



**HAL**  
open science

# Fabrication et optimisation d'une biocathode abiotique pour une biopile à glucose implantable

Gauthier Menassol

► **To cite this version:**

Gauthier Menassol. Fabrication et optimisation d'une biocathode abiotique pour une biopile à glucose implantable. Biotechnologies. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALS016 . tel-03245986

**HAL Id: tel-03245986**

**<https://theses.hal.science/tel-03245986v1>**

Submitted on 2 Jun 2021

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

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

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie, instrumentation, signal**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Gauthier MENASSOL**

Thèse dirigée par

**Donald MARTIN, Professeur des universités, Université  
Grenoble Alpes, et codirigée par**

**Lionel DUBOIS, Directeur de recherche, SyMMES CEA**

Et encadrée par

**Abdelkader ZEBDA, chercheur INSERM, Université Grenoble  
Alpes**

préparée au sein des **Laboratoires TIMC-IMAG & SyMMES**  
dans **l'École Doctorale pour la Santé, la Cognition et  
l'Environnement**

## **Fabrication et optimisation d'une biocathode abiotique pour une biopile à glucose et oxygène implantable**

Thèse soutenue publiquement le « **23 Octobre 2020** »,  
devant le jury composé de :

**Dr Sophie TINGRY Directrice de recherche CNRS,**  
Institut Européen des Membranes, (Rapporteur)

**Dr Stéphane MARINESCO Chargé de recherche**  
Université Claude Bernard Lyon1, (Rapporteur)

**Dr Karine SERVAT Maître de conférences**  
Université de Poitiers (Membre)

**Pr Pankaj, VADGAMA**  
Queen Mary University (Membre)

**Pr Naceur, BELGACEM**  
INP Grenoble (Président)





*« You can't always get what you want, but if you try  
sometimes, you get what you need »*

*The Rolling Stones*

## Remerciements

Voilà, enfin, finalement : les remerciements !

Si pour vous, lecteurs qui ne connaissez pas les engrenages et cheminements de la rédaction d'un manuscrit, il s'agit de la partie par laquelle vous commencez votre lecture, sachez qu'il s'agit de la partie par laquelle se termine ma rédaction.

Et d'ailleurs, par où commencer ces remerciements ? Et bien par ceux sans qui ce projet n'aurait pu exister et qui m'ont donné ma chance : mes encadrants. Ce magnifique projet s'est partagé entre l'équipe SyNABI du laboratoire TIMC-IMAG et le laboratoire CAMPE du CEA tous les deux sur Grenoble. Mon implication dans ce projet a commencé par une entrevue avec Lionel Dubois, responsable du laboratoire CAMPE. Lors de ce premier entretien j'ai tout de suite été marqué et impressionné, par la pertinence, la culture et l'intelligence des propos tenus par Lionel. Merci Lionel de m'avoir donné cette chance.

Grâce à cet entretien, j'ai pu alors rencontrer, dans un deuxième temps, Abdelkader Zebda, chargé de recherche de l'équipe SyNABI. Ce deuxième entretien m'a permis d'entrevoir la pensée d'Abdel. Par la suite, sa créativité, son esprit sans limite et sa grande capacité d'écoute m'ont mis en confiance quant à l'avancement de ce projet. Merci Abdel de m'avoir soutenu corps et âmes tout au long de ce projet et ceci même lors des périodes les plus sombres.

Et puis, j'ai pu rencontrer Donald Martin, responsable de l'équipe SyNABI au TIMC-IMAG. Don qui, avec Lionel, ont été les directeurs de cette thèse. Durant ce projet, j'ai eu la chance d'échanger avec Don et ainsi découvrir l'immense complexité du monde biologique. Merci Don pour tes conseils avisés et nos discussions.

Je suis très reconnaissant aux membres de mon jury pour les corrections apportées à ce manuscrit. Je tiens à remercier les rapporteurs Sophie Tingry et Stéphane Marinesco pour avoir examiné et évalué mes travaux, une tâche complexe qui a donné lieu à des discussions pertinentes. Je suis très honoré d'avoir eu pour président Naceur Belgacem, dont le charisme et l'éloquence ont sublimé la soutenance de cette thèse. Je remercie également Karine Servat dont les conseils et les remarques ont été mis à profit afin de valoriser ce manuscrit. Et puis je remercie grandement le professeur Pankaj Vadgama. Thank you professor, your way of thinking, your speeches and your manners should be an exemple for all of us.

Les grandes avancées, qui ne sont pas le fruit du hasard, sont nées de la somme des résultats échangés. En d'autres termes : seul on va vite, mais ensemble nous irons loin. Sans ce crédo mon travail ne pourrait être, c'est pourquoi je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai travaillé quotidiennement, que cela soit fréquemment ou même occasionnellement, merci à :

Jean-Pierre Alcaraz, qui m'a soutenu et aidé à de maintes reprises et dont la joie et la bonne humeur transforment un jour sombre en une douce après-midi ensoleillée.

Awatef Ben-Tahar, dont le sourire et les conseils sont magnifiques et précieux.

François Boucher, sans qui les implantations n'auraient jamais eu lieu et dont l'humour combiné à son intelligence a su m'émerveiller. Merci également pour tes nombreux conseils et participations aux CSI.

Céline Beaujean, grâce à qui les techniques de culture cellulaire n'ont (presque) plus de secret pour moi, ainsi que son aide précieuse pour les études histologiques et les caractérisations aux microscopes.

Philippe Cinquin, que j'admire beaucoup. Un grand merci pour sa pertinence, son intellect et sa finesse lors de nos échanges durant les meetings Synabi.

Jacques Thelu, qui a su me motiver, m'aider et m'accompagner, ce qui est particulièrement vrai pour la mise en forme de l'hydrogel de PVA et pour comprendre les phénomènes qui l'entourent.

Je tiens particulièrement à remercier mes collègues et amis de bureau : Pierre Harispuru, pour tous ces cafés et ces moments geek. Sebastian Kohler, thank you so much. I won't find the word (even in french) to tell you thank you as much as you deserve it. But I bet that beers will do it better than me (no worries, not french one).

Je remercie aussi Myriam, du laboratoire LGP2 avec qui notre compréhension de l'électrochimie a été mise à rude épreuve. Je remercie Charly du laboratoire IC2MP de Poitiers pour ses catalyseurs et sa complicité au cours des réunions du projet IMABIC.

Je tiens aussi à remercier le service informatique de TIMC pour m'avoir aidé à de nombreuses reprises suite aux (trop) nombreuses péripéties que j'ai vécues avec les ordinateurs et disques durs (paix à leurs âmes). Merci Olivier, Nouredine et Aristide.

Et tous ceux du laboratoire TIMC qui ont participé de près ou de loin à ce magnifique projet : Marco, Thomas, Boudewijn, Angélique Stéphanou et Angélique Abrouta ; ainsi que les personnes du laboratoire CAMPE : Yves, Coralie, Harish et Johan.

Sur une note plus personnelle, je tiens à remercier tous mes amis. L'équipe des Tsakos, sans cette deuxième famille je n'aurais jamais pu développer mon assurance (je vous l'accorde, j'ai encore du travail), mon endurance psychologique et ce manuscrit n'aurait jamais vu le jour. Merci Tasso pour ton éternelle persévérance et ta confiance en toi. Merci Gab pour ton humour et ces années si précieuses passées ensemble à l'école de la vie. Merci Prousty pour ta malice et ta clairvoyance qui m'inspirent. Merci Nico pour tous tes « Capitaine Chao » qui peuvent mener loin, je ne sais toujours pas où ils commencent et j'ai toujours peur de savoir où ils se terminent. A mes yeux vous êtes exemplaire. Toutes les pages blanches ne suffiraient pas pour aligner l'immensité de nos délires.

Également, je souhaite remercier ma troisième famille, la famille grenobloise, sans laquelle la vie de tous les jours serait moins animée. Merci aux trois mousquetaires rencontrés à Sète et dont l'aventure n'a pas fini de nous faire rêver : merci à Rémi, d'être l'homme à LA bêtise à dire mais surtout pour ton franc-parler qui, même s'il peut jouer des tours, nous remet en question et nous permet d'avancer ensemble. Merci à Tristan, pour ces soirées, ces festivals, ces fous rires, ces moments philosophiques qui, bizarrement se déroulent toujours tardivement. Merci à Mathias, avec qui on est capable de condenser l'expérience d'une vie en quelques jours et ainsi rencontrer Dark-Vador, apprendre à se servir d'une tondeuse et goûter un miel sans pareil. Et merci à Florentin, Carole, Antoine, Yan, Esra, Doudou, Marjo, Coraline, Laure et tous ceux que j'oublie (pardonnez-moi, ou venez réclamer votre dû à la maison).

Et puis, je remercie ma famille. Mes grands-parents, Papi, Mamie, Abuela, Abuelo, qui m'ont servi d'exemple durant toute ma vie et m'inspireront encore pour les années à venir. A ma sœur et à mon frère, ceux avec qui j'ai tant partagé et avec qui aujourd'hui encore nous partageons, il me faudra encore des années pour avoir une complicité aussi aigüe avec d'autres personnes. Merci Marie de prendre soin de mon frère et de mon magnifique petit neveu. A mon père, mon papa, l'homme que j'admire le plus, pour sa patience sans égale, son sens de la répartie et sa philosophie. A ma mère, ma maman, qui a toujours cru et croira toujours en moi et qui n'a vécu et ne vit encore aujourd'hui que pour ses enfants.

Et pour finir, je ne sais à quel point, ni comment, remercier celle qui, chaque jour, chaque heure et chaque minute est avec moi. Celle sans qui cette petite aventure que l'on appelle la vie n'aurait pas de sens. Celle qui supporte mes humeurs, mes maux et parfois même mes crises (dont elle peut être la cause, si, si, je me dois d'être juste dans mes propos). Merci Mélanie mon amour. Moment Waouh ?

J'espère n'oublier personne, de toute manière, comme disait Boris Vian « On n'oublie rien de ce que l'on veut oublier : c'est le reste que l'on oublie ». Ne vous considérez pas comme un simple « reste », mais plutôt comme la part d'un tout qui, à un moment ou à un autre, d'une manière ou d'une autre, a aidé à l'élaboration de ce manuscrit.

# Sommaire

Sommaire .....	6
Liste des abréviations .....	10
Liste des Figures .....	12
Résumé .....	18
Abstract .....	20
Introduction Générale .....	22
Chapitre 1 : Etat de l'art .....	25
1 Les dispositifs médicaux implantables actifs.....	26
1.1 Définitions et classifications .....	26
1.2 Miniaturisation des DMIs .....	28
1.3 Matériaux d'enrobage et de composition des DMIs.....	29
1.4 Besoin énergétique des DMIs : exemple du pacemaker .....	30
2 Les différentes sources d'énergie électrique pour un DMIs .....	33
2.1 Principes et définitions des accumulateurs.....	34
2.2 Exemples de sources utilisées .....	34
2.3 Systèmes de récupération d'énergie du corps.....	36
2.3.1 L'énergie mécanique .....	36
2.3.2 L'énergie thermique .....	36
2.3.3 L'énergie chimique .....	37
2.4 Les Piles à combustible.....	37
2.4.1 Définitions .....	37
2.4.2 Les Biopiles à combustible.....	40
2.4.2.1 Les Biopiles enzymatiques ou hybrides.....	41
2.4.2.1.1 Exemples de biopiles à glucose (GBFC).....	43
2.4.2.1.2 Exemples <i>in vivo</i> .....	45
2.4.2.2 Les Biopiles abiotiques .....	50
2.4.2.2.1 Biopiles abiotiques <i>in vitro</i> .....	50
2.4.2.2.2 Biopiles abiotiques <i>in vivo</i> .....	54
3 Conclusion et problématique .....	57
Chapitre 2 : Fabrication d'une biocathode abiotique pour la réduction de l'oxygène .....	59
1 Introduction.....	60
2 Choix des matériaux .....	61
2.1 Catalyseurs de la réaction de réduction de l'oxygène .....	61
2.1.1 Réaction de réduction de l'oxygène.....	61

2.1.2	Catalyseur de l'ORR avec support carboné .....	62
2.1.3	Dopage de support carboné .....	63
2.1.4	Catalyseur de type Me-N/C .....	63
2.2	Les liants .....	67
2.2.1	Le chitosan (Chi) .....	68
2.2.2	Le Polyvinyle alcool (PVA).....	70
3	Catalyseur Abiotique .....	73
3.1	Synthèse .....	73
3.2	Caractérisations.....	74
3.2.1	Spectroscopie des rayons X.....	74
3.2.2	Électrochimie en électrode tournante .....	76
3.2.2.1	Impacte de la concentration d'oxygène .....	76
3.2.2.2	Impact de la température .....	77
3.2.2.3	Impact de la concentration en glucose .....	78
4	Fabrication d'une biocathode abiotique .....	79
4.1	Biocathode compressée .....	79
4.1.1	Fabrication.....	79
4.1.2	Caractérisation électrochimique .....	80
4.1.2.1	Biocathode compressée avec Chitosan.....	80
4.1.2.2	Biocathode compressée avec Chitosan-Génépine .....	83
4.1.2.3	Biocathode compressée avec PVA .....	85
4.1.2.4	Etude de la concentration de liant .....	88
4.1.2.5	Impact de l'homogénéisation.....	89
4.1.2.6	Stabilité dans le temps des électrodes compressées .....	90
4.1.2.6.1	Chitosan .....	90
4.1.2.6.2	Chitosan génépine .....	91
4.1.2.6.3	PVA.....	92
4.2	Biocathode lyophilisée .....	93
4.2.1	Fabrication.....	94
4.2.2	Caractérisation Electrochimique .....	95
4.3	Biocathode lyophilisée sur support conducteur .....	97
4.3.1	Fabrication.....	97
4.3.2	Caractérisation Electrochimique .....	97
5	Mesure BET.....	99
6	Conclusion .....	100
Chapitre 3 : Etudes biologiques de la biocathode et de ses composants .....		103

1	Introduction.....	104
2	Etude de la biocompatibilité d'un implant.....	107
3	Etude <i>in vitro</i> : Etude de cytocompatibilité.....	108
4	Culture cellulaire .....	111
4.1	Chitosan.....	111
4.2	Hydrogel de PVA.....	112
4.3	Catalyseur Fe/N-rGO .....	113
4.4	Cathodes : Chitosan-Fe/N-rGO et PVA-Fe/NrGO .....	114
5	Etude <i>in vivo</i> .....	115
5.1	Choix du lieu d'implantation .....	115
5.2	Implantation de Biocathodes compressées et lyophilisées autoportées.....	116
5.2.1	Design des électrodes.....	116
5.2.2	Stérilisation.....	117
5.2.3	Implantation .....	118
5.2.4	Euthanasie .....	119
5.3	Etude histologique.....	121
5.3.1	Electrode de Fe/N-rGO et chitosan compressée a (Fils vert).....	121
5.3.2	Electrode de Fe/N-rGO et chitosan Compressée b (Fils orange) .....	122
5.3.3	Electrode de Fe/N-rGO et chitosan lyophilisée c (Fils blanc) .....	123
5.4	Mesures électrochimiques après implantation.....	124
6	Conclusion .....	126
Chapitre 4 : Utilisation de la biocathode en biopile.....		127
1	Introduction.....	128
2	Fabrication et caractérisation de bioanodes enzymatiques et abiotiques .....	129
2.1	Anodes Abiotiques.....	129
2.1.1	Culture cellulaire en présence de catalyseur abiotique .....	129
2.1.2	Fabrication des anodes abiotiques.....	130
2.1.3	Performances électrochimiques d'anodes abiotiques .....	131
2.1.3.1	Après fabrication .....	131
2.1.3.2	Après implantation .....	132
2.1.3.3	Conclusion sur les performances électrochimiques.....	134
2.2	Anode Enzymatique.....	134
2.2.1	Choix des matériaux .....	134
2.2.1.1	La Glucose oxydase (GOx) .....	135
2.2.1.2	La Glucose Déshydrogénase FAD dépendante (FAD-GDH) .....	136
2.2.1.3	Connexion de l'enzyme à l'électrode .....	136

2.2.1.4	Transfert d'électron de l'enzyme à l'électrode .....	137
2.2.1.5	Support conducteur de l'électrode : les nanotubes de carbone.....	139
2.2.2	Fabrication des anodes enzymatiques .....	140
2.2.3	Performances électrochimiques des anodes enzymatiques.....	140
2.2.3.1	FAD-GDH-Naphtoquinone-MWCNTs.....	140
2.2.3.2	GOx-Catalase-Naphtoquinone-MWCNT.....	141
2.2.4	Conclusion sur les performances électrochimiques.....	142
3	Fabrication et caractérisation de la biopile.....	143
3.1	Résultats <i>in vitro</i> .....	143
3.1.1	Biopile FAD-GDH-NQ-MwCNTs et Fe/N-rGO.....	143
3.1.2	Biopile GOx-Catalase-NQ-MwCNTs et Fe/N-rGO .....	144
3.2	Fabrication des biopiles implantables .....	144
3.3	Implantation .....	146
3.3.1	Zone d'implantation .....	146
3.3.2	Résultats préliminaires .....	146
3.3.2.1	Euthanasies anticipées .....	146
3.3.2.1.1	Résultats Biologiques .....	146
3.3.2.1.2	Résultats Electrochimiques.....	147
3.3.2.2	Euthanasies après 1 mois d'implantation .....	148
3.3.2.2.1	Résultats Biologiques .....	148
3.3.2.2.2	Résultats Electrochimiques.....	148
3.3.2.2.2.1	Biopiles GOx-Catalase-NQ-MWCNTs et Fe/N-rGO .....	148
3.3.2.2.2.2	Biopiles FAD-GDH-NQ-MWCNTs et Fe/N-rGO .....	151
3.3.2.3	Euthanasies après 3 mois d'implantations.....	152
3.3.2.3.1	Résultats Biologiques .....	153
3.3.2.3.2	Résultats Electrochimiques.....	153
4	Conclusion .....	154
	Conclusion Générale et Perspectives .....	156
	Annexes .....	163
	Références.....	171

## Liste des abréviations

AFC	Piles à combustible alcaline
Bfc	Biopiles a combustible
CA	Chronoampéométrie
CB	Noir de carbone
Chi	chitosan
CNT	nanotubes de carbone
CP	Chronopotentiométrie
CV	Voltammétrie cyclique
d.d.p.	différence de potentiel
DA	Degrès d'acétylation
DET	transfert direct d'électron
DL	Dose létale
DM	Dispositifs Médicaux
DMFC	Piles à combustible à méthanol direct
DMI	Dispositifs Médicaux Implantables
DMIa	Dispositif Médical Implantable actif
DMSO	diméthylsulfoxyde
DRX	Diffraction des rayons X
e.g.	par exemple
ECS	Electrode au calomel saturée
ED	Eau désionisée
ERH	Electrode réversible à hydrogène
f.e.m.	force électromotrice
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FCF	Fibre de carbone flexible
Fe	Fer
GBFC	biopiles à glucose
GDH	Glucose Déshydrogénase
GO	Oxyde de Graphène
GOx	Glucose Oxydase
I	iodure
IP	Indice de polydispersité
IR	Infrarouge
LED	diode électroluminescente
Li	Lithium
LSV	voltampérométrie à balayage linéaire
MCFC	Piles à combustible à carbonate fondu
Me	Métaux de transition
MEB	Microscope électronique balayage
MEMS	Microsystèmes électromécaniques
MET	transfert électronique médiaté
MWCNTs	nanotubes de carbones a multi feuillets
N	Azote
NQ	1,4-naphtoquinone

OCV	Tension en circuit ouverte
ORR	Réaction de réduction de l'oxygène
P2VP	Poly(2-vinylpyridine)
PAA	Acide Polyacrylique
PàC	Piles à combustible Piles à combustible à l'acide
PAFC	phosphorique
PAMAM	Polyamidoamine
PBS	Solution saline de tampon phosphate
PDMS	polydiméthylsiloxane
PET	Polyéthylène téréphtalate
pH	Potentiel hydrogène
PP	Polypropylène
PQQ	Pyrroloquinoline Quinone
Pt	Platine
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PU	Polyuréthane
PVA	Polyvinyle alcool
PVAc	Polyacétate de vinyle
PVI	Polyvinylimidazole
PVP	Poly vinyl pyrrolidone
RDE	Electrode à disque tournant
rGO	Oxyde de Graphène réduit
RPM	Tour par minute
SOFC	Piles à combustible à oxyde solide
SWCNTs	nanotubes de carbones a mono feuillets
TAH	cœur totalement artificiel
U	Tension
VAD	dispositif d'assisatnce ventriculaire
XPS	Spéctrométrie photoélectronique X
Z	Impédance

## Liste des Figures

Figure 1: Espérance de vie d'après [3].....	26
Figure 2: Exemples de DMIs selon [6] .....	27
Figure 3: Exemples de pompes à insuline a/ dispositif développé par Arnold Kadish [9] ; b/ DMIa commercialisé par Medtronic [10].....	28
Figure 4: Exemple de cœurs artificiels commercialisés par Thorates [11-13] .....	29
Figure 5: Exemple de biomatériaux utilisés pour des DMIs [19].....	30
Figure 6: Exemple de DMIa et leurs besoins en énergies et durée de vie correspondant [20] .....	31
Figure 7: Exemples de consommation énergétique de pacemakers issus du commerce [21-23].....	32
Figure 8: Paramètre de conception des pacemakers.....	32
Figure 9: Photos de pacemakers développés par Biotronik et Vitatron .....	32
Figure 10: Exemple d'accumulateurs primaires et secondaire, leurs composants et propriétés [27] .	35
Figure 11: collecteur d'énergie piézoélectrique implanté sur le cœur d'un cochon et capable de générer in vivo de l'énergie électrique d'après [30] .....	36
Figure 12: Générateur thermoélectrique implanté dans un lapin selon Jing Liu et al. [33] .....	37
Figure 13: Schéma de fonctionnement d'une pile à combustible à hydrogène et oxygène.....	38
Figure 14: Processus de réductions de l'oxygène à 4 ou 2 électrons en milieu basique .....	41
Figure 15: Exemples d'enzymes utilisées à la cathode.....	42
Figure 16: Exemples d'enzymes utilisées à l'anode.....	42
Figure 17 : Schéma d'une pile à glucose et oxygène enzymatique.....	43
Figure 18: a/ Photo de la biopile implantée par Mano et al. b/Densité de puissances en fonction de la tension, biopile implantée près de la peau (courbe en gras), et proche du centre (courbe fine) ; d'après [44] .....	43
Figure 19: a/ Etude de la stabilité des électrodes, stabilité relative (%) au temps (h) pour une électrode en fibre CNT (cercles pleins) et une fibre de carbone (cercles ouverts). Tampon salin de phosphate à 37°C, + 0,3 V / Ag / AgCl, sous 1 atm d'oxygène et agitation vigoureuse, m = 170 µg b/ Courbe de densité de puissance pour une Bfc fabriquée avec des fibres de carbone (cercles ouverts) et des fibres CNT (cercles pleins) dans un tampon salin de phosphate, sous air, 15 mM de glucose à 37°C [45].....	44
Figure 20: Schéma, photo, et mesure OCP de la Bfc implantée selon [47].....	45
Figure 21: a/Bfc implanté dans blaberus discoidalis b/Densité de puissance vs densité de courant; rouge: Bfc implantée; Contrôles : noir: carbone vierge, bleu : polymère d'osmium seul, vert : sans GOx à l'anode, violet : sans tréshalase à l'anode [49].....	46
Figure 22:a/ Rat dont le tissu crémaster a été extériorisé et exposé à la Bfc b/ OCV des électrodes en contact avec le tissu crémaster c/ courant mesuré des électrodes en contact avec le tissu crémaster [51] .....	47
Figure 23: Fabrication d'une biopile implantable : a/ Composant d'une biopile : Bioélectrode, tube en silicone, membrane de dialyse b/ Bioanodes et biocathodes scellées dans du silicone c/ Biopile dans	

un sac DacronH d/ Connexions électriques de la Bfc implantée e/ Schéma des réactions ; d'après [52] .....	47
Figure 24: Photos a/ du cathéter dans la jugulaire b/des électrodes c/ cathéter et Bfc dans la jugulaire ; d/ tension en fonction de la densité de courant de la Bfc in vivo e/ densité de puissance en fonction de la tension in vivo [53].....	48
Figure 25:A/ Photo de la bfc implantée dans le cerveau du rat avec (a) et sans (b) saignement local. B/Densités de puissances de la bfc mesurées en présence de 2,5 mM de glucose tamponné (1), de CSF (2), implantée dans le cerveau du rat (3) [54].....	49
Figure 26:A/ bioelectrodes enrobées de membranes de chitosan B/ système de télétransmission des datas C/ Bfc encapsulée dans une enveloppe Dacron et connectée au système de télétransmission D/ Schéma de télétransmission des données [55].....	49
Figure 27: Schéma et stabilité dans le temps d'une anode abiotique de nanoparticules de Pt sur du carbone selon Von Stetten [63].....	51
Figure 28: Diagramme de Pourbaix et CV à différents pH d'une électrode MWCNT/(DPDE)Rh <sup>III</sup> ( $v = 50$ $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , Britton-Robinson buffer, 25°C) [64] .....	52
Figure 29: a/ Procédure d'accroche du complexe [Cu(Hdatrz)] sur une électrode d'oxyde d'indium- étain b/ Schéma du principe de fonctionnement du bio-détecteur de PPI auto-alimenté [66].....	53
Figure 30:a/ Courbe de polarisation (noir) et de puissance (bleu) de la biopile abiotique de Zhao et al. avec 5 mM de glucose b/ relation entre la densité de puissance max et le temps de fonctionnement selon Zhao et al. [66] .....	53
Figure 31: Schémas de la biopile abiotique selon Drake et al. [67] .....	54
Figure 32: a/ Bfc abiotique de Weidlich et al. composée d'une anode métallique d'aluminium et d'une cathode métallique de d'argent b/Puissances des bfc implantées dans des chiens : 1/ 180 jours, $r=5$ KOhms ; 2/ 40 jours et in vitro pendant 110 jours, $r= 13,25$ kOhms [68].....	55
Figure 33: a/ Schéma de la pile abiotique implanté de Weidlich et al. composée d'une anode d'aluminium et de deux cathodes de charbon actif b/ Tensions de bfc implantées dans des chiens : 1/ 330 jours, $r=4,7$ kOhms ; 2/ 809 jours, $r=8,2$ kOhms [68] .....	56
Figure 34: Diagramme de Ragone montrant différentes sources d'énergies électriques et les besoins de pacemakers .....	57
Figure 35: Potentiels redox des réactions de réduction de l'oxygène en conditions alcaline et acide (Les potentiels thermodynamiques des réactions de réduction à 1 électron impliquant la forme de superoxyde de l'oxygène ne sont pas explicités car leurs valeurs dépendent fortement des solvants et conditions utilisés.) [69-70] .....	61
Figure 36: Courbes de polarisation ; histogramme de densité de courant maximale obtenue et stabilité de la densité de courant sur 3000 cycle selon [91] .....	64
Figure 37: voie de synthèse du graphène exempté d'impureté selon Dubois et al. [109] .....	65
Figure 38: a/ DRX, b/ Courbes ATG, c/ spectre FT-IR, d/ spectre Raman, du graphite d'origine, GO et Sn-rGO ; e/ Spectre XPS f/ Spectre XPS à haute résolution de Sn-rGO; les régions C1s et Sn montrent aucune trace de Sn, d'après [109].....	66
Figure 39: Structures de la chitine, du chitosan et de la cellulose .....	68

Figure 40: Réaction d'hydrolyse du polyacétate de vinyle donnant du polyvinyle alcool partiellement dés-acétylé .....	70
Figure 41: Interactions intermoléculaires par liaison hydrogène entre différentes chaînes de PVA ...	70
Figure 42: Mécanismes de formation de l'hydrogel de PVA.....	71
Figure 43: Schéma de synthèse du catalyseur Fe/NrGO .....	73
Figure 44: Mesure en microscopie électronique à balayage du catalyseur Fe/N-rGO .....	73
Figure 45: a/ Spectre d'ensemble d'une mesure XPS faite sur le matériau Fe/N-rGO avec vue en détail de la répartition des configurations des atomes de : b/ carbones ; c/ azotes ; d/fer e/ oxygènes ; et leur f/ les formes impliquant les atomes d'azotes et carbones .....	74
Figure 46: Voltammétrie cyclique en RDE du catalyseur Fe/N-rGO, Bleu sous azote, Orange sous air, Gris saturé en oxygène, dépôt de $300 \mu\text{G}/\text{cm}^2$ sur électrode tournante en carbone vitreux, $10 \text{ mV}/\text{s}$ , $1000 \text{ rpm}$ , $T=25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine .	76
Figure 47: Voltammétrie en RDE, Bleu à $25^\circ\text{C}$ , Vert $30^\circ\text{C}$ , Jaune $37,7^\circ\text{C}$ , $m = 300 \mu\text{G}\cdot\text{cm}^{-2}$ , $10 \text{ mV}/\text{s}$ , $1000 \text{ rpm}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine .....	77
Figure 48: Voltammétrie cyclique en RDE, Bleu sans glucose, Orange avec $5 \text{ mM}$ de Glucose, Gris avec $100 \text{ mM}$ de Glucose, $m = 300 \mu\text{G}\cdot\text{cm}^{-2}$ , $10 \text{ mV}/\text{s}$ , $100 \text{ rpm}$ , $T = 37,7^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine .....	78
Figure 49: Voltammétrie cyclique en RDE, Orange à $100 \text{ rpm}$ , Gris à $1000 \text{ rpm}$ , en présence de $100 \text{ mM}$ de glucose, $m = 300 \mu\text{G}\cdot\text{cm}^{-2}$ , $10 \text{ mV}/\text{s}$ , $T = 37,7^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine .....	78
Figure 50: Schéma de fabrication des électrodes compressées et exemples d'électrodes.....	79
Figure 51 : Schéma d'isolation du fils conducteur .....	80
Figure 52: Chronoampérogramme d'une électrode comportant le liant chitosan, $m = 30 \text{ mg}$ , $e = 0,3 \text{ cm}$ , $d = 0,5 \text{ cm}$ , $t = 3,29 \text{ h}$ bullage d'oxygène, $E = 100 \text{ mV}$ vs ECS, $T = 25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, contre électrode de platine.....	81
Figure 53:a/ Voltammétrie cyclique, $0,1 \text{ mV}/\text{s}$ ; b/ Chronopotentiométrie $I = -1\mu\text{A}$ après $26\text{h}$ de contrainte à $I = -1 \text{ mA}$ ; c/ Chronoampérométrie $E = 100 \text{ mV}$ vs ECS d'une électrode comportant le liant chitosan, $m = 30 \text{ mg}$ , $e = 0,3 \text{ cm}$ , $d = 0,5 \text{ cm}$ , $T=25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine .....	82
Figure 54: Chronoampérogramme d'une électrode comportant le liant chitosan réticulé avec génépine, $m = 30 \text{ mg}$ , $e = 0,3 \text{ cm}$ , $d = 0,5 \text{ cm}$ , $t = 73,5 \text{ h}$ bullage d'azote, $t = 74,9 \text{ h}$ bullage d'oxygène, $E = 200 \text{ mV}$ vs ECS, $T = 25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine.....	83
Figure 55: a/ Voltammétrie cyclique, $0,1 \text{ mV}/\text{s}$ ; b/ Chronopotentiométrie $I = -1 \mu\text{A}$ après $26 \text{ h}$ de contrainte à $I = -1 \text{ mA}$ ; c/ Chronoampérométrie $E = 100 \text{ mV}$ vs ECS d'une électrode comportant le liant réticulé chitosan, $m = 30 \text{ mg}$ , $e = 0,3 \text{ cm}$ , $d = 0,5 \text{ cm}$ , $T = 25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine .....	84
Figure 56: Chronoampérogramme d'une électrode comportant le liant PVA, $m = 30 \text{ mg}$ , $e = 0,3 \text{ cm}$ , $d = 0,5 \text{ cm}$ , $t = 2,49 \text{ h}$ injection d'oxygène, $E = 200 \text{ mV}$ vs ECS, $T=25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine .....	85

Figure 57: a/ Voltammétrie cyclique, 0,1 mV/s ; b/ Chronopotentiométrie I = -1 $\mu$ A après 26h de contrainte à I = -1 mA ; c/ Chronoampérométrie E = 100 mV vs ECS d'une électrode comportant le liant PVA, m = 30 mg, e = 0,3 cm, d = 0,5 cm, T = 25°C, solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine .....	86
Figure 58: a/ Voltammétrie cyclique, 0,2mV/s ; b/ Chronopotentiométrie I = 1 $\mu$ A après 26 h de décharge ; c/ Chronoampérométrie E = 100 mV d'une électrode comportant le liant PVA 10%, m = 30 mg, e = 0,3 cm, d = 0,5 cm, T = 25°C, solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine .....	88
Figure 59: Schéma du système d'homogénéisation à rouleaux.....	89
Figure 60: Chronoampérométries E = 100 mV, sous air, d'électrodes comportant le liant a/chitosan et b/PVA ; m = 30 mg, e = 0,3 cm, d = 0,5 cm, T = 25°C, solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine .....	90
Figure 61: Chronoampérométries effectuées à 100 mV, courbe bleu électrode après fabrication, courbe orange après 27 mois de stockage, liant chitosan, m = 30 mg, e = 0,3 cm, d = 0,5 cm, T = 25°C, solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine.....	91
Figure 62: Structure de la molécule de génépine .....	91
Figure 63: Chronoampérométries effectuées à 200 mV, courbe bleu électrode après fabrication, courbe orange après 27 mois de stockage, liant chitosan réticulé avec génépine, m = 30 mg, e = 0,3 cm, d = 0,5 cm, T = 25°C, solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine.....	92
Figure 64: Chronoampérométries effectuées à 200 mV, courbe bleu électrode après fabrication, courbe orange après 27 mois de stockage, liant PVA, m = 30 mg, e = 0,3 cm, d = 0,5 cm, T = 25°C, solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine.....	93
Figure 65: Schéma de fabrication d'électrodes lyophilisées .....	94
Figure 66: Chronoampérogramme d'une électrode lyophilisée, m = 30 mg, e = 0,3 cm, d = 0,5 cm, t = 93,48 h injection d'oxygène, E= 100 mV, T = 25°C, solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine.....	95
Figure 67: a/ Chronopotentiométrie : bleu 5 $\mu$ A.cm <sup>-2</sup> , orange 25,5 $\mu$ A.cm <sup>-2</sup> , grise 51 $\mu$ A.cm <sup>-2</sup> , jaune 255 $\mu$ A.cm <sup>-2</sup> , bleu 510 $\mu$ A.cm <sup>-2</sup> b/ Potentiels en fonction de la densité de courant c/ Chronoampérométrie E = 100 mV ; m = 30 mg, e = 0,3 cm, d = 0,5 cm, T = 25°C, solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine .....	96
Figure 68: Schéma de fabrication des électrodes lyophilisées sur support conducteur.....	97
Figure 69: a/ Chronoampérométrie effectuée à 100mV vs ECS ; densité de courant d'après a/ exprimé en : b/ surfacique, c/ volumique, d/ massique ; E = 100 mV ; e = 0,3 cm, d = 0,5 cm, T = 25°C, solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine.....	98
Figure 70: Mesure de surface spécifique par BET, adsorption-désorption de N <sub>2</sub> à 77K.....	99
Figure 71: Tableau résumant les différentes performances des cathodes développées dans le chapitre 2.....	101
Figure 72 : Illustration des différentes sources potentielles de dysfonctionnement d'un biocapteur implanté selon les auteurs [20].....	105
Figure 73 : Membranes d'hydrogel de PVA explantées après 24 jours [152] .....	106

Figure 74: Tableau récapitulant différents tests de biocompatibilité.....	107
Figure 75: Cellules 3T3-L1 après 10 jours d'incubations à : T=37°C ; 5% CO <sub>2</sub> ; en milieu de culture : DMEM (Dubelco Modified Eagle Medium) .....	110
Figure 76: Cellules 3T3-L1 a/ en présence de chitosan ; b/contrôle ; après 72 heures d'incubation à: T=37°C ; 5% CO <sub>2</sub> ; DMEM.....	111
Figure 77: Cellules 3T3-L1 : a/en présence d'hydrogel de PVA ; b/ contrôle ; 7 jours après incubation à: T=37°C ; 5% CO <sub>2</sub> ; DMEM.....	112
Figure 78: Cellules 3T3-L1 : a/ en présence de Fe/N-rGO b/contrôle ; 7 jours après incubation à: T=37°C ; 5%CO <sub>2</sub> ; DMEM.....	113
Figure 79: Cellules 3T3-L1 en présence d'une électrode compressée de : a/ Fe/N-rGO et chitosan et b/ Fe/N-rGO et PVA ; après incubation à: t=72 heures T=37°C ; 5% CO <sub>2</sub> ; DMEM .....	114
Figure 80:a-b Electrodes compressées de Fe/N-rGO et chitosan (électrode a et b), électrodes enrobées de PVA avec contact électrique.....	117
Figure 81: Photos de membrane d'hydrogel de PVA avant (a) et après (b) stérilisation à l'étuve .....	117
Figure 82: a/ Rat comportant les électrodes compressées b/ rat comportant les électrodes lyophilisées .....	119
Figure 83: a/ biocathode a compressée de Fe/N-rGO-chitosan après 1 mois d'implantation .....	120
Figure 84: a et b: analyse microscopique des tissus enrobant la biocathode compressée a .....	121
Figure 85: a/ et b/ Analyse des tissus enrobant la biocathode compressée b .....	122
Figure 86: a/b/c/ analyse microscopique des tissus enrobant la biocathode lyophilisée c.....	123
Figure 87: Mesures de chronoampérométrie après implantation effectuées à 100 mV vs ECS en solution saline de PBS en condition physiologique sous air puis ajout de O <sub>2</sub> . Dans l'ordre : a/ biocathode compressée a ; b/ biocathode compressée b ; c/ biocathode lyophilisée c et d/ biocathode lyophilisée d .....	124
Figure 88:a/ Mesures de chronoampérométrie avant (gris) et après (bleu) implantation effectuées à 100 mV vs ECS en solution saline de PBS en condition physiologique de la biocathode lyophilisée C ; b/ détails du chronoampérogramme a/.....	125
Figure 89: Cellules 3T3-L1 en présence de catalyseur a/ Pt-rGO, b/ Au <sub>70</sub> /Pt <sub>30</sub> -rGO, c/ Au <sub>50</sub> /Pt <sub>50</sub> -rGO, à 50 µg/mL, après 2 jours d'incubation à 37°C, 5% CO <sub>2</sub> , DMEM cercle vert cellules en mitose, cercle violet cellules fusiformes.....	130
Figure 90: a/ Chronoampérométrie d'une anode composée de 30 mg Au <sub>70</sub> Pt <sub>30</sub> /rGO à 0V vs ECS sous air avec ajout de glucose (total de 5 mM) et de NaCl (total de 150 mM) b/ Vue d'ensemble du chronoampérogramme (a).....	131
Figure 91:Densités de courant des anodes compressées comportant les catalyseurs de Lemoine et al. 0 V vs ECS, contre électrode de platine.....	132
Figure 92 : a: Anode explantée et composée de 30 mg de Au <sub>70</sub> Pt <sub>30</sub> /rGO; b : Anode explantée et composée de 30 mg de Pt-rGO .....	132
Figure 93: Chronoampérométrie d'une anode explantée et composée de 30 mg de Pt-rGO à 0 V vs ECS, en présence de 50 mM Glucose dans une solution saline de PBS .....	133

Figure 94: Chronoampérométrie d'une anode explantée et composée de 30 mg de Au <sub>70</sub> Pt <sub>30</sub> /rGO à 0 V vs ECS, en présence de 50 mM Glucose .....	133
Figure 95: Représentation de l'enzyme GOx et son groupement rédox [175] .....	135
Figure 96: Mécanisme réactionnel d'oxydation du glucose par un groupement FAD selon [176].....	135
Figure 97: Représentation de la FAD-GDH et son groupement rédox [177].....	136
Figure 98: Schéma mettant en jeu un DET et un MET à partir de l'oxydation du glucose .....	138
Figure 99: Exemple de l'impact du médiateur sur la f.e.m. ....	138
Figure 100: Formule de la 1,4-naphtoquinone .....	139
Figure 101: Chronoampérométrie d'une anode FAD-GDH-NQ-MWCNTs à 0 V vs ECS avec ajout de Glucose (C <sub>finale</sub> 5 mM) en condition physiologique PBS.....	141
Figure 102: Chronoampérométrie d'une anode GOx-catalase-NQ-MwCNTs à 0 V vs ECS à 5 mM de Glucose et en conditions physiologiques .....	142
Figure 103: LSV d'une Bfc FAD-GDH-NQ-MwCNTs et Fe/N-rGO effectuées à 0,2 mV/s en condition physiologique avec 5 mM de glucose sous air .....	143
Figure 104: LSV d'une Bfc GOx-Catalase-NQ-MwCNTs et Fe/N-rGO effectuées à 0,2 mV/s en condition physiologique avec 5 mM de glucose sous air .....	144
Figure 105: Photos des différentes étapes de fabrication des biopiles implantées : .....	145
Figure 106: Biopiles explantées après 5 jours : .....	147
Figure 107: Chronoampérogramme d'une cathode composée de Fe/N-rGO et du liant chitosan après 5 jours d'implantation, PBS, 100 mV vs ECS, contre Pt .....	147
Figure 108: f.e.m. d'une Bfc GOx-catalase et Fe/N-rGO après 1 mois d'implantation, PBS, 5 mM glucose, sous air .....	149
Figure 109: a/ Chronoampérogramme d'une cathode composée de Fe/N-rGO et du liant chitosan après 1 mois d'implantation, PBS, 100 mV vs ECS, contre Pt .....	149
Figure 110: f.e.m. d'une Bfc GOx-catalase et Fe/N-rGO après 1 mois d'implantation, PBS, 5 mM glucose, sous air .....	150
Figure 111: LSV d'une Bfc GOx-Catalase-NQ-MWCNTs et Fe/N-rGO effectuées à 0,2 mV/s en condition physiologique avec 5 mM de glucose après 1 mois d'implantation .....	150
Figure 112: Chromatogrammes de cathodes composées de Fe/N-rGO et du liant chitosan après 1 mois d'implantation, PBS, 100 mV vs ECS, contre électrode de Pt.....	151
Figure 113: f.e.m. d'une Bfc FAD-GDH-NQ-MWCNTs et Fe/N-rGO après 1 mois d'implantation, PBS, 5 mM glucose .....	152
Figure 114: LSV d'une Bfc FAD-GDH-NQ-MWCNTs et Fe/N-rGO effectuées à 0,2 mV.s <sup>-1</sup> en conditions physiologiques avec 5 mM de glucose après 1 mois d'implantation.....	152
Figure 115: Chronoampérogramme d'une cathode composée de Fe/N-rGO et du liant chitosan après 3 mois d'implantation, PBS, 100 mV vs ECS, contre électrode de Pt ; sous air puis ajout de O <sub>2</sub> à t = 70 h.....	153

## Résumé

Dans le cadre du projet ANR biopile abiotique implantable (ImAbic) coordonné par l'INAC, ce travail de thèse avait pour objectif d'optimiser les performances et la stabilité d'une biocathode à base de graphène dopé au fer et à l'azote (Fe/N-rGO). Différents types de biocathodes mettant en jeu différents liants ont été fabriquées et caractérisées afin de fournir des architectures d'électrodes les plus aptes à laisser diffuser en leur sein les espèces consommées et produites lors de la réaction. Lors de ces études, un liant s'est distingué des autres, le liant chitosan. De plus, une fois ce liant réticulé à l'aide de Génépine, nous avons observé une stabilité des performances électrochimiques dans le temps, limitant la perte de densité de courant à 5% pour une biocathode ayant été stockée en condition physiologique pendant 27 mois. Durant ce projet, un nouveau processus de fabrication des électrodes a été développé. Ce processus, qui implique la lyophilisation, permet une augmentation de la porosité des électrodes et améliore les densités de courant massique d'un facteur 4 en comparaison à celles fournies par les électrodes compressées. Toutefois, cette amélioration se fait au détriment de la tenue mécanique et les électrodes obtenues deviennent alors plus sensibles aux chocs. Afin d'apporter une solution à cette nouvelle problématique nous avons optimisé notre processus en ajoutant un support carboné à nos biocathodes lyophilisées, permettant d'améliorer la tenue mécanique tout en maintenant les propriétés électrochimiques. La deuxième partie de ce manuscrit s'intéresse à l'étude de la biocompatibilité de notre système de biocathode. Des tests préliminaires de culture cellulaire ont été effectués sur différents matériaux susceptibles de composer les biocathodes en présence de cellules fibroblastes issues de souris : les cellules 3T3-L1. Ces tests démontrent une prolifération normale pour les différents liants utilisés, mais démontrent une viabilité perturbée des cellules face à la présence du catalyseur à hauteur de 10%. Fort de ces résultats, nous avons eu l'autorisation du comité d'éthique de Grenoble afin d'effectuer des implantations chez le rat. Deux biocathodes issues du procédé de compression et deux biocathodes issues du procédé de lyophilisation ont été implantées dans deux rats qui n'ont démontré aucun signe de souffrance et un comportement naturel durant la période d'implantation soit 1 mois. Après autopsie, aucun organe ne fut affecté par la présence des électrodes, d'autre part, sur les quatre implants, trois étaient enrobés d'un tissu biologique résultant de l'implantation. L'analyse histologique de ces tissus a montré une composition de tissu adipeux pour deux d'entre eux et une zone inflammatoire comprise entre 20 et 50  $\mu\text{m}$ , composée de cellules fibroblaste, de macrophages et de polynucléaire. L'observation de ces tissus sous microscope photonique a révélé une forte vascularisation. D'autres implantations ont été réalisées sur plusieurs périodes (1 à 6 mois). Au cours de ces implantations, 28 biopiles ont été implantées à l'aide de cathodes constituées de Fe/N-rGO et d'anodes enzymatiques. Sur les 28 biocellules, 10 d'entre elles utilisaient FAD-GDH pour catalyser l'oxydation du glucose au bioanode et 18 utilisaient GOx et la catalase. Après 1 mois d'implantation, la pile à biocarburant utilisant Fe / N-rGO à la cathode et FAD-GDH à l'anode montrait une tension de 200 mV et  $65,6 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  (mesurée par LSV dans des conditions physiologiques avec 5 mM de glucose,  $0,2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  à 170 mV). Et 90% des cathodes implantées catalysaient encore l'ORR une fois explantées.

## Abstract

As part of the implantable abiotic biofuel cell (ImAbic), a ANR project coordinated by the INAC. This thesis work aimed to optimize the performance and stability of a graphene-based biocathode doped with iron and nitrogen (Fe / N-rGO). Different types of biocathodes involving different binders have been manufactured and characterized in order to provide the most suitable electrode architectures for diffusion of the species which are consumed and produced during the reaction. In these studies, one binder stood out from the rest, the chitosan binder. When crosslinked using Genepin, we observed a stability of electrochemical performance over time, limiting the loss of current density to 5% for a biocathode that had been stored in physiological condition for 27 months. During this project, a new electrode manufacturing process was developed. This process, which involves lyophilization, allowed an increase in the porosity of the electrodes and improved the specific current densities by a factor of 4 compared to those provided by compressed electrodes. However, this improvement was made at the cost of mechanical strength and the electrodes obtained became more sensitive to collisions. In order to provide a solution to this new problem, we have optimized our process by adding a carbonaceous support to our lyophilized biocathodes, making it possible to improve the mechanical strength while maintaining the electrochemical properties. The second part of this manuscript is concerned with the study of the biocompatibility of our biocathode system. Preliminary cell culture studies were carried out on biocathodes composed of different materials in the presence of fibroblast cells obtained from mice: 3T3-L1 cells. These studies demonstrated normal proliferation for the various binders used, but demonstrated a disturbed viability of the cells in presence of the catalyst at an amount of 10%. Based on these results, we obtained authorization from the Grenoble ethics committee to perform implantation in rats. Two biocathodes produced using the compression process and two biocathodes using the freeze-drying process were implanted in two rats which showed no signs of suffering and natural behavior during the implantation period of 1 month. The autopsy showed that no organ was affected by the presence of the electrodes. Of the four implants, three were coated with biological tissue resulting from the implantation. Histological analysis of these tissues showed a composition of fatty tissue for two of them and an inflammatory zone between 20 and 50  $\mu\text{m}$ , composed of fibroblast cells, macrophages and polymorphonuclear cells for all of them. Observation of these tissues under a light microscope revealed strong vascularization. Other implantations were carried out over several periods (1 to 6 months). During these implantations 28 biofuel cells were implanted using cathodes made with Fe/N-rGO and enzymatic anodes. Of the 28 biofuel cells, 10 of them were using FAD-GDH to catalyse glucose oxidation and 18 were using GOx and catalase. After 1 month implanted, biofuel cell using Fe/N-rGO at the cathode and FAD-GDH at anode was showing a voltage of 200 mV and  $65,6 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  (measured by LSV in physiological conditions with 5 mM glucose,  $0,2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  at 170 mV). And 90% of cathodes implanted were still catalysing ORR once explanted.

## Introduction Générale

Depuis l'invention du stimulateur cardiaque, ou pacemaker, dans les années 1950, de nombreuses avancées technologiques ont été effectuées et de nombreux dispositifs médicaux actifs (DMA) ont été développés. La plupart de ces dispositifs a bien souvent besoin d'une source d'énergie électrique pour pouvoir fonctionner. Par exemple, dans le cas du pacemaker, il est estimé qu'une densité de puissance de 30  $\mu\text{W}$  doit être fournie afin que ce dispositif puisse délivrer une impulsion électrique dans le but de réguler le rythme cardiaque du patient.

Les sources actuelles d'énergies privilégiées pour alimenter ces dispositifs sont majoritairement les accumulateurs au lithium. Ces accumulateurs possèdent une tension et des cycles de vie élevés ainsi qu'une faible diminution des performances dans le temps. Ces caractéristiques ont fait qu'aujourd'hui les accumulateurs au lithium sont la source d'énergie électrique privilégiée dans le cas des DMAs. Toutefois, les avancées technologiques réalisées dans le domaine des DMAs s'accompagnent de besoins en énergie électrique de plus en plus élevés et les accumulateurs au lithium ont de plus en plus de difficulté à satisfaire les besoins en énergie des nouveaux DMAs.

Dans ce contexte, les biopiles à combustible (Bfc) implantables sont des solutions alternatives prometteuses aux accumulateurs au lithium. Les Bfc sont des biopiles capables d'utiliser le glucose comme combustible et l'oxygène en tant que comburant afin de générer de l'énergie électrique. Or le glucose et l'oxygène sont tous deux présents dans les fluides extracellulaires qui parcourent le corps humain. Ainsi, en théorie, une Bfc à glucose et oxygène implantée peut fonctionner durant toute la vie du patient.

Les biopiles à glucose et oxygène les plus connues de la littérature utilisent des systèmes catalytiques enzymatiques afin d'oxyder le glucose à l'anode et réduire l'oxygène à la cathode. Les catalyseurs enzymatiques ont la particularité d'être sélectifs et fonctionnent en conditions physiologiques. Cependant, ces catalyseurs souffrent d'un inconvénient majeur : leur durée de vie, due à leur fragilité. Bien que des stratégies d'immobilisation ont permis de faire des avancées spectaculaires dans la stabilisation des Bfc enzymatiques, ces progrès restent encore insuffisants pour alimenter les DMAs. Entre autres, la complexité du milieu physiologique due à sa composition chimique et aux réactions du corps telles que la réaction inflammatoire et les phénomènes d'encrassement biologique, font que l'optimisation de la stabilité des biopiles enzymatiques est une tâche ardue. A cela, s'ajoutent les problèmes de disponibilité des composés en condition *in vivo*, ce qui est particulièrement vrai pour l'oxygène, 40  $\mu\text{M}$  pour l'oxygène contre 5 mM pour le glucose [1].

Dans ce contexte, l'utilisation des catalyseurs abiotiques peut être une voie très prometteuse dans le domaine des biopiles implantables. Bien que les études des biopiles abiotiques implantables utilisant le platine comme catalyseur ont été explorées avant les biopiles enzymatiques, l'empoisonnement et la non sélectivité du platine en conditions physiologiques ont rapidement découragé les chercheurs dans ce domaine.

La recherche dans le domaine des piles à combustible à hydrogène et oxygène a permis le développement de nouveaux catalyseurs abiotiques moins onéreux que le platine. Ces nouveaux catalyseurs, à base de matériaux carbonés tel que le graphène, ont pu démontrer, une fois dopé au fer et à l'azote, des performances électrochimiques équivalentes, sinon supérieures, à celle du platine et de surcroît sont sélectifs à la réduction de l'oxygène. Cependant, les conditions d'utilisation en pile à combustible sont éloignées de celles de l'implantation, les pH sont très acides et les températures très élevées. Malgré cela, ces nouveaux catalyseurs à base de graphène-fer-azote, ont fait l'objet d'une étude préliminaire entre le laboratoire TIMC-IMAG et le laboratoire SyMMES. Cette étude préliminaire a démontré que les catalyseurs de graphène dopé à l'azote et au fer pouvaient fonctionner en conditions physiologiques.

Cette thèse a pour but de fabriquer et caractériser une biocathode mettant en jeu un catalyseur basé sur du graphène et dopé au fer et à l'azote (Fe/N-rGO). L'architecture de cette biocathode sera optimisée afin de permettre une diffusion optimale des espèces chimiques, cette biocathode sera idéalement sélective et effectuera uniquement la réduction de l'oxygène. L'application visée de cette biocathode étant l'implantation, un cahier des charges sera dressé afin de sélectionner des composants respectueux du corps biologique (ou biocompatible) et des tests biologiques *in vitro* seront mis en place afin de garantir cette biocompatibilité. Des tests *in vivo* seront également effectués afin d'étudier l'impact du vivant sur les performances électrochimiques du système fabriqué, et réciproquement l'impact d'une biocathode abiotique employant le catalyseur Fe/N-rGO sur un corps biologique. Et puis, afin d'analyser les densités de puissances obtenues *in vitro* et éventuellement *in vivo*, des tests combinant cette biocathode à une bioanode seront faits, ceci dans le but d'alimenter des dispositifs peu énergivores tels que les stimulateurs cardiaques.

## Chapitre 1 : Etat de l'art

# 1 Les dispositifs médicaux implantables actifs

## 1.1 Définitions et classifications

Aujourd'hui en 2020, la population mondiale atteint le nombre de 7,2 milliards et l'on prévoit de compter prêt de 10 milliards d'êtres humains sur Terre d'ici 2050 [2], à cela s'ajoute une espérance de vie qui ne cesse d'augmenter, grâce au progrès de la médecine et de la recherche, on peut aujourd'hui espérer vivre, en France, 80 ans pour les hommes et 85 ans pour les femmes (figure 1 d'après [3]). La population est donc destinée à vivre plus nombreuse et plus longtemps, et maintenir la santé et la qualité de vie des patients qui seront de plus en plus sensibles car de plus en plus âgés mais également de plus en plus nombreux, est un défi relevé par un grand nombre de communautés, tels que : les chercheurs, les ingénieurs, les médecins, et par nos gouvernements.

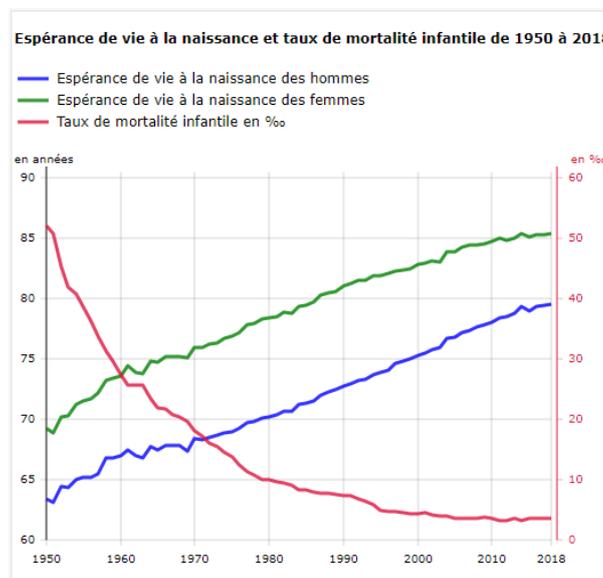


Figure 1: Espérance de vie d'après [3]

Afin de relever ce défi, la recherche médicale s'oriente de plus en plus vers le développement de nouvelles solutions telles que les dispositifs médicaux implantables (DM). Adaptés au besoin du patient, ils servent à prolonger la vie du patient ou bien à la rendre plus confortable. Le Comité économique, social et environnemental, recense en France en 2015 de 800 000 à 2 000 000 de références de dispositifs médicaux [4] visant à améliorer et/ou prolonger la vie des patients.

Toutefois, ces dispositifs ont des fonctions très disparates allant du simple scalpel aux dispositifs implantables complexes comme les neuro-simulateurs. Une classification par degré de risque encouru par le patient permet de regrouper et différencier les différents DM.

Cette classification est répartie sous un total de 4 catégories :

*Classe I* : classe de risque de potentiel le plus faible :

Exemples : scalpels, fauteuils roulants, bandes de contention, béquilles...

*Classe IIa* : classe de risque de potentiel modéré :

Exemples : lentilles de contact, agrafes cutanées, couronnes dentaires, appareils d'aide auditive, les échographes...

*Classe IIb* : classe de risque de potentiel élevé :

Exemples : les hémodialyseurs, les pompes à perfusion, les préservatifs, les sutures internes, les systèmes de radiothérapie...

*Classe III* : classe de risque de potentiel le plus élevé :

Exemples : stent coronaire actif, prothèse de hanche...

Parmi les DM, existent donc des sous catégories comme les Dispositifs Médicaux Implantables (DMI). Si l'on se réfère à l'agence fédérale des médicaments et des produits de santé, les DMIs sont des dispositifs destinés à être implantés en totalité dans le corps humain par une intervention chirurgicale et destinés à y rester [5]. Il peut également s'agir d'un dispositif qui est partiellement introduit dans le corps par une intervention chirurgicale et destiné à y rester pendant au moins 30 jours après l'intervention. Les DMIs peuvent être actifs (DMIa) ou non-actifs et leur différenciation réside dans le fait que l'action induite par le dispositif nécessite ou non une source d'énergie (figure 2 selon [6]). Par exemple, une prothèse dentaire ou bien un anneau gastrique une fois implantés effectueront leur tâche en continu et sans besoin d'apport d'énergie électrique, ce sont donc des DMIs non actifs. Des DMIs tels que les stimulateurs cardiaques (ou pacemaker) et les stimulateurs neurologiques ont pour action de délivrer des impulsions électriques, ces impulsions électriques sont produites grâce à un circuit électronique alimenté à l'aide d'une source d'énergie électrique, ici une pile au lithium. En 2016 et aux Etats-Unis, on estime le nombre de pacemaker implantés par année à 60 000 [7] et la Société de Cardiologie Européenne estime le nombre de pacemaker implantés durant l'année 2019 à 590 [8], aussi, en prenant en compte le nombre grandissant de la population ainsi que l'augmentation de l'espérance de vie générale il est possible d'anticiper les futurs besoins des DMIsa.

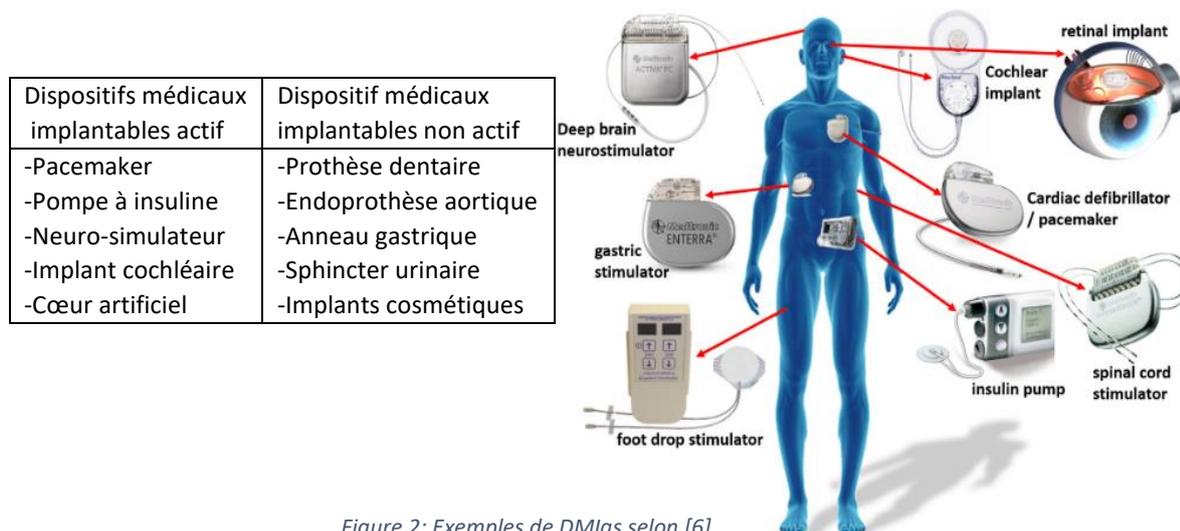


Figure 2: Exemples de DMIsa selon [6]

Toutefois, bien que la science ait fait des progrès conséquents sur les DMIs de nombreux challenges restent présents.

