne pas être la meilleure option.

### II.7.2. Biopile GO<sub>x</sub>-NQ/BOD orientée par MWCNTs-PP IX

Cette biopile représente le système dont les bioélectrodes fonctionnent et présentent une activité maximale dans des conditions pH identiques, à pH 7. Pour cette étude, il a été choisi

de regarder la puissance de la biopile à 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose afin d'être dans un système pseudo-physiologique.

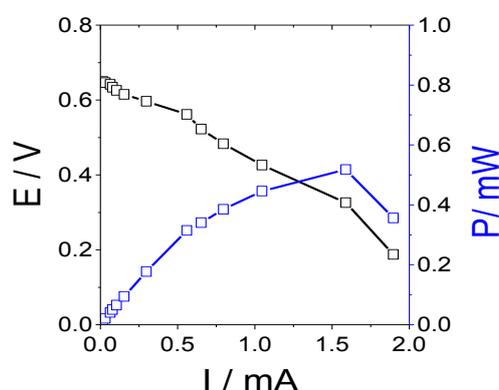


Figure II-38 : Courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir) pour la biopile GOx-NQ/BOD orientée par la PP IX à 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose dans Mc Ilvaine pH 7. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 1,9 mA

La Figure II-38 montre les performances de la biopile GOx-NQ/BOD orientée. L'OCV de cette biopile est de 0,65 V ce qui est très proche de la précédente biopile. Une puissance de l'ordre de 0,5 mW est obtenue (0,31 V et 1,6 mA). Si l'on compare cela à la biopile GOx-NQ/Lac, les performances ont été triplées alors que l'on a 10 fois moins de glucose en solution. Cette biopile présente donc une très bonne alternative à l'implantable ou à l'alimentation d'un appareil nomade. Une étude approfondie du design de cette biopile et de la mise en série et/ou en parallèle de celle-ci fera l'objet de la suite de cette thèse.

## II.8. Conclusion du chapitre II

Dans la première partie du chapitre, l'élaboration d'une bioanode nanostructurée MWCNTs/enzyme basée sur la connexion indirecte de la GOx ou FADGDH avec un médiateur rédox, la NQ, a été décrite. Cette NQ, possède un potentiel rédox idéalement placé et une faible solubilité en milieu aqueux, ce qui a permis d'obtenir de bons courants anodiques de l'ordre de 2,5 mA pour la GOx, contre 16 mA pour la FADGDH. Cette partie a été conclue par une ouverture sur l'utilisation d'autres médiateurs rédox dont les propriétés ont été évaluées à partir de bioélectrodes constituées toujours d'un composite MWCNTs/enzyme (GOx ou FADGDH) : la 1,10-phenanthroline-5,6-dione, des

nanoparticules ZnO-Fc, le ferrocène-méthanol, la 5-hydroxy-1,4-naphtoquinone. En effet ces médiateurs ont permis l'obtention de très forts courants anodiques avec des potentiels d'abandon proches de la NQ respectivement.

La seconde partie était centrée sur la connexion directe d'enzymes à cuivre pour la fabrication de biocathode CNTs 3D. Les deux enzymes, Laccase et Bilirubine oxydase ont été intégrées à la matrice MWCNTs et connectées avec succès donnant accès à des courants de catalyses de réduction de l'oxygène. Chaque système (Lac ou BOD) a démontré des avantages et des inconvénients. La Laccase qui donne de meilleures performances à pH acide (pH = 5) a le désavantage d'être bien moins active en condition physiologique. Par ailleurs, la BOD qui elle reste active même en condition physiologique donne quant à elle des performances intéressantes et meilleures que celles de la Lac avec un  $i_{\max}$  de 1 mA lorsqu'elle n'est pas orientée. La fonctionnalisation des MWCNTs par la protoporphyrine IX a permis d'orienter préférentiellement l'enzyme sur l'électrode et on a donc pu obtenir de meilleurs courants catalytiques ( $i = 2$  mA).

La troisième partie s'est axée sur la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau *via* l'utilisation de la HRP en connexion directe. Cette enzyme est intéressante pour l'application implantable d'une biopile GOx/HRP. En effet, le peroxyde d'hydrogène qui sera produit par l'anode pourra être consommé par la cathode. De plus, les performances de cette cathode ne sont pas négligeables ainsi que son potentiel.

La quatrième partie a consisté à combiner la bioanode GOx-NQ avec les biocathodes Lac et BOD orientée par la PP IX, soit les performances des biopiles GOx-NQ/Lac et GOx-NQ/BOD orientée. Les f.e.m de chaque biopile sont très proches, 0,6 V contre 0,65 V, puisque les anodes sont les mêmes et l'enzyme de la cathode change. On constate que même en étant au pH préférentiel de la Laccase, les performances de la biopile GOx-NQ/Lac sont 3 fois plus faibles que pour la biopile GOx-NQ/BOD orientée.



**CHAPITRE III. CONCEPT  
D'ASSEMBLAGE DE BIOPILES  
ENZYMATIQUES DANS UN  
SYSTEME A FLUX POUR  
L'ALIMENTATION  
D'APPAREILS NOMADES**

<b>CHAPITRE III. CONCEPT D'ASSEMBLAGE DE BIOPILES ENZYMATIQUES DANS UN SYSTEME A FLUX POUR L'ALIMENTATION D'APPAREILS NOMADES .....</b>	<b>99</b>
<b>III.1. Introduction .....</b>	<b>102</b>
<b>III.2. Principe de fabrication des biopiles enzymatiques.....</b>	<b>103</b>
III.2.1. Biopiles GO <sub>x</sub> -NQ/BOD orientée et GO <sub>x</sub> -PLQ/BOD.....	104
III.2.2. Biopiles FADGDH-NQ/BOD et FADGDH-PLQ/BOD.....	106
III.2.3. Biopile GO <sub>x</sub> -NQ/HRP .....	107
<b>III.3. Performances des biopiles enzymatiques .....</b>	<b>108</b>
III.3.1. Biopile GO <sub>x</sub> -NQ/BOD .....	108
III.3.2. Biopile GO <sub>x</sub> -PLQ/BOD .....	111
III.3.3. Biopile FADGDH-NQ/BOD .....	112
III.3.4. Biopile FADGDH-PLQ/BOD .....	112
III.3.5. Biopile GO <sub>x</sub> -NQ/HRP .....	113
<b>III.4. Stabilité en fonctionnement des biopiles enzymatiques .....</b>	<b>114</b>
III.4.1. Stabilité de la biopile GO <sub>x</sub> -NQ/BOD.....	114
III.4.2. Stabilité de la biopile GO <sub>x</sub> -NQ/HRP .....	117
<b>III.5. Etude de l'influence du débit de solution de glucose.....</b>	<b>118</b>
III.5.1. Biopile GO <sub>x</sub> -PLQ/BOD .....	118
III.5.2. Biopile GO <sub>x</sub> -NQ/HRP .....	119
<b>III.6. Mise en série et/ou en parallèle de biopiles enzymatiques .....</b>	<b>120</b>
III.6.1. Biopiles GO <sub>x</sub> -NQ/BOD.....	120
III.6.2. Biopiles GO <sub>x</sub> -NQ/HRP .....	122
<b>III.7. Alimentation d'un minuteur à l'aide de deux biopiles GO<sub>x</sub>-NQ/BOD connectées en série.....</b>	<b>123</b>
<b>III.8. Vers l'alimentation d'un appareil à usage unique.....</b>	<b>125</b>
III.8.1. Test d'ovulation digital Clearblue .....	126
III.8.1.1. Caractérisation d'un test d'ovulation avec sa pile lithium CR1220 d'origine .....	126
III.8.1.2. Alimentation directe du test d'ovulation à partir de 5 biopiles GO <sub>x</sub> -NQ/BOD en série.....	128
III.8.2. Test de grossesse digital Clearblue avec estimation de l'âge de la grossesse ....	129

III.8.2.1. Caractérisation d'un test de grossesse avec ses 2 piles Zn/MnO <sub>2</sub> LR41 d'origines .....	130
III.8.2.2. Alimentation directe du test de grossesse à partir de 5 biopiles GOx- NQ/BOD en série.....	131
<b>III.9. Alimentation d'un capteur de température à l'aide d'un circuit électronique associé aux biopiles enzymatiques .....</b>	<b>132</b>
III.9.1. L'Unité de Gestion de l'Energie (UGE).....	132
III.9.2. Alimentation du capteur de température.....	137
<b>III.10. Conclusion du chapitre III.....</b>	<b>142</b>

### III.1. Introduction

Ce chapitre présente une invention donnant lieu à un brevet national déposé durant la thèse concernant une pile à biocombustible ainsi qu'un assemblage comprenant au moins deux piles à biocombustible<sup>221</sup>. Le glucose est une des sources d'énergie les plus importantes de nombreux organismes vivants et peut être considéré comme un combustible sûr, facile à manipuler et même consommable.

Dans ce contexte, les GBFCs sont étudiées pour produire de l'énergie à partir des fluides corporels puisqu'ils contiennent à la fois du glucose et de l'oxygène, c'est-à-dire un combustible et un oxydant, respectivement. En tant que telles, les GBFCs offrent la perspective exotique de fournir une alimentation en puissance autonome pour des dispositifs électroniques implantables dans le corps humain. A cet égard, d'importants défis sont à surmonter avant de pouvoir mettre en pratique commerciale les GBFCs.

En particulier, les GBFCs doivent être de très petite taille. Elles doivent également permettre un accès optimisé du biocombustible et de l'oxydant aux électrodes. Ainsi, l'invention vise à résoudre le problème de la fourniture d'une pile à biocombustible, en particulier de très petite taille pour qu'elle soit implantable dans le corps humain, mais surtout avec un accès optimisé du biocombustible et de l'oxydant aux électrodes, pour produire le maximum d'énergie et qui, de plus, puisse être utilisée en un assemblage de plusieurs piles à biocombustibles, pour produire une énergie durable et renouvelée.

Ainsi, d'une manière générale, l'invention vise à résoudre le problème de la fabrication aisée des piles à biocombustible et leur intégration dans des circuits sophistiqués dans lesquels non seulement les densités de courant produites sont élevées mais également la tension délivrée est suffisante pour faire fonctionner un dispositif tel qu'un pacemaker ou un moteur électrique. En effet, alors que les densités de courant des piles à biocombustible sont prometteuses, la tension fournie par une pile individuelle n'est pas suffisante pour faire fonctionner un dispositif.

Szczupak *et al.* ont proposé de connecter plusieurs piles à biocombustible glucose entre elles, en parallèle et en série, respectivement<sup>54</sup>. Les assemblages obtenus pouvaient suffisamment charger un condensateur qui actionnait un moteur électrique de façon à ce qu'il tourne pendant une rotation d'un quart de tour (moins d'une seconde). En une heure, une sortie d'énergie de 28,8 mJ (environ 8 mW.h) pouvait être accumulée.

MacVittie *et al.* ont décrit la connexion de deux biopiles sur deux homards utilisant des bioélectrodes à base de buckypaper et ont démontré la possibilité de faire fonctionner une montre pendant plus d'une heure<sup>56</sup>. Dans ces travaux, plusieurs configurations ont été testées pour connecter les deux piles à biocombustible en série dans un homard, dans son dos et sur ses pinces, pour atteindre la tension nécessaire. Cependant, la faible impédance des tissus corporels des homards a empêché l'obtention de la sortie de tension voulue. D'autre part, il n'est pas réaliste de connecter deux ou plus organismes individuels pour fournir une puissance suffisante pour faire fonctionner un dispositif.

Pour surmonter tous ces problèmes, l'invention propose un modèle de pile à biocombustible qui peut être reliée à une ou plusieurs autres piles à biocombustible, sans le besoin de condensateur ou de convertisseur et qui puisse fonctionner sur des périodes de temps étendues, en fournissant une tension de sortie suffisante pour faire fonctionner des dispositifs, éventuellement implantés dans le corps d'organismes vivants. De préférence, dans cet assemblage selon l'invention, les piles à biocombustible sont reliées électriquement entre elles, en série et/ou en parallèle.

### III.2. Principe de fabrication des biopiles enzymatiques

Un schéma complet de la conception des biopiles enzymatiques est représenté sur la Figure III-1.

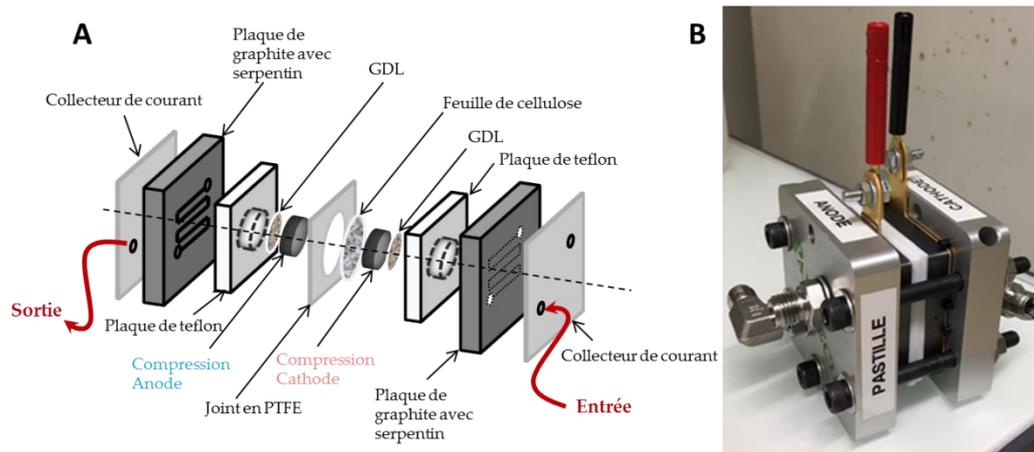


Figure III-1 : Schéma (A) et photo (B) de la cellule utilisée pour une biopile enzymatique à flux individuelle. Les insertions dans le schéma représentent les composants utilisés pour le bioanode et la biocathode. Les flèches rouges montrent le sens d'écoulement de la solution de glucose dans le système

Les biopiles enzymatiques ont été conçues selon deux configurations. Pour la première configuration, la conception d'une biopile à flux a été développée à partir d'une cellule commerciale Paxitech® (Figure III-1B) dédiée aux tests de pile à combustible de type PEMFC (Polymer Electrolyte Membrane Fuel Cell). Celle-ci comporte deux plaques monopolaires en graphite de surface active 5 cm<sup>2</sup> dans lesquelles sont usinés des serpentins permettant la distribution du flux gazeux. Notre idée a été d'utiliser ces serpentins pour le flux de solution et la gestion du débit d'air. Deux blocs de PTFE de 3 mm d'épaisseur ont été réalisés avec un trou central de diamètre 13 mm. Une GDL microporeuse est placée à l'arrière de chaque bloc PTFE pour servir de collecteur d'électrons tout en assurant la diffusion de l'oxygène et de la solution de glucose. La pastille de CNT-enzyme est réalisée par compression directe dans la cavité de 13 mm en contact avec la GDL. La face accessible de la pastille est alors recouverte d'une feuille de cellulose jouant le rôle de réservoir d'électrolyte efficace. Un film PTFE d'épaisseur 127 µm avec un trou de 13 mm est placé entre la bioanode et la biocathode comme joint pour éviter toute fuite. En contact en face arrière des GDL de chaque bioélectrode, une plaque de graphite avec des serpentins gravés et des trous d'entrée et de sortie, ainsi qu'une plaque en laiton pour le collecteur de courant final, ont été assemblées pour finaliser la conception de cette biopile enzymatique à glucose-O<sub>2</sub>. Pour un fonctionnement standard, une pompe péristaltique a été utilisée pour faire circuler la solution aqueuse avec un débit constant de 0,15 mL.min<sup>-1</sup>. Une deuxième conception de biopile enzymatique a été développée afin de permettre de fabriquer de multiples éléments grâce à une structure simple, à partir de blocs de plexiglas faciles à manipuler. Pour fournir un flux de glucose constant dans les cellules, on a utilisé soit une pompe péristaltique, soit un sac de perfusion de glucose standard, comme ceux trouvés dans les hôpitaux.

### III.2.1. Biopiles GO<sub>x</sub>-NQ/BOD orientée et GO<sub>x</sub>-PLQ/BOD

L'anode et la cathode ont été fabriquées selon notre procédure précédemment décrite<sup>139</sup>. Pour la suite des expériences, il faut considérer que toutes nos cathodes à base de BOD seront orientées à l'aide de la PP IX puisque le courant cathodique obtenu est augmenté lorsque cette enzyme est orientée par cette molécule.

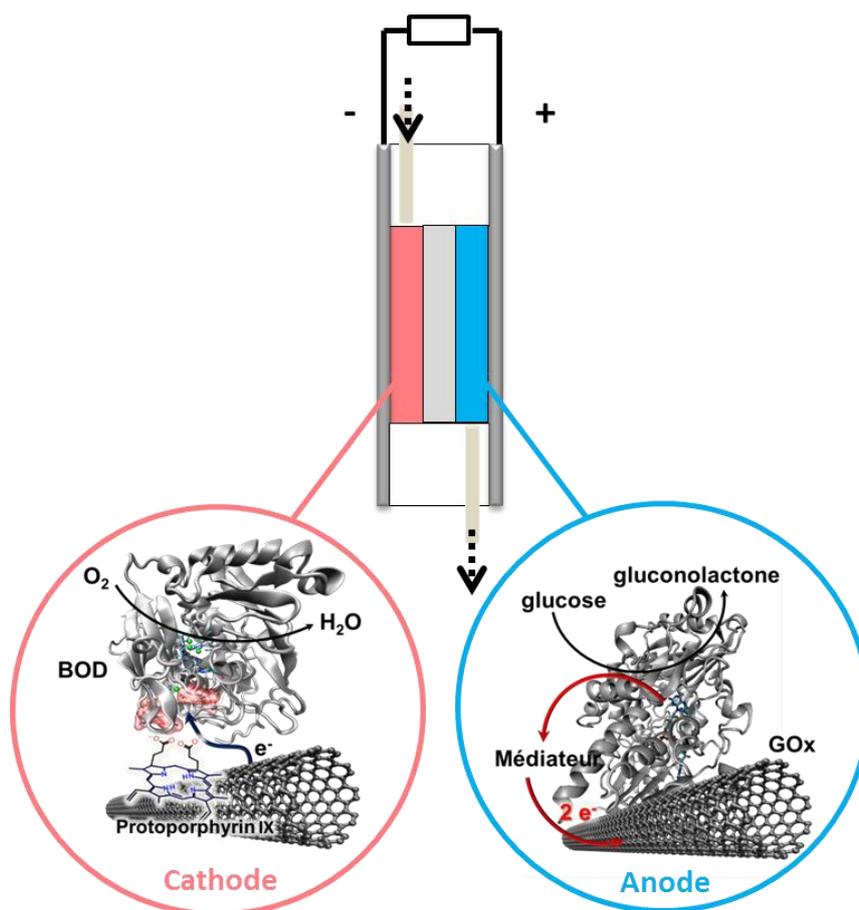


Figure III-2 : Schéma de la miniaturisation de la biopile GOx-Med/BOD à flux traversant

L'anode oxydante du glucose est composée de GOx et de la 1,4-NQ ou la PLQ comme médiateur rédox et l'ensemble est confiné dans une matrice de MWCNTs. Le médiateur agit comme une navette pour les électrons obtenus de l'enzyme à l'électrode CNT. Une telle médiation n'est malheureusement pas quantitative puisque la GOx non-connectée réagit par réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. Ainsi, la catalase est ajoutée pour consommer une quantité maximale de peroxyde d'hydrogène générée enzymatiquement. La cathode réduisant l'oxygène est composée de MWCNTs fonctionnalisés par la protoporphyrine IX et de BOD. La PP IX s'est révélée être un promoteur efficace de transfert d'électrons conduisant à une immobilisation orientée de la BOD et du DET. Les électrons requis pour la réduction de l'oxygène sont donc directement fournis par la matrice de MWCNTs. L'écoulement de la solution de glucose a été dirigé de la cathode vers l'anode pour éviter l'inhibition de la biocathode par tout peroxyde d'hydrogène restant non consommé par la catalase à l'anode.

Différentes configurations de flux ont été étudiées à partir de la biopile enzymatique GOx/BOD afin d'optimiser les performances de nos biopiles, et de créer un système facile à

utiliser pour l'association de plusieurs biopiles (Figure III-5). Cela sera détaillé plus précisément dans la partie III.3.1 ci-dessous. De plus, il faut noter que la cathode restera toujours la même pour nos biopiles enzymatiques glucose- $O_2$ , soit la BOD orientée par la PP IX.

### III.2.2. Biopiles FADGDH-NQ/BOD et FADGDH-PLQ/BOD

Pour les biopiles FADGDH/BOD, les compressions sont réalisées de la même manière et la configuration de montage est, elle-aussi, identique. Cependant, à l'anode cette fois-ci on n'aura pas besoin de catalase puisqu'il n'y aura pas de production de peroxyde d'hydrogène avec la FADGDH. L'écoulement de la solution de glucose peut être dirigé de l'anode vers la cathode ou de la cathode vers l'anode puisque qu'il n'y aura pas de produit dégradant les électrodes.

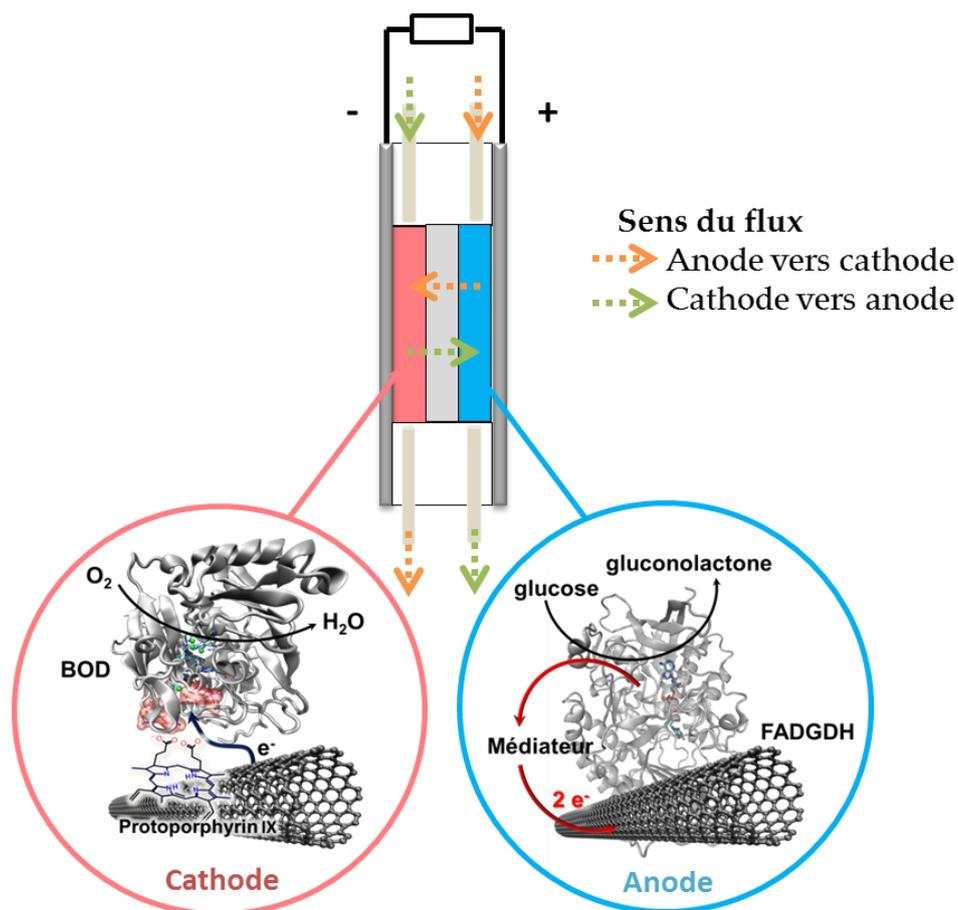


Figure III-3 : Schéma de la miniaturisation de la biopile FADGDH-Med/BOD à flux traversant

Deux médiateurs seront étudiés dans cette biopile pour l'oxydation du glucose : la NQ et la PLQ. Le but étant de voir si le transfert médié d'électrons peut être aussi efficace que la GOx mais aussi d'avoir une nouvelle GBFC pour l'implantable.

### III.2.3. Biopile GOx-NQ/HRP

Une approche originale a été démontrée en profitant de cette production de peroxyde d'hydrogène par la GOx pour le développement de biocathodes utilisant un système bisenzymatique avec de la peroxydase de raifort (HRP) comme catalyseur pour la réduction du peroxyde d'hydrogène. Dans cette configuration, la GOx a réduit le dioxygène en peroxyde d'hydrogène qui est ensuite réduit en eau par la HRP. Cette petite enzyme a un hème comme site actif. Celui-ci est facilement accessible, ce qui favorisera le DET<sup>73</sup>. En 2013, l'équipe de Cosnier a combiné la GOx et la HRP dans la même biocathode basée sur des DWCNTs afin que la HRP consomme le peroxyde d'hydrogène produit par la GOx<sup>75</sup>. En outre, cette enzyme pourrait être orientée en utilisant des dérivés de porphyrine ou de pyrène<sup>76</sup>.

L'inconvénient de ces biocathodes est l'utilisation accrue d'enzymes et la consommation supplémentaire de glucose. En outre, la production de peroxyde d'hydrogène contaminant la bioanode n'est toujours pas résolue.

Ici, nous présentons une nouvelle approche qui bénéficie de la production de peroxyde d'hydrogène par la GOx à la bioanode. Avec le montage à flux présenté au chapitre précédent, le peroxyde d'hydrogène est conduit de l'anode vers la cathode à base de HRP fournissant à cette enzyme son substrat naturel qui est entièrement consommé. Cette configuration fournit des sorties de puissance et des durées de vie très satisfaisantes.