## 1.2 Miniaturisation des DMIs

Parmi les différents challenges concernant l'avancement des DMIs, la miniaturisation est un enjeu de taille. A titre indicatif, la première pompe à insuline développée par Arnold Kadish [9] avait un volume tellement imposant que le patient devait transporter la pompe sur le dos du patient (figure 3a) [9]. L'optimisation de la miniaturisation a permis la fabrication des dispositifs plus récents comme les pompes commercialisées par Medtronic (figure 3b) dont le volume, le poids, la précision du volume injecté et les performances ont été considérablement optimisés grâce à un système de monitoring externe qui contrôle et rectifie le volume d'insuline injecté en temps réel [10].



Figure 3: Exemples de pompes à insuline a/ dispositif développé par Arnold Kadish [9] ; b/ DMI commercialisé par Medtronic [10]

Parmi les différents DMIs existant, les organes artificiels sont des exemples qui démontrent clairement la nécessité de miniaturiser les DMIs. Parmi ces organes artificiels nous pouvons citer l'exemple des dispositifs d'assistance-ventriculaire implantable. Ces dispositifs ont pour but de simuler le mécanisme biologique du cœur par une action mécanique monitorée. Ces dispositifs sont généralement réservés aux patients en attente de transplantation ou souffrant d'insuffisance cardiaque en phase terminale. La première réussite d'implantation humaine d'un support mécanique circulatoire fut implanté vers 1960 chez une femme de 37 ans souffrant d'insuffisance cardiaque, cet appareil accompagnait le cœur biologique dans son fonctionnement via un système de pompe placé au ventricule gauche [11]. Il existe plusieurs types de dispositifs permettant l'assistance circulatoire, leur différenciation est faite selon l'assistance portée au cœur biologique, elle peut être partielle : dispositif d'assistance ventriculaire (VAD, en anglais Ventricular Assist Device), ou totale : cœur totalement artificiel (TAH, en anglais Total Artificial Heart). La compagnie Thoratec, qui fait maintenant partie du groupe St. Jude Medical, a récemment développé et commercialisé un système LVAD (HeartMate III) permettant l'assistance du ventricule gauche via un système de pompe par

l'évitation magnétique (figure 4) [12], [13]. Le flux est régulé via un moniteur externe le tout alimenté par deux batteries lithium-ion externes de 14 V.

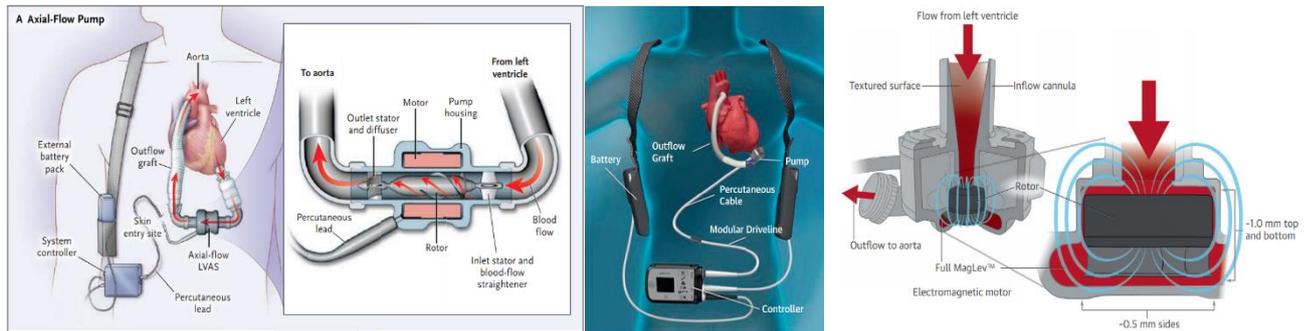


Figure 4: Exemple de cœurs artificiels commercialisés par Thorates [11-13]

Notons que pour ces exemples d'organes artificiels une des étapes qui limite la miniaturisation des DMIs est le stockage énergétique. Si en effet la recherche a permis de nombreuses optimisations sur les DMIs, par exemple en substituant des composants en acier, titane ou autres métaux par des matériaux organiques (e.g. PTFE, PDMS, PP...), les récents progrès ne permettent pas une nette diminution des densités volumiques et massiques des accumulateurs utilisés pour alimenter les différents DMIs.

### 1.3 Matériaux d'enrobage et de composition des DMIs

En plus de cette course à la miniaturisation des DMIs s'ajoutent les problèmes de biocompatibilité et d'acceptation des DMIs par le corps. Bien que la réponse de l'organisme sur un DMI implanté soit très renseignée et documentée par la littérature, les documents concernent majoritairement des implants biodégradables ou encore des implants scellés [14]–[17]. Pour chaque implant une réaction du corps en découlera, que cela soit pour rejeter ou accepter le dispositif implanté. Cette réaction du corps dépendra de nombreux paramètres, on peut d'ores et déjà énumérer en particulier : la zone d'implantation ainsi que la composition, le volume et le poids de l'implant. Dans le cas des DMIs non actifs tels que le stent vasculaire ou bien l'anneau gastrique, le choix de composition du DMI est capital, non seulement pour l'action que doit induire le DMI mais également pour l'interaction avec le corps, dans ce contexte, les biomatériaux jouent un rôle crucial pour ne pas dire unique. Selon D. Williams [18], on peut définir un biomatériau par :

« Un biomatériau est une substance conçue pour prendre une forme, seule ou faisant partie d'un système complexe, et utilisée pour orienter les procédures diagnostiques ou thérapeutiques par le contrôle des interactions des composants avec les systèmes vivants, en médecine humaine ou vétérinaire. »

On peut classer les biomatériaux en 3 catégories :

- 1/ Les métaux, qu'ils soient sous forme d'alliages ou pur.
- 2/ Les céramiques.
- 3/ Les polymères, qu'ils soient biosourcés, synthétiques ou encore bioinspirés.

Le tableau ci-dessous résume les différents biomatériaux synthétiques non biodégradables utilisés pour les dispositifs médicaux implantables [19]:

<b>Biomatériaux métalliques et Céramiques</b>	<b>Exemple</b>	
Acier Inoxydable	Prothèse de hanche, plaques, vissees fines temporaires	
Titane et alliages	Tête fémorale, stimulateur cardiaque	
Cobalt et alliages	Moulages dentaires, tiges	
Céramiques	Chambres implantables, prothèse (hanche, dents,...)	
<b>Polymères implantables</b>	<b>Sigle</b>	<b>Exemples</b>
Polytétrafluoroéthylène	PTFE	Prothèse vasculaire
Polydiméthylsiloxane	PDMS	Cathéter urétral, implants cosmétiques
Polypropylène	PP	Sutures, valves cardiaques
Polyéthylène-téréphtalate	PET	Prothèse pariétale ou vasculaire
Polyoxy-méthylène	POM	Chambres implantables
Polyamide	Nylon	Membrane d'hémodialyse
Polyétheréthercétone	PEEK	Emballage de dispositifs implantables
Polyéther-uréthane	TPU	Enveloppe d'implant mammaire, cathéters
Polyéthylène (basse et haute densité)	PELD PEHD	Articulations, tubulures
Polysulfone	PSU	Chambres implantables
Polychlorure de vinyle	PVC	Poche de perfusion
Poly-2-hydroxyéthylméthacrylate	PHEMA	Lentille intra-oculaire
Polyméthylméthacrylate	PMMA	Ciment osseux
Parylène	...	Revêtement des dispositifs médicaux

Figure 5: Exemple de biomatériaux utilisés pour des DMIs [19]

Ces biomatériaux sont utilisés à des fins disparates, allant de la tenue mécanique à l'optique, ou encore en tant que revêtement protecteur. Dans le cas des DMIs, les dispositifs sont bien souvent isolés du corps humain via un métal ou un alliage en forme de capsule (e.g. pompe à insuline, simulateur cardiaque etc...) afin de limiter toute interaction non souhaitée.

Toutefois, il existe des cas où ces biomatériaux jouent un double rôle, notamment lorsque les DMIs doivent effectuer des échanges permanents avec le corps biologique dans lequel le DMI est implanté. C'est le cas, par exemple, des biocapteurs et des piles à combustible implantables, dans ces cas-ci, ces DMIs doivent être d'une part isolés du corps afin de limiter la réaction biologique du corps sur le corps étranger, et d'autre part, ces DMIs doivent interagir avec des composés du fluide extracellulaire (e.g. oxygène et glucose). Dans ce cas-ci, les DMIs doivent être enrobés par une membrane biocompatible permettant certains échanges avec le liquide extracellulaire.

#### 1.4 Besoin énergétique des DMIs : exemple du pacemaker

En plus des challenges de miniaturisation du volume, de diminution du poids, de biocompatibilité des DMIs, s'ajoute l'un des principaux challenges : leur alimentation en énergie électrique. Il s'agit là d'un des plus grands défis du fait que la source de l'alimentation électrique doit être fiable en tout temps et la moins encombrante possible, or, avec les matériaux servant à l'encapsulation des DMIs, leur source d'énergie est responsable de la majorité du volume et du poids des DMIs.

Les DMIas peuvent être scindés en deux catégories, ceux nécessitant de faibles quantités d'énergie (*e.g.* pacemaker) et ceux plus énergivores (*e.g.* TAH). Pour répondre à cette demande il existe deux voies d'alimentations énergétiques, la voie interne, où l'alimentation est également implantée, voie privilégiée pour les DMIas nécessitant des puissances électriques allant de quelques  $\mu\text{W}$  à des centaines de  $\mu\text{W}$ , et la voie externe, qui concerne les DMIas plus énergivores comme les organes artificiels qui nécessitent des puissances allant de quelques mW à des dizaines de Watt [20] et dont l'accumulateur, alors trop volumineux, ne peut être implanté (figure 6).

Power requirement of different IMDs in comparison with main characteristics of modern batteries.

IMD	Power	Battery life time
Pacemaker	10 $\mu\text{W}$ –30 W	5–7 years
Insulin pump	70 $\mu\text{W}$	Up to 5 years
Neurological stimulator	0.03 mW–3 mW	Up to 3 years
Cochlear implant	0.02 W–1 W	–
Artificial Organs	30 W	Several hours

Figure 6: Exemple de DMIa et leurs besoins en énergies et durée de vie correspondant [20]

Il faut cependant noter que ces valeurs de puissances correspondent à des puissances moyennes. En effet, un DMI ne fonctionne pas avec de simples charges ohmiques et nécessitent un courant et une tension spécifiques qui peuvent varier selon l'effort que le DMI doit fournir. Pour cette raison, chaque DMI intègre des systèmes électroniques de gestion de fonctionnement. Par exemple, dans le cas des pacemakers, ceux-ci doivent délivrer une décharge électrique sur une certaine période et d'une certaine puissance qui varient selon de nombreux paramètres tels que : le dysfonctionnement cardiaque du patient, le type de pacemaker employé (simple ou double chambre), l'impédance appliquée...

La figure 7 met en avant différents pacemakers disponible sur le marché selon [21]–[23].

Compagnie	Modèle	Tension (V)	Intensité (μA)	Impédance (Ohm)
Biotronik	EcuroSR(-T)	1,5-3	9	1000
Biotronik	EcuroDR(-T)	1,5-3	13	1000
Vitatron	G70A1	2	10	1000
Vitatron	G20A1	2	10	1000

Figure 7: Exemples de consommation énergétique de pacemakers issus du commerce [21-23]

L'un des paramètres de conception les plus critiques pour un stimulateur cardiaque est le compromis entre la taille et la longévité, pour une densité d'énergie de batterie et une consommation d'énergie données suivant la formule :

$$\frac{\text{Durée de vie}}{\text{taille}} = \frac{\text{Densité d'énergie de la batterie}}{\text{consommation d'énergie}}$$

Figure 8: Paramètre de conception des pacemakers

Les différents progrès sur les batteries utilisées par les pacemakers ainsi que la consommation d'énergie de ces derniers, ont permis une augmentation de la longévité des stimulateurs cardiaques atteignant une longévité de l'ordre de la décennie. D'autre part, les avancées sur la miniaturisation ont permis d'obtenir des pacemakers dont le volume est de l'ordre de 10 cm<sup>3</sup> [21]–[23].



Figure 9: Photos de pacemakers développés par Biotronik et Vitatron

Généralement, la consommation d'énergie d'un pacemaker est due à quatre facteurs :

- ❖ Le détecteur.
- ❖ Le système de télécommunication.
- ❖ Le système de calcul d'algorithmes permettant de déterminer le comportement ou la réponse optimale que doit fournir le pacemaker.
- ❖ L'impulsion électrique stimulant le muscle cardiaque.

Les trois premiers points de consommation d'énergie du pacemaker dépendent directement du progrès de l'électronique, cette consommation peut-être de l'ordre du microwatt à la dizaine de microwatts et est négligeable face à celle consommée par l'impulsion délivrée au muscle qui est régie par la conception et la composition des électrodes utilisées ainsi que le muscle auxquels les électrodes sont en contact. On peut définir l'énergie consommée par une impulsion par :

$$W_{stim.} = t_{impulsion} \frac{U^2}{Z}$$

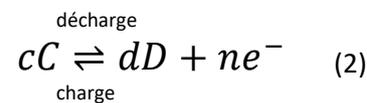
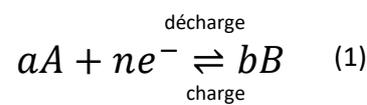
Où  $t_{impulsion}$  est la durée de l'impulsion,  $U$  la tension et  $Z$  l'impédance du tissu.  $Z$  est naturellement compliqué à définir, cependant, les constructeurs et la littérature proposent des valeurs comprises entre 400 et 1000 Ohms (500 Ohms pour une valeur moyenne). Si l'on reprend les exemples de pacemakers développés par Biotronik et Vitatron, les constructeurs nous renseignent sur une durée de vie moyenne de 11,3 et 12 ans selon une utilisation où le voltage appliqué est de 1,5 à 2,5 V pour une stimulation à 100% appliqué sur une durée allant de 0,4 à 1 ms, pour une impédance allant de 500 à 1000 Ohms et pour une fréquence de 60 bpm. Grâce à ces données, on peut déduire la consommation énergétique par chaque impulsion du pacemaker qui peut aller de 0,9  $\mu$ J (ou 0,9 $\mu$ Ws) à 12,5  $\mu$ J (ou 12,5  $\mu$ Ws).

## 2 Les différentes sources d'énergie électrique pour un DMIs

De nombreux types de dispositifs électrochimiques peuvent être imaginés pour assurer l'alimentation en énergie électrique des dispositifs implantés, toutefois, deux d'entre eux se distinguent : les batteries et les piles à combustible. Les constituants du premier dispositif sont isolés du milieu biologique, ce qui permet de relâcher les contraintes quant à la nature des matériaux utilisés, il « suffit » de s'assurer que l'enrobage du dispositif soit biocompatible. Dans le cas des piles à combustible il est nécessaire que les composants biologiques qui permettent les réactions redox puissent diffuser aux niveaux des électrodes. Les contraintes portant sur l'ensemble des matériaux mis en œuvre sont donc beaucoup plus importantes : ils doivent être fonctionnels et biocompatibles. Pour cette raison actuellement les batteries sont développées à grande échelle et assurent quasi exclusivement l'alimentation en énergie des dispositifs implantés. Il n'existe pas à ce jour de dispositifs de type « biopile à combustible » qui soient commercialisés et implantés. Dans une première partie les principaux types d'accumulateurs électrochimiques implantables seront présentés ainsi que leurs performances. Une seconde partie sera consacrée aux biopiles implantables ainsi qu'aux différentes réactions chimiques mises en jeu et les catalyseurs existants et nécessaires afin d'optimiser ces réactions.

## 2.1 Principes et définitions des accumulateurs

Un accumulateur électrochimique est composé de deux électrodes, positive et négative, recouvertes ou constituées d'un matériau capable de réaliser une réaction électrochimique. Le potentiel redox du matériau de l'électrode positive est supérieur à celui du matériau de l'électrode négative. La tension de chaque élément correspond à la différence de potentiel entre ces deux réactions rédox. Plusieurs éléments peuvent être associés entre eux pour obtenir de plus hautes tensions ou de plus grandes intensités. Il est possible de différencier les générateurs primaires, irréversibles et non rechargeable ou piles, des générateurs secondaires réversibles, donc rechargeables ou batteries.



Historiquement, les premiers travaux reconnus par la communauté scientifique sur les accumulateurs électrochimiques remontent vers la fin des années 1800, avec les travaux de Alessandro Volta, qui développa un accumulateur en empilant des rondelles de zinc et d'argent séparées par un carton imbibé de saumure [24], [25], c'est d'ailleurs de cet empilement d'où vient le nom de « pile ». Toutefois, les plus grandes avancées technologiques effectuées sur les accumulateurs apparurent dans les années 1960 avec l'augmentation de la demande en énergie à des fins militaires et du fait de l'apparition de l'électronique. Également, l'invention du pacemaker va augmenter l'urgence d'apporter des sources énergétiques avec des ratios énergie/poids (ou densité massique d'énergie) et énergie/volume (ou densité énergétique) élevés car les densités d'énergie piles et batteries utilisées à cette époque-là ne dépassaient pas les 75 Wh.kg<sup>-1</sup> ou 200 Wh.L<sup>-1</sup> et atteignaient des durées de vie inférieure à 3 ans.

## 2.2 Exemples de sources utilisées

Depuis la première utilisation des stimulateurs cardiaques implantables à la fin des années 1950, des piles de type Zn/HgO ont été utilisées afin d'alimenter ces DMIas. Puis, dans les années 1970, une pile mettant en jeu le couple Li/I<sub>2</sub>(P2VP) a révolutionné le domaine du stockage énergétique. L'émergence du lithium a permis d'augmenter la durée de vie des piles jusqu'à 10 ans et de fournir des densités énergétiques 4 à 5 fois supérieures, soit environ 210 Wh.Kg<sup>-1</sup> [26]. A titre d'exemple, la pile composée de Li/I<sub>2</sub>(P2VP) peut atteindre des tensions de 3,6 V et une densité de puissance de 1000 Wh/kg. De plus, l'utilisation d'un électrolyte solide a augmenté la stabilité de la pile. En outre, les piles au lithium ont des durées de vie qui dépassent les dix ans. Toutes ces raisons expliquent pourquoi les piles au

lithium dominant aujourd’hui le domaine des piles implantables. Il faut également noter, qu’en plus des piles au lithium, les batteries au lithium sont très fortement utilisées dans le cas des DMIs à forte consommation d’énergie électrique. Il est possible de recharger ces accumulateurs secondaires par voie transcutanée à l’aide de signaux externes (radiofréquence, ultrason, champ magnétique...) toutefois, et dans certains cas, ces signaux peuvent perturber, ou bien même endommager le DMIa. Le tableau suivant présente des exemples d’accumulateurs présents sur tout type de marchés [27] :

Batteries primaires (ou piles)				Batteries secondaires (rechargeables)			
Composition	V (volt)	Energie spécifique (Wh.Kg <sup>-1</sup> )	Densité énergie (Wh.Dm <sup>-3</sup> )	Composition	V (volt)	Energie spécifique (Wh.Kg <sup>-1</sup> )	Densité d’énergie (Wh.Dm <sup>-3</sup> )
Zn/MnO <sub>2</sub>	1,5	85	165	Pb/PbO <sub>2</sub>	2	35	70
Li/SoCl <sub>2</sub>	3,6	590	1100	Li <sub>x</sub> C <sub>6</sub> /Li <sub>(1-x)</sub> CoO <sub>2</sub>	4,1	150	400
Li/SO <sub>2</sub>	3	260	415	Li/MnO <sub>2</sub>	3	120	265
Li/(CF) <sub>n</sub>	3	250	635	Li/FeS <sub>2</sub>	1,7	180	350
Li/I <sub>2</sub> (P2VP) <b>(pacemaker)</b>	2,8	245	900	Na/S	2,1	170	345
				Na/NiCl <sub>2</sub>	2,58	115	190

Figure 10: Exemple d’accumulateurs primaires et secondaire, leurs composants et propriétés [27]

Pour les pacemakers développés par Biotronik et Vitatron (figures 7 et 9), les constructeurs nous informent que les accumulateurs primaires alimentant les DMIs mettent en jeu le couple Li/I<sub>2</sub>(P2VP), soulignant les difficultés de la recherche quant à développer de nouvelles sources de stockage énergétique. La durée de vie moyenne des pacemakers est de 11,3 à 12 ans pour un poids total allant de 26 à 27,1 g, ainsi, une batterie de type Li/I<sub>2</sub>(P2VP) de l’ordre d’une vingtaine de grammes permet d’alimenter un pacemaker sur une dizaine d’année.

Bien que les piles au lithium implantables aient fait leurs preuves dans le cas des pacemakers et les stimulateurs neurologiques par exemple, leurs densités d’énergies deviennent une limite dans le cas des DMIs qui nécessitent des puissances électriques plus élevées. En effet, le volume des piles remplit 75% du volume total du stimulateur cardiaque classique (3 mL). Si un DMI nécessite une puissance élevée, par exemple > 20 mW, le volume d’une batterie au lithium serait proche de 1 L avec un poids total > 1 kg, ce qui est clairement médicalement inacceptable. Pour ces raisons, l’alimentation électrique est considérée aujourd’hui comme un verrou bloquant le développement des DMIs qui consomment des puissances allant de quelques mW à quelques dizaines de mW.

## 2.3 Systèmes de récupération d'énergie du corps

Notre corps contient et libère différentes formes d'énergies incluant la chaleur, l'énergie chimique des molécules organiques (acide gras, sucres etc...) et de l'énergie mécanique lors de la respiration ou des mouvements. De nombreux dispositifs ont été proposés permettant de transformer ces différentes formes d'énergie en énergie électrique.

### 2.3.1 L'énergie mécanique

Dans le cas de la récupération d'énergie mécanique, il existe trois principaux mécanismes de conversion du mouvement ou des vibrations en énergie électrique: électromagnétique, électrostatique et piézoélectrique [28], [29]. A titre d'exemple, Kim *et al.* [30] ont récemment développé un collecteur d'énergie piézoélectrique implanté sur le cœur d'un cochon et capable de générer *in vivo* 17,8 V et 1,78  $\mu$ A par battements du cœur (figure 11 selon [30]). Ce collecteur d'énergie était relié à un système de télétransmission qui envoyait par onde les performances électriques fournies par le dispositif.

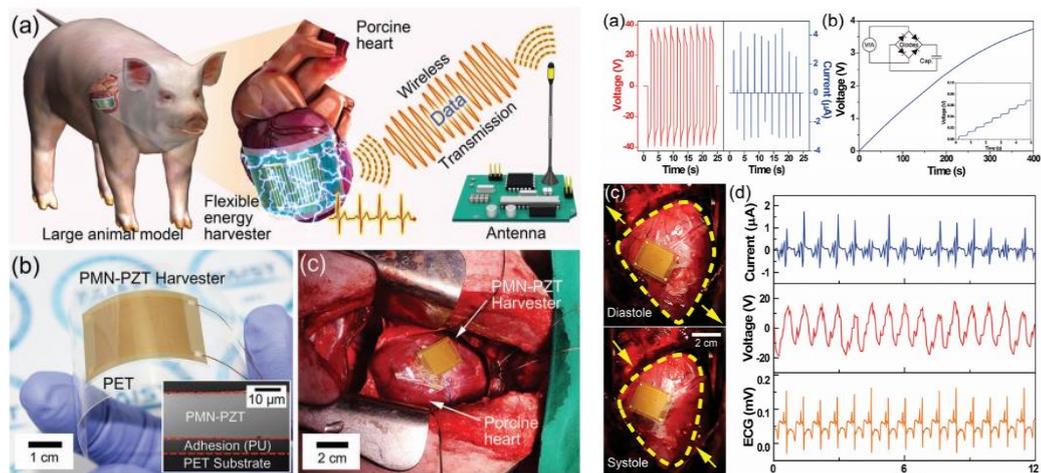


Figure 11: collecteur d'énergie piézoélectrique implanté sur le cœur d'un cochon et capable de générer *in vivo* de l'énergie électrique d'après [30]

L'inconvénient de ces mécanismes de génération d'énergie électrique est qu'ils dépendent de la nature non continue des vibrations. Egalement, un système basé sur le mouvement respiratoire est en cours de développement [31].

### 2.3.2 L'énergie thermique

Les récupérateurs d'énergie thermique exploitent l'effet Seebeck pour transformer les gradients de température disponibles dans le corps humain en énergie électrique. Vullers *et al.* [32] suggèrent que la combinaison d'un récupérateur d'énergie avec une batterie rechargeable de petite taille (ou avec un autre système de stockage d'énergie comme une batterie rechargeable à couche mince ou un super condensateur) est la meilleure approche pour permettre l'autonomie énergétique de l'IMD sur toute la vie. Jing Liu *et al.* [33] ont étudié les performances d'un générateur thermoélectrique implanté dans un lapin (figure 12 selon [33]), les auteurs ont démontré qu'une tension de 1.5 mV peut être obtenue

grâce à la différence de température entre les deux extrémités du thermo générateur électrique. Mais, généralement en raison du gradient de température limité à l'intérieur du corps humain (max 5°C), la tension de sortie des récupérateurs d'énergie thermique implantable devrait être très faible, et typiquement de l'ordre de quelques dizaines de  $\mu\text{W}$  [34].

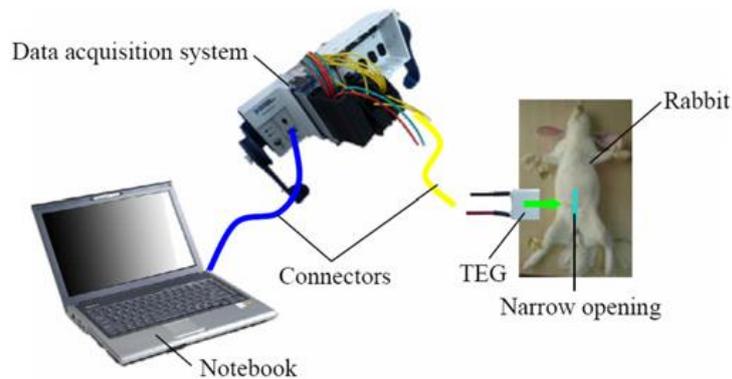


Figure 12: Générateur thermoélectrique implanté dans un lapin selon Jing Liu et al. [33]

### 2.3.3 L'énergie chimique

Le corps humain renferme de nombreuses molécules qui peuvent subir des transformations électrochimiques changeant l'énergie chimique en énergie électrique. Les collecteurs biochimiques, tels que les piles à combustible, sont des dispositifs capables d'induire cette transformation électrochimique et de transférer l'énergie électrique à des DMIas. Ces collecteurs sont prometteurs car l'équivalent de 100 W sont contenus sous forme chimique dans notre corps [35]. La différence entre les piles à biocombustible et les batteries classiques est que dans les Bfc, la concentration des réactifs est continuellement fournie par les fluides corporels. La présence et la disponibilité constantes du combustible à partir du corps, rendent inutiles les mécanismes de recharge ou de remplacement externes et offrent une capacité théorique de fonctionnement indéfini, tant qu'il existe un approvisionnement constant en combustible [36]. Par exemple, le glucose est le combustible le plus couramment utilisé pour les Bfc en raison de sa disponibilité dans la plupart des fluides corporels.

## 2.4 Les Piles à combustible

### 2.4.1 Définitions

Les piles à combustible (PàC) (en anglais Fuel cells) sont des générateurs électrochimiques permettant la conversion de l'énergie chimique des combustibles, comme l'alcool, les hydrocarbures ou encore l'hydrogène, en énergie électrique. A l'occasion du programme lunaire américain, en 1955 Général Électrique développe la première PàCs fonctionnelle et installe notamment, en 1962, un système de PàC de 1 kW dans les capsules spatiales du programme Gemini pouvant produire 37 mA/cm<sup>2</sup> à 0,78 V pour 35 mg Pt/cm<sup>2</sup> [37]. C'est avec ce programme que débute réellement l'engouement et les nombreux travaux de recherche des PàCs.



## 2/ Pile à combustible à méthanol direct (DMFC)

Dans la DMFC, une membrane polymère est utilisée en tant qu'électrolyte et le combustible est du méthanol, le système travaille à des températures proches de 60°C, généralement utilisée pour des applications portables de l'ordre de 260 W.

## 3/ Pile à combustible à l'acide phosphorique (PAFC)

Dans les PAFC, l'électrolyte est de l'acide phosphorique sous forme liquide et de l'hydrogène pur sert de combustible, la température opérationnelle est de l'ordre de 180 °C. Ce type de PàC est particulièrement utilisé en tant que groupe électrogène.

## 4/ Pile à combustible à oxyde solide (SOFC)

Ce type de PàC met en jeu des électrolytes de céramiques solides comme par exemple de l'oxyde de zirconium et utilise comme combustible du syngas ou gaz manufacturé. Ces PàCs sont utilisées en tant que groupe électrogène et ont une température de fonctionnement proche de 1000°C.

## 5/ Pile à combustible à carbonate fondu (MCFC)

Dans ce type de PàC, des sels de carbonate fondus sont mis en suspension dans une matrice de céramique poreuse et jouent le rôle d'électrolyte et des hydrocarbures sont utilisés comme combustible. La température de fonctionnement est proche de 650°C, cette PàC est fréquemment utilisée pour des applications extrêmement énergivores.

## 6/ Pile à combustible alcaline (AFC)

Un polymère permettant le transport des ions hydroxydes est employé comme électrolyte et le combustible mis en jeu est de l'hydrogène pur. Ce système fonctionne à des températures proches de 70°C et est couramment utilisé comme groupe électrogène autonome.

Malgré un concept innovant et prometteur, la commercialisation des PàCs reste marginale pour deux raisons : la durée de vie des PàCs et leurs coûts [38]. Néanmoins, ces dernières années de nombreux travaux ont permis de résoudre, en partie, ces problématiques, notamment sur les coûts en proposant de nouvelles électrodes non plus basées sur les métaux nobles comme le platine, mais sur des matériaux carbonés ou encore issus de la biologie tels que les enzymes ou encore les bactéries.

#### 2.4.2 Les Biopiles à combustible

Aujourd'hui, la définition de biopile à combustible (Bfc) est encore sujette à polémique du fait des possibilités qu'englobe l'utilisation du préfixe « bio ». La polémique vient du fait qu'une biopile peut être une pile à combustible utilisant un combustible d'origine naturel (biocombustibles), comme le glucose ou encore l'éthanol, ou bien, une biopile doit employer des catalyseurs naturels (biocatalyseurs) comme les enzymes ou des bactéries [39] ou encore utilisant un biocombustible et un biocatalyseur.

Le concept de biopile fut proposé en 1911 par Potter [40] qui a observé qu'une bactérie présente dans l'intestin humain, la bactérie *Escherichia Coli*, était capable de produire de l'électricité. Toutefois, ce n'est qu'à partir des années 2000 que les travaux scientifiques prennent un engouement pour les biopiles.

Les biopiles possèdent de nombreux avantages qui les rendent particulièrement attractives. Ces systèmes sont capables de fonctionner dans des conditions nettement moins drastiques que les PàCs, avec des pH neutres contre des pH très acides ou très basiques pour des PàCs plus traditionnelles. Les biopiles fonctionnent également à des températures moins élevées allant jusqu'à un maximum de 60°C contre 1000°C pour les SOFC. De plus, les biopiles offrent un large choix de transformation de combustibles et comburants renouvelables qui peuvent être issus de la biomasse. L'un des facteurs les plus prometteurs offerts par les biopiles est incontestablement leur capacité à fournir de hautes densités énergétiques pour un faible volume occupé.

De ces faits, ces systèmes que sont les biopiles à combustible sont très étudiées, pour une multitude d'applications et particulièrement afin d'alimenter les DMIs. En effet le glucose et O<sub>2</sub> sont deux composants présents dans notre corps, l'utilisation du couple glucose/O<sub>2</sub> semble logique et prometteur afin de développer une biopile : la biopile à glucose et oxygène. Dans cette voie, les DMIs alimentés par des biopiles deviendraient complètement autonomes et supprimeraient les interventions sur les patients liées au remplacement de la source énergétique du DMI. Dans une biopile glucose/O<sub>2</sub>, la réaction de réduction de l'oxygène (ORR), s'effectue à la cathode, et la réaction d'oxydation du glucose, à l'anode. Zebda *et al* [20] ont estimé que la puissance électrique disponible sous forme de glucose et présent dans notre corps est d'environ 50 W, ce qui est très élevé comme valeur si on considère que les DMIs visés consomment des puissances de quelques  $\mu$ W à quelques dizaines de mW. Les mêmes auteurs ont étudié l'effet de la consommation de l'oxygène par la biopile sur sa concentration physiologique et ont conclu que, comme dans le cas du glucose, la biopile ne consommera que d'infimes quantités d'oxygène n'impactant pas le mode de fonctionnement d'un corps biologique.

Dans une biopile à glucose/O<sub>2</sub> les réactions d'oxydo-réduction sont catalysées soit par des enzymes soit par des catalyseurs abiotiques.

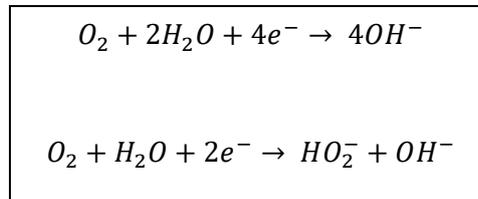


Figure 14: Processus de réductions de l'oxygène à 4 ou 2 électrons en milieu basique

#### 2.4.2.1 Les Biopiles enzymatiques ou hybrides

Les biopiles enzymatiques sont des piles à combustible utilisant des enzymes de type oxydo réductase pour catalyser les réactions aux électrodes. La première biopile enzymatique a été développé en 1964 par Yahiro *et al.* [41], qui développèrent trois biopiles utilisant la glucose oxydase, la D-aminoacide oxydase et l'alcool déshydrogénase afin de développer trois anodes chacune d'elles combinée à une cathode de platine. Toutefois, les densités de courant et de puissance ainsi que la stabilité dans le temps qu'ils obtinrent étaient trop faibles, et le développement des biopiles enzymatiques fut délaissé.

Dans les années 1980, plusieurs travaux donnent un regain d'intérêt des Bfc enzymatiques grâce au développement du génie génétique et de la purification des enzymes [42], mais là encore, les bioélectrodes développées fournissaient de faibles stabilités dans le temps et de faibles puissances. Puis dans les années 2000 l'avancement de l'ingénierie enzymatique couplée à la découverte des laccases permit un réel regain.

En plus d'avoir une cinétique élevée, leur sélectivité pour un substrat ou une famille de substrat permet aux biopiles enzymatiques de s'affranchir de membrane séparatrice utilisée généralement dans les piles à combustible. Pour les applications implantables, de nombreux catalyseurs enzymatiques présentent l'avantage d'être capables de fonctionner dans les conditions physiologiques.

Les principales enzymes cathodiques actuellement utilisées sont répertoriées sur la figure 15 et les principales enzymes employées à l'anode sont répertoriées sur la figure 16.

Oxydant	Enzymes	Métaux	Demi-Réaction
O <sub>2</sub>	Laccase	Cu	O <sub>2</sub> + 4H <sup>+</sup> + 4e <sup>-</sup> = 2H <sub>2</sub> O
O <sub>2</sub>	Bilirubine Oxydase	Cu	O <sub>2</sub> + 4H <sup>+</sup> + 4e <sup>-</sup> = 2H <sub>2</sub> O
O <sub>2</sub>	Polyphénol Oxydase	Cu	O <sub>2</sub> + 4H <sup>+</sup> + 4e <sup>-</sup> = 2H <sub>2</sub> O
O <sub>2</sub>	Cytochrome Oxydase	Cu/Fe/Hème	O <sub>2</sub> + 4H <sup>+</sup> + 4e <sup>-</sup> = 2H <sub>2</sub> O
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Horseradish peroxydase	Fe/Hème	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> = 2H <sub>2</sub> O

Figure 15: Exemples d'enzymes utilisées à la cathode

Combustible	Enzymes	Cofacteur	Demi-Réaction
Acides	Formate DH	NAD <sup>+</sup>	Acide formique = CO <sub>2</sub>
Aldéhydes	Aldéhyde DH	NAD <sup>+</sup>	Aldéhyde = Acide
Cellobiose	Cellobiose déshydrogénase	FAD/Hème	Lactose = Lactone
Ethanol	Alcool DH	NAD <sup>+</sup>	Alcool = Aldéhyde
Fructose	Fructose déshydrogénase	FAD/Hème	D-Fructose = 5-cétofructose
Glucose	Glucose déshydrogénase	FAD ou NAD <sup>+</sup> ou PQQ	D-Glucose = Acide gluconique
Glucose	Glucose oxydase	FAD	D-Glucose = Acide gluconique
Hydrogène	Hydrogénase	Fe/Fe ou Ni/Fe	H <sub>2</sub> = 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup>
Méthanol	Alcool DH	NAD <sup>+</sup>	Alcool = Aldéhyde

Figure 16: Exemples d'enzymes utilisées à l'anode

La fabrication d'électrodes enzymatiques passe bien souvent par une immobilisation de l'enzyme en surface d'un collecteur d'électrons qui est généralement sous forme métallique du fait de leur propriété de forte conduction électronique. Cette immobilisation peut être effectuée de différentes façons, par greffage à l'aide de molécules permettant la formation de liaisons covalentes entre l'enzyme et la surface de l'électrode, par encapsulation ou recouvrement à l'aide de polymère. L'immobilisation des enzymes permet de diminuer les risques de relargage des enzymes solubles en solutions, limitant ainsi une diminution de la cinétique de réaction et donc de la densité de courant et restreint également le risque de dénaturation de l'enzyme [43]. La confection des biopiles enzymatiques nécessite bien souvent l'utilisation d'un médiateur qui a pour rôle de transférer les électrons partant des centres catalytiques de l'enzyme à l'électrode, pour l'anode, et réciproquement, de l'électrode vers l'enzyme pour la cathode (figure 17).

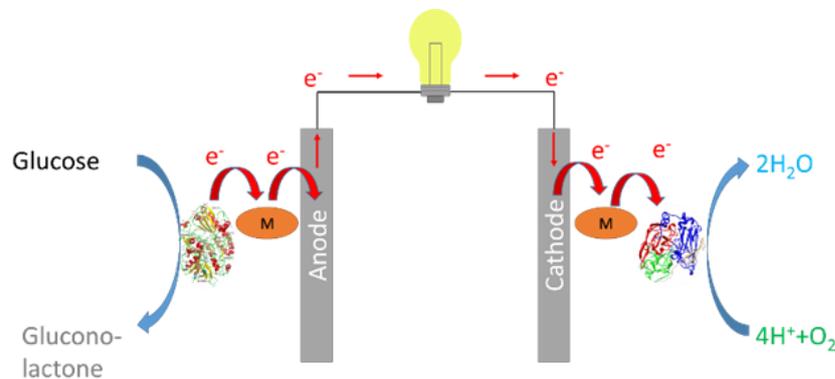


Figure 17 : Schéma d'une pile à glucose et oxygène enzymatique

#### 2.4.2.1.1 Exemples de biopiles à glucose (GBFC)

Un des premiers exemples de biopile fonctionnant dans un organisme est celle développée par Mano *et al.* [44], en 2003. Cette biopile enzymatique fut insérée dans un grain de raisin et était capable de fournir  $240 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  et une tension de 0,52 V, notons tout de même que ces performances furent obtenues à 30 mM de Glucose (figure 18).

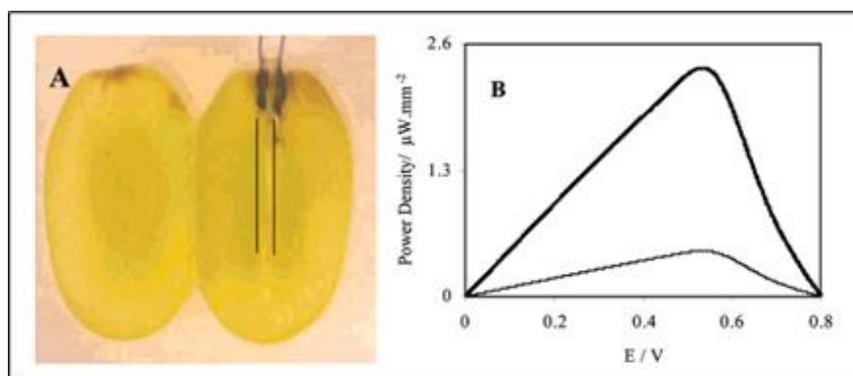


Figure 18: a/ Photo de la biopile implantée par Mano *et al.* b/ Densité de puissances en fonction de la tension, biopile implantée près de la peau (courbe en gras), et proche du centre (courbe fine) ; d'après [44]

Cette biopile utilisait la glucose oxydase pour oxyder le glucose et la bilirubine oxydase pour réduire l'oxygène, ces enzymes étaient alors greffées à des fibres de carbone via des polymères rédox (PAA-PVI- [Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> et PVP-[Os(N,N'-dialkylated-2,2'-biimidazole)<sub>3</sub>]<sup>2+/3+</sup>) [44]. Quelques années après, en 2010, les mêmes auteurs ont perfectionné leur système en employant des nanotubes de carbone et obtinrent des densités de puissance d'environ 500  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour une tension mesurée de 0,42 V, avec 15 mM de glucose, sous air et pH neutre, contre une densité de puissance proche 150  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour la précédente biopile (figure 19) [45], [46]. Ces travaux ont su démontrer qu'il est possible de produire de la puissance électrique à l'aide de catalyseur enzymatique et ceci en conditions similaires à l'*in vivo*. Toutefois, les auteurs en tentant de montrer une stabilité supérieure dans le temps via l'utilisation de nanotubes de carbone plutôt que des fibres de carbone, montrent également les limites des systèmes enzymatiques. En effet, bien que limitant la perte du courant de 20% à 80% après 7 heures d'utilisation (voir figure 19), ce temps est bien trop faible pour envisager l'alimentation de DMIa comme le pacemaker. De plus, le fait qu'ils aient inséré leur biopile dans des végétaux ne permet pas d'étudier la complexité d'un système implanté et biocompatible.

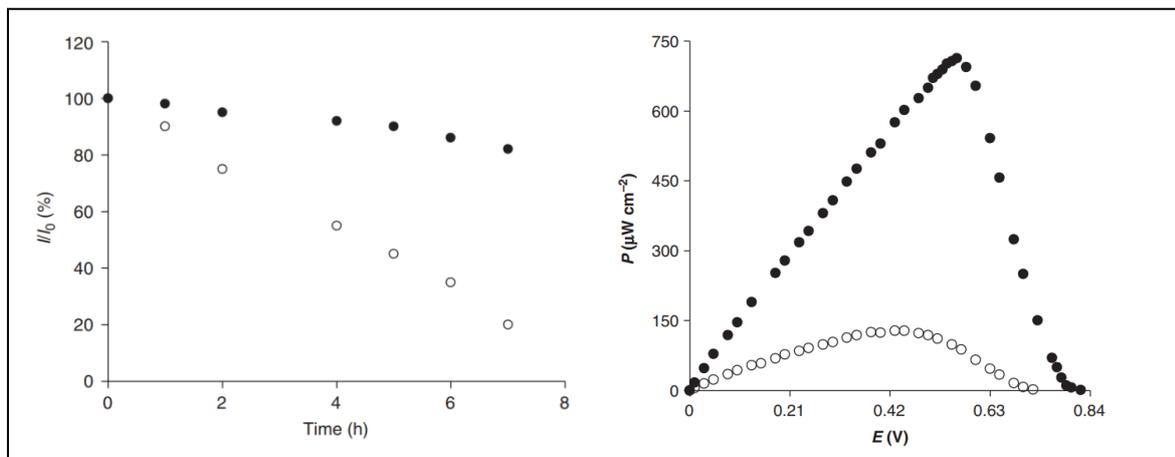


Figure 19: a/ Etude de la stabilité des électrodes, stabilité relative (%) au temps (h) pour une électrode en fibre CNT (cercles pleins) et une fibre de carbone (cercles ouverts). Tampon salin de phosphate à 37°C, + 0,3 V / Ag / AgCl, sous 1 atm d'oxygène et agitation vigoureuse,  $m = 170 \mu\text{g}$  b/ Courbe de densité de puissance pour une Bfc fabriquée avec des fibres de carbone (cercles ouverts) et des fibres CNT (cercles pleins) dans un tampon salin de phosphate, sous air, 15 mM de glucose à 37°C [45]

### 2.4.2.1.2 Exemples *in vivo*

En 2010, Cinquin *et al.* [47], publièrent la première biopile enzymatique capable de fonctionner dans un mammifère. Ces travaux étaient la première démonstration qu'une biopile peut fonctionner dans le corps d'un animal et cela en utilisant le glucose et l'oxygène présent dans le fluide extracellulaire. Cette biopile utilisait la glucose oxydase et la catalase à l'anode et la polyphénol oxydase à la cathode. Cette dernière enzyme est capable de réduire l'oxygène à pH physiologique 7 sans être inhibée contrairement à l'enzyme laccase utilisée massivement jusqu'ici et dont le pH optimum de fonctionnement est de 5. Les bioelectrodes ont été enrobées dans des sacs de dialyse pour d'une part assurer une biocompatibilité de la biopile et d'autre part afin d'empêcher la diffusion des molécules et espèces non désirables, tels que les anticorps et protéines, de l'organisme.

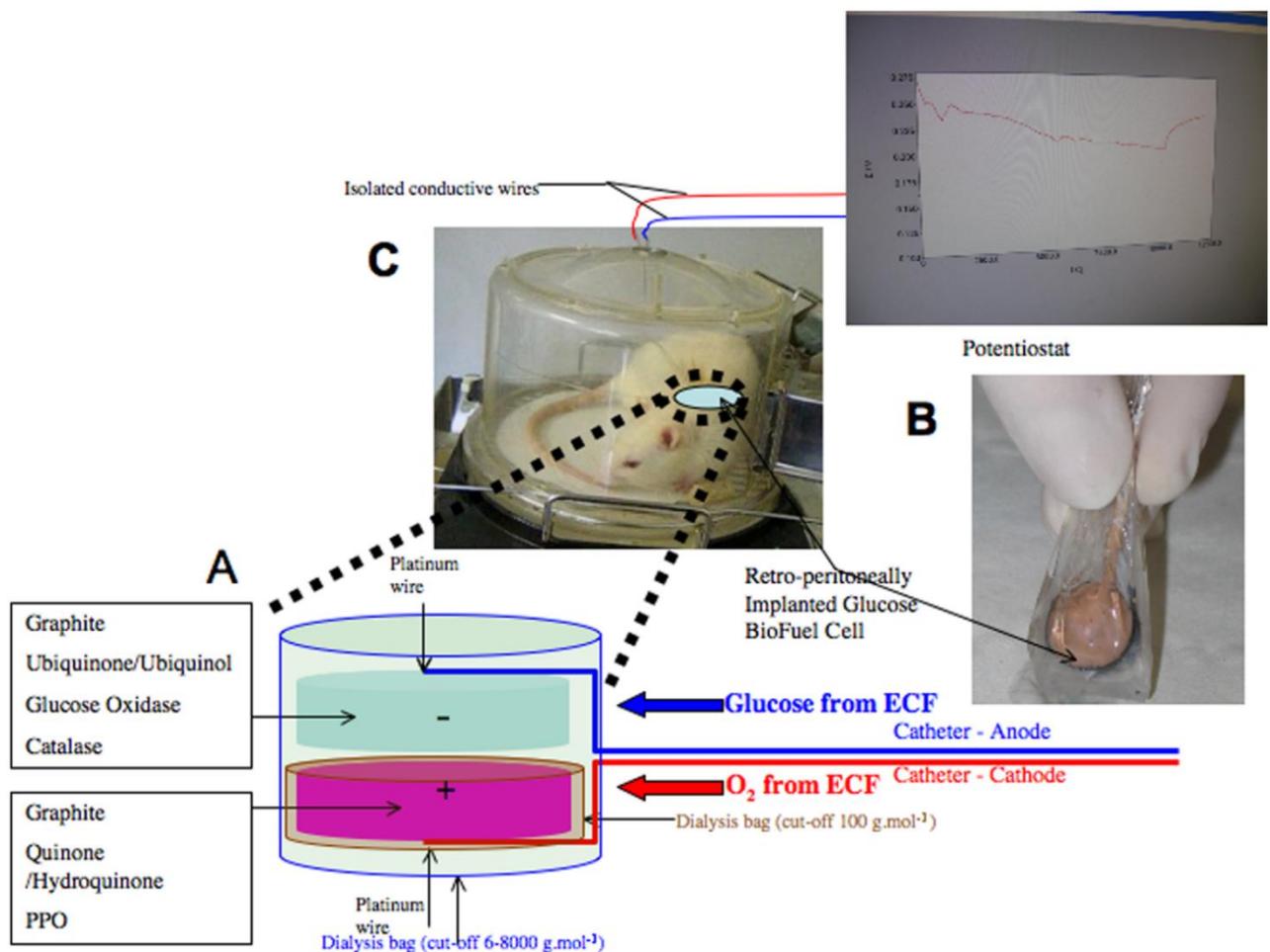
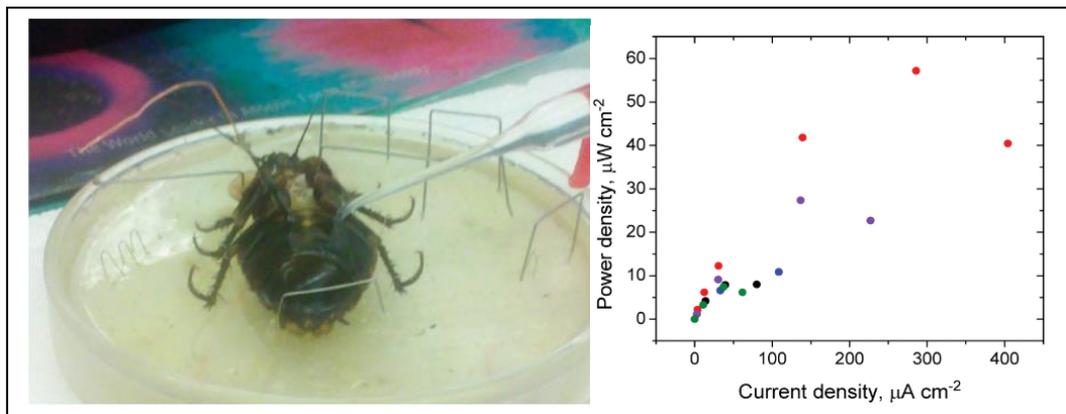


Figure 20: Schéma, photo, et mesure OCP de la Bfc implantée selon [47]

Un autre exemple de la littérature concerne Rasmussen *et al.* [48], les auteurs ont développé une biopile implantable contenant à l'anode deux enzymes : la tréshalase et la GOx et à la cathode : la bilirubine oxydase utilisant des complexes d'osmium greffés sur un squelette polymère comme relais d'électrons. Cette biopile a été implantée dans l'abdomen d'une blatte femelle (*Blaberus discoidalis*) (figure 21a) et était capable de délivrer une densité de puissance maximale de  $55 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  à 0,3 V (figure 21b). Notons toutefois que dans cette étude plusieurs molécules sont oxydées à l'anode : le tréhalose et le glucose, dont les concentrations dans l'animal sont respectivement de 30 et 5 mM, soulignant la quantité relativement importante de tréhalose. De surcroît, les auteurs ont également dû effectuer leur mesure en injectant de l'air au niveau de la cathode. De ces faits, les conditions de l'expérience menée par les auteurs sont éloignées de celles visées dans cette thèse. Egalement, Morishima et ses collègues [49] ont développé une GBFC enzymatique pour les blattes, qui a généré une puissance maximale de  $333 \mu\text{W}$  à partir du tréhalose dans l'hémolymphe des insectes à l'aide des enzymes de tréshalase et de glucose déshydrogénase (GDH).



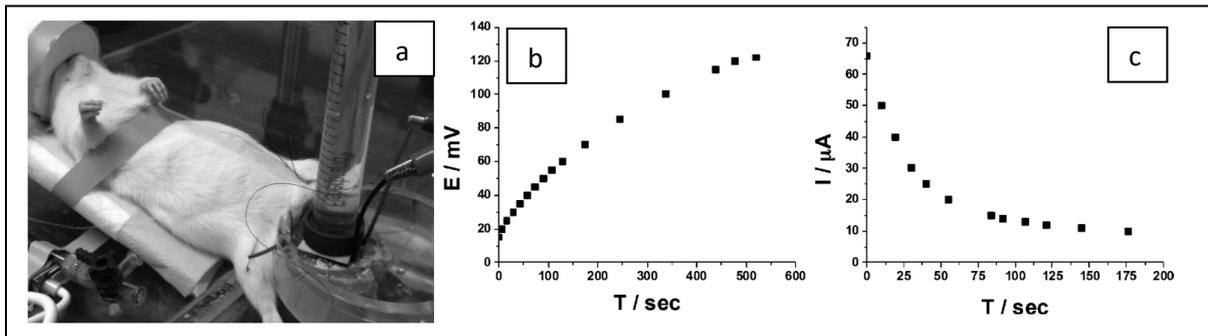


Figure 22: a/ Rat dont le tissu crémaster a été extériorisé et exposé à la Bfc b/ OCV des électrodes en contact avec le tissu crémaster c/ courant mesuré des électrodes en contact avec le tissu crémaster [51]

Les auteurs ont ainsi calculé à partir des courbes des figures 22b et 22c, la puissance délivrée par leur Bfc :  $0,175 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Les faibles performances observées sont très probablement dues au fait que les électrodes étaient au contact du tissu et non immergées en solution.

En 2012, Zebda et al. ont développé la première biopile à glucose/ $\text{O}_2$ , sans médiateur redox et à base de nanotubes de carbone (figure 23). Cette biopile était capable de fonctionner dans le corps d'un rat et de délivrer une puissance suffisante pour alimenter une LED ou un thermomètre électronique [52]. Cette biopile utilisait la laccase à la cathode et la glucose oxydase à l'anode ainsi que la catalase à l'anode pour éliminer le peroxyde d'hydrogène produit parasite de la réaction de réduction de l'oxygène à l'anode.

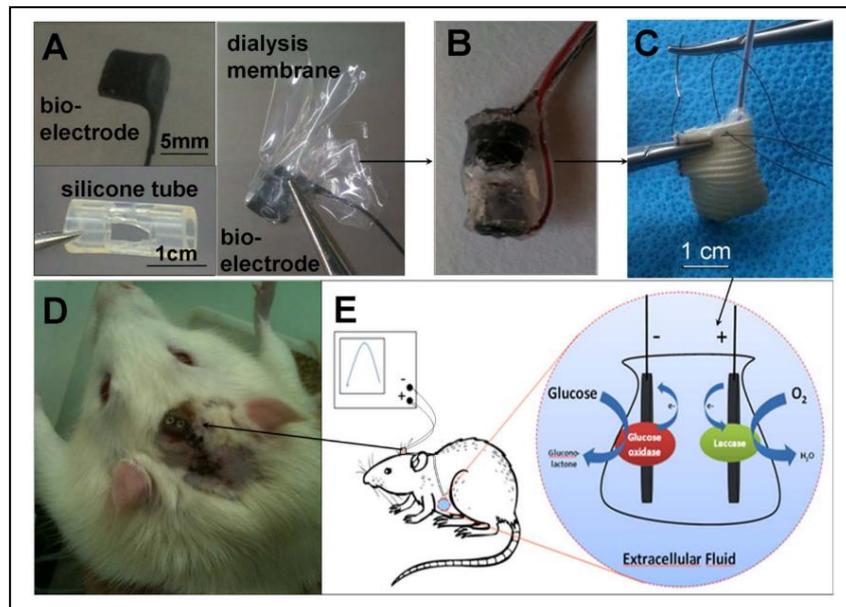


Figure 23: Fabrication d'une biopile implantable : a/ Composant d'une biopile : Bioélectrode, tube en silicone, membrane de dialyse b/ Bioanodes et biocathodes scellées dans du silicone c/ Biopile dans un sac DacronH d/ Connexions électriques de la Bfc implantée e/ Schéma des réactions ; d'après [52]

Dans une autre étude, Sales *et al.* [53] ont implanté une biopile hybride dans la veine jugulaire d'un rat (figures 24a,b et c). Cette biopile était composée de microélectrodes en fibre de carbone flexible (FCF) modifiées avec du rouge neutre utilisé comme médiateur redox de la glucose oxydase à la bioanode et un FCF modifié avec des nanoparticules de platine stabilisées sur un dendrimère de polyamidoamine PAMAM-G4 utilisé comme cathode. La densité de puissance a été évaluée sur une période de 24h, avec un OCV de 125 mV la biopile était capable de délivrer une densité de puissance maximale de  $95 \mu\text{Wcm}^{-2}$  à 80 mV (figure 24d). Les auteurs ont réussi à développer et faire fonctionner une Bfc implantée dans le compartiment sanguin durant 24h, toutefois, le lieu de l'implantation reste risqué. Bien que le système sanguin offre des concentrations en glucose et oxygène intéressants ainsi qu'une pression sanguine favorisant la diffusion de ces composants, ce lieu d'implantation est risqué du fait des nombreuses interactions induites par la présence de diverses cellules. Les auteurs expliquent leur choix du fait de l'utilisation du PAMAM, qui empêcherait la pénétration des globules rouges et blancs au sein même de la Bfc, cependant, le PAMAM n'empêche pas l'adhésion des protéines à sa surface, étape préliminaire permettant l'identification d'un corps étranger et induisant, éventuellement, une action de rejet ou une action de bio-encrassement de la part du corps. Egalement, les auteurs utilisent comme catalyseur cathodique des nanoparticules de Pt, qui peuvent se désorber ou s'agglomérer et ne sont pas sélectifs à l'oxygène, ce qui a pour impact de diminuer les performances sur le long terme de la cathode et donc de la Bfc. Les auteurs observent également que leur Bfc synthétise  $\text{H}_2\text{O}_2$ , molécule indésirable pour l'*in vivo* du fait de ses fortes propriétés oxydantes.

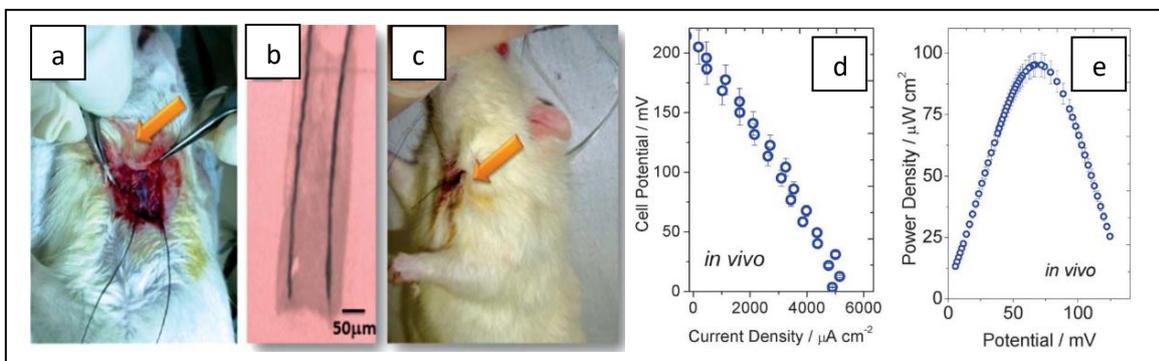


Figure 24: Photos a/ du cathéter dans la jugulaire b/ des électrodes c/ cathéter et Bfc dans la jugulaire ; d/ tension en fonction de la densité de courant de la Bfc *in vivo* e/ densité de puissance en fonction de la tension *in vivo* [53]

Un autre exemple fourni par la littérature sont les travaux développés par Shleev et ses collègues [54] qui ont réussi à produire  $2 \mu\text{W/cm}^2$  en utilisant une biopile implantée dans le cerveau d'un rat (figures 25), comportant des microélectrodes d'or avec de la bilirubine oxydase à la cathode et de la cellobiose déshydrogénase à l'anode.

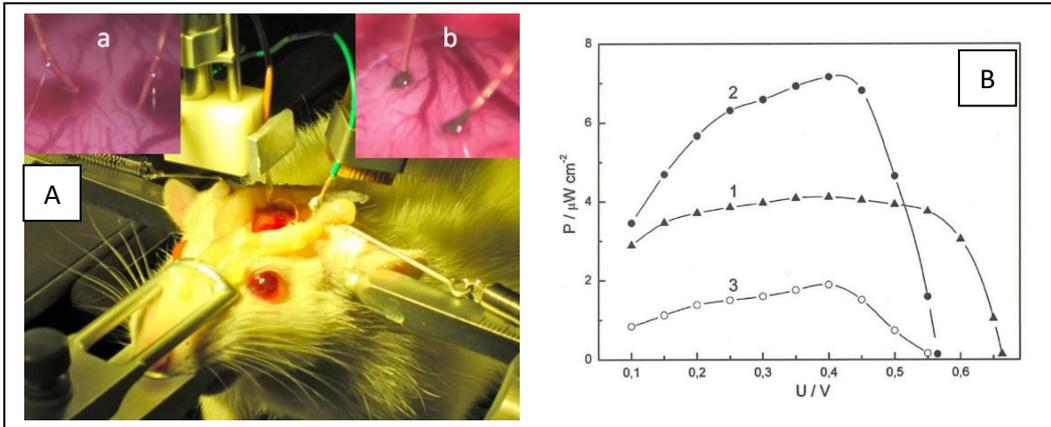


Figure 25:A/ Photo de la bfc implantée dans le cerveau du rat avec (a) et sans (b) saignement local. B/Densités de puissances de la bfc mesurées en présence de 2,5 mM de glucose tamponné (1), de CSF (2), implantée dans le cerveau du rat (3) [54]

Notons cependant que pour ce dernier exemple les performances restent relativement faibles par rapport aux valeurs décrites dans les précédentes études, il faut toutefois prendre en compte qu'il s'agit ici d'électrodes nanostructurées, de ce fait la dimension n'est plus la même et doit donc être prise en compte.