Concernant le système GOx-NQ/HRP, les compressions sont réalisées de la même manière que la biopile GOx-NQ/BOD et la configuration de montage est identique. En effet, ce montage permet d'avoir un contrôle sur le sens de circulation de notre électrolyte à base de glucose. Ici, l'écoulement de la solution de glucose a été dirigé de l'anode vers la cathode afin que le peroxyde d'hydrogène produit par la réduction de l'oxygène à l'anode soit alors consommé directement par la HRP (Figure III-4). Une autre différence est à souligner, à l'anode : on n'aura pas besoin de catalase puisque le peroxyde d'hydrogène sera utilisé pour effectuer la réduction de catalyse enzymatique à la biocathode.

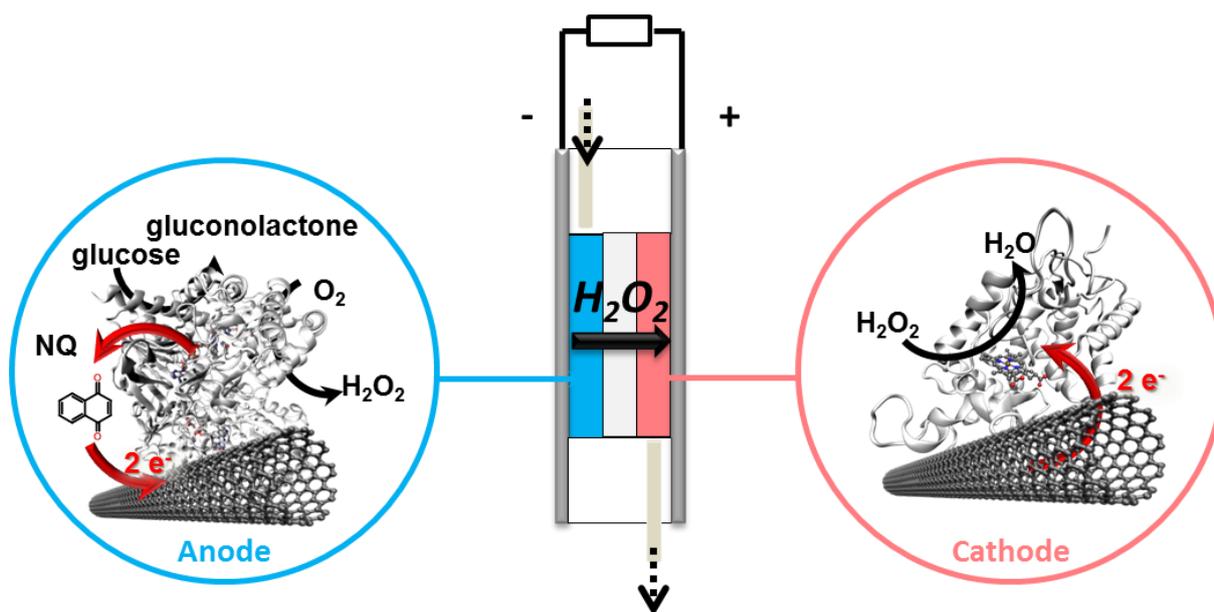


Figure III-4 : Schéma de la miniaturisation de la biopile GOx-NQ/HRP à flux traversant

L'anode est donc une compression de MWCNTs, GOx et le médiateur rédox 1,4-NQ. Au sein de l'anode, il y a deux réactions en compétition : la réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène et la réduction du médiateur rédox, la 1,4-NQ. Une troisième réaction a lieu, qui elle est une réaction naturelle, l'oxydation du glucose en gluconolactone. La cathode est simplement composée de MWCNTs et HRP. A cette bioélectrode a lieu la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau. Le peroxyde d'hydrogène provient de la réaction anodique et le flux permet l'apport de ce peroxyde d'hydrogène à la cathode.

### III.3. Performances des biopiles enzymatiques

Les performances de nos biopiles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub> ou glucose-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été étudiées par électrochimie et plus particulièrement par l'étude de leurs courbes de polarisation et de puissance, mais aussi de leurs valeurs de puissance maximale.

#### III.3.1. Biopile GOx-NQ/BOD

La configuration A représente une biopile dans laquelle chaque électrode est placée dans son bloc PTFE. La GBFC présente un OCV de 0,65 V et fournit une puissance maximale de 0.51

mW sous  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de glucose dans le tampon Mc Ilvaine à pH 7. Pour toutes les autres configurations, une membrane de cellulose poreuse (0,13 mm d'épaisseur) a été utilisée pour séparer les deux électrodes, permettre le flux d'électrolyte et minimiser les distances des électrodes tout en assurant une fabrication multicouches facile à fabriquer. La configuration B représente la GBFC avec un circuit d'écoulement externe de  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de glucose traversant les serpentins à la cathode vers les serpentins de l'anode. Un OCV de 0,55 V avec une puissance maximale de 0,38 mW à 0,33 V ont été obtenus. Dans la configuration C, l'entrée et la sortie d'électrolyte ont été bouchées respectivement à l'anode et la cathode. Cela permet à la solution de glucose  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  saturée d'air de circuler de la cathode à l'anode, en traversant la membrane de cellulose. L'OCV mesuré de cette configuration est clairement supérieur (675 mV) et une puissance maximale de 1,238 mW ( $0,933 \text{ mW.cm}^{-2}$ ) à 0,375 V a été obtenue. L'augmentation nette de la puissance pour cette conception transversale, par rapport à la configuration A et B, démontre que l'électrolyte traversant maximise l'accès des substrats aux enzymes profondément piégées dans la matrice des CNTs. Ce n'est pas le cas pour les configurations A et B où l'électrolyte n'est en contact qu'avec la surface de l'électrode de CNTs.

En dépit de la puissance optimisée avec un mouillage entier et un flux amélioré de glucose et d'oxygène à travers les pastilles, la nécessité d'un serpentin est un inconvénient dans cette configuration lorsque plusieurs biopiles doivent être empilées et connectées en parallèle ou en série. Pour évaluer l'efficacité de notre configuration, faciliter l'empilement des biopiles, et permettre un apport individualisé de solution de glucose et miniaturiser l'ensemble, nous avons élaboré de nouvelles plaques en plexiglas. Ces dernières sont utilisées en tant que moule sous la forme d'un disque de 36 mm de diamètre, 3 mm d'épaisseur, et avec un trou de 13 mm au centre pour positionner chaque bioélectrode<sup>221</sup>. Un disque de graphoïl de 36 mm de diamètre est ajouté de chaque côté de la biopile pour remplacer la plaque de graphite et servir à la fois de collecteur de courant et de joint. Une aiguille a été insérée dans chaque trou percé de part et d'autre de la tranche de Plexiglas de chaque bioélectrode pour permettre l'écoulement complet de la solution de glucose saturée d'air de la cathode à l'anode.

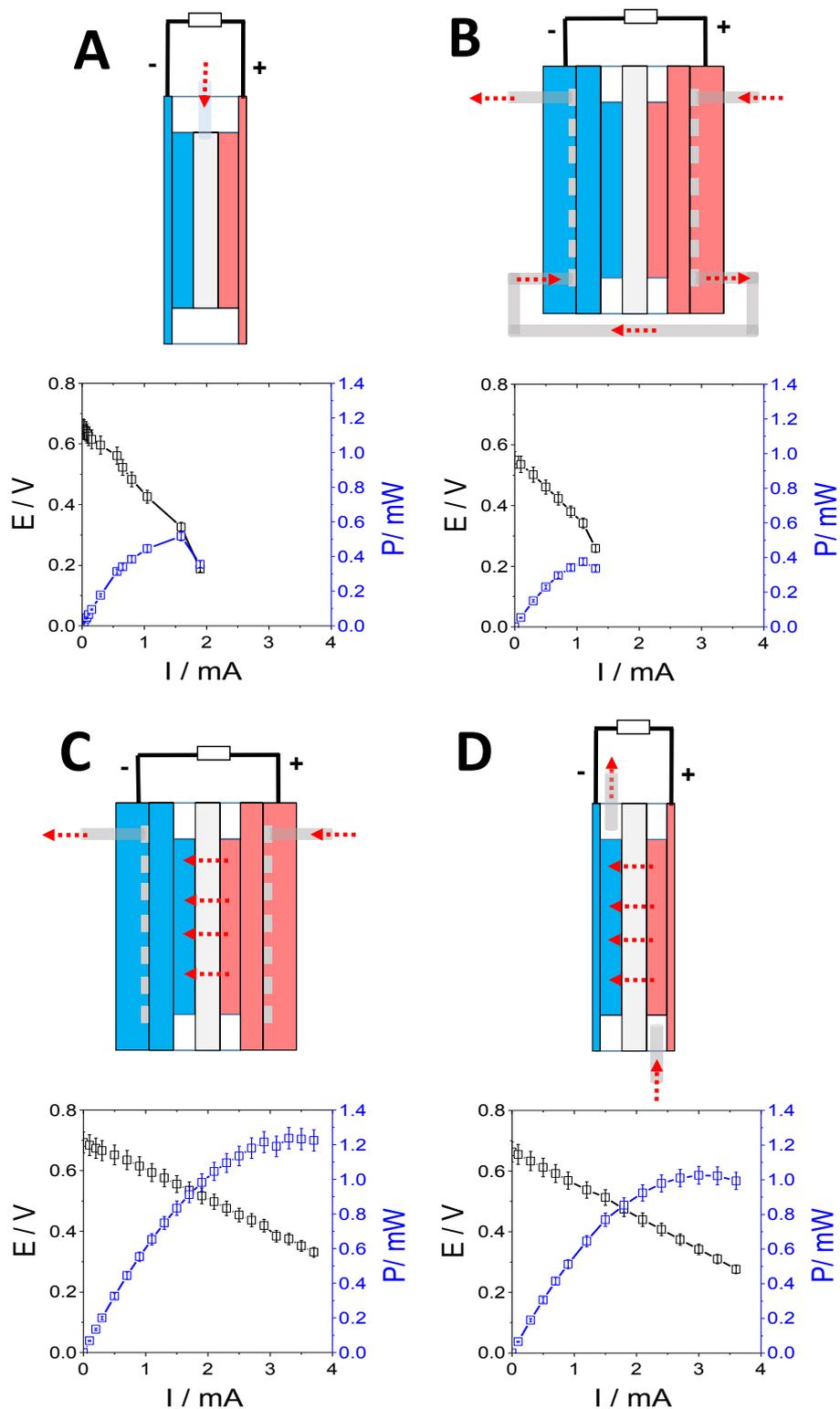


Figure III-5 : Schémas des différents designs à flux et les performances correspondantes (courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir)) pour les différentes configurations de biopiles enzymatiques GOx-NQ/BOD. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 3,5 mA

Pour la configuration D, la biopile enzymatique présente un OCV et une puissance maximale de 0,663 V et 1,03 mW (à 0,34 V). Cette configuration offre des performances légèrement inférieures par rapport à la configuration C. Cela provient probablement d'une alimentation plus homogène d'électrolyte pour la configuration C, grâce à la présence du design en serpentin à chaque électrode. Compte tenu des surfaces et des volumes de la membrane de séparation et des deux électrodes, cette performance correspond à des densités de puissance de  $0,77 \text{ mW cm}^{-2}$ .

Ces valeurs, obtenues à  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  sous air et à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , sont parmi les meilleures performances pour une biopile enzymatique glucose- $\text{O}_2$  fonctionnant *in vitro*. Ceci est proche des performances de GBFC à base d'hydrogels d'osmium ( $0,74 \text{ mW.cm}^{-2}$  à  $60 \text{ mmol.L}^{-1}$  de glucose)<sup>137</sup> ou de GBFC précédemment développé à base de pastilles de CNT ( $1,54 \text{ mW.cm}^{-2}$  à  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  de glucose)<sup>13,67,139</sup>.

### III.3.2. Biopile GO<sub>x</sub>-PLQ/BOD

Cette biopile possède un OCV de 0,67 V. La courbe de polarisation (en noir) de la Figure III-6 est linéaire montrant les pertes ohmiques de la biopile, ce qui peut expliquer le comportement résistif de notre biopile.

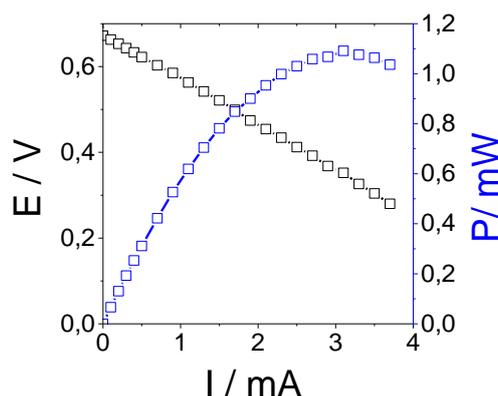


Figure III-6 : Courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir) pour la biopile GO<sub>x</sub>-PLQ/BOD orientée à  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de glucose dans Mc Ilvaine pH 7. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 3,7 mA

Cette biopile permet d'obtenir une puissance maximale de 1,1 mW, à un potentiel de 0,35 V et 3,1 mA. Ces performances sont équivalentes à la biopile GO<sub>x</sub>-NQ/BOD orientée.

### III.3.3. Biopile FADGDH-NQ/BOD

Cette biopile a été élaborée dans l'idée de sa possible compatibilité avec l'implantable. En effet, étant donné que la GOx produit du peroxyde d'hydrogène, nous avons voulu étudier une autre enzyme oxydant le glucose, la FADGDH. Cette enzyme nécessite également un transfert médié d'où l'utilisation du médiateur NQ. Dans ce système, le sens du flux peut alors être de l'anode vers la cathode ou de la cathode vers l'anode, puisqu'il n'y a pas peroxyde d'hydrogène formé et la BOD ne risque pas d'être inhibée.

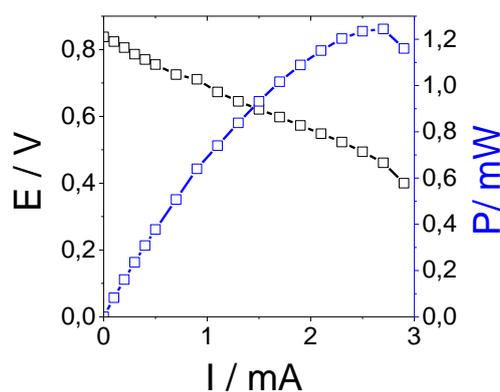


Figure III-7 : Courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir) pour la biopile FADGDH-NQ/BOD orientée à  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de glucose dans Mc Ilvaine pH 7. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 2,9 mA

La biopile présente un OCV de 0,83 V sous un flux de glucose  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Sa puissance maximale est de 1,24 mW (à 0,46 V). Ceci est très proche des performances de notre biopile GOx-NQ/BOD orientée présentée ci-dessus.

Il serait intéressant d'implanter cette biopile dans l'animal afin de voir ses performances et sa stabilité *in vivo*.

### III.3.4. Biopile FADGDH-PLQ/BOD

Cette biopile a été réalisée afin de comparer ses performances avec celle qui vient d'être décrite. En effet, la seule modification ici est le médiateur rédox pour l'anode, c'est-à-dire que l'on remplace la 1,4-NQ par la PLQ. On a pu observer par l'analyse électrochimique de ces deux bioanodes, que leurs courants catalytiques d'oxydation sont proches ainsi que leurs potentiels rédox.

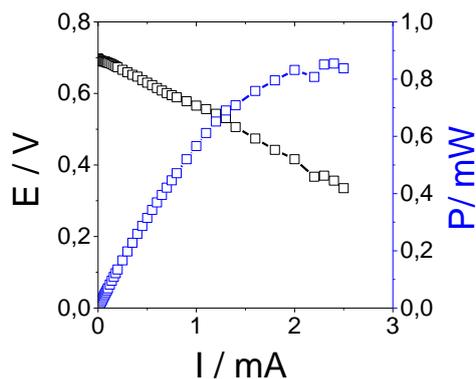


Figure III-8 : Courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir) pour la biopile FADGDH-PLQ/BOD orientée à  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de glucose dans Mc Ilvaine pH 7. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 2,5 mA

La Figure III-8 ci-dessus montre la performance de cette biopile. L'OCV et sa puissance maximale sont de 0,7 V et 0,85 mW respectivement. De l'allure de la courbe de polarisation, on peut en déduire le comportement résistif de la biopile. On constate donc que cette performance reste dans le même ordre de grandeur que la biopile FADGDH-NQ/BOD.

A ce stade, la NQ reste notre médiateur rédox le plus performant pour l'anode.

### III.3.5. Biopile GO<sub>x</sub>-NQ/HRP

Cette biopile enzymatique a été élaborée à partir de la configuration D présentée dans la Figure III-5. Comme mentionné précédemment, le flux de glucose circule de l'anode vers la cathode afin que le peroxyde d'hydrogène produit à l'anode puisse être consommé à la cathode. La biopile enzymatique fonctionnant sous  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de glucose et sous dioxygène dissous dans Mc Ilvaine pH 7 et à température ambiante présente un OCV et une puissance maximale de 0,6 V et 0,7 mW. Ce résultat est satisfaisant. De plus, pour une application implantable cela est encourageant puisque le peroxyde d'hydrogène formé à l'anode, nocif pour l'Homme à forte concentration ( $> 100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), est totalement consommé à la cathode. Cela a pu être observé avec une électrode de platine.

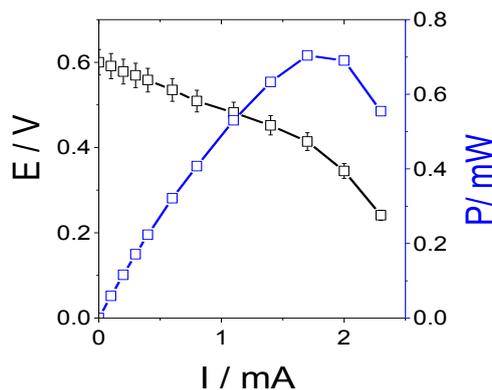


Figure III-9 : Courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir) pour la biopile GOx-NQ/HRP à 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose dans Mc Ilvaine pH 7. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 2,3 mA

Sans la maîtrise de la configuration, sans la maîtrise du flux traversant de l'anode vers la cathode, ces performances n'auraient pas été possibles. En effet, ces deux enzymes ont déjà été associées mais pour l'élaboration d'une biocathode combinée à une bioanode GOx-NQ<sup>75</sup>. Cette biopile montre bien l'intérêt du design de notre biopile à flux de combustible.

### III.4. Stabilité en fonctionnement des biopiles enzymatiques

#### III.4.1. Stabilité de la biopile GOx-NQ/BOD

Afin d'estimer la stabilité en fonctionnement de nos différentes biopiles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub>, nous avons élaboré un mode opératoire. Celui-ci se base sur le montage présenté à la Figure II-3 en ayant la cathode comme ET et l'anode comme CE/ER. Cela consiste à faire des cycles de décharge/charge, comme le décrit la Figure III-10 ci-dessous. Ce type d'expérience permet d'avoir un contrôle sur la décharge de la pile jusqu'à une tension limite afin que la biopile puisse se régénérer lors du cycle de charge et ainsi ne pas détériorer les enzymes. Cela assure une meilleure stabilité temporelle de notre système enzymatique. Durant le temps t<sub>1</sub>, une résistance va être appliquée jusqu'à un seuil de tension bas que l'on aura déterminé (0,35 V). Puis, une fois ce seuil atteint, la biopile va être laissée en circuit ouvert afin que la tension remonte jusqu'à un seuil haut (0,55 V) durant un temps t<sub>2</sub>. De nouveau, nous pourrions effectuer une décharge avec la même résistance appliquée à t<sub>1</sub>.

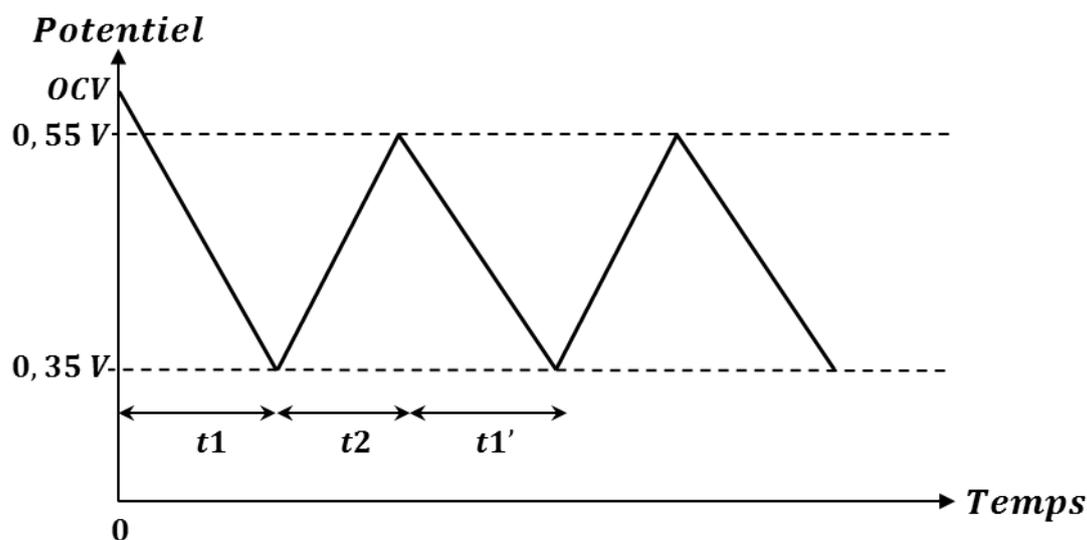


Figure III-10 : Schéma expliquant le mode opératoire pour étudier la stabilité d'une biopile glucose- $O_2$  en décharge/charge

Afin d'examiner cette configuration plus en détails, en termes de durée de vie et de gestion pratique de l'alimentation, deux modes de fonctionnement ont été appliqués. L'utilisation d'une pompe péristaltique, évidemment, annule l'énergie produite par la GBFC. Dans ce contexte, un sac de perfusion contenant la solution de glucose a été utilisé en alternative à la pompe péristaltique (Figure III-11A). La Figure III-11B montre une expérience continue de charge-décharge effectuée pendant 24 heures. Ceci est effectué sous une résistance constante de  $3\text{ k}\Omega$  dans la fenêtre de tension de 0,55 à 0,35 V. Cette gamme de tension est choisie afin de pouvoir générer de l'énergie mais aussi afin que la biopile enzymatique puisse enchaîner des cycles de charge/décharge durant une longue durée. Lorsque la faible tension nominale de 0,35 V est atteinte, le circuit est ouvert et la tension de la cellule remonte jusqu'à la valeur initiale haute de 0,55 V (Figure III-11Ba, noir). Au cours de cette expérience, la biopile a fourni 1 mW.h (3,6 J) d'énergie en 48 heures (Figure III-11b, bleu). À décharge constante sous une résistance appliquée de  $6\text{ k}\Omega$  (Figure III-11Bc, rouge), l'OCV décroît lentement à partir de 0,5 V jusqu'à ce qu'un plateau soit observé à 0,40 V après 18 heures. Au cours des 24 premières heures, environ  $715\text{ }\mu\text{W.h}$  (2,6 J) pourraient être accumulés (Figure III-11Bd, vert).

La Figure III-11C compare les durées des cycles de charge-décharge simples à  $500\text{ }\Omega$  et  $3\text{ k}\Omega$ , au début de l'expérience et 48 heures plus tard. Pour les décharges de  $500\text{ }\Omega$ , le cycle de charge/décharge est assez rapide et s'effectue en moins de 2 minutes en début d'expérience. Cependant, la durée du cycle augmente assez rapidement jusqu'à ce que plus de 4 minutes par cycle soit requis après 48 heures. Dans le cas d'une décharge de  $3\text{ k}\Omega$ , la durée d'un seul cycle

de charge/décharge reste constante sur 48 heures et s'effectue en environ 9 minutes. Étant donné que les limitations de transport de masse pour cette configuration d'écoulement peuvent être exclues, cette durée croissante de cycle doit être corrélée à la perte de l'activité enzymatique et au transfert réduit d'électrons. Cela indique que les enzymes perdent plus rapidement leur activité aux décharges proches de la puissance maximale. Il est donc concluant que pendant 48 heures, deux fois plus d'énergie (1 mW.h, 3,6 J) pourrait être accumulée à des décharges de 3 k $\Omega$  que 500  $\Omega$  (0,5 mW.h, 1,8 J).

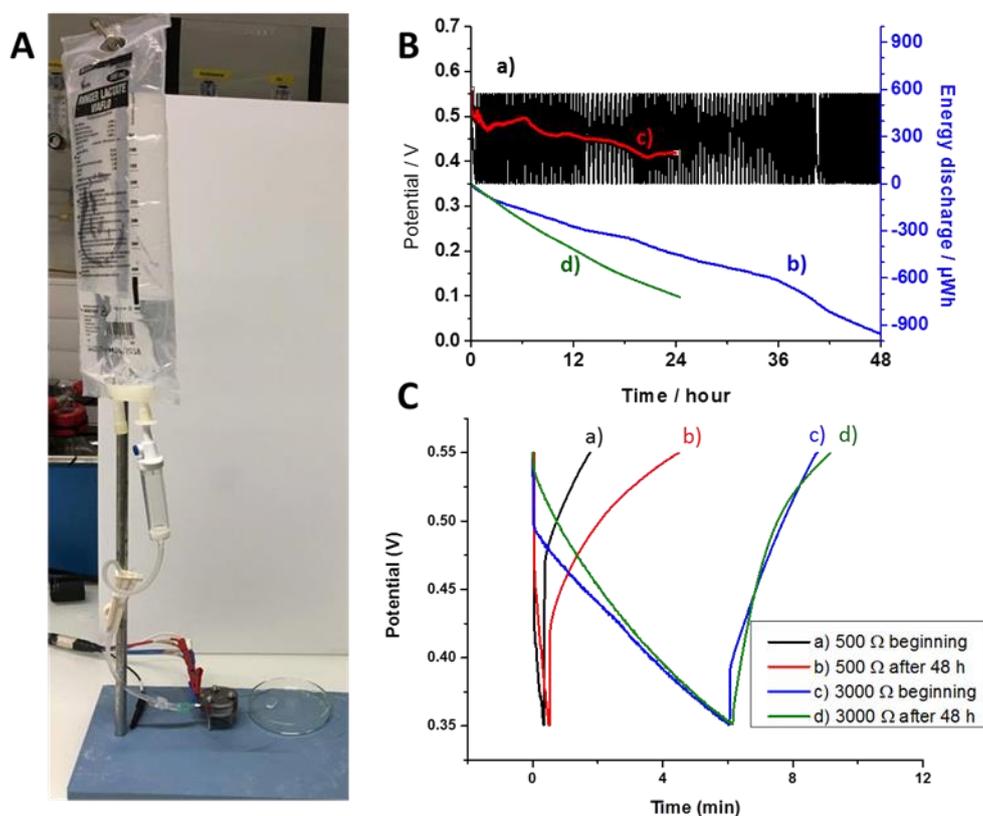


Figure III-11 : (A) Photo d'un sac à perfusion contenant une solution de glucose remplaçant la pompe péristaltique pour alimenter la biopile à glucose- $O_2$  GOx-NQ/BOD. (B) Cycles de charge/décharge entre 0,55 V et 0,35 V à 3 k $\Omega$  durant 24 heures (a, noir) et l'énergie générée (b, bleu); Décharge continue à 6 k $\Omega$  pendant 48 heures (c, rouge) et l'énergie produite (d, vert). (C) Cycles de décharge/charge à 500  $\Omega$  (a, noir) et 3 k $\Omega$  (c, bleu) au début de l'expérience et après 48 heures (b, d, respectivement)<sup>222</sup>

Il semble plus approprié d'effectuer une décharge en continu lorsqu'une puissance élevée est nécessaire pendant un court laps de temps alors que les cycles de décharge/charge sont meilleurs pour prolonger la durée de vie de la GBFC et obtenir des rendements énergétiques plus élevés. Pour obtenir des rendements énergétiques efficaces, un sac de perfusion

contenant la solution de glucose a été utilisé pour remplacer la pompe péristaltique (Figure III-11A). Des performances presque similaires ont été observées avec cette configuration qui a produit 1 mW.h (3,6 J) d'énergie efficace après 48 heures sous mode de cycle décharge/charge à 3 k $\Omega$ .

### III.4.2. Stabilité de la biopile GOx-NQ/HRP

Afin d'estimer la stabilité en fonctionnement des biopiles enzymatiques glucose-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous avons élaboré un mode opératoire. Celui-ci se base sur le montage présenté à la Figure II-3 en ayant la cathode comme ET et l'anode comme CE/ER. Cela consiste à faire des cycles de décharge/charge, comme le décrit la Figure III-10 ci-dessus. Durant le temps t<sub>1</sub>, une résistance va être appliquée jusqu'à un seuil de tension bas que l'on aura déterminé à 0,4 V. Puis, une fois cette tension atteinte, la biopile va être laissée en circuit ouvert afin que la tension remonte jusqu'à un seuil haut à 0,5 V, durant un temps t<sub>2</sub>. De nouveau, on pourra effectuer une décharge avec la même résistance appliquée à t<sub>1</sub>.

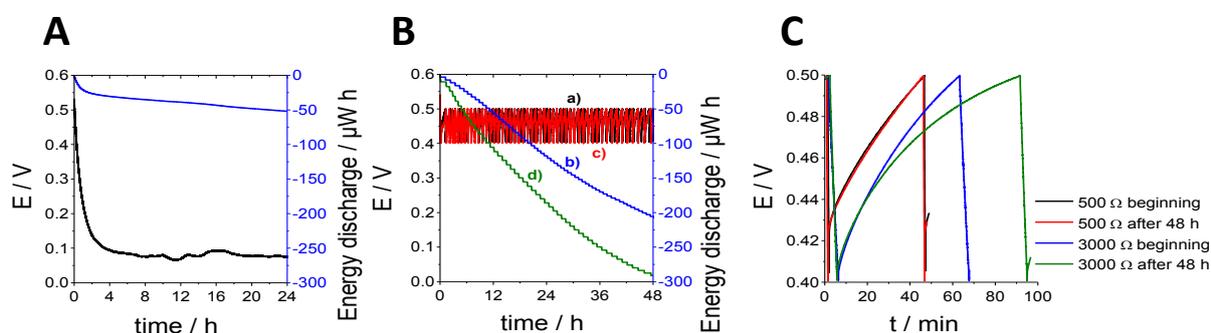


Figure III-12 : (A) Décharge continue à une résistance de 6000  $\Omega$  (noir) et l'énergie produite (bleu). (B) Cycles de charge/décharge entre 0,5 et 0,4 V à une résistance de 500  $\Omega$  (a, noir) et l'énergie produite (b, bleu), de 3000  $\Omega$  (c, rouge) et l'énergie produite (d, vert). (C) Zoom d'un cycle de décharge-charge à 500  $\Omega$  (noir) et 3000  $\Omega$  (bleu) au début de l'expérience et après 48 heures (noir et vert respectivement).

Sous décharge continue à 6 k $\Omega$ , 50  $\mu$ W.h (0,18 J) d'énergie pourraient être accumulés en 24 heures (Figure III-12A). Après l'application de la résistance, la tension de la biopile a continuellement diminué jusqu'à 75 mV. On constate qu'après deux heures de décharge, la tension de la biopile est déjà proche de cette valeur de 75 mV. Une des raisons de cette stabilité relativement faible pourrait être liée à un transport massique insuffisant de peroxyde

d'hydrogène à la cathode HRP en utilisant un débit de  $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Il semble que le peroxyde passe trop vite affectant les performances de la biocathode et conduit ainsi à une conversion de puissance limitée. En mode cycle de décharge/charge dans une plage de potentiel comprise entre 0,5 et 0,4 V à différentes résistances (Figure III-12B noir et rouge), notre configuration est parfaitement stable pendant 48 heures. À  $3 \text{ k}\Omega$ ,  $290 \mu\text{W}\cdot\text{h}$  ( $1,04 \text{ J}$ ) ont été produites pendant 48 heures, tandis qu'à  $500 \Omega$ ,  $200 \mu\text{W}\cdot\text{h}$  ( $0,72 \text{ J}$ ) d'énergie pourraient être générés. Le rendement d'énergie inférieur à une résistance inférieure s'explique par les cycles de décharge/charge plus longs à  $500 \Omega$  (Figure III-12C, noir et rouge), un cycle prend 45 minutes et reste stable pendant 48 heures. À  $3000 \Omega$  (Figure III-12C, bleu et vert), un cycle prend 65 minutes au début de l'expérience et augmente à 90 pour un cycle de décharge/charge après 48 heures. À  $500 \Omega$ , le processus de décharge est très rapide, ce qui peut expliquer l'accumulation réduite d'énergie à cette résistance. À  $3000 \Omega$ , le processus de décharge prend 5 minutes et pendant ce temps, plus d'énergie peut être récupérée.

En comparaison avec l'expérience de décharge continue, le peroxyde d'hydrogène peut être consommé à la biocathode pendant la recharge, ce qui peut expliquer la stabilité améliorée de ce système.

En effet, pendant la période de recharge, la naphthoquinone n'est pas régénérée sur le matériau de l'électrode et reste dans l'état réduit. Ainsi, GOx produit plus de peroxyde d'hydrogène en réduisant plus d'oxygène car pendant ce temps il n'y a pas de réaction concurrentielle avec le médiateur. La concentration plus élevée de peroxyde d'hydrogène améliore la performance de la biocathode.

## III.5. Etude de l'influence du débit de solution de glucose

### III.5.1. Biopile GOx-PLQ/BOD

Cette expérience a permis de déterminer le débit optimal afin d'améliorer les performances de nos biopiles enzymatiques. Pour cela, une décharge continue à  $6 \text{ k}\Omega$  a été effectuée, en commençant par un débit élevé,  $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  jusqu'à un débit faible de  $0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Ce choix a été décidé puisque normalement plus l'apport en glucose et en air sera rapide, plus la biopile se stabilisera rapidement.

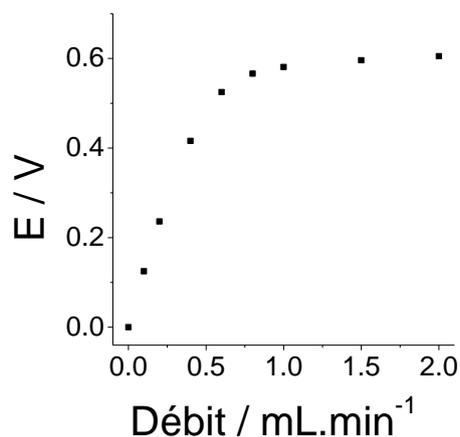


Figure III-13 : Courbe montrant le potentiel de stabilisation de la biopile GOx-PLQ/BOD en fonction du débit d'électrolyte à base de glucose 5 mmol.L<sup>-1</sup> en appliquant une décharge continue de 6 kΩ

La Figure III-13 illustre l'expérience. On constate que la biopile se stabilise et atteint un plateau à partir d'un débit proche de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Ainsi, cela permettrait de stocker beaucoup plus d'énergie dans le temps.

### III.5.2. Biopile GOx-NQ/HRP

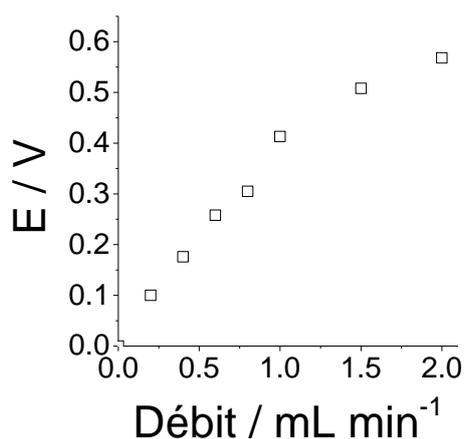


Figure III-14 : Étude de la dépendance du flux dans la biopile GOx-NQ/HRP en appliquant une décharge continue à 12 kΩ dans une solution de 5 mmol L<sup>-1</sup> de glucose et saturée en oxygène

La Figure III-14 montre une étude de la dépendance à l'écoulement pour voir si le système pourrait être stabilisé dans des conditions spécifiques pour stocker un maximum d'énergie.

Ceci est possible en utilisant une solution de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de glucose et d'oxygène saturé pour produire un maximum de peroxyde d'hydrogène sous une décharge continue de  $12 \text{ k}\Omega$ . À faible débit, le système a été stabilisé à basse tension et une petite quantité d'énergie pourrait être produite. Sous un flux de  $1,0$  à  $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , le système a été stabilisé à un potentiel suffisant pour cumuler une énergie efficace. En outre, le débit de  $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  semble être le débit optimisé car un régime stationnaire apparaît.

### III.6. Mise en série et/ou en parallèle de biopiles enzymatiques

#### III.6.1. Biopiles GOx-NQ/BOD

Les circuits utilisés pour connecter deux GBFC empilés en série et en parallèle sont représentés sur les Figure III-15B et C respectivement. Des inserts séparés ont été utilisés pour alimenter les bioélectrodes avec la solution de glucose saturée à l'air tandis que le sens d'écoulement était toujours dirigé de la cathode à l'anode pour la biopile GOx/BOD. La même solution de glucose  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  a été utilisée pour alimenter les deux GBFC *via* des pièces en T (Figure III-15A).

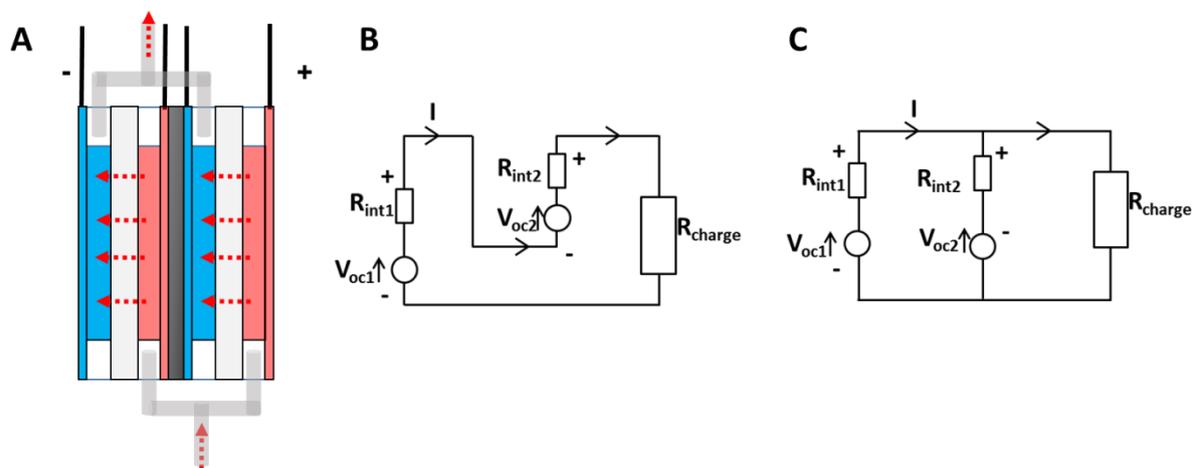


Figure III-15 : (A) Schéma décrivant la direction du flux pour la solution de glucose  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pour l'association de deux biopiles à glucose. Circuit appliqué décrivant l'association de deux biopiles (B) en série et (C) en parallèle

Les associations de biopiles enzymatiques sont très intéressantes pour augmenter la puissance de sortie et étendre le domaine d'application. L'association parallèle est une méthode pour

augmenter le courant de sortie mais elle impose des limitations en efficacité de conversion en raison de la faible tension de sortie de la pile. Au contraire, l'association en série double la tension ce qui conduit à une meilleure performance du convertisseur. En effet, il est difficile de faire fonctionner un convertisseur, ou simplement utiliser l'énergie, lorsque la tension est trop basse.

Cette association de plusieurs biopiles a été pensée afin d'atteindre un potentiel et un courant suffisants en vue d'alimenter un appareil à faible demande énergétique, mais aussi, pour stocker plus d'énergie en moins de temps possible *via* l'utilisation d'un circuit électrique adapté. Cela sera plus détaillé dans les parties III.7 à III.9 ci-dessous.

La Figure III-16A montre les courbes de polarisation et de puissance du système en série. La courbe de puissance a été tracée à partir de la courbe de polarisation, qui a été enregistrée par des décharges successives de 30 secondes à courant constant (0,1 mA à 3,0 mA pour ce système en série). Les performances ont été enregistrées à pH 7 en présence d'un flux de solution de glucose 5 mmol.L<sup>-1</sup> saturé d'air.

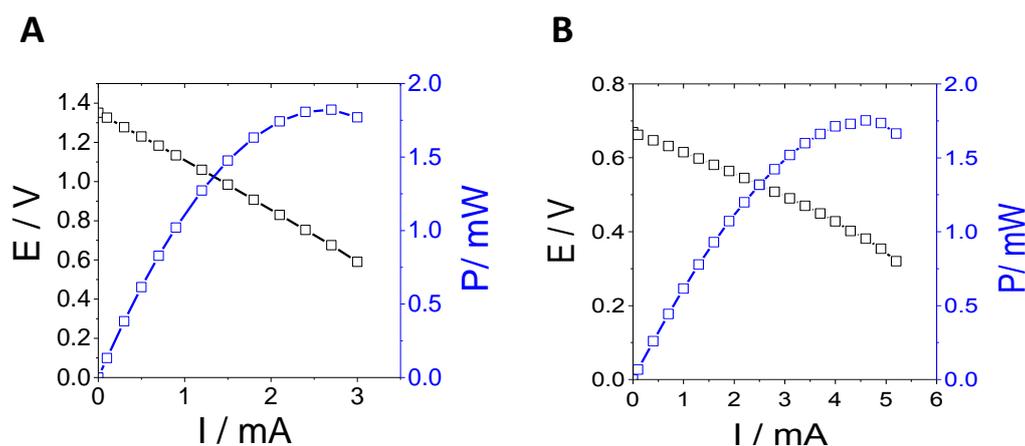


Figure III-16 : Courbe de puissance correspondante (bleu), et courbe de polarisation (noir) de la connexion de deux biopiles à glucose GOx-NQ/BOD en série (A) et en parallèle (B)

Pour le circuit parallèle, l'OCV est resté constant (0,669 V) tandis que la puissance maximale de 1,75 mW à 0,381 V et le courant (4,6 mA) ont augmenté d'un facteur deux par rapport à une GBFC individuelle (Figure III-16B). Les deux GBFC en série (Figure III-16A) présentent un OCV de 1,35 V et une puissance maximale de 1,82 mW (à 0,675 V). En outre, pour la GBFC en série, la puissance générée et le potentiel opérationnel sont presque deux fois supérieurs à ceux observés pour une GBFC individuelle, tandis que le courant reste le même. Ce doublement de la tension et du courant de la cellule pour la connexion de deux GBFC,

respectivement en série et en parallèle, démontre la pertinence de notre configuration en empilement et d'une alimentation efficace en solution de glucose. Ceci nous permet d'envisager de connecter plusieurs GBFC dans des plaques miniaturisables sans perte de performance. Par la suite, l'association de biopiles choisie est celle en série car celle-ci a pour avantage d'augmenter la tension, paramètre important pour l'alimentation d'un dispositif, étant donné que le courant fourni par une biopile peut s'avérer suffisant pour l'alimentation d'un appareil à faible demande énergétique.

### III.6.2. Biopiles GOx-NQ/HRP

Les circuits utilisés pour connecter deux GBFC empilés en série et en parallèle sont représentés sur les Figure III-15B et C respectivement. Des inserts séparés ont été utilisés pour alimenter les bioélectrodes avec la solution de glucose saturée à l'air tandis que le sens d'écoulement était toujours dirigé de l'anode vers la cathode pour GOx/HRP. La même solution de glucose  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  a été utilisée pour alimenter les deux GBFC *via* des pièces en T (Figure III-15A).

La Figure III-17 montre les courbes de polarisation et de puissance du système en série et en parallèle. Les performances ont été enregistrées à pH 7 en présence d'un flux de solution de glucose  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  saturé d'air allant de l'anode vers la cathode.

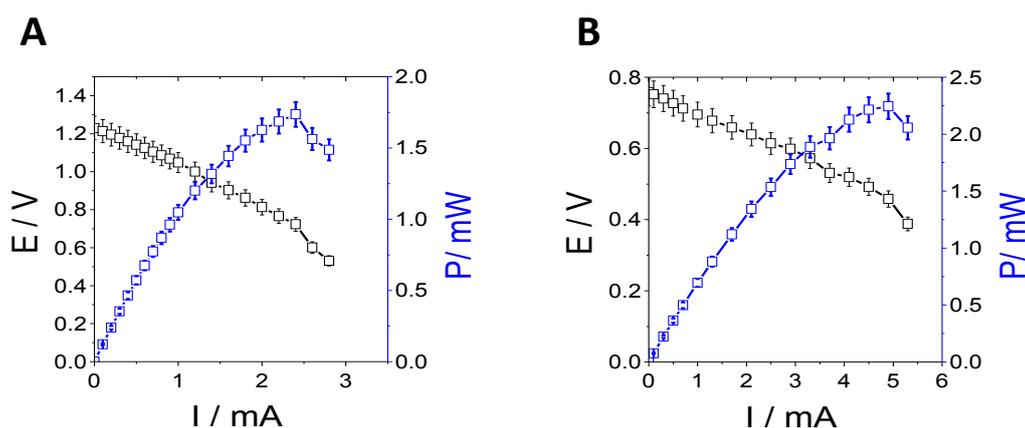


Figure III-17 : (A) Courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir) pour deux biopiles GOx-NQ/HRP connectées en série. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 2,8 mA. (B) Courbe de puissance (bleu) et courbe de polarisation (noir)

*pour deux biopiles GOx-NQ/HRP connectées en parallèle. Chaque point représente la valeur obtenue après une décharge de 30 secondes entre 0,1 et 5.2 mA.*

Les deux biopiles glucose-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en série (Figure III-17A) présentent un OCV de 1,23 V et une puissance maximale de 1,73 mW (à 0,72 V). Pour le circuit parallèle, l'OCV est resté constant (0,75 V) tandis que la puissance maximale de 2,24 mW à 0,46 V et le courant (4,9 mA) ont augmenté d'un facteur deux par rapport à une biopile individuelle (Figure III-17B).

Les performances obtenues pour ce système GOx/HRP sont très prometteuses. En effet, les puissances obtenues sont élevées. Ce système présente une alternative pour l'implantable à partir d'une anode à base GOx.

### III.7. Alimentation d'un minuteur à l'aide de deux biopiles GOx-NQ/BOD connectées en série

Pour démontrer l'usage pratique de notre configuration de biopile enzymatique à flux de glucose et d'oxygène dissous dit traversant, nous avons alimenté un minuteur électronique. Ceci a été réalisé sur une durée de 17 heures, à l'aide de deux biopiles à glucose-O<sub>2</sub> GOx-NQ/BOD associées en série et connectées en direct sur le minuteur (Figure III-18A). L'OCV est resté pratiquement stable et a diminué de 1,37 V à 1,32 V sur toute la durée de l'expérience (Figure III-18B). De plus, le flux de glucose est entretenu grâce à un sac de perfusion afin d'optimiser le rendement énergétique de cette expérience. Cette configuration ne demande alors aucun apport énergétique au regard de l'utilisation d'une pompe péristaltique.

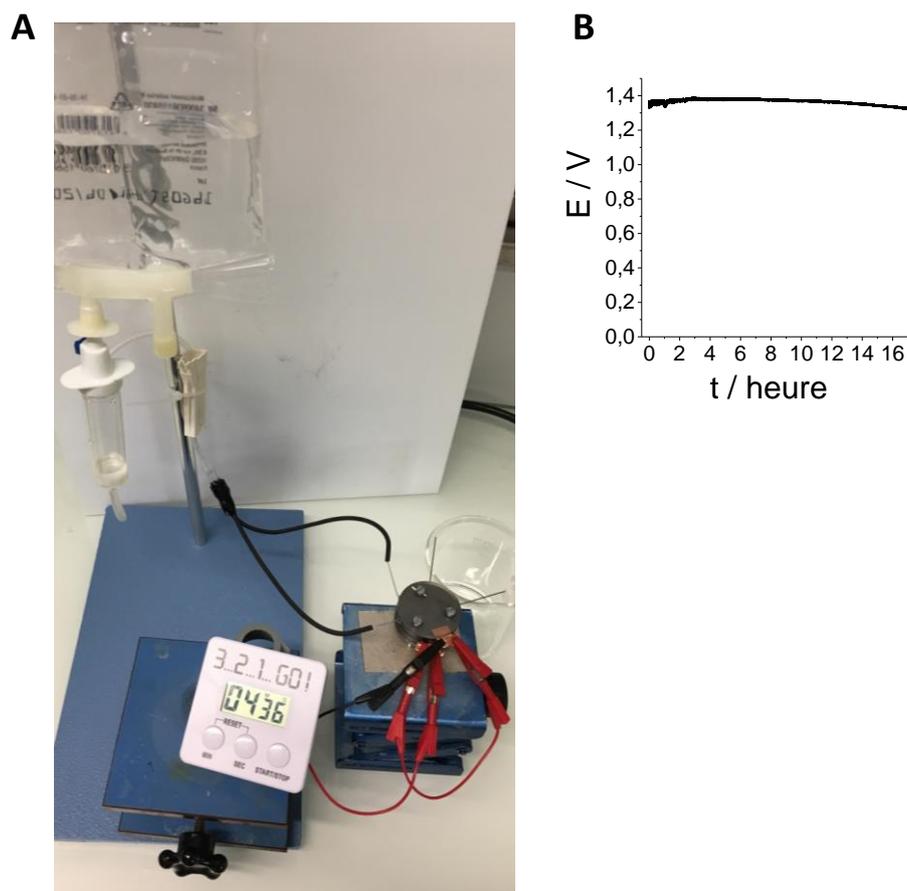


Figure III-18 : (A) Photo de deux biopiles  $GOx-NQ/BOD$  connectées en série avec un apport de solution de glucose  $5\text{ mmol.L}^{-1}$  par un sac de perfusion et alimentant un minuteur. (B) Evolution de la tension en fonction du temps lors de l'alimentation directe d'un minuteur

Cette association de deux biopiles en série a permis également d'alimenter une LED ou encore une montre/chronomètre. Sur ce système, nous pouvions arrêter le chronomètre, le mettre à zéro, le redémarrer voire changer de « menu » sans soucis. Cependant, le rétroéclairage de l'écran de cette montre s'est avéré inopérant car celui-ci nécessite un courant instantané supérieur à ce que les deux biopiles enzymatiques en série peuvent fournir.

Une nouvelle conception de GBFC a été présentée permettant l'empilement de deux GBFC et leur connexion en parallèle et en série. Chaque cellule est alimentée par un flux individuel de glucose saturé d'air qui est dirigé depuis la cathode à travers une membrane de cellulose vers l'anode. Sous une décharge continue, un GBFC individuel a généré  $0,7\text{ mW.h}$  ( $2,5\text{ J}$ ) de puissance en utilisant des solutions de glucose saturées  $5\text{ mmol L}^{-1}$  en 24 heures. Dans les conditions de décharge, cette cellule de biocarburant était stable pendant 9 jours et produisait  $2,2\text{ mW.h}$  ( $7,9\text{ J}$ ). Deux GBFCs empilées fournissent une puissance de sortie presque double lorsqu'elles sont connectées en série ou en parallèle. Les densités de puissance obtenues avec

notre conception GBFC empilée sont comparables aux meilleures performances citées dans la littérature<sup>169,223</sup>, mais les rendements énergétiques dépassent largement la grande majorité des performances déclarées. L'empilement et la connexion d'autres GBFC sont en cours d'évaluation. Enfin, un dispositif de démonstration portable pourrait fonctionner pendant 17 heures avec deux GBFC en série.