Récemment, El Ichi *et al.* [55] ont publié la première biopile implantée dans le corps d'un lapin. Les auteurs ont démontré que cette biopile est capable de conserver son activité durant deux mois in vivo. Cette biopile enzymatique, à base de nanotubes de carbone, était composée de laccase à la cathode et de GOx et naphtoquinone à l'anode. Les auteurs ont enrobé les électrodes d'une membrane de chitosan, permettant ainsi d'améliorer la biocompatibilité et diminuer les risques de rejet du DMI par le corps. Leur Bfc était reliée à un système de télétransmission leur permettant d'observer les performances de leur Bfc en temps réel (figures 26 B et D).

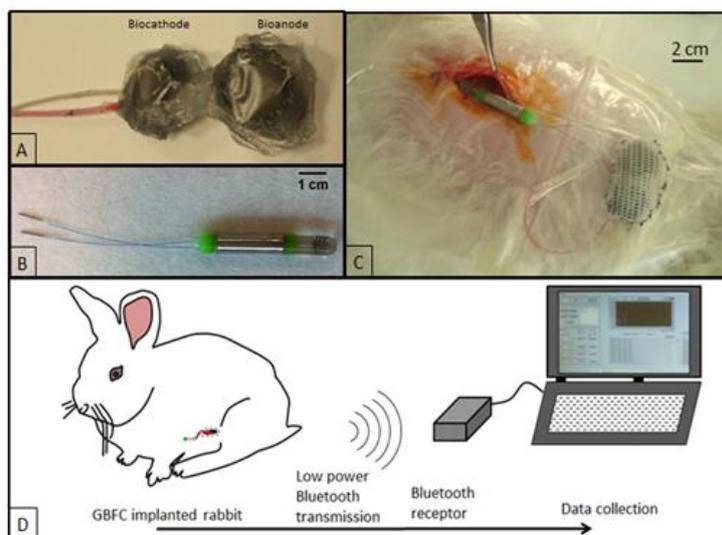


Figure 26:A/ bioelectrodes enrobées de membranes de chitosan B/ système de télétransmission des datas C/ Bfc encapsulée dans une enveloppe Dacron et connectée au système de télétransmission D/ Schéma de télétransmission des données [55]

Malgré ces nombreux travaux et avantages concernant les biopiles enzymatiques, ces dernières souffrent de plusieurs limitations. Entre autres, la faible disponibilité de l'oxygène souligne une des principales limites imposées par les organismes vivants. La littérature démontre également la difficulté quant à développer des catalyseurs efficaces afin de procéder à l'ORR (biocathode au contact de l'air). De plus, la courte durée de vie des enzymes détériore les performances dans le temps des Bfc implantées. En effet, bien que les stratégies d'immobilisation des enzymes aient permis d'accroître considérablement leur durée de vie, ces avancées restent insuffisantes pour qu'une biopile soit capable d'alimenter un DMla sur des durées supérieures à une année.

#### 2.4.2.2 Les Biopiles abiotiques

Le terme « abiotique » est défini dans la littérature comme : « se dit d'un milieu impropre à la vie // qui ne concerne pas, ne conditionne pas la vie » [56], [57], plus largement, le terme abiotique est en opposition au terme biotique et vient donc s'opposer au milieu du vivant et de ce qui en résulte. Dans le cadre des biopiles, les catalyseurs issus du vivant sont, pour la plupart, des catalyseurs enzymatiques, aussi, le terme abiotique vient donc en opposition au terme enzymatique et comprend donc un très large choix de catalyseurs (métaux purs, alliages, molécules synthétiques...) mais aussi selon la forme de ces catalyseurs (nanoparticules, greffage de molécules...).

##### 2.4.2.2.1 Biopiles abiotiques *in vitro*

Historiquement le concept d'une pile à combustible utilisant des catalyseurs abiotiques afin d'oxyder le glucose remonte avec les travaux publiés par Bockris qui étudia, en 1964, l'oxydation anodique de la cellulose et de glucides [58]. Un brevet déposé par Union Carbide décrit également une pile à combustible utilisant des combustibles organiques solides avec notamment l'oxydation du glucose en milieu alcalin [59]. On peut également citer les travaux de Warner et Robinson [60] qui ont développé une biopile abiotique capable de produire de l'électricité à partir de fluide corporel. Leur prototype était capable de fournir des performances de  $165 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  pendant 24h et pouvait fonctionner en continu sur près de 250 h. Avec ce dispositif Warner et Robinson visait l'alimentation du pacemaker, qui venait alors d'être développé, via une implantation de leur biopile, toutefois, ils se confrontèrent très rapidement à des phénomènes de désinhibition et de biofouling de leur biopile en présence de liquide pleural. En parallèle, Wolson *et al.* ont développé une biopile abiotique qu'ils qualifièrent de « bioauto-pile combustible » [61]. Cette biopile était composée de deux électrodes de platine séparées l'une de l'autre dans des béchers reliés par un pont salin composé de chlorure de potassium. Les deux béchers contenaient une solution tamponnée à pH neutre de phosphate et bicarbonate. Dans l'un des béchers, où avait lieu la réaction d'oxydation du glucose (avec 5 mM de glucose), barbotait de l'azote afin d'empêcher la réaction parasite de réduction de l'oxygène qui devait avoir lieu dans le deuxième bécher où était bullé de l'oxygène. Les performances de la biopile développée par Wolson *et al.*

atteignent  $3,5 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour une durée maximale de 18h, toutefois, leur dispositif ne put être étudié dans des conditions physiologiques où glucose et oxygène sont présents tous les deux.

Les années 1990 voient le développement des MEMS, microsystèmes électromécaniques, qui ont permis non seulement de réduire la taille des dispositifs électroniques complexes, en particulier implantés, mais également leur consommation électrique. Comme les DMIs nécessitent moins d'énergie, notamment les pacemakers, Woias *et al.* donnent, avec leurs travaux, un regain d'intérêt aux biopiles abiotiques [62]. Dans ce même temps, le développement de nouveaux nanomatériaux va également voir le jour et contribuer au regain d'intérêt des biopiles abiotiques et plus généralement aux piles à combustible. Grâce à cette diminution de la taille des catalyseurs, les chercheurs ont pu développer des électrodes plus performantes, grâce à une activité catalytique augmentée via des surfaces spécifiques plus importantes. Par exemple, Von Stetten *et al.* [63] ont déposé des particules de platine sur du carbone (figure 27) afin de développer une anode abiotique. Pour autant, la puissance délivrée par cette biopile reste faible ( $2 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) et sa stabilité est inférieure à quinze jours.

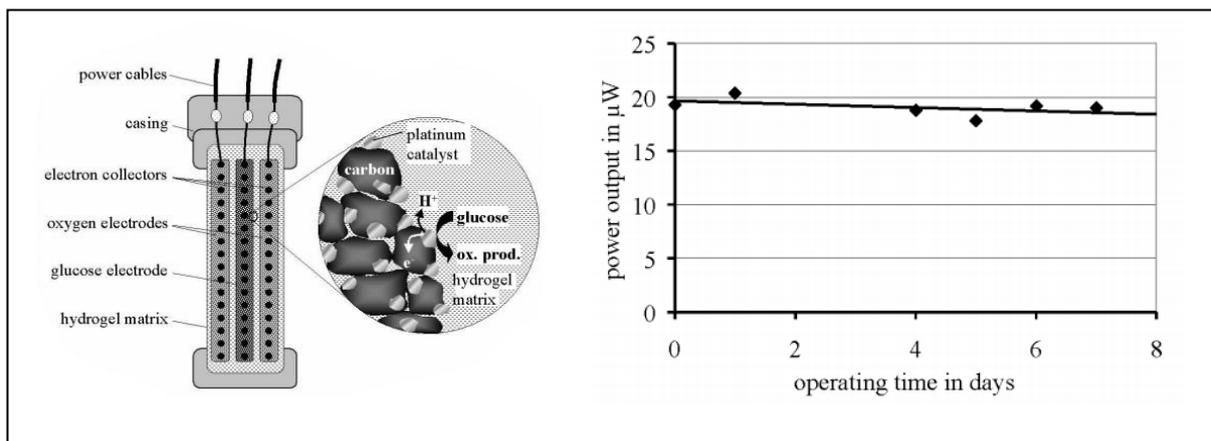


Figure 27: Schéma et stabilité dans le temps d'une anode abiotique de nanoparticules de Pt sur du carbone selon Von Stetten [63]

En 2012, Cosnier *et al.* [64], ont développé une biopile abiotique à base de nanotubes de carbone, et de complexe de diméthylester deutéroporphyrine rhodium (III) pour l'oxydation du glucose et un catalyseur de phthalocyanine de cobalt (II) pour la réduction de l'oxygène. Les auteurs ont démontré que la pile pouvait fournir des densités de puissances de  $0,182 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  à  $0,22 \text{ V}$ , et une OCP de  $0,64 \text{ V}$  avec  $50 \text{ mM}$  de Glucose et à pH alcalin. Cependant, leur diagramme de Pourbaix démontre qu'à un pH neutre, le complexe de rhodium existe sous trois formes selon le potentiel :  $\text{Rh(I)-H}$  ;  $\text{Rh(II)}$  et  $\text{Rh(III)-OH}$ , avec un écart de potentiel entre les couples  $\text{Rh(I)H/Rh(II)}$  et  $\text{Rh(II)/Rh(III)-OH}$  de l'ordre de  $150 \text{ mV}$  vs ECS (figure 28). L'apparition de ce système à trois espèces redox implique qu'il ne peut y avoir de

transfert direct de deux électrons au glucose à pH neutre, pouvant conduire à une oxydation partielle du glucose. De ce fait, l'utilisation de ce système en implantable semble compromis.

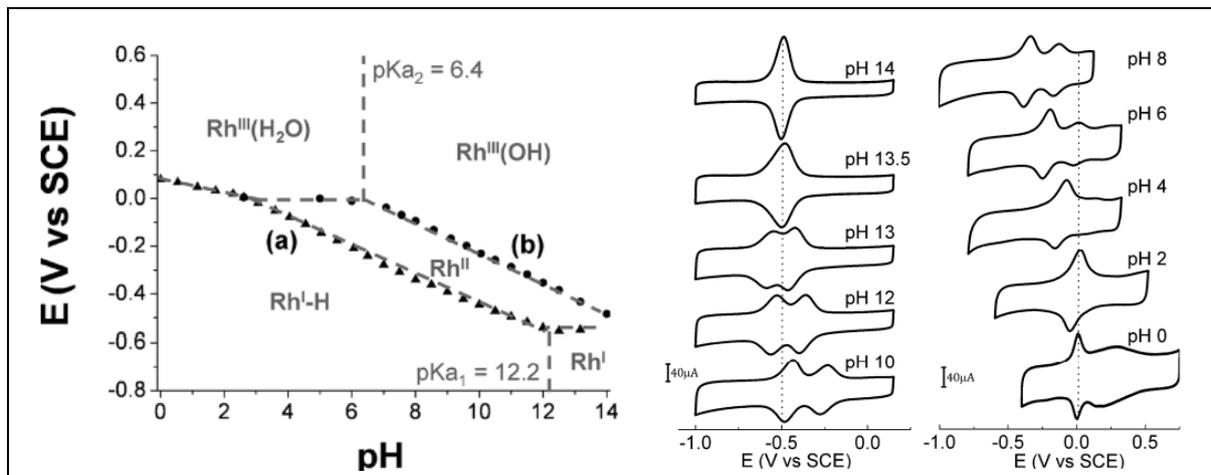


Figure 28: Diagramme de Pourbaix et CV à différents pH d'une électrode MWCNT/(DPDE)Rh<sup>III</sup> ( $\nu = 50 \text{ mV.s}^{-1}$ , Britton-Robinson buffer, 25°C) [64]

Puis récemment, en 2014, Holade *et al.* ont conçu une biopile abiotique capable d'alimenter un pacemaker, à partir d'une solution de sérum humain [65]. Leur travail porte sur le développement de catalyseur bimétallique d'or et platine sous forme de nanoparticules déposées sur du noir de carbone (CB), le tout déposé sur du buckypaper ou du papier carbone. Les auteurs ont proposé une composition de Au<sub>60</sub>Pt<sub>40</sub>/CB pour l'anode et une composition de Au<sub>100</sub>Pt<sub>0</sub>/CB pour la réduction de l'oxygène à la cathode, ceci, après avoir mesuré la plus grande différence de potentiel entre deux électrodes constituées de différents ratios de Au/Pt en présence de Glucose et d'oxygène dissous. Leur biopile a délivré une puissance maximale de 105  $\mu\text{W}$  en condition physiologique avec une tension de 0,35 V et une densité de courant de 0,65  $\text{mA.cm}^{-2}$ . Ces travaux démontrent la faisabilité du développement d'un DMLa autoalimenté via une biopile à glucose et oxygène totalement abiotique. Les auteurs ont su développer un système fonctionnant en condition physiologique et qui contenait simultanément de l'oxygène et du glucose, bien que les catalyseurs employés n'étaient pas sélectifs, la réaction parasite d'ORR à l'anode était observée mais négligeable et tolérée par le système.

En 2019, Zhao *et al.* ont proposé d'utiliser dans leurs travaux [66], un complexe de cuivre utilisant comme ligand : 3,5-diamino-1,2,4-triazole (Hdatrz) (figure 29), afin de réduire l'oxygène à la cathode et ont utilisé une anode faite de nanoparticules d'or et chaque catalyseur fut déposé sur une plaque d'oxyde d'indium-étain [66].



système, la courbe que montrent les auteurs reliant la puissance de la pile en fonction du temps de l'expérience, montre une perte de 40% des performances après 30 jours d'activité, ce qui doit être optimisé afin de viser une application d'implantation. Dans cette optique d'implantation, une autre étude qui doit être menée, car décisive, est une étude *in vivo*, afin d'observer d'une part si les phénomènes de bio encrassement ne désinhibent pas leur système catalytique, car l'emploi de surface comportant des nanoparticules d'or, bien que biocompatible, apportent des phénomènes d'adhésion de molécules et organismes issus de la biologie.

#### 2.4.2.2.2 Biopiles abiotiques *in vivo*

Historiquement, les premières biopiles qui ont été implantées étaient abiotiques. Pour exemple, on peut citer les travaux de Drake *et al.* [67] qui développèrent une biopile abiotique dont le système et les électrodes étaient séparés via un jeu de membranes en silicone et de dialyse permettant la séparation des molécules d'oxygène et des glucides. Leur système fut implanté en sous-cutané dans un chien et fonctionna *in vivo* sur une période de 30 jours, donnant une performance stable de  $2,2 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

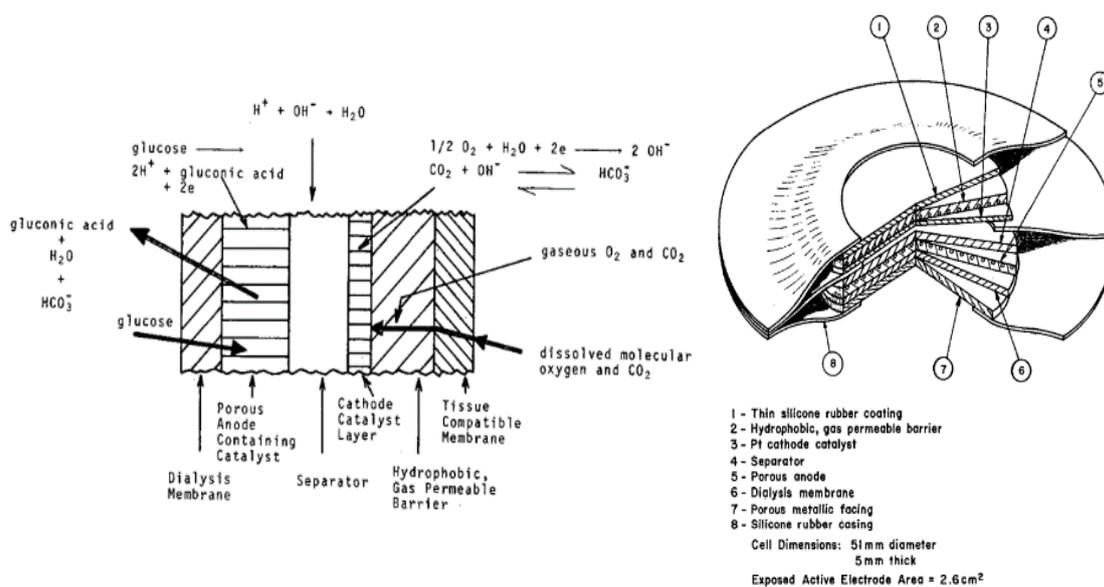


Figure 31: Schémas de la biopile abiotique selon Drake et al. [67]

Quelques temps après, une autre biopile abiotique fut présentée par P. Malacheský *et al.* lors de la septième conférence inter société sur l'ingénierie de la conversion d'énergie. Cette biopile fut capable de fonctionner *in vivo* dans la veine d'un mouton donnant une densité de puissance de  $40 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , malheureusement, moins d'une heure après l'implantation, la biopile ne fonctionnait plus.

Quelques années après, Weidlich *et al.* décrivent dans leurs travaux en 1976 [68], un système de biopile abiotique constitué d'une anode métallique d'aluminium et d'une cathode métallique d'argent (figure 32a). Un total de 6 Bfc ont été implantées entre les muscles abdominaux internes et externes obliques de chiens. Les auteurs expliquent que 4 de ces Bfc ont démontré des d.d.p. trop faibles pour être mesurées par induction. Une de ces Bfc a pu être implantée durant 180 jours (figure 32b), durant lesquels la puissance délivrée n'était pas stable, diminuant de 60 à  $20 \mu\text{W}$  les 30 premiers jours, puis augmentant jusqu'à  $50 \mu\text{W}$  avant d'osciller pendant les 100 derniers jours[68].

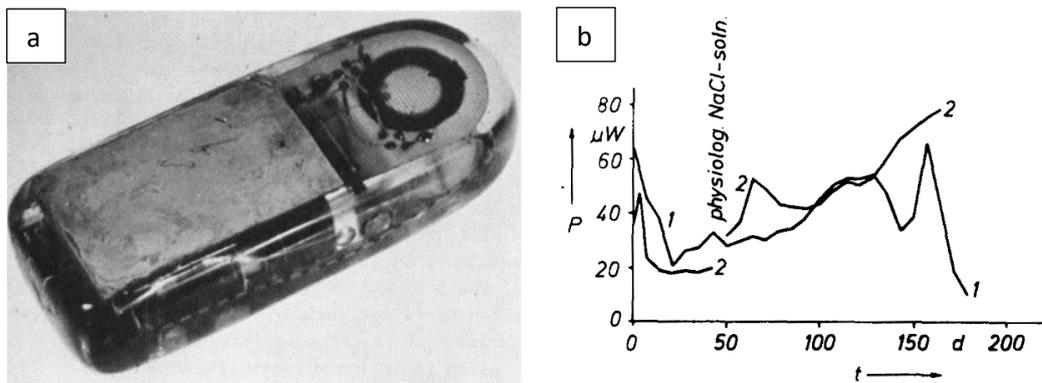


Figure 32: a/ Bfc abiotique de Weidlich *et al.* composée d'une anode métallique d'aluminium et d'une cathode métallique de d'argent b/ Puissances des bfc implantées dans des chiens : 1/ 180 jours,  $r=5 \text{ KOhms}$  ; 2/ 40 jours et *in vitro* pendant 110 jours,  $r= 13,25 \text{ kOhms}$  [68]

Malgré les efforts mis en place, ces dispositifs n'offrent pas des puissances suffisamment intéressantes pour alimenter les DMIas. Les auteurs de ces travaux se sont également heurtés à des soucis de biocompatibilité et de bio encrassement. Ils ont toutefois proposé des optimisations de leur Bfc via de nouveau enrobage à base de résine époxy [68] (figure 33a) ainsi qu'en entourant l'anode d'aluminium par deux cathodes de charbon actif jouant le rôle de catalyseur de l'ORR. Le fait d'entourer l'anode de cathode a limité la réaction parasite de l'ORR à l'anode.

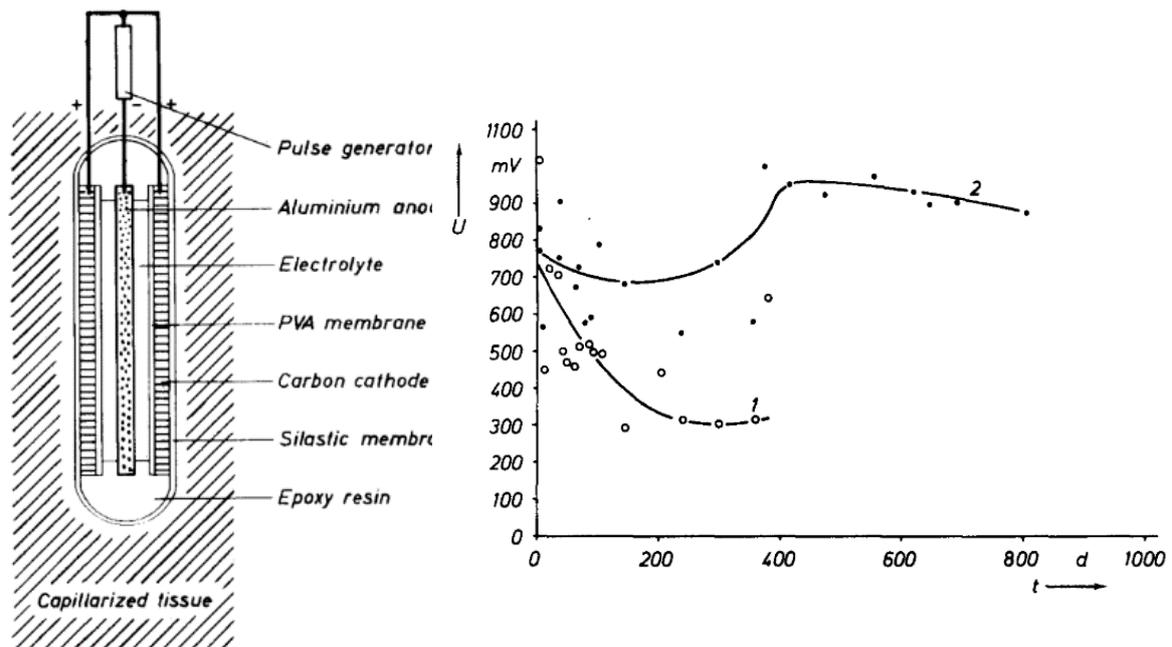


Figure 33: a/ Schéma de la pile abiotique implantée de Weidlich et al. composée d'une anode d'aluminium et de deux cathodes de charbon actif b/ Tensions de bfc implantées dans des chiens : 1/ 330 jours,  $r=4,7$  kOhms ; 2/ 809 jours,  $r=8,2$  kOhms [68]

Weidlich *et al.* ont pu ainsi implanter deux Bfc et mesurer une d.d.p. sur 380 et 809 jours (figure 33b). Les auteurs indiquent que l'une des deux Bfc (figure 33b-1) a entraîné une forte inflammation et l'expérience a dû être stoppée, la d.d.p. mesurée avant la fin de l'expérience semblait se stabiliser vers 330 mV. A contrario, la seconde Bfc implantée n'a engendré aucune complication, et une tension moyenne a pu être mesurée à 775 mV pour une puissance moyenne de 73  $\mu$ W. Toutefois, l'allure des courbes observées sur la figure 33b semble montrer des systèmes mettant un certain temps à se stabiliser.

### 3 Conclusion et problématique

Aujourd'hui, l'alimentation électrique des dispositifs médicaux implantables actifs est un verrou majeur dans le développement des nouveaux DMIs. Les piles à lithium sont encore aujourd'hui considérées comme une solution satisfaisante pour l'alimentation des DMIs. Toutefois, les développements et progrès stagnent quant à optimiser drastiquement les performances des piles au lithium. De plus, les piles au lithium atteignent leurs limites en termes de densité énergétique et sont de moins en moins en mesure d'assurer les besoins électriques des nouveaux DMIs, plus sophistiqués et plus énergivores. Ceci combiné à une demande croissante de miniaturisation fait que les piles au lithium actuelles atteignent leurs limites. Pour ces raisons, la recherche s'oriente vers l'exploration de nouvelles solutions alternatives aux piles au lithium implantables. Parmi ces alternatives, il existe des systèmes de récupération d'énergie du corps humain. En effet, le corps humain possède diverses sources d'énergies sous différentes formes : mécanique (battements du cœur, compression/décompression de la cage thoracique lors de la respiration...) ; gradient de température ; ou encore de manière chimique. De toutes sources d'énergies exploitables, la voie chimique est la plus prometteuse. En effet, cette voie offre théoriquement une grande quantité d'énergie. Un moyen de transformer cette énergie chimique en énergie électrique est l'utilisation d'une biopile à combustible. Cette biopile est capable de transformer les espèces glucose et oxygène, toutes deux présentes dans le corps humain, en énergie électrique et ainsi alimenter un DMI faiblement énergivore tel que le pacemaker. Le diagramme de Ragone (figure 34) met en évidence les densités de puissances et d'énergies des différents systèmes produisant de l'énergie et montre les besoins énergétiques du pacemaker :

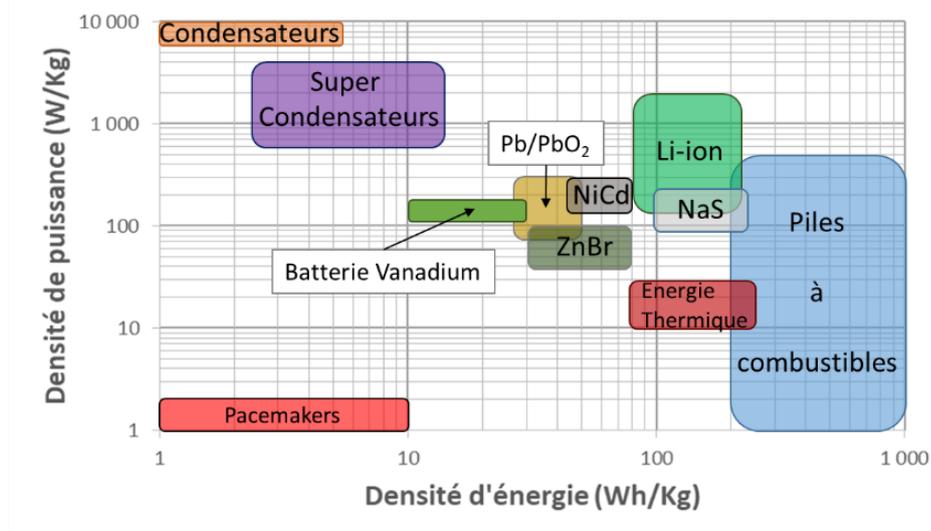


Figure 34: Diagramme de Ragone montrant différentes sources d'énergies électriques et les besoins de pacemakers

La biopile à combustible à glucose et oxygène peut-être constituée de deux types de catalyseurs afin d'oxyder le glucose et réduire l'oxygène, soit un catalyseur enzymatique ou bien, un catalyseur abiotique. Aujourd'hui l'utilisation de catalyseur enzymatique pour les biopiles implantables est la plus explorée et cela du fait des avantages de la catalyse enzymatique en termes de sélectivité et capacité à fonctionner dans l'organisme vivant. Les biopiles enzymatiques citées en amont de ce chapitre possèdent de grands avantages (cinétique de réaction élevée, réaction spécifique à une espèce chimique, performances plus élevées...) cependant, les biopiles enzymatiques souffrent de la faible stabilité des enzymes. En effet, ces catalyseurs sont sensibles à leur environnement et peuvent se dénaturer, se désinhiber ou bien se désorber selon le pH, la température et les inhibiteurs environnants. Aussi, afin de fournir de l'énergie de manière constante et suffisante une biopile abiotique serait une option prometteuse. Toutefois, les biopiles abiotiques développées par le passé ont montré des électrodes peu sélectives, diminuant les performances électrochimiques mais aussi la stabilité dans le temps. Ce phénomène est d'autant plus important pour la cathode, électrode où a lieu la réaction de réduction de l'oxygène (ORR), du fait de la faible quantité d'oxygène disponible *in vivo*. Le platine, catalyseur bien connu de l'ORR dans la littérature, peine à démontrer des stabilités et des performances électrochimiques en condition physiologique pouvant rivaliser avec celles des piles au lithium actuellement sur le marché. De plus, les contraintes liées à l'implantation font que les piles abiotiques implantées par le passé ont pu générer des infections ou des rejets.

Dans ce contexte, le sujet de cette thèse propose de développer une biocathode abiotique capable de procéder à la réduction de l'oxygène en conditions physiologiques. La réaction de l'ORR aura pour objectif d'être effectuée de manière sélective afin d'offrir une stabilité améliorée par rapport à celle du platine. Une première partie sera consacrée au choix des matériaux composant cette cathode tout en respectant une biocompatibilité en vue de l'implantation chez l'homme. Dans cette première partie, les matériaux sélectionnés seront alors architecturés de manière à laisser diffuser l'oxygène et ainsi fournir des densités de courant optimales. Différentes cathodes seront alors comparées entre elles afin de fournir les meilleures performances électrochimiques et stabilités dans le temps. Dans une deuxième partie, les composés de cette électrode seront les sujets d'études biologiques afin de vérifier la biocompatibilité des matériaux. Cette même étude sera faite sur les composés sous forme d'électrode. Cette deuxième partie étudiera aussi l'impact de la cathode sur l'animal afin de limiter les réactions d'inflammation et éviter les réactions de rejet. L'étude *in vivo* permettra également d'étudier l'impact du vivant sur la biocathode. Enfin, dans une troisième partie, ce manuscrit cherchera à montrer les performances électrochimiques de cette cathode connectée à différents types d'anodes. Cette troisième partie montrera également une étude *in vivo* en implantant des biopiles comportant la cathode développée dans le corps de rats. Les biopiles en fonctionnement permettront ainsi de comparer les performances obtenues avec celle de la littérature.

## Chapitre 2 : Fabrication d'une biocathode abiotique pour la réduction de l'oxygène

## 1 Introduction

Comme vu au cours du premier chapitre de cette thèse, l'élaboration et la caractérisation d'un système permettant l'ORR en condition *in vivo* est un travail complexe car pluridisciplinaire et qui demande la mise en place d'études : 1/ chimiques, afin de développer un catalyseur apte à effectuer l'ORR dans des conditions spécifiques et doit être sélectif afin d'éviter les réactions parasites ; 2/ d'ingénierie des matériaux, afin de développer une électrode dont l'architecture soit la plus à même de laisser diffuser les espèces chimiques au sein de l'électrode ; 3/ biologiques, afin de certifier une biocompatibilité du système permettant l'acceptation d'un élément externe au corps dans lequel l'électrode sera implantée.

Ce chapitre traitera des points 1 et 2, à savoir, le choix et l'étude de catalyseurs capables de réaliser sélectivement et efficacement la réaction de réduction de l'oxygène (ORR) en condition physiologique. La formulation et la mise en forme de catalyseur, qui impactent fortement la performance des électrodes, seront également traitées. Le point 3 portant sur les interactions entre les matériaux et le vivant sera traité dans le chapitre suivant de ce manuscrit. Cependant, les contraintes concernant la biocompatibilité seront d'ores et déjà intégrées lors du choix des matériaux mis en œuvre.

Lors de ce chapitre nous découvrirons également la mise en œuvre d'un nouveau processus de développement des cathodes non connu de la littérature jusqu'à présent mettant en jeu la lyophilisation. Nous étudierons l'électrochimie d'une cathode obtenue à l'aide de ce procédé et verrons également les limites de ce système ainsi qu'une voie d'optimisation.

## 2 Choix des matériaux

### 2.1 Catalyseurs de la réaction de réduction de l'oxygène

#### 2.1.1 Réaction de réduction de l'oxygène

La réaction de réduction de l'oxygène (ou en anglais Oxygen Reduction Reaction, ORR) est l'une, si ce n'est la plus importante des réactions chimiques du monde du vivant. Cette réaction, qui s'effectue par le biais de la respiration ou par la transformation de carburant dans les organismes vivants, est une réaction thermodynamiquement favorable mais très lente, voire de vitesse quasiment nulle sur certains substrats. Bien que la littérature compte un grand nombre d'études menées sur cette réaction, son mécanisme et sa cinétique sont encore mal définis et ceci même pour des catalyseurs très étudiés comme le platine. On peut malgré tout tirer de la composition physique de cette molécule d'oxygène des informations thermodynamiques et cinétiques afin d'envisager différents scénarios lors de cette ORR : la distribution orbitale des électrons dans la molécule fait apparaître 6 orbitales de valences dont deux électrons célibataires dans les orbitales anti-liantes. Ces deux électrons étant de spins non appariés, la molécule est paramagnétique et dans un état triplet. L'état triplet de la molécule est responsable de la faible réactivité de l'oxygène moléculaire sur la majorité des substrats qui eux sont à l'état singulet. La molécule peut ainsi accepter 1, 2 ou 4 électrons dans ses orbitales anti-liantes pour former respectivement l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ), l'ion peroxyde ( $O_2^{2-}$ ) et l'espèce  $O^{2-}$ . Par ailleurs, la liaison O-O est une liaison forte (enthalpie de formation =  $-498,7 \text{ kJ mole}^{-1}$ ), donc difficile à rompre, ce qui explique les difficultés quant à la réduction de l'oxygène dans cette configuration [69].

L'ORR peut donc être effectuée de différentes manières selon les conditions environnementales, et peut générer différents produits :

Conditions	Réactions	Potentiels standards de réaction électrochimique (V vs ENH)
Milieu Acide	$O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$	1,229
	$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$	0,7
	$H_2O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow 2H_2O$	1,75
Milieu Alcalin	$O_2 + 4e^- + 2H_2O \rightarrow 4OH^-$	0,401
	$O_2 + 2e^- + H_2O \rightarrow 4OH^-$	-0,065
	$O_2 + 2e^- + H_2O \rightarrow 4OH^-$	0,867

Figure 35: Potentiels redox des réactions de réduction de l'oxygène en conditions alcaline et acide (Les potentiels thermodynamiques des réactions de réduction à 1 électron impliquant la forme de superoxyde de l'oxygène ne sont pas explicités car leurs valeurs dépendent fortement des solvants et conditions utilisés.) [69-70]

On peut donc observer, en milieu aqueux, quatre voies de réduction totale de l'oxygène en eau ou ion hydroxy : deux chemins directs, mettant en jeu les mécanismes réactionnels à quatre électrons en milieu alcalin ou acide réduit via 3 espèces intermédiaires :  $*OOH$  ;  $*O$  ;  $*OH$  ; et deux chemins en série, avec la formation de  $H_2O_2$  (milieu acide) et  $HOO^-$  (milieu alcalin) et mettant en jeu deux électrons (figure 35). Un des facteurs déterminant du mécanisme de l'ORR selon un procédé impliquant deux ou quatre électrons est la vitesse de désorption des peroxydes des matériaux sur lesquels l'ORR s'effectue. Le mécanisme de l'ORR s'effectuera préférentiellement à 2 électrons sur un support permettant une vitesse de désorption élevée des peroxydes, et à l'inverse, un mécanisme à 4 électrons sera favorisé pour des surfaces de matériau où la vitesse de désorption est faible [70].

Ainsi, lorsque la réaction de réduction de l'oxygène est impliquée dans une biopile à combustible implantée, un catalyseur cathodique doit être spécifique à l'ORR. Un catalyseur idéal doit effectuer une seule et unique réaction : l'ORR, il doit donc être sélectif à l'oxygène et éviter les réactions parasites telles que l'oxydation du glucose, ce qui a lieu avec le platine à pH neutre. Le catalyseur cathodique doit également favoriser une ORR mettant en jeu un mécanisme à 4 électrons afin de limiter la formation d'espèce de type  $H_2O_2$  ou encore  $HOO^-$  qui sont des espèces chimiques corrosives, très réactives, et nocives. La littérature nous informe sur la grande quantité de catalyseurs abiotiques capables de réduire l'oxygène [58], [63], [71]. Historiquement, les métaux tels que le platine ou l'or étaient les plus utilisés car efficaces du point de vue de la cinétique de réaction. Ces catalyseurs sont très utilisés dans les piles à combustible opérant en milieux acides ou en milieux basiques. Cependant, ces catalyseurs souffrent de plusieurs inconvénients : leur coût, leur rareté, leur faible sélectivité réactionnelle et leur empoisonnement les rendant inactifs [72]. En outre, ils sont moins efficaces à pH neutre ce qui les rend moins performant dans le cas des biopiles implantables à glucose et oxygène implantables.

### 2.1.2 Catalyseur de l'ORR avec support carboné

Ce sont principalement les problématiques de coûts et de disponibilités qui ont orienté la recherche vers la conception de nouveaux types de catalyseur. Une solution décrite dans la littérature est basée sur l'utilisation de matériaux carbonés qui sont moins onéreux, plus abondants, et avec une activité électrocatalytique très intéressante. Parmi les différents supports carbonés, le graphène est un candidat de choix de par ses propriétés avantageuses telles qu'une surface active et une porosité élevées [73], [74], une conduction électrique et thermique performante [75], [76] ainsi qu'une tenue mécanique robuste [77], [78]. Afin de diminuer la quantité utilisée de platine, différents travaux proposent d'utiliser le platine sous forme de nanoparticules déposées sur un matériau conducteur (*e.g.* graphène, nanotube de carbone, etc...) mais là aussi, des problèmes apparaissent liés à l'utilisation du

platine tels que la sélectivité de l'ORR, ou bien encore, la stabilité dans le temps du fait du détachement du platine de son support carboné et/ou de son agglomération [79]–[81].

### 2.1.3 Dopage de support carboné

Jusqu'à présent, trois stratégies de régulation sont proposées pour transformer le carbone  $sp^2$  en électrocatalyseurs actifs de l'ORR: 1) le dopage chimique, c'est-à-dire l'incorporation d'éléments chimiques dans la matrice de carbone  $sp^2$ ; 2) le transfert physique de charge intermoléculaire, par exemple adsorption physique de chaînes de polyélectrolytes sur des nanocarbones non dopés; 3) l'ajout de défauts dans la structure carbonée. De ces trois voies, c'est le dopage chimique qui est le plus étudié. Il existe deux voies majeures de dopage des matériaux carbonés : 1) par adsorption de gaz, métaux, ou de molécules organiques en surface du matériau carboné et/ou 2) dopage par substitution, ce qui permet l'incorporation d'hétéroatomes, comme par exemple l'insertion d'atomes d'azote. Lorsque l'hétéroatome utilisé est l'azote sur des matériaux carbonés tels que le noir de carbone, le graphène ou les nanotubes de carbones, ces matériaux peuvent incorporer dans leur matrice des atomes d'azote sous plusieurs formes : pyridinique, graphitique ou encore pyrrolique, afin de donner des matériaux carbonés dopé-N (N/C) et cela pour les deux méthodes de dopage. Chacune des formes azotées modifie les propriétés électroniques du matériau sur lequel le dopage est effectué via des changements de densité locale des atomes de carbone liés et par donation/conjugaison d'électron(s) au matériau [82], [83]. Toutefois, même si l'impact du dopage-N sur l'ORR est incontestable, un débat subsiste quant à la répartition des fonctions pyridinique, graphitique et pyrrolique, ainsi que leur quantité et leur rôle dans l'ORR. A cela s'ajoute une suspicion supplémentaire provenant de la contamination des matériaux carbonés aux métaux (*e.g.* Fe, Co, Ni, Mn) et impactant de manière considérable les propriétés catalytiques de l'ORR du matériau [84], [85]. Cette contamination peut provenir du processus de traitement/purification des matériaux carbonés ou bien d'origine naturelle (déjà présent lors de l'extraction).

### 2.1.4 Catalyseur de type Me-N/C

Un autre type de dopage des matériaux carbonés, également très prometteur, combine deux types de dopage via l'insertion de métaux de transition (Me) et ajout de gaz comportant de l'azote ( $N_2$ , ammoniac...) au sein de matrice carbonée (Me-N/C). Ce type de catalyseur montre des performances supérieures aux catalyseurs N/C [86]. Parmi les différents métaux de transition utilisables, le fer se distingue particulièrement. Les catalyseurs de type Fe-N/C sont parmi les catalyseurs de l'ORR les plus prometteurs car ils démontrent des performances similaires et même supérieures (en conditions acides et alcalines) à celle des matériaux de type Pt/C qui étaient jusqu'à présent la référence en termes de stabilité et de performance pour la catalyse de l'ORR [87]–[89]. Les catalyseurs Fe-N/C sont sous le joug d'une recherche très active, de nombreuses études démontrent que les performances de ces catalyseurs dépendent de nombreux paramètres tels que la voie de

synthèse, les précurseurs de fer, d'azote et de carbone utilisés, et également les conditions de traitement thermique. Tous ces paramètres influencent fortement la formation des complexes actifs Fe/N au sein de la matrice carbonée, or comme pour le cas du dopage à l'azote, les sites actifs des matériaux Fe-N/C sont encore aujourd'hui mal définis. Toutefois, Jaouen et al. identifient dans leur étude sur du graphène dopé Fe/N, une forme porphyrine de type  $\text{FeN}_4\text{C}_{12}$  qui favorise un mécanisme à 4 électrons lors de l'ORR [90]. Cette forme met en jeu un complexe pour lequel l'atome de fer est coordonné par 4 atomes d'azote liés à des atomes de carbone qui, contrairement à ce qui était alors pensé, ne sont pas tous dans un cycle à 6 atomes de carbone. Jaouen et al. expliquent qu'en raison de leur structure géométrique, les fractions porphyriniques peuvent se former soit dans des feuilles de graphène fortement désordonnées, soit entre les feuilles de graphène en zigzag définissant un micropore [90]. Les travaux plus récents de Chen *et al.* [91] montrent l'isolation d'un site actif d'un catalyseur Fe-N/C préparé par pyrolyse des précurseurs. Leur étude montre une structure où cette fois-ci les atomes d'azote coordonnant l'atome de fer seraient inclus dans des cycles à 6 atomes de carbone. Leur catalyseur présente une excellente activité ORR offrant une densité de courant maximale de  $37.83 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$  à  $0.85 \text{ V}$  (vs ERH) et en condition très acide, une bonne stabilité sur 3000 cycles (figure 36). Leurs courbes de Koutecky et Levich montrent un mécanisme réactionnel global impliquant 3,9 électrons avec un relargage de peroxyde d'hydrogène mesuré par électrode à disque et anneau tournants de 5% [91].

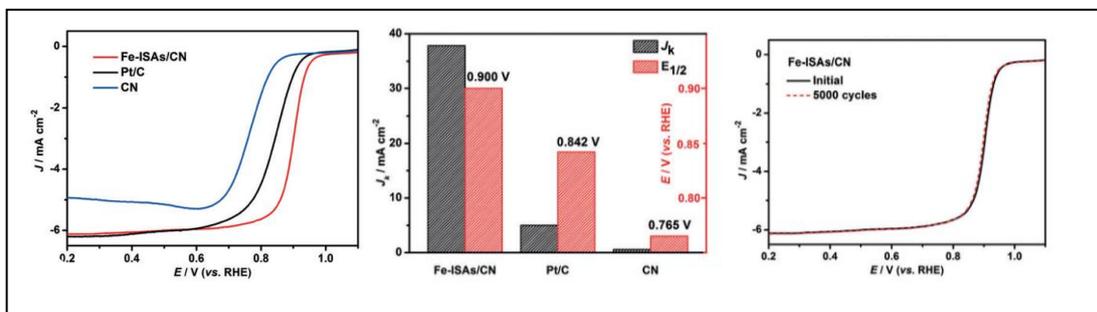


Figure 36: Courbes de polarisation ; histogramme de densité de courant maximale obtenue et stabilité de la densité de courant sur 3000 cycle selon [91]

Bien que leurs systèmes soient performants, leurs mesures sont effectuées avec  $0,1 \text{ M}$  de  $\text{HClO}_4$ , soit un pH de 1, ces conditions d'études sont très éloignées de celles imposées par la physiologie. De plus, dans le cas des travaux de Chen *et al.*, aucune mesure ne vérifie s'il y a un relargage de particules de fer en solution ou si des impuretés restent adsorbées en surface du graphène via les électrons  $\pi$ , ce qui n'est pas nécessaire compte tenu de l'application qu'ils visent, à savoir, les piles à combustible, mais qui l'est dans le domaine de l'implantation, ce qui causerait des inflammations et des réactions de rejets.

De manière plus générale, il est difficile de conclure sur l'identification des sites actifs des catalyseurs Fe/N-rGO impliqués dans l'ORR. De nombreuses caractérisations ont été faites afin de répondre à cette problématique, employant la microscopie à transmission électronique à haute résolution [91]–[94], la diffraction des rayons X [92], [95], [96], la spectroscopie Mössbauer [97]–[99], l'absorption des rayons-X [91], [94], [97]–[101], ou encore la voltammétrie cyclique [102], [103]. Ces caractérisations ont eu pour résultats d'identifier plusieurs formes de fer comme étant actives pour l'ORR, telles que : la coordination d'atomes de fer par des atomes d'azote [102], [104], [105] ; le carbone graphitique recouvert de carbure de fer ; le carbone graphitique recouvert de fer métallique ou d'oxyde de fer [92], [96], [97], [106]–[108] ou bien, les formes décrites par Jaouen *et al.* [90] de  $\text{FeN}_x\text{C}_y$ . Malgré cette incertitude, le catalyseur de forme Fe/N-rGO, reste un catalyseur de choix pour la catalyse de l'ORR. Toutefois, la littérature manque d'information sur son fonctionnement à pH neutre et aucune étude à ce jour n'a été réalisée pour étudier son comportement en conditions physiologiques. Ce travail de thèse c'est donc attaché à étudier les performances électrochimiques, en conditions physiologiques, du catalyseur de type Fe/N-rGO réalisé au sein de l'équipe de L. Dubois (INAC/CEA). Récemment, Dubois *et al.* [109] ont proposé une méthode chimique de synthèse d'un précurseur de la catalyse de l'ORR : l'oxyde de graphène réduit (rGO). Leur synthèse offre un graphène exempt d'impureté métallique qui peut par la suite être dopé au fer et à l'azote pour donner le catalyseur : Fe/N-rGO. La synthèse de leur matériau repose sur l'exfoliation du graphite avec la méthode de Hummer suivie de la réduction du graphène avec  $\text{SnCl}_2$  en présence d'acide chlorhydrique concentré.

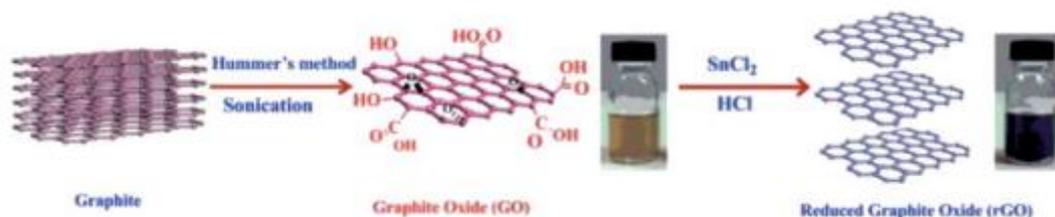


Figure 37: voie de synthèse du graphène exempt d'impureté selon Dubois *et al.* [109]

L'utilisation de l'étain offre comme avantage des degrés d'oxydation de +II et +IV, qui sont des états diamagnétiques de l'étain et qui seraient sans conséquence pour l'ORR si des traces de résidu venaient à rester, les ions chlorures permettent une bonne complexation des ions métalliques ainsi qu'une solubilité dans l'eau, offrant une élimination très efficace des éléments chimiques utilisés lors de la réduction.

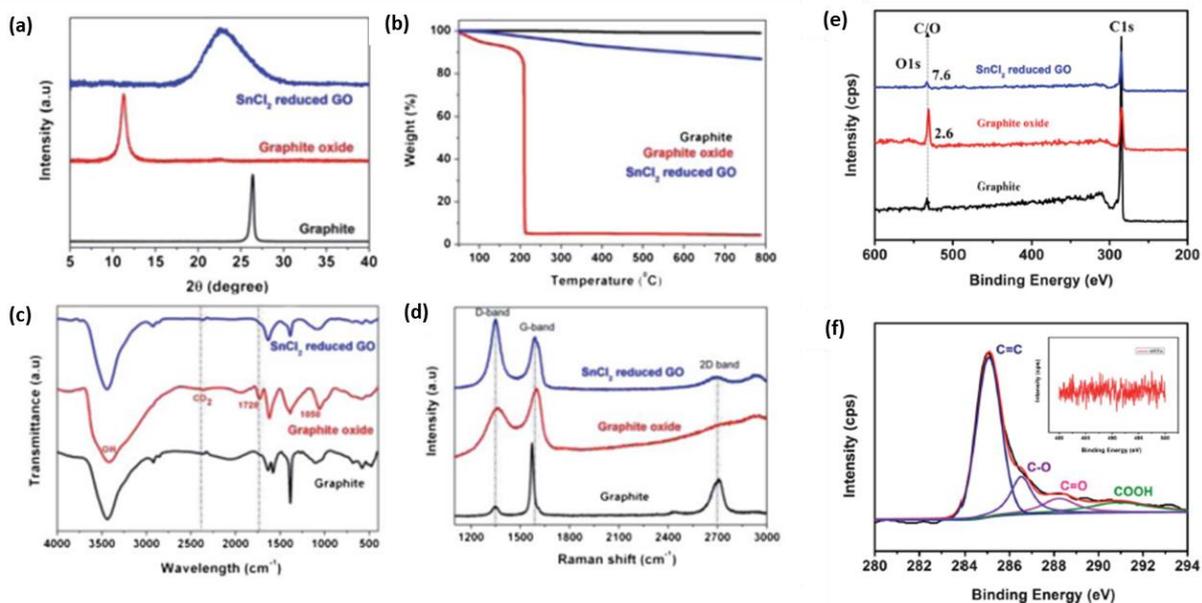


Figure 38: a/ DRX, b/ Courbes ATG, c/ spectre FT-IR, d/ spectre Raman, du graphite d'origine, GO et Sn-rGO ; e/ Spectre XPS f/ Spectre XPS à haute résolution de Sn-rGO; les régions C1s et Sn montrent aucune trace de Sn, d'après [109]

Leur étude montre que la réduction du GO en rGO ne modifie pas la structure et restaure une configuration sous forme hexagonale du graphène, incluant donc des cycles à 6 atomes de carbone. L'étude DRX montre que la réduction du GO retire les fonctions oxygénées majoritairement via l'ouverture de cycle époxy. Cette étude indique que le graphène obtenu est sous forme sp<sup>2</sup>. Comme aucune trace de particule de SnO<sub>2</sub> n'a pu être détectée, il semblerait que les conditions utilisées pour synthétiser Sn - rGO excluent la formation de particules de SnO<sub>2</sub> ou bien elles sont extraites au cours du rinçage. En addition, l'étude IR confirme que la réduction élimine la plupart des fonctions oxygénées et aucune trace de la forme O-Sn-O n'est observée. Par ailleurs, une étude XPS montre que la surface du rGO obtenue présente un système électronique π conjugué et l'absence totale d'impureté métallique.

La voie de synthèse de fabrication proposée par Dubois *et al.* [109] est à ce jour l'une des voies les plus efficace pour obtenir un graphène exempt d'impureté métallique et donc susceptible de jouer le rôle de catalyseur de l'ORR pour une cathode abiotique. Toutefois de nombreux tests doivent être effectués afin de vérifier les performances que peut offrir ce catalyseur en condition physiologique et donc à pH neutre, mais également l'impact qu'il peut avoir sur le vivant.

## 2.2 Les liants

Les propriétés mécaniques et électrochimiques d'une électrode dépendent directement de ses composés, ces derniers impacteront la résistance aux contraintes mécaniques, la diffusion des espèces chimiques dans l'électrode... Le catalyseur sélectionné est sous forme de nanoparticules de graphène dopé à l'azote et au fer, il est donc nécessaire de l'agglomérer afin de construire une électrode macroscopique et ainsi éviter tout relargage. Cette mise en forme apportera des avantages tels qu'une percolation électronique efficace ou encore une robustesse face aux contraintes mécaniques. Par conséquent il faudra maîtriser la porosité du composite liant/catalyseur car une des limites du système est régi par la quantité d'oxygène disponible, plus l'oxygène est en grande quantité plus les sites catalytiques sont sollicités ce qui permettra d'atteindre une cinétique maximale d'ORR, et donc des performances maximales. A ces problématiques s'ajoute : la mise en solution. En effet, bien que le graphène aggloméré possède une résistance élevée aux contraintes mécaniques, une fois mis en solution un phénomène de diffusion des molécules d'eau et des espèces chimiques présentes, vont venir perturber cet agglomérat via une insertion des molécules entre les différents feuillets et particules de graphène, engendrant un gonflement de l'électrode, une perte des propriétés et tenues mécaniques du système et dans notre cas, la destruction de l'électrode.

Afin d'apporter une réponse à ces trois problématiques majeures, et afin de garder les propriétés avantageuses du graphène, une solution de liant polymère organique peut être ajoutée. Par définition, un polymère organique est une longue chaîne de même molécule organique se répétant afin de donner une macromolécule. Le panel des propriétés des polymères est tellement disparate qu'il peut s'appliquer dans n'importe quel domaine, allant de la peinture au textile en passant par l'agroalimentaire et la plasturgie. Dans ce travail des polymères liants seront utilisés. Ces liants auront pour rôle principal la tenue mécanique de l'électrode. La présence du liant aura pour effet de stabiliser les particules de graphène lors de l'effet de gonflement dû à l'immersion de l'électrode en solution. De surcroît, cet ajout a pour effet d'espacer les particules de catalyseur, avec pour conséquence une meilleure diffusion de l'oxygène et donc une optimisation de l'utilisation des sites catalytiques. Toutefois, l'utilisation d'un liant polymère organique doit être effectuée avec parcimonie car un excès de polymère aura des effets allant à l'opposé des effets escomptés comme une diminution de la conductivité électronique et/ou ionique (selon le type de polymère) pouvant même aller jusqu'à désinhiber le catalyseur.

Afin d'effectuer un choix sur les différents polymères pouvant être utilisés, un cahier des charges a été mis en place. L'application visée étant l'implantation, les liants devront être biocompatibles, ce critère est primordial car dans le cas dramatique où le patient subirait un accident susceptible d'endommager la cathode, le patient ne devrait en aucun cas subir les effets secondaires

liés à la présence de corps non biocompatibles. De surcroît, le liant polymère organique devra être chimiquement stable, il ne devra en aucun cas perturber le processus de réduction de l'oxygène ce qui pourrait créer des réactions parasites et ainsi favoriser la production de molécules indésirables (peroxyde d'hydrogène, ion hydroxyde...), cette propriété comprend aussi le fait que le liant ne devra pas avoir d'affinité particulière pour les sites catalytiques.

En se basant sur des travaux réalisés antérieurement par l'équipe SyNaBi, deux polymères ont été sélectionnés afin de jouer le rôle de liant dans les cathodes : le chitosan et le polyvinyle alcool (PVA). Lors des précédents travaux effectués au laboratoire, ces liants ont démontré, une fois combinés à du graphène ou des nanotubes de carbone, une bonne tenue mécanique ainsi qu'une bonne résistance au gonflement une fois l'électrode mise en solution.

D'autres liants polymères bien connus de la littérature ont également été sélectionnés : le polyacide acrylique et le Nafion®. Toutefois, après des tests préliminaires, il s'est avéré que la tenue mécanique de ces deux liants était faible, une fois l'électrode produite, celle-ci se désagrégait lors de son immersion en solution aqueuse. Ainsi, ce chapitre se consacrera à l'étude des liants chitosan et polyvinyle alcool ainsi qu'à trois procédés de mise en œuvre des électrodes.

### 2.2.1 Le chitosan (Chi)

Le chitosan est un polymère appartenant à la catégorie des polysaccharides, il est obtenu via la désacétylation chimique ou enzymatique de la chitine (ou chitin en anglais). La chitine ou poly-( $\beta$ -(1-4)-N-acétyl-D-glucosamine) est le deuxième polymère le plus abondant sur terre derrière la cellulose dont les deux structures chimiques sont proches (figure 39).

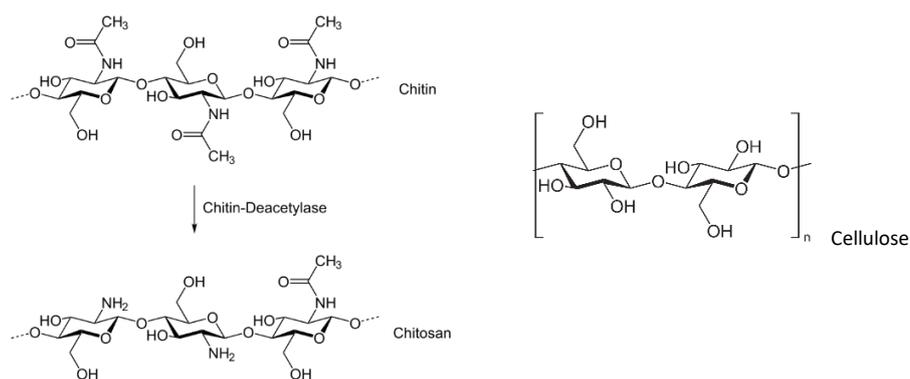


Figure 39: Structures de la chitine, du chitosan et de la cellulose

La chitine peut être extraite de la coquille des mollusques comme celle des huîtres ou bien des calamars, elle est également présente dans l'exosquelette des crevettes, des crabes, des homards, ou bien encore chez certains insectes et champignons [110]–[112]. Son extraction est aisée et peu onéreuse, elle peut être effectuée via extraction chimique ou bien par extraction biologique [113]. Ce dernier est plus récent et plus en vogue car basé sur le concept de « chimie verte ». Une fois la chitine

extraite, une étape de désacétylation peut être effectuée ce qui permet d'obtenir la chitine sous forme désacétylée [113]–[115]. Cependant la réaction de désacétylation n'étant pas totale, le produit formé est un mélange des deux formes : acétylée et désacétylée. Lorsque le ratio de ces deux formes atteint un DA (degré d'acétylation) moyen inférieur à 50% (fraction molaire), le produit est appelé chitosan et devient en partie soluble en solution aqueuse et acide grâce aux fonctions amines primaires susceptibles d'accepter un proton [116]. Cette étape de désacétylation doit être effectuée avec précaution car selon les conditions de température, de durée, mais aussi et surtout selon la voie de synthèse choisie (chimique ou enzymatique), le DA sera fortement impacté ainsi que la répartition des fonctions amines le long de la chaîne, impactant également la solubilité finale du chitosan. La masse molaire moyenne du chitosan peut elle aussi être affectée lors de la désacétylation de la chitine en voie chimique qui utilise des acides forts et peuvent impacter les liaisons glycosidiques, menant à la rupture de la chaîne. De ce fait, la voie basique est généralement privilégiée [117]. Une fois en solution, le chitosan peut donner lieu à différentes formes : coulé pour un film, filé pour des fibres, lyophilisé pour un matériau poreux. Le traitement du chitosan est plus aisé que celui de la chitine, en revanche, la stabilité des matériaux est moindre en raison de son caractère hydrophile supérieur et en particulier de sa sensibilité au pH. Pour une meilleure stabilité, le chitosan peut être réticulé en utilisant des réactifs tels que le diisocyanate, l'épichlorhydrine, le glutaraldéhyde ou la genépin [118]–[121]. De nombreux hydrogels de chitosan peuvent être obtenus par traitement avec des anions multivalents tels que l'acide oxalique, l'acide citrique ou le tripolyphosphate. Des mélanges et des composites sont parfois produits en tirant parti des propriétés polycationiques du chitosan dans des conditions acides. En effet, une fois mis en solution acide le chitosan est alors sous forme de polyélectrolytes chargés positivement permettant une attraction avec des matériaux chargés négativement. De surcroît, ces interactions électrostatiques peuvent aussi conduire à la formation de complexe, tel que des hydrogels, en présence de macromolécules de charge opposée. Les propriétés de ces complexes sont régies selon bien des facteurs tels que la longueur moyenne de chaîne du chitosan, la concentration du chitosan, la température, le pH, la concentration ionique [122]. Ces interactions électrostatiques permettent également la formation de film de polyélectrolytes via la méthode de couche par couche, où l'on alterne un polymère chargé positivement avec un polymère de charge opposée [123]. El Ichi *et al.* [124], [125] ont proposé d'utiliser le chitosan comme un liant dans des biocathodes enzymatiques à base de nanotubes de carbone et ont ainsi démontré que la présence de chitosan permet une tenue mécanique des biocathodes qui permet de garder une activité catalytique après six mois d'implantation dans des rats.