### III.8. Vers l'alimentation d'un appareil à usage unique

Ayant optimisé la configuration à flux traversant de nos biopiles enzymatiques permettant l'association d'un nombre infini de biopiles en série et/ou en parallèle, nous avons cherché une application qui serait intéressante et adaptée aux performances de nos biopiles. A partir de cette idée, nous nous sommes orientés vers l'alimentation d'un appareil électronique à usage unique. Après quelques recherches, nous avons décidé d'alimenter un test d'ovulation digital permettant d'effectuer plusieurs tests *via* le changement des bâtonnets-test, ainsi qu'un test de grossesse digital à usage unique. En effet, ces appareils sont alimentés par des piles lithium (CR1220) ou des piles alcalines zinc-dioxyde de manganèse (LR41) qui doivent être recyclées après le test. On suppose que nombreuses sont les personnes qui jettent ces appareils complets à la poubelle sans retirer la pile. Les piles lithium sont connues pour délivrer plus d'énergie que les piles alcalines et pour avoir une durée de vie bien plus importante. Or, pour cette application, il est dommage d'utiliser ce type de pile, surtout que leur coût de production n'est pas négligeable. De plus, surnommé « or blanc », le lithium se trouve principalement en Amérique du Sud et ses réserves pourraient rapidement venir à être limitées car celui-ci n'est actuellement que partiellement recyclable. Le lithium présente un risque potentiel pour l'environnement car il peut réagir avec l'azote, l'oxygène ou encore la vapeur d'eau présents dans l'air, formant une mixture d'hydroxyde de lithium (LiOH), de carbonate de lithium (Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) et de nitrure de lithium (Li<sub>3</sub>N). Concernant les piles alcalines, celles-ci fonctionnent aussi à basse température (jusqu'à -30°C) et sont résistantes aux contraintes thermiques et mécaniques. Cependant, leur coût reste plus élevé et il n'y a pas de récupération d'énergie en temps de repos. Le zinc est un élément peu présent dans nos sols et il est important pour la vie végétale, donc il est nécessaire de le recycler. Cependant, il peut être contaminant et polluant selon sa teneur dans les sols. Sa production mondiale est en croissance ces dernières années et il est également recyclé à titre de 30 %. Le dioxyde de manganèse est le composé de manganèse le plus répandu dans la nature. Celui-ci peut s'avérer nocif pour l'homme.

L'électrolyte de cette pile est du KOH qui est corrosif. C'est pour cela que nous cherchons à trouver de nouvelles générations de piles qui sont biodégradables.

### III.8.1. Test d'ovulation digital Clearblue

Ce test d'ovulation permet de détecter le pic de l'Hormone Lutéinisante (LH) des urines afin de déterminer les jours de fertilité chez la femme.

#### III.8.1.1. Caractérisation d'un test d'ovulation avec sa pile lithium CR1220 d'origine

Pour savoir si nous étions dans la capacité d'alimenter cet appareil, nous l'avons ouvert afin d'en comprendre sa constitution (Figure III-19). Au niveau du circuit électronique on trouve un microcontrôleur paramétré pour que le système se mette en sécurité dès le retrait de la pile (seuil de tension). Le système est alimenté par une pile lithium CR1220 3V.

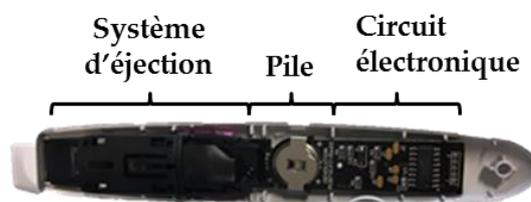


Figure III-19 : Photo du test d'ovulation ouvert présentant de la gauche vers la droite, son système d'éjection du bâtonnet test, sa pile d'origine CR1220 et son circuit électronique

Par la suite, nous avons caractérisé cet appareil en faisant une mesure des caractéristiques courant/tension en le connectant respectivement à un ampèremètre et au potentiostat.

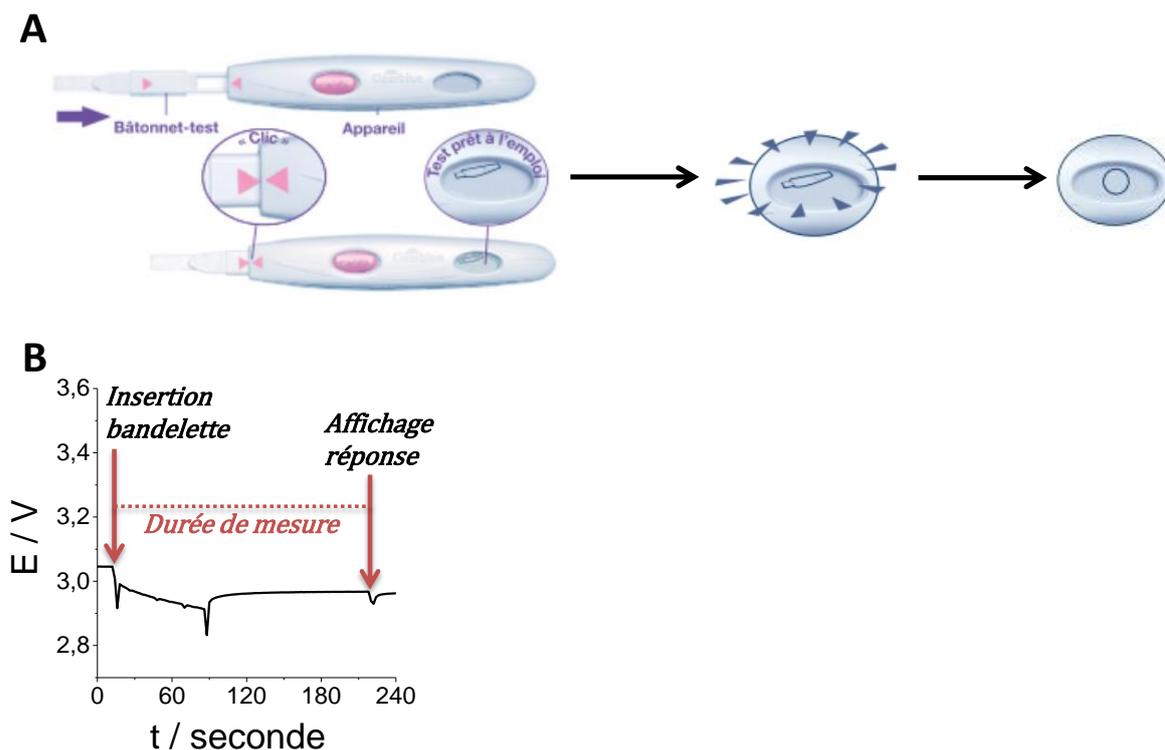


Figure III-20 : (A) Schéma des différents affichages sur l'appareil lors de la mesure du taux de LH. (B) Courbe de suivi de la tension de la pile en fonction du temps durant une mesure

La Figure III-20A montre les différentes étapes au niveau de l'affichage de l'écran digital du test d'ovulation. Lorsque l'on insère le bâtonnet-test, l'appareil s'allume et affiche le logo du test à l'écran ; à cette étape l'appareil consomme environ 60  $\mu\text{A}$  et la tension reste stable à 3,05 V (tension de la pile). Aussitôt, on vient déposer une goutte d'eau afin de démarrer la mesure. A cet instant, la tension commence à chuter, le courant oscille entre 0,7 et 1,4 mA et le logo se met à clignoter. Au bout de 90 secondes, le courant repasse à 60  $\mu\text{A}$ . Puis après 120 secondes, on observe une petite chute de tension due au changement de l'affichage à l'écran montrant le résultat « négatif » du test (Figure III-20B). Dès que l'on retire le bâtonnet-test, l'appareil ne consomme plus que 2  $\mu\text{A}$  et affiche durant 8 minutes le résultat avant de s'éteindre.

### III.8.1.2. Alimentation directe du test d'ovulation à partir de 5 biopiles GOx-NQ/BOD en série

Afin d'alimenter ce test d'ovulation, nous avons associé 5 biopiles GOx-NQ/BOD en série sous  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de glucose et oxygène dissous de la solution dans Mc Ilvaine pH7. Chaque biopile est alimentée individuellement par un flux traversant (Figure III-21).

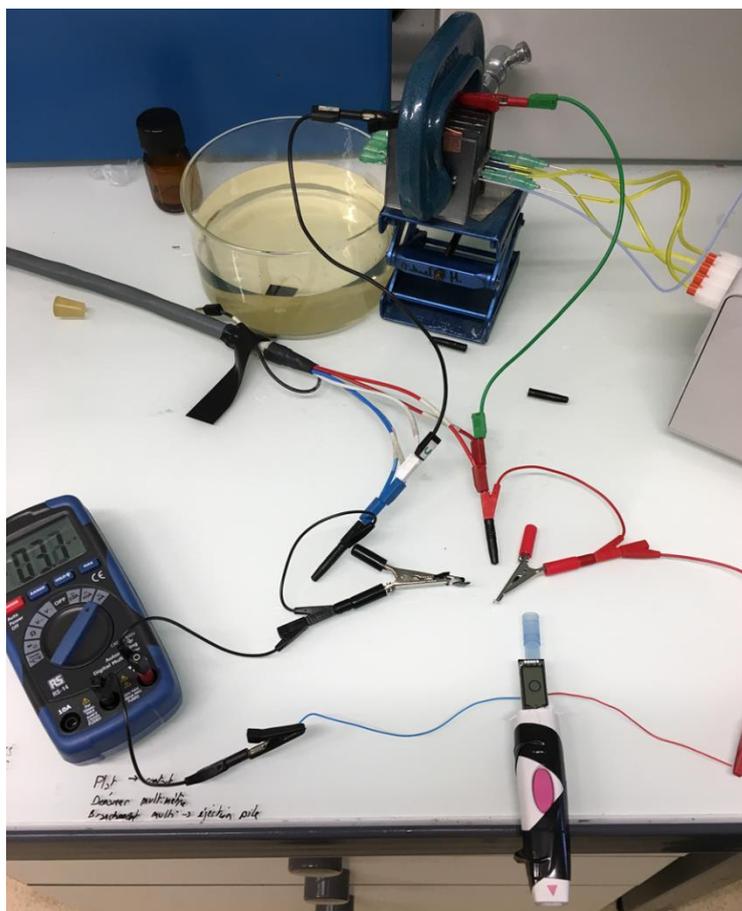


Figure III-21 : Photographie de l'expérience d'alimentation du test d'ovulation à partir de 5 biopiles GOx-NQ/BOD connectées en série

Au démarrage de l'expérience, l'OCV est de 3,55 V ce qui représente en moyenne 0,71 V par biopile. Nous avons dû placer ce stack en parallèle de la pile d'origine avant de pouvoir la déconnecter. Ceci pour éviter que le microcontrôleur ne détecte une perte de tension et se mette en défaut. Puis nous avons suivi le même mode opératoire que précédemment. On observe que dès que l'on insère le bâtonnet et qu'on lui dépose une goutte d'eau, la tension chute quasi-linéairement de 3,55 à 2,95 V durant 60 secondes (courant entre 0,7 et 1,4 mA ; clignotement du logo), puis l'appareil consomme de nouveau moins de courant ( $60 \mu\text{A}$ ) ce qui permet à la tension de remonter durant les 120 secondes restantes de la mesure (3,2 V). Au

moment d'afficher le résultat « négatif » à l'écran, on observe une chute spontanée de la tension à 2,75 V sur quelques secondes (Figure III-22). Puis, dès que l'on retire le bâtonnet-test, la tension remonte ( $i = 2 \mu\text{A}$ ) jusqu'à l'OCV (extinction de l'affichage).

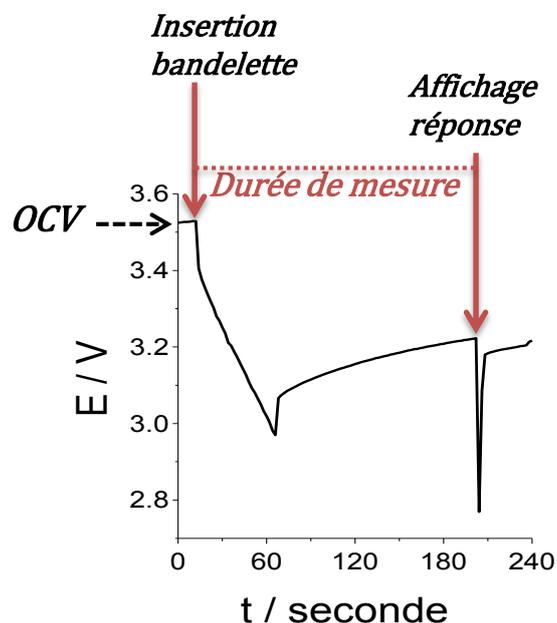


Figure III-22 : Courbe de suivi de la tension des cinq piles connectées en série en fonction du temps durant une mesure

Afin de vérifier la reproductibilité et contrôler la stabilité de nos biopiles enzymatiques, nous avons réédité plusieurs tests avec le même stack. Entre chaque test, il est nécessaire d'attendre que la tension se stabilise autour de 3,5 V.

Cette alimentation a été concluante et on a pu démontrer que ce stack permet d'effectuer plusieurs mesures successives. De plus, l'intérêt réside dans le fait que nous utilisons des éléments biodégradables et non nocifs pour l'environnement.

### III.8.2. Test de grossesse digital Clearblue avec estimation de l'âge de la grossesse

Ce test de grossesse permet de détecter la quantité de l'hormone de grossesse hCG (gonadotrophine chorionique humaine) des urines afin de donner une estimation de l'âge de grossesse.

### III.8.2.1. Caractérisation d'un test de grossesse avec ses 2 piles Zn/MnO<sub>2</sub> LR41 d'origines

Le système est alimenté par deux piles Zn/MnO<sub>2</sub> avec KOH pour électrolyte, LR41 1,5 V.

Par la suite, nous avons caractérisé cet appareil en faisant une mesure des caractéristiques courant/tension en le connectant respectivement à un ampèremètre et au potentiostat.

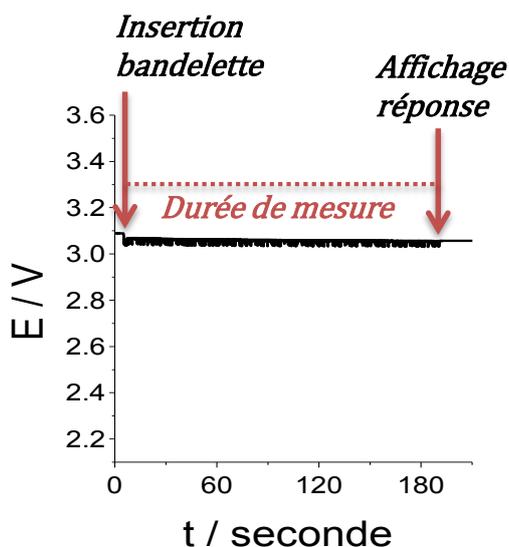
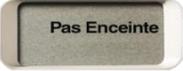


Figure III-23 : Courbe de suivi de la tension de la pile en fonction du temps durant une mesure du test de grossesse

Contrairement au test d'ovulation, ce test est à usage unique et le bâtonnet-test est déjà placé pour la mesure. Ce n'est que lorsque l'on va venir mettre de l'eau sur ce bâtonnet que

l'appareil s'allume et affiche le logo  clignotant montrant que le test est en cours. Comme le montre la Figure III-23, à cette étape, la tension reste stable à 3,05 V (tension de la pile) et l'appareil consomme environ 0,7 mA en continu et cela durant 3 minutes. Puis après 3 minutes, on observe le changement de l'affichage à l'écran montrant le

résultat  du test.

### III.8.2.2. Alimentation directe du test de grossesse à partir de 5 biopiles GOx-NQ/BOD en série

Afin d'alimenter ce test de grossesse, nous avons associé 5 biopiles GOx-NQ/BOD en série sous  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de glucose et oxygène dissous de la solution dans Mc Ilvaine pH 7 en effectuant un flux traversant au sein de chaque biopile. Au démarrage de l'expérience, l'OCV est de 3,5 V ce qui représente en moyenne 0,7 V par pile. Comme pour le test d'ovulation, nous avons dû placer ce stack en parallèle de la pile d'origine, avant de pouvoir la déconnecter afin que le microcontrôleur ne détecte pas une perte de tension. Puis nous avons suivi le même mode opératoire que précédemment. On observe que dès que l'on humidifie le bâtonnet, la tension chute de 3,5 à 2,2 V durant les 180 secondes d'acquisition (Figure III-24). Au moment d'afficher le résultat « négatif » à l'écran, celui-ci s'est éteint. On suppose que 2,2 V est la tension basse pour faire fonctionner ce système et que la puissance délivrée par le stack n'était alors plus suffisante.

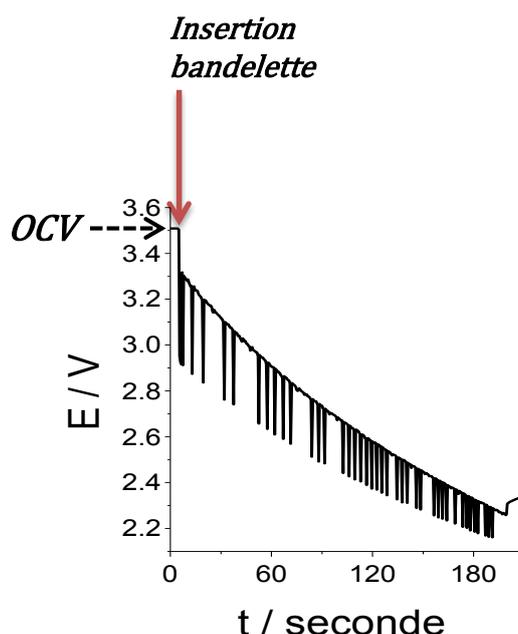


Figure III-24 : Courbe de suivi de la tension des cinq piles connectées en série en fonction du temps durant une mesure

Afin d'alimenter cet appareil, il serait judicieux d'ajouter une biopile afin que la tension soit plus haute au démarrage et que l'on n'atteigne pas cette valeur basse de 2,2 V. Autre solution, pour remédier à cela, on pourrait coupler des biopiles à un circuit électronique de management afin de stocker l'énergie des biopiles enzymatiques et de la restituer de façon continue en vue d'alimenter cet appareil.

### III.9. Alimentation d'un capteur de température à l'aide d'un circuit électronique associé aux biopiles enzymatiques

Cette partie de la thèse a été réalisée au sein du laboratoire Ampère. Cela consiste en l'alimentation d'un capteur de température « Temp101A Data Logger, MadgeTech, Inc., Contocook, NH, USA » via l'utilisation d'un circuit spécifique qui va servir d'intermédiaire entre la ou les piles et la charge (en l'occurrence ici un capteur de température). Ce circuit a pour nom Unité de Gestion de l'Energie (UGE). Ce type de système est couramment utilisé au sein de ce laboratoire, pour les biopiles microbiennes, ainsi on a pu utiliser leur savoir-faire pour l'adapter aux biopiles enzymatiques élaborées au DCM.

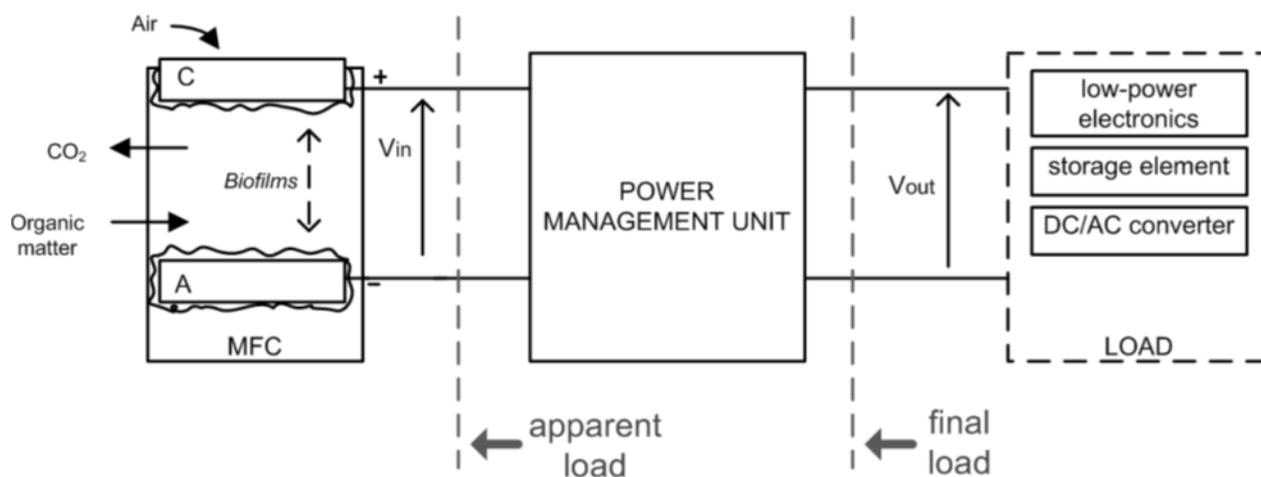


Figure III-25 : Schéma d'un système de gestion de l'énergie avec une biopile microbienne

Cette UGE est indispensable puisque la tension et la puissance générées par nos biopiles enzymatiques sont trop faibles. En effet, la tension généralement demandée par ce type de capteur est de 3,6 V, or, une biopile enzymatique ne fournit qu'environ 0,67 V. Ce circuit va d'une part, élever la tension initiale pour atteindre le seuil de démarrage du capteur et d'autre part, permettre de stocker l'énergie générée par une ou plusieurs biopiles connectées afin de la restituer selon les besoins.

#### III.9.1. L'Unité de Gestion de l'Énergie (UGE)

Une stratégie spécifique de collecte d'énergie est nécessaire pour capturer, stocker et distribuer l'énergie afin d'améliorer l'efficacité, la fiabilité et la durabilité de l'apport

électrique. Pour cette raison, nous utilisons une unité de gestion de l'énergie. Elle peut être composée de capteurs, de convertisseurs électroniques de puissance, de systèmes de contrôle et de dispositifs de traitement numérique. Dans le cas de la production d'énergie à partir de biopiles enzymatiques à glucose- $O_2$ , le nombre de micro-générateurs peut être très différent selon l'application considérée.

Pour ce type d'application, l'UGE doit répondre à plusieurs critères :

- définir le taux de stockage d'énergie,
- capturer l'énergie à la plus grande efficacité possible,
- fournir de l'énergie électrique.

Dans cette partie, une UGE a été conçue et fabriquée par rapport aux caractéristiques électriques de nos piles enzymatiques. Le circuit démarre et fonctionne à basse tension (environ 300 mV) mais la tension doit être élevée pour atteindre des tensions de sortie suffisantes au regard de nos applications.

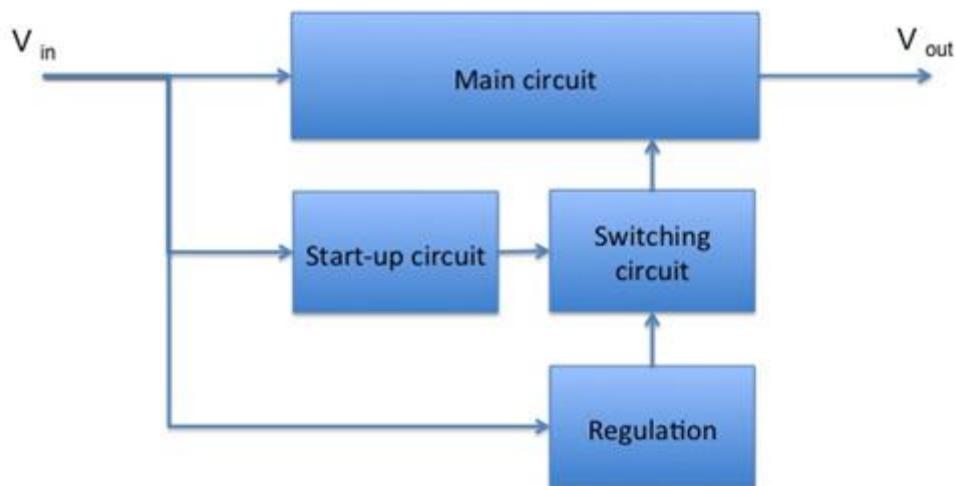


Figure III-26 : Schéma de principe de l'UGE

Cette UGE est composée d'un convertisseur de puissance appelé "Flyback" ('Main circuit' sur la Figure III-26). Le choix de ce convertisseur est dû à sa simplicité et sa facilité relative de mise en œuvre. Il ne nécessite qu'un seul commutateur de puissance (dans notre cas un MOSFET (« Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor ») et deux inductances couplées. La tension secondaire est redressée et filtrée en utilisant seulement une diode et un condensateur. Pour les bas niveaux de puissance, ce qui est notre cas, le flyback fonctionne en DCM "Discontinuous Conduction Mode" généralement le mode préféré de fonctionnement en raison de sa mise en œuvre simple, de réponse transitoire rapide et de faibles pertes. De plus, les caractéristiques du DCM convertisseur flyback sont très attractives pour réaliser

l'adaptation d'impédance du convertisseur, permettant ainsi de faire fonctionner la source facilement à un point de fonctionnement voulu.