### 2.2.2 Le Polyvinyle alcool (PVA)

Le poly(alcool vinylique), ou PVA, est un polymère synthétique obtenu par hydrolyse du polyacétate de vinyle (PVAc) (figure 40) :

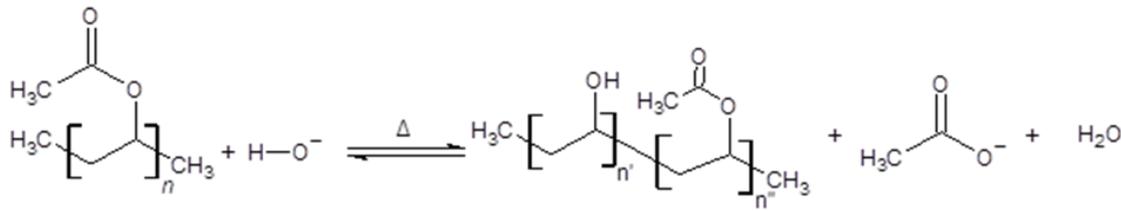


Figure 40: Réaction d'hydrolyse du polyacétate de vinyle donnant du polyvinyle alcool partiellement dés-acétylé

Comme cette réaction est régie par un équilibre, le PVA est obtenu sous la forme de copolymère de PVA et PVAc. Le nombre de fonctions acétate restantes définit le degré de désacétylation du PVA et impacte ses propriétés physico-chimiques, au même titre que la longueur de chaîne, l'indice de polydispersité (IP) ou encore la tacticité de la chaîne polymérique (e.g. solubilité, cristallinité, force mécanique, module de Young, adhésion, diffusivité). Plus spécifiquement, la tacticité des chaînes moléculaires influence l'habilité du PVA à former des structures supramoléculaires, lorsque les fonctions hydroxy sont réparties de manière alternative le long de la chaîne carbonée, ou syndiotactique, la gêne stérique occasionnée est minimalisée entre les chaînes et favorise la formation d'interactions intermoléculaires avec les chaînes adjacentes menant à la formation de zones cristallines. A l'inverse, une chaîne carbonée pour laquelle les fonctions hydroxy sont réparties du même côté, ou isotactique, favorisera des interactions intramoléculaires. Un PVA syndiotactique possédant une grande longueur de chaîne et un indice de polydispersité proche de 1 pourra être mis sous forme de gel élastique avec un haut taux de cristallinité (point de fusion défini), en opposition, un PVA atactique avec les mêmes longueurs de chaîne et indice de polydispersité ne pourra posséder de point de fusion et n'offrira pas de propriété élastique.

Le PVA est très utilisé dans le domaine pharmaceutique et en industrie biomédicale, il est utilisé pour l'ingénierie de tissus organiques tels que le cartilage ou le ménisque du genou [126]–[132], la fabrication de lentille de contact et de cornée artificielle [133]–[136] ou bien encore en tant que transporteur de substances actives [137]–[139].

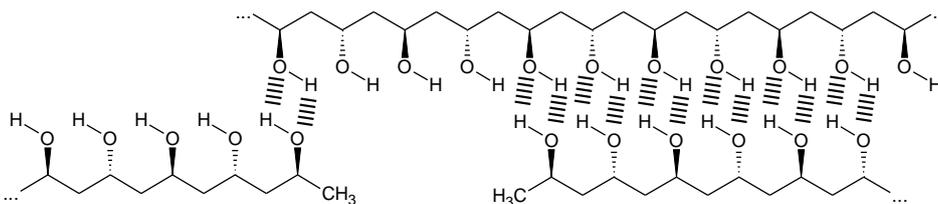


Figure 41: Interactions intermoléculaires par liaison hydrogène entre différentes chaînes de PVA

Lorsque le PVA est dissout en solution aqueuse, en quantité suffisante, et avec des longueurs de chaîne suffisamment élevées, il est possible d'augmenter le nombre de zones cristallines via des cycles de congélation et décongélation. Lors de la congélation, la formation de cristaux de glace repousse les chaînes de polymères les unes sur les autres, favorisant les interactions hydrogène et l'apparition de zone cristalline. Ces zones cristallines s'apparentent à des points de réticulation. Il subsiste cependant de très nombreuses zones amorphes capables de piéger de grandes quantités de la solution sous forme de glace. La création et la maîtrise de ces phases amorphes et cristallines apporte des propriétés très intéressantes, les phases amorphes permettent au matériau de se déformer lorsqu'il subit un stress mécanique, et les phases cristallines permettent au matériau de restituer sa forme initiale lorsque la contrainte mécanique cesse, le matériau est appelé hydrogel de PVA.

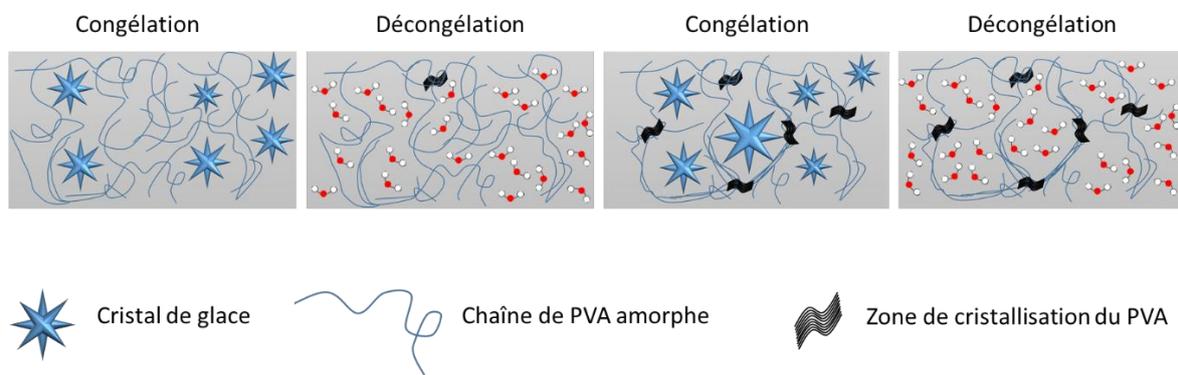


Figure 42: Mécanismes de formation de l'hydrogel de PVA

Toutefois, ces liaisons intermoléculaires de types liaisons hydrogène peuvent être rompues, ce qui conduit inexorablement à la perte des propriétés mécaniques. Ainsi les chaînes de polymères finissent inévitablement par partir en solution. Notons toutefois que cette dégradation peut être parfois un avantage comme c'est le cas dans le milieu pharmaceutique, le PVA est utilisé en tant que membrane d'encapsulation, contenant une molécule active qui est relarguée à un instant et un endroit précis grâce à la dissolution du PVA.

En plus de ces propriétés, de nombreuses études tendent à démontrer la biocompatibilité du PVA. Ces premières études remontent à 1959 avec les travaux de Hueper *et al.* [140], depuis, d'autres études ont été effectuées comme le montre la revue publiée par DeMerlis *et al.* [141] qui regroupent des résultats prometteurs sur du PVA absorbé par des rongeurs par voie orale. Cette revue conclut que le PVA absorbé par voie orale semble être relativement inoffensif avec une  $DL_{50}$  de 15-20 g/kg, qu'il y a peu d'absorption gastro-intestinale, pas d'accumulation dans le corps après absorption et aussi que le PVA n'est ni mutagène ni clastogène. D'autres tests précliniques et cliniques rapportent également que le PVA serait non toxique et biocompatible, pouvant ainsi être utilisé à des fins médicales [126], [142], [143]. Les travaux de Penven *et al.* [144] montrent une étude de la biocompatibilité de l'hydrogel

de PVA. Les auteurs ont développé et implanté des membranes d'hydrogel de PVA dans l'organisme de rats et ont conclu sur une bonne intégration du matériau qui n'engendrait aucune réaction toxique ainsi qu'une très faible adhésion cellulaire.

Parmi les différents catalyseurs possibles seul le graphène dopé au fer et à l'azote a été sélectionné pour ce travail. Ce catalyseur permet d'effectuer une ORR à moindre coût puisque basé sur un matériau carboné : le graphène. De plus, ce catalyseur pourra être exempt de toute impureté métallique grâce à la synthèse de Dubois *et al.*, empêchant un relargage de particules métalliques dans l'organisme et garantissant une ORR catalysée uniquement par la combinaison des atomes de fer et d'azote incorporés. De plus, l'utilisation du graphène garantit une percolation électronique et une surface spécifique intéressantes. Dans ce chapitre, les performances de ce catalyseur en condition physiologique seront étudiées. De plus, ses performances seront évaluées une fois sous forme d'électrode afin de déterminer si elles sont suffisantes pour alimenter un DMIa tel qu'un pacemaker. Pour ce faire, des électrodes à l'aide de liants polymères : le chitosan et le polyvinyle alcool seront développées. Ces deux liants sont connus dans la littérature pour leurs nombreuses propriétés et applications notamment en biomédical et agroalimentaire [126], [127], [136]–[139], [145]–[147], [128]–[135].

Ce chapitre tentera de déterminer parmi ces deux liants lequel permet une fabrication d'électrode la plus performante tout en apportant une tenue mécanique optimale et stable dans le temps.

### 3 Catalyseur Abiotique

#### 3.1 Synthèse

Classiquement, le catalyseur Fe/N-rGO est obtenu via la méthode de Hummer. Toutefois Dubois *et al.* ont mis au point un autre procédé permettant d'obtenir ce catalyseur exempt de toutes impuretés et dont la synthèse est peu onéreuse : la première étape de synthèse consiste à exfolier le graphène commercial avec une solution d'acide sulfurique à 200°C durant 7 heures. Après lavage une porosité est créée en oxydant de manière maîtrisée le graphène, ceci à l'aide d'une solution piranha. Après dispersion dans une solution de FeCl<sub>3</sub>, le matériau est lyophilisé puis traité sous atmosphère NH<sub>3</sub> à 750°C. Deux derniers rinçages sont effectués avec une solution d'acide sulfurique, puis avec de l'eau désionisée (ED). Enfin, le catalyseur est filtré et séché.

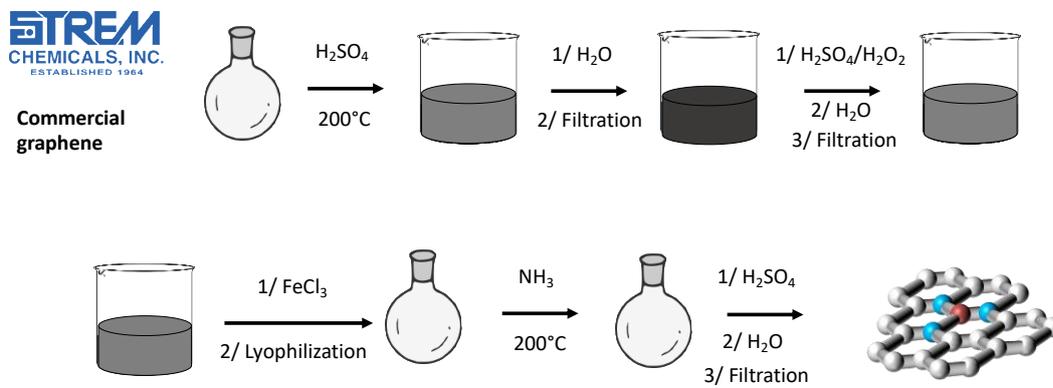


Figure 43: Schéma de synthèse du catalyseur Fe/NrGO

Après séchage le catalyseur peut alors être employé et observé au MEB (figure 43).

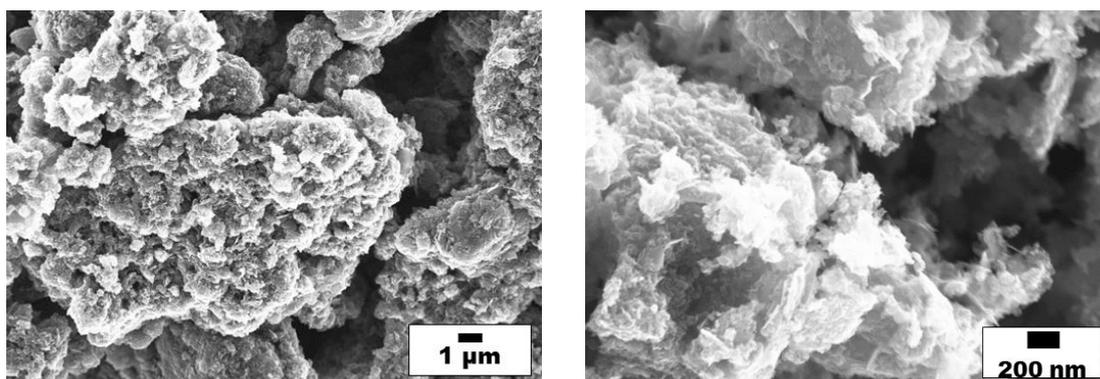


Figure 44: Mesure en microscopie électronique à balayage du catalyseur Fe/N-rGO

### 3.2 Caractérisations

#### 3.2.1 Spectroscopie des rayons X

Après obtention du catalyseur, une première caractérisation structurale a été effectuée par spectroscopie des rayons X (figure 45).

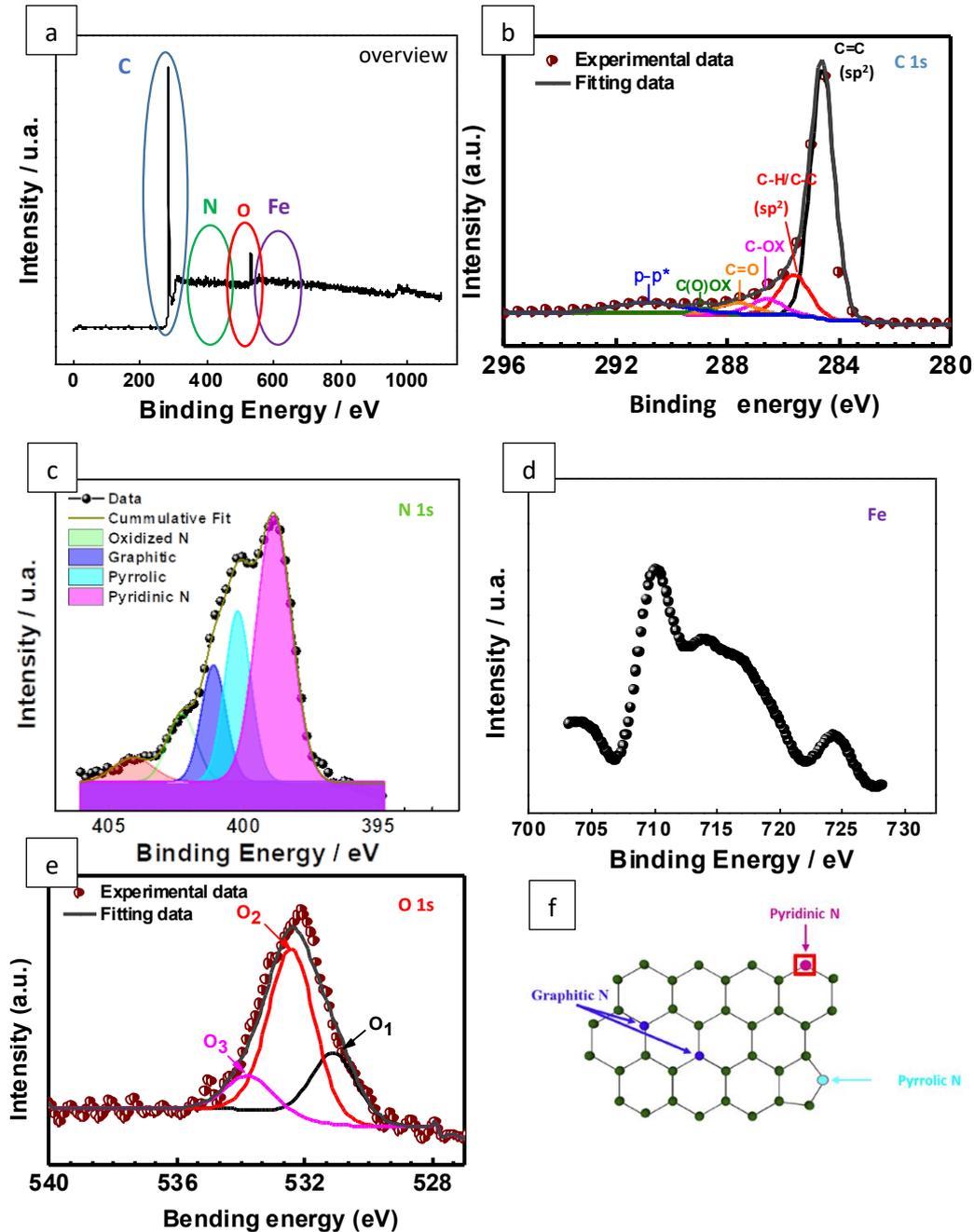


Figure 45: a/ Spectre d'ensemble d'une mesure XPS faite sur le matériau Fe/N-rGO avec vue en détail de la répartition des configurations des atomes de : b/ carbones ; c/ azotes ; d/fer e/ oxygènes ; et leur f/ les formes impliquant les atomes d'azotes et carbones

La figure 45a montre un spectre du matériau Fe/N-rGO avec quatre régions d'intérêts encerclées qui correspondent aux liaisons impliquant des atomes de : carbone (bleu), d'azote (vert), d'oxygène (rouge) et d'oxygène (vert). La figure 45b montre en détail la répartition des liaisons concernant les

atomes de carbone. Le pic situé vers 285 eV montre une configuration du matériau majoritairement composé de doubles liaisons carbone-carbone hybridés  $sp^2$ . Également, la figure 45b montre également des liaisons simples carbone-carbone et carbone-hydrogène, moins nombreuses. Enfin, la figure 45b montre des liaisons impliquant des atomes de carbone et d'oxygène, qui sont simples, doubles ou impliquent deux atomes d'oxygène. Cette dernière observation nous permet de déduire la présence de fonctions hydroxy, acide carboxylique et éventuellement de cétone, fonctions engendrées par l'utilisation de la solution piranha et de l'acide sulfurique lors de la synthèse du catalyseur. La figure 45c montre la répartition des liaisons concernant les atomes d'azote. Sur cette figure est observé différentes formes d'azote : pyridinique (formes majoritaires), pyrrolique, graphitique et oxydé (formes minoritaires). Cette répartition des différentes formes d'azotes est un résultat très encourageant, en effet, selon Jaouen et al. [90], les formes pyridiniques et pyrroliques sont à privilégier afin de favoriser la catalyse de l'ORR via un processus à quatre électrons.

D'autre part, la figure 45d montre la présence de fer sous la forme II. Cette information cruciale indique que le fer est bien présent au sein de notre matériau et lié par lien covalent. Également, la figure 45e montre la présence d'atomes d'oxygène sous différentes formes (double et simple liaison) ce qui est en accord avec les observations faites sur la figure 45b.

### 3.2.2 Electrochimie en électrode tournante

#### 3.2.2.1 Impacte de la concentration d'oxygène

Dans un premier temps, une étude avec une électrode tournante a été effectuée afin d'observer l'activité catalytique d'une part, et d'autre part le potentiel auquel commence l'ORR. La figure 46 montre des cyclovoltammogrammes effectués sous azote, sous air et sous oxygène en solution tampon de phosphate salin (pH 7,4). La première mesure effectuée sous azote permet d'obtenir un cyclovoltammogramme correspondant principalement au courant capacitif dont les valeurs sont relativement faibles. La saturation de la solution en oxygène induit l'apparition d'une vague de réduction à partir de 200 mV vs ECS, à température ambiante, avec un courant limite maximal proche de 600  $\mu\text{A}$  (ou 3045  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) à  $E = -1\text{ V}$  vs ECS et 550  $\mu\text{A}$  (ou 2792  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) à  $E = -0,5\text{ V}$  vs ECS. La figure 46 montre que sous-air la vague de réduction est toujours présente, mais avec des densités de courants maximales inférieures (environ 200  $\mu\text{A}$ ) du fait d'une concentration presque cinq fois inférieure à celle saturée en oxygène. Ces résultats montrent que le catalyseur Fe/N-rGO est capable de catalyser la réduction de l'oxygène à pH physiologique. Bien que ces performances soient inférieures à celles qu'offrent les catalyseurs obtenus en condition acide, décrites dans la littérature, ils restent néanmoins en termes des densités de courant catalytiques au même niveau que les performances des catalyseurs enzymatiques.

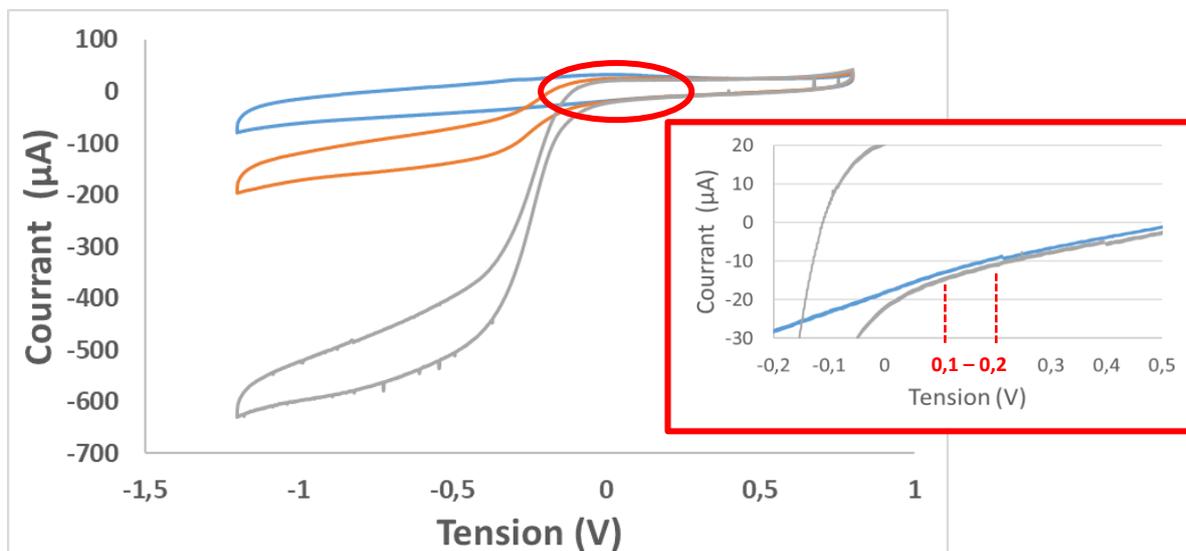


Figure 46: Voltammétrie cyclique en RDE du catalyseur Fe/N-rGO, Bleu sous azote, Orange sous air, Gris saturé en oxygène, dépôt de 300  $\mu\text{G}/\text{cm}^{-2}$  sur électrode tournante en carbone vitreux, 10 mV/s, 1000 rpm,  $T=25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

### 3.2.2.2 Impact de la température

La température physiologique chez l'homme et les mammifères est différente de la température ambiante, et du fait de l'application finale visée, qui est l'implantation chez l'homme, il est nécessaire d'étudier l'impact de la température sur les performances du catalyseur. En effet, les lois thermodynamiques et cinétiques informent que la variation de la température impacte de manière conséquente et non-négligeable les conditions et le fonctionnement des réactions catalytiques. La figure 47 montre trois voltammogrammes effectués à  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  en condition physiologique et sous air à trois températures différentes,  $25^\circ\text{C}$  (courbe bleue)  $30^\circ\text{C}$  (courbe verte) et  $37,7^\circ\text{C}$  (courbe jaune), et pour chacun de ces voltammogrammes le courant capacitif a été soustrait afin d'obtenir uniquement le courant faradique. Il est alors possible de déduire de cette expérience que la variation de la température impacte la densité de courant et qu'il y a compétition entre les phénomènes cinétiques et les phénomènes thermodynamiques. La variation de la température affecte la concentration d'oxygène dissout, celle-ci diminue lorsque la température augmente. Ainsi, lorsque la température augmente on observe une diminution des valeurs du courant faradique. D'autre part, lorsque la température augmente, les cinétiques de réactions et les coefficients de diffusion des espèces sont plus élevées. Ainsi, ces résultats montrent une courbe  $I_{\text{mesuré}}=f(T^\circ)$  qui passe par un maximum pour  $T = 37,7^\circ\text{C}$ .

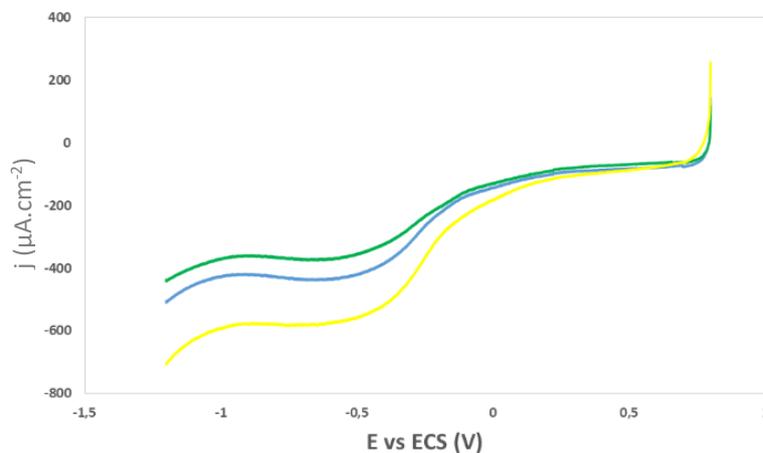


Figure 47: Voltammétrie en RDE, Bleu à  $25^\circ\text{C}$ , Vert  $30^\circ\text{C}$ , Jaune  $37,7^\circ\text{C}$ ,  $m = 300 \mu\text{G}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,  $10 \text{ mV/s}$ ,  $1000 \text{ rpm}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

### 3.2.2.3 Impact de la concentration en glucose

L'impact du glucose sur le catalyseur a été étudié en RDE. La figure 48 montre trois cyclovoltammogrammes enregistrés à 10 mV/s sous azote, à une vitesse de rotation de 100 rpm et à 37,7°C. Pour chaque cyclovoltammogramme un pic d'oxydation est observé vers 200 mV vs ECS, ceci même en absence du glucose. On note que lorsque la concentration en glucose augmente, le pic d'oxydation augmente, on note cependant que cette augmentation reste faible en comparaison de la variation induite par la concentration d'oxygène sur la densité de courant.

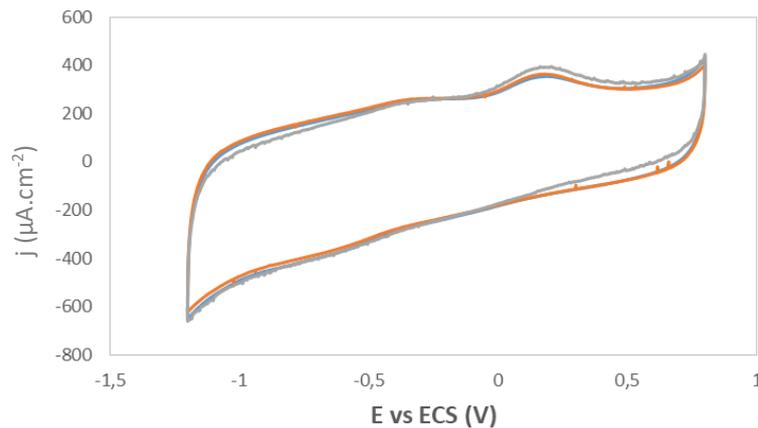


Figure 48: Voltammétrie cyclique en RDE, Bleu sans glucose, Orange avec 5 mM de Glucose, Gris avec 100 mM de Glucose,  $m = 300 \mu\text{G}.\text{cm}^{-2}$ , 10 mV/s, 100 rpm,  $T = 37,7^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

L'impact de la quantité de glucose a été étudié en faisant varier la vitesse de rotation afin d'observer un courant limite comme le suggère la loi de Koutecky-Levitch. La figure 49 montre deux cyclovoltammogrammes effectués enregistrés à 10 mV/s sous azote, en présence de 100 mM de glucose et à une vitesse de rotation de 100 et 1000 rpm.

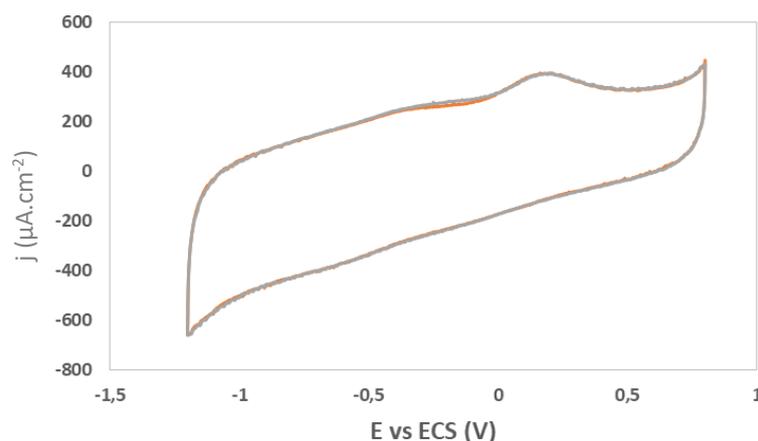


Figure 49: Voltammétrie cyclique en RDE, Orange à 100 rpm, Gris à 1000 rpm, en présence de 100 mM de glucose,  $m = 300 \mu\text{G}.\text{cm}^{-2}$ , 10 mV/s,  $T = 37,7^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

L'observation de la figure 49 montre que la variation de la vitesse de rotation de l'électrode n'induit pas de courant limite ou de palier sur la gamme de potentiel appliqué et montre deux cyclovoltammogrammes similaires, permettant de conclure que dans ces conditions, l'oxydation du glucose n'est pas catalysée par Fe/N-rGO.

## 4 Fabrication d'une biocathode abiotique

### 4.1 Biocathode compressée

#### 4.1.1 Fabrication

Afin de développer une électrode par compression, une quantité précise de catalyseur est pesée et une solution de liant polymère organique développée en amont est ajoutée. La formulation du liant dépend du type de polymère mis en jeu (PVA, chitosan, PAA, nafion...). Le catalyseur est ensuite homogénéisé à la solution de liant, puis, le mélange est ensuite transvasé dans un moule entre deux cales puis compressé via une presse hydraulique, on obtient alors une électrode en forme de cylindre (épaisseur de 0,3 cm-diamètre 0,5 cm).

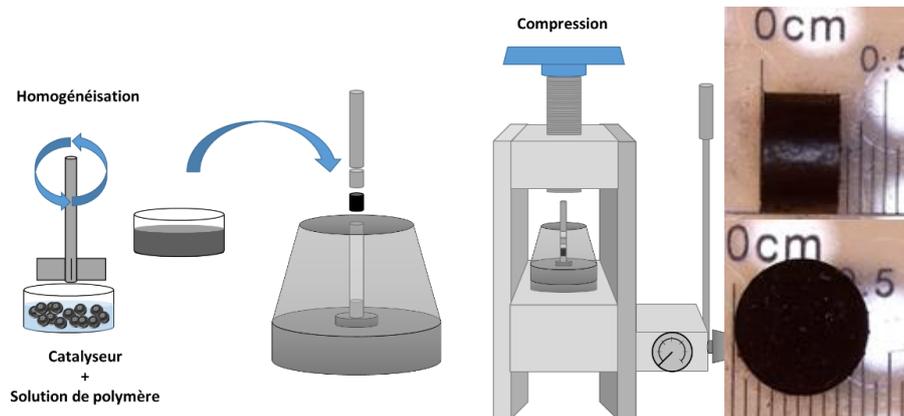


Figure 50: Schéma de fabrication des électrodes compressées et exemples d'électrodes

Le ratio liant/catalyseur a fait l'objet d'une étude afin de déduire les quantités optimales des composants pour fabriquer les électrodes. Cette étude a permis de trouver les quantités minimales ( $m_{\text{liant}} / m_{\text{catalyseur}} = 1$ ) nécessaires au maintien structural des électrodes, mais les caractérisations électrochimiques ont montré des résultats trop dispersifs afin de déduire les quantités optimales. Seuls les résultats des caractérisations électrochimiques effectuées sur des électrodes comportant une quantité de liant importante ( $m_{\text{liant}} / m_{\text{catalyseur}} > 2$ ) permettent de conclure sur une diminution des performances électrochimiques, du fait de l'ajout d'un matériau électroniquement isolant. Afin de fabriquer les électrodes, un ratio de 1 a été choisi afin de minimiser l'ajout de matériaux isolant tout en gardant une tenue mécanique.

Après avoir compressé le mélange polymère/catalyseur, la biocathode obtenue doit être séchée afin d'ajouter sur l'une de ses surfaces une connexion électrique avec un fil de cuivre collé à l'aide de pâte

de carbone. Une fois la pâte de carbone sèche (12 h), le contact est ensuite protégé et isolé à l'aide d'une solution de silicone (figure 51). Une fois le silicone durci, il est alors possible d'étudier les performances électrochimiques de la biocathode obtenue. Ainsi, plusieurs séries de biocathodes ont été confectionnées selon les types de liants choisis en amont (épaisseur = 0,3 cm ; diamètre = 0,5 cm).

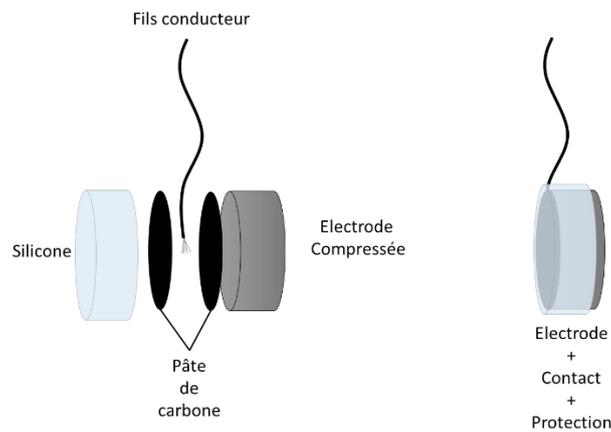


Figure 51 : Schéma d'isolation du fils conducteur

#### 4.1.2 Caractérisation électrochimique

##### 4.1.2.1 Biocathode compressée avec Chitosan

Les biocathodes compressées mettant en jeu le liant chitosan ont été développées et étudiées en électrochimie (voltamétrie cyclique, chronopotentiométrie et chronoampérométrie) afin de déterminer leurs comportements et performances en conditions physiologiques (Phosphate Buffer Saline Solution ou PBS).

Après fabrication des électrodes, un contrôle du fonctionnement est vérifié par chronoampérométrie. La figure 52 montre un chronoampérogramme effectué à 100 mV vs en condition physiologique. On observe qu'après augmentation de la concentration en oxygène, via bullage ( $t = 3,29$  h), la densité de courant en valeur absolue augmente de  $95 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  à  $1216 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ , démontrant la catalyse de l'ORR par l'électrode.

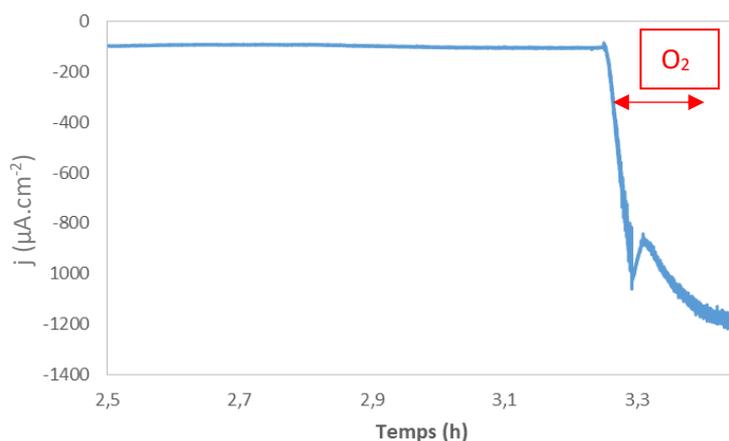


Figure 52: Chronoampérométrie d'une électrode comportant le liant chitosan,  $m = 30 \text{ mg}$ ,  $e = 0,3 \text{ cm}$ ,  $d = 0,5 \text{ cm}$ ,  $t = 3,29 \text{ h}$  bullage d'oxygène,  $E = 100 \text{ mV vs ECS}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, contre électrode de platine

La figure 53a représente un cyclovoltammogramme enregistré à  $1 \text{ mV/s}$  d'une électrode comportant le liant chitosan. La réponse électrochimique est dominée par l'important courant capacitif lié à la très grande surface développée de l'électrode. Il est difficile d'obtenir uniquement la signature de ce courant capacitif car même sous azote de l'oxygène reste piégé dans la structure poreuse de l'électrode, ceci même après de nombreux cycles. Aussi, il a été impossible, comme dans le cas des premières expériences en RDE, de soustraire la composante capacitive au courant total sous air pour isoler la composante faradique de l'intensité. Il est néanmoins possible d'observer une variation de courant enregistrée vers  $0 \text{ V (vs ECS)}$ , correspondant à la réponse électrochimique de l'oxygène étudiée en RDE.

L'intensité de ce signal faradique de réduction de l'oxygène peut être estimée à  $175 \mu\text{A.cm}^{-2}$  (figure 53c). Les courbes de chronoampérométrie et de chronopotentiométrie sont également fortement dépendantes de ce courant capacitif important, il est nécessaire d'attendre des temps long ( $\geq 10\text{h}$ ) afin que la mesure soit représentative de la réaction de réduction de l'oxygène. D'autre part, le potentiel a été enregistré après avoir appliqué une contrainte ( $I = -1 \text{ mA}$ ) pendant 26 heures, l'électrode recouvre son potentiel initial après 40 heures durant lesquelles la contrainte est faible ( $I = -1 \mu\text{A}$ ) (figure 53b).

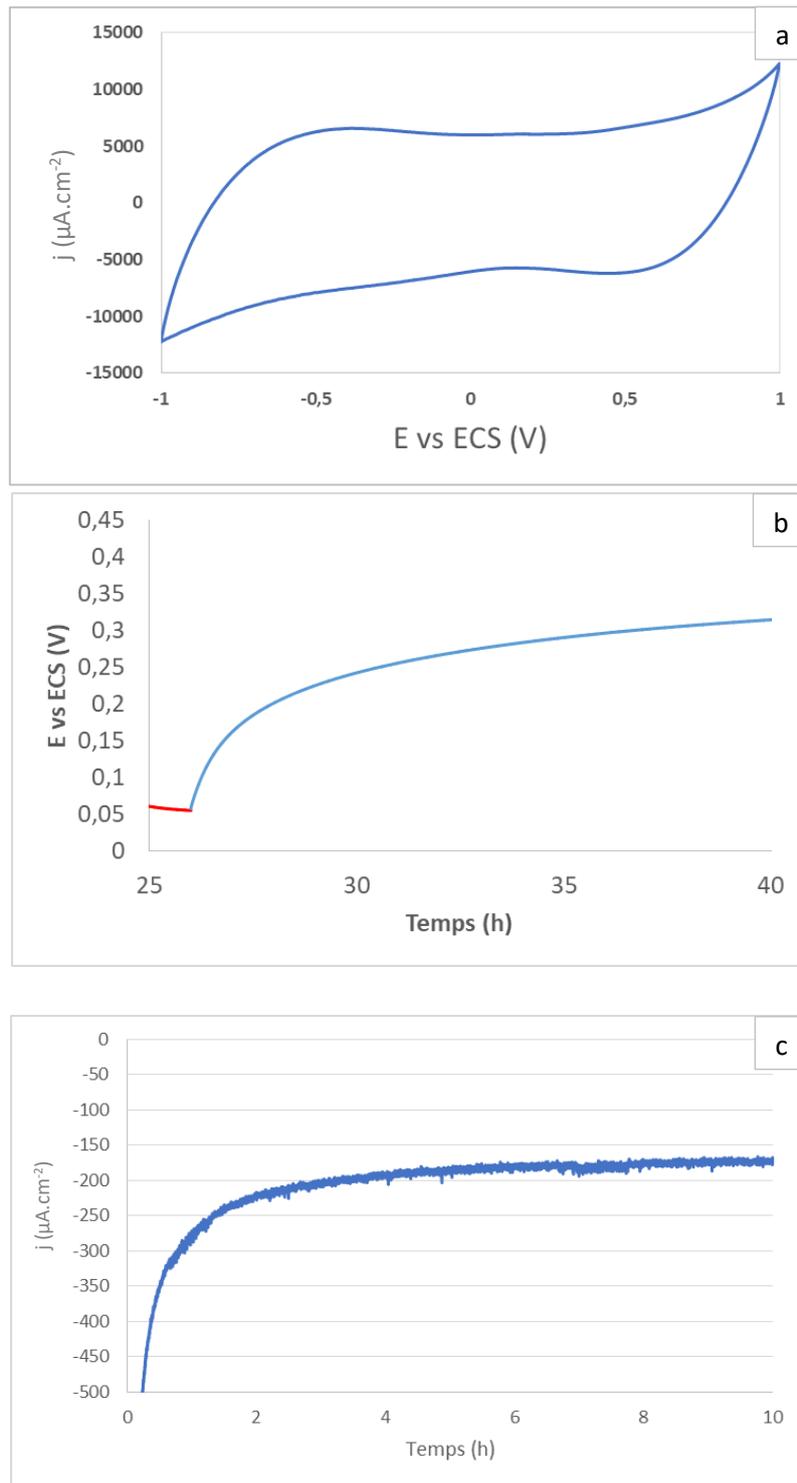


Figure 53:a/ Voltammétrie cyclique, 0,1 mV/s; b/ Chronopotentiométrie  $I = -1\mu\text{A}$  après 26h de contrainte à  $I = -1\text{ mA}$ ; c/ Chronoampérométrie  $E = 100\text{ mV}$  vs ECS d'une électrode comportant le liant chitosan,  $m = 30\text{ mg}$ ,  $e = 0,3\text{ cm}$ ,  $d = 0,5\text{ cm}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

#### 4.1.2.2 Biocathode compressée avec Chitosan-Génépine

Une biocathode comportant le liant chitosan réticulé à l'aide d'une solution de génépine a également été développée [124] et des caractérisations par voie électrochimique ont été faites dans les mêmes conditions que pour les électrodes composées du liant chitosan.

La figure 54 montre un chronoampérogramme obtenu à 200 mV en condition physiologique d'une électrode massive composée du liant chitosan réticulé à l'aide de génépine. On observe une diminution de la densité de courant cathodique lors de l'ajout d'azote ( $t = 73,5$  h), puis, une forte augmentation de la densité de courant lors de l'ajout de l'oxygène ( $t = 74,9$  h) qui atteint  $45 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Ce phénomène démontre la catalyse de l'ORR de l'électrode fabriquée. On peut également noter qu'après plus d'une heure en présence d'azote, le courant n'atteint pas une valeur nulle, soulignant la quantité d'oxygène emprisonnée dans l'électrode.

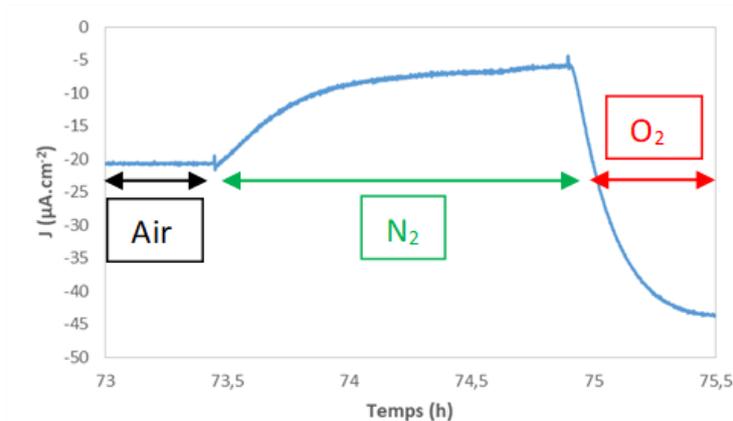


Figure 54: Chronoampérogramme d'une électrode comportant le liant chitosan réticulé avec génépine,  $m = 30$  mg,  $e = 0,3$  cm,  $d = 0,5$  cm,  $t = 73,5$  h bullage d'azote,  $t = 74,9$  h bullage d'oxygène,  $E = 200$  mV vs ECS,  $T = 25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

La figure 55a représente un cyclovoltammogramme enregistré à 1 mV/s d'une électrode massive de chitosan réticulé. La réponse électrochimique est dominée par l'important courant capacitif lié à la très grande surface développée de l'électrode. De même que l'électrode comportant le liant chitosan, il est difficile d'obtenir uniquement la signature de ce courant capacitif car même sous azote de l'oxygène reste piégé dans la structure poreuse de l'électrode. Aussi, il nous est impossible comme dans le cas des premières expériences en RDE, de soustraire la composante capacitive au courant total sous air pour isoler la composante faradique de l'intensité. Il est néanmoins possible d'observer une variation de courant enregistrée vers 0 V (vs ECS).

L'intensité de ce signal faradique de réduction de l'oxygène peut être estimée à  $180 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  (figure 55c). De même que pour les courbes observées en amont, les courbes de chronoampérométrie et de chronopotentiométrie sont également fortement dépendantes de ce courant capacitif important.

Comme précédemment, une contrainte a été appliquée pendant 26 heures ( $I = -1 \text{ mA}$ ), puis le potentiel de l'électrode a été enregistré pendant 40 heures (où  $I = -1 \mu\text{A}$ ) afin d'observer le retour au potentiel initial de l'électrode (figure 55b).

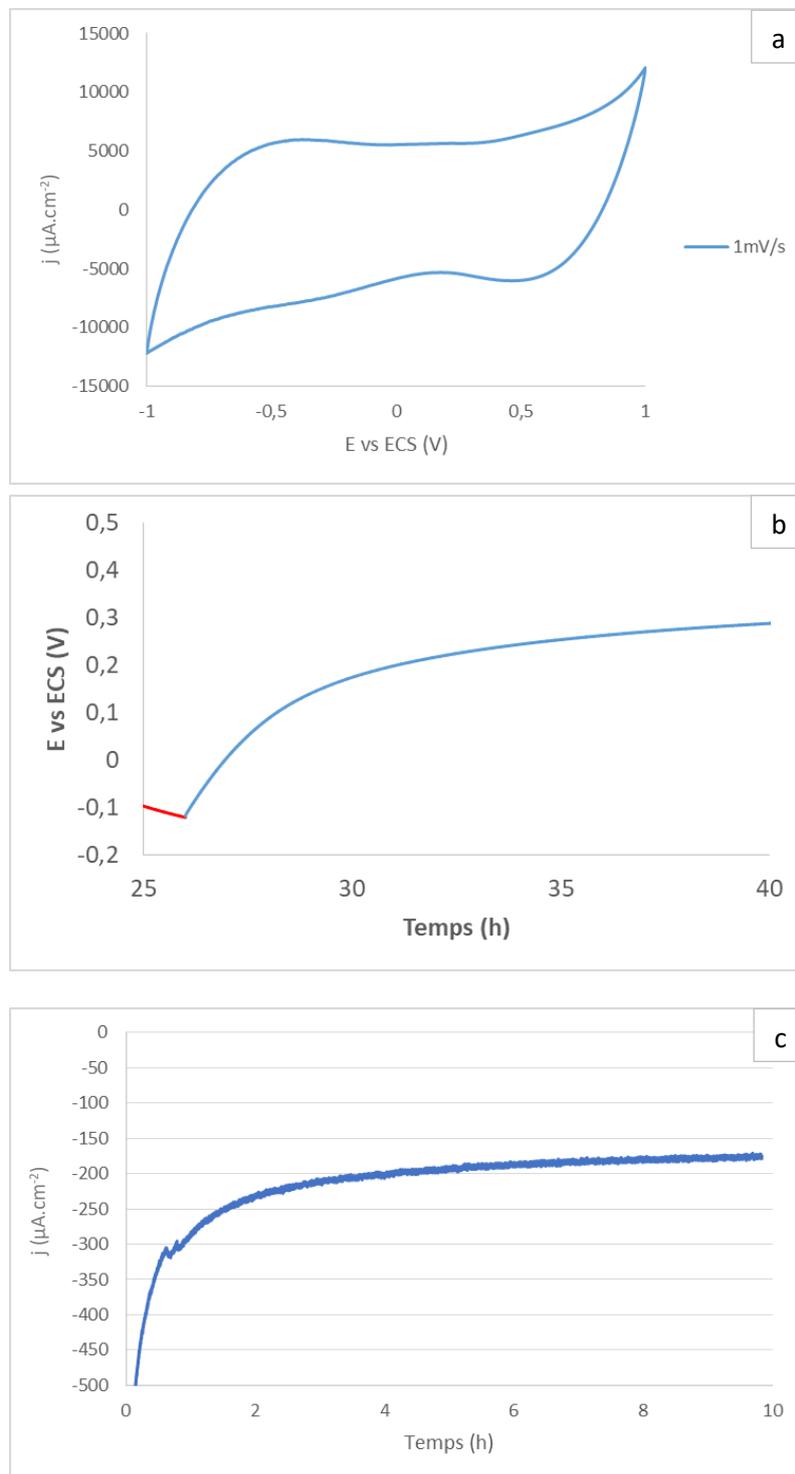


Figure 55: a/ Voltammétrie cyclique,  $0,1 \text{ mV/s}$  ; b/ Chronopotentiométrie  $I = -1 \mu\text{A}$  après 26 h de contrainte à  $I = -1 \text{ mA}$  ; c/ Chronoampérométrie  $E = 100 \text{ mV}$  vs ECS d'une électrode comportant le liant réticulé chitosan,  $m = 30 \text{ mg}$ ,  $e = 0,3 \text{ cm}$ ,  $d = 0,5 \text{ cm}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

#### 4.1.2.3 Biocathode compressée avec PVA

La figure 56 montre un chronoampéromètre obtenu à 200 mV vs ECS en condition physiologique d'une électrode massive composée du liant PVA. Il est observé qu'après bullage d'oxygène ( $t = 2,49$  h), la densité de courant augmente de  $51 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  (sous air) à  $242 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  (sous oxygène), démontrant la catalyse de l'ORR par notre électrode.

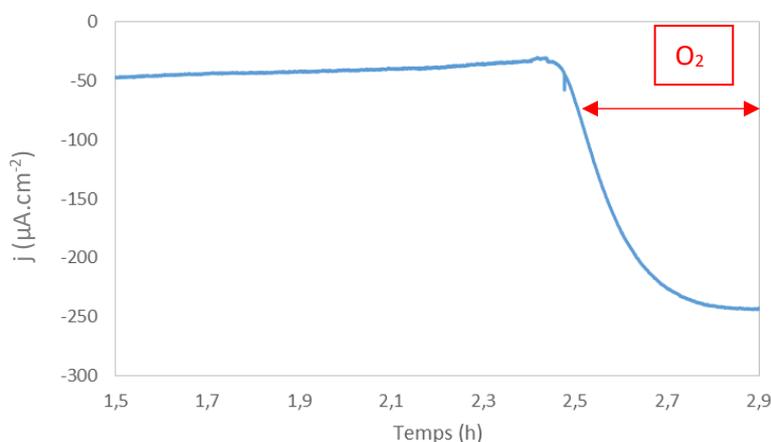


Figure 56: Chronoampéromètre d'une électrode comportant le liant PVA,  $m = 30$  mg,  $e = 0,3$  cm,  $d = 0,5$  cm,  $t = 2,49$  h injection d'oxygène,  $E = 200$  mV vs ECS,  $T=25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

La figure 57a montre un cyclovoltammogramme obtenu à  $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  compris entre  $[-1 ; 1]$  V, comme pour l'électrode comportant le liant chitosan ou encore le liant chitosan réticulé, le voltammogramme se rapproche de la forme proche de celle d'un rectangle, ce qui indique un courant capacitif très important. Il est également observé une variation de la densité de courant aux alentours de 0 mV vs ECS, comme les précédents résultats. La figure 57b montre une courbe de chronopotentiométrie où l'électrode a subi une contrainte ( $I = -1$  mA) pendant 26 heures. Lorsqu'une intensité de courant plus faible est ensuite appliquée ( $I = -1 \mu\text{A}$ ) le potentiel augmente et tend vers 300 mV après 15 heures d'expérience. La figure 57c montre également une étude de chronoampérométrie effectuée à 100 mV vs ECS, l'intensité de ce signal faradique de réduction de l'oxygène peut être estimée à  $130 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . De même que pour les courbes observées en amont, les courbes de chronoampérométrie et de chronopotentiométrie sont également fortement dépendantes de ce courant capacitif important, et on la propriété de stocker de grande quantité d'oxygène, soulignant la difficulté à atteindre un état stationnaire.

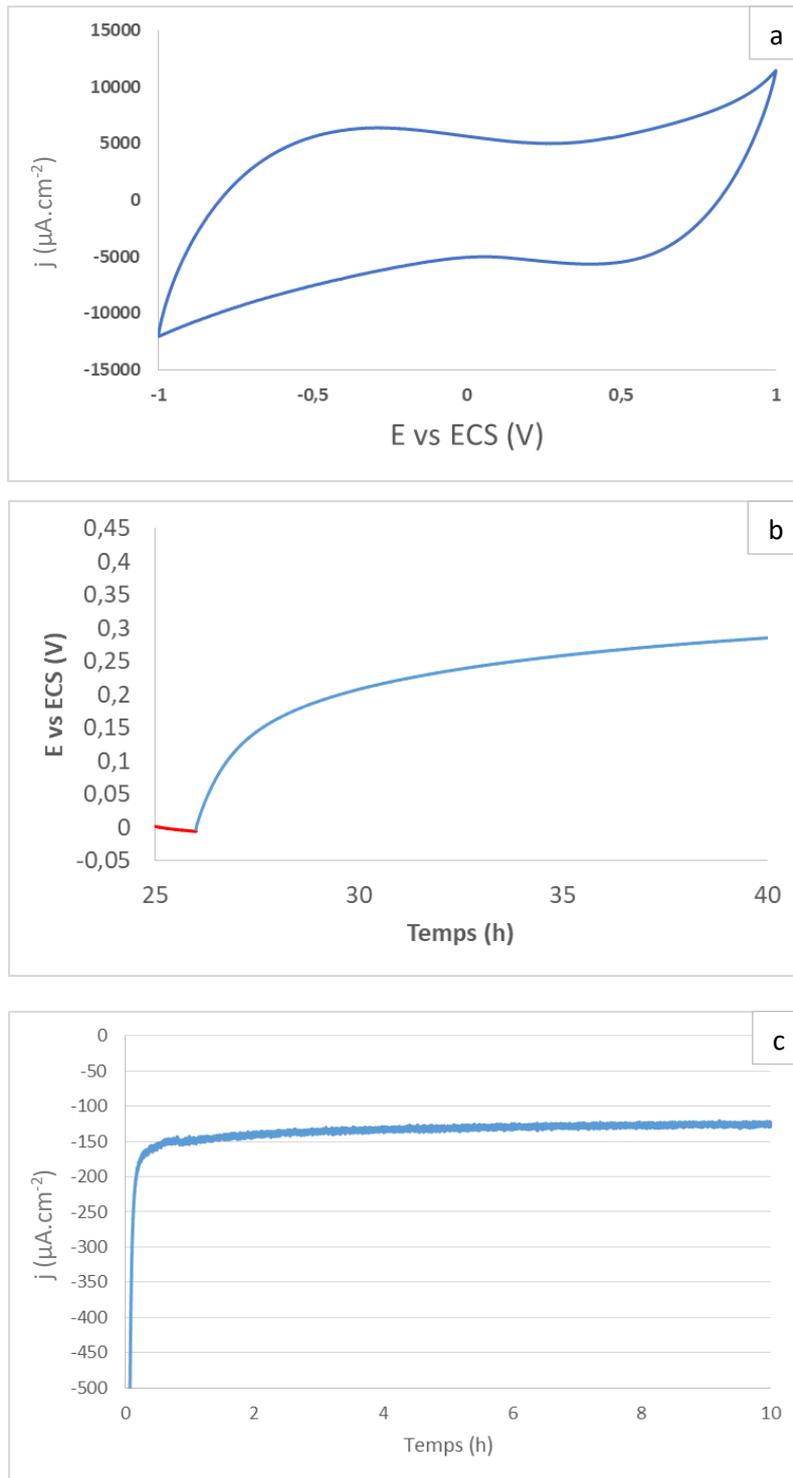


Figure 57: a/ Voltammétrie cyclique, 0,1 mV/s ; b/ Chronopotentiométrie  $I = -1 \mu\text{A}$  après 26h de contrainte à  $I = -1 \text{ mA}$  ; c/ Chronoampérométrie  $E = 100 \text{ mV}$  vs ECS d'une électrode comportant le liant PVA,  $m = 30 \text{ mg}$ ,  $e = 0,3 \text{ cm}$ ,  $d = 0,5 \text{ cm}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

La comparaison de ces résultats à ceux obtenus avec le liant chitosan et le liant chitosan réticulé, montre des densités de courant inférieures pour le liant PVA (à 100 mV vs ECS) :

Liant	j ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
Chitosan	175
Chitosan-Génépin	180
PVA	130

On peut ainsi déduire de ces résultats une densité de courant optimale pour les électrodes comportant le liant chitosan et le liant chitosan réticulé, toutefois, il est difficile de comparer l'efficacité de la catalyse de l'ORR qui demande une investigation plus poussée. La différence des résultats observés ci-dessus entre le liant PVA et chitosan peut être due au processus de mise en solution. En effet, afin de solubiliser le PVA, le solvant DMSO est employé, alors que pour le chitosan un ajout d'acide acétique est effectué afin d'ajouter un proton sur la fonction amine. Cette différence considérable permet l'obtention d'une chaîne chargée positivement pour le chitosan qui est alors plus susceptible d'interagir avec des espèces chargées et donc d'impacter la conductivité électronique. On note cependant des valeurs très proches pour les électrodes comportant le liant chitosan et le liant chitosan réticulé.

#### 4.1.2.4 Etude de la concentration de liant

Afin de proposer une architecture d'électrode la plus performante possible nous avons souhaité étudier la variation de la quantité de liant employée au sein de l'électrode, dans cette étude la quantité de liant PVA a été variée d'un facteur 10.

La figure 58a met en avant un cyclovoltammogramme dont la forme s'éloigne de celles observées lors des précédentes mesures. Une diminution des courants est observée, ce qui montre une électrode moins électriquement conductrice. Également, la vague de réduction observée sur les précédentes cyclovoltammétries est ici moins explicite, ce qui montre que la réduction de l'oxygène est affectée. La figure 58b montre une étude de chronopotentiométrie similaire à celle obtenue pour la précédente électrode de PVA, démontrant que le potentiel n'est pas impacté par la variation de la concentration de liant. L'étude de chronoampérométrie (figure 58c) effectuée à 100 mV vs ECS pour laquelle l'électrode est capable de fournir une densité de courant de  $125 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Cette étude montre que la variation en liant PVA ne semble pas affecter les performances électrochimiques, du moins pour les études en chronopotentiométrie et chronoampérométrie, en revanche, la cyclovoltammétrie montre un déclin du courant, ce qui est dû à l'ajout d'un composé isolant : le PVA.

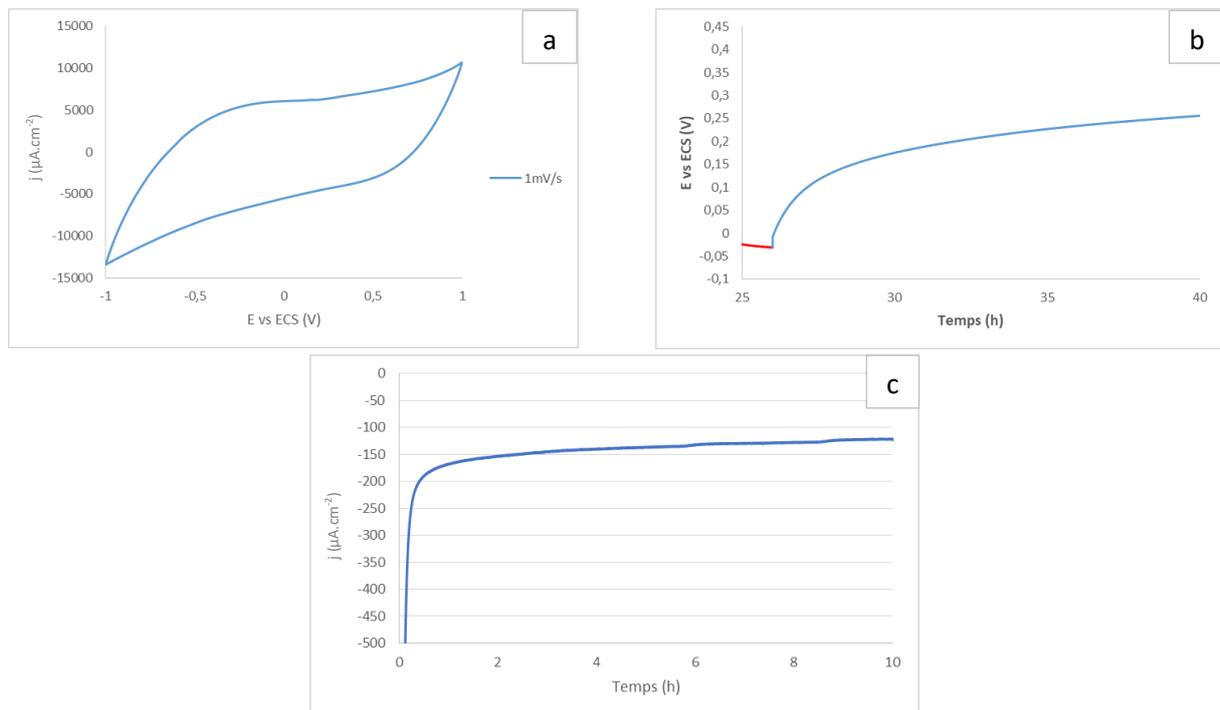


Figure 58: a/ Voltamétrie cyclique,  $0,2\text{mV/s}$  ; b/ Chronopotentiométrie  $I = 1 \mu\text{A}$  après 26 h de décharge ; c/ Chronoampérométrie  $E = 100 \text{ mV}$  d'une électrode comportant le liant PVA 10%,  $m = 30 \text{ mg}$ ,  $e = 0,3 \text{ cm}$ ,  $d = 0,5 \text{ cm}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

#### 4.1.2.5 Impact de l'homogénéisation

Les premières caractérisations des performances électrochimiques des biocathodes de même composition ont montré des résultats dispersés.

Bien que ces résultats ont permis d'observer des tendances, la comparaison des performances électrochimiques des cathodes de différentes compositions (variation du ratio  $m_{\text{liant}} / m_{\text{catalyseur}}$ ) a donné des

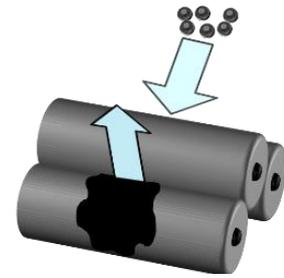


Figure 59: Schéma du système d'homogénéisation à rouleaux

écarts type trop important pour conclure. Afin d'observer des résultats concordants entre des électrodes de même composition, une étude de l'homogénéisation des composants a été faite. Ainsi, un appareil mettant en jeu des rouleaux a été utilisé afin homogénéisant la pâte de catalyseur et le liant par compression (figure 59). Deux mélanges ont été préparés, un premier avec une solution de chitosan et de catalyseur, un second avec une solution de PVA et de catalyseur. Chaque mélange a été homogénéisé dans les mêmes conditions (même nombre de passages dans les rouleaux et temps de passage) et a ensuite été façonné en pastilles de même masse. A chaque pastille un contact électrique a été ajouté puis protégé à l'aide d'une solution de silicone. Une fois les électrodes préparées, elles furent caractérisées par électrochimie. La figure 60a montre des résultats de chronoampérométrie de biocathode toutes issues d'un même mélange de chitosan et catalyseur, et d'homogénéisation par dispositif à rouleaux. Suite à l'homogénéisation des composants, la disparité des résultats entre électrodes de même composition est fortement atténuée. En effet, les résultats électrochimiques obtenus lors des caractérisations des électrodes non homogénéisées et comportant le même ratio  $m_{\text{liant}} / m_{\text{catalyseur}}$  ont montré des valeurs allant de 50 à 150  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $E = 100 \text{ mV vs ECS sous air}$ ). Or, la figure 60a montre des résultats groupés pour des densités de courant à 100  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

Toutefois, la figure 60b montre des résultats dispersifs de chronoampérométrie de biocathodes de PVA homogénéisées par dispositifs à rouleaux, démontrant que l'homogénéisation de la pâte faite avec du PVA n'est pas complète. Cette différence de résultats homogènes entre les pastilles de PVA et de chitosane peut s'expliquer par le fait que le liant chitosan est, lors du processus, sous forme de polyélectrolyte du fait de l'ajout d'acide acétique. Afin de pallier à cette différence de résultats, il faudra augmenter le nombre de passages dans le système d'homogénéisation afin d'accentuer l'homogénéisation des composants PVA et catalyseur.

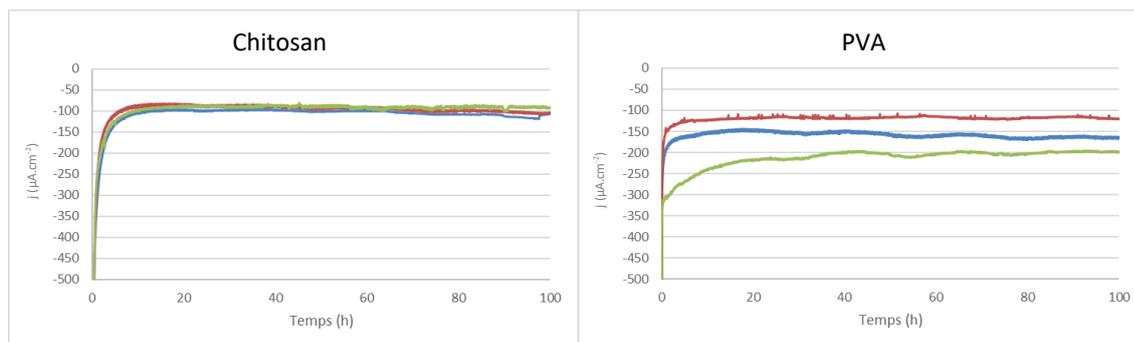


Figure 60: Chronoampérométries  $E = 100$  mV, sous air, d'électrodes comportant le liant a/chitosan et b/PVA ;  $m = 30$  mg,  $e = 0,3$  cm,  $d = 0,5$  cm,  $T = 25^{\circ}\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

#### 4.1.2.6 Stabilité dans le temps des électrodes compressées

Afin d'étudier la stabilité dans le temps des électrodes, nous avons effectué des mesures périodiques en CA après fabrication des électrodes puis après stockage en solution de PBS sur une période de 27 mois. Afin de vérifier l'activité catalytique, des CA ont été effectuées durant lesquels la concentration en oxygène a été augmentée afin d'observer l'augmentation du courant faradique.

##### 4.1.2.6.1 Chitosan

La figure 61 montre deux CA ( $E = 100$  mV vs ECS) effectuées avec une même électrode à deux périodes différentes sur une période de 2 heures, l'une juste après fabrication de l'électrode ( $t=0$ ) l'autre après 27 mois de stockage en solution de PBS, température ambiante et à l'abri de la lumière. La comparaison des deux courbes met en avant une perte de la densité de courant, initialement de  $315 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  après fabrication, elle passe à  $143 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  après 27 mois de stockage, soit une perte proche de 55%. Cette perte est la résultante de nombreux facteurs, comme entre autres la perte du liant chitosan en solution, ce qui diminue la perméabilité aux espèces chimiques, mais aussi la tenue mécanique, le catalyseur peut également être relargué en solution, du fait de la perte du liant chitosan mais aussi par phénomène de dégradation du liant, ou bien encore par rupture de la compression des feuillets de graphène par insertion de molécules d'eau et autres espèces chimiques présentes (ions phosphate, ions chlorure, ions sodium...)

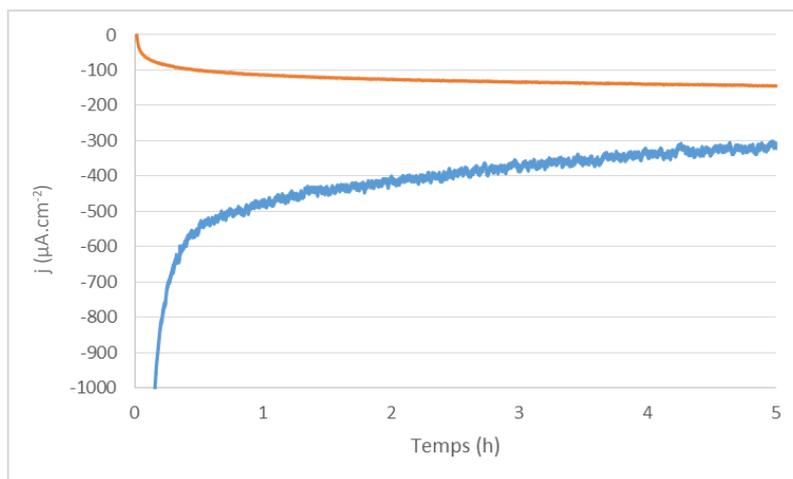


Figure 61: Chronoampérométries effectuées à 100 mV, courbe *bleu* électrode après fabrication, courbe *orange* après 27 mois de stockage, liant chitosan,  $m = 30$  mg,  $e = 0,3$  cm,  $d = 0,5$  cm,  $T = 25^{\circ}\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

#### 4.1.2.6.2 Chitosan génépine

Le chitosan est un polymère qui au cours du temps se dégrade naturellement, aussi, l'ajout d'un réticulant, tel que la génépine (figure 62), permet d'améliorer la résistance du chitosan à la dégradation dans le temps.

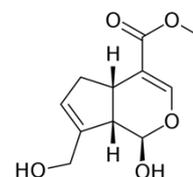


Figure 62: Structure de la molécule de génépine

La figure 63 comporte deux courbes de chronoampérométrie ( $E = 200$  mV vs ECS) effectuées sur une même biocathode composée du liant chitosan réticulé via une solution de génépine, comme pour l'étude faite précédemment, la courbe bleue correspond à une chronoampérométrie effectuée juste après fabrication de l'électrode et la courbe orange correspond à une chronoampérométrie faite 27 mois après stockage. En comparant ces deux courbes on observe que la différence de densité de courant entre les courbes  $t = 0$  et  $t = 27$  mois après 10 heures de fonctionnement est faible cela résulte d'un dysfonctionnement de l'électrode de référence dont le potentiel interne variait légèrement, toutefois, le résultat obtenu reste interprétable et comparable à la mesure effectuée 27 mois plus tard, et l'on constate une très faible perte de l'ordre de 3%. Cette faible perte de performance obtenue est très probablement le résultat de la réticulation du chitosan par génépine, cet ajout de liaison inter polymère permet une meilleure rétention des chaînes moléculaires au sein de l'électrode, et donc de maintenir la structure de l'électrode sur de plus longues périodes.

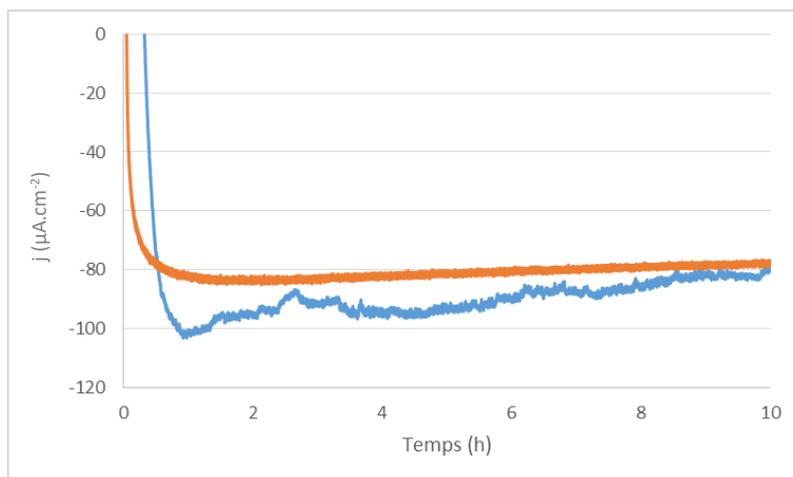


Figure 63: Chronoampérométries effectuées à 200 mV, courbe *bleu* électrode après fabrication, courbe *orange* après 27 mois de stockage, liant chitosan réticulé avec génépine,  $m = 30$  mg,  $e = 0,3$  cm,  $d = 0,5$  cm,  $T = 25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

#### 4.1.2.6.3 PVA

La figure 64 comporte deux courbes de CA ( $E = 200$  mV vs ECS) effectuées sur une même biocathode composée de liant PVA. Comme les études précédentes, la courbe bleue correspond à une chronoampérométrie faite après fabrication de l'électrode délivrant une densité de courant de  $30 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  après deux heures d'expérience, ce qui est nettement inférieur aux densités de courant des systèmes précédents. La courbe orange correspond à une CA effectuée après 27 mois de stockage de la biocathode dans une solution de PBS salin, à température ambiante et à l'abri de la lumière. En comparant ces deux courbes, une perte des performances s'élevant à 55% est observée. Cette perte des performances est due à différents facteurs similaires à ceux décrits pour l'électrode de chitosan non réticulée, comme entre autres la perte du liant en solution, ce qui diminue la perméabilité aux espèces chimiques et la tenue mécanique, le catalyseur peut également être relargué en solution, du fait de la perte du liant PVA mais aussi par phénomène de dissolution du liant, ou bien par rupture de la compression des feuillets de graphène via insertion de molécules d'eau et autres espèces chimiques présentes (ions phosphate, ions chlorure, ions sodium...)

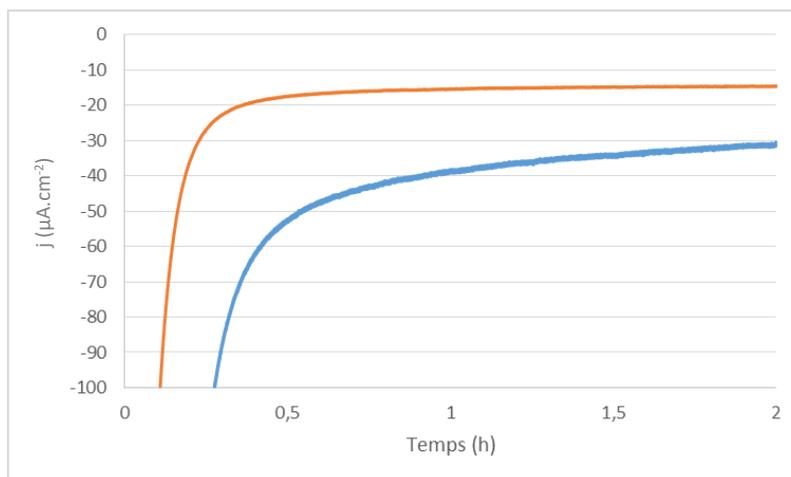


Figure 64: Chronoampérométries effectuées à 200 mV, courbe *bleu* électrode après fabrication, courbe *orange* après 27 mois de stockage, liant PVA,  $m = 30$  mg,  $e = 0,3$  cm,  $d = 0,5$  cm,  $T = 25^{\circ}\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

## 4.2 Biocathode lyophilisée

Les bioélectrodes fabriquées par compression ont l'avantage d'offrir un système mécaniquement stable sur de longues périodes, toutefois, le fait de compresser le système apporte comme inconvénient de limiter la diffusion des espèces chimiques au sein de l'électrode et donc de limiter l'efficacité de l'ORR et inévitablement les performances de l'électrode. Nous avons donc cherché à développer une nouvelle architecture d'électrode capable d'offrir une porosité supérieure à celle proposée par la méthode de compression. Dans cette optique nous nous sommes intéressés aux propriétés de mises en œuvre qu'offrent le chitosan, en effet, ce dernier est capable de former un réseau en trois dimensions comportant de nombreux pores. Le processus met en jeu une solution de chitosan dissous congelée puis lyophilisée, ce qui forme un échafaud dont la taille des pores varie, selon Madihally *et al.* [148], avec différents paramètres, comme la concentration en chitosan dissous, la salinité de la solution utilisée mais surtout, avec la température de congélation. Madihally *et al.* [148] ont démontré que la température de congélation impacte la formation des cristaux de glace qui, une fois éliminés, formeront des pores. Ainsi, il s'agirait d'une question de cinétique et non thermodynamique, la solution de chitosan immergée dans des conditions de température proche du point de cristallisation permettrait une meilleure organisation des cristaux de glace et des chaînes carbonées et de former un réseau plus volumineux. A l'inverse, une immersion de la solution dans des températures éloignées du point de cristallisation figera la solution, diminuant le temps d'organisation des chaînes polymères et formant des cristaux de solvant moins volumineux, et donc des pores de tailles amoindries. Madihally *et al.* [148] ont observé également une disparité dans la distribution de la taille des pores, avec des pores de faible dimension situés proche de la paroi du contenant, et des pores plus conséquents au centre du matériau. Cette disparité à deux phases peut s'expliquer selon Madihally *et al.* [148] par le résultat de la différence de nucléation de la glace à l'interface solution-

verre, par rapport aux conditions de nucléation secondaires à l'interface solution-glace. Madihally *et al.* [148] expliquent également que la formation des pores s'effectue préférentiellement de manière longitudinale, et donc sous forme de canaux, toutefois, ils notent que ces canaux sont reliés les uns aux autres par de nombreux pores. Ainsi, afin d'augmenter la diffusion des espèces chimiques au sein de l'électrode nous avons souhaité utiliser cette matrice de chitosan en tant que support de notre catalyseur.

#### 4.2.1 Fabrication

Une solution de catalyseur et de chitosan est placée dans un flacon surmonté d'un bouchon percé par lequel on peut insérer l'hélice de l'ultraturax et limiter l'évaporation de la solution du chitosan. Une fois le système monté, la solution est homogénéisée pendant 30 min. Après homogénéisation, le mélange est coulé dans un récipient sous forme de cylindre, dont les dimensions correspondent à celles des électrodes compressées, puis placé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit, puis lyophilisé durant une nuit également.

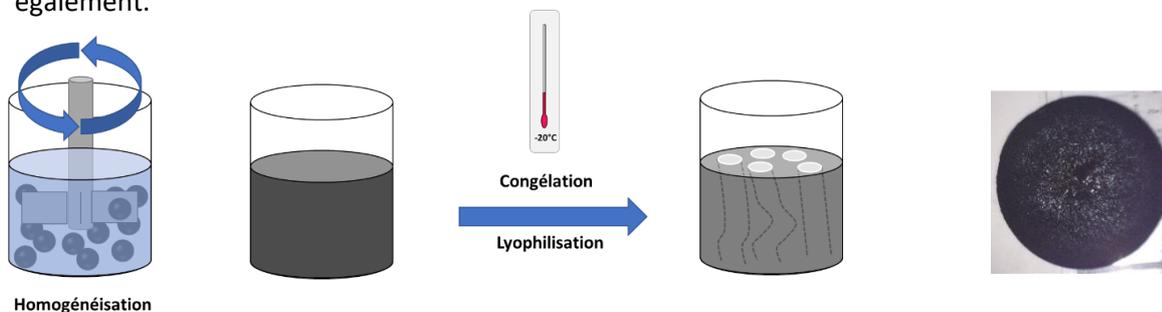


Figure 65: Schéma de fabrication d'électrodes lyophilisées

Après lyophilisation, l'électrode est obtenue et, de même que pour la cathode compressée, il faut alors ajouter un contact électrique à l'aide de pâte de carbone et le protéger à l'aide d'une solution de silicone. Une fois le silicone durcit, les électrodes sont progressivement hydratées à l'aide de bains d'éthanol-eau, une fois l'hydratation terminée, les électrodes sont stockées dans une solution de PBS et peuvent être caractérisées par électrochimie. La figure 66 montre un chronoampérogramme obtenu à  $100\text{ mV}$  en condition physiologique d'une électrode lyophilisée. On observe une augmentation de la densité de courant lors de l'ajout de l'oxygène ( $t = 93,48\text{ h}$ ). Ce phénomène démontre la catalyse de l'ORR par l'électrode lyophilisée.

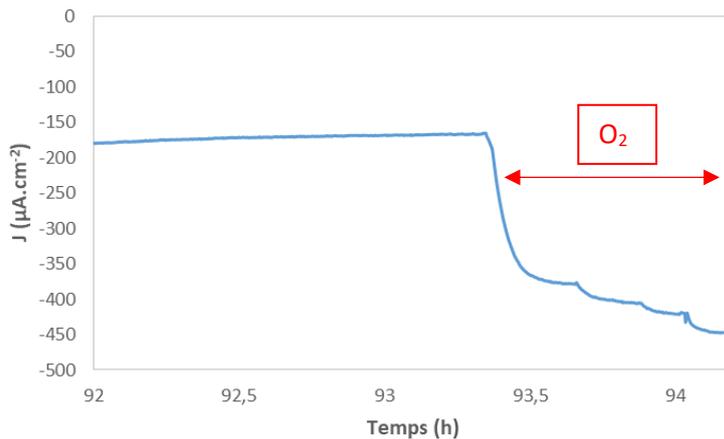


Figure 66: Chronoampérométrie d'une électrode lyophilisée,  $m = 30 \text{ mg}$ ,  $e = 0,3 \text{ cm}$ ,  $d = 0,5 \text{ cm}$ ,  $t = 93,48 \text{ h}$  injection d'oxygène,  $E = 100 \text{ mV}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

#### 4.2.2 Caractérisation Electrochimique

La figure 67a présente une étude de chronopotentiométrie (CP) de l'électrode développée par lyophilisation, cette étude montre une chute de potentiel dès l'application des premiers courants appliqués, on observe également l'apparition de palier de potentiel lors de l'application de  $I = -255 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  (courbe jaune), phénomène dû à la limite de diffusion de l'oxygène au sein de l'électrode, également, on note un potentiel proche de  $100 \text{ mV}$  pour un courant de  $-50 \mu\text{A}$  soit une densité de courant de  $-255 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ , ce qui est nettement supérieur aux potentiels que nous avons pu observer lors des mesures des électrodes compressées. La figure 67b montre les potentiels en fonction des courants appliqués, il est possible d'observer sur cette courbe que des potentiels négatifs seront observés pour des courants supérieurs à  $-70 \mu\text{A}$ . La figure 67c montre une étude de CA de l'électrode effectuée à  $100 \text{ mV}$  vs ECS sur une période de 10 heures, après étude on note une densité de courant de  $230 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  ce qui est supérieure aux densités observées précédemment. Il faut également prendre en compte un facteur majeur lors de la comparaison des performances électrochimiques obtenues entre électrode lyophilisée et électrode compressée à savoir la quantité de catalyseur utilisé, lors du procédé par lyophilisation une solution mère de catalyseur et de liant chitosan est développée :  $1 \text{ g}$  de catalyseur pour  $5 \text{ g}$  de solution de chitosan, soit une composition en liant chitosan supérieure d'un facteur 3, de plus, lors du processus de compression il est observé une perte de solution de chitosan de l'ordre de  $10$  à  $15 \text{ mg}$ , augmentant l'écart de composition des électrodes lyophilisées/compressées. C'est pour cela qu'il est important de comparer les densités de courant massique entre les données des électrodes compressées et lyophilisées.

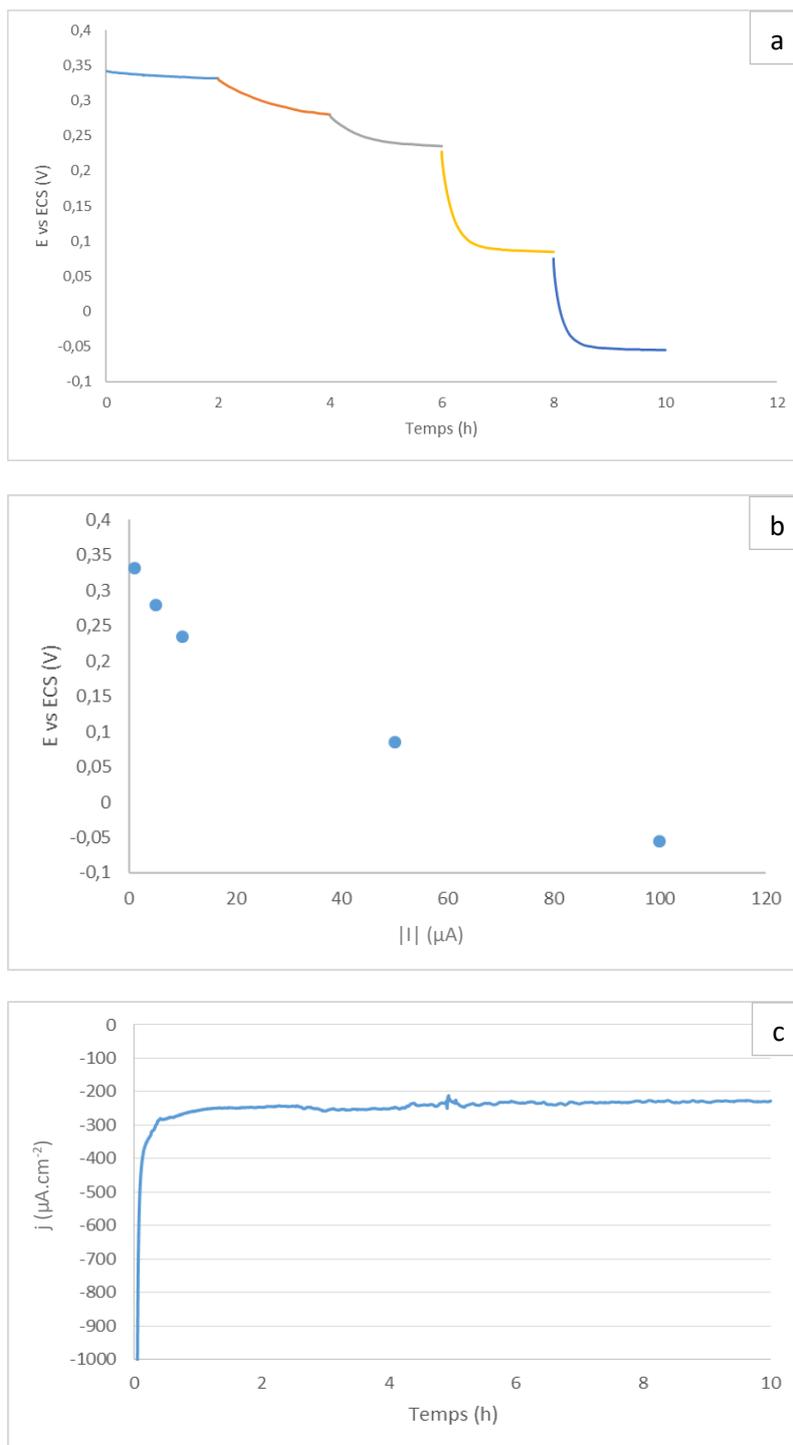


Figure 67: a/ Chronopotentiométrie : bleu 5  $\mu\text{A.cm}^{-2}$ , orange 25,5  $\mu\text{A.cm}^{-2}$ , grise 51  $\mu\text{A.cm}^{-2}$ , jaune 255  $\mu\text{A.cm}^{-2}$ , bleu 510  $\mu\text{A.cm}^{-2}$  b/ Potentiels en fonction de la densité de courant c/ Chronoampérométrie  $E = 100 \text{ mV}$  ;  $m = 30 \text{ mg}$ ,  $e = 0,3 \text{ cm}$ ,  $d = 0,5 \text{ cm}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

Ainsi, la lyophilisation a permis de modifier la structure de l'électrode en augmentant la porosité et la diffusion de l'oxygène au sein du système et donc les densités de courants obtenus. Toutefois, l'augmentation de la porosité du système s'est vue accompagnée d'une augmentation de la fragilité du réseau développé. En effet, les nouvelles électrodes fabriquées ont montré une sensibilité accrue

face à de faibles contraintes mécaniques (gonflement en solution, choc sur les parois des cellules électrochimiques etc...).

#### 4.3 Biocathode lyophilisée sur support conducteur

Les électrodes développées par lyophilisation ont montré une densité de courant supérieure aux électrodes compressées, probablement dû à une meilleure diffusion des espèces chimiques au sein de l'électrode. Toutefois, les électrodes lyophilisées souffrent d'instabilité mécanique. Aussi, afin de bénéficier à la fois d'une densité de courant supérieure ainsi qu'une robustesse optimale, un support conducteur en mousse de polyuréthane carboné a été ajouté à une solution de liant chitosan et de catalyseur. Au préalable, un fil conducteur fut ajouté sur le support carboné à l'aide de pâte de carbone.

##### 4.3.1 Fabrication

Comme pour les électrodes lyophilisées une solution de catalyseur et de polymère est placée dans un flacon surmonté d'un bouchon percé par lequel on peut insérer l'hélice de l'ultraturax et limiter l'évaporation de la solution du chitosan. Une fois le système monté, la solution est homogénéisée pendant 30 min. Après homogénéisation du mélange, le support conducteur en mousse de polyuréthane est plongé dans un récipient cylindrique, puis placé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit, puis lyophilisée durant une nuit. L'électrode est obtenue sous la forme d'un cylindre creux, l'électrode est ensuite progressivement hydratée à l'aide de bains d'éthanol-eau, une fois l'hydratation terminée, l'électrode est stockée dans une solution de PBS et peut être caractérisée par électrochimie.

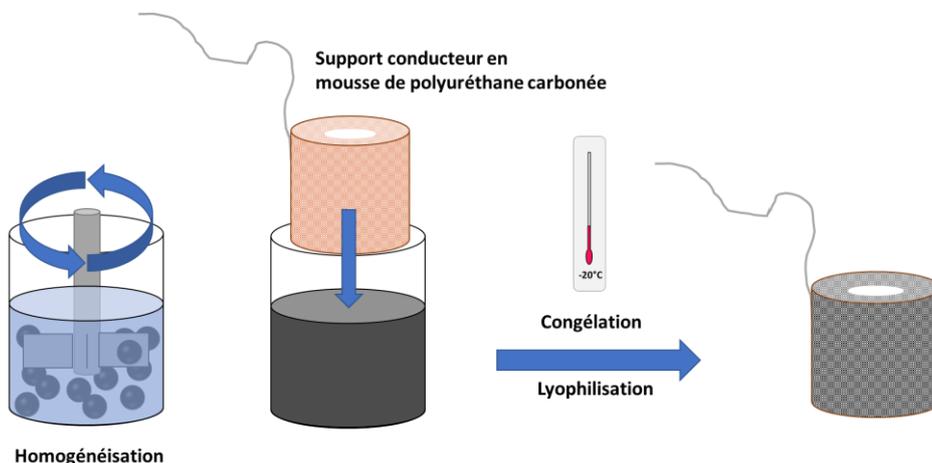


Figure 68: Schéma de fabrication des électrodes lyophilisées sur support conducteur

##### 4.3.2 Caractérisation Electrochimique

Le figure 69a montre une étude de CA effectuée à  $100\text{ mV}$  vs ECS d'une électrode avec support conducteur et sur une période de 10 heures. Sur la figure 69a on observe alors un courant de  $-1200\text{ }\mu\text{A}$ . Toutefois et afin de comparer cette valeur aux précédentes, cette courbe a été convertie en

diverses valeurs, les courbes 69b, c et d montrent ainsi les densités de courant : surfacique (courbe 69b), volumique (courbe 69c) et massique (courbe 69d). Cette conversion est effectuée car la géométrie de l'électrode est fortement éloignée de celle obtenue par le processus de compression ou de lyophilisation.

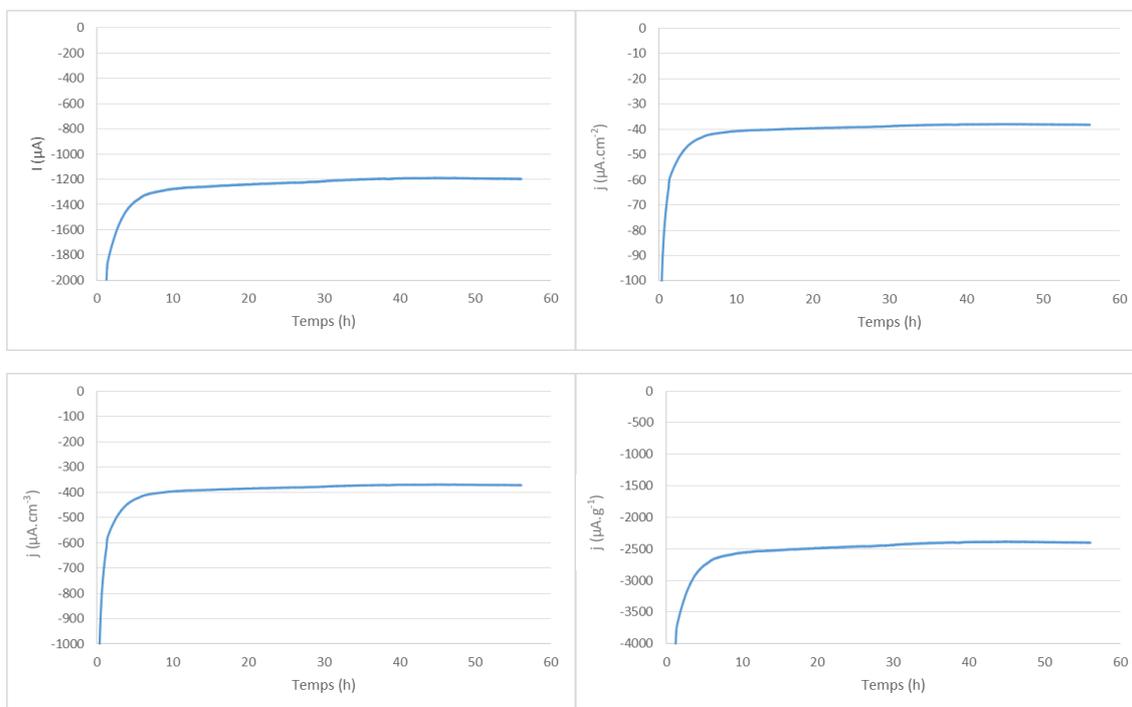


Figure 69: a/ Chronoampérométrie effectuée à 100mV vs ECS ; densité de courant d'après a/ exprimé en : b/ surfacique, c/ volumique, d/ massique ;  $E = 100 \text{ mV}$  ;  $e = 0,3 \text{ cm}$ ,  $d = 0,5 \text{ cm}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ , solution saline de PBS, électrode de référence ECS, contre électrode de platine

Les densités de courant obtenues sont récapitulées dans le tableau suivant :

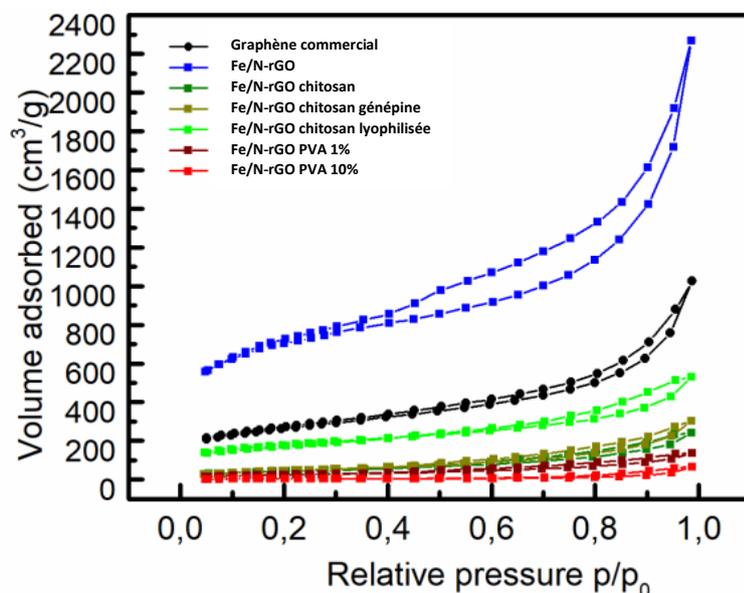
Densité de courant	Valeures
Surfacique ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-38
Volumique ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-3}$ )	-372
Massique ( $\mu\text{A}\cdot\text{g}^{-1}$ )	-2400

Ainsi la biocathode sur support conducteur offre des densités de courants surfacique et volumique nettement inférieures aux électrodes développées en amont. Ce phénomène est le résultat de la géométrie de l'électrode, en effet, du fait de rajouter un support carboné l'électrode ne possède plus la même géométrie que les configurations précédentes et offre une surface et un volume nettement supérieurs. Toutefois, la quantité de catalyseur utilisée offre une densité de courant massique 2 à 3 fois supérieure aux densités massiques que les électrodes obtenues par compression, mais est également inférieure d'un facteur 2 à l'électrode obtenue par lyophilisation. Malgré cela, le but recherché a été atteint, puisque lors de la manipulation de l'électrode sur support celle-ci subit

nettement moins les contraintes mécaniques, que cela soit lors de l'immersion en solution ou bien en cas de choc contre les parois des cellules électrochimiques.

## 5 Mesure BET

Les isothermes d'adsorption et de désorption d'azote des différentes électrodes fabriquées ainsi que ceux du catalyseur et du graphène commercial sont représentées sur la figure 70.



Echantillon	Surface (m <sup>2</sup> /g)	Volume total des pores (cm <sup>3</sup> /g)
Graphène Commerciale	940,71	1,590
Fe/N-rGO	2567,56	3,518
Fe/N-rGO chitosan	157,33	0,375
Fe/N-rGO chitosan génépine	176,25	0,471
Fe/N-rGO chitosan lyophilisée	637,87	0,821
Fe/N-rGO PVA 1%	93,92	0,214
Fe/N-rGO PVA 10%	22,86	0,102

Figure 70: Mesure de surface spécifique par BET, adsorption-désorption de N<sub>2</sub> à 77K

Les valeurs de volumes adsorbés maximales sont observées pour le catalyseur, suivi par le graphène commercial et l'électrode lyophilisée, ces résultats sont observés du fait que le catalyseur est sous forme de poudre et non aggloméré, et du fait que l'électrode lyophilisée offre une plus grande porosité. Les volumes d'azote adsorbés sont similaires pour les cathodes composées de chitosan et chitosan réticulé. On notera un volume adsorbé minimal pour l'électrode comportant une concentration en liant maximale (PVA 10%), du fait des agglomérats plus volumineux formés par une quantité de liant supérieure.

## 6 Conclusion

Au cours de ce chapitre il a été mis en évidence que le catalyseur Fe-N/rGO était capable d'effectuer l'ORR en condition physiologique, fort de ce résultat, des biocathodes ont été fabriquées à partir du catalyseur Fe-N/rGO et de liants polymères organiques par compression mécanique. Lors du processus de compression l'impact de la nature du liant (PVA vs chitosan), de sa réticulation (chitosan vs chitosan/genepin) ainsi que sa quantité (PVA1% vs PVA10%) ont été étudiés. En regardant le tableau (figure 71) résumant les performances des différentes électrodes obtenues par compression, il semble que de manière générale les biocathodes constituées du liant chitosan offrent des performances supérieures à celle du liant PVA, que cela soit du point de vue des potentiels ou bien des densités de courant. Cette différence observée peut être due à la présence de la fonction amine sur les chaînes de chitosan qui permet une acceptation de proton. Lors du processus de dissolution du chitosan, l'ajout d'acide acétique permet cette protonation et, bien que l'électrode soit rincée dans une solution de PBS, il est possible que des amines protonées subsistent, offrant une charge positive sur les chaînes de chitosan ce qui impacte de manière considérable la conductivité ionique et électronique, ainsi que la diffusion de l'oxygène, offrant ainsi de meilleures performances électrochimiques. Ce chapitre a permis de constater des densités de courant similaires entre le liant chitosan et le liant chitosan réticulé. Également, ce chapitre a permis de mettre en évidence que la variation de la quantité du liant PVA au sein de l'électrode impacte principalement la géométrie de l'électrode via un volume plus grand et donc une densité de courant volumique plus faible. Toutefois, on peut s'attendre à une diminution des performances électrochimiques en cas de trop grand ajout du fait que le PVA est un polymère non chargé et isolant électrique. Ce chapitre met en avant la mise en œuvre d'un nouveau procédé de développement des électrodes via lyophilisation. Ce nouveau procédé très prometteur a su démontrer des performances électrochimiques en biocathode nettement supérieures à celles développées précédemment via une augmentation de la porosité du système offrant une diffusion des espèces chimiques supérieure à celle obtenue par compression, néanmoins, l'augmentation de la porosité a également apporté comme inconvénient une sensibilité aux contraintes mécaniques conséquente, à tel point que l'effet de gonflement seul pouvait suffire à conduire à la destruction de l'électrode. Aussi, c'est pourquoi une optimisation du processus de lyophilisation a été effectuée avec l'ajout d'un support conducteur en mousse de polyuréthane carbonée, offrant une tenue mécanique supérieure mais impactant de manière considérable la géométrie de la biocathode, plus particulièrement le volume ainsi que la surface. De ce fait, un travail qui pourrait être effectué ultérieurement, serait d'étudier et optimiser la géométrie de cathodes développées à l'aide de ce processus.

Processus	Compression				Lyophilisation	Lyophilisation sur support
	Liant	PVA 1%	PVA 10%	Chitosan	Chitosan Génépine	Chitosan
$I (\mu A) 100 mV vs ECS$	24,5	23,8	34	35	45	1200
$j (\mu A.cm^{-2}) 100 mV vs ECS$	130	125	175	180	230	38
$j (\mu A.cm^{-3}) 100 mV vs ECS$	492	304	686	705	744	372
$j (\mu A.g^{-1}) 100 mV vs ECS$	820	796	1164	1153	4060	2400

Figure 71: Tableau résumant les différentes performances des cathodes développées dans le chapitre 2

Il a également été observé, lors de ce chapitre, différentes performances obtenues via chronopotentiométrie. Ces mesures ont permis de déduire les limites des systèmes fabriqués face à la diffusion de l'oxygène. Également, ces études ont permis d'anticiper les contraintes quant à combiner ces cathodes à des anodes afin de développer une biopile.

Les auteurs Ahmed *et al.* [149] ont développé un catalyseur à partir de graphène auquel ils ont greffé des fonctions thiol, servant de support à des nanoparticules de platine. Le catalyseur ainsi fabriqué est nommé : GOS-Pt. Leur publication met en avant une étude du catalyseur en RDE en condition physiologique alors capable de fournir  $3,3 \text{ mA.cm}^{-2}$ , avec une solution saturée en oxygène, à  $-0,5 \text{ V vs ECS}$ , 900 rpm, et une vitesse de variation de potentiel de  $20 \text{ mV.s}^{-1}$  et un chargement de catalyseur sur l'électrode tournante de  $50 \mu\text{g.cm}^{-2}$ . Cette densité de courant est légèrement supérieure à celle obtenue au cours des travaux présentés dans ce manuscrit (figure 44) avec le catalyseur Fe/N-rGO dans des conditions similaires :  $2,792 \text{ mA.cm}^{-2}$  avec toutefois un dépôt de catalyseur supérieur ( $300 \mu\text{g.cm}^{-2}$ ). Cependant, leur étude ne développe pas les performances de leur catalyseur une fois mis en forme d'électrode. Dans un autre contexte, Qazzazie *et al.* [150] ont développé un catalyseur de type N-rGO capable de catalyser l'ORR en condition physiologique. Leur catalyseur est obtenu par réduction de GO et après un traitement thermique en présence de cyanamide, qui joue le rôle de précurseur d'azote. Leur étude se concentre sur une caractérisation par RDE, leur catalyseur est alors capable de fournir  $2,6 \text{ mA.cm}^{-2}$ , dans des conditions similaires que précédemment (900 rpm ;  $-0,5 \text{ V vs ECS}$  et  $5 \text{ mV.s}^{-1}$ ). Cette densité de courant est légèrement inférieure à celle obtenue avec le catalyseur Fe/N-rGO, mais reste du même ordre. Les auteurs ont comparé leurs données avec un catalyseur commercial de Pt/C avec lequel ils obtiennent  $4,2 \text{ mA.cm}^{-2}$  dans les mêmes conditions, ce qui est la densité de courant maximale alors observée.

Les travaux de Ahmed *et al.* ainsi que ceux de Qazzazie *et al.* [150] permettent de situer les performances électrochimiques du catalyseur caractérisé dans ce manuscrit en condition

physiologique. Toutefois, leurs études ne développent pas les performances de leur catalyseur sous forme d'électrode, ce qui peut noter un écart sur les performances électrochimiques ainsi que sur l'étude de stabilité dans le temps. Comme expliqué précédemment, El Ichi *et al.* [55] ont développé des électrodes enzymatiques comportant la laccase sur support de nanotubes de carbone. Leur électrode est capable de délivrer  $10 \text{ mA}\cdot\text{ml}^{-1}$  en condition physiologique et une solution saturée en oxygène, à  $0,2\text{V}$  vs ECS. Ces performances sont supérieures à celles obtenues avec le catalyseur Fe/N-rGO, toutefois, les auteurs démontrent qu'après une période de 90 jours d'implantation dans le corps d'un rat, leur cathode perd 90% des performances observées *in vitro* et mesurent  $0,03 \text{ mA}\cdot\text{ml}^{-1}$  sous air. Également, après une période d'implantation de 167 jours, les auteurs montrent une cathode capable d'effectuer l'ORR en conditions *in vitro* et délivre  $0,6 \text{ mA}\cdot\text{ml}^{-1}$  lorsque la solution est saturée en oxygène, soulignant une perte de performance de 50%. L'étude *in vitro* conduite dans ce chapitre montre une perte de 5% après 27 mois de stockage, soulignant ainsi que ce type de catalyseur est robuste et doit faire l'objet d'une étude *in vivo* afin d'être comparé aux résultats de l'enzyme employée par El Ichi *et al.* [55].

## Chapitre 3 : Etudes biologiques de la biocathode et de ses composants

## 1 Introduction

Comme tout dispositif destiné à être implanté dans un mammifère, la biopile doit être biocompatible. La biocompatibilité d'un implant peut être définie comme la capacité de l'implant à fonctionner correctement dans le corps sans provoquer des risques de blessure, de toxicité, de rejet par le système immunitaire ou encore d'effets locaux ou systémiques indésirables ou inappropriés. Un implant doit donc coexister avec l'environnement vivant sans provoquer d'effets indésirables dans le cadre d'une application biomédicale spécifique [151]. Cependant, quelle que soit sa qualité, un implant reste toujours un corps étranger pour l'organisme et son introduction dans l'organisme, entraîne des réactions plus ou moins importantes du tissu environnant ce en quoi consiste la réponse inflammatoire du corps vis-à-vis de l'implantation. L'intensité de la réaction inflammatoire varie selon la nature de l'implant : taille, composition chimique, propriétés physico-chimiques de la surface, propriétés mécaniques.

Lorsqu'un corps étranger ou encore des bactéries ont réussi à envahir un tissu d'un organisme, on assiste à un phénomène de défense de la part de l'organisme attaqué lié à une rupture de l'équilibre, ou homéostasie, tissulaire. Les cellules sentinelles comme les mastocytes, les dendritiques et les macrophages recrutent par chimiotactisme des leucocytes, ou globules blancs, circulant dans le sang qui sont alors capables de localiser le site d'infection, de sortir du torrent circulatoire et de migrer en direction du corps étranger pour intervenir et l'éliminer, c'est la réponse inflammatoire de l'organisme. Cette étape d'identification du corps étranger par l'organisme donne lieu au rejet ou à l'isolement du DMI, la réponse inflammatoire est une cascade de réactions biologiques qui débute par l'adhésion de protéines sur l'implant constituant un support permettant des interactions entre le corps étranger, les cellules (leucocytes, fibroblastes, cellules endothéliales...) et les macromolécules synthétisées par les cellules, ou d'ores et déjà présentes, du tissu conjonctif (collagènes, fibres élastiques, glycoprotéines, polysaccharides...) [18], [20], [152]–[154]. Ces interactions conduisent à une adhésion des éléments biologiques présents sur l'élément externe à l'organisme, ce phénomène d'adhésion et, dans le cas de DMIa, d'obstruction biologique est appelé en anglais : bioencrassement [155].

Ce phénomène de bioencrassement peut, lors de la réaction de l'organisme sur un corps étranger, former un réseau biologique autour du corps étranger, soit dans notre cas, la biopile à glucose et oxygène. Ce réseau biologique est un réseau complexe de macromolécules et de cellules pouvant être composé de collagène, de fibrine, de cellules fibroblastes et endothéliales. Ce phénomène de bioencrassement peut-être problématique pour le fonctionnement de la biopile puisqu'il en résulte une matrice extra cellulaire pouvant limiter l'apport en glucose et en oxygène. Toutefois, ce réseau biologique est également composé de cellules endothéliales, cellules qui forment les parois des vaisseaux sanguins. Cette formation de vaisseaux sanguin est appelée vascularisation. Ces vaisseaux

sont des conduits dont les flux qui circulent ont des concentrations en oxygène et glucose supérieures aux liquides extracellulaires présents en sous-cutané ou en intra-abdominale.

Le phénomène de bioencrassement est un phénomène complexe car, comme démontré en amont, composé de nombreux phénomènes et entités biologiques, chimiques et biochimiques. Dans le cas de l'implantation de DMI impliquant l'échange de molécules avec l'organisme biologique, le phénomène de bioencrassement est à la fois problématique du fait de la limitation de la diffusion des espèces chimiques qu'il impose, mais peut être également bénéfique du fait du phénomène de vascularisation (figure 72).

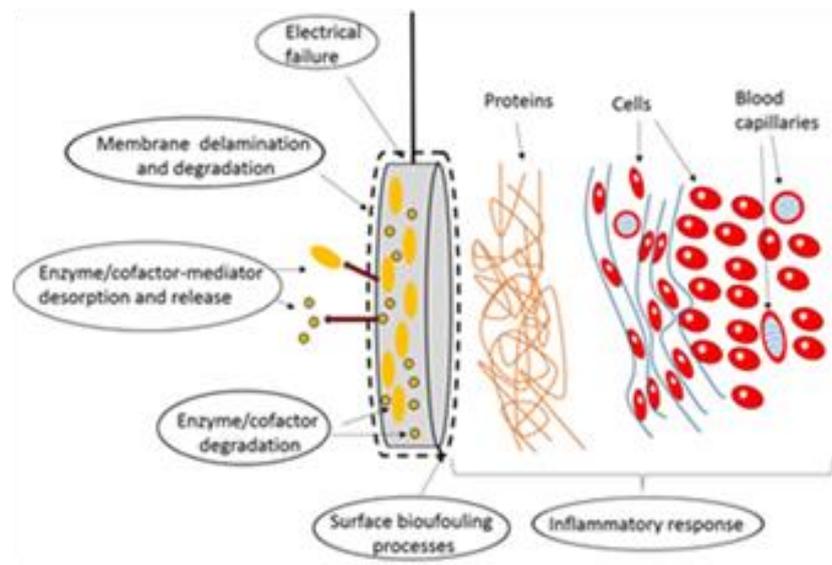


Figure 72 : Illustration des différentes sources potentielles de dysfonctionnement d'un biocapteur implanté selon les auteurs [20]

La réponse inflammatoire se produit en plusieurs étapes incluant trois principaux processus : l'inflammation aiguë, l'inflammation chronique et la formation du tissu granulomateux. En bref, l'inflammation aiguë est caractérisée par l'infiltration de mastocytes et de neutrophiles au niveau du site de l'implantation et de nombreuses protéines sanguines et tissulaires telles que les cytokines. Les facteurs de croissance sont libérés et les leucocytes adhèrent à l'endothélium des vaisseaux sanguins pouvant ainsi infiltrer le site d'implantation. L'inflammation chronique est caractérisée par la présence des macrophages et des cellules géantes de corps étrangers, ainsi que la prolifération des vaisseaux sanguins et du tissu conjonctif pour restructurer la zone de l'implant. La phase de restructuration se déroule comme suit : le caillot de fibrine, formé pendant la phase inflammatoire aiguë, est converti en un tissu de granulation hautement vascularisé par la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales vasculaires. Ces dernières n'altèrent généralement pas le fonctionnement des dispositifs implantables qui ne nécessitent pas d'échanger avec le liquide extracellulaire, mais elles peuvent être néfastes pour le fonctionnement des dispositifs effectuant un tel échange, comme dans le cas des

biocapteurs de glucose et des biopiles. En effet, les réactions inflammatoires résultant de l'implantation de ces dispositifs entraînent différents phénomènes qui entraînent la dégradation du fonctionnement des électrodes (figure 72 d'après [20]).

Dans le cas d'une biopile ou d'un biocapteur à glucose, l'attaque continue du système immunitaire contre l'implant compromet à la fois son intégrité structurelle et sa capacité à échanger des substrats (*e.g.* glucose), entraînant une défaillance électrique, une délamination des membranes, une dégradation des (bio)catalyseurs, une biodégradation des membranes à la surface du dispositif, une passivation des électrodes et une encapsulation fibreuse.

Pour prévenir les effets combinés de l'encrassement biologique en surface et de l'inflammation locale sur la stabilité fonctionnelle et la durée de vie de ces dispositifs électrochimiques implantables (biopile, biocapteurs), différentes méthodes ont été proposées. Celles-ci sont principalement basées sur une approche des biomatériaux qui consiste à recouvrir la surface de membranes poreuses biocompatibles dotées de propriétés anti-bio-encrassement dans le but de réduire les phénomènes de bioencrassement et de minimiser les réactions inflammatoires provoquées par l'intrusion et l'implantation de tissus.

Dans le cadre de ce projet, l'utilisation des membranes à base de PolyVinylAlcohol (PVA) a été favorisée. Ce choix est justifié par les travaux de Penven [144] qui, lors d'un projet de recherche réalisé dans le cadre d'une thèse de doctorat au sein de l'équipe SyNaBi, a optimisé l'utilisation du PVA lors de l'implantation biopile. Les résultats obtenus ont montré que le PVA en plus d'être biocompatible et non biodégradable possède des excellentes propriétés d'anti-encrassement qui lui permettent d'être un excellent matériau pour l'application biopile implantable (figure 73)



*Figure 73 : Membranes d'hydrogel de PVA explantées après 24 jours [152]*

Le but de ce chapitre est d'une part d'évaluer les propriétés de biocompatibilité de nos biocathodes et d'autre part d'étudier l'impact de leur implantation dans l'animal sur les performances électrochimiques.

## 2 Etude de la biocompatibilité d'un implant

Les DMIs doivent suivre une procédure d'évaluation biologique décrite dans la norme ISO 10993-1 [156]. Des tests *in vitro* et des tests *in vivo* sont recommandés afin de démontrer l'absence vraisemblable d'effet délétère du DMIs sur l'organisme. Le tableau (figure 72) résume les différents tests *in vitro* recommandés par la norme ISO 10993-1 [156]. Les tests *in vitro* sont la somme de nombreuses études et tests tels que des essais de cytotoxicité, génotoxicité, ou encore d'hémolyse. Les tests *in vitro* et *in vivo* incluent :

Test	Type
Cytotoxicité	<i>In vitro</i>
Génotoxicité	<i>In vitro</i>
Hémocompatibilité	<i>In vitro, In vivo</i>
Implantation	In vivo
Irritation	In vivo
Carcinogénicité	In vivo, <i>in vitro</i>

Figure 74: Tableau récapitulatif différents tests de biocompatibilité

Puisque l'objectif principal de cette thèse n'est pas de réaliser une étude complète de la biocompatibilité des biocathodes mais plutôt de s'assurer qu'elles ne représentent aucun danger de toxicité sur l'animal lors des études *in vivo*, les études menées se sont focalisées sur : la cytotoxicité des composants des biocathodes, l'analyse des éventuelles réactions de rejet du corps de la biocathode, et l'interaction entre la surface des biocathodes et le tissu environnant. Pour cette dernière étude, le tissu a été analysé afin de vérifier d'une part le degré des réactions inflammatoires engendrées par l'implantation des biocathodes et d'autre part l'évolution des phénomènes de bioencrassement à la surface des biocathodes.

Comme décrit en détail dans le premier chapitre de cette thèse, l'application visée est l'implantation, ceci afin de fournir de l'énergie électrique à des dispositifs consommant des densités de puissance de l'ordre du microwatt : *e.g.* pacemaker =  $30 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Toutefois, implanter un dispositif médical est extrêmement complexe, que cela soit chez des animaux de laboratoire (rongeurs, ovins, bovins...) ou, bien évidemment, chez l'homme. Cette complexité réside dans la multitude d'interaction physicochimique entre le corps biologique et l'objet implanté. Ces interactions varient selon le degré de toxicité des matériaux qui composent l'implant, la taille du dispositif implanté, la réponse immunologique de l'hôte, le relargage d'espèce chimique par l'implant ou encore le vieillissement des composants. Anticiper et restreindre ces phénomènes est un enjeu de taille pour certains, toutefois pour d'autres, des méthodes peuvent être envisagées comme l'utilisation de matériaux biocompatibles, qui limitera l'impact de la toxicité, du relargage de molécules et du vieillissement dans le corps.

Au cours de ce chapitre il sera étudié dans un premier temps des tests *in vitro* mettant en avant la cytotoxicité des différents composants de la biocathode connus de la littérature (chitosan, PVA...). Ces premiers résultats permettront de valider un protocole d'analyse qui permettra d'effectuer la première étude de cytotoxicité du catalyseur Fe/N-rGO. Ensuite, l'impact de ces composés en forme d'électrode sur une culture cellulaire fera l'objet d'une étude. Puis, l'influence de la présence de l'électrode chez le rongeur et réciproquement les effets de l'implantation sur notre cathode seront étudiés.

### 3 Etude *in vitro* : Etude de cytocompatibilité

Les tests de cytotoxicité sont considérés comme des tests de dépistage, ils sont utilisés afin d'évaluer la réaction des cellules vivantes face à un composant. Ces tests soulignent la viabilité cellulaire, la capacité de croissance des cellules et, selon le type cellulaire, leur adhésion. L'étude de cytocompatibilité d'un matériau consiste à observer et analyser le comportement de cellules en présence d'un matériau et comparer le comportement de ce même type de cellules en conditions usuelles. Généralement un matériau cytotoxique provoque des phénomènes de nécrose cellulaire dans lequel les cellules perdent leur membrane externe et meurent rapidement à la suite de la lyse cellulaire. Les cellules en cours de nécrose présentent généralement un gonflement rapide, perdent l'intégrité de la membrane, arrêtent le métabolisme et libèrent leur contenu dans l'environnement. Les cellules qui subissent une nécrose rapide *in vitro* ne disposent pas de suffisamment de temps ou d'énergie pour activer le mécanisme apoptotique et n'expriment pas de marqueurs apoptotiques, permettant aux cellules macrophages d'éliminer les débris cellulaires et ainsi empêcher une réaction inflammatoire. Ce phénomène renseigne rapidement et efficacement sur la toxicité d'un composé selon le type de cellule, de plus, il est facilement observable. Toutefois, il s'agit là d'un test spécifique

à un type unique de cellules pour un type de matériaux, aussi, le choix de la provenance ainsi que du type cellulaire renseigneront directement sur les interactions potentielles entre le corps et le matériau implanté.

Les travaux de T. Koyano *et al.* [157] mettent en avant une étude de cytocompatibilité des matériaux d'hydrogel de PVA et mélange de chitosan et de PVA face à des cellules fibroblastes de souris (L929), lors de leur étude ils montrent que les matériaux semblent être cytocompatibles et montrent une faible adhésion cellulaire pour le matériau PVA en forme d'hydrogel. T. Koyano *et al.* [157] mettent en avant que lorsque la composition d'hydrogel de PVA varie avec l'ajout de chitosan, l'adhésion des cellules fibroblastes L929 augmente également, certainement à cause de la charge positive du chitosan.

Ces premiers travaux montrent les prémices d'une étude de biocompatibilité des matériaux chitosan et PVA dont les résultats nous réconfortent dans nos choix quant à les utiliser en tant que liant polymère organique au sein de notre électrode. Ces travaux montrent que le matériau PVA sous forme d'hydrogel en plus d'être cytocompatible, limite également l'adhésion cellulaire. Cette propriété peut être bénéfique si l'électrode est encapsulée d'hydrogel de PVA, limitant ainsi la prolifération de cellules et de tissus cellulaires, limitant ainsi la diffusion des espèces chimiques au sein de l'électrode. Dans cette optique, les travaux de Penven *et al.* [144] montrent une étude de la biocompatibilité d'hydrogel de PVA. Ils développent et implantent des membranes d'hydrogel de PVA qui, selon les auteurs, peuvent servir de membrane protectrice et isolante. En effet, du fait des propriétés mécaniques d'élasticité, de souplesse et de résistance aux chocs, les membranes d'hydrogel de PVA possèdent également une taille et une quantité de pores permettant la diffusion des espèces chimiques telles que le glucose, de multiples propriétés qui font de la membrane d'hydrogel de PVA un candidat très intéressant afin d'encapsuler et protéger les DMIs. Penven *et al.* concluent dans leur étude sur la non-toxicité cellulaire du PVA ainsi qu'une intégration relativement bonne dans l'organisme des rats. Également, les auteurs concluent que ce matériau n'engendre pas de réaction inflammatoire marquée ni de réaction toxique. De plus, Penven *et al.* notent une propriété particulièrement intéressante dans le cadre de l'enrobage de biopile : les cellules n'ont pas d'affinité marquée pour lui et se multiplient modérément à sa surface ce qui limite leur prolifération et l'apparition d'une couche cellulaire épaisse à leur surface. Néanmoins, les auteurs notent la formation, après implantation *in vivo*, d'une fine capsule de collagène. Cette formation peut être problématique, notamment pour la diffusion du glucose. De plus sur le long terme, la formation de collagène favorise l'adhésion cellulaire et donc le développement de tissus limitant une fois encore la diffusion des espèces chimiques. Les travaux de Srikanth [158] montrent une étude de cytotoxicité de différents matériaux organiques sous forme de nanoparticules, plus spécifiquement, il met en présence des cellules fibroblastes 3T3 issues de souris

avec des nanotubes de carbone, des fullerènes, du graphène et des nanoclays. Dans cette étude ils mettent en avant l'impact de la concentration en matériau sur la viabilité cellulaire, ils concluent sur une viabilité cellulaire de 70% pour des concentrations en graphène de  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$  sur des cellules 3T3. Srikanth [158] explique que le graphène, lorsqu'il est bien dispersé dans le milieu de culture, possède un très bon rapport hauteur / largeur qui permet à ces structures en forme d'aiguilles de franchir et couper facilement les membranes cellulaires et ainsi accélérer leur mort.

Wojtoniszaka *et al.* [159] se sont focalisés sur l'étude de la cytocompatibilité des matériaux oxyde de graphène (GO) et oxyde de graphène réduit (rGO). Dans celle-ci, les auteurs mettent les matériaux GO et rGO en présence de cellules fibroblastes de souris L929 et concluent qu'une cytocompatibilité existe pour une concentration en matériau compris entre  $3,125 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  et  $12.5 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  face aux cellules L929. Afin d'effectuer des études préliminaires de cytocompatibilité sur les matériaux choisis, des cellules de type fibroblastes embryonnaires issues de la souris, les 3T3-L1 (figure 75) ont été sélectionnées.

Les cellules fibroblastes sont des cellules très connues de la littérature et sont également employées lors de l'obtention de norme ISO 10993-5 [156] afin de certifier une cytocompatibilité voire une biocompatibilité. Les fibroblastes sont aussi connues pour jouer un rôle crucial dans le processus de cicatrisation, il est admis qu'elles suivent les cellules inflammatoires jusqu'aux sites de lésions tissulaires et contribuent à la cicatrisation des plaies par la synthèse de protéines structurales.