L'UGE nécessite aussi un oscillateur permettant de fournir un signal carré de fréquence  $f$  variable pour d'alimenter le MOSFET du convertisseur ('Switching circuit' sur la Figure III-26), d'un circuit de démarrage ('start-up circuit' sur la Figure III-26) permettant d'élever la tension d'entrée (ici environ 0,6 V pour une pile) à un niveau acceptable pour les composants électroniques ( $> 1$  V) et d'une capacité de stockage permettant dans un premier temps de stocker l'énergie et ensuite d'alimenter une charge de façon continue ou intermittente en fonction de ses besoins.

Comme défini ci-dessous, c'est le mode de conduction discontinue avec une fréquence variable qui est choisi car il permet une adaptation assez simple de la résistance interne du convertisseur ('Regulation' sur la Figure III-26). De ce fait, cela permet de moduler la résistance que l'on va appliquer à ou aux piles et donc de les faire fonctionner au point de fonctionnement voulu.

Sur la Figure III-27 ci-dessous est représenté le schéma électrique détaillé de l'UGE avec ces différents composants qui la constitue.

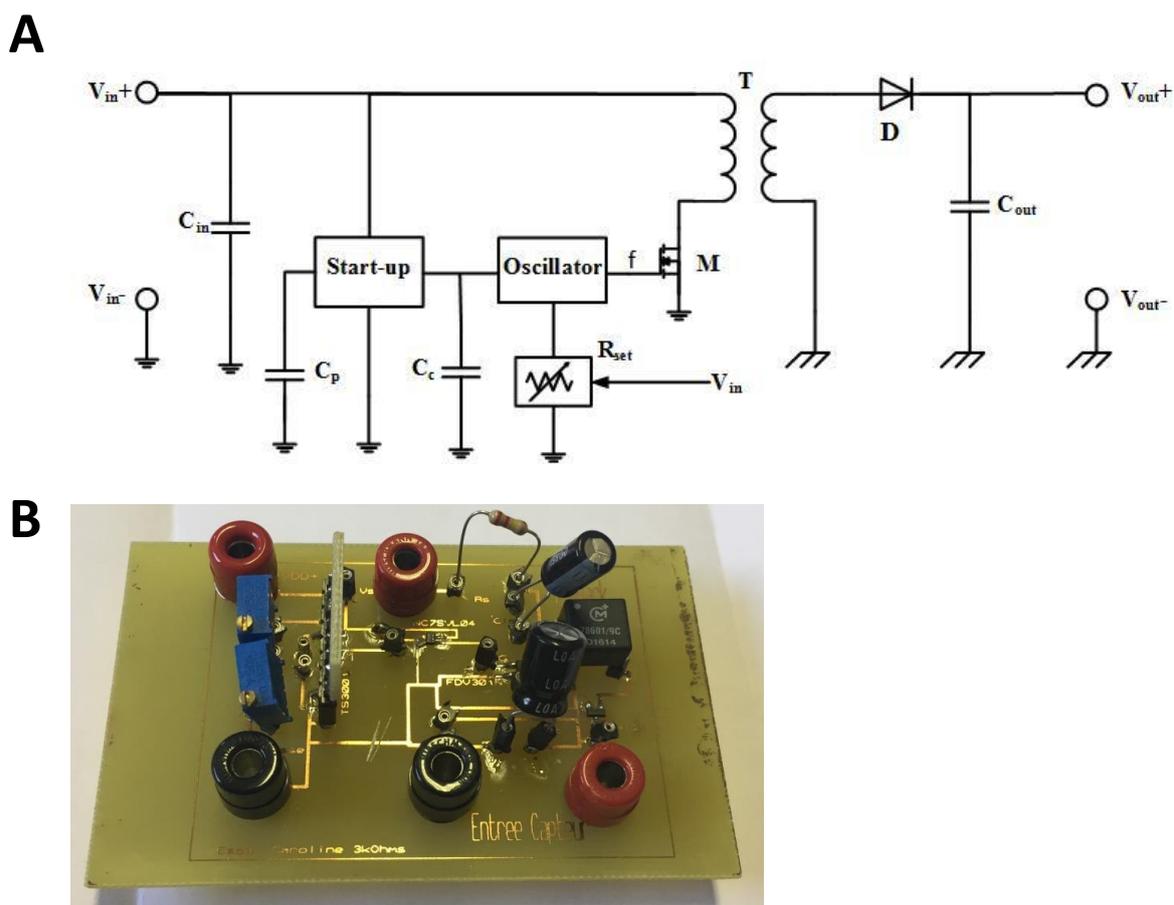


Figure III-27 : (A) Schéma de l'unité de gestion de l'énergie. (B) Photographie de l'UGE

Le commutateur (MOSFET, M sur la Figure III-27A ci-dessus) est piloté par la tension de sortie du régulateur,  $V_{CC}$ . La tension de seuil du commutateur doit être comprise entre 1 et 2 V. En outre, il existe 2 types de pertes dans le commutateur : les pertes de conduction et les pertes de changements. Les pertes de conduction sont causées par la résistance interne drain-source du commutateur  $R_{DS(on)}$  lorsqu'il est traversé par le courant. La capacité drain-source ou la capacité de sortie ( $C_{oss}$ ) crée des pertes de commutation dans tous les MOSFET. L'énergie stockée dans  $C_{oss}$ , dans chaque cycle, est dissipée dans le MOSFET. Ces pertes sont proportionnelles aux valeurs des capacités parasites et à la fréquence de commutation. Pour minimiser les pertes totales dans le commutateur, la fréquence  $f$ , la résistance  $R_{DS(on)}$ , et la capacité drain-source ( $C_{oss}$ ) devraient être minimisées. Un autre type de pertes se produit pendant la commutation on-off. Il est bien connu qu'une commutation plus rapide, entraîne des pertes par commutations plus faibles<sup>224</sup>. Compte tenu de toutes ces considérations, le MOSFET FDV301N apparaît comme un bon candidat pour le convertisseur flyback. Il a une faible tension seuil de sortie ( $V_{GS(th)} \approx 1$  V) et est apte à être contrôlé par l'oscillateur. Il dispose d'une  $R_{DS(on)}$  acceptable et d'une capacité de drain-source très faible ( $C_{oss}$ ). La

résistance interne du convertisseur flyback est indépendante de la tension d'entrée ou de sortie et dépend uniquement de l'inductance primaire, de la fréquence de commutation et du cycle de service. L'impédance d'entrée  $R_{in}$  du convertisseur, correspondant à la résistance que voit la pile est donnée par la formule suivante :

$$R_{in} = \frac{(2L_m f)}{d^2} \quad \text{Équation III.1}$$

avec  $L_m$  : inductance primaire du transformateur

$f$  : fréquence de fonctionnement du convertisseur

$d$  : rapport cyclique du signal d'entrée du mosfet

Pour assurer le fonctionnement en mode de conduction discontinue du convertisseur flyback sur une large gamme de tension d'entrée et pour simplifier le contrôle, le rapport cyclique a été fixé à  $d = 0,5$ <sup>225</sup>.

Le circuit électronique élaboré comporte un transformateur de type 78601/9C (Murata) dont les caractéristiques sont données dans le tableau ci-dessous.

Order code	Turns Ratio $\pm 2\%$	Min. Primary Inductance (mH)	Primary Min. Volt-time Product, Et ( $V\mu s$ )	Typ. Leakage Inductance ( $\mu H$ )	Typ. Interwinding Capacitance (pF)	Max. DC Resistance ( $\Omega$ )	Isolation Voltage (Vrms)	Winding Configuration
78601/9C	1 : 1	17	56	0,86	121	1,30	1000	1

Tableau III-1 : Caractéristiques du transformateur 78601/9C utilisé

En résumé, le convertisseur Flyback a été réalisé comme présenté sur la Figure III-27.

Le Tableau III-2 résume les composants utilisés dans ce convertisseur.

Symbole	Description	Paramètres
<b>Cout</b>	Condensateur de sortie	Calculé par la suite
<b>Cin</b>	Condensateur d'entrée	100 $\mu$ F
<b>D</b>	Diode	BAT54
<b>M</b>	MOSFET	FDV301N
<b>Cp</b>	Condensateur de démarrage	10 $\mu$ F
<b>Cc</b>	Condensateur de démarrage	20 $\mu$ F
<b>T</b>	Transformateur	Décrit Tableau III-1

Tableau III-2 : Composants du convertisseur Flyback

L'oscillateur intégré sélectionné est le TS3001. Il présente une faible consommation de 1  $\mu$ W/1 V à 25 kHz. La fréquence peut être réglée (entre 10 kHz et 110 kHz). La tension de la pile est utilisée pour contrôler la fréquence. En fonction de la tension d'entrée, l'oscillateur produit une fréquence pour modifier la résistance à l'entrée du convertisseur (adaptation d'impédance).

### III.9.2. Alimentation du capteur de température

Habituellement, le capteur doit être alimenté par une batterie au lithium de 3,6 V. Le besoin en énergie de ce capteur a été caractérisé dans les différents modes de fonctionnement.

En fonctionnement normal, après le démarrage, sa consommation est d'environ 0,9 mJ pour un cycle de traitement de données. Cette énergie peut être fournie par des biopiles enzymatiques à glucose-O<sub>2</sub>. En revanche, ce capteur nécessite environ 160 mJ au démarrage, ce qui ne peut être livré par une biopile. En effet, au démarrage, le capteur consomme plus de 2 mA durant environ 20 secondes (comparer avec des centaines  $\mu$ A en régime permanent). Une unité de gestion de l'énergie (UGE) est donc nécessaire pour stocker l'énergie indispensable afin d'assurer le démarrage du capteur (et aussi pour élever la tension à la tension de démarrage du capteur). L'alimentation du capteur par deux biopiles associées en série apparaît comme une bonne solution puisque la tension est proche de 1,3 V et le temps de charge que va mettre notre UGE pour atteindre la tension et l'énergie nécessaire au démarrage du capteur sera de l'ordre d'une dizaine d'heures. Dans cette expérience, deux biopiles GOx-NQ/BOD ont été associées en série, comme présenté précédemment dans la partie III.6 ci-

dessus, sous  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de glucose et oxygène dissous dans Mc Ilvaine pH 7. Le débit appliqué est de  $1 \text{ mL.min}^{-1}$  puisqu'il a été montré que ce débit est optimal pour la stabilisation à haut potentiel de notre biopile lors de décharge continue. A ces deux biopiles associées en série, on applique alors une résistance de  $12 \text{ k}\Omega$ . En effet, on choisit cette valeur de résistance car précédemment dans l'étude de la stabilité de nos biopiles enzymatiques GOx-NQ/BOD (cf. III.4 ci-dessus), il a été démontré qu'à  $6 \text{ k}\Omega$ , une biopile se stabilise à une tension de  $0,45 \text{ V}$  et de ce fait permet de stocker le maximum d'énergie venant des biopiles sur un temps donné. De ce fait, si l'on souhaite associer deux biopiles en série, il faut donc doubler la résistance afin que l'on soit toujours au même point de fonctionnement. La valeur de résistance est réglée *via* l'impédance d'entrée du convertisseur et celle-ci est contrôlée avec la fréquence (cf. Équation III.1). Au démarrage de l'expérience, l'OCV de nos deux biopiles en série est de  $1,35 \text{ V}$ .

La tension nominale du capteur de température doit être de  $3,6 \text{ V}$  et ne doit pas descendre en-dessous d'une tension basse théorique donnée par le constructeur de  $3,17 \text{ V}$ . Dans nos calculs suivants, nous prendrons comme valeur basse  $3,3 \text{ V}$  (au lieu des  $3,17 \text{ V}$ ) pour être sûrs de ne pas descendre en dessous de la tension minimale d'alimentation du capteur et ainsi éviter toute déconnection intempestive. Comme mentionné peu avant, le capteur consomme environ  $160 \text{ mJ}$  au démarrage et  $30 \text{ }\mu\text{W}$  de pertes statiques au repos. Nous choisissons par la suite  $165 \text{ mJ}$  comme valeur d'énergie nécessaire au démarrage pour prendre en compte les imprécisions des appareillages de mesures lors de la caractérisation du capteur.

On utilise la formule suivante pour définir la valeur de la capacité  $C_{out}$  qui servira de stockage d'énergie

$$E = \frac{1}{2} C_{out} V^2 \quad \text{Équation III.2}$$

avec  $E$ , l'énergie ;  $C_{out}$ , la capacité de sortie du convertisseur; et  $V$ , la tension aux bornes de  $C_{out}$

En théorie, notre capacité de stockage doit être de :

$$C_{out} = \frac{2E}{V^2} = \frac{2 \times 165}{(3,6^2 - 3,3^2)} = 159,4 \text{ mF} \quad \text{Équation III.3}$$

En pratique, nous prenons la valeur normalisée se rapprochant le plus de la valeur théorique, ce qui donne  $C_{out} = 157 \text{ mF}$ .

Si l'on charge notre capacité jusqu'à 3,6 V, alors l'énergie stockée sera alors de :

$$E = \frac{1}{2} C_{out} V^2 = 0,5 \times 157 \times (3,6^2 - 0^2) = 1,017 J \quad \text{Équation III.4}$$

Une fois le capteur démarré, la tension aux bornes de celui-ci passera de 3,6 V à 3,3 V (cf. Équation III.3). Le capteur peut fonctionner jusqu'à ce que sa tension descende en dessous de 3,17 V (valeur constructeur). De ce fait l'énergie dont nous disposons pour réaliser des mesures avant déconnection du capteur est de :

$$E = 0,5 \times 157 \times (3,3^2 - 3,17^2) = 66 mJ \quad \text{Équation III.5}$$

Cette valeur correspond à l'énergie dont on dispose pour faire des acquisitions.

On a vu précédemment que le capteur consommait 900  $\mu W$  par acquisition et qu'il avait des pertes statiques d'environ 30  $\mu W$ .

Pour l'expérience, on décide de faire des acquisitions toutes les 10 secondes (6 acquisitions en 1 minute).

Donc en 1 minute, on consomme  $900 \times 6 = 5,4 mJ$  et on a des pertes de l'ordre de  $30 \times (60 - 6) = 1,62 mJ$ , soit une consommation totale de 7,02 mJ.

On peut donc déduire la période d'acquisition possible avec l'énergie dont on dispose :

$$t = \frac{66}{7,02} = 9,4 min \quad \text{Équation III.6}$$

Après environ 11 heures de fonctionnement pour atteindre 3,6 V et une énergie cumulée de 1,017 J (cf. Figure III-28), l'ensemble des piles fournit en sortie du circuit  $P_{out} \approx 15,4 \mu W$  (cf. Figure III-28), soit 0,92 mJ en une minute.

La Figure III-28 ci-dessous montre l'énergie et la puissance pour deux biopiles GOx-NQ/BOD associées en série en tenant compte du rendement du convertisseur qui est de 70%. Cette valeur a été déduite à la suite d'expérimentation réalisée par le laboratoire Ampère.

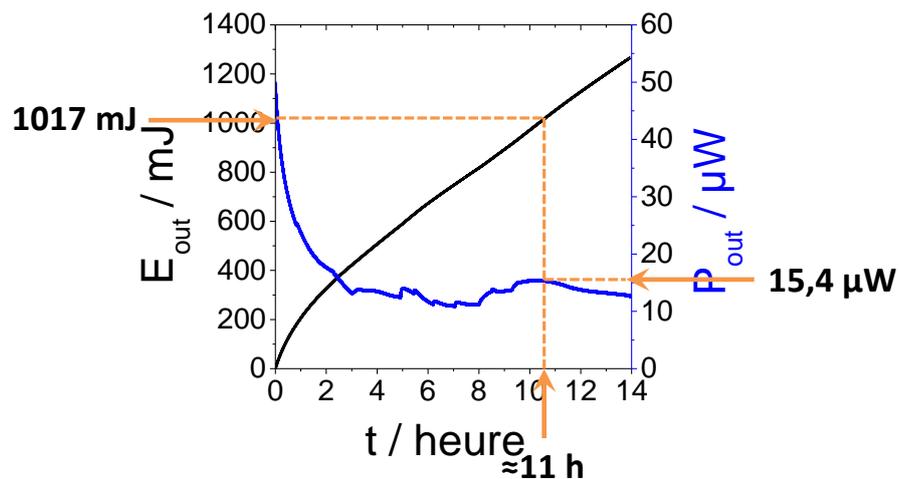


Figure III-28 : Suivi de  $E_{out}$  et  $P_{out}$  en fonction du temps pour deux biopiles GOx-NQ/BOD associées en série

Si l'on soustrait ce qui est fourni de ce qui est consommé, on a :

$$\Delta = 7,02 - 0,93 = 6,1 \text{ mJ} \quad \text{Équation III.7}$$

$$\text{Soit } t = \frac{66}{6,1} \approx 11 \text{ min} \quad \text{Équation III.8}$$

La Figure III-29 illustre graphiquement l'évolution de l'énergie et de la tension au cours du temps durant la période de charge de la capacité mais également lors du fonctionnement du capteur de température ainsi que leurs valeurs caractéristiques.

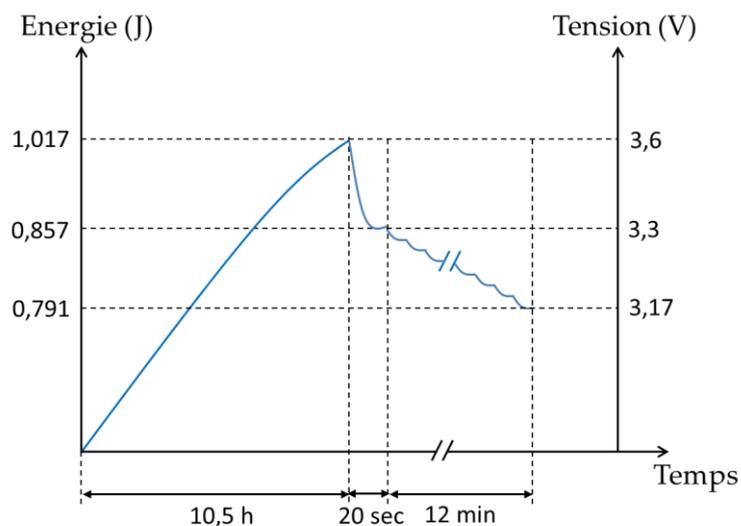


Figure III-29 : Représentation schématique de l'énergie et de la tension en fonction du temps lors de l'alimentation d'un capteur de température

La Figure III-30 montre les acquisitions réalisées de la température en fonction du temps avec un pas d'échantillonnage de 10 secondes. On constate que nos deux biopiles ont donc permis de démarrer et d'alimenter ce capteur durant 700 secondes, soit 70 acquisitions. Au-delà, la tension est passée en-dessous de 3,17 V ce qui ne permet plus d'acquérir de nouvelles valeurs.

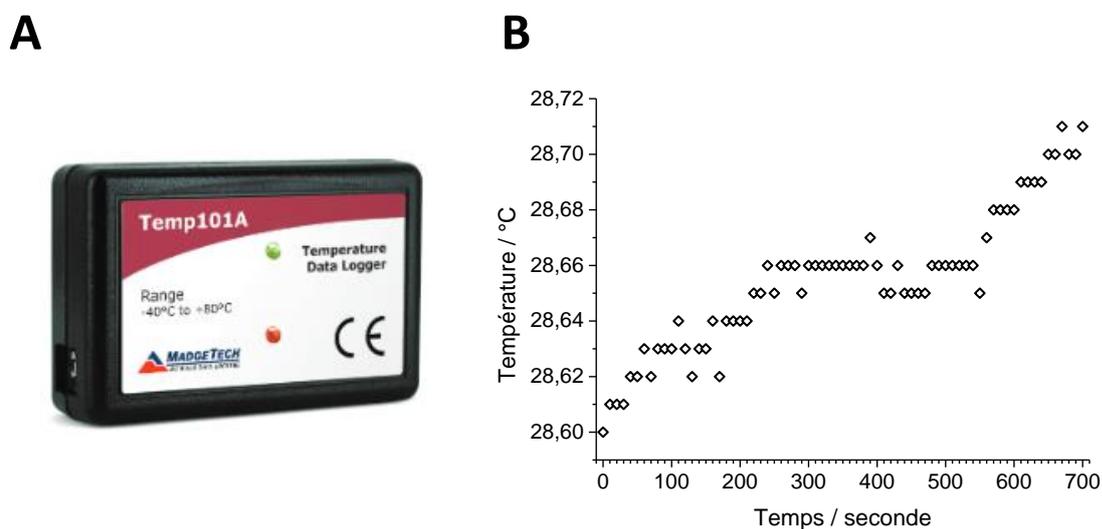


Figure III-30 : (A) Photo du capteur de température « Temp101A Data Logger, MadgeTech, Inc., Contoocook, NH, USA » alimenté. (B) Suivi de la température en fonction du temps avec un pas de 10 secondes entre chaque acquisition, à l'aide d'un capteur de température alimenté par l'énergie générée par deux biopiles GOx-NQ/BOD connectées en série

Les calculs théoriques précédents ont montré qu'il était possible d'alimenter le capteur et de faire des acquisitions durant environ 11 minutes. On voit bien que ceci est validé par les résultats expérimentaux dont les mesures sont reproduites sur la figure ci-dessus. Nous avons pu alimenter le capteur durant un peu plus de 11 minutes.

Ce résultat est très encourageant. En effet, afin d'alimenter plus longtemps notre capteur de température, il serait intéressant de stocker plus d'énergie en choisissant une valeur de  $C_{out}$  plus grande ce qui engendrait un temps de charge plus élevé. Pour éviter d'avoir un temps d'attente trop long avant de pouvoir démarrer le capteur, une solution serait d'associer initialement un nombre de piles plus important afin d'augmenter l'énergie disponible au niveau de la source d'entrée.

### III.10. Conclusion du chapitre III

Une nouvelle conception d'une biopile enzymatique a été présentée permettant l'empilement de deux GBFCs et leur connexion en parallèle et en série. Chaque cellule est alimentée par un flux individuel saturé d'air et de glucose  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  qui est dirigé depuis la cathode à travers une membrane de cellulose vers l'anode. Le Tableau III-3 résume les puissances des différentes biopiles enzymatiques étudiées.

Biopile		Anode		Cathode	OCV (V)	Puissance (mW)
		Enzyme	Méiateur	Enzyme		
		FADGDH	1,4-NQ	BOD	0,83	1,24
		FADGDH	PLQ	BOD	0,7	0,85
		GOx	PLQ	BOD	0,67	1,1
Association	1	GOx	1,4-NQ	BOD	0,66	1,03
	2 en série				1,35	1,82
	2 en parallèle				0,67	1,75
Association	1	GOx	1,4-NQ	HRP	0,6	0,7
	2 en série				1,23	1,74
	2 en parallèle				0,757	2,24

Tableau III-3 : Récapitulatif des biopiles enzymatiques étudiées et leurs performances

En décharge continue, une GBFC individuelle a généré une énergie de 2,5 J (0,7 mW.h), en utilisant une solution de glucose à  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  en 24 heures. Dans ces conditions de décharge, cette biopile était stable plus de 9 jours et a produit 7,9 J (2,2 mW.h). Deux biopiles enzymatiques GOx-NQ/BOD associées fournissent une puissance presque double, par rapport à une biopile seule, lorsqu'elles sont connectées en série ou en parallèle. Les puissances obtenues avec notre conception de GBFCs empilées sont comparables aux meilleures performances dans la littérature<sup>169,223</sup>. Cependant, les rendements énergétiques dépassent la grande majorité des performances décrites. Enfin, un dispositif de démonstration portable pourrait être utilisé pour 17 heures avec deux GBFCs connectées en série. Cette configuration d'écoulement représente un pas en avant vers des applications réalistes pour alimenter des appareils électroniques portables ou biomédicaux. Le seul inconvénient restant est la durée de

vie en cours d'opération. L'utilisation de générateurs peut à ce stade être envisagée pour une utilisation de dispositifs à court terme.

Concernant la biopile GOx-NQ/HRP, le système à flux permet l'empilement de deux GBFC pour sa connexion en parallèle et en série afin de bénéficier de la production de peroxyde d'hydrogène à la bioanode à base de GOx pour fournir au biocatalyseur cathodique, la HRP, son substrat naturel. Chaque cellule a été alimentée par un flux de glucose qui est dirigé à partir de l'anode à travers une membrane de cellulose vers la cathode. De cette façon, la biocathode n'est pas dépendante de la concentration d'oxygène en solution puisque les substrats, glucose et oxygène, sont transformés à la bioanode. En outre, le peroxyde produit est lié à la concentration de glucose et conduit à des performances équilibrées des bioélectrodes. Ainsi, cette conception est prometteuse pour l'alimentation électrique des dispositifs médicaux implantables car tous les produits sont biocompatibles (eau et gluconolactone) et parce que le peroxyde d'hydrogène produit est totalement consommé à la biocathode. Deux biopiles GOx-NQ/HRP ont fourni une bonne puissance de sortie lorsqu'elles sont connectées en série ou en parallèle. Cette configuration permet en outre l'association d'un nombre illimité de GBFC en série et en parallèle, ce qui devrait permettre d'atteindre les sorties de tension et de courant nécessaires pour exécuter des périphériques sans avoir besoin de convertisseurs ou de condensateurs complémentaires.



CONCLUSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES

Ce travail de recherche avait pour objectif d'optimiser la connexion électrique entre des enzymes rédox actives et des électrodes de nanotubes de carbone pour l'élaboration de biopiles glucose-O<sub>2</sub> performantes en vue de la gestion de puissance de l'association de plusieurs biopiles.

Après un chapitre de synthèse bibliographique, la deuxième partie de ce travail de thèse s'est concentrée sur le développement et la fabrication de bioélectrodes nanostructurées enzymatiques par compression mécanique, dans le but d'élaborer des biopiles glucose-O<sub>2</sub> pour l'alimentation de dispositifs électriques à faible demande énergétique. L'intégration d'une importante quantité d'enzymes dans une matrice de CNTs permet l'obtention de bioélectrodes stables et aisément manipulables. La fabrication de différentes bioanodes à base de GOx ou FADGDH et d'un médiateur rédox incorporé à la matrice de CNTs, a permis d'assurer un transfert électronique médié efficace entre l'enzyme et l'électrode pour l'oxydation du glucose.