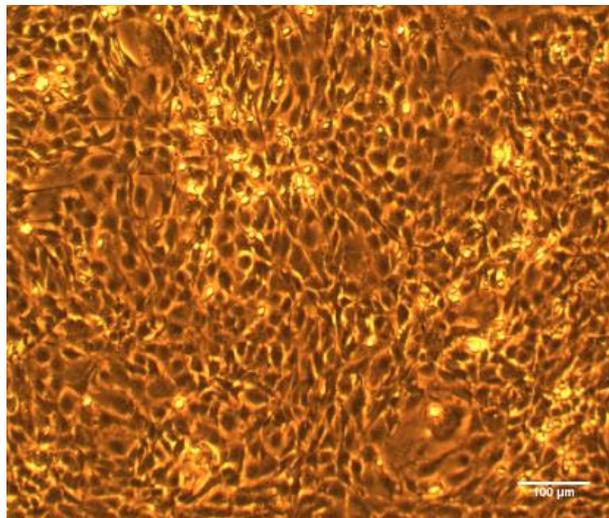


Figure 75: Cellules 3T3-L1 après 10 jours d'incubations à :  $T=37^{\circ}\text{C}$  ;  $5\% \text{ CO}_2$  ; en milieu de culture : DMEM (Dubelco Modified Eagle Medium)

De ce fait, les cellules fibroblaste 3T3-L1 sont un choix pertinent compte tenu des futures implantations chez le rongeur, ces cellules seront impliquées dans le processus de cicatrisation en cas d'implantation et ceci quel que soit la zone d'implantation.

## 4 Culture cellulaire

### 4.1 Chitosan

Un test préliminaire de cytocompatibilité du chitosan, dont les propriétés ont été développées lors du chapitre 2 de ce manuscrit, a été effectué en présence des cellules 3T3-L1. Ce premier test préliminaire consiste à observer si la présence du matériau chitosan impacte drastiquement le cycle de vie cellulaire, si le matériau chitosan induit une toxicité aigüe conduisant à la mort prématurée des cellules observables. Toutefois, la solution de chitosan utilisée lors de la fabrication des électrodes étant à un pH très acide, il est nécessaire d'effectuer de nombreux rinçages qui ont pour conséquence de solubiliser une grande partie du chitosan. L'analyse du chitosan a donc été effectuée sous forme de membrane. Bien que la structure soit différente, une partie du chitosan reste soluble et pourra ainsi diffuser en solution, permettant ainsi d'étudier d'une part l'adhésion cellulaire sur une membrane et dans un même temps étudier la toxicité du chitosan en solution. Pour ce faire, une solution de chitosan a été déposée au fond du récipient de culture cellulaire, puis, après séchage, stérilisation et lavage au PBS, des cellules fibroblastes issues d'embryons de souris (cellules 3T3-L1) ont été ajoutées.

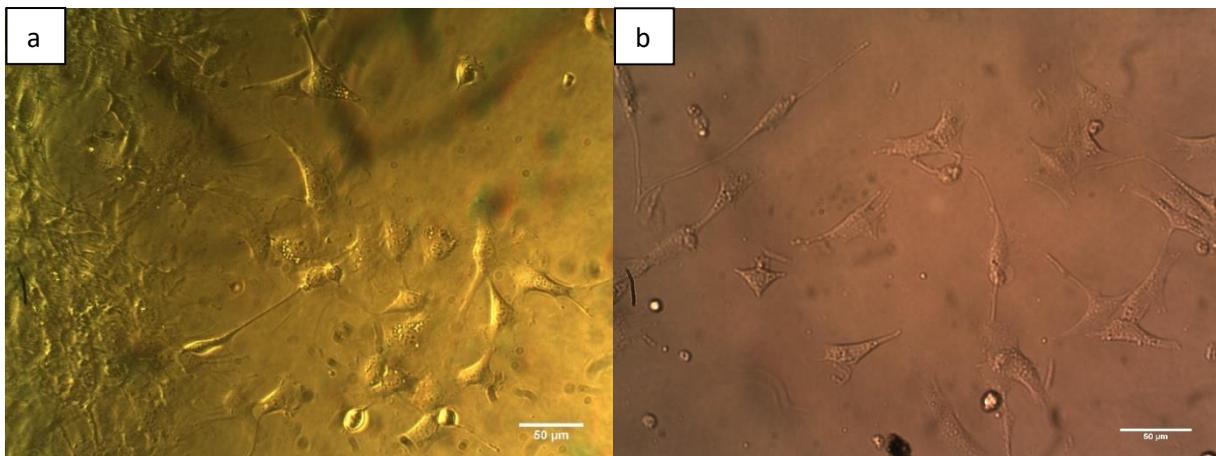


Figure 76: Cellules 3T3-L1 a/ en présence de chitosan ; b/contrôle ; après 72 heures d'incubation à :  $T=37^{\circ}\text{C}$  ; 5%  $\text{CO}_2$  ; DMEM

La figure 76a montre des cellules 3T3-L1 en présence de membrane de chitosan après 48h d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$ . De même que l'oxyde de graphène réduit dopé au fer et à l'azote, ce résultat permet de conclure que le chitosan ne montre pas d'effet toxique sur les cellules 3T3-L1, et que ces dernières peuvent proliférer en présence du chitosan. La figure 76a montre également des cellules 3T3-L1 en forme allongée, forme typique des cellules fibroblastes, démontrant ainsi que le matériau ne semble pas affecter l'adhésion cellulaire. En comparant ce résultat ( $t = 72$  heures) avec le résultat témoin (figure 76b) un nombre de cellules équivalent est constaté ( $7511 \text{ cellules.cm}^{-2}$  vs contrôle : 7418

cellules.cm<sup>-2</sup> +/- 200 cellules.cm<sup>-2</sup>), ce qui confirme une non-cytotoxicité du polymère chitosan vis-à-vis des cellules 3T3-L1. Si l'on se réfère aux travaux de Mori *et al.* [160], ainsi que d'autres études [161], [162] publiées dans la littérature, le liant chitosan semble effectivement cytocompatible, il ne semble nullement impacter la cinétique de reproduction des fibroblastes auxquelles il a déjà été mis en contact lors de ces travaux.

#### 4.2 Hydrogel de PVA

De même que pour le chitosan, des tests préliminaires de cytocompatibilité avec des membranes d'hydrogel PVA ont été effectués. Le PVA sous forme de membrane peut être utilisé en tant que membrane séparatrice d'un DMI implanté, de plus, bien que n'étant pas sous la même forme, ce résultat nous permettra de faire un parallèle avec le PVA sous forme de liant organique. La figure 77a montre des cellules fibroblastes 3T3-L1 en présence d'une membrane d'hydrogel de PVA après 7 jours d'incubation à 37°C.

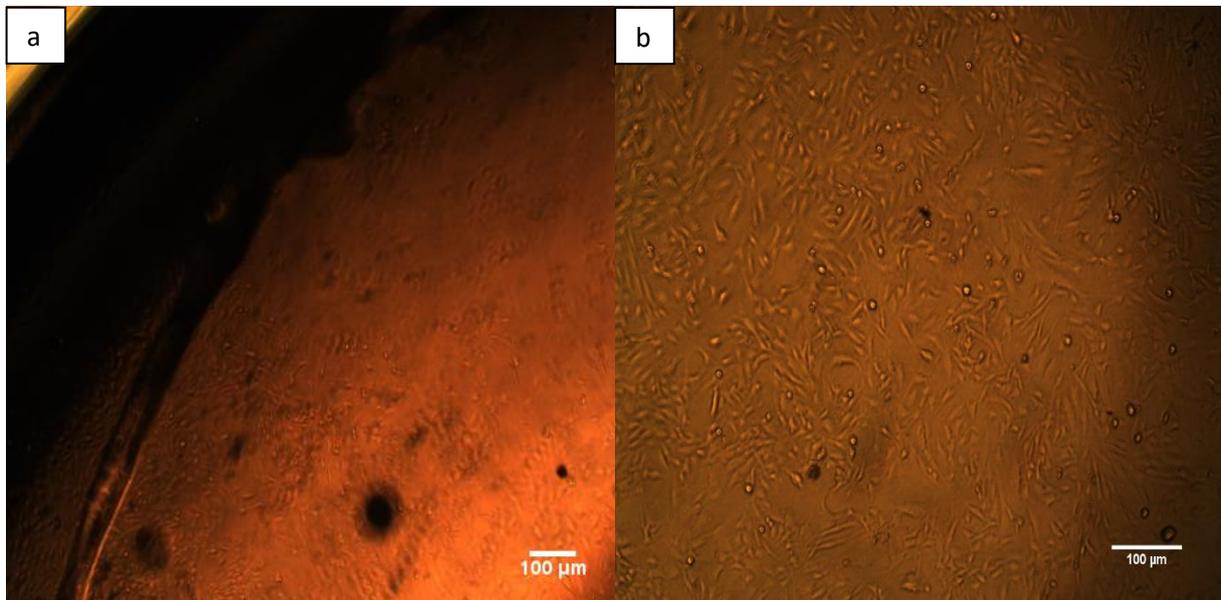


Figure 77: Cellules 3T3-L1 : a/en présence d'hydrogel de PVA ; b/ contrôle ; 7 jours après incubation à : T=37°C ; 5% CO<sub>2</sub> ; DMEM

Ce résultat nous informe d'une non toxicité aigüe que le PVA pourrait induire sur les cellules 3T3-L1. Cette figure montre que les conditions environnementales dans lesquelles se trouvent les cellules offrent un ancrage des membranes plasmiques en configuration fusiforme, qui est la forme typique des cellules 3T3-L1 lorsqu'elles sont ancrées et cultivées en 2D.

Toutefois, comme décrit en amont, les travaux de Penven *et al.* [144] concluent sur une forte probabilité quant à la biocompatibilité de l'hydrogel de PVA du fait de leur expérience d'implantation. D'autre part, T. Koyano *et al.* [157] concluent leurs travaux sur la cytocompatibilité du matériau hydrogel PVA, et démontrent aussi la faible voire nulle adhésion cellulaire des L929 sur ce matériau.

#### 4.3 Catalyseur Fe/N-rGO

La figure 78a montre des cellules fibroblastes 3T3-L1 en présence de particules de catalyseur Fe/N-rGO, ceci après 7 jours d'incubation à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> et avec culture cellulaire obtenue après 7 jours d'incubation. Grâce à ce résultat il est possible d'affirmer que les cellules peuvent non seulement vivre en présence du catalyseur mais également se développer jusqu'à former un réseau, la présence du catalyseur n'empêche ainsi pas la prolifération des cellules, comme cela aurait été le cas pour un produit toxique.

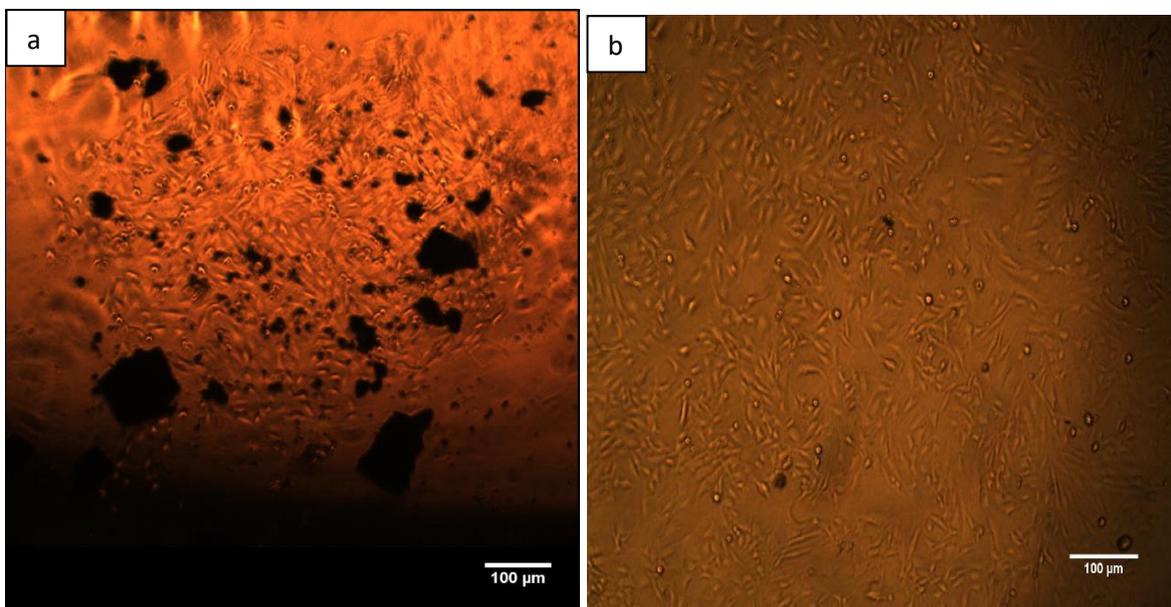


Figure 78: Cellules 3T3-L1 : a/ en présence de Fe/N-rGO b/contrôle ; 7 jours après incubation à : T=37°C ; 5%CO<sub>2</sub> ; DMEM

En comparant ce résultat avec celui du contrôle (figure 78b), on note une cinétique de croissance cellulaire inférieure, ce qui permet de conclure que la présence du catalyseur affecte le cycle de vie des cellules fibroblastes 3T3-L1. Comme démontré en amont, il est fort probable que le catalyseur Fe/N-rGO affecte le cycle de vie des cellules 3T3-L1, mais à ce stade d'expérimentation il est impossible de conclure sur une cytocompatibilité ou une cytotoxicité totale du catalyseur Fe/N-rGO face aux cellules fibroblastes 3T3-L1, pour cela des tests plus approfondis doivent être mis en place comme des tests MTT par exemple.

#### 4.4 Cathodes : Chitosan-Fe/N-rGO et PVA-Fe/NrGO

Après avoir effectué des tests de culture cellulaire sur les différents composants des cathodes, ce même test a été effectué sur des électrodes complètes. La figure 79a montre une électrode composée du catalyseur Fe/N-rGO et du liant chitosan et la figure 79b une électrode composée du même catalyseur et du liant PVA. Dans chaque cas, 100 000 cellules ont été ajoutées. Après 6 jours d'incubation à 37°C et 5%CO<sub>2</sub>, un tapis cellulaire est observable.

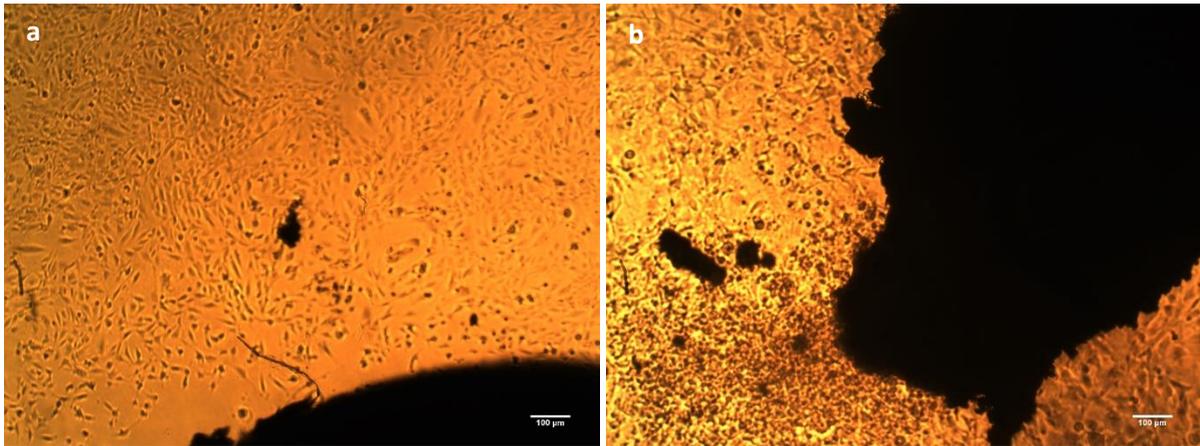


Figure 79: Cellules 3T3-L1 en présence d'une électrode compressée de : a/ Fe/N-rGO et chitosan et b/ Fe/N-rGO et PVA ; après incubation à : t=72 heures T=37°C ; 5% CO<sub>2</sub> ; DMEM

Les figures 79a et 79b présentent des cellules pour lesquelles les conditions environnementales permettent aux membranes plasmiques de s'ancrer sur le fond de la plaque de culture et en configuration fusiforme démontrant un comportement typique des fibroblastes et soulignant des conditions propices à leur prolifération.

Afin de compléter ce résultat d'autres tests doivent être envisagés tels que des tests de MTT afin de mesurer la viabilité des cellules.

## 5 Etude *in vivo*

Une procédure de demande au comité d'éthique a été effectuée afin d'effectuer des implantations de notre dispositif chez l'animal. Les objectifs d'études *in vivo* sont légitimes par rapport à une réponse cellulaire, du fait qu'une réponse d'un organisme est plus complète. Le choix de l'animal s'est porté sur le rat, qui est un eucaryote supérieur vertébré dont la physiologie est proche de celle de l'homme. Le rat est un modèle de choix dont les processus biologiques et physiologiques d'acceptation d'un implant sont proches de ceux de l'homme. De plus, le choix de l'espèce pour l'implantation favorise toujours l'espèce la moins avancée dans le processus de l'évolution, c'est pour cela qu'une implantation chez le cochon ou le singe n'est pas envisageable à ce stade. Ce choix d'animal permet d'atteindre un nombre important de rongeur implantés, permettant d'obtenir des données statistiques et des résultats reproductibles.

### 5.1 Choix du lieu d'implantation

Du fait de la taille importante de l'implant, les implantations ont été effectuées chez le rat en intra-abdominal, de plus, il s'agit d'un compartiment où les fluides extracellulaires sont très présents et où les mouvements des viscères peuvent permettre une diffusion facilitée du glucose et de l'oxygène. Ce choix se justifie également grâce aux travaux de Alcaraz *et al.* [19] qui ont démontré l'intérêt d'une implantation dans la cavité abdominale concernant la biodisponibilité du glucose. Lors de leurs travaux, les auteurs ont injecté une solution saline dépourvue de glucose en intrapéritonéal par l'intermédiaire d'un cathéter chez un rat anesthésié sous isoflurane, puis ils ont effectué une laparotomie en maintenant les bords de la plaie soulevés pour éviter la présence de sang dans la cavité abdominale. Alcaraz *et al.* [19] ont ensuite installé un glucomètre directement dans la cavité abdominale pour doser la quantité de glucose intra-abdominal. De cette manière ils ont pu observer que le glucose diffuse librement du sang jusqu'au compartiment de la cavité abdominale et que l'équilibre est atteint en 30 minutes.

Le compartiment intra-abdominal chez le rat nous a donc semblé être le lieu le plus approprié pour effectuer nos implantations.

## 5.2 Implantation de Biocathodes compressées et lyophilisées autoportées

### 5.2.1 Design des électrodes

Deux biocathodes ont été fabriquées par compression composées de chitosan et comme catalyseur Fe/N-rGO, ainsi que deux biocathodes lyophilisées autoportées. Comme lors du procédé décrit dans le deuxième chapitre, un contact électrique a été ajouté à l'aide de pâte de carbone ainsi qu'une protection à l'aide de silicone. Une fois l'électrode fabriquée, des premières caractérisations électrochimiques ont été effectuées, notamment une chronoampérométrie à 100 mV vs ECS.

Comme évoqué en amont, les électrodes ont été encapsulées avec une membrane séparatrice d'hydrogel de PVA, permettant à la fois de jouer le rôle de protection des électrodes fabriquées et diminuant la réponse inflammatoire. La littérature renseigne sur l'existence d'un grand nombre de membranes séparatrices/protectrices. Il existe différents types de matériaux synthétiques permettant de fabriquer des prothèses jouant le rôle de séparateur et dont la fabrication est facilement contrôlable : le polypropylène, le polyuréthane (PU), le polytétrafluoroéthylène expansé (e-PTFE) et le polyéthylène téréphtalate (PET) commercialisé sous le nom de Dacron® [163]–[166]. Ces membranes ont été optimisées par des dépôts de protéines visant à limiter l'adhésion cellulaire, mais les recherches actuelles s'orientent surtout vers l'utilisation de biomatériaux biodégradables de type polycaprolactone, acide poly(lactique-co-glycolique), fibroïne de soie... et l'utilisation de nouvelles techniques de fabrication, notamment le dépôt de fibres par electrospinning ou electrospraying pour créer des architectures 3D mimant la matrice extracellulaire.

Comme décrits en amont, les travaux de Penven *et al.* mettent en avant l'utilisation de PVA sous forme d'hydrogel en tant que membrane [167]. Cette forme de PVA apparaît comme une solution très prometteuse afin de jouer le rôle de membrane séparatrice. En plus de posséder des pores élevés et nombreux, l'hydrogel de PVA limite l'adhésion cellulaire à sa surface, le PVA est de plus biodégradable et inerte une fois implanté, en d'autres termes, il ne semble pas engendrer de réactions du corps non souhaitées [168]. C'est pour ces nombreuses raisons qu'une membrane d'hydrogel de PVA est ajoutée sur les électrodes (figures 80a-d).

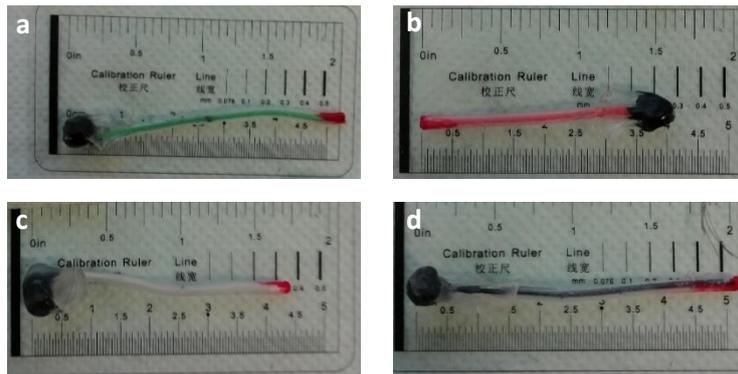


Figure 80: a-b Electrodes compressées de Fe/N-rGO et chitosan (électrode a et b), électrodes enrobées de PVA avec contact électrique  
c-d Electrodes lyophilisées de Fe/N-rGO et chitosan (électrode c et d), électrodes enrobées de PVA avec contact électrique

### 5.2.2 Stérilisation

L'étape de stérilisation d'un implant est primordiale car elle permet d'éviter une infection pouvant donner lieu à des complications telle qu'une éventration, ou bien une septicémie. Il existe différents procédés de stérilisation, par action chimique ou bien physique d'un dispositif. Parmi les méthodes les plus courantes, l'utilisation de l'autoclave est la plus populaire. Toutefois, l'utilisation d'une membrane hydrogel de PVA n'autorise pas cette option, car les propriétés de cette membrane seront affectées par la pression et la température (figures 81).

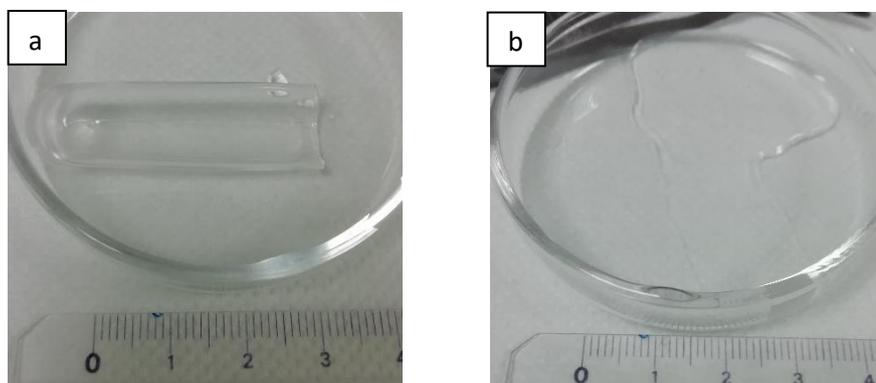


Figure 81: Photos de membrane d'hydrogel de PVA avant (a) et après (b) stérilisation à l'étuve

Il subsiste ainsi deux types de stérilisation à froid, l'une utilisant le peroxyde d'hydrogène sous vide, la seconde, par ionisation à l'aide de faisceaux d'électrons ou rayons gamma. La stérilisation au peroxyde d'hydrogène est un procédé couramment utilisé dans les hôpitaux pour les dispositifs médicaux implantables. Toutefois, ce procédé n'est pas adapté aux électrodes fabriquées, l'utilisation d'un oxydant fort aurait des conséquences sur la membrane de PVA ainsi que sur le liant employé.

Dans leurs travaux, Penven *et al.* [144] ainsi que Alcaraz *et al.* [19], ont étudié l'impact des rayons gamma sur les différents composants de leurs biopiles enzymatiques ainsi que sur des spores de *Geobacillus stearothermophilus*. Ils définissent, grâce à leurs travaux, une dose idéale de radiation au cobalt ( $\text{Co}^{60}$ ) de 12 kGy qui permet de neutraliser les spores. Les auteurs justifient également ce choix de stérilisation par un faible impact de la radiation du cobalt sur l'activité enzymatique. Dans le cas des catalyseurs abiotique Fe/N-rGO, cette stérilisation ne devrait pas, ou très peu, impacter la structure ni l'activité du catalyseur.

Les électrodes ont donc été stérilisées au rayonnement gamma à l'aide d'une source de cobalt  $^{60}\text{Co}$ .

### 5.2.3 Implantation

Les électrodes compressées ont été implantées dans un rat et celles lyophilisées dans un autre rat sur une période de 1 mois. Les rats ont été anesthésiés à l'aide d'isoflurane, l'opérateur a ensuite effectué une laparotomie latérale sur la ligne blanche, puis, les électrodes ont été insérées. Après implantation, le chirurgien a effectué un surjet musculaire en points cintrés de bas en haut et une suture cutanée point à point. Ces implantations ont été effectuées afin de répondre à deux questions principales : 1/ Quel impact notre électrode peut-elle avoir sur l'organisme et le comportement d'un rat ? 2/ Est-ce que l'implantation inhibe le catalyseur Fe/N-rGO et est-ce que celui-ci catalyse toujours l'ORR après implantation ?

Le suivi des paramètres physiologiques s'est limité à la mesure de la masse corporelle et de l'alimentation, l'observation des fèces et du comportement général de l'animal. L'implantation d'électrodes ou de biopiles chez l'animal ne doit pas générer de douleur. La réussite des implantations tient en partie au fait que les animaux sont en bonne santé physique et psychologique, de préférence peu agressifs. Les réponses biologiques au stress incluent la réponse du système immunitaire, et il est primordial pour nos expériences de favoriser une bonne cicatrisation ainsi qu'un état de bien-être évitant des pathologies opportunistes. En pratique, l'enrichissement du milieu couvre de nombreuses initiatives techniques ingénieuses et imaginatives pour occuper les animaux captifs. Différentes actions ont permis de diminuer le stress chez le rat.

-Un programme d'enrichissement du milieu a été mis en place, avec l'introduction d'un tunnel cartonné de 80 mm de diamètre et d'une quinzaine de cm de long avec lequel le rat joue. Un jeu en copeaux de bois est aussi introduit dans la cage et permet à l'animal de se cacher, ce qui a un effet apaisant pour lui. L'amélioration des conditions d'hébergement a permis de diminuer le stress et a favorisé la récupération post- opératoire.

-Au niveau de la gestion de la douleur, un anti-inflammatoire non stéroïdien (Rimadyl) a été prescrit et systématiquement injecté pendant les premiers jours suivant l'implantation puis de façon moins systématique en fonction du comportement de l'animal. Les signes de douleur ont été cherchés dans les comportements classiques comme la prostration, le dos voussé, le poil hérissé, mais aussi en utilisant l'échelle du « grimace facing » (plissement des yeux, nez et joues moins bombées, oreilles repliées, moustaches rassemblées vers l'arrière du museau).

L'observation des paramètres physiologiques et comportementaux des animaux a montré l'innocuité des implantations pratiquées :

-Aucune manifestation de douleur n'a été observée.

-Les rats implantés avaient un comportement d'exploration et de toilettage normal.

-La cicatrice laissée par la laparotomie était rapidement résorbée après quelques jours.

-La pesée bi-hebdomadaire des rats a montré que leur poids augmentait de façon régulière avec cependant une légère inflexion due à l'opération chirurgicale pendant les 2 ou 3 premiers jours.

#### 5.2.4 Euthanasie

Après 1 mois d'implantation, le chirurgien a procédé à l'euthanasie des rats à l'aide d'injection de pentobarbital. Une fois les animaux euthanasiés l'autopsie a pu être effectuée (figure 82a et 82b).

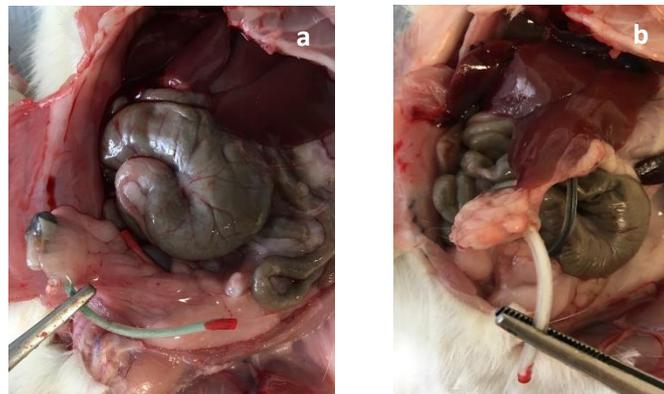
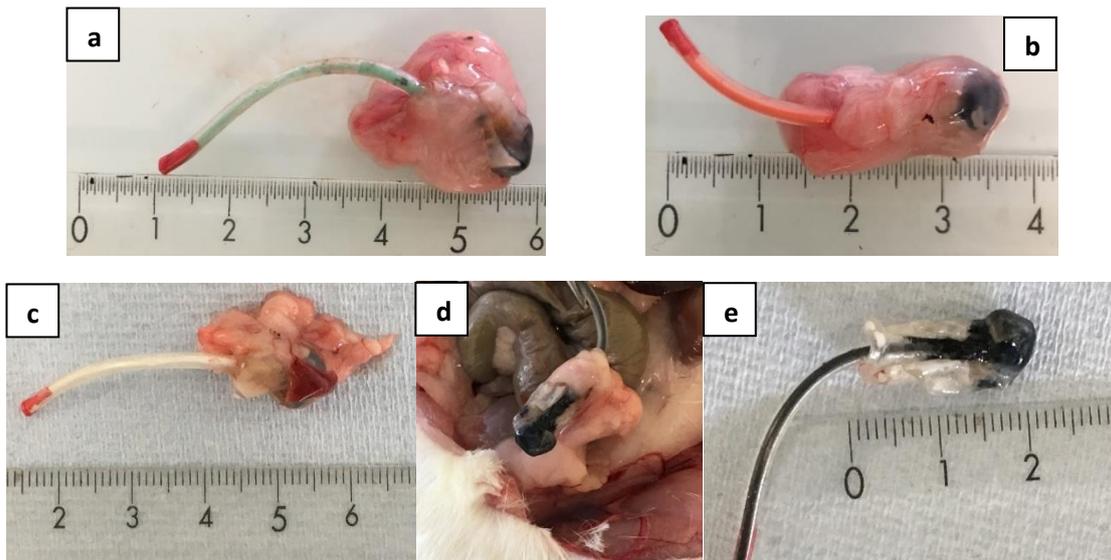


Figure 82: a/ Rat comportant les électrodes compressées b/ rat comportant les électrodes lyophilisées

Les cicatrices au niveau du derme et de l'épiderme n'étaient plus visibles et les points cutanés s'étaient résorbés, seuls les points musculaires de la laparotomie subsistaient. Les organes de chacun des rats étaient sains, aucune anomalie n'a été constatée au niveau du foie, des reins, du cœur et des poumons. On constate la présence de tissus biologiques autour de trois des échantillons implantés (figures 83a, 83b et 83c), alors que le quatrième échantillon (figures 83d et 83e) n'a pas fait l'objet de recouvrement de tissus, ce qui s'explique par la propriété d'anti-bioencrassement qu'offre le PVA.



*Figure 83: a/ biocathode a compressée de Fe/N-rGO-chitosan après 1 mois d'implantation  
 b/ biocathode b compressée de Fe/N-rGO-chitosan après 1 mois d'implantation  
 c/ biocathode c lyophilisée de Fe/N-rGO-chitosan après 1 mois d'implantation  
 d/ et e/ biocathode d lyophilisée de Fe/N-rGO-chitosan après 1 mois d'implantation*

Les tissus qui comportaient les cathodes compressées (figures 83a et 83b) n'ont montré aucune adhérence à l'électrode lors de leurs retraits. Le tissu adipofibreux entourant la cathode était adhérent aux organes par un bourrelet de graisse mésentérique. Il fut de même pour la cathode lyophilisée enrobée de tissu adipofibreux (figure 83c), avec toutefois des adhérences hépatiques.

Afin de compléter l'étude de biocompatibilité, les tissus présents autour de l'électrode ont ensuite fait l'objet d'une caractérisation histologique alors que l'électrode a été caractérisée par une chronoampérométrie à 100 mv vs ECS.

### 5.3 Etude histologique

#### 5.3.1 Electrode de Fe/N-rGO et chitosan compressée a (Fils vert)

Les figures 84a et 84b nous montrent une coupe des tissus au contact de l'implant, nous observons qu'une densité de fibroblastes au contact de l'implant ainsi que quelques globules rouges, informant d'une zone inflammatoire d'une épaisseur de 40 à 50  $\mu\text{m}$  (double flèche verte), cependant, lorsque l'on s'éloigne de la zone d'implantation, on note un réseau composé de graisse mésantérique.

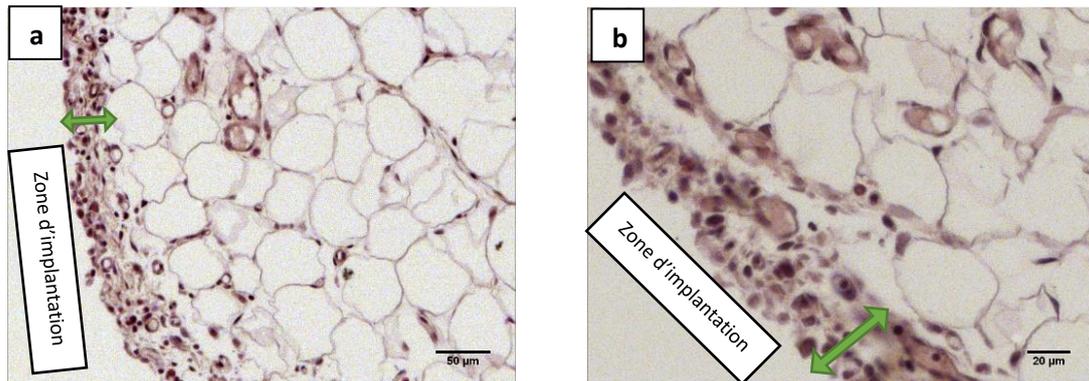


Figure 84: a et b: analyse microscopique des tissus enrobant la biocathode compressée a

La figure 84b souligne la démarcation de la zone inflammatoire (double flèche verte) au contact de l'implant, cette zone reste malgré tout de faible épaisseur (de l'ordre de 20  $\mu\text{m}$ ) et constituée de cellules inflammatoires ainsi que de macrophage. Cette figure renseigne également sur un réseau faiblement constitué de fibrine et collagène, d'autre part, on note la présence de vaisseaux sanguins.

### 5.3.2 Electrode de Fe/N-rGO et chitosan Compressée b (Fils orange)

Les figures 85a et 85b montrent une coupe effectuée au microtome du tissu en contact avec l'implant composé de l'électrode de Fe/N-rGO et chitosan compressée b et enrobée d'hydrogel de PVA. On note sur la partie droite en contact avec l'implant une densité de cellules inflammatoires, de fibroblastes et de macrophages imposants et d'une épaisseur allant de 20 à 40  $\mu\text{m}$ . Au-delà de cette zone inflammatoire nous observons un réseau typique de tissus adipeux, dans notre cas, composé de graisse mésentérique.

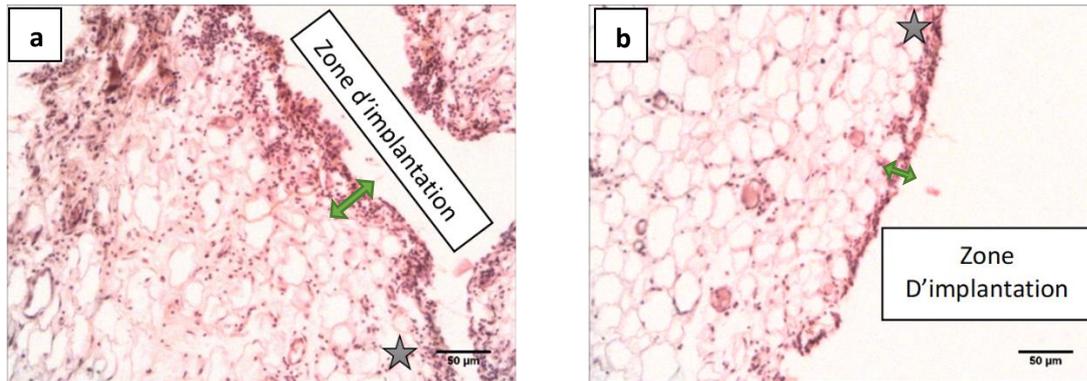


Figure 85: a/ et b/ Analyse des tissus enrobant la biocathode compressée b

La figure 85b est le prolongement du tissu observé dans la figure 85a, les deux étoiles désignant la jonction du tissu, on observe une zone inflammatoire (double flèche verte) plus réduite que celle observée sur la figure 85a, également, on peut noter une forte vascularisation du tissu en observant des vaisseaux sanguins à une dizaine de micromètres de la zone où se trouvait l'implant. Cette vascularisation est de bon augure, car les vaisseaux sanguins sont des canaux où les flux sont riches en oxygène et en glucose, traduisant donc une meilleure diffusion de ces espèces chimiques au plus proche de notre implant.

### 5.3.3 Electrode de Fe/N-rGO et chitosan lyophilisée c (Fils blanc)

La figure 86a montre une coupe des tissus qui furent en contact direct avec la membrane de PVA et au-delà, l'électrode compressée a. On note un tissu vascularisé, avec la présence de quatre vaisseaux sanguins à une distance de 100 – 200  $\mu\text{m}$  de l'implant sous forme d'artériole et veines (flèches noires), indiquant un milieu riche en glucose et oxygène. On note également la présence d'une couche de fibrine peu structurée et lâche en adéquation avec une densité relativement modeste des cellules inflammatoires.

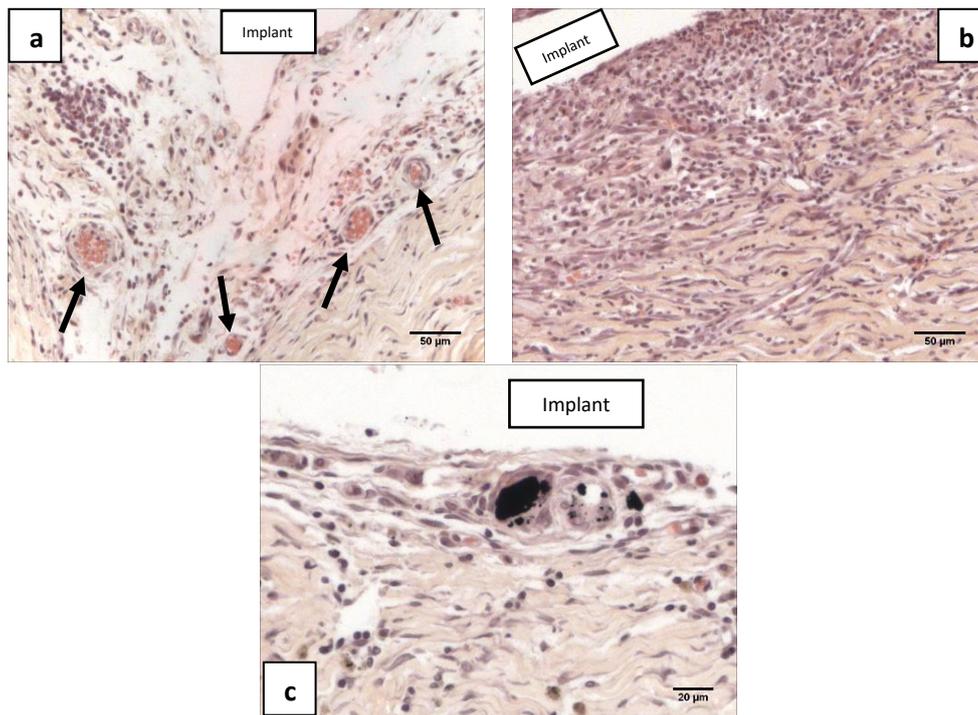


Figure 86: a/b/c/ analyse microscopique des tissus entourant la biocathode lyophilisée c

La figure 86b, qui résume convenablement l'observation effectuée sur l'échantillon, montre une zone très inflammatoire près de l'implant du fait de la présence de nombreuses fibroblastes et macrophages. Toutefois, lorsque l'on s'éloigne de la zone d'implant, on note une diminution des fibroblastes et des cellules inflammatoires et une augmentation du collagène et de la fibrine, montrant un processus de cicatrisation ou encore, d'encapsulation du dispositif.

La figure 86c montre un débris de l'électrode au contact avec des cellules inflammatoires. La présence de ce matériau résulte probablement d'un enrobage de PVA défectueux ou d'une rupture microscopique de la membrane d'hydrogel de PVA. On note cependant que les débris sont inclus et entourés de fibroblastes. La figure 86c nous montre un réseau de fibrine et collagène à proximité des débris de l'électrode, ce qui montre un début d'encapsulation.

#### 5.4 Mesures électrochimiques après implantation

L'une des interrogations majeures de ce projet de thèse était de savoir si l'environnement et les conditions impliquées par l'*in vivo* désactiveraient ou non le catalyseur Fe/N-rGO. Pour cela, les performances électrochimiques de quatre biocathodes ont été analysées avant et après implantation. La figure 87 montrent quatre chronoampérométries effectuées avec les biocathodes à 100 mV vs ECS après leur implantation.

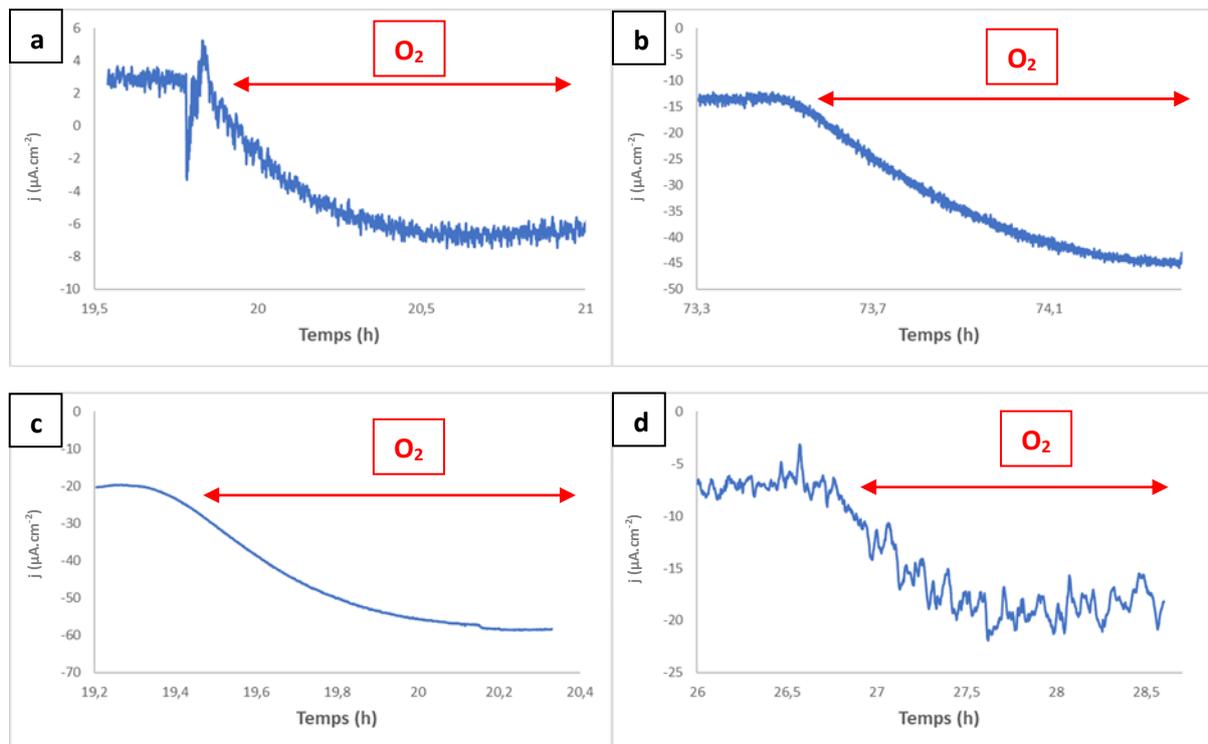


Figure 87: Mesures de chronoampérométrie après implantation effectuées à 100 mV vs ECS en solution saline de PBS en condition physiologique sous air puis ajout de  $\text{O}_2$ . Dans l'ordre : a/ biocathode compressée a ; b/ biocathode compressée b ; c/ biocathode lyophilisée c et d/ biocathode lyophilisée d

Pour les quatre biocathodes, la saturation en oxygène induit une augmentation du courant ce qui démontre que les biocathodes restent électro actives et sont capables de catalyser la réduction de l'oxygène. Les biocathodes compressées délivrent des courants, sous oxygène, entre 6 et  $45 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  et celles lyophilisées entre 20 et  $60 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Il est difficile de conclure, avec ce nombre d'échantillons et cette dispersion des valeurs de courants catalytiques, laquelle des deux biocathodes : compressée ou lyophilisée, est la plus stable.

Cependant, si l'on compare les densités de courant obtenues avant et après implantation ( $175 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour la cathode compressée avec liant chitosan,  $230 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour cathode lyophilisée), une chute des courants catalytiques d'un facteur allant de quatre à vingt après un mois d'implantation est observé. Cette diminution est due à un cumule de différent phénomène. Une des premières causes est due à d'une désactivation de sites catalytiques ou bien, une diminution de la surface électro active

de la biocathode due à des phénomènes de dégradation des biocathodes durant la période d'implantation. Cette hypothèse semble la plus probable du fait que les courants capacitifs mesurés après implantation diminuent d'un facteur d'environ trois, comparés aux courants capacitifs mesurés avant implantation (figures 88).

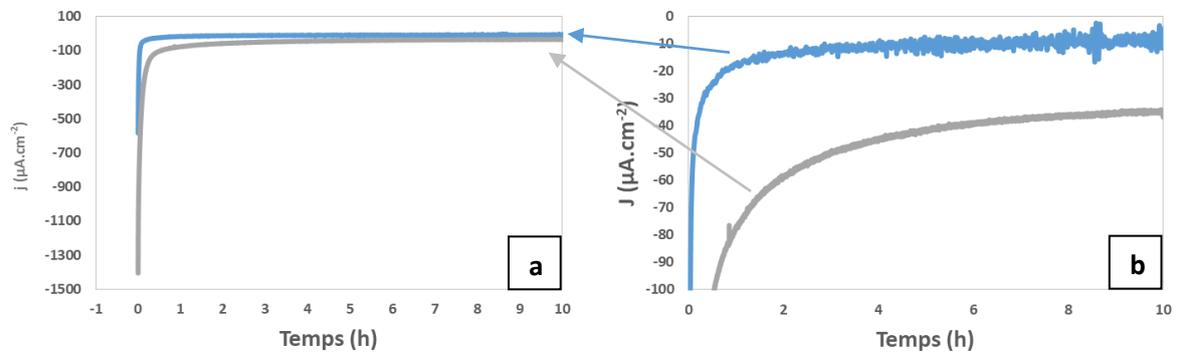


Figure 88: a/ Mesures de chronoampérométrie avant (gris) et après (bleu) implantation effectuées à 100 mV vs ECS en solution saline de PBS en condition physiologique de la biocathode lyophilisée C ; b/ détails du chronoampérogramme a/

En effet, le courant capacitif dépend principalement de la surface électro active de la bio cathode. Le catalyseur Fe/N-rGO est relativement peu impacté par les conditions *in vivo*, contrairement aux autres catalyseurs abiotiques testés *in vivo* tel que le platine qui souffre des risques d'empoisonnement. Ce résultat montre le potentiel prometteur de ce catalyseur pour l'application biopile implantable.

D'autre part, lors de l'application de la membrane d'hydrogel de PVA sur la surface de la biocathode, on observe une perte de l'électrode. En effet, la membrane d'hydrogel de PVA adsorbe une partie de l'électrode. Des mesures en chronoampérométrie sur diverses électrodes ont été effectuées avant et après ajout de la membrane afin de mesurer l'impact de ce phénomène. Une perte moyenne des performances électrochimiques allant de 20 à 71% a été observé après ajout de la membrane de PVA autour des cathodes Cette perte de performance peut être anticipée en ajoutant un séparateur en silicone poreux permettant d'éviter tout contact entre l'hydrogel de PVA et la biocathode. Suite à ces résultats, il est clair que la géométrie, la tenue mécanique ainsi que la stabilité chimique dans les conditions *in vivo* jouent un rôle majeur dans l'évolution des performances électrochimiques de la biocathode après implantation.

## 6 Conclusion

Au cours de ce chapitre, les résultats obtenus sont en accords avec la littérature et confirment la cytocompatibilité du chitosan et de l'hydrogel de PVA [144], [157]. Nous avons montré pour la première fois que le catalyseur Fe/N-rGO sous forme de particules et nanoparticules, ne présente pas de toxicité aiguë, ce qui est en concordance avec les résultats obtenus par Srikanth *et al.* [158] ainsi que par Wojtoniszaka *et al.* [159] sur le graphène. Cependant, nous avons observé que la présence du catalyseur Fe/N-rGO affecte la cinétique de croissance cellulaire, chose qui aura besoin d'études plus approfondies. Pour cela et pour les études *in vivo*, il a été décidé que le catalyseur présent dans les biocathodes implantées ne devra pas être en contact direct avec l'organisme vivant.

De manière plus générale, aucun des constituants susceptibles de composer la biocathode ne semble être cytotoxique. Bien que ces études soient préliminaires et demandent à être complétées par d'autres tests, notamment étudier les effets qui peuvent apparaître à long terme, ces résultats restent un bon indicateur et ont permis d'aller vers les études *in vivo*.

L'implantation des biocathodes dans les rats, qu'elles soient compressées ou bien lyophilisées, n'ont pas impacté le comportement de leurs hôtes. En effet, après un mois d'implantation les rats avaient une activité normale, une consommation régulière de nourriture et une prise de poids commune et ne montraient aucun signe de souffrance. Les euthanasies n'ont révélé aucune anomalie au niveau du foie, des reins, des poumons et du cœur. Après explantation, trois des quatre échantillons étaient entourés d'un tissu cellulaire d'épaisseur fine, de plus, une très faible adhésion a été observée du tissu sur la surface des biocathodes. Ceci indique des réactions inflammatoires, post-opération, peu intenses très certainement dues à la présence de la membrane de PVA dont la surface possède d'excellentes propriétés d'anti encrassements, ceci en accord avec les travaux de Peven *et al.* [144]. L'histologie effectuée sur les trois tissus obtenus, montre une réaction inflammatoire dans chacune des situations, ainsi que la présence de tissus adipeux pour les deux premiers implants. Il a également été observé une forte vascularisation proche de la zone d'implantation offrant ainsi des concentrations en oxygène et en glucose propices au bon fonctionnement de notre électrode une fois combinée en biopile. On note également la présence d'une matrice de fibrine et de collagène relativement dense et lâche pour le dernier implant.

En outre, les performances électrochimiques *ex vivo* montrent que les biocathodes restent électro actives après un mois d'implantation. Une baisse des performances électrochimiques de 80% a été observée. Cette baisse est largement due à la présence de la membrane de PVA qui a tendance à désorber une partie du catalyseur de la cathode. Toutefois, cet effet pourrait être évité en ajoutant un séparateur empêchant le contact entre l'électrode et la membrane de PVA. (*e.g.* silicone poreux).

## Chapitre 4 : Utilisation de la biocathode en biopile

## 1 Introduction

Le but de ce chapitre est de développer une biopile à partir de cathodes constituées de Fe/N-rGO et capables d'alimenter un DMIa tel que le pacemaker, soit de fournir 30  $\mu\text{W}$  [20] et ceci *in vivo*. La littérature nous informe sur les différents travaux qui ont approché cet objectif avec notamment les travaux de Holade *et al.* [65], développés dans le chapitre 1, ont démontré une biopile abiotique capable de fournir 105  $\mu\text{W}$  avec une d.d.p. de 350 mV et une densité de courant de 0,65  $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Toutefois ces travaux sont en condition *in vitro* (5,4 mM de glucose) et ne tiennent donc pas compte de la dimension biologique. Southcott *et al.* [169] ont fabriqué une biopile dont les enzymes, la laccase et la quinoprotéine glucose déshydrogénase, étaient immobilisées sur du buckypaper. La biopile, parcourue par un flux constant de sérum humain mimant la circulation sanguine (6,4 mM en glucose), a généré une densité de courant de 0,83  $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ , une ddp de 470 mV et une puissance générée de 77  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Cette puissance fut suffisante pour alimenter un pacemaker sur une période de cinq heures. Un autre exemple de la littérature sont les travaux de Zebda *et al.* [170], les auteurs ont fabriqué et implanté une biopile enzymatique de glucose oxidase et laccase capable de fournir 570 mV et 193,5  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  sur une période de 110 jours.

Après avoir démontré la biocompatibilité des graphène dopés et leur sélectivité face au glucose, ce chapitre sera consacré à leur utilisation pour réaliser une pile complète. Pour cela les cathodes abiotiques précédemment mises au point seront associées à des anodes. Deux types d'anodes ont été employés : abiotiques ou enzymatiques. Les premières ont été développées par le laboratoire IC2MP de l'université de Poitiers et sont à base de nanoparticules métalliques (or, platine et alliages) supportées sur du graphène [171]. La cytocompatibilité de ces composés a été étudiée dans un premier temps avant de mettre en forme ces catalyseurs dans des anodes et de les tester électrochimiquement *in vitro*. La même approche a été suivie avec les anodes enzymatiques, deux enzymes décrites dans la littérature et déjà étudiées au laboratoire ont été mises en œuvre : la glucose oxydase (GOx) et la glucose déshydrogénase (GDH).

Des implantations de ces différentes piles (abiotiques ou hybrides) ont été réalisées dans des rats en intra-abdominal pour évaluer les effets sur les performances électrochimiques et la réaction de l'organisme face à ces composés. Les performances et stabilities des biopiles fabriquées seront finalement comparées à celle de la littérature.

## 2 Fabrication et caractérisation de bioanodes enzymatiques et abiotiques

Les catalyseurs d'oxydation du glucose, enzymatiques ou abiotiques doivent répondre aux mêmes exigences que les catalyseurs de réduction de l'oxygène : sélectivité, stabilité, biocompatibilité. Dans le cas des systèmes enzymatiques la stabilité concerne également la résistance des enzymes à la dénaturation lors des processus de mise en forme de l'anode.

### 2.1 Anodes Abiotiques

Dans le cadre du projet ANR « IMABiC », le laboratoire IC2MP a développé plusieurs types de catalyseurs abiotiques en utilisant la méthode BAE (Bromide Anion Exchange). Cette méthode permet la synthèse de nanoparticules de platine (Pt), d'or (Au) ou d'or/platine (Au/Pt) ancré à la surface de différents supports carbonés (vulcan ou rGO). La taille de ces particules varie de 2 à 15 nm pour les particules d'or et des tailles inférieures à 5 nm pour les particules de platine. Les supports carbonés mis en œuvre sont le Vulcan, l'oxyde de graphène (GO) et l'oxyde de graphène réduit (r-GO). Dans tous les cas ce dernier support (r-GO), s'est révélé le plus performant. De plus il s'agit du même r-GO utilisé comme point de départ pour la synthèse des catalyseurs de réduction de l'oxygène. Les catalyseurs à base de nanoparticules de platine pur sur r-GO ainsi que les deux formulations mixtes avec un mélange de 50% d'or et 50% de platine ( $Au_{50}Pt_{50}/rGO$ ) et 70% d'or et 30% de platine ( $Au_{70}Pt_{30}/rGO$ ) se sont révélés les plus efficaces.

Dans un premier temps, la cytotoxicité de ces catalyseurs a été étudiée sur une culture cellulaire de 3T3-L1, puis les performances et limites électrochimiques en conditions physiologiques de ces catalyseurs mis sous formes d'électrodes ont été évaluées.

#### 2.1.1 Culture cellulaire en présence de catalyseur abiotique

Une culture des cellules 3T3-L1 à 37°C, 5%  $CO_2$ , en milieu DMEM a été effectuée en présence de particules de catalyseur Pt-rGO,  $Au_{70}Pt_{30}/rGO$  et  $Au_{50}Pt_{50}/rGO$ . Les figures 89a et 89b montrent des cellules 3T3-L1 en présence des catalyseurs Pt-rGO et  $Au_{70}Pt_{30}/rGO$ . On note la présence de cellules fusiforme, soulignant l'adhérence des cellules en présence des particules et nanoparticules de catalyseurs à la plaque de culture. De plus, des cellules en phase de mitose sont observables (cercles verts), démontrant que les 3T3-L1 sont capables de proliférer en présence des catalyseurs Pt-rGO et  $Au_{70}Pt_{30}/rGO$ .

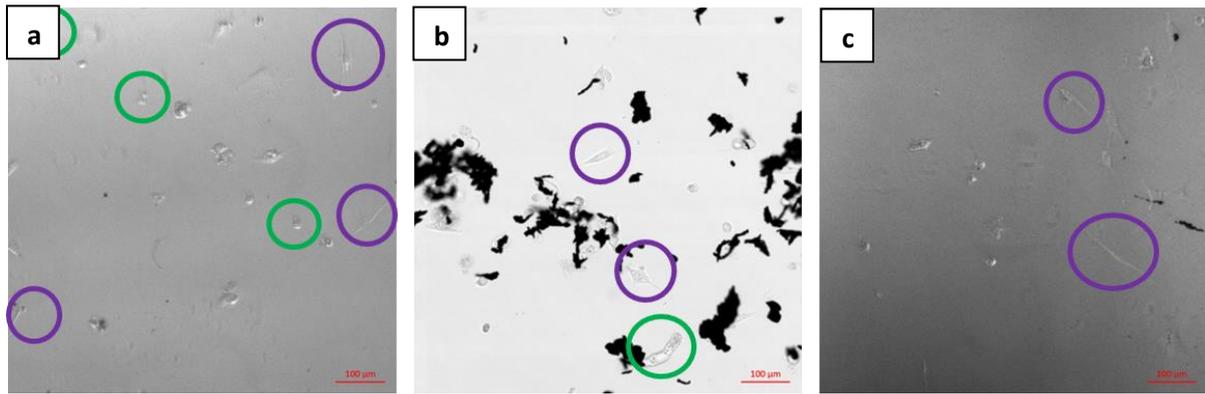


Figure 89: Cellules 3T3-L1 en présence de catalyseur a/ Pt-rGO, b/ Au<sub>70</sub>/Pt<sub>30</sub>-rGO, c/ Au<sub>50</sub>/Pt<sub>50</sub>-rGO, à 50 µg/mL, après 2 jours d'incubation à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, DMEM cercle vert cellules en mitose, cercle violet cellules fusiformes

Après 48 heures d'incubation à 37,5°C des cellules 3t3-L1 fusiforme en présence du catalyseur Au<sub>50</sub>/Pt<sub>50</sub>-rGO, on observe que la présence du catalyseur n'empêche pas l'adhésion cellulaire sur la plaque de culture. De plus, plusieurs cellules sont observées en contact avec des particules de catalyseur Au<sub>50</sub>/Pt<sub>50</sub>-rGO, confirmant ainsi, que le catalyseur ne présente pas de toxicité aiguë face au temps d'exposition.

Après 48h d'exposition, aucun des catalyseurs testés n'a montré de toxicité pouvant éliminer la totalité des cellules 3t3-L1. Les cultures cellulaires effectuées en présence des trois catalyseurs ont démontré des cellules fusiformes, forme spécifique aux cellules 3t3-L1 lorsqu'elles sont en culture et qu'elles cherchent à former un réseau cellulaire, ce qui démontre que ces conditions n'affectent pas le comportement des cellules 3t3-L1. Lors des tests mettant en jeu les catalyseurs Pt-rGO et Au<sub>70</sub>Pt<sub>30</sub>/rGO, il a été observé des cellules en phase de mitose, ce qui démontre que ces catalyseurs n'empêchent pas les cycles de reproduction des cellules 3t3-L1. Il serait pertinent d'implanter ces catalyseurs afin d'étudier sur une autre échelle, l'impact qu'ils pourraient avoir sur un organisme entier (e.g. rats).

### 2.1.2 Fabrication des anodes abiotiques

Les anodes caractérisées au cours de ce chapitre ont été fabriquées par compression, dans la mesure où ce procédé est le mieux maîtrisé et offre une résistance aux contraintes mécaniques satisfaisante. Chacune des anodes a été fabriquée en compressant 30 mg de catalyseur et sans ajout de liant, en revanche, les anodes furent encapsulées d'une membrane de chitosan. Cet ajout permet d'apporter un maintien de la structure de l'électrode. Toutefois, les membranes de chitosan ne permettent pas de limiter le bio-encrassement lors des implantations, il faudra donc ajouter une membrane de PVA si des implantations sont envisagées. Aucun liant n'a été ajouté car les premières anodes fabriquées à l'aide de liant chitosan ou PVA, se démantelaient sous l'effet du gonflement lors de l'immersion de l'électrode en solution. Une solution alternative a donc été mise au point par encapsulation, toutefois, la diffusion des espèces chimiques pourrait être impactée.

## 2.1.3 Performances électrochimiques d'anodes abiotiques

### 2.1.3.1 Après fabrication

En raison des forts courants capacitifs de ces électrodes (difficulté de réaliser des cyclovoltammogrammes) celles-ci ont été caractérisées par des expériences de CA. Ces dernières permettent l'observation des phénomènes faradiques une fois le régime stationnaire atteint. Lors de nos premiers tests électrochimiques, une sensibilité aux chlorures de l'ensemble de ces catalyseurs a été observée. Aussi, des mesures en présence de glucose et différentes concentrations en ions chlorure ont été effectuées, afin d'estimer les densités de courants qu'il serait possible d'atteindre en milieu physiologique.

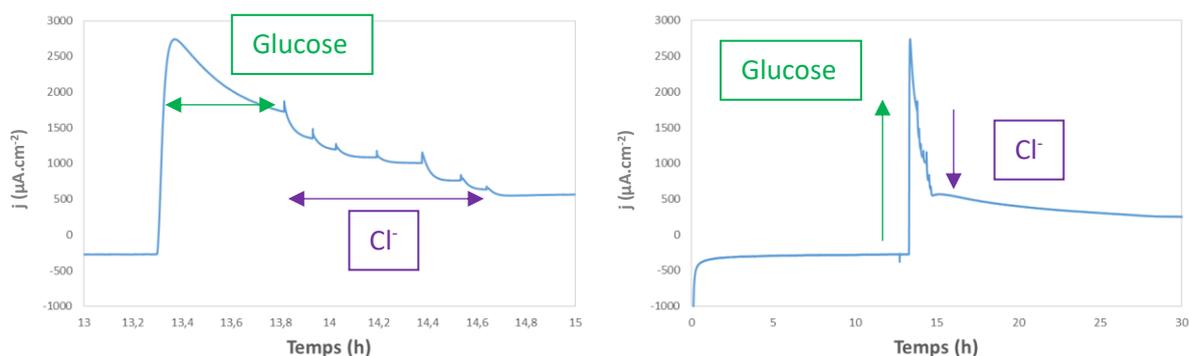


Figure 90: a/ Chronoampérométrie d'une anode composée de 30 mg  $\text{Au}_{70}\text{Pt}_{30}/\text{rGO}$  à 0V vs ECS sous air avec ajout de glucose (total de 5 mM) et de NaCl (total de 150 mM) b/ Vue d'ensemble du chronoampérogramme (a)

Les figures 90a et 90b représentent les courbes d'évolution de l'intensité en fonction du temps pour un potentiel de 0 V vs ECS (potentiel donné par le laboratoire IC2MP) enregistrées pour l'anode composée du catalyseur  $\text{Au}_{70}\text{Pt}_{30}/\text{rGO}$ . Après une première période sans réactifs, du glucose est ajouté (5 mM concentration finale), puis après 30 min de stabilisation, des ions chlorures sont ajoutés par incrément de 1 M pour atteindre une concentration représentative du milieu physiologique (150 mM). Une densité de courant initialement négative est obtenue, suivie d'une forte augmentation de la densité de courant après ajout de glucose :  $1763 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . L'addition de chlorure de sodium par fraction provoque une diminution importante, par paliers, de la densité de courant jusqu'à atteindre un état stationnaire à :  $255 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

Les mêmes études ont été effectuées sur les anodes comportant les catalyseurs Pt-rGO et Au<sub>50</sub>Pt<sub>50</sub>/rGO. Le tableau suivant résume les densités de courant des trois anodes fabriquées, les densités sont obtenues avant et après ajout de glucose et ions chlorures :

Anode	Initiale	Glucose 5mM	NaCl 150mM
Au <sub>50</sub> Pt <sub>50</sub> /rGO	-45 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	520 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	94 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$
Au <sub>70</sub> Pt <sub>30</sub> /rGO	-278 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	1763 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	255 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$
Pt-rGO	-280 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	2004 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	470 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$

Figure 91: Densités de courant des anodes compressées comportant les catalyseurs de Lemoine et al. 0 V vs ECS, contre électrode de platine

Les catalyseurs Pt-rGO et Au<sub>70</sub>/Pt<sub>30</sub>-rGO présentant de meilleures performances électrochimiques en présence de chlorure et étant non-cytotoxiques ils ont été choisis afin de réaliser des anodes qui seront implantées.

### 2.1.3.2 Après implantation

Comme décrit dans le chapitre 3 de ce manuscrit, les électrodes ont dans un premier temps été encapsulées dans une membrane d'hydrogel de PVA afin de limiter l'encrassement biologique et d'éviter un contact direct de l'anode avec l'organisme biologique. Les implants ont subi une stérilisation aux rayons gamma (12 kGy) et ont été implantés en intra abdominal chez le rat. Après implantation, les rats n'ont montré aucun signe de souffrance ou de mal être. Après 4 semaines d'implantation les rats ont été euthanasiés, l'autopsie n'a révélé aucun organe endommagé, le foie, le cœur, les poumons et les reins étaient tous sains.

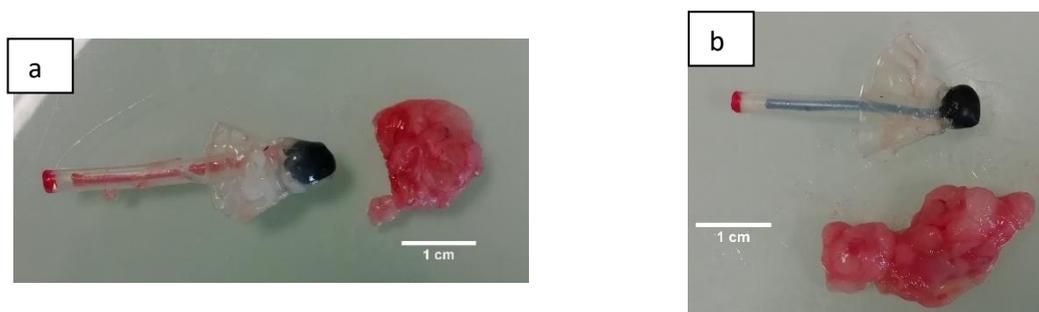


Figure 92 : a: Anode implantée et composée de 30 mg de Au<sub>70</sub>Pt<sub>30</sub>/rGO; b : Anode implantée et composée de 30 mg de Pt-rGO

Les figures 92a et 92b montrent les bioanodes constituées de Au<sub>70</sub>Pt<sub>30</sub>/rGO et Pt-rGO implantées, un tissu biologique s'est développé autour de chaque anode, toutefois, ce tissu n'a montré aucune adhérence sur la membrane de PVA, ce qui souligne le rôle anti-encrassement biologique de cette dernière. L'observation montre également la présence de vaisseaux sanguins, démontrant une vascularisation de ces tissus.

Les anodes ont ensuite été caractérisées par chronoampérométries, la figure 93 montre une chronoampérométrie obtenue à 0 V vs ECS pour l'anode composée du catalyseur Pt-rGO explantée.

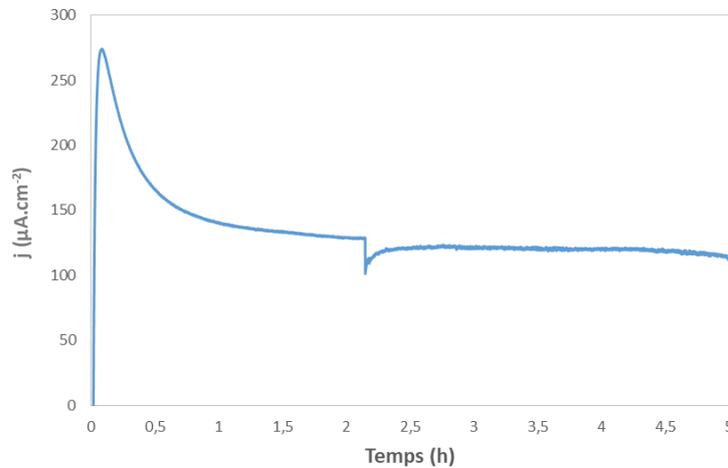


Figure 93: Chronoampérométrie d'une anode explantée et composée de 30 mg de Pt-rGO à 0 V vs ECS, en présence de 50 mM Glucose dans une solution saline de PBS

La courbe de chronoampérométrie montre une densité de courant proche de  $110 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  en présence de 50 mM de glucose (soit dix fois la concentration physiologique), de 150 mM d'ions chlorures et après 5 heures de stabilisation. En comparant les densités de courant avant ( $470 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) et après implantation, on note une très forte diminution des propriétés électrochimiques. Après ajout de la solution de chlorure à  $t = 2 \text{ h}$ , puis à  $t = 6,3 \text{ h}$ , la densité de courant chute et atteint  $10 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  soulignant une désactivation du catalyseur anodique par les ions chlorures.

La figure 94 montre une chronoampérométrie effectuée après implantation sur une anode de  $\text{Au}_{70}\text{Pt}_{30}/\text{rGO}$  à 0 V vs ECS sur une anode de  $\text{Au}_{70}\text{Pt}_{30}/\text{rGO}$ .

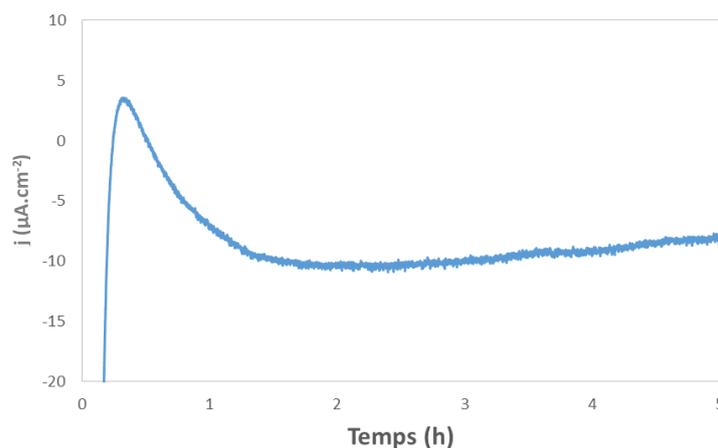


Figure 94: Chronoampérométrie d'une anode explantée et composée de 30 mg de  $\text{Au}_{70}\text{Pt}_{30}/\text{rGO}$  à 0 V vs ECS, en présence de 50 mM Glucose

La chronoampérométrie est effectuée en solution saline de PBS (150 mM de  $\text{Cl}^-$ ) et avec 50 mM de glucose. Une densité de courant de l'ordre de  $-7 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  est observée après 5 heures de stabilisation.

Bien qu'on note une légère augmentation de la courbe en fin de mesure, les performances électrochimiques sont très éloignées de celles obtenues avant implantation ( $255 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) et également très faible.

### 2.1.3.3 Conclusion sur les performances électrochimiques

Les tests de cytotoxicité et les observations réalisées après implantation sur les catalyseurs développés par Lemoine et *al.* [171], suggèrent aucun risque de toxicité pour l'organisme vivant. Les études électrochimiques montrent que ces catalyseurs abiotiques ont une excellente activité électrocatalytique pour l'oxydation du glucose et les densités de courants mesurées en chronoampérométrie à 0 V vs ECS, en présence de 5 mM de glucose, sont comprises entre 2000 et 500  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Cependant, les études effectuées en CA ont révélé la sensibilité des catalyseurs face aux ions chlorures. En effet, la présence des ions chlorures a tendance à diminuer l'activité électro catalytique de ces catalyseurs, ce qui se traduit par une forte diminution des courants d'oxydation du glucose. Ces diminutions peuvent être expliquées par un phénomène de complexation des ions chlorures en surface des nanoparticules d'or et de platine qui affectent grandement les densités de courants.

Après implantation, et comme dans le cas des biocathodes, les performances des bioanodes ont diminué considérablement, certainement due à des phénomènes de dégradation des bioanodes induits, entre autres, par la présence des ions chlorures. D'autre part, l'implantation n'affecte pas l'organisme biologique des rats qui n'ont démontré aucun signe de souffrance ou de gêne. En revanche, les implantations ont fortement impacté les densités de courants des anodes constituées des catalyseurs Pt-rGO et Au<sub>70</sub>/Pt<sub>30</sub>-rGO.

Suite à ces résultats et compte tenu du fait qu'en milieu physiologique la perte d'activité de ces anodes est trop importante, des anodes mettant en jeu des systèmes enzymatiques ont été choisies afin d'être combinées en biopile (Bfc) avec des cathodes composées de Fe/N-rGO

## 2.2 Anode Enzymatique

### 2.2.1 Choix des matériaux

Il existe plusieurs enzymes capables d'effectuer l'oxydation du glucose, les plus connues de la littérature sont la glucose oxydase (GOx), la glucose déshydrogénase (GDH), la cellobiose déshydrogénase (CDH), la pyranose déshydrogénase (PyDH), la pyranose oxydase (PyOx) ou encore la glucose déshydrogénase FAD-dépendante (FAD-GDH). Afin d'effectuer des tests en biopile, deux enzymes ont été sélectionnées pour développer deux types d'anode : la glucose oxydase ou la glucose déshydrogénase FAD-dépendante ou FAD-GDH

### 2.2.1.1 La Glucose oxydase (GOx)

La glucose oxydase est probablement la protéine la plus utilisée pour catalyser la réaction d'oxydation du glucose à l'anode des biopiles glucose-O<sub>2</sub>. L'une des principales raisons est qu'elle fut utilisée à grande échelle depuis les années 1950 [172], elle est notamment utilisée pour la fabrication des biocapteurs métaboliques [173]–[175].

La GOx, est une enzyme constituée de deux unités identiques ou homodimère, qui contiennent le cofacteur organique rédox: la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) (figure 95 d'après [176]).

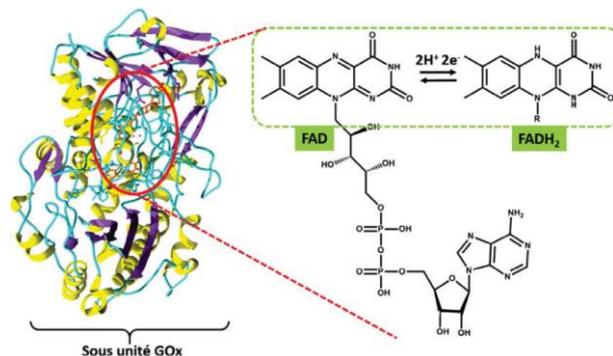


Figure 95: Représentation de l'enzyme GOx et son groupement rédox [175]

Grâce à ce cofacteur organique et à l'environnement protéique de ce dernier, la GOx réalise l'oxydation du glucose en gluconolactone par un processus à deux électrons, quant au gluconolactone produit, celui-ci est spontanément hydrolysé en acide gluconique. Après oxydation du glucose, la GOx se trouve alors sous forme réduite (FADH<sub>2</sub>), qui peut alors s'oxyder spontanément à l'aide d'un accepteur d'électron naturel : l'oxygène (figure 94 selon [177]).

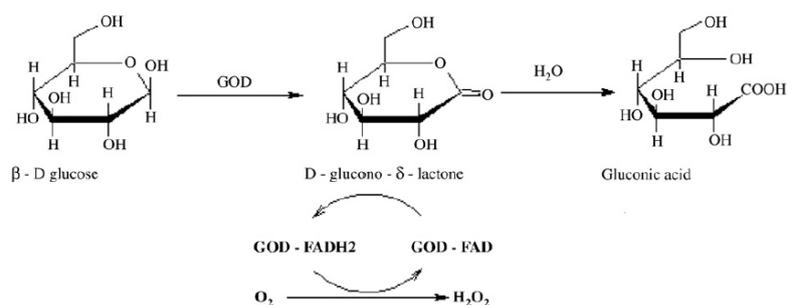


Figure 96: Mécanisme réactionnel d'oxydation du glucose par un groupement FAD selon [176]

Cette réaction a pour conséquence de limiter le transfert électronique entre la protéine et l'électrode, de plus, comme il est constaté sur le schéma de Wiit *et al.* [177] cette réaction met en jeu un processus à deux électrons, ce qui favorisera la production de peroxyde d'hydrogène. Cependant, cette réaction peut être limitée en employant une co-enzyme : la catalase, capable de dismuter le peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau.

### 2.2.1.2 La Glucose Déshydrogénase FAD dépendante (FAD-GDH)

Comme pour l'enzyme GOx, cette enzyme possède un site actif, la FAD, siège de l'oxydation du glucose, notons que cette enzyme est également susceptible d'oxyder d'autres sucres comme le D-xylose ou encore le 2-deoxy-D-glucose.

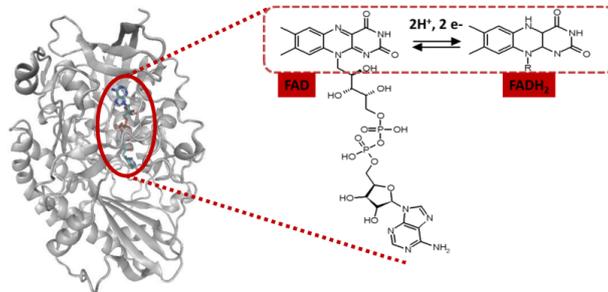


Figure 97: Représentation de la FAD-GDH et son groupement redox [177]

L'enzyme FAD-GDH (figure 97 [178]) présente l'avantage, de ne pas utiliser l'oxygène comme accepteur d'électrons [179], [180]. Cette propriété est un avantage considérable pour l'application en tant que biopile à glucose et oxygène, compte tenu du fait que d'une part l'oxygène est uniquement consommé à la cathode, et d'autre part qu'il n'y ait pas de production de peroxyde d'hydrogène. L'enzyme FAD-GDH fait l'objet de nombreuses recherches du fait de son utilisation dans les biocapteurs à glucose mais aussi en tant qu'anode pour les biopiles enzymatiques à glucose et oxygène [181]–[183].

### 2.2.1.3 Connexion de l'enzyme à l'électrode

Si l'utilisation des enzymes présente des avantages (sélectivité, cinétique élevée) la principale difficulté est de les ancrer de manière à pouvoir transférer les charges entre le site actif et la surface de l'électrode. Comme vu lors du premier chapitre de ce manuscrit, il existe différentes méthodes pour cela :

- Adsorption
- Réticulation
- Encapsulation
- Assemblage supramoléculaire
- Immobilisation par lien covalent

Chaque méthode de connexion possède des avantages et des inconvénients, l'adsorption permet d'éviter de dénaturer les enzymes et sauvegarde le mécanisme catalytique initial, toutefois, les enzymes adsorbées peuvent se désorber de l'électrode et ainsi partir en solution. La méthode par réticulation permet la formation d'agrégat d'enzymes à l'aide d'agent de couplage (ou de réticulation). L'agent de réticulation possède généralement deux fonctions identiques qui lui permet, via une

réaction intermoléculaire, de coupler des protéines à ses deux extrémités [184], [185]. Cette méthode offre des électrodes plus stables dans le temps que l'adsorption et reste simple à mettre en œuvre, toutefois après réticulation les enzymes peuvent se dénaturer et être inactives. La méthode d'encapsulation consiste à « piéger » l'enzyme à l'aide d'un réseau tridimensionnel, bien souvent un polymère. Celui-ci peut être d'origine naturelle comme le chitosan [186] ou bien synthétique, comme le nafion [187]. L'encapsulation peut aussi se faire via une électropolymérisation de monomères électroactifs, l'enzyme est alors piégée en surface de l'électrode une fois le polymère obtenu (*e.g.* polyméthylène vert...) [188]. L'encapsulation présente l'avantage d'éviter la désorption et le relargage de l'enzyme en solution, en revanche, cette méthode limite la diffusion des espèces chimiques et peut diminuer les performances de l'électrode. La méthode d'assemblage de molécules repose sur un principe d'interactions moléculaires. Des modifications peuvent être effectuées en surface de l'électrode ou bien sur l'enzyme permettant des interactions favorisant l'adsorption à la désorption de l'enzyme. Cette technique présente l'avantage de mettre en jeu des interactions électrostatiques ou hydrophobes, cette technique peut également mettre en jeu des complexes de coordination [189], [190]. Ces interactions sont spécifiques entre l'enzyme et les supra-molécules utilisées et n'altèrent pas les propriétés de l'enzyme. Toutefois, dans le cas de la modification de l'enzyme, la chimie mise en jeu peut être complexe et modifier les propriétés catalytiques de l'enzyme. L'immobilisation de l'enzyme par la formation de lien covalent entre l'enzyme et l'électrode permet une immobilisation efficace de l'enzyme. Cette technique met souvent en jeu la formation de liaisons amides, du fait des nombreuses fonctions amines présentes sur les enzymes. Bien que cette méthode permette une immobilisation efficace, il est observé qu'elle engendre également un greffage aléatoire en surface de l'électrode et l'enzyme peut alors être mal orientée, limitant ainsi la réaction d'oxydation du glucose et aussi les performances de l'électrode.

Dans le cas des anodes enzymatiques fabriquées par compression, l'enzyme est encapsulée à l'intérieur d'une matrice 3D poreuse composée d'un composite de nanotubes de carbone (MWCNTs) et du liant chitosan. Cette méthode présente l'avantage de combiner l'immobilisation par adsorption et l'immobilisation par encapsulation, ce qui a un impact positif sur sa stabilité.

#### 2.2.1.4 Transfert d'électron de l'enzyme à l'électrode

Les électrodes enzymatiques mettent en jeu des échanges d'électrons entre les centres catalytiques des enzymes et le collecteur d'électrons employé, c'est de ces échanges que dépendra l'efficacité catalytique de l'électrode. Ces transferts d'électrons, sont effectués de deux manières : direct ou indirect.

Le transfert direct d'électrons (DET) est un phénomène connu de la littérature et qui a été observé à plusieurs reprises et pour différentes enzymes [181], [191]–[197]. Toutefois, il arrive que le DET ne

s'effectue pas ou soit défavorisé, généralement pour des raisons de mauvaise affinité entre l'enzyme et l'électrode. Pour remédier à cette lacune, il est possible d'ajouter une molécule redox capable de substituer les électrons mis en jeu au centre de l'enzyme et joue le rôle de « navette » électronique entre l'électrode et l'enzyme (figure 98). Ce type de molécule est généralement de faible masse moléculaire afin de favoriser sa diffusion. Ces molécules sont communément nommées : médiateurs redox et le transfert d'électrons est alors appelé : transfert électronique médiaté (MET).

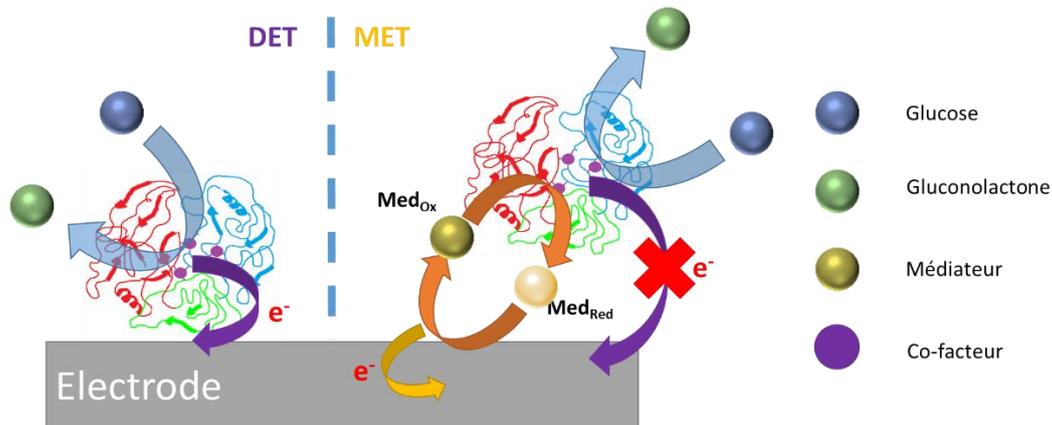


Figure 98: Schéma mettant en jeu un DET et un MET à partir de l'oxydation du glucose

Les médiateurs, peuvent être liés à l'électrode ou à l'enzyme via des procédés similaires à ceux décrits en amont (encapsulation, lien covalent...) pour l'enzyme. Le choix du médiateur lors de la fabrication de l'électrode est crucial car il permet d'optimiser les courants catalytiques en connectant les sites actifs à l'électrode. Toutefois, du fait que les potentiels redox des médiateurs doivent permettre d'oxyder ou réduire l'enzyme, l'ajout de médiateur(s) a pour conséquence de diminuer la force électromotrice (f.e.m.) (ou tension) de la biopile dans lesquels ils sont employés (figure 99).

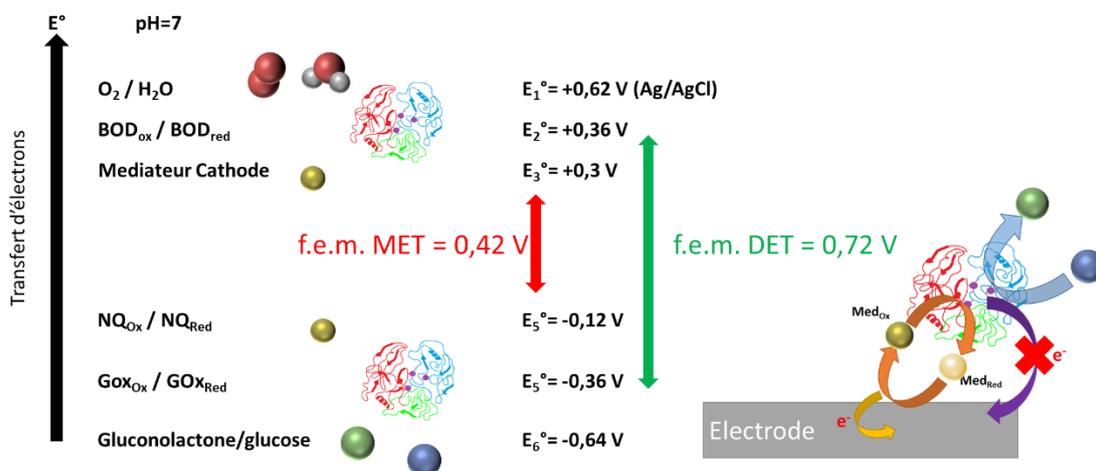


Figure 99: Exemple de l'impact du médiateur sur la f.e.m.

Certaines enzymes sont connectées à l'électrode et permettent le DET, pour beaucoup d'autres, un médiateur est bien souvent nécessaire afin de transférer les électrons. La littérature est très riche en variété de médiateurs, parmi les plus connus et utilisés on peut trouver des complexes métalliques tels que les dérivés du ferrocène ou les complexes d'osmium, on trouve également de nombreux dérivés des quinones, des azines ou encore des viologènes.

Le potentiel du médiateur doit favoriser thermodynamiquement la catalyse de la réaction redox. Le potentiel redox du médiateur doit obligatoirement être supérieur à celui de l'enzyme à l'anode et inférieur à celui de l'enzyme à la cathode afin de permettre les réactions redox. Le potentiel du médiateur ne doit pas être trop proche de celui de la biomolécule redox sous peine de diminuer l'efficacité de

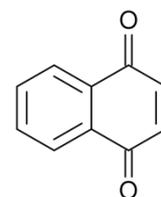


Figure 100: Formule de la 1,4-naphthoquinone

l'échange électronique. La structure chimique de la sonde redox ne doit pas être trop volumineuse du fait de l'encombrement stérique dont souffre l'enzyme, en effet, un médiateur trop volumineux aura difficilement, voire nullement, accès au site actif. L'utilisation de médiateur a des avantages et des inconvénients, il améliore la connexion de l'enzyme, le transfert d'électron ainsi que la densité de courant, mais il diminue la d.d.p. de la biopile. Dans le cadre des enzymes sélectionnées, GOx et FAD-GDH, le DET est encore aujourd'hui sujet à discussion pour la GOx [198]–[200] et n'a, à ce jour, pas été démontré pour la FAD-GDH, aussi, un médiateur sera incorporé aux anodes fabriquées : la 1,4-naphthoquinone (NQ) (figure 100). Les avantages de ce médiateur sont nombreux, en plus d'être de petite taille, ce qui permet des échanges rapides, la NQ donne des courants catalytiques élevés à des potentiels redox attractifs [201], [202]. On notera toutefois pour la NQ, la possibilité d'effectuer des réactions secondaires en présence d'amines aliphatiques ceci dans des conditions douces.

#### 2.2.1.5 Support conducteur de l'électrode : les nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone (NTCs) sont des matériaux à base de carbone qui présentent une conductivité électronique élevée. Les NTC sont particulièrement recommandés pour l'électrochimie de molécules organiques et biomolécules, vis-à-vis desquelles ils ont de bien meilleures propriétés électrochimiques que les métaux nobles [203]. Les NTCs sont très utilisés dans le domaine de l'électronique imprimé, pour des dispositifs de bio-analyse en raison de leur biocompatibilité et conductivité. Lors de la synthèse des NTCs il est possible de contrôler leur diamètre et ainsi sélectionner un diamètre favorisant l'approche des sites actifs de protéines redox comme la GOx ou la FAD-GDH [204]. Il a également été démontré que la stabilité des enzymes était supérieure en surface des NTCs que sur celle du graphite [205] et que les enzymes en surface des NTCs semblent moins se dénaturer lors de leur fonctionnement [206]. La synthèse des NTCs offre différentes structures des NTCs qui peuvent être obtenues à mono (en anglais : Single Walled Carbon Nanotubes ou SWCNTs) ou multi feuillets (en anglais : Multi-Walled Carbon Nanotubes ou MWCNTs).

Un autre point fort des CNTs est leurs propriétés mécaniques exceptionnelles. Du fait de la présence de la double liaison C=C et d'un système  $\pi$  hautement conjugué au sein du système aromatique du graphène, les CNTs offrent une tenue mécanique exceptionnelle avec un module de Young moyen d'environ 1,28 TPa pour des SWCNTs [207] et des modules d'Young de 0,1 à 0,3 TPa pour des MWCNTs [208], [209]. De plus, les CNTs démontrent une flexibilité certaine et peuvent également reprendre leur forme initiale après une déformation [210]. Les propriétés mécaniques des CNTs sont considérées parmi les meilleures recensées à ce jour. Par conséquent, les nanotubes de carbone sont d'excellents candidats pour des applications multifonctionnelles comme le renfort mécanique des matériaux. Enfin du fait de leur hybridation  $sp^2$  qui leur confère des électrons  $\pi$  délocalisés parallèles aux feuillets, les CNTs possèdent une conductivité électronique élevée.

C'est pour le cumul de ces nombreuses et prometteuses propriétés, que les MWCNTs seront utilisés comme support du médiateur NQ, des enzymes GOx et FAD-GDH, ceci afin de fabriquer deux types d'anodes.

### 2.2.2 *Fabrication des anodes enzymatiques*

Afin de fabriquer des bioanodes enzymatiques, le procédé par compression mécanique a été choisi. Le protocole de fabrication des anodes enzymatiques diffère par rapport à celui des cathodes abiotiques, toutefois quelques étapes restent similaires, notamment dans la préparation et intégration du liant organique (ici : le liant chitosan).

Dans une première étape, le médiateur (NQ) est mélangé au MWCNTs, puis adsorbé à l'aide du solvant acétonitrile (dissolution de la NQ). L'acétonitrile est ensuite évaporé et le mélange NQ-MWCNTs séché. L'enzyme est ensuite ajoutée (GOx et Catalase pour le premier type d'anode, et FAD-GDH pour le deuxième) et mélangée. Suite à cela, une solution de liant est ajoutée et le mélange est homogénéisé. Après homogénéisation, le mélange est transvasé dans un moule puis compressé à l'aide d'une presse hydraulique (voir annexe).

Un contact électrique est ensuite ajouté à l'aide de pâte de carbone puis protégé à l'aide de silicone. Les électrodes peuvent ensuite être testées via mesures électrochimiques.

### 2.2.3 *Performances électrochimiques des anodes enzymatiques*

#### 2.2.3.1 *FAD-GDH-Naphtoquinone-MWCNTs*

Les anodes ont été fabriquées de même dimension que précédemment, soit 0,5 cm de diamètre et 0,3 cm d'épaisseur composées de 3 mg de FAD-GDH, 30 mg de MWCNTs et 30 mg de NQ. La NQ est ajoutée en excès et son surplus est relargué par lavage de l'anode. Ces bioanodes étant fonctionnelles en conditions physiologiques, toutes les études électrochimiques ont été faites dans un tampon phosphate à pH = 7,4. Comme pour les précédentes électrodes, ces électrodes ont été caractérisées

par chronoampérométrie à 0 V vs ECS (figure 101). Consécutivement à l'ajout d'une solution de glucose au milieu (concentration après ajout 5 mM), un courant catalytique de 50  $\mu\text{A}$  (255  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) est observé.

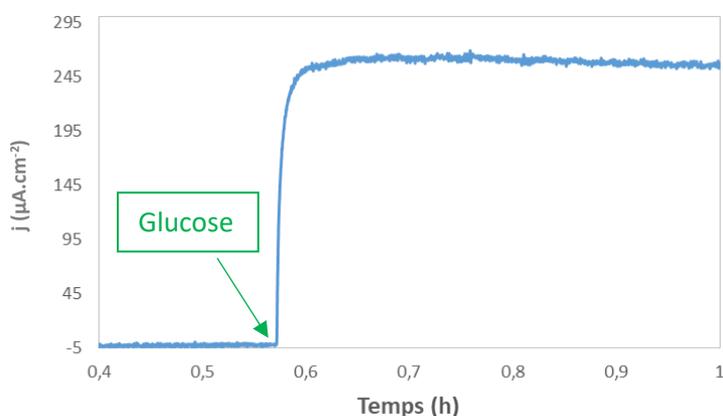


Figure 101: Chronoampérométrie d'une anode FAD-GDH-NQ-MWCNTs à 0 V vs ECS avec ajout de Glucose ( $C_{\text{finale}}$  5 mM) en condition physiologique PBS

Si l'on compare cette densité de courant à celles obtenues en amont, nous observons que les anodes enzymatiques FAD-GDH-NQ-MWCNTs offrent des densités supérieures aux anodes abiotiques comportant les catalyseurs bimétalliques :  $\text{Au}_{70}\text{Pt}_{30}/\text{rGO}$  et  $\text{Au}_{50}\text{Pt}_{50}/\text{rGO}$ , pour lesquels ont été obtenus respectivement 94  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  et 255  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ , avant implantation. Toutefois, notons que l'anode abiotique monométallique (Pt-rGO) offre une densité de courant supérieure (470  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). On peut également observer sur la figure qu'après ajout du glucose la densité de courant augmente très rapidement, soulignant ainsi la sensibilité de l'anode face au glucose ainsi qu'une cinétique de catalyse élevée. Également, à l'inverse des anodes abiotiques, aucune sensibilité aux ions chlorures n'est constatée (150 mM d'ions chlorures présents dans la solution de PBS).

#### 2.2.3.2 GOx-Catalase-Naphtoquinone-MWCNT

Comme pour les anodes composées avec l'enzyme FAD-GDH, les anodes mettant en jeu les enzymes GOx et catalase ont été fabriquées par compression et de mêmes dimensions (épaisseur : 0,3 cm ; diamètre 0,5 cm).

Les anodes comportent un mélange de 10 mg de GOx, 10 mg de catalase, 30 mg de NQ et 30 mg de MWCNTs. Ces anodes, comme les précédentes anodes enzymatiques, fonctionnent en conditions physiologiques, aussi les mesures électrochimiques ont été effectuées à pH 7,4 et dans une solution saline de phosphate (PBS).

La figure 102 montre une chronoampérométrie effectuée à 0 V vs ECS d'une anode de GOx-Catalase-NQ-MWCNTs. Après ajout d'une solution de glucose permettant d'obtenir une concentration de 5mM, un courant catalytique de 16,7  $\mu\text{A}$  ( $85 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) est observé.

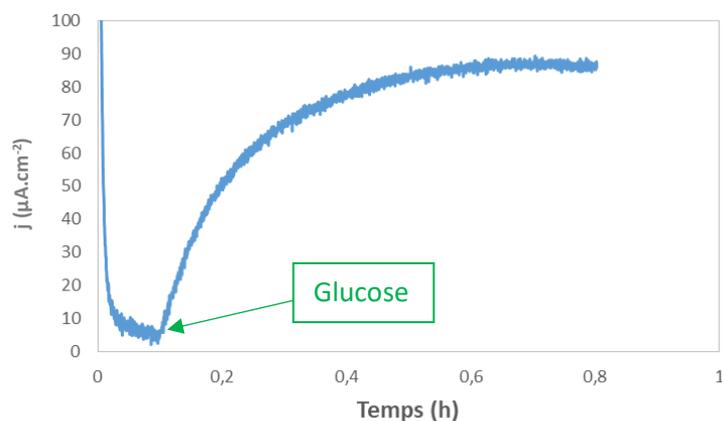


Figure 102: Chronoampérométrie d'une anode GOx-catalase-NQ-MWCNTs à 0 V vs ECS à 5 mM de Glucose et en conditions physiologiques

Les densités de courant que peuvent fournir ce type d'anode sont inférieures d'un facteur 3 à celles obtenues avec l'anode comportant l'enzyme FAD-GDH. Ceci peut être attribué à une meilleure activité catalytique de la FAD-GDH en présence de glucose et de NQ et du fait que la FAD-GDH est plus soluble que la GOx, ce qui peut induire une meilleure distribution de la FAD-GDH dans l'électrode.

Une réponse au glucose plus lente que l'anode enzymatique FAD-GDH-NQ-MWCNTs est observée, ce qui peut résulter d'une diffusion plus lente du glucose au sein de l'électrode.

#### 2.2.4 Conclusion sur les performances électrochimiques

Les anodes enzymatiques développées ont l'avantage d'être insensibles aux ions chlorures tout en offrant, des densités de courants intéressantes. En comparant les anodes enzymatiques entre elles, nous notons des performances supérieures pour les anodes composées de l'enzyme FAD-GDH. Toutefois les anodes comportant l'enzyme GOx montrent des efficacités similaires à celles obtenues dans la littérature [176], [178], [211], il en est de même pour les anodes composées de l'enzyme FAD-GDH [176], [178].

### 3 Fabrication et caractérisation de la biopile

#### 3.1 Résultats *in vitro*

Les Bfc constituées de deux bioélectrodes compressées de mêmes dimensions, soit un total de 120  $\mu\text{L}$  pour les deux électrodes, ont été caractérisées en conditions physiologiques (pH = 7,4, solution saline de tampon phosphate, 5 mM de glucose, sous air), par la méthode de voltampérométrie à balayage linéaire (ou LSV pour Linear Sweep Voltammetry). Cette technique permet de déduire la différence de potentiel offrant la puissance optimale de la Bfc.

##### 3.1.1 Biopile FAD-GDH-NQ-MwCNTs et Fe/N-rGO

Sur les figures 103a et 103b sont représentés les densités de courant et de puissance en fonction de la tension aux bornes d'une pile constituée d'une cathode à base de catalyseur Fe/N-rGO et liant chitosan, combiné à un système d'anode enzymatique de type FAD-GDH. Ce type de système est donc capable de fournir  $95 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou encore  $600 \mu\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$  ceci pour une tension de 295 mV et en conditions physiologiques.

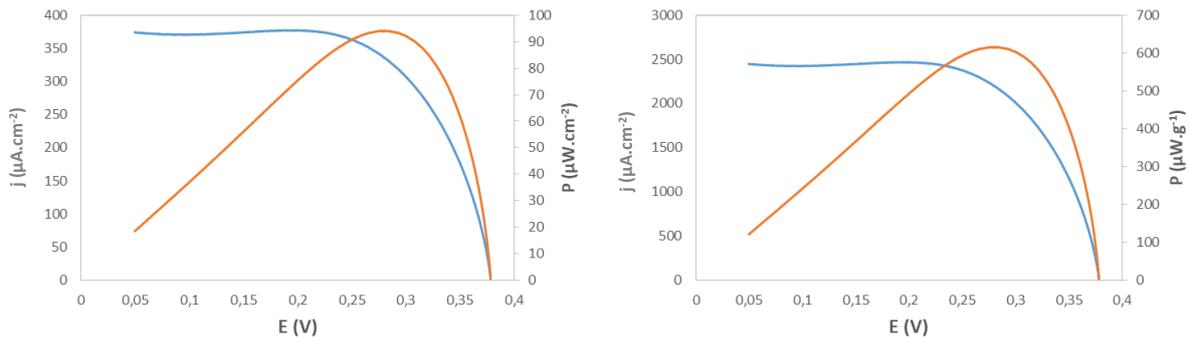


Figure 103: LSV d'une Bfc FAD-GDH-NQ-MwCNTs et Fe/N-rGO effectuées à 0,2 mV/s en condition physiologique avec 5 mM de glucose sous air  
a/ résultats exprimés en surfacique b/ résultats exprimés en massique

### 3.1.2 Biopile GOx-Catalase-NQ-MwCNTs et Fe/N-rGO

De même que précédemment, une mesure LSV en conditions physiologiques et avec 5 mM de glucose a été effectuée pour une biopile constituée d'une anode de GOx, catalase, NQ et MwCNTs et une cathode comportant le catalyseur Fe/N-rGO. Les deux électrodes ont été fabriquées par compression et comportaient le liant chitosan.

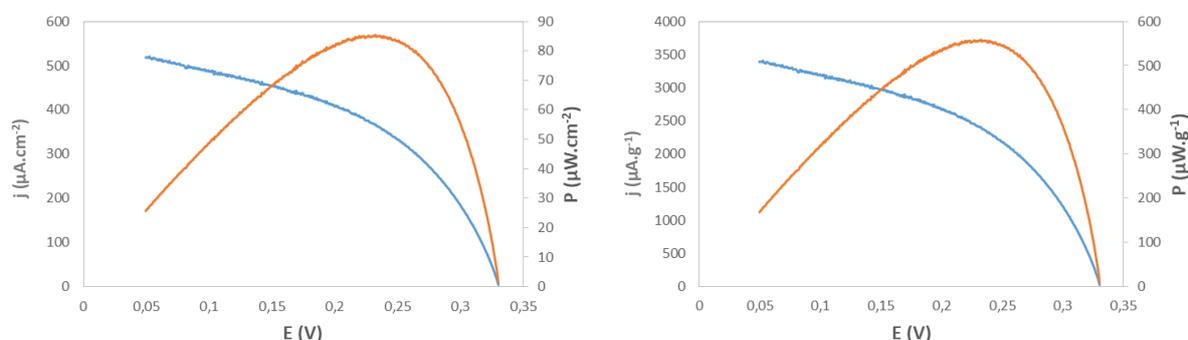


Figure 104: LSV d'une Bfc GOx-Catalase-NQ-MwCNTs et Fe/N-rGO effectuées à 0,2 mV/s en condition physiologique avec 5 mM de glucose sous air  
a/ résultats exprimés en surfacique b/ résultats exprimés en massique

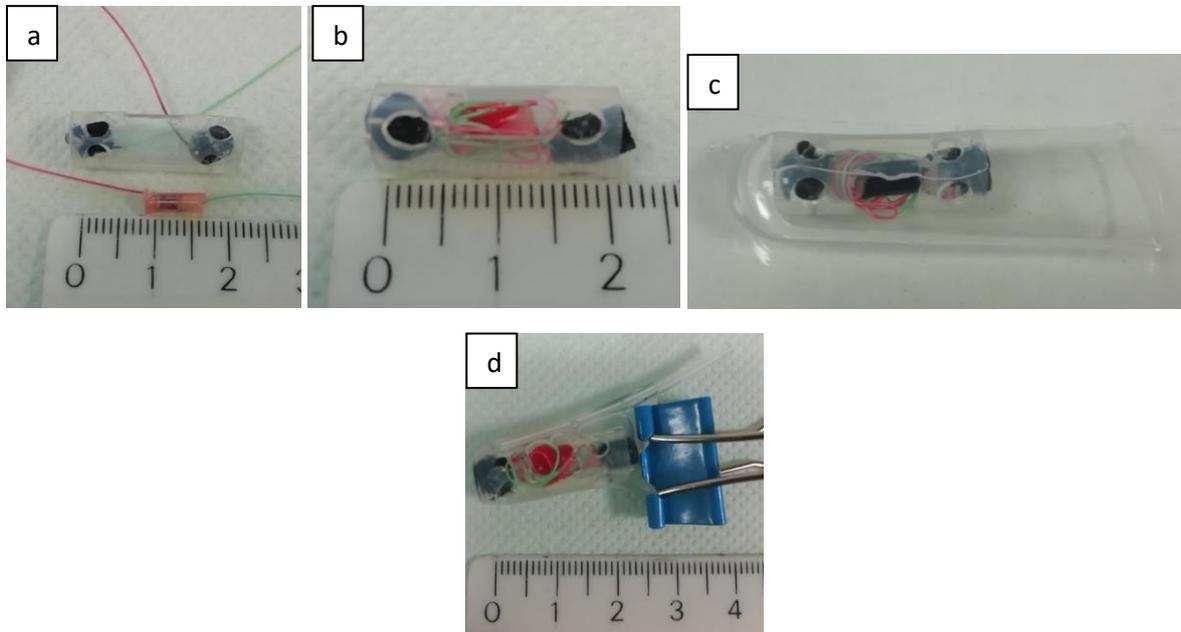
Sur les figures 104a et 104b, il est possible d'observer des densités de puissances optimales de 85  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou encore 560  $\mu\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$  ceci pour une tension de 250 mV.

En comparant les deux biopiles développées, le système électrochimique mettant en jeu l'anode composée de FAD-GDH offre des densités de puissance et une f.e.m. supérieure à la biopile composée de GOx et Catalase, ce qui est en adéquation avec les mesures effectuées sur les anodes enzymatiques.

### 3.2 Fabrication des biopiles implantables

Il n'est pas possible pour le moment au laboratoire de suivre en direct le fonctionnement d'une biopile implantée. Cela suppose d'utiliser l'équivalent d'un potentiostat miniaturisé et implanté capable de télé-transférer les données de fonctionnement de la biopile. Pour compenser cela et simuler un fonctionnement de la biopile (décharge), cette dernière a été connectée à une résistance électrique. Deux valeurs de résistances, 80 ou 40 k $\Omega$ , ont été choisies en accord avec la tension et le courant que le biopile est en mesure de fournir et également en accord avec des expériences faites au laboratoire TIMC-IMAG. La résistance est connectée aux deux électrodes à l'aide de pâte de carbone, puis isolée du milieu physiologique par une résine acrylique.

Afin d'enrober les Bfc et de les isoler du milieu physiologique, une membrane d'hydrogel de PVA a été choisie. Toutefois, l'enrobage direct des électrodes par cette membrane de PVA induit une forte chute (70%) des performances électrochimiques. Aussi pour éviter cela, le système biopile / résistance a été inséré dans un tube silicone percé qui a ensuite été enrobé par la membrane de PVA (figure 105).



*Figure 105: Photos des différentes étapes de fabrication des biopiles implantées :*  
*a/ Anode et cathode connectées à une résistance de 40 kOhms*  
*b/ Electrodes et résistance insérées dans un tube de silicone*  
*c/ Ajout d'une membrane de PVA autour d'une biopile*  
*d/ Scellage de la membrane de PVA*

Une fois la membrane de PVA ajoutée autour de la Bfc, suit une étape de scellage qui consiste à appliquer une force constante sur la membrane de PVA, ce qui est le rôle de la pince observée sur la figure 105c.

Le dispositif est ensuite exposé à des rayonnements ionisants (source de  $^{60}\text{Co}$ ) afin d'être stérilisé. Cette méthode est la moins contraignante vis-à-vis du dispositif. Des traitements thermiques ou par solvants (éthanol) pouvant modifier la structure des différentes membranes. Toutefois, cette méthode de stérilisation requiert une étape de déshydratation de la membrane hydrogel afin de garantir une stérilisation homogène de notre implant. Aussi, il est nécessaire avant implantation de réhydrater l'ensemble de la biopile et particulièrement de la membrane de PVA afin de garantir la diffusion des espèces chimiques au sein de l'implant. Pour garantir une réhydratation homogène de l'implant, une solution saline de glucose (5 mM) est ajoutée à l'intérieure du dispositif via un tuyau de polypropylène (figure 105c). Le dispositif est ensuite immergé dans une solution de même composition. Le fait d'ajouter une solution physiologique glucosée permet également de garantir que la Bfc est en fonctionnement lors de son implantation, et facilitera l'équilibre entre la solution implantée et les liquides de l'organisme. Après ajout de la solution au sein du dispositif, le tuyau est retiré et la

membrane de PVA scellée via compression mécanique. Après cette dernière étape de scellage, le dispositif peut alors être implanté.

Au total de 28 Bfc ont été fabriquées avec succès avec cette méthode. Parmi ces 28 Bfc hybrides, 18 comportaient des bioanodes mettant en jeu le système enzymatique GOx et catalase, et les 10 biopiles hybrides restantes comportaient FAD-GDH. Dans chacun des cas, la moitié des anodes a été reliée à une résistance de 40 k $\Omega$  et l'autre moitié à une résistance 80 k $\Omega$ . Toutes ces Bfc comportaient une biocathode compressée de Fe/N-rGO avec le liant chitosan.

Ce nombre élevé d'implantation a été réalisé en vue d'obtenir une étude statistique permettant à la fois de conclure sur l'impact de l'implantation d'une Bfc en fonctionnement sur l'organisme de rats vivants, et réciproquement. Ces implantations ont été effectuées sur 3 durées différentes afin de déduire l'impact de la durée de l'implantation sur le fonctionnement des Bfc.

### 3.3 Implantation

#### 3.3.1 Zone d'implantation

Les implantations ont été réalisées dans la zone intra abdominale, zone riche en glucose et oxygène et dont les mouvements musculaires permettent une diffusion efficace des espèces chimiques.

#### 3.3.2 Résultats préliminaires

##### 3.3.2.1 Euthanasies anticipées

###### 3.3.2.1.1 Résultats Biologiques

Après avoir effectué les implantations, une première euthanasie anticipée a dû être effectuée 5 jours après implantation. L'euthanasie a été pratiquée car l'animal présentait des symptômes de douleur (prostration, dos voussé avec poils hérissés, douleur à la préhension, fermeture des yeux, orientation anormale des vibrisses...). Après autopsie, aucune anomalie au niveau cardio-pulmonaire n'a été constaté, ni d'infection due à un micro-organisme. Toutefois, une grande quantité d'ascite ( $V > 15$  ml) a été observée, de couleur beige-marron. Une couleur anormale et hétérogène a été constatée au niveau des organes qui étaient tous agglomérés les uns aux autres avec une très forte adhérence. Un très important dépôt de fibrine a également été observé au niveau du foie, des intestins et des reins. Du matériau des électrodes a été observé en zone intra abdominale de l'animal. L'autopsie a également révélé une perforation abdominale due au délitement des intestins.

L'autopsie conclut à un choc toxique vraisemblablement dû à une fuite du matériel d'électrode ou à un dysfonctionnement du scellage de la membrane de PVA.

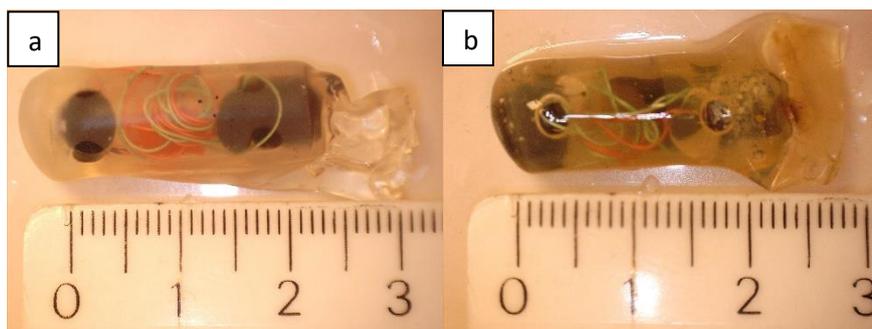


Figure 106: Biopiles explantées après 5 jours :  
 a/ Bfc avec FAD-GDH et  $R = 40 \text{ k}\Omega$   
 b/ Bfc avec FAD-GDH et  $R = 80 \text{ k}\Omega$

Les figures 106a et 106b montrent deux biopiles comportant chacune une anode de FAD-GDH et une cathode de Fe/N-rGO, chaque électrode reliée à une résistance de  $40 \text{ k}\Omega$  (figure 106a) et  $80 \text{ k}\Omega$  (figure 106b). L'observation détaillée de la figure 103b, démontre une zone fragilisée de la membrane de PVA, soulignant l'hypothèse de la fuite de matériau d'électrode. Toutefois, il ne nous est pas possible à ce jour de conclure définitivement sur la cause de la toxicité aigüe observée, cependant, compte tenu des résultats d'implantations effectuées sur la cathode, une suspicion portée sur les composants de l'anode peut être envisagée.

### 3.3.2.1.2 Résultats Electrochimiques

Après avoir retiré la membrane protectrice de chacune des deux Bfc, les anodes des Bfc étaient endommagées et ne pouvaient faire le sujet d'une étude électrochimique. Après avoir retiré les électrodes du tube en silicone, le contact entre la pâte de carbone et la cathode de la Bfc de la figure 106a était rompu, aussi, une étude électrochimique sur la cathode restante de la Bfc de la figure 106b a été effectuée.

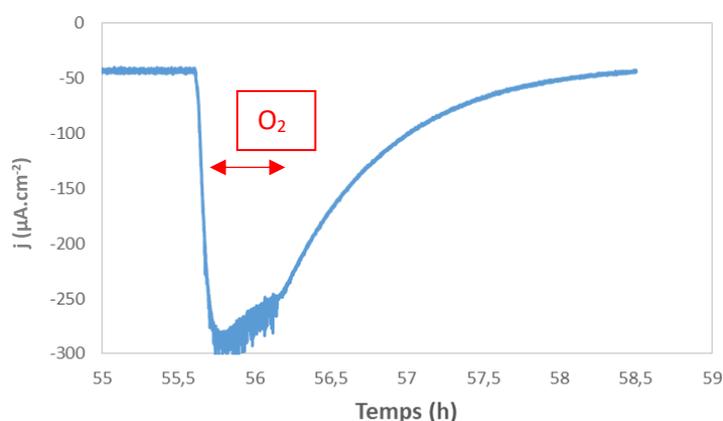


Figure 107: Chronoampérogramme d'une cathode composée de Fe/N-rGO et du liant chitosan après 5 jours d'implantation, PBS,  $100 \text{ mV vs ECS}$ , contre Pt

La figure 107 est le résultat d'une chronoampérométrie effectuée à 100 mV (vs ECS) en condition physiologique et avec 5 mM de glucose. Cette chronoampérométrie a été effectuée sur une cathode implantée 5 jours en intra abdominale chez le rat. La cathode démontre toujours une réponse catalytique du fait de l'augmentation de la densité de courant lors de l'ajout d'oxygène au milieu à t=55,5h, puis, lorsque le barbotage d'oxygène est stoppé et que la concentration en oxygène dissout diminue, on observe une baisse de la densité de courant (en valeur absolue). Ceci démontre que la biocathode constituée du catalyseur Fe/N-rGO est capable de conserver son activité catalytique après 5 jours de décharge en continue dans le corps d'un rat.

### 3.3.2.2 Euthanasies après 1 mois d'implantation

#### 3.3.2.2.1 Résultats Biologiques

Après un mois d'implantation, un total de cinq rats ont été euthanasiés par le chirurgien, ceci conformément au planning mis en place.

Les cicatrices au niveau du derme et de l'épiderme n'étaient plus visibles et les points cutanés s'étaient résorbés, seuls les points musculaires de la laparotomie subsistaient. Les organes de chacun des rats étaient sains, aucune anomalie n'a été constatée au niveau du foie, des reins, du cœur et des poumons. On constate la présence de tissus autour des dix échantillons implantés qui n'ont toutefois montré aucune adhérence aux biopiles, ces tissus pourront faire l'objet d'une étude histologique afin d'observer la composition du tissu (fibrine, collagène, fibroblaste, cellules polynucléaires...).

#### 3.3.2.2.2 Résultats Electrochimiques

Après euthanasie, dix biopiles des cinq rats ont été explantées. Six biopiles comportaient des anodes GOx-Catalase et quatre biopiles des anodes FAD-GDH.

##### 3.3.2.2.2.1 Biopiles GOx-Catalase-NQ-MWCNTs et Fe/N-rGO

Les anodes GOx-Catalase n'ont pas résisté aux contraintes mécaniques imposées par l'implantation, seulement deux anodes ont gardé une architecture en forme de pastille permettant d'effectuer des tests électrochimiques. La première biopile, une fois plongée dans un milieu physiologique s'est révélée non fonctionnelle (d.d.p. de l'ordre du millivolt).

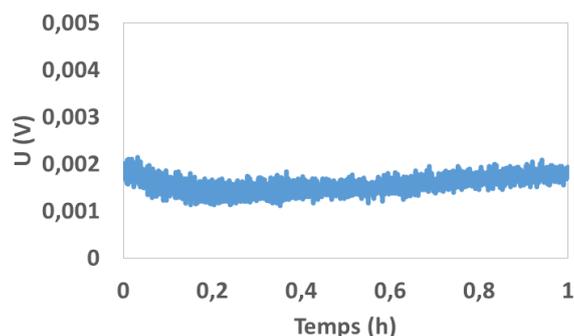


Figure 108: f.e.m. d'une Bfc GOx-catalase et Fe/N-rGO après 1 mois d'implantation, PBS, 5 mM glucose, sous air

Des chronoampérométries ont été effectuées sur l'anode et la cathode (séparément) en condition physiologique avec 5 mM de glucose et respectivement à 100 et 0 mV vs ECS (figure 106a et 106b).

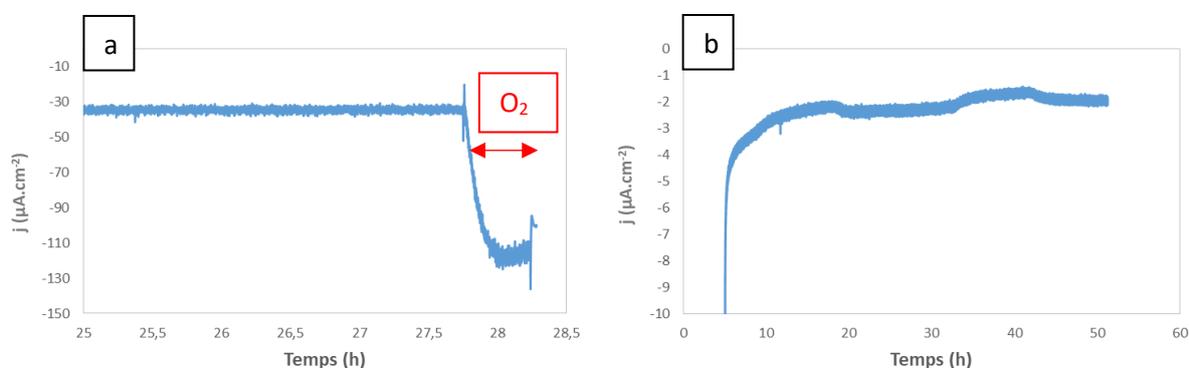


Figure 109: a/ Chronoampérogramme d'une cathode composée de Fe/N-rGO et du liant chitosan après 1 mois d'implantation, PBS, 100 mV vs ECS, contre Pt

b/ Chronoampérogramme d'une anode composée de GOx-Catalase-NQ-MWCNTs et du liant chitosan après 1 mois d'implantation, PBS, 5 mM Glucose, 0 mV vs ECS, contre Pt

Le chrono-ampérogramme enregistré avec la cathode (figure 109a) présente un courant réducteur et donc une cathode toujours active dont la densité de courant augmente lorsque la concentration en oxygène augmente (injection d'oxygène à  $t = 27,75$  h). En revanche, le chrono-ampérogramme enregistré avec l'anode (figure 109b) présente un courant négatif pour une anode qui se trouve être en présence de 5 mM de glucose. Lors de cette expérience une grande quantité de glucose a été ajoutée jusqu'à atteindre 150 mM en solution, sans réponse visible sur le chrono-ampérogramme. La conclusion est que l'anode n'a pas supporté l'implantation, qu'elle est défectueuse et donc responsable de la faible d.d.p. observée pour la pile.

La seconde biopile implanté a été caractérisée de la même manière. Après avoir retiré la membrane de PVA, la d.d.p. de la biopile a été mesurée en conservant les électrodes connectées à leur résistance de 80 k $\Omega$ .

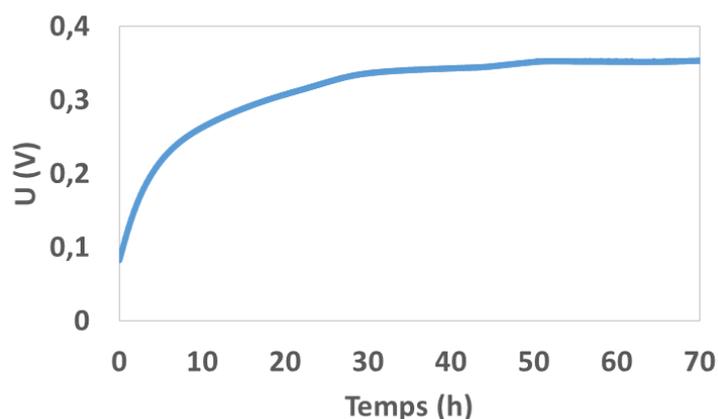


Figure 110: f.e.m. d'une Bfc GOx-catalase et Fe/N-rGO après 1 mois d'implantation, PBS, 5 mM glucose, sous air

La figure 110 représente cette d.d.p. mesurée en fonction du temps dans un milieu physiologique. Après 30 h de stabilisation, une d.d.p. de 353 mV a été enregistrée pendant plus de 60 h. Ceci démontre un système stable et fonctionnel après un mois d'implantation. La résistance a ensuite été déconnectée et la biopile a été analysée par LSV en conditions physiologiques (avec 5 mM de glucose) et pour une variation du potentiel de  $0,2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (Figure 111a et 111b).