Par le même procédé de compression mécanique, des biocathodes à base de deux différentes enzymes à cuivre, la laccase et la bilirubine oxydase, ont été étudiées. L'orientation préférentielle de la bilirubine oxydase (BOD) avec la protoporphyrine IX, a permis d'obtenir un transfert électronique direct et un courant de réduction de l'ordre de 2 mA.

Enfin, un autre type de biocathode a été étudié pour la réduction électrocatalytique du peroxyde d'hydrogène à 2 électrons par la peroxydase (HRP) comme alternative à la réduction à 4 électrons du dioxygène par les MCOs pour l'élaboration de biopiles fonctionnelles en milieu physiologique. Cette enzyme permet la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau *via* un transfert direct d'électrons.

Par assemblage de diverses bioélectrodes, des biopiles glucose-O<sub>2</sub> ont donc pu être élaborées. Tout d'abord, la biopile GOx-NQ/Lac présente une puissance de l'ordre de 150  $\mu$ W sous 150 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose. La puissance obtenue n'est pas très élevée. En effet, le pH 5 n'est pas optimal pour la bioanode. Pour les applications recherchées, dans un système physiologique, la laccase à la biocathode s'est avérée ne pas être la meilleure option. Considérant l'importance de ce facteur pH, une biopile GOx-NQ/BOD orientée par la PP IX a été réalisée. Cette biopile représente le système dont les bioélectrodes fonctionnent et présentent une activité maximale dans des conditions pH identiques, à pH 7. L'OCV de cette biopile sous 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose est de 0,65 V ce qui est très proche de la précédente biopile. Une puissance de l'ordre de 0,5 mW est obtenue (0,31 V et 1,6 mA). Si l'on compare cela à la biopile GOx-NQ/Lac, les performances ont été triplées alors que l'on a 10 fois moins de

glucose en solution. Cette biopile présente une très bonne alternative à l'implantable ou à l'alimentation d'un appareil électronique à faible demande énergétique.

Le troisième chapitre s'est focalisé sur la recherche d'un système de biopile optimisant la diffusion du substrat à l'intérieur de la bioélectrode. De ce fait, plusieurs systèmes de biopiles GOx-NQ/BOD à flux de substrat ont été étudiés. La configuration de flux traversant a permis d'obtenir une puissance de l'ordre de 1 mW sous 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose et oxygène dissous. La possibilité d'utiliser cette pile en décharge continue ou en cycle de charge/décharge a été étudiée. Ce système de biopile à flux de glucose a permis également d'associer plusieurs biopiles en série ou en parallèle. Ainsi, l'alimentation d'un minuteur pendant une dizaine d'heures a été possible à l'aide de deux biopiles connectées en série.

Egalement, un test d'ovulation a pu être alimenté sur plusieurs mesures à l'aide de cinq biopiles en série. En effet, l'alimentation d'appareils à usage unique pourrait présenter une application à ces biopiles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub>.

L'utilisation d'un circuit de gestion de l'énergie a également fait ces preuves. En effet, grâce à celui-ci un capteur de température, consommant plus d'énergie que les systèmes à usage unique précédent, a pu être alimenté durant 11 minutes et réaliser des acquisitions toutes les 10 secondes en stockant l'énergie produite par deux biopiles connectées en série.

Une autre biopile basée sur l'association de la HRP à la cathode et la GOx-NQ à l'anode a pu être élaborée. Ce système est très intéressant puisque grâce à la maîtrise du sens du flux de notre substrat, le peroxyde d'hydrogène formé par l'anode peut être alors consommé par la cathode. Cette pile s'est montrée parfaitement opérationnelle en condition physiologique et a mené à l'obtention de puissances de l'ordre de 0,8 mW.

En résumé, ce travail démontre le potentiel des CNTs pour la conception de bioélectrodes pour les biopiles enzymatiques. Ils permettent la fabrication simple d'électrodes de grande surface spécifique accompagnée d'une grande tenue mécanique. Leur morphologie, leurs propriétés électroniques et leur caractère hydrophobe ont permis d'opérer un transfert électronique direct efficace avec différentes métalloenzymes. Enfin, la possibilité de les fonctionnaliser, par voie chimique a permis de développer des méthodes douces d'immobilisation d'enzymes pour la fabrication de biopiles. A l'heure actuelle, seule l'alimentation de dispositifs électroniques a été réalisée. Ces travaux mettent aussi en évidence les aspects à améliorer pour que le concept de biopile enzymatique soit un jour viable. Il serait intéressant de remplacer ces CNTs par du feutre de carbone usuellement

utilisé dans les PACs ou par d'autres matériaux afin de permettre une meilleure catalyse et durée de vie des enzymes.

A ce stade, la biocathode BOD s'avère être limitante pour nos biopiles enzymatiques. Le développement futur de nouvelles méthodes de fonctionnalisation ou de nouvelles méthodes de fabrication d'électrodes nanostructurées peuvent permettre l'optimisation des propriétés des biopiles enzymatiques. L'extension de leurs durées de vie ainsi que l'augmentation des puissances devraient permettre, à terme, d'envisager de véritables applications pour la production d'énergie et l'alimentation de petits dispositifs électroniques. L'amélioration de la stabilité des électrodes nécessite de comprendre les phénomènes à l'origine de cette dernière. A savoir si la diminution des courants catalytiques est attribuable à l'instabilité intrinsèque de l'enzyme ou à l'instabilité de son immobilisation.

Egalement, le système de biopiles à flux élaboré durant cette thèse devrait être miniaturisé avant de pouvoir l'implanter au sein d'une veine par exemple.

On pourrait aussi envisager d'utiliser des biopiles glucose-O<sub>2</sub> pour des applications *in vivo* en vue d'auto-alimenter ce système enzymatique grâce au glucose et au dioxygène présents dans le corps humain.

# BIBLIOGRAPHIE

- (1) M.A, W. R. G. E. XXIV. On Voltaic Series and the Combination of Gases by Platinum. *Philos. Mag. Ser. 3* **1839**, *14*, 127–130.
- (2) Schœnbein, P. C. F. X. On the Voltaic Polarization of Certain Solid and Fluid Substances. *Philos. Mag. Ser. 3* **1839**, *14*, 43–45.
- (3) Haga, K.; Adachi, S.; Shiratori, Y.; Itoh, K.; Sasaki, K. Poisoning of SOFC Anodes by Various Fuel Impurities. *Solid State Ion.* **2008**, *179*, 1427–1431.
- (4) Yan, W.-M.; Chu, H.-S.; Lu, M.-X.; Weng, F.-B.; Jung, G.-B.; Lee, C.-Y. Degradation of Proton Exchange Membrane Fuel Cells due to CO and CO<sub>2</sub> Poisoning. *J. Power Sources* **2009**, *188*, 141–147.
- (5) Savéant, J.-M. Molecular Catalysis of Electrochemical Reactions. Mechanistic Aspects. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2348–2378.
- (6) Yahiro, A. T.; Lee, S. M.; Kimble, D. O. Bioelectrochemistry. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Spec. Sect. Biophys. Subj.* **1964**, *88*, 375–383.
- (7) Vincent, K. A.; Parkin, A.; Armstrong, F. A. Investigating and Exploiting the Electrocatalytic Properties of Hydrogenases. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4366–4413.
- (8) Wait, A. F.; Parkin, A.; Morley, G. M.; dos Santos, L.; Armstrong, F. A. Characteristics of Enzyme-Based Hydrogen Fuel Cells Using an Oxygen-Tolerant Hydrogenase as the Anodic Catalyst. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 12003–12009.
- (9) Yan, Y.-M.; Baravik, I.; Tel-Vered, R.; Willner, I. An Ethanol/O<sub>2</sub> Biofuel Cell Based on an Electropolymerized Bilirubin Oxidase/Pt Nanoparticle Bioelectrocatalytic O<sub>2</sub> - Reduction Cathode. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4275–4279.
- (10) Arechederra, R. L.; Minteer, S. D. Complete Oxidation of Glycerol in an Enzymatic Biofuel Cell. *Fuel Cells* **2009**, *9*, 63–69.
- (11) Kim, Y. H.; Campbell, E.; Yu, J.; Minteer, S. D.; Banta, S. Complete Oxidation of Methanol in Biobattery Devices Using a Hydrogel Created from Three Modified Dehydrogenases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1437–1440.
- (12) Sakai, H.; Nakagawa, T.; Tokita, Y.; Hatazawa, T.; Ikeda, T.; Tsujimura, S.; Kano, K. A High-Power Glucose/oxygen Biofuel Cell Operating under Quiescent Conditions. *Energy Env. Sci* **2009**, *2*, 133–138.
- (13) Zebda, A.; Gondran, C.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cinquin, P.; Cosnier, S. Mediatorless High-Power Glucose Biofuel Cells Based on Compressed Carbon Nanotube-Enzyme Electrodes. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 370.
- (14) Bullen, R. A.; Arnot, T. C.; Lakeman, J. B.; Walsh, F. C. Biofuel Cells and Their Development. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 2015–2045.

- (15) Potter, M. C. Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1911**, *84*, 260–276.
- (16) Bennetto, H. P.; Stirling, J. L.; Tanaka, K.; Vega, C. A. Anodic Reactions in Microbial Fuel Cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1983**, *25*, 559–568.
- (17) Arechederra, R. L.; Boehm, K.; Minteer, S. D. Mitochondrial Bioelectrocatalysis for Biofuel Cell Applications. *Electrochimica Acta* **2009**, *54*, 7268–7273.
- (18) Graham, J. M.; Rickwood, D. *Subcellular Fractionation: A Practical Approach*; IRL Press at Oxford University Press, 1997.
- (19) Arechederra, R.; Minteer, S. D. Organelle-Based Biofuel Cells: Immobilized Mitochondria on Carbon Paper Electrodes. *Electrochimica Acta* **2008**, *53*, 6698–6703.
- (20) Cracknell, J. A.; Vincent, K. A.; Armstrong, F. A. Enzymes as Working or Inspirational Electrocatalysts for Fuel Cells and Electrolysis. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2439–2461.
- (21) Cooney, M. J.; Svoboda, V.; Lau, C.; Martin, G.; Minteer, S. D. Enzyme Catalysed Biofuel Cells. *Energy Environ. Sci.* **2008**, *1*, 320.
- (22) Minteer, S. D.; Liaw, B. Y.; Cooney, M. J. Enzyme-Based Biofuel Cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 228–234.
- (23) Leech, D.; Kavanagh, P.; Schuhmann, W. Enzymatic Fuel Cells: Recent Progress. *Electrochimica Acta* **2012**, *84*, 223–234.
- (24) Calabrese Barton, S.; Gallaway, J.; Atanassov, P. Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4867–4886.
- (25) Willner, I.; Yan, Y.-M.; Willner, B.; Tel-Vered, R. Integrated Enzyme-Based Biofuel Cells-A Review. *Fuel Cells* **2009**, *9*, 7–24.
- (26) Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563–2606.
- (27) Shleev, S.; Jarosz-Wilkolazka, A.; Khalunina, A.; Morozova, O.; Yaropolov, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. Direct Electron Transfer Reactions of Laccases from Different Origins on Carbon Electrodes. *Bioelectrochemistry* **2005**, *67*, 115–124.
- (28) Mano, N.; Kim, H.-H.; Zhang, Y.; Heller, A. An Oxygen Cathode Operating in a Physiological Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6480–6486.
- (29) Giroud, F.; Gondran, C.; Gorgy, K.; Vivier, V.; Cosnier, S. An Enzymatic Biofuel Cell Based on Electrically Wired Polyphenol Oxidase and Glucose Oxidase Operating under Physiological Conditions. *Electrochimica Acta* **2012**, *85*, 278–282.

- (30) Katz, E.; Lioubashevski, O.; Willner, I. Magnetic Field Effects on Bioelectrocatalytic Reactions of Surface-Confined Enzyme Systems: Enhanced Performance of Biofuel Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3979–3988.
- (31) De Lacey, A. L.; Fernández, V. M.; Rousset, M.; Cammack, R. Activation and Inactivation of Hydrogenase Function and the Catalytic Cycle: Spectroelectrochemical Studies. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4304–4330.
- (32) Strack, G.; Luckarift, H. R.; Sizemore, S. R.; Nichols, R. K.; Farrington, K. E.; Wu, P. K.; Atanassov, P.; Biffinger, J. C.; Johnson, G. R. Power Generation from a Hybrid Biological Fuel Cell in Seawater. *Bioresour. Technol.* **2013**, *128*, 222–228.
- (33) Gentil, S.; Lalaoui, N.; Dutta, A.; Nedellec, Y.; Cosnier, S.; Shaw, W. J.; Artero, V.; Le Goff, A. Carbon-Nanotube-Supported Bio-Inspired Nickel Catalyst and Its Integration in Hybrid Hydrogen/Air Fuel Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1845–1849.
- (34) D. Tran, P.; Morozan, A.; Archambault, S.; Heidkamp, J.; Chenevier, P.; Dau, H.; Fontecave, M.; Martinet, A.; Jusselme, B.; Artero, V. A Noble Metal-Free Proton-Exchange Membrane Fuel Cell Based on Bio-Inspired Molecular Catalysts. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2050–2053.
- (35) Falk, M.; Narváez Villarrubia, C. W.; Babanova, S.; Atanassov, P.; Shleev, S. Biofuel Cells for Biomedical Applications: Colonizing the Animal Kingdom. *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 2045–2058.
- (36) Katz, E. *Implantable Bioelectronics*; John Wiley & Sons, 2014.
- (37) Cosnier, S.; Le Goff, A.; Holzinger, M. Towards Glucose Biofuel Cells Implanted in Human Body for Powering Artificial Organs: Review. *Electrochem. Commun.* **2014**, *38*, 19–23.
- (38) Mano, N.; Mao, F.; Heller, A. Characteristics of a Miniature Compartment-Less Glucose–O<sub>2</sub> Biofuel Cell and Its Operation in a Living Plant. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6588–6594.
- (39) Zebda, A.; Cosnier, S.; Alcaraz, J.-P.; Holzinger, M.; Goff, A. L.; Gondran, C.; Boucher, F.; Giroud, F.; Gorgy, K.; Lamraoui, H.; *et al.* Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1516.
- (40) Shoji, K.; Akiyama, Y.; Suzuki, M.; Nakamura, N.; Ohno, H.; Morishima, K. Biofuel Cell Backpack Insect and Its Application to Wireless Sensing. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *78*, 390–395.
- (41) Wang, J. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 814–825.
- (42) Bankar, S. B.; Bule, M. V.; Singhal, R. S.; Ananthanarayan, L. Glucose Oxidase — An Overview. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 489–501.

- (43) Wohlfahrt, G.; Witt, S.; Hendle, J.; Schomburg, D.; Kalisz, H. M.; Hecht, H.-J. 1.8 and 1.9 Å Resolution Structures of the *Aspergillus niger* Glucose Oxidases as a Basis for Modelling Substrate Complexes. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1999**, *55*, 969–977.
- (44) Leskovac, V.; Trivić, S.; Wohlfahrt, G.; Kandrač, J.; Peričin, D. Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*: The Mechanism of Action with Molecular Oxygen, Quinones, and One-Electron Acceptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 731–750.
- (45) PrévotEAU, A.; Courjean, O.; Mano, N. Deglycosylation of Glucose Oxidase to Improve Biosensors and Biofuel Cells. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 213–215.
- (46) Ferri, S.; Kojima, K.; Sode, K. Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases: A Bird's Eye View of Glucose Sensing Enzymes. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2011**, *5*, 1068–1076.
- (47) Milton, R. D.; Giroud, F.; Thumser, A. E.; Minter, S. D.; Slade, R. C. T. Hydrogen Peroxide Produced by Glucose Oxidase Affects the Performance of Laccase Cathodes in Glucose/oxygen Fuel Cells: FAD-Dependent Glucose Dehydrogenase as a Replacement. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19371–19379.
- (48) Oubrie, A. Structure and Mechanism of Soluble Quinoprotein Glucose Dehydrogenase. *EMBO J.* **1999**, *18*, 5187–5194.
- (49) Tanne, C.; Göbel, G.; Lisdat, F. Development of a (PQQ)-GDH-Anode Based on MWCNT-Modified Gold and Its Application in a glucose/O<sub>2</sub>-Biofuel Cell. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 530–535.
- (50) Göbel, G.; Schubart, I. W.; Scherbahn, V.; Lisdat, F. Direct Electron Transfer of PQQ-Glucose Dehydrogenase at Modified Carbon Nanotubes Electrodes. *Electrochem. Commun.* **2011**, *13*, 1240–1243.
- (51) Scherbahn, V.; Putze, M. T.; Dietzel, B.; Heinlein, T.; Schneider, J. J.; Lisdat, F. Biofuel Cells Based on Direct Enzyme–electrode Contacts Using PQQ-Dependent Glucose Dehydrogenase/bilirubin Oxidase and Modified Carbon Nanotube Materials. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *61*, 631–638.
- (52) Halámková, L.; Halánek, J.; Bocharova, V.; Szczupak, A.; Alfonta, L.; Katz, E. Implanted Biofuel Cell Operating in a Living Snail. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5040–5043.
- (53) Ivniński, D.; Atanassov, P.; Apblett, C. Direct Bioelectrocatalysis of PQQ-Dependent Glucose Dehydrogenase. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1562–1568.
- (54) Szczupak, A.; Halánek, J.; Halámková, L.; Bocharova, V.; Alfonta, L.; Katz, E. Living Battery – Biofuel Cells Operating in Vivo in Clams. *Energy Environ. Sci.* **2012**, *5*, 8891.

- (55) Castorena-Gonzalez, J. A.; Foote, C.; MacVittie, K.; Halánek, J.; Halámková, L.; Martínez-Lemus, L. A.; Katz, E. Biofuel Cell Operating in Vivo in Rat. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 1579–1584.
- (56) MacVittie, K.; Halánek, J.; Halámková, L.; Southcott, M.; Jemison, W. D.; Lobel, R.; Katz, E. From “cyborg” Lobsters to a Pacemaker Powered by Implantable Biofuel Cells. *Energy Env. Sci* **2013**, *6*, 81–86.
- (57) Yamamoto, K.; Kurisu, G.; Kusunoki, M.; Tabata, S.; Urabe, I.; Osaki, S. Crystal Structure of Glucose Dehydrogenase from *Bacillus Megaterium* IWG3 at 1.7 Å Resolution. *J. Biochem. (Tokyo)* **2001**, *129*, 303–312.
- (58) Zafar, M. N.; Beden, N.; Leech, D.; Sygmund, C.; Ludwig, R.; Gorton, L. Characterization of Different FAD-Dependent Glucose Dehydrogenases for Possible Use in Glucose-Based Biosensors and Biofuel Cells. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 2069–2077.
- (59) Jia, W.; Valdés-Ramírez, G.; Bandodkar, A. J.; Windmiller, J. R.; Wang, J. Epidermal Biofuel Cells: Energy Harvesting from Human Perspiration. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7233–7236.
- (60) Lalaoui, N.; Means, N.; Walgama, C.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Krishnan, S.; Cosnier, S. Enzymatic versus Electrocatalytic Oxidation of NADH at Carbon-Nanotube Electrodes Modified with Glucose Dehydrogenases: Application in a Bucky-Paper-Based Glucose Enzymatic Fuel Cell. *ChemElectroChem* **2016**, *3*, 2058–2062.
- (61) Giroud, F.; Sawada, K.; Taya, M.; Cosnier, S. 5,5-Dithiobis(2-Nitrobenzoic Acid) Pyrene Derivative-Carbon Nanotube Electrodes for NADH Electrooxidation and Oriented Immobilization of Multicopper Oxidases for the Development of glucose/O<sub>2</sub> Biofuel Cells. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 957–963.
- (62) Gao, F.; Yan, Y.; Su, L.; Wang, L.; Mao, L. An Enzymatic glucose/O<sub>2</sub> Biofuel Cell: Preparation, Characterization and Performance in Serum. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 989–996.
- (63) Narvaez Villarrubia, C. W.; Artyushkova, K.; Garcia, S. O.; Atanassov, P. NAD<sup>+</sup>/NADH Tethering on MWNTs-Bucky Papers for Glucose Dehydrogenase-Based Anodes. *J. Electrochem. Soc.* **2014**, *161*, H3020–H3028.
- (64) Zhang, M.; Mullens, C.; Gorski, W. Coimmobilization of Dehydrogenases and Their Cofactors in Electrochemical Biosensors. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2446–2450.
- (65) Ivnitski, D.; Atanassov, P. Electrochemical Studies of Intramolecular Electron Transfer in Laccase from *Trametes Versicolor*. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 2307–2313.
- (66) Shleev, S.; Christenson, A.; Serezhenkov, V.; Burbaev, D.; Yaropolov, A.; Gorton, L.; Ruzgas, T. Electrochemical Redox Transformations of T1 and T2 Copper Sites in Native *Trametes Hirsuta* Laccase at Gold Electrode. *Biochem. J.* **2005**, *385*, 745–754.

- (67) Reuillard, B.; Abreu, C.; Lalaoui, N.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Ondel, O.; Buret, F.; Cosnier, S. One-Year Stability for a Glucose/oxygen Biofuel Cell Combined with pH Reactivation of the Laccase/carbon Nanotube Biocathode. *Bioelectrochemistry* **2015**, *106*, Part A, 73–76.
- (68) Liu, Y.; Dong, S. A Biofuel Cell Harvesting Energy from Glucose–air and Fruit Juice–air. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 593–597.
- (69) Cracknell, J. A.; McNamara, T. P.; Lowe, E. D.; Blanford, C. F. Bilirubin Oxidase from *Myrothecium Verrucaria*: X-Ray Determination of the Complete Crystal Structure and a Rational Surface Modification for Enhanced Electrocatalytic O<sub>2</sub> Reduction. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 6668.
- (70) Mano, N.; Edembe, L. Bilirubin Oxidases in Bioelectrochemistry: Features and Recent Findings. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *50*, 478–485.
- (71) Kang, C.; Shin, H.; Zhang, Y.; Heller, A. Deactivation of Bilirubin Oxidase by a Product of the Reaction of Urate and O<sub>2</sub>. *Bioelectrochemistry* **2004**, *65*, 83–88.
- (72) Edembe, L.; Gounel, S.; Cadet, M.; Durand, F.; Mano, N. A Highly Efficient O<sub>2</sub> Cathode Based on Bilirubin Oxidase from *Bacillus Pumilus* Operating in Serum. *Electrochem. Commun.* **2012**, *23*, 80–82.
- (73) Gorton, L.; Lindgren, A.; Larsson, T.; Munteanu, F. D.; Ruzgas, T.; Gazaryan, I. Direct Electron Transfer between Heme-Containing Enzymes and Electrodes as Basis for Third Generation Biosensors. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *400*, 91–108.
- (74) Ho, W. O.; Athey, D.; McNeil, C. J.; Hager, H. J.; Evans, G. P.; Mullen, W. H. Mediatorless Horseradish Peroxidase Enzyme Electrodes Based on Activated Carbon: Potential Application to Specific Binding Assay. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *351*, 185–197.
- (75) Agnès, C.; Reuillard, B.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cosnier, S. A Double-Walled Carbon Nanotube-Based glucose/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Biofuel Cell Operating under Physiological Conditions. *Electrochem. Commun.* **2013**, *34*, 105–108.
- (76) Reuillard, B.; Gentil, S.; Carrière, M.; Goff, A. L.; Cosnier, S. Biomimetic versus Enzymatic High-Potential Electrocatalytic Reduction of Hydrogen Peroxide on a Functionalized Carbon Nanotube Electrode. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 5139–5143.
- (77) Ramanavicius, A.; Kausaite-Minkstimiene, A.; Morkvenaite-Vilkonciene, I.; Genys, P.; Mikhailova, R.; Semashko, T.; Voronovic, J.; Ramanaviciene, A. Biofuel Cell Based on Glucose Oxidase from *Penicillium Funiculosum* 46.1 and Horseradish Peroxidase. *Chem. Eng. J.* **2015**, *264*, 165–173.
- (78) Bartlett, P. N. *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*; John Wiley & Sons, 2008.

- (79) Nelson, J. M.; Griffin, E. G. ADSORPTION OF INVERTASE. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *38*, 1109–1115.
- (80) Coman, V.; Ludwig, R.; Harreither, W.; Haltrich, D.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Shleev, and S. A Direct Electron Transfer-Based Glucose/Oxygen Biofuel Cell Operating in Human Serum. *Fuel Cells* **2009**, NA-NA.
- (81) Pellissier, M.; Barrière, F.; Downard, A. J.; Leech, D. Improved Stability of Redox Enzyme Layers on Glassy Carbon Electrodes via Covalent Grafting. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10*, 835–838.
- (82) Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, J.; Waldron, K. C. Glutaraldehyde: Behavior in Aqueous Solution, Reaction with Proteins, and Application to Enzyme Crosslinking. *BioTechniques* **2004**, *37*, 790–802.
- (83) de Lumley-Woodyear, T.; Rocca, P.; Lindsay, J.; Dror, Y.; Freeman, A.; Heller, A. Polyacrylamide-Based Redox Polymer for Connecting Redox Centers of Enzymes to Electrodes. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1332–1338.
- (84) Klotzbach, T.; Watt, M.; Ansari, Y.; Minteer, S. Effects of Hydrophobic Modification of Chitosan and Nafion on Transport Properties, Ion-Exchange Capacities, and Enzyme Immobilization. *J. Membr. Sci.* **2006**, *282*, 276–283.
- (85) Cosnier, S. Biomolecule Immobilization on Electrode Surfaces by Entrapment or Attachment to Electrochemically Polymerized Films. A Review. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 443–456.
- (86) Cosnier, S. Biosensors Based on Immobilization of Biomolecules by Electrogenated Polymer Films. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *89*, 127–138.
- (87) Cosnier, S. Recent Advances in Biological Sensors Based on Electrogenated Polymers: A Review. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 1260–1279.
- (88) Tarasevich, M. R.; Yaropolov, A. I.; Bogdanovskaya, V. A.; Varfolomeev, S. D. 293 - Electrocatalysis of a Cathodic Oxygen Reduction by Laccase. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1979**, *6*, 393–403.
- (89) Yaropolov, A. I.; Tarasevich, M. R.; Varfolomeev, S. D. 192 - Electrochemical Properties of Peroxidase. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1978**, *5*, 18–24.
- (90) Armstrong, F. A.; Hill, H. A. O.; Walton, N. J. Direct Electrochemistry of Redox Proteins. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 407–413.
- (91) Christenson, A.; Dimcheva, N.; Ferapontova, E. E.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Stoica, L.; Shleev, S.; Yaropolov, A. I.; Haltrich, D.; Thorneley, R. N. F.; *et al.* Direct Electron Transfer Between Ligninolytic Redox Enzymes and Electrodes. *Electroanalysis* **2004**, *16*, 1074–1092.

- (92) Ciaccafava, A.; Infossi, P.; Ilbert, M.; Guiral, M.; Lecomte, S.; Giudici-Ortoni, M. T.; Lojou, E. Electrochemistry, AFM, and PM-IRRA Spectroscopy of Immobilized Hydrogenase: Role of a Hydrophobic Helix in Enzyme Orientation for Efficient H<sub>2</sub> Oxidation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 953–956.
- (93) Falk, M.; Blum, Z.; Shleev, S. Direct Electron Transfer Based Enzymatic Fuel Cells. *Electrochimica Acta* **2012**, *82*, 191–202.
- (94) Kavanagh, P.; Leech, D. Mediated Electron Transfer in Glucose Oxidising Enzyme Electrodes for Application to Biofuel Cells: Recent Progress and Perspectives. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 4859.
- (95) Mao, F.; Mano, N.; Heller, A. Long Tethers Binding Redox Centers to Polymer Backbones Enhance Electron Transport in Enzyme “Wiring” Hydrogels. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4951–4957.
- (96) Cosnier, S.; J. Gross, A.; Le Goff, A.; Holzinger, M. Recent Advances on Enzymatic Glucose/oxygen and Hydrogen/oxygen Biofuel Cells: Achievements and Limitations. *J. Power Sources* **2016**, *325*, 252–263.
- (97) Vaz-Dominguez, C.; Campuzano, S.; Rüdiger, O.; Pita, M.; Gorbacheva, M.; Shleev, S.; Fernandez, V. M.; De Lacey, A. L. Laccase Electrode for Direct Electrocatalytic Reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O with High-Operational Stability and Resistance to Chloride Inhibition. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 531–537.
- (98) Gutiérrez-Sánchez, C.; Jia, W.; Beyl, Y.; Pita, M.; Schuhmann, W.; De Lacey, A. L.; Stoica, L. Enhanced Direct Electron Transfer between Laccase and Hierarchical Carbon Microfibers/carbon Nanotubes Composite Electrodes. Comparison of Three Enzyme Immobilization Methods. *Electrochimica Acta* **2012**, *82*, 218–223.
- (99) Pang, H. L.; Liu, J.; Hu, D.; Zhang, X. H.; Chen, J. H. Immobilization of Laccase onto 1-Aminopyrene Functionalized Carbon Nanotubes and Their Electrocatalytic Activity for Oxygen Reduction. *Electrochimica Acta* **2010**, *55*, 6611–6616.
- (100) Gutiérrez-Sánchez, C.; Pita, M.; Vaz-Domínguez, C.; Shleev, S.; De Lacey, A. L. Gold Nanoparticles as Electronic Bridges for Laccase-Based Biocathodes. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17212–17220.
- (101) Bertrand, T.; Jolival, C.; Briozzo, P.; Caminade, E.; Joly, N.; Madzak, C.; Mougin, C. Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, *41*, 7325–7333.
- (102) Blanford, C. F.; Heath, R. S.; Armstrong, F. A. A Stable Electrode for High-Potential, Electrocatalytic O<sub>2</sub> Reduction Based on Rational Attachment of a Blue Copper Oxidase to a Graphite Surface. *Chem. Commun.* **2007**, 1710.

- (103) Sosna, M.; Stoica, L.; Wright, E.; Kilburn, J. D.; Schuhmann, W.; Bartlett, P. N. Mass Transport Controlled Oxygen Reduction at Anthraquinone Modified 3D-CNT Electrodes with Immobilized *Trametes Hirsuta* Laccase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 11882.
- (104) Bourourou, M.; Elouarzaki, K.; Lalaoui, N.; Agnès, C.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Maaref, A.; Cosnier, S. Supramolecular Immobilization of Laccase on Carbon Nanotube Electrodes Functionalized with (Methylpyrenylaminomethyl)anthraquinone for Direct Electron Reduction of Oxygen. *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19*, 9371–9375.
- (105) Lalaoui, N.; Elouarzaki, K.; Goff, A. L.; Holzinger, M.; Cosnier, S. Efficient Direct Oxygen Reduction by Laccases Attached and Oriented on Pyrene-Functionalized Polypyrrole/carbon Nanotube Electrodes. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9281.
- (106) Karaśkiewicz, M.; Nazaruk, E.; Żelechowska, K.; Biernat, J. F.; Rogalski, J.; Bilewicz, R. Fully Enzymatic Mediatorless Fuel Cell with Efficient Naphthylated Carbon Nanotube–laccase Composite Cathodes. *Electrochem. Commun.* **2012**, *20*, 124–127.
- (107) Palmore, G. T. R.; Kim, H.-H. Electro-Enzymatic Reduction of Dioxygen to Water in the Cathode Compartment of a Biofuel Cell. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *464*, 110–117.
- (108) Karnicka, K.; Miecznikowski, K.; Kowalewska, B.; Skunik, M.; Opallo, M.; Rogalski, J.; Schuhmann, W.; Kulesza, P. J. ABTS-Modified Multiwalled Carbon Nanotubes as an Effective Mediating System for Bioelectrocatalytic Reduction of Oxygen. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7643–7648.
- (109) Bourourou, M.; Elouarzaki, K.; Holzinger, M.; Agnès, C.; Le Goff, A.; Reverdy-Bruas, N.; Chaussy, D.; Party, M.; Maaref, A.; Cosnier, S. Freestanding Redox Buckypaper Electrodes from Multi-Wall Carbon Nanotubes for Bioelectrocatalytic Oxygen Reduction via Mediated Electron Transfer. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2885.
- (110) Mano, N.; Soukharev, V.; Heller, A. A Laccase-Wiring Redox Hydrogel for Efficient Catalysis of O<sub>2</sub> Electroreduction. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 11180–11187.
- (111) Kavanagh, P.; Boland, S.; Jenkins, P.; Leech, D. Performance of a Glucose/O<sub>2</sub> Enzymatic Biofuel Cell Containing a Mediated *Melanocarpus Albomyces* Laccase Cathode in a Physiological Buffer. *Fuel Cells* **2009**, *9*, 79–84.
- (112) Beyl, Y.; Guschin, D. A.; Shleev, S.; Schuhmann, W. A Chloride Resistant High Potential Oxygen Reducing Biocathode Based on a Fungal Laccase Incorporated into an Optimized Os-Complex Modified Redox Hydrogel. *Electrochem. Commun.* **2011**, *13*, 474–476.
- (113) Shleev, S.; Elkasmi, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. Direct Heterogeneous Electron Transfer Reactions of Bilirubin Oxidase at a Spectrographic Graphite Electrode. *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 934–939.

- (114) Weigel, M. C.; Tritscher, E.; Lisdat, F. Direct Electrochemical Conversion of Bilirubin Oxidase at Carbon Nanotube-Modified Glassy Carbon Electrodes. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 689–693.
- (115) dos Santos, L.; Climent, V.; Blanford, C. F.; Armstrong, F. A. Mechanistic Studies of the “blue” Cu Enzyme, Bilirubin Oxidase, as a Highly Efficient Electrocatalyst for the Oxygen Reduction Reaction. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13962.
- (116) Ramírez, P.; Mano, N.; Andreu, R.; Ruzgas, T.; Heller, A.; Gorton, L.; Shleev, S. Direct Electron Transfer from Graphite and Functionalized Gold Electrodes to T1 and T2/T3 Copper Centers of Bilirubin Oxidase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2008**, *1777*, 1364–1369.
- (117) Lalaoui, N.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cosnier, S. Fully Oriented Bilirubin Oxidase on Porphyrin-Functionalized Carbon Nanotube Electrodes for Electrocatalytic Oxygen Reduction. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 16868–16873.
- (118) Tsujimura, S.; Tatsumi, H.; Ogawa, J.; Shimizu, S.; Kano, K.; Ikeda, T. Bioelectrocatalytic Reduction of Dioxygen to Water at Neutral pH Using Bilirubin Oxidase as an Enzyme and 2,2'-Azinobis (3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonate) as an Electron Transfer Mediator. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *496*, 69–75.
- (119) Lalaoui, N.; Reuillard, B.; Philouze, C.; Holzinger, M.; Cosnier, S.; Le Goff, A. Osmium(II) Complexes Bearing Chelating N-Heterocyclic Carbene and Pyrene-Modified Ligands: Surface Electrochemistry and Electron Transfer Mediation of Oxygen Reduction by Multicopper Enzymes. *Organometallics* **2016**, *35*, 2987–2992.
- (120) Yaropolov, A. I.; Tarasevich, M. R.; Varfolomeev, S. D. 192 - Electrochemical Properties of Peroxidase. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1978**, *5*, 18–24.
- (121) Zhao, Y.-D.; Zhang, W.-D.; Chen, H.; Luo, Q.-M.; Li, S. F. Y. Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase at Carbon Nanotube Powder Microelectrode. *Sens. Actuators B Chem.* **2002**, *87*, 168–172.
- (122) Chen, X.; Ruan, C.; Kong, J.; Deng, J. Characterization of the Direct Electron Transfer and Bioelectrocatalysis of Horseradish Peroxidase in DNA Film at Pyrolytic Graphite Electrode. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *412*, 89–98.
- (123) Zhao, J.; Henkens, R. W.; Stonehuerner, J.; O'Daly, J. P.; Crumbliss, A. L. Direct Electron Transfer at Horseradish Peroxidase—colloidal Gold Modified Electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **1992**, *327*, 109–119.
- (124) Jia, W.; Jin, C.; Xia, W.; Muhler, M.; Schuhmann, W.; Stoica, L. Glucose Oxidase/Horseradish Peroxidase Co-Immobilized at a CNT-Modified Graphite Electrode: Towards Potentially Implantable Biocathodes. *Chem. – Eur. J.* **2012**, *18*, 2783–2786.

- (125) Ruzgas, T.; Csöregi, E.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G. Peroxidase-Modified Electrodes: Fundamentals and Application. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *330*, 123–138.
- (126) Ivnitski, D.; Artyushkova, K.; Rincón, R. A.; Atanassov, P.; Luckarift, H. R.; Johnson, G. R. Entrapment of Enzymes and Carbon Nanotubes in Biologically Synthesized Silica: Glucose Oxidase-Catalyzed Direct Electron Transfer. *Small* **2008**, *4*, 357–364.
- (127) Salimi, A.; Sharifi, E.; Noorbakhsh, A.; Soltanian, S. Immobilization of Glucose Oxidase on Electrodeposited Nickel Oxide Nanoparticles: Direct Electron Transfer and Electrocatalytic Activity. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 3146–3153.
- (128) Shan, C.; Yang, H.; Song, J.; Han, D.; Ivaska, A.; Niu, L. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on Graphene. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2378–2382.
- (129) Zhao, M.; Wu, X.; Cai, C. Polyaniline Nanofibers: Synthesis, Characterization, and Application to Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 4987–4996.
- (130) Goran, J. M.; Mantilla, S. M.; Stevenson, K. J. Influence of Surface Adsorption on the Interfacial Electron Transfer of Flavin Adenine Dinucleotide and Glucose Oxidase at Carbon Nanotube and Nitrogen-Doped Carbon Nanotube Electrodes. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1571–1581.
- (131) Degani, Y.; Heller, A. Electrical Communication between Redox Centers of Glucose Oxidase and Electrodes via Electrostatically and Covalently Bound Redox Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2357–2358.
- (132) Gregg, B. A.; Heller, A. Cross-Linked Redox Gels Containing Glucose Oxidase for Amperometric Biosensor Applications. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 258–263.
- (133) Schuhmann, W.; Ohara, T. J.; Schmidt, H. L.; Heller, A. Electron Transfer between Glucose Oxidase and Electrodes via Redox Mediators Bound with Flexible Chains to the Enzyme Surface. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1394–1397.
- (134) Mano, N.; Mao, F.; Heller, A. A Miniature Biofuel Cell Operating in A Physiological Buffer. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12962–12963.
- (135) Barrière, F.; Kavanagh, P.; Leech, D. A Laccase–glucose Oxidase Biofuel Cell Prototype Operating in a Physiological Buffer. *Electrochimica Acta* **2006**, *51*, 5187–5192.
- (136) MacAodha, D.; Ferrer, M. L.; Conghaile, P. Ó.; Kavanagh, P.; Leech, D. Crosslinked Redox Polymer Enzyme Electrodes Containing Carbon Nanotubes for High and Stable Glucose Oxidation Current. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 14667.

- (137) Gao, F.; Viry, L.; Maugey, M.; Poulin, P.; Mano, N. Engineering Hybrid Nanotube Wires for High-Power Biofuel Cells. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 1–7.
- (138) Suzuki, A.; Mano, N.; Tsujimura, S. Lowering the Potential of Electroenzymatic Glucose Oxidation on Redox Hydrogel-Modified Porous Carbon Electrode. *Electrochimica Acta* **2017**, *232*, 581–585.
- (139) Reuillard, B.; Le Goff, A.; Agnès, C.; Holzinger, M.; Zebda, A.; Gondran, C.; Elouarzaki, K.; Cosnier, S. High Power Enzymatic Biofuel Cell Based on Naphthoquinone-Mediated Oxidation of Glucose by Glucose Oxidase in a Carbon Nanotube 3D Matrix. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 4892.
- (140) Sakuta, R.; Takeda, K.; Ishida, T.; Igarashi, K.; Samejima, M.; Nakamura, N.; Ohno, H. Multi-Enzyme Anode Composed of FAD-Dependent and NAD-Dependent Enzymes with a Single Ruthenium Polymer Mediator for Biofuel Cells. *Electrochem. Commun.* **2015**, *56*, 75–78.
- (141) Milton, R. D.; Lim, K.; Hickey, D. P.; Minteer, S. D. Employing FAD-Dependent Glucose Dehydrogenase within a Glucose/oxygen Enzymatic Fuel Cell Operating in Human Serum. *Bioelectrochemistry* **2015**, *106, Part A*, 56–63.
- (142) Hou, C.; Lang, Q.; Liu, A. Tailoring 1,4-Naphthoquinone with Electron-Withdrawing Group: Toward Developing Redox Polymer and FAD-GDH Based Hydrogel Bioanode for Efficient Electrocatalytic Glucose Oxidation. *Electrochimica Acta* **2016**, *211*, 663–670.
- (143) D. Milton, R.; P. Hickey, D.; Abdellaoui, S.; Lim, K.; Wu, F.; Tan, B.; D. Minteer, S. Rational Design of Quinones for High Power Density Biofuel Cells. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 4867–4875.
- (144) Ravenna, Y.; Xia, L.; Gun, J.; Mikhaylov, A. A.; Medvedev, A. G.; Lev, O.; Alfonta, L. Biocomposite Based on Reduced Graphene Oxide Film Modified with Phenothiazone and Flavin Adenine Dinucleotide-Dependent Glucose Dehydrogenase for Glucose Sensing and Biofuel Cell Applications. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9567–9571.
- (145) McCreery, R. L. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2646–2687.
- (146) Iijima, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature* **1991**, *354*, 56–58.
- (147) Iijima, S.; Ichihashi, T. Single-Shell Carbon Nanotubes of 1-Nm Diameter. *Nature* **1993**, *363*, 603–605.
- (148) Bethune, D. S.; Klang, C. H.; de Vries, M. S.; Gorman, G.; Savoy, R.; Vazquez, J.; Beyers, R. Cobalt-Catalysed Growth of Carbon Nanotubes with Single-Atomic-Layer Walls. *Nature* **1993**, *363*, 605–607.

- (149) Hirsch, A.; Vostrowsky, O. Functionalization of Carbon Nanotubes. In *Functional Molecular Nanostructures*; Schlüter, A. D., Ed.; Topics in Current Chemistry; Springer Berlin Heidelberg, 2005; pp. 193–237.
- (150) Schnorr, J. M.; Swager, T. M. Emerging Applications of Carbon Nanotubes. *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 646–657.
- (151) Dresselhaus, M. S.; Avouris, P. Introduction to Carbon Materials Research. In *Carbon Nanotubes*; Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Avouris, P., Eds.; Topics in Applied Physics; Springer Berlin Heidelberg, 2001; pp. 1–9.
- (152) Valcárcel, M.; Cárdenas, S.; Simonet, B. M. Role of Carbon Nanotubes in Analytical Science. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4788–4797.
- (153) Ausman, K. D.; Piner, R.; Lourie, O.; Ruoff, R. S.; Korobov, M. Organic Solvent Dispersions of Single-Walled Carbon Nanotubes: Toward Solutions of Pristine Nanotubes. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 8911–8915.
- (154) Vaisman, L.; Wagner, H. D.; Marom, G. The Role of Surfactants in Dispersion of Carbon Nanotubes. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *128–130*, 37–46.
- (155) Baughman, R. H. Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications. *Science* **2002**, *297*, 787–792.
- (156) Cinquin, P.; Gondran, C.; Giroud, F.; Mazabrard, S.; Pellissier, A.; Boucher, F.; Alcaraz, J.-P.; Gorgy, K.; Lenouvel, F.; Mathé, S.; *et al.* A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10476.
- (157) Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. Chemistry of Carbon Nanotubes. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1105–1136.
- (158) Karousis, N.; Tagmatarchis, N.; Tasis, D. Current Progress on the Chemical Modification of Carbon Nanotubes. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 5366–5397.
- (159) Wong, L. S.; Khan, F.; Micklefield, J. Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4025–4053.
- (160) Tsang, S. C.; Guo, Z.; Chen, Y. K.; Green, M. L. H.; Hill, H. A. O.; Hambley, T. W.; Sadler, P. J. Immobilization of Platinated and Iodinated Oligonucleotides on Carbon Nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2198–2200.
- (161) Kim, J.; Jia, H.; Wang, P. Challenges in Biocatalysis for Enzyme-Based Biofuel Cells. *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 296–308.
- (162) Sarma, A. K.; Vatsyayan, P.; Goswami, P.; Minter, S. D. Recent Advances in Material Science for Developing Enzyme Electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2313–2322.

- (163) Drake, R. F.; Kusserow, B. K.; Messinger, S.; Matsuda, S. A TISSUE IMPLANTABLE FUEL CELL POWER SUPPLY. *Trans. - Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **1970**, *16*, 199–205.
- (164) Gellett, W.; Kesmez, M.; Schumacher, J.; Akers, N.; Minteer, S. D. Biofuel Cells for Portable Power. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 727–731.
- (165) Ammam, M.; Fransaer, J. Micro-Biofuel Cell Powered by glucose/O<sub>2</sub> Based on Electro-Deposition of Enzyme, Conducting Polymer and Redox Mediators: Preparation, Characterization and Performance in Human Serum. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1474–1480.
- (166) Sales, F. C. P. F.; Iost, R. M.; Martins, M. V. A.; Almeida, M. C.; Crespilho, F. N. An Intravenous Implantable Glucose/dioxygen Biofuel Cell with Modified Flexible Carbon Fiber Electrodes. *Lab. Chip* **2013**, *13*, 468–474.
- (167) Zhang, L.; Zhou, M.; Wen, D.; Bai, L.; Lou, B.; Dong, S. Small-Size Biofuel Cell on Paper. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *35*, 155–159.
- (168) Endo, M.; Muramatsu, H.; Hayashi, T.; Kim, Y. A.; Terrones, M.; Dresselhaus, M. S. Nanotechnology: “Buckypaper” from Coaxial Nanotubes. *Nature* **2005**, *433*, 476–476.
- (169) Strack, G.; Babanova, S.; Farrington, K. E.; Luckarift, H. R.; Atanassov, P.; Johnson, G. R. Enzyme-Modified Buckypaper for Bioelectrocatalysis. *J. Electrochem. Soc.* **2013**, *160*, G3178–G3182.
- (170) Miyake, T.; Haneda, K.; Yoshino, S.; Nishizawa, M. Flexible, Layered Biofuel Cells. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *40*, 45–49.
- (171) Bazylak, A.; Sinton, D.; Djilali, N. Improved Fuel Utilization in Microfluidic Fuel Cells: A Computational Study. *J. Power Sources* **2005**, *143*, 57–66.
- (172) Moore, C. M.; Minteer, S. D.; Martin, R. S. Microchip-Based Ethanol/oxygen Biofuel Cell. *Lab. Chip* **2005**, *5*, 218–225.
- (173) Jayashree, R. S.; Gancs, L.; Choban, E. R.; Primak, A.; Natarajan, D.; Markoski, L. J.; Kenis, P. J. A. Air-Breathing Laminar Flow-Based Microfluidic Fuel Cell. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16758–16759.
- (174) Cohen, J. L.; Westly, D. A.; Pechenik, A.; Abruña, H. D. Fabrication and Preliminary Testing of a Planar Membraneless Microchannel Fuel Cell. *J. Power Sources* **2005**, *139*, 96–105.
- (175) Sun, M. H.; Velasco Casquillas, G.; Guo, S. S.; Shi, J.; Ji, H.; Ouyang, Q.; Chen, Y. Characterization of Microfluidic Fuel Cell Based on Multiple Laminar Flow. *Microelectron. Eng.* **2007**, *84*, 1182–1185.
- (176) Chen, F.; Chang, M.-H.; Lin, M.-K. Analysis of Membraneless Formic Acid Microfuel Cell Using a Planar Microchannel. *Electrochimica Acta* **2007**, *52*, 2506–2514.

- (177) Choban, E. R.; Waszczuk, P.; Kenis, P. J. A. Characterization of Limiting Factors in Laminar Flow-Based Membraneless Microfuel Cells. *Electrochem. Solid-State Lett.* **2005**, *8*, A348–A352.
- (178) Lim, K. G.; Palmore, G. T. R. Microfluidic Biofuel Cells: The Influence of Electrode Diffusion Layer on Performance. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 941–947.
- (179) Togo, M.; Takamura, A.; Asai, T.; Kaji, H.; Nishizawa, M. Structural Studies of Enzyme-Based Microfluidic Biofuel Cells. *J. Power Sources* **2008**, *178*, 53–58.
- (180) Kamitaka, Y.; Tsujimura, S.; Setoyama, N.; Kajino, T.; Kano, K. Fructose / Dioxygen Biofuel Cell Based on Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 1793–1801.
- (181) Donovan, C.; Dewan, A.; Heo, D.; Beyenal, H. Batteryless, Wireless Sensor Powered by a Sediment Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 8591–8596.
- (182) Degrenne, N.; Allard, B.; Buret, F.; Morel, F.; Adami, S. E.; Labrousse, D. Comparison of 3 Self-Starting Step-up DC:DC Converter Topologies for Harvesting Energy from Low-Voltage and Low-Power Microbial Fuel Cells. In *Proceedings of the 2011 14th European Conference on Power Electronics and Applications*; 2011; pp. 1–10.
- (183) Khaled, F.; Ondel, O.; Allard, B.; Degrenne, N. Voltage Balancing Circuit for Energy Harvesting from a Stack of Serially-Connected Microbial Fuel Cells. In *2013 IEEE ECCE Asia Downunder*; 2013; pp. 392–397.
- (184) Amar, A. B.; Kouki, A. B.; Cao, H. Power Approaches for Implantable Medical Devices. *Sensors* **2015**, *15*, 28889–28914.
- (185) Bhandodkar, A. J.; Wang, J. Wearable Biofuel Cells: A Review. *Electroanalysis* **2016**, *28*, 1188–1200.
- (186) Pankratov, D.; González-Arribas, E.; Blum, Z.; Shleev, S. Tear Based Bioelectronics. *Electroanalysis* **2016**, *28*, 1250–1266.
- (187) Reid, R. C.; Minter, S. D.; Gale, B. K. Contact Lens Biofuel Cell Tested in a Synthetic Tear Solution. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *68*, 142–148.
- (188) Cosnier, S.; Fombon, J.-J.; Labbé, P.; Limosin, D. Development of a PPO-Poly(amphiphilic Pyrrole) Electrode for on Site Monitoring of Phenol in Aqueous Effluents. *Sens. Actuators B Chem.* **1999**, *59*, 134–139.
- (189) Cosnier, S.; Innocent, C.; Allien, L.; Poitry, S.; Tsacopoulos, M. An Electrochemical Method for Making Enzyme Microsensors. Application to the Detection of Dopamine and Glutamate. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 968–971.
- (190) Rasmussen, M.; Ritzmann, R. E.; Lee, I.; Pollack, A. J.; Scherson, D. An Implantable Biofuel Cell for a Live Insect. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1458–1460.