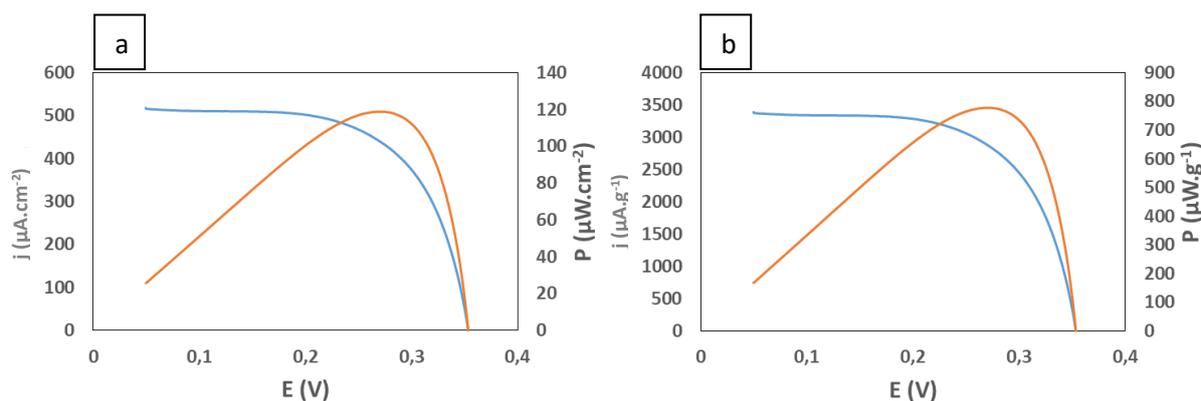


Figure 111: LSV d'une Bfc GOx-Catalase-NQ-MWCNTs et Fe/N-rGO effectuées à  $0,2 \text{ mV/s}$  en condition physiologique avec 5 mM de glucose après 1 mois d'implantation

a/ résultats exprimés en surfacique b/ résultats exprimés en massique

Les figures 111a et 111b représentent l'évolution de la densité de courant et de puissance en fonction de la tension de la pile. Une puissance maximale ( $118,85 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) est observée pour une différence de potentiel de 270 mV. Une augmentation importante des performances est observée par rapport aux expériences précédentes ( $85 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Il faut cependant relativiser ces performances car un fort gonflement des électrodes dues à une plus longue immersion en solution est également constaté.

Les 4 cathodes restantes ont ensuite été étudiées, l'une d'entre elles démontrait un potentiel aberrant dû à un problème de connexion entre le contact électrique et l'électrode. Par ailleurs, les trois cathodes restantes ont été caractérisées par chronoampérométrie à 100 mV vs ECS en conditions physiologiques avec un ajout d'oxygène afin d'observer la catalyse de l'ORR (figures 112).

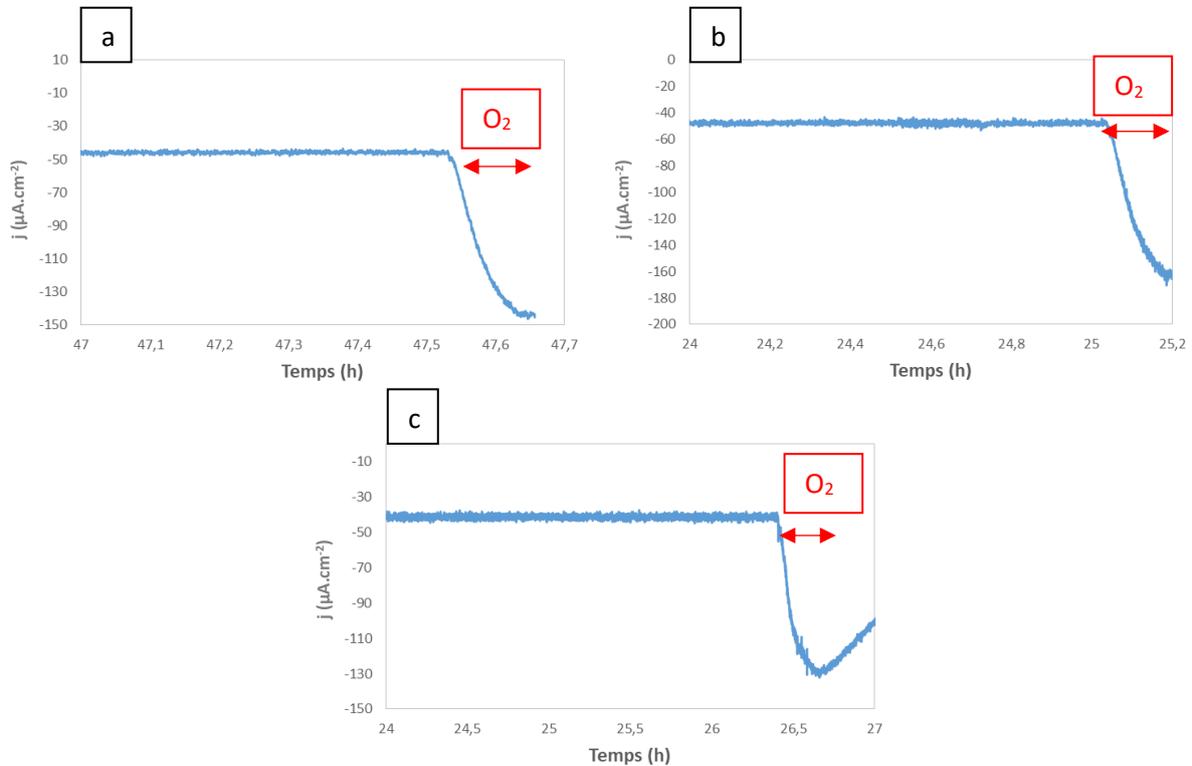


Figure 112: Chromatogrammes de cathodes composées de Fe/N-rGO et du liant chitosan après 1 mois d'implantation, PBS, 100 mV vs ECS, contre électrode de Pt

L'observation des figures 112a, 112b et 112c permet de conclure que les biocathodes implantées fonctionnent toujours et permettent d'effectuer l'ORR en conditions physiologiques, ceci après 1 mois d'implantation. Soit une perte d'environ 70% en moyenne en comparaison aux performances électrochimiques obtenues après fabrication (perte calculée avec les données de la figure 71).

#### 3.3.2.2.2.2 Biopiles FAD-GDH-NQ-MWCNTs et Fe/N-rGO

Après explantation, les contacts électriques des anodes de FAD-GDH ne résistaient pas aux contraintes mécaniques imposées par l'implantation, il a été observé que sur les quatre biopiles implantées seulement une anode avait gardé sa connexion électrique, toutefois, à l'inverse de l'observation faite pour les anodes de GOx et catalase, les architectures observées de chacune des anodes étaient sous forme de pastille. Après avoir enlevé la membrane de PVA, la différence de potentiel aux bornes de la résistance de 80 kOhms a été enregistrée (figure 113).

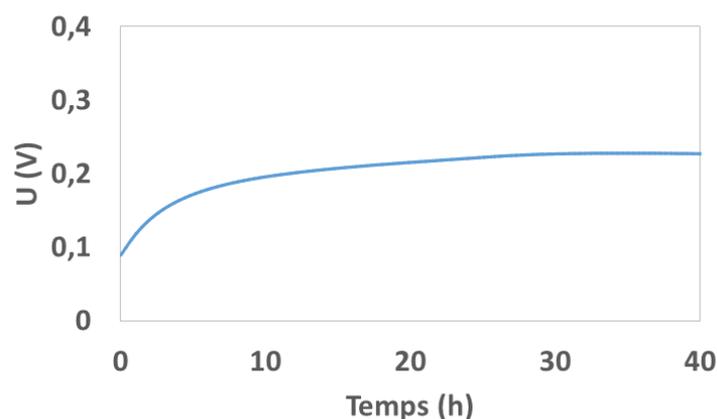


Figure 113: f.e.m. d'une Bfc FAD-GDH-NQ-MWCNTs et Fe/N-rGO après 1 mois d'implantation, PBS, 5 mM glucose

La figure 113 montre l'obtention d'une d.d.p. stable après 30 h de mesure et de 226 mV. L'obtention de cette f.e.m. démontre un système stable et fonctionnel ceci après un mois d'implantation. Après cette mesure, la résistance a été déconnecté et la biopile analysée par LSV en conditions physiologique (avec 5 mM de glucose) et avec une variation du potentiel à 0,2 mV.s<sup>-1</sup> (figures 114a et 114b).

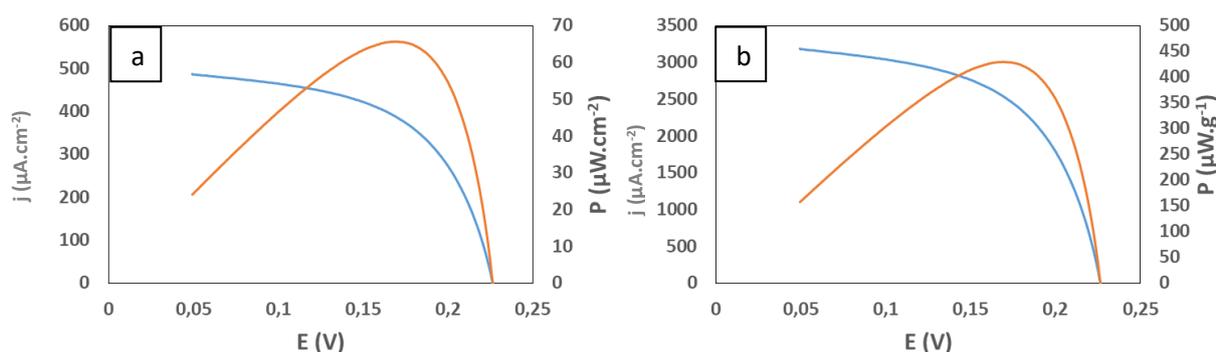


Figure 114: LSV d'une Bfc FAD-GDH-NQ-MWCNTs et Fe/N-rGO effectuées à 0,2 mV.s<sup>-1</sup> en conditions physiologiques avec 5 mM de glucose après 1 mois d'implantation

a/ résultats exprimés en surfacique b/ résultats exprimés en massique

Les figures 111a et 111b montrent une puissance maximale de 65,6  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour une différence de potentiel de 170 mV en conditions physiologiques avec 5 mM de glucose. Si l'on compare avec les précédentes données (95  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), une diminution des performances est observée. Cette diminution peut être expliquée par une désactivation ou une désorption du système enzymatique.

### 3.3.2.3 Euthanasies après 3 mois d'implantations

Après trois mois d'implantation, un total de quatre rats ont été euthanasiés par le chirurgien, ceci conformément au planning mis en place. Chaque rat comportait deux biopiles, soit un total de huit biopiles. Parmi ces biopiles, six comportaient l'anode de : GOx-Catalase-Naphtoquinone et les deux autres Bfc contenaient des anodes de : FAD-GDH-Naphtoquinone. Toutes les cathodes étaient composées du catalyseur Fe/N-rGO et du liant chitosan.

### 3.3.2.3.1 Résultats Biologiques

Les cicatrices au niveau du derme et de l'épiderme n'étaient plus visibles et les points cutanés s'étaient résorbés, seuls les points musculaires de la laparotomie subsistaient. Les organes de chacun des rats étaient sains, aucune anomalie n'a été constatée au niveau du foie, des reins, du cœur et des poumons. Il a été constaté la présence d'un tissu autour des six Bfc composées de l'anode de GOx, en revanche, les Bfc composées de l'anode de FAD-GDH, n'ont démontré aucune adhérence et aucun tissu. Dans les cas des six Bfc, les tissus prélevés pourront faire l'objet d'une étude histologique afin d'observer la composition du tissu (fibrine, collagène, fibroblaste, cellules polynucléaire...).

### 3.3.2.3.2 Résultats Electrochimiques

Les deux biopiles comportant les anodes FAD-GDH ont démontré une rupture du contact électrique au niveau de l'anode. Une chronoampérométrie a été effectuée sur l'une des deux cathodes implantées (figure 115) :

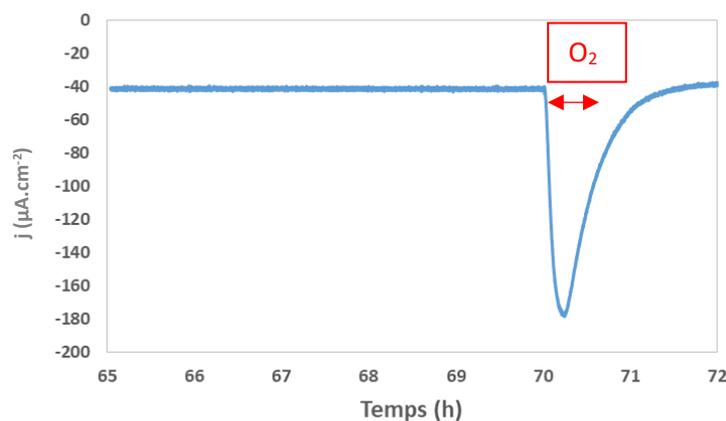


Figure 115: Chronoampérométrie d'une cathode composée de Fe/N-rGO et du liant chitosan après 3 mois d'implantation, PBS, 100 mV vs ECS, contre électrode de Pt ; sous air puis ajout de O<sub>2</sub> à t = 70 h

L'observation de la figure 115 nous permet de conclure que la biocathode implantée fonctionne toujours et permet d'effectuer l'ORR en conditions physiologiques, ceci après 3 mois d'implantation. Le chrono-ampérométrie montre une augmentation de 42,5  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  à 178  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  lors de l'ajout d'oxygène à la solution.

## 4 Conclusion

Au cours de ce chapitre, différentes anodes capables d'être mises en connexion avec le système cathodique Fe/N-rGO ont été développées par compression et avec le liant chitosan. Dans un premier temps, des anodes abiotiques ont été fabriquées à partir des catalyseurs développés par Lemoine *et al.* dans le but de créer une biopile complètement abiotique. Ces catalyseurs, à base de graphène, d'or et de platine, ont démontré des densités de courant de l'ordre de  $1500 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  (figure 90) à 0 V vs ECS et en présence de 5 mM de glucose en conditions physiologiques. La culture des cellules 3T3-L1 effectuée en présence de ces catalyseurs n'a soulevé aucune toxicité aiguë et ne semble pas impacter le cycle de prolifération des cellules 3T3-L1. Toutefois, les catalyseurs abiotiques sélectionnés ont démontré un empoisonnement aux ions chlorures irrémédiables impactant drastiquement les performances des systèmes anodiques. Aussi, dans un deuxième temps, deux types d'anodes ont été fabriquées impliquant deux systèmes enzymatiques : FAD-GDH et GOx-catalase, offrant des densités de courant en conditions physiologiques respectivement de  $255 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  et  $85 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  à 0 V vs ECS avec 5 mM de glucose. Par la suite, les caractéristiques des systèmes anodiques et cathodiques ont été analysés en biopiles par LSV, il a ainsi été mesuré, en conditions physiologiques avec 5 mM de glucose, des puissances de  $85 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour une biopile comportant le système GOx pour une tension de 250 mV et catalase et  $95 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour le système FAD-GDH pour 295 mV, soit des puissances spécifiques suffisantes pour alimenter un pacemaker. Ces puissances obtenues *in vitro* sont voisines et même supérieures à celles obtenues par Holade *et al.* [65] ou encore Southcott *et al.* [169], qui ont développé des biopiles capables de fournir respectivement  $52,5 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  et  $77 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Toutefois, les systèmes développés au cours de ce chapitre révèlent une f.e.m. inférieure : 250 mV et 295 mV contre 350 mV pour Holade *et al.* [65] et 470 mV pour Southcott *et al.* [169]. Cette différence de d.d.p. est due au potentiel de la cathode, en effet, l'OCP de la cathode de Fe/N-rGO est plus faible (350 mV vs ECS) par rapport à celles de Holade *et al.* et Southcott *et al.*

Après avoir obtenu des résultats concluants *in vitro*, un système permettant d'implanter une biopile en fonctionnement a alors été développé. Ce système mettait en jeu une résistance reliée à une cathode et une anode composée soit du système GOx et catalase ou bien FAD-GDH. Deux types de résistances de hautes valeurs (80 et 40 kOhms) ont été sélectionnés afin de relier anodes et cathodes. Les électrodes et résistances ont ensuite été protégées par une combinaison de silicone et d'hydrogel de PVA. Une série de 28 Bfc ont été fabriquées et implantées, dont 10 comportant le système FAD-GDH et 18 GOx-Catalase, dans des rats. Ces implantations ont été effectuées sur plusieurs périodes : de 1, 3 et 6 mois.

Cette expérience est toujours en cours et prendra fin après la rédaction de ce manuscrit, aussi, seul une partie des résultats a pu être étudiée dans ce manuscrit.

Les résultats préliminaires suite à ces implantations ont permis de souligner différents défauts de fabrication et conception, notamment sur la membrane de PVA. En effet, il faudra vérifier et contrôler l'architecture des membranes de PVA afin d'éviter une mauvaise soudure de cette membrane et empêcher une diffusion des composants des électrodes dans l'organisme. Ces expériences ont également révélé que la membrane de PVA pouvait limiter, et même bloquer la diffusion du glucose, aussi, il faudra prévoir d'une part, de vérifier la résistance à la déchirure de la membrane de PVA en contrôlant le module de Young par essai de traction. D'autre part, il faudra contrôler la taille des pores afin de garantir une diffusion optimale du glucose, un contrôle peut être fait en mesurant la diffusion du glucose à l'aide d'une chambre de diffusion et d'une mesure à trois électrodes. Les défaillances sur les anodes ont pu être observées, plus exactement, les défaillances dans le maintien des architectures des anodes composées de GOx et catalase une fois immergées en solution. Ce phénomène est probablement dû à une mauvaise formulation, le liant a dû être incorporé en quantité insuffisante. Une défaillance sur le contact électrique des anodes composées de FAD-GDH a été relevée, pour palier cet inconvénient, il faudra faire attention à appliquer une solution de silicone adaptée permettant, le cas échéant, de limiter les contraintes mécaniques.

D'autre part, sur les 10 cathodes explantées, une seule n'a plus répondu à l'ajout de l'oxygène, de plus, il est fort probable que ce phénomène soit dû à un mauvais contact électrique du fait que l'on obtienne un potentiel aberrant (proche de 0 V vs ECS). De même, deux biopiles comportant des cathodes de Fe/N-rGO étaient actives après leur implantation. La première biopile, composée de GOx et Catalase, a démontré après implantation une OCP de 353 mV et a fourni une puissance maximale de 118,9  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour une différence de potentiel de 270 mV. La deuxième biopile explantée, constituée d'une anode de FAD-GDH, montrait une d.d.p. de 226 mV et une puissance de 65,6  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour une tension de 170 mV. Si l'on compare ces valeurs à celles obtenues par Zebda *et al.* [170], soit une puissance de 193,5  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour une tension de 570 mV, on note une différence notable sur la puissance et la d.d.p. mesurées. Ces biopiles, fonctionnant après 1 mois d'implantation, ont montré des performances électrochimiques pouvant alimenter un pacemaker. Du moins en termes de puissance, car la f.e.m. n'est pas suffisante pour délivrer une tension de 1 à 2 V (tension généralement utilisée pour les pacemakers sur le marché), toutefois, cet inconvénient peut être anticipé via un système de régulateur de tension. Ce chapitre a également pu mettre en évidence des cathodes fonctionnant 3 mois après implantation dans le corps de rats, comme il a été montré dans le chapitre 2, El Ichi *et al.* [125] ont développé et implanté deux anodes comportant l'enzyme laccase, après une période de 90 et 167 jours ils ont pu mesurer des pertes de performances électrochimiques respectivement de 90% et 50% après implantation.

## Conclusion Générale et Perspectives

Cette thèse s'inscrit dans la suite des travaux réalisés dans l'équipe SyNaBi sur le développement des biopiles à glucose et oxygène implantables. Cette thèse s'inscrit également dans le projet ANR : « Biopile Abiotique Implantable » (IMaBic), dont l'objectif est de développer des catalyseurs abiotiques pour une biopile implantable.

Bien que les travaux réalisés par l'équipe SyNaBi sur les biopiles implantables ont permis de réaliser des progrès considérables, la stabilité dans le temps de ces biopiles enzymatiques est devenue un verrou majeur dans le développement de cette technologie.

Ce travail de thèse avait pour objectif d'optimiser la fabrication d'une biocathode abiotique à base de graphène dopé au fer et à l'azote. La biocathode fabriquée devait être capable de catalyser la réaction de réduction de l'oxygène (ORR) en condition physiologique et montrer une stabilité sur de longues périodes, ceci en tenant compte des conditions imposées par l'*in vivo*. Le choix du catalyseur abiotique s'est porté sur un oxyde de graphène réduit et dopé au fer et à l'azote (Fe/N-rGO). Ce choix a été motivé par des études préliminaires réalisées dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe CAMPE du laboratoire SyMMES et l'équipe SyNaBi du laboratoire TIMC-IMAG et dont les résultats ont motivé ce projet de thèse.

Il nous a paru nécessaire de définir dans une première partie de ce manuscrit, la fonction d'un dispositif médical actif (DMIa) ainsi que leurs besoins, notamment en termes d'alimentation électrique. A titre d'exemple, cette première partie a traité le cas d'un DMIa bien connu : le pacemaker. Les pacemakers ont, historiquement, rythmé la recherche et les découvertes sur le domaine du stockage énergétique en créant une demande de source d'énergie électrique stable sur une décennie. Leurs besoins en énergie électrique ont été explicités via la littérature [20] et calculés à l'aide de données de constructeurs [21]–[23], ainsi, un pacemaker a besoin de 20 à 50  $\mu\text{W}$  afin de fonctionner. Actuellement, ces DMIas sont alimentés par des piles au lithium, dont la dangerosité, le coût, la disponibilité et la quantité d'énergie limitée sont problématiques. Une solution alternative à cette source d'énergie serait de développer un système capable de récupérer une énergie stockée dans le corps humain et de la convertir en énergie électrique. Parmi ces solutions, la plus prometteuse est la biopile à glucose et oxygène. Cette biopile est capable de transformer l'énergie chimique du glucose et de l'oxygène disponible dans un corps en énergie électrique. Les problématiques dont sont victimes les biopiles implantables résident principalement dans leur capacité à fonctionner sur de longues périodes. En effet, les biopiles implantables utilisent des catalyseurs enzymatiques afin de transformer par électrochimie l'énergie chimique du glucose et de l'oxygène dissous dans le corps en énergie électrique. La faible stabilité de ces biopiles est due en grande partie à la désactivation des enzymes employées. Ce phénomène est d'autant plus accentué à la cathode qui doit composer avec la faible

disponibilité de l'oxygène *in vivo* (40  $\mu\text{M}$  [1]). Afin d'améliorer de manière conséquente cette stabilité dans le temps, le catalyseur enzymatique qu'avait employé Zebda *et al.* [170] lors de leurs implantations a été substitué par un catalyseur abiotique à base de graphène dopé au fer et à l'azote (Fe/NrGO) dont de nombreuses études ont démontré la capacité de ce type de catalyseur à réduire l'oxygène [86], [87], [90], [91], [212].

Le deuxième chapitre de cette thèse a permis d'étudier le comportement électrochimique du catalyseur Fe/N-rGO et de démontrer sa capacité à catalyser l'ORR en conditions physiologiques. De plus, il a été constaté, à l'aide d'une étude en RDE, que ce catalyseur est sélectif et que la présence du glucose ne nuit pas à son fonctionnement, ce qui est un atout de taille face aux catalyseurs à base de platine [86]. Plusieurs électrodes ont ensuite été fabriquées par un procédé de compression. Ces électrodes volumiques ont un courant capacitif très important qui ne permet pas d'observer le courant faradique en voltampérométrie cyclique et ont été caractérisées par chronoampérométrie, démontrant ainsi des densités de courant de  $175 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  à 100 mV vs ECS. Les électrodes comportant le liant réticulé de chitosan ont démontré une faible perte de 5% après 27 mois de stockage en condition physiologique, soulignant la robustesse du catalyseur et de l'électrode.

Afin d'améliorer les performances des biocathodes, un nouveau procédé original basé sur la lyophilisation d'une encre de catalyseur et de chitosan a été mis en place. Grâce à ce nouveau procédé, des architectures d'électrodes optimisées ont permis d'atteindre  $220 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ , toutefois, ces performances sont plus appréciables en densité massique du fait de la diminution de la quantité de catalyseur utilisée lors du procédé ( $4060 \mu\text{A}\cdot\text{g}^{-1}$  vs  $1150 \mu\text{A}\cdot\text{g}^{-1}$  pour les électrodes compressées). Cependant, ce nouveau procédé a généré une porosité importante rendant l'électrode fragile. Afin d'apporter une réponse à cette problématique, un support conducteur à base de mousse de polyuréthane a été ajouté. L'électrode fabriquée a permis d'obtenir une densité de courant massique de  $2400 \mu\text{A}\cdot\text{g}^{-1}$ . Ce nouveau procédé a ainsi permis de multiplier les performances des électrodes compressées par un facteur 2 : de  $800$  à  $1150 \mu\text{A}\cdot\text{g}^{-1}$  pour les électrodes compressées contre  $2400 \mu\text{A}\cdot\text{g}^{-1}$  pour les lyophilisées sur support. Ce nouveau procédé a également permis d'améliorer la tenue mécanique qui faisait défaut aux électrodes lyophilisées.

Dans le chapitre trois de ce manuscrit, un protocole d'étude de la biocompatibilité, plus précisément de la cytotoxicité, des différents candidats susceptibles de constituer la biocathode a été mis en place. Les résultats de la littérature sur la cytocompatibilité des liants chitosan et PVA ont été confirmés, d'autre part, les premiers tests de cytotoxicité du catalyseur Fe/N-rGO ont été développés et ont permis de conclure qu'il pouvait affecter le cycle de vie des cellules 3T3-L1. Ces résultats étant les premiers de la littérature, il n'est pas possible d'effectuer de comparaison, toutefois, des études

menées sur le graphène [158], [159] permettent d'observer des résultats similaires et concordant. Ce résultat indique que le contact direct de la biocathode avec l'organisme vivant devra être évité. Des biocathodes compressées et lyophilisées ont été implantées dans des rats. Pour ce faire, une membrane de PVA a été utilisée afin de limiter l'encrassement biologique. Sur les quatre échantillons implantés, trois étaient entourés d'une gangue cellulaire qui n'a montré qu'une très faible adhésion sur les implants. La présence de la membrane de PVA a donc permis de réduire considérablement les phénomènes de physisorption et d'encrassement biologique. L'histologie effectuée sur les trois tissus obtenus montre une faible réaction inflammatoire dans chacune des situations, réaction principalement localisée au voisinage de l'implant. L'étude histologique a également révélé la présence de tissus adipeux pour les deux premiers implants. Une forte vascularisation près de la zone d'implantation a été observée, assurant ainsi une alimentation en oxygène propice au bon fonctionnement de l'électrode une fois combinée en biopile. Les implantations ont pu démontrer que le catalyseur Fe/N-rGO effectuait toujours l'ORR après 1 mois en intra-abdominal chez le rat. Cependant, une baisse des performances électrochimiques a été constatée. Il a été observé que l'ajout de la membrane de PVA désorbait une partie du catalyseur de la surface de l'électrode, impactant jusqu'à 70% les performances électrochimiques.

Le quatrième chapitre de ce manuscrit s'est intéressé à l'étude de différentes anodes afin de développer une biopile. Dans un premier temps, des anodes abiotiques ont été fabriquées à partir des catalyseurs développés par Lemoine *et al.* [171] dans le but de créer une biopile complètement abiotique. Ces catalyseurs, à base de graphène, d'or et de platine, ont démontré des densités de courant allant jusqu'à  $1500 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  à 0 V vs ECS et en présence de 5 mM de glucose en conditions physiologiques. La culture des cellules 3T3-L1 effectuée en présence de ces catalyseurs n'a soulevé aucune toxicité aigüe et ne semble pas impacter le cycle de prolifération des cellules 3T3-L1. Toutefois, les catalyseurs abiotiques sélectionnés ont démontré un empoisonnement aux ions chlorures impactant irrémédiablement les performances des systèmes anodiques. Suite à ces résultats, la fabrication des anodes s'est alors orientée vers des catalyseurs enzymatiques. Un travail d'optimisation a été conduit sur deux types de bioanodes impliquant : la FAD-GDH et la GOx. Ces deux anodes ont délivré des densités de courant en conditions physiologiques respectivement de  $255 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  et  $85 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  à 0V vs ECS avec 5 mM de glucose. Les caractéristiques des systèmes anodiques et cathodiques ont été analysées en biopile par LSV, une densité de puissance de  $85 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  à 250 mV a été mesurée pour une biopile comportant le système GOx et  $95 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  à 298 mV pour le système FAD-GDH. Par la suite, des systèmes permettant d'implanter une biopile hybride en fonctionnement ont été développés et implantés en intra-abdominale dans des rats. Ce système mettait en jeu une résistance reliée d'un côté à une biocathode de Fe/N-rGO et de l'autre à une

bioanode composée soit de GOx ou bien de FAD-GDH. Deux types de résistances de hautes valeurs (80 et 40 kOhms) ont été sélectionnés. Une série de 28 Bfc a été fabriquée et implantée, dont 10 comportant le système FAD-GDH et 18 le système GOx. Ces implantations ont été effectuées sur plusieurs périodes : de 1, 3 et 6 mois. Cette expérience est actuellement toujours en cours et prendra fin après la rédaction de ce manuscrit, aussi, seule une partie des résultats peut être étudiée dans ce manuscrit.

Les résultats obtenus montrent que 90% des biocathodes implantées pendant un mois ont conservé leur activité catalytique. Ceci prouve que les biocathodes Fe/N-rGO sont capables de fonctionner en continu et sans être fortement impactées en condition *in vivo*. Bien qu'à ce stade une comparaison entre catalyseur enzymatique et abiotique soit prématurée, il faut d'ores et déjà souligner que ce catalyseur comparé à la laccase et la BOD et même, dans une autre mesure, la FAD-GDH et la GOx testées dans cette étude, est plus prometteur et peut être sérieusement considéré comme une alternative aux catalyseurs de l'ORR actuels des biopiles implantables à glucose et oxygène.

Lors de ce travail de thèse, un nouveau procédé de fabrication des biocathodes innovant basé sur la lyophilisation d'une encre de chitosan et de catalyseur a été développé. Ce protocole devra toutefois, faire l'objet d'études plus approfondies notamment concernant la géométrie de l'électrode, mais aussi afin de définir précisément sa porosité et ses performances en électrochimie. L'étude de cytocompatibilité devra être complétée avec des tests mettant en avant la viabilité cellulaire et de nouveaux types de cellules issues cette fois-ci de l'homme. Pour compléter les tests effectués en *in vivo*, une mesure en temps réel devra être effectuée sur les biopiles fabriquées.

Concernant la partie anodique, les résultats obtenus ont démontré des défaillances dans le maintien des architectures des anodes composées de GOx une fois immergées en solution. Ce phénomène est très certainement dû à une mauvaise formulation ainsi qu'à une mauvaise incorporation du liant. Une autre défaillance a été notée au niveau du contact électrique des bioanodes composées de FAD-GDH, soulignant l'importance de la protection du contact électrique par le silicone. Cette étude montre à quel point les propriétés mécaniques des électrodes sont primordiales et impactent la durée de vie et la stabilité des Bfc. Il est donc nécessaire de mettre en œuvre des protocoles d'étude des propriétés mécaniques des biopiles. En effet, jusqu'à aujourd'hui l'accent a été porté sur les propriétés des performances électrochimiques et de biocompatibilité, deux aspects majeurs dans le développement des Bfc implantables, mais cette étude montre clairement qu'un troisième aspect doit impérativement être pris en compte : la tenue mécanique des bioélectrodes et de la Bfc. En effet, un déficit de cet aspect entraînera inexorablement sur le long terme la désintégration de la Bfc.

Ces implantations ont permis de souligner d'autres défauts de fabrication et conception, notamment sur la membrane de PVA. En effet, il faudra vérifier et contrôler l'architecture des membranes de PVA afin d'éviter une mauvaise soudure de cette membrane et empêcher une diffusion des composants des électrodes dans l'organisme. Ces implantations ont révélé également que la membrane de PVA pouvait limiter et même bloquer la diffusion du glucose, aussi, il faudra prévoir d'une part, de vérifier la résistance à la déchirure de la membrane de PVA en contrôlant le module de Young pour des essais de traction et d'autre part, de contrôler la taille des pores afin de garantir une diffusion optimale du glucose. Un contrôle peut être fait en mesurant la diffusion du glucose à l'aide d'une chambre de diffusion et d'une mesure à trois électrodes.

En résumé, ce travail de thèse démontre le potentiel prometteur du catalyseur Fe/N-rGO permettant l'ORR en condition *in vitro* et *in vivo* afin de développer une biocathode pour la biopile à glucose et oxygène implantable. Le procédé de fabrication des électrodes par compression a été optimisé et a permis d'obtenir des biocathodes performantes et stables dans le temps. De plus, sa compatibilité avec le vivant et sa stabilité sur de longues périodes a également été démontrée. Les résultats obtenus lors de ce travail de thèse montrent que la voie abiotique, souvent écartée pour des raisons liées à la non sélectivité des catalyseurs abiotiques ainsi qu'à leur sensibilité au milieu physiologique, peut aujourd'hui être reconsidérée pour l'application biopile implantable. En effet, nos études montrent que le catalyseur Fe/N-rGO est un bon exemple de la capacité des catalyseurs abiotiques à fonctionner dans le milieu vivant sans être sujet à des phénomènes de désactivation et sans être la cause ou à l'origine de réaction nocive pour l'organisme vivant. Cependant, il faudra effectuer des études plus poussées afin d'étudier l'impact, sur le long terme, de sa présence *in vivo*. Pour finir, ces résultats montrent aussi la nécessité quant à développer de nouveaux catalyseurs abiotiques sélectifs pour la partie anodique, ceci, afin de développer une biopile abiotique à glucose et oxygène stable sur le long terme.



## Annexes

- **Solvants**

Acide acétique 100% v/v (CAS 64-19-7) de VWR

Solution saline de tampon phosphate de Dominique Dutscher

Diméthyle sulfoxyde (CAS 67-68-5) de Carlo Erba

Hydroxyde de potassium de J T Baker (Deventer, Hollande)

Eau a été purifiée ( $0,055 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , TOC 1 ppb) avec Purelab pulse + Flex ultra-pure water (Elga Veolia, Milan, Italie)

- **Matériels**

Chitosan à poids moléculaire moyen (CAS 9012-76-4) degré de désacétylation 75-85%

Glucose Oxydase (*Aspergillus niger*,  $139 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) et PVA à Mw 85000-124000 99+% Hydrolysé (CAS 9002-89-5) de chez Sigma-Aldrich

Penicilin-Streptomycin (PS) 100x Gibco de chez Dominique Dutscher

TRYPsin 0,05% (ref : 25300054), Sérum bovin de fœtus (FBS) originaire de Nouvelle-Zélande (ref : 10091148), DMEM, haute concentration en glucose, GlutaMAX™ avec supplément pyruvate (ref : 10569010) ont été achetés chez ThermoFischer

MWCNTs 95 (ref cyl-310) de chez Nanocills

Catalase (du foie de bovin,  $16000 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) et FAD-Glucose Dehydrogenase (du *Pseudomonas* sp.,  $566 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), de chez Sorachim.

- **Préparations des liants et membranes**

- **Solution de liant PVA**

Dissoudre 2 g de PVA ( $M_w = 85000 - 124000$  g/mol) dans un mélange de 16 ml de DMSO et 4 ml d'eau distillée à  $T^\circ = 80^\circ\text{C}$ . Une fois le PVA dissous, laisser revenir à température ambiante, puis, placer le mélange sous vide afin d'éliminer l'oxygène dissout en solution en prenant soin d'éviter les projections. Le mélange est ensuite replacé sur une plaque chauffante pendant 30 min. Laisser revenir la solution à température ambiante.

La solution de liant est prête à l'emploi.

- **Solution de chitosan**

Dissoudre 0,2 g de chitosan dans un mélange de 20 ml d'eau désionisée (ED) et 0,1 ml d'acide acétique 100% à  $T^\circ = 80^\circ\text{C}$ . Après 2 h sous agitation mécanique, la solution est agitée jusqu'à température ambiante pendant 1 h.

La solution de liant est prête à l'emploi.

- **Solution de chitosan réticulé**

Dissoudre 0,2 g de chitosan dans un mélange de 20 ml d'eau désionisée (ED) et 0,1 ml d'acide acétique 100% à  $T^\circ = 80^\circ\text{C}$ . Après 2 h sous agitation mécanique, ajouter 150  $\mu\text{L}$  d'une solution de génépine à 6  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . (génépine dissous dans un mélange ED/DMSO à 9/1). Après 1 h sous agitation, faire revenir la solution à température ambiante pendant 1 h, toujours sous agitation mécanique.

La solution de liant est prête à l'emploi.

- **Membrane d'hydrogel de PVA**

Dans un bécher de 20 ml, faire chauffer 16 ml de DMSO et 4 ml d'eau désionisée (ED) ( $T^\circ = 55^\circ\text{C}$ ), peser 1,000 g de PVA ( $M_w = 85000 - 124000$  g/mol) ajouté à la solution. Après 4 h d'homogénéisation, augmenter la température à 75-80°C pendant une heure. Une fois le PVA dissous, placer le bécher sous vide afin d'éliminer l'oxygène dissout en solution en prenant soin d'éviter les projections. Puis replacer le bécher sur la plaque chauffante pendant 15-30 min.

La solution de PVA obtenue est ensuite coulée dans un moule adapté, puis, afin d'obtenir un hydrogel de PVA, la solution doit être congelée à  $-20^\circ\text{C}$  pendant 8h. La membrane est ensuite décongelée dans une solution d'eau distillée. Effectuer 10 rinçages dans un grand volume d'eau distillée (500 ml ED) répartis sur 48h.

- **Fabrication des électrodes**

- **Fabrication d'une cathode Fe/N-rGO-PVA par compression**

Les électrodes par compression ont été fabriquées en mélangeant 30 mg de catalyseur Fe/N-rGO et 30 mg d'une solution de liant de PVA. La pâte homogène obtenue est ensuite compressée à l'aide d'une presse hydraulique afin d'obtenir une électrode sous la forme de pastille de diamètre 5 mm et de 3 mm d'épaisseur. Un fil de cuivre est ensuite connecté à une face à l'aide d'une colle conductrice. Du silicone est ensuite ajouté de manière à recouvrir le fil conducteur et la colle, et laissant ainsi une face de l'électrode correspondant à la surface électrochimique active de 0,195 cm<sup>2</sup>. Après 12 h de séchage, la cathode est alors plongée dans une solution de PBS (0.14 M NaCl ; 0.0027 M KCl ; 0.01 M Phosphate buffer) pendant 12 h afin de l'équilibrer.

- **Fabrication d'une cathode Fe/N-rGO-Chitosan par compression**

Le même protocole que pour l'électrode compressée avec le liant PVA est utilisé, toutefois, la solution de liant est remplacée par une solution de chitosan et la quantité ajoutée est de 60 mg au lieu de 30 mg de PVA.

- **Fabrication d'une cathode Fe/N-rGO-Chitosan-Génépine par compression**

Le même protocole que pour l'électrode compressée avec le liant chitosan est utilisé, toutefois, la solution de liant est remplacée par une solution de chitosan réticulé avec génépine.

- **Fabrication des bioanodes GOx-Cat-NQ-MWCNTs**

Les électrodes ont été obtenues en mélangeant 30 mg de nanotubes de carbone, 10 mg de p-naphtoquinone, 10 mg de glucose oxidase provenant d'*Aspergillus Niger* (139 U.mg<sup>-1</sup>), 10 mg de catalase d'origine bovine et 100 µL d'ED. La pâte homogène est ensuite compressée à l'aide d'une presse hydraulique afin d'obtenir une électrode sous la forme de pastille de 5 mm de diamètre et de 3 mm d'épaisseur. Un fil de cuivre est ensuite connecté à une face à l'aide d'une colle conductrice. Du silicone est ensuite ajouté de manière à recouvrir le fil conducteur et la colle, et laissant ainsi une face de l'électrode correspondant à la surface électrochimique active de 0,195 cm<sup>2</sup>. Après 12h de séchage, l'anode est alors plongée dans une solution de PBS (0.14 M NaCl ; 0.0027 M KCl ; 0.01 M Phosphate buffer) pendant 24h afin d'éliminer le surplus de p-naphtoquinone et de l'équilibrer.

- **Fabrication des anodes FAD-GDH-NQ-MWCNTs**

Le même procédé que pour l'anode GOx-Cat-NQ-MWCNTs a été utilisé en remplaçant la GOx par 3 mg de FAD-GDH et en supprimant la catalase.

- **Fabrication d'une cathode Fe/N-rGO par lyophilisation**

Dans un flacon en polypropylène surmonté d'un bouchon perforé à l'emporte-pièce au diamètre de la tige d'homogénéisation de l'ultra-Turrax, peser 1,5 g d'oxyde de graphène réduit dopé Fe/N, ajouter 15 ml de solution de chitosan et 15 ml d'ED. Homogénéiser la solution à l'aide de l'ultra-Turrax pendant 30 min à 20 000 rpm.

Après homogénéisation, couler la solution dans un moule adapté comportant un puit de 0,5 cm de diamètre et 0,6 cm d'épaisseur, puis congeler la solution à -20°C pendant 12 h. Le mélange est ensuite lyophilisé à -20°C pendant 72°C.

Après Lyophilisation, les électrodes sont pesées et mesurées (diamètre et épaisseur), puis plongées dans une solution d'éthanol absolu pendant une heure, les électrodes sont ensuite séchées via une

étuve à 60°C pendant 12h. On ajoute ensuite un contact électrique aux électrodes à l'aide de pâte de carbone, une fois la pâte sèche (12h) isoler le contact électrique à l'aide d'une solution de silicone laissée ensuite sécher (2h). Les électrodes sont ensuite plongées dans une série de bains d'éthanol à différentes compositions (éthanol/ED), pendant une heure pour chaque composition : 100/0 ; 80/20 ; 60/40 ; 50/50 ; 40/60 ; 20/80. Enfin, les électrodes sont plongées et stockées dans une solution saline de PBS et peuvent être étudiées via électrochimie.

- **Fabrication d'une cathode Fe/N-rGO par lyophilisation sur support conducteur**

Le même procédé que les électrodes lyophilisées a été effectué, à la différence que la solution a été coulée sur un support conducteur en mousse de polyuréthane contenant un fil conducteur en or.

## ● **Mesures électrochimiques**

Les caractérisations électrochimiques du catalyseur par RDE ont été effectuées dans des solutions aqueuses de PBS (0.14 M NaCl ; 0.0027 M KCl ; 0.01 M Phosphate buffer), dans une cellule électrochimique à trois électrodes à l'aide d'un potentiostat Biologic. L'électrode tournante de carbone vitreux de 3 mm de diamètre a été dans un premier temps poncée, puis chargée avec de 300  $\mu\text{G}\cdot\text{cm}^{-2}$  en Fe/N-rGO (2 mg de catalyseur dissout dans une solution de 220  $\mu\text{L}$  de Naffion117 et 780  $\mu\text{L}$  d'isopropanol). Un fil de platine a été utilisé comme contre-électrode et une électrode au calomel saturé (ECS) a servi d'électrode de référence. Tous les potentiels donnés dans ce travail sont référés à l'électrode de référence ECS.

Les caractérisations électrochimiques de toutes les électrodes (voltampérométrie cyclique, chronoampérométrie, potentiel en circuit ouvert et mesures de décharge à charge constante) ont été effectuées dans des solutions aqueuses de PBS, dans une cellule électrochimique à trois électrodes à l'aide d'un potentiostat Biologic. Un fil de platine a été utilisé comme contre-électrode et une électrode au calomel saturé (SCE) a servi d'électrode de référence.

Pour la caractérisation électrochimique des biopiles, l'anode a été identifiée en tant qu'électrode de travail tandis que la cathode a été branchée comme électrode de contre-référence. Toutes les expériences ont été menées dans une solution saline de tampon phosphate (PBS, 0.14 M NaCl ; 0.0027 M KCl ; 0.01 M tampon Phosphate pH 7,4) comme électrolyte de support à 25, 30 ou 37 °C.

- **Biologie**

- **Tests de Cytocompatibilité des matériaux**

La cytocompatibilité des différents matériaux a été testée dans une plaque de 24 puits (P24) face aux cellules fibroblaste 3T3-L1. Trois tests ont été effectués dans 3 différents puits pour chaque échantillon, ainsi une plaque de 24 puits (P24) permet de caractériser 7 matériaux avec en plus une série de 3 puits témoins (sans matériau). La P24 est organisé de la manière suivante :

1. Témoins :

2. Chitosan :

Dépôt de 100  $\mu$ L de solution de chitosan dans une série de trois puits. Une fois sec, 100  $\mu$ L d'éthanol 70° sont ajoutés dans chaque puits.

3. Chitosan-Génépine :

Dépôt de 100  $\mu$ L de solution de chitosan réticulé dans une série de trois puits. Une fois sec, 100  $\mu$ L d'éthanol 70° sont ajoutés dans chaque puits.

4. PVA :

A l'aide d'un emporte-pièce, on découpe l'hydrogel d'un diamètre inférieur à ceux des puits de la plaque d'ensemencement. L'opération est répétée trois fois, les hydrogels découpés sont ensuite pesés.

Une fois pesés, les échantillons sont placés dans des tubes séparés, on ajoute une solution d'éthanol à 70° afin de recouvrir le matériau.

5. Fe/N-rGO :

Dans un tube adapté, 15 mg de catalyseur sont pesés auxquels sont ajoutés 1,5 ml d'éthanol. La solution est ensuite homogénéisée pendant 20 mn. 100  $\mu$ L du mélange sont déposés dans une série de trois puits.

6. Au<sub>50</sub>/Pt<sub>50</sub>-rGO :

Dans un tube adapté, 15 mg de catalyseur sont pesés auxquels sont ajoutés 1,5 ml d'éthanol. La solution est ensuite homogénéisée pendant 20 mn. 100  $\mu$ L du mélange sont déposés dans une série de trois puits.

7. Au<sub>70</sub>/Pt<sub>30</sub>-rGO :

Dans un tube adapté, 15 mg de catalyseur sont pesés auxquels sont ajoutés 1,5 ml d'éthanol. La solution est ensuite homogénéisée pendant 20 mn. 100  $\mu$ L du mélange sont déposés dans une série de trois puits.

8. Pt-rGO :

Dans un tube adapté, 15 mg de catalyseur sont pesés auxquels sont ajoutés 1,5 ml d'éthanol. La solution est ensuite homogénéisée pendant 20 mn. 100  $\mu$ L du mélange sont déposés dans une série de trois puits.

La plaque est ensuite laissée sous hotte de culture cellulaire pendant 48 h afin que l'éthanol soit évaporé. Chaque échantillon est ensuite rincé 4 fois avec du milieu culturel DMEM. Puis on recouvre l'échantillon de milieu cellulaire et on place la P24 dans une étuve à 37°C avec flux de CO<sub>2</sub> à 5% pendant 2h, après quoi les cellules 3T3-L1 sont ajoutées (M = 2.10<sup>4</sup> cellules par puit).

L'observation est effectuée le lendemain.

- **Tests de Cytocompatibilité des électrodes**

Le même protocole a été effectué que précédemment en remplaçant les matériaux par les électrodes.

- **Implantations**

- **Methode :**

Un total de 30 rats a été utilisé pour l'étude qui a été approuvée par le comité d'éthique des expériences animales de l'université de Grenoble. Le bien-être et la santé des animaux ont été approuvés par le comité de protection et d'utilisation des animaux de la directive du Conseil des Communautés européennes et les expériences ont été réalisées conformément à leur principes (Directives du Conseil des Communautés Européennes L358-86 / 609 / CEE) et également sous licence française du ministère de l'agriculture (numéros 38018 et 381141). Deux implants ont été préparés et implantés dans chaque rat en région intra-abdominale pour la caractérisation histologique. Tous les implants ont été revêtus d'hydrogel de PVA comme membrane séparative. Les rats ont été anesthésiés, une laparotomie médiane a été réalisée pour insérer les cathodes dans l'espace rétropéritonéal en position latérale gauche. La paroi abdominale musculaire et la peau ont été suturées séparément et les animaux ont pu se remettre de l'anesthésie. Pour la période postopératoire, jusqu'à 180 jours, les rats ont été nourris avec un régime standard et de l'eau à volonté dans une pièce avec un cycle lumière/obscurité de 12 h à une température de 22°C +/- 2°C.

Après la période d'implantation, les implants ont été analysés *ex vivo*.

Immédiatement après leur extraction du corps des rats, les échantillons biologiques ont été immergés pendant 24 h dans une solution de formaldéhyde à 4% et les cathodes ou biopiles dans une solution saline de PBS (0.14 M NaCl ; 0.0027 M KCl ; 0.01 M tampon Phosphate pH 7,4 et 5 mM glucose). Le traitement des cassettes contenant ces échantillons de tissus a été effectué automatiquement dans un processeur de tissus semi-fermé de paillasse Leica TP1020. La coupe en tranches de 50 µm a été réalisée à l'aide d'un microtome rotatif semi-automatisé Leica RM2245. Une investigation de routine de la coloration histologique HES (Hématoxyline – Eosin – Safran) a été réalisée. Les échantillons de cathodes et biopiles ont été caractérisés par électrochimie (CA, CP, LSV...) après avoir retiré la membrane de PVA.



## Références

- [1] A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin, and S. Cosnier, “Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes,” *Nat. Commun.*, vol. 2, no. 1, pp. 370–376, 2011, doi: 10.1038/ncomms1365.
- [2] “World population projected to reach 9.8 billion in 2050, and 11.2 billion in 2100 | UN DESA | United Nations Department of Economic and Social Affairs.” <https://www.un.org/development/desa/en/news/population/world-population-prospects-2017.html> (accessed Jan. 17, 2020).
- [3] “Espérance de vie - Mortalité – Tableaux de l’économie française | Insee.” <https://www.insee.fr/fr/statistiques/3676610?sommaire=3696937#consulter> (accessed Jan. 17, 2020).
- [4] “CESE - Informez-vous grâce au CESE, conseil économique social et environnemental.” <https://www.lecese.fr/> (accessed Jan. 31, 2020).
- [5] “Qu’est-ce qu’un dispositif médical ? | AFMPS.” [https://www.afmps.be/fr/public\\_information/dispositifs\\_medicaux/qu\\_est-ce\\_qu\\_un\\_dispositif\\_medical\\_](https://www.afmps.be/fr/public_information/dispositifs_medicaux/qu_est-ce_qu_un_dispositif_medical_) (accessed Jan. 17, 2020).
- [6] M. Gamella, A. Koushanpour, and E. Katz, “Biofuel cells – Activation of micro- and macro-electronic devices,” *Bioelectrochemistry*, vol. 119, pp. 33–42, 2018, doi: 10.1016/j.bioelechem.2017.09.002.
- [7] N. Gupta, M. Lou Kiley, F. Anthony, C. Young, S. Brar, and K. Kwaku, “Multi-Center, Community-Based Cardiac implantable electronic devices registry: Population, device utilization, and outcomes,” *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 5, no. 3, pp. 1–9, 2015, doi: 10.1161/JAHA.115.002798.
- [8] M. J. P. Raatikainen, D. O. Arnar, B. Merkely, A. J. Camm, and G. Hindricks, “Access to and clinical use of cardiac implantable electronic devices and interventional electrophysiological procedures in the European Society of Cardiology Countries: 2016 Report from the European Heart Rhythm Association,” *Europace*, vol. 18, pp. iii1–iii79, 2016, doi: 10.1093/europace/euw244.
- [9] T. SHIMIZU, “Continuous Subcutaneous Insulin Infusion Therapy,” *Juntendo Med. J.*, vol. 58, no. 6, pp. 485–489, 2014, doi: 10.14789/pjmj.58.485.
- [10] J. Pickup, “Foreword,” *Handb. Diabetes Technol.*, pp. v–vi, 2019, doi: 10.1007/978-3-319-98119-2.
- [11] P. Mohacsi and P. Leprince, “The CARMAT total artificial heart,” *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.*, vol. 46, no. 6, pp. 933–934, 2014, doi: 10.1093/ejcts/ezu333.
- [12] I. Netuka, P. Sood, Y. Pya, D. Zimpfer, T. Krabatsch, J. Garbade, V. Rao, M. Morshuis, S. Marasco, F. Beyersdorf, L. Damme, and J. D. Schmitto, “Fully Magnetically Levitated Left Ventricular Assist System for Treating Advanced HF A Multicenter Study,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 66, no. 23, pp. 2579–2589, 2015, doi: 10.1016/j.jacc.2015.09.083.
- [13] M. R. Mehra *et al.*, “A fully magnetically levitated circulatory pump for advanced heart failure,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 376, no. 5, pp. 440–450, 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1610426.
- [14] S. L. M. van Loon, A. I. P. M. Smits, A. Driessen-Mol, F. P. T. Baaijens, and C. V. C. Boute, “The Immune Response in In Situ Tissue Engineering of Aortic Heart Valves,” *Calcif. Aortic Valve Dis.*, no. 2013, pp. 207–245, 2013, doi: 10.5772/54354.
- [15] J. D. Bryers, C. M. Giachelli, and B. D. Ratner, “Engineering biomaterials to integrate and heal:

- The biocompatibility paradigm shifts," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 8, pp. 1898–1911, 2012, doi: 10.1002/bit.24559.
- [16] J. M. Anderson, A. Rodriguez, and D. T. Chang, "Foreign body reaction to biomaterials," *Semin. Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 86–100, 2008, doi: 10.1016/j.smim.2007.11.004.
- [17] J. M. Anderson, "Biological Responses To Materials," *Annu. Rev.*, vol. 31, pp. 81–110, 2001, [Online]. Available: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org).
- [18] D. F. Williams, "On the nature of biomaterials," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5897–5909, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.
- [19] J. Alcaraz and J. A. Conception, "Conception guidée par la physiologie de biopiles bioinspirées implantables To cite this version : HAL Id : tel-01473414 Jean-Pierre Alcaraz Conception guidée par la physiologie de biopiles bioinspirées implantables," 2017.
- [20] A. Zebda, J. P. Alcaraz, P. Vadgama, S. Shleev, S. D. Minteer, F. Boucher, P. Cinquin, and D. K. Martin, "Challenges for successful implantation of biofuel cells," *Bioelectrochemistry*, vol. 124, pp. 57–72, 2018, doi: 10.1016/j.bioelechem.2018.05.011.
- [21] M. Ga and M. Ga, "G20 SR Specifications."
- [22] M. Ga and M. Ga, "G70 DR Specifications."
- [23] P. Mri, "Eucuro SR(-T), DR(-T)," vol. 49, no. 0, 2014.
- [24] B. Scrosati, "History of lithium batteries," *J. Solid State Electrochem.*, vol. 15, no. 7–8, pp. 1623–1630, 2011, doi: 10.1007/s10008-011-1386-8.
- [25] J. M. Andújar and F. Segura, "Fuel cells: History and updating. A walk along two centuries," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 13, no. 9, pp. 2309–2322, 2009, doi: 10.1016/j.rser.2009.03.015.
- [26] N. Imanishi, A. C. Luntz, and P. Bruce, *The lithium air battery: Fundamentals*, vol. 9781489980. 2014.
- [27] D. Linden and T. B. Reddy, *HANDBOOK OF BATTERIES*. .
- [28] X. Wei and J. Liu, "Power sources and electrical recharging strategies for implantable medical devices," *Front. Energy Power Eng. China*, vol. 2, no. 1, pp. 1–13, 2008, doi: 10.1007/s11708-008-0016-3.
- [29] E. Romero, R. O. Warrington, and M. R. Neuman, "Energy scavenging sources for biomedical sensors," *Physiol. Meas.*, vol. 30, no. 9, 2009, doi: 10.1088/0967-3334/30/9/R01.
- [30] D. H. Kim, H. J. Shin, H. Lee, C. K. Jeong, H. Park, G. T. Hwang, H. Y. Lee, D. J. Joe, J. H. Han, S. H. Lee, J. Kim, B. Joung, and K. J. Lee, "In Vivo Self-Powered Wireless Transmission Using Biocompatible Flexible Energy Harvesters," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 27, no. 25, pp. 1–8, 2017, doi: 10.1002/adfm.201700341.
- [31] A. Nasiri, S. A. Zabalawi, and D. C. Jeutter, "A linear permanent magnet generator for powering implanted electronic devices," *IEEE Trans. Power Electron.*, vol. 26, no. 1, pp. 192–199, 2011, doi: 10.1109/TPEL.2010.2055891.
- [32] R. J. M. Vullers, R. van Schaijk, I. Doms, C. Van Hoof, and R. Mertens, "Micropower energy harvesting," *Solid. State. Electron.*, vol. 53, no. 7, pp. 684–693, 2009, doi: 10.1016/j.sse.2008.12.011.
- [33] Y. Yang, X. J. Wei, and J. Liu, "Suitability of a thermoelectric power generator for implantable

- medical electronic devices," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 40, no. 18, pp. 5790–5800, 2007, doi: 10.1088/0022-3727/40/18/042.
- [34] N. Jiang, J. Wu, H. Qing, Y. Cao, and Y. Yang, "The relationship between expression of mitogen-activated protein kinase kinase 4 and metastasis in oral squamous cell carcinoma," *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, vol. 29, no. 5, pp. 555–558, 2011.
- [35] E. Katz and K. MacVittie, "Implanted biofuel cells operating in vivo-methods, applications and perspectives-feature article," *Energy Environ. Sci.*, vol. 6, no. 10, pp. 2791–2803, 2013, doi: 10.1039/c3ee42126k.
- [36] C. Henry, "Basal metabolic rate studies in humans: measurement and development of new equations," *Public Health Nutr.*, vol. 8, no. 7a, pp. 1133–1152, 2005, doi: 10.1079/phn2005801.
- [37] V. Das, S. Padmanaban, K. Venkitesamy, R. Selvamuthukumar, F. Blaabjerg, and P. Siano, "Recent advances and challenges of fuel cell based power system architectures and control – A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 73, no. November 2016, pp. 10–18, 2017, doi: 10.1016/j.rser.2017.01.148.
- [38] S. Satyapal, J. Petrovic, C. Read, G. Thomas, and G. Ordaz, "The U.S. Department of Energy's National Hydrogen Storage Project: Progress towards meeting hydrogen-powered vehicle requirements," *Catal. Today*, vol. 120, no. 3-4 SPEC. ISS., pp. 246–256, 2007, doi: 10.1016/j.cattod.2006.09.022.
- [39] S. Shleev, A. Bergel, and L. Gorton, "Biological fuel cells: Divergence of opinion," *Bioelectrochemistry*, vol. 106, pp. 1–2, 2015, doi: 10.1016/j.bioelechem.2015.07.006.
- [40] M. C. Potter, "Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 84, no. 571, pp. 260–276, 1911, doi: 10.1098/rspb.1911.0073.
- [41] A. T. Yahiro, S. M. Lee, and D. O. Kimble, "Bioelectrochemistry. I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies," *BBA - Spec. Sect. Biophys. Subj.*, vol. 88, no. 2, pp. 375–383, 1964, doi: 10.1016/0926-6577(64)90192-5.
- [42] B. Persson, L. Gorton, and G. Johansson, "Biofuel anode for cell reactions involving nicotinamide adenine dinucleotide as a charge carrier," *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 16, no. 3, pp. 479–483, 1986, doi: 10.1016/0302-4598(86)80069-1.
- [43] M. J. Moehlenbrock and S. D. Minteer, "Extended lifetime biofuel cells," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37, no. 6, pp. 1188–1196, 2008, doi: 10.1039/B708013C.
- [44] N. Mano, F. Mao, and A. Heller, "Characteristics of a Miniature Compartment-less Glucose - O<sub>2</sub> Biofuel Cell and Its Operation in a Living Plant," no. 13, pp. 6588–6594, 2003.
- [45] F. Gao, L. Viry, M. Maugey, P. Poulin, and N. Mano, "Engineering hybrid nanotube wires for high-power biofuel cells," *Nat. Commun.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–7, 2010, doi: 10.1038/ncomms1000.
- [46] V. Flexer and N. Mano, "From dynamic measurements of photosynthesis in a living plant to sunlight transformation into electricity," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 4, pp. 1444–1449, 2010, doi: 10.1021/ac902537h.
- [47] P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J. P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathé, P. Porcu, and S. Cosnier, "A glucose BioFuel cell implanted in Rats," *PLoS One*, vol. 5, no. 5, pp. 1–7, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010476.
- [48] M. Rasmussen, R. E. Ritzmann, I. Lee, A. J. Pollack, and D. Scherson, "An implantable biofuel

- cell for a live insect," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 3, pp. 1458–1460, 2012, doi: 10.1021/ja210794c.
- [49] K. Shoji, Y. Akiyama, M. Suzuki, T. Hoshino, N. Nakamura, H. Ohno