- (191) Shoji, K.; Akiyama, Y.; Suzuki, M.; Hoshino, T.; Nakamura, N.; Ohno, H.; Morishima, K. Insect Biofuel Cells Using Trehalose Included in Insect Hemolymph Leading to an Insect-Mountable Biofuel Cell. *Biomed. Microdevices* **2012**, *14*, 1063–1068.
- (192) Cheng, H.; Yu, P.; Lu, X.; Lin, Y.; Ohsaka, T.; Mao, L. Biofuel Cell-Based Self-Powered Biogenerators for Online Continuous Monitoring of Neurochemicals in Rat Brain. *Analyst* **2012**, *138*, 179–185.
- (193) Miyake, T.; Haneda, K.; Nagai, N.; Yatagawa, Y.; Onami, H.; Yoshino, S.; Abe, T.; Nishizawa, M. Enzymatic Biofuel Cells Designed for Direct Power Generation from Biofluids in Living Organisms. *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4*, 5008.
- (194) Southcott, M.; MacVittie, K.; Halánek, J.; Halámková, L.; Jemison, W. D.; Lobel, R.; Katz, E. A Pacemaker Powered by an Implantable Biofuel Cell Operating under Conditions Mimicking the Human Blood Circulatory System – Battery Not Included. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 6278–6283.
- (195) Pankratov, D.; Falkman, P.; Blum, Z.; Shleev, S. A Hybrid Electric Power Device for Simultaneous Generation and Storage of Electric Energy. *Energy Environ. Sci.* **2014**, *7*, 989–993.
- (196) Agnès, C.; Holzinger, M.; Le Goff, A.; Reuillard, B.; Elouarzaki, K.; Tingry, S.; Cosnier, S. Supercapacitor/biofuel Cell Hybrids Based on Wired Enzymes on Carbon Nanotube Matrices: Autonomous Reloading after High Power Pulses in Neutral Buffered Glucose Solutions. *Energy Environ. Sci.* **2014**, *7*, 1884.
- (197) Yoshino, S.; Miyake, T.; Yamada, T.; Hata, K.; Nishizawa, M. Molecularly Ordered Bioelectrocatalytic Composite Inside a Film of Aligned Carbon Nanotubes. *Adv. Energy Mater.* **2013**, *3*, 60–64.
- (198) Valdés-Ramírez, G.; Li, Y.-C.; Kim, J.; Jia, W.; Bandodkar, A. J.; Nuñez-Flores, R.; Miller, P. R.; Wu, S.-Y.; Narayan, R.; Windmiller, J. R.; *et al.* Microneedle-Based Self-Powered Glucose Sensor. *Electrochem. Commun.* **2014**, *47*, 58–62.
- (199) Falk, M.; Pankratov, D.; Lindh, L.; Arnebrant, T.; Shleev, S. Miniature Direct Electron Transfer Based Enzymatic Fuel Cell Operating in Human Sweat and Saliva. *Fuel Cells* **2014**, *14*, 1050–1056.
- (200) du Toit, H.; Di Lorenzo, M. Continuous Power Generation from Glucose with Two Different Miniature Flow-through Enzymatic Biofuel Cells. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *69*, 199–205.
- (201) Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. Carbon Nanotube/enzyme Biofuel Cells. *Electrochimica Acta* **2012**, *82*, 179–190.
- (202) Hu, L.; Hecht, D. S.; Grüner, G. Carbon Nanotube Thin Films: Fabrication, Properties, and Applications. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 5790–5844.

- (203) Gooding, J. J. Nanostructuring Electrodes with Carbon Nanotubes: A Review on Electrochemistry and Applications for Sensing. *Electrochimica Acta* **2005**, *50*, 3049–3060.
- (204) Hughes, M.; Chen, G. Z.; Shaffer, M. S. P.; Fray, D. J.; Windle, A. H. Electrochemical Capacitance of a Nanoporous Composite of Carbon Nanotubes and Polypyrrole. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 1610–1613.
- (205) Britto, P. J.; Santhanam, K. S. V.; Ajayan, P. M. Carbon Nanotube Electrode for Oxidation of Dopamine. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1996**, *41*, 121–125.
- (206) Reuillard, B.; Le Goff, A.; Cosnier, S. Polypyrrolic Bipyridine Bis(phenantrolinequinone) Ru(II) Complex/Carbon Nanotube Composites for NAD-Dependent Enzyme Immobilization and Wiring. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4409–4415.
- (207) Luz, R. A. S.; Pereira, A. R.; de Souza, J. C. P.; Sales, F. C. P. F.; Crespilho, F. N. Enzyme Biofuel Cells: Thermodynamics, Kinetics and Challenges in Applicability. *ChemElectroChem* **2014**, *1*, 1751–1777.
- (208) Silverstein, T. P. Marcus Theory: Thermodynamics CAN Control the Kinetics of Electron Transfer Reactions. *J. Chem. Educ.* **2012**, *89*, 1159–1167.
- (209) Alzari, P.; Anicet, N.; Bourdillon, C.; Moiroux, J.; Savéant, J.-M. Molecular Recognition of Artificial Single-Electron Acceptor Cosubstrates by Glucose Oxidase? *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6788–6789.
- (210) J. Forrow, N.; S. Sanghera, G.; J. Walters, S. The Influence of Structure in the Reaction of Electrochemically Generated Ferrocenium Derivatives with Reduced Glucose Oxidase. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2002**, *0*, 3187–3194.
- (211) Gibson, Q. H.; Swoboda, B. E. P.; Massey, V. Kinetics and Mechanism of Action of Glucose Oxidase. *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 3927–3934.
- (212) Tsujimura, S.; Kojima, S.; Kano, K.; Ikeda, T.; Sato, M.; Sanada, H.; Omura, H. Novel FAD-Dependent Glucose Dehydrogenase for a Dioxygen-Insensitive Glucose Biosensor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 654–659.
- (213) Wu, Q.; Maskus, M.; Pariente, F.; Tobalina, F.; Fernández, V. M.; Lorenzo, E.; Abruña, H. D. Electrocatalytic Oxidation of NADH at Glassy Carbon Electrodes Modified with Transition Metal Complexes Containing 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione Ligands. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3688–3696.
- (214) Mao, X.; Wu, Y.; Xu, L.; Cao, X.; Cui, X.; Zhu, L. Electrochemical Biosensors Based on Redox Carbon Nanotubes Prepared by Noncovalent Functionalization with 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione. *Analyst* **2011**, *136*, 293–298.

- (215) Ramanavicius, A.; Genys, P.; Ramanaviciene, A. Electrochemical Impedance Spectroscopy Based Evaluation of 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione and Glucose Oxidase Modified Graphite Electrode. *Electrochimica Acta* **2014**, *146*, 659–665.
- (216) Reuillard, B.; Goff, A. L.; Cosnier, S. Non-Covalent Double Functionalization of Carbon Nanotubes with a NADH Oxidation Ru(II)-Based Molecular Catalyst and a NAD-Dependent Glucose Dehydrogenase. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11731–11734.
- (217) Gross, A. J.; Chen, X.; Giroud, F.; Abreu, C.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cosnier, S. A High Power Buckypaper Biofuel Cell: Exploiting 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione with FAD-Dependent Dehydrogenase for Catalytically-Powerful Glucose Oxidation. *ACS Catal.* **2017**.
- (218) Haddad, R.; Mattei, J.-G.; Thery, J.; Auger, A. Novel Ferrocene-Anchored ZnO Nanoparticle/carbon Nanotube Assembly for Glucose Oxidase Wiring: Application to a Glucose/air Fuel Cell. *Nanoscale* **2015**, *7*, 10641–10647.
- (219) Goff, A. L.; Holzinger, M.; Cosnier, S. Recent Progress in Oxygen-Reducing Laccase Biocathodes for Enzymatic Biofuel Cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 941–952.
- (220) Shleev, S.; Tkac, J.; Christenson, A.; Ruzgas, T.; Yaropolov, A. I.; Whittaker, J. W.; Gorton, L. Direct Electron Transfer between Copper-Containing Proteins and Electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2517–2554.
- (221) Morozan, A.; Campidelli, S.; Filoramo, A.; Jusselme, B.; Palacin, S. Catalytic Activity of Cobalt and Iron Phthalocyanines or Porphyrins Supported on Different Carbon Nanotubes towards Oxygen Reduction Reaction. *Carbon* **2011**, *49*, 4839–4847.
- (222) Le Goff, A.; Nedellec, Y.; Abreu, C.; Cosnier, S.; Holzinger, M. Pile À Biocombustible. F064400385/FR/BN, 2017.
- (223) Abreu, C.; Nedellec, Y.; Gross, A. J.; Ondel, O.; Buret, F.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cosnier, S. Assembly and Stacking of Flow-through Enzymatic Bioelectrodes for High Power Glucose Fuel Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**.
- (224) Sakai, H.; Nakagawa, T.; Mita, H.; Kumita, H.; Tokita, Y. Evolution of Sony's Biofuel Cell. *Meet. Abstr.* **2010**, *MA2010-01*, 396–396.
- (225) Changming, P.; Wei, Y.; Ke, Z.; Wenhong, L. DCM, FSM, Dead Time and Width Controllers for a High Frequency High Efficiency Buck DC-DC Converter over a Wide Load Range. *J. Semicond.* **2010**, *31*, 85003.
- (226) Paing, T.; Shin, J.; Zane, R.; Popovic, Z. Resistor Emulation Approach to Low-Power RF Energy Harvesting. *IEEE Trans. Power Electron.* **2008**, *23*, 1494–1501.



# MATERIALS AND METHODS

## I. SOLVENTS, REAGENTS, ENZYMES, MATERIALS AND APPARATUS

### A. Solvents

The dimethylformamide (DMF) used for synthesis was directly used as received from Sigma-Aldrich.

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

### B. Reagents

All the reagents: 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (5-hydroxy-1,4-NQ), 1,4-naphthoquinone (1,4-NQ), 1,10-phenanthroline-5,6-dione (PLQ), ferrocenemethanol (Fc-MeOH) and  $\alpha$ -D-glucose were used as received from Sigma-Aldrich.

The ZnO nanoparticles functionalized by the ferrocene (ZnO-Fc) were synthesized by Haddad R.<sup>217</sup>.

Multi walled carbon nanotubes (MWCNTs) (9.5 nm diameter, purity > 95%) were purchased from Nanocyl.

For buffer solutions and electrolytes preparation: potassium phosphate monobasic (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), potassium phosphate dibasic (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), citric acid monohydrate (HOC(COOH)(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O) were used as received from Sigma Aldrich.

### C. Enzymes

All enzymes: Glucose Oxidase (from *Aspergillus Niger*, 139 U mg<sup>-1</sup>), Catalase (from *bovine liver*, 16000 U mg<sup>-1</sup>), Laccase (from *Trametes Versicolor*, 210 U mg<sup>-1</sup>) and Horseradish Peroxidase (193 U mg<sup>-1</sup>) were used as received from Sigma-Aldrich.

The bilirubin oxidase (from *Myrothecium Verrucaria*, 1.96 U mg<sup>-1</sup>) came from Amano and Glucose Dehydrogenase FAD-dependent (from *Aspergillus Sp.*, 1170 U mg<sup>-1</sup>) from Sekisui.

### D. Materials

The microporous GDL with 210  $\mu\text{m}$  of thickness, 8  $\text{m}\Omega\ \text{cm}^2$  of through plane electrical resistance and through plane air permeability of 70 seconds, was purchased from Paxitech. The 100 % cellulose membrane with 0.13 mm thickness and 64  $\text{g m}^{-2}$  was purchased from FiltraTech. The graphoil came from Panasonic with 0.07 mm thickness and 1000  $\text{W/m K}$  thermic conductivity.

### E. Apparatus

#### - Electrochemical measurement

The electrochemical characterizations of all electrodes (cyclic voltammetry, chronoamperometry, open circuit potential and constant load discharge measurements) in aqueous solutions were carried out in a three-electrode electrochemical cell using a multichannel potentiostat Biologic® VMP3 running EC-lab software 10.39 (Biologic, France). A platinum grid was used as the counter electrode and an Ag/AgCl KCl sat (Ag/AgCl) served as reference electrode. All potentials given in this work are referred to the Ag/AgCl reference electrode.

#### - Characterization of the glucose- $\text{O}_2$ or glucose- $\text{H}_2\text{O}_2$ biofuel cell

For the electrochemical characterization of the biofuel cells, the anode was set as working electrode while the cathode was plugged as counter-reference electrode. Power curves were plotted from successive discharges ( $t = 30$  seconds) at constant current. Measurements were performed in presence of 5  $\text{mmol L}^{-1}$  of glucose under air at room temperature (25 ° C).

#### - Life time and power management of the glucose- $\text{O}_2$ or glucose- $\text{H}_2\text{O}_2$ biofuel cell

In order to examine the life time and practical power management, two operation modes were applied. The use of a peristaltic pump, of course, nullifies the produced energy by the GBFC. In this context, a perfusion bag containing the glucose solution was mounted to replace the pump. Continuous charge-discharge experiment was performed during many hours. A resistance was applied for the discharge from a high voltage to a low voltage. This voltage range was chosen for its compatibility with conventional electrical circuit requirements. When the low voltage value is reached, the circuit was opened and the cell voltage was allowed to

recharge until the initial potential. Another experiment was done, applying a constant discharge with a higher applied resistance of 6 k $\Omega$ .

All experiments were conducted in 0.2 M phosphate buffer (PB, pH 7) or in Mc Ilvaine pH 7 as the supporting electrolyte at room temperature.

## **II. SYNTHESIS**

### *A. Synthesis of PP IX\_MWCNTs*

120 mg of MWCNTs were sonicated in DMF (120 mL) during 30 minutes. Then protoporphyrin IX (40 mg) was added to the reaction medium which is left heated to 80 °C overnight. The reaction mixture was filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE membrane filters (OMNIPORE membrane filters) and the obtained PP IX-MWCNTs and were extensively washed with distilled water, after vigorous sonication, next with acetone and finally dried under reduced pressure.

## **III. FABRICATION OF THE NANOSTRUCTURED MWCNTs PELLETS**

Two techniques were developed:

- For the analysis in electrochemistry cell

The MWCNT pellets were obtained by soft grinding of a mixture of water, enzyme, mediator and MWCNTs. The homogenous paste is then compressed in a hydraulic press to obtain a pellet with 13 mm in diameter and 2 mm thickness. A copper or gold wire is connected to one side of the pellet by a conductive adhesive. Silicon is added to cover the sides, electrical wires and conductive adhesive, leaving one side of the pellet that corresponds to the electrochemical surface of the electrode with a geometrical surface of 1.32 cm<sup>2</sup>.

- For the optimized design by housing

The MWCNT pellets were obtained by soft grinding of a mixture of distilled water, enzyme, mediator and MWCNTs. The homogenous paste is then compressed in a hydraulic press to obtain a pellet with a 1.3 cm diameter and 2 mm thickness in a Plexiglas holding, as opposed

to our classical procedure where a free-standing pellet is obtained. A GDL disc was then connected to one side of the pellet to make the electrical connection with the graphite plate.

### A. Bioanode

#### 1. Bioanode MWCNTs/GOx/Cat/1,4-NQ

The MWCNT pellets were obtained by soft grinding of a mixture of 100  $\mu\text{L}$  of distilled water, 5 mg of 1,4-naphthoquinone, 15 mg of GOx from *Aspergillus Niger* ( $174 \text{ U mg}^{-1}$ ), 10 mg of catalase from bovine liver ( $1600 \text{ U mg}^{-1}$ ) and 35 mg of MWCNTs. Catalase was used in combination with GOx in order to catalyze both the decomposition of hydrogen peroxide and the removal of oxygen at the bioanode.

#### 2. Bioanode MWCNTs/GOx/1,4-NQ

The MWCNT pellet was obtained by soft grinding of a mixture of 100  $\mu\text{L}$  of distilled water, 5 mg of 1,4-naphthoquinone, 15 mg of GOx from *Aspergillus Niger* ( $174 \text{ U mg}^{-1}$ ) and 35 mg of MWCNTs.

#### 3. Bioanode MWCNTs/GOx/Cat/PLQ

The MWCNT pellets were obtained by soft grinding of a mixture of 100  $\mu\text{L}$  of distilled water, 6.6 mg of 1,10-phenanthroline-5,6-dione, 15 mg of GOx from *Aspergillus Niger* ( $174 \text{ U mg}^{-1}$ ), 10 mg of catalase from bovine liver ( $1600 \text{ U mg}^{-1}$ ) and 35 mg of MWCNTs. Catalase was used in combination with GOx in order to catalyze both the decomposition of hydrogen peroxide and the removal of oxygen at the bioanode.

#### 4. Bioanode MWCNTs/GOx/5-hydroxy-1,4-NQ

A mixture of 15 mg of 15 mg of GOx from *Aspergillus Niger* ( $174 \text{ U mg}^{-1}$ ), 5 mg of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone, 35 mg of MWCNTs and 100  $\mu\text{L}$  was used to make the anode pellet.

#### 5. Bioanode MWCNTs/GO<sub>x</sub>/Fc-MeOH

The MWCNT pellet was obtained by soft grinding of a mixture of 100  $\mu\text{L}$  of distilled water, 3.2 mg of ferrocene methanol (same n than 1,4-NQ), 15 mg of GO<sub>x</sub> from *Aspergillus Niger* (174 U  $\text{mg}^{-1}$ ) and 35 mg of MWCNTs.

#### 6. Bioanode MWCNTs/GO<sub>x</sub>/ZnO-Fc

A mixture of 15 mg of 15 mg of GO<sub>x</sub> from *Aspergillus Niger* (174 U  $\text{mg}^{-1}$ ), 100  $\mu\text{L}$  of a dispersion at 11  $\text{mg mL}^{-1}$  of ZnO nanoparticles functionalized with ferrocene and 35 mg of MWCNTs was used to make the anode pellet.

#### 7. Bioanode MWCNTs/FADGDH/1,4-NQ

The MWCNT pellet was obtained by soft grinding of a mixture of 100  $\mu\text{L}$  of distilled water, 5 mg of 1,4-naphthoquinone, 15 mg of FADGDH from *Aspergillus Sp.* (1170 U  $\text{mg}^{-1}$ ) and 35 mg of MWCNTs.

#### 8. Bioanode MWCNTs/FADGDH/PLQ

A mixture of 15 mg of FADGDH from *Aspergillus Sp.* (1170 U  $\text{mg}^{-1}$ ), 6.6 mg of 1,10-phenanthroline-5,6-dione (same n than 1,4-NQ), 35 mg of MWCNTs and 100  $\mu\text{L}$  was used to make the anode pellet.

### *B. Biocathode*

#### 1. Biocathode MWCNTs/Lac

A similar procedure was employed using 15 mg of Laccase from *Trametes Versicolor* (210 U  $\text{mg}^{-1}$ ) and 35 mg of MWCNTs.

### 2. Biocathode PP IX-MWCNTs/BOD

A similar procedure was employed using 15 mg of bilirubin oxidase (BOD) from *Myrothecium Verrucaria* ( $1.96 \text{ U mg}^{-1}$ ) and 35 mg of functionalized MWCNTs. The efficient immobilization and orientation of BOD on MWCNT electrodes by using  $\pi$ -stacked protoporphyrin IX as a direct electron-transfer promoter is used.

### 3. Biocathode MWCNTs/HRP

A similar procedure was employed using 15 mg of peroxidase (HRP) from *Horseradish* ( $193 \text{ U mg}^{-1}$ ) and 35 mg of MWCNTs.



# LISTE DES PUBLICATIONS

## **One-Year Stability for a Glucose/oxygen Biofuel Cell Combined with pH Reactivation of the Laccase/carbon Nanotube Biocathode**

Reuillard, B.; Abreu, C.; Lalaoui, N.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Ondel, O.; Buret, F.; Cosnier, S. - *Bioelectrochemistry* **2015**, *106*, Part A, 73–76.

## **A High Power Buckypaper Biofuel Cell: Exploiting 1,10-Phenanthroline-5,6-dione with FAD-Dependent Dehydrogenase for Catalytically-Powerful Glucose Oxidation**

Gross, A. J.; Chen, X.; Giroud, F.; Abreu, C.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cosnier, S. – *ACS Catalysis*, **2017**.

## **Assembly and Stacking of Flow-through Enzymatic Bioelectrodes for High Power Glucose Fuel Cells**

Abreu, C.; Nedellec, Y.; Gross, A. J.; Ondel, O.; Buret, F.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cosnier, S.. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**.

# BREVET

## **Pile à Biocombustible**

Le Goff, A.; Nedellec, Y.; Abreu, C.; Cosnier, S.; Holzinger, M. F064400385/FR/BN, **2017**.



## AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 25 mai 2016,

Vu la demande des directeurs de thèse

Messieurs F. BURET et O. ONDEL

et les rapports de

M. S. ARBAULT

Directeur de Recherche - Université de Bordeaux - Bordeaux INP - Institut des Sciences  
Moléculaires UMR CNRS 5255 - 33607 Pessac

et de

Mme S. TINGRY

Chargée de Recherche HDR - Institut Européen des Membranes UMR 5635 ENSCM-UMII-  
CNRS - place Eugène Bataillon - 34095 Montpellier

**Madame ABREU Caroline**

est autorisée à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

**Ecole doctorale ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE**

Fait à Ecully, le 14 novembre 2017

P/Le directeur de l'E.C.L.  
La directrice des Etudes

M-A. GALLAND



## Conception et optimisation de piles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub> pour la gestion de puissance

Ce mémoire est consacré à l'optimisation de la connexion enzymatique pour l'oxydation du glucose et la réduction du dioxygène dans une matrice de nanotubes de carbone (CNTs) sous forme de compression dans les biopiles à glucose, et à l'assemblage de biopiles dans un système à flux. Dans un premier temps, le transfert électronique indirect de la glucose oxydase (GOx) et de la glucose déshydrogénase FAD-dépendante (FADGDH) est optimisé dans une matrice nanostructurée de CNTs contenant différents médiateurs rédox. Ces bioanodes ont pu être combinées avec des biocathodes similaires à bases d'enzymes à cuivre, la laccase (Lac) et la bilirubine oxydase (BOD). La biopile GOx-NQ/Lac présente une puissance de l'ordre de 150  $\mu\text{W}$  sous 150  $\text{mmol.L}^{-1}$  de glucose et la biopile GOx-NQ/BOD orientée par la PP IX, quant à elle, possède une puissance de l'ordre de 0,5 mW sous 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  de glucose. Cette biopile présente une très bonne alternative à l'implantable ou à l'alimentation d'un appareil électronique à faible demande énergétique. La partie suivante concerne l'élaboration d'un design de biopile à flux optimisant la diffusion du substrat à l'intérieur de la bioélectrode. De ce fait, plusieurs systèmes de biopiles GOx-NQ/BOD à flux de substrat ont été étudiés. La configuration de flux traversant a permis d'obtenir une puissance de l'ordre de 1 mW sous 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  de glucose et oxygène dissous. La possibilité d'utiliser cette pile en décharge continue ou en cycle de charge/décharge a été étudiée. Ce système de biopile à flux de glucose a permis également d'associer plusieurs biopiles en série ou en parallèle. Ainsi, l'alimentation d'un minuteur et d'un test d'ovulation a pu être réalisée à l'aide de biopiles associées en série. D'autre part, l'utilisation d'un circuit de gestion de l'énergie a permis d'alimenter un capteur de température en stockant l'énergie produite par deux biopiles connectées en série. Cette partie se consacre également à une biopile basée sur l'association de la HRP à la cathode et la GOx-NQ à l'anode. Ce système est très intéressant puisque grâce à la maîtrise du sens du flux de notre substrat, le peroxyde d'hydrogène formé par l'anode peut être alors consommé par la cathode. Cette pile s'est montrée parfaitement opérationnelle en condition physiologique et a abouti à l'obtention de puissances de l'ordre de 0,8 mW.

Mots clefs : bioélectrocatalyse, biopile enzymatique, nanotubes de carbone, structuration des matériaux, gestion de l'énergie

---

## Design and optimization of glucose-O<sub>2</sub> enzymatic cells for power management

This work is devoted to the optimization of the enzymatic connection for the oxidation of glucose and the reduction of dioxygen in a matrix of carbon nanotubes (CNTs) in the form of compression in glucose biofuel cells, and the assembly of biofuel cells in a flow system. First, mediated electron transfer of glucose oxidase (GOx) and FAD-dependent glucose dehydrogenase (FADGDH) is optimized in a nanostructured CNTs matrix containing different redox mediators. These bioanodes could be combined with similar biocathodes with copper enzyme bases, laccase (Lac) and bilirubin oxidase (BOD). The GOx-NQ/Lac biofuel cell has a power of the order of 150  $\mu\text{W}$  under 150  $\text{mmol L}^{-1}$  of glucose and the biofuel cell GOx-NQ/BOD oriented by the PP IX, order of 0.5 mW under 5  $\text{mmol L}^{-1}$  of glucose. This biofuel cell presents a very good alternative to the implantable or to the supply of an electronic device with low energy demand. The next part concerns the development of a biofuel cell design with flux optimizing the diffusion of the substrate inside the bioelectrode. As a result, several GOx-NQ/BOD flow systems have been studied. The flow-through configuration made it possible to obtain a power of the order of 1 mW under 5  $\text{mmol L}^{-1}$  of glucose and dissolved oxygen. The possibility of using this battery in continuous discharge or in charge/discharge cycle has been studied. This biofuel cell system with a glucose flow has also made it possible to associate several biofuel cells in series or in parallel. Thus, the power supply of a timer and an ovulation test could be realised using associated biofuel cells in series. The use of an energy management circuit made it possible to supply a temperature sensor by storing the energy produced by two biofuel cells connected in series. Moreover, this part is about another biofuel cell based on the association of HRP with the cathode and the GOx-NQ at the anode. This system is very interesting because, thanks to the control of the flow direction of our substrate, the hydrogen peroxide formed by the anode can then be consumed by the cathode. This stack was perfectly operational in physiological condition and led to the achievement of powers of the order of 0.8 mW.

Key words: bioelectrocatalysis, enzymatic biofuel cell, carbon nanotubes, structured materials, energy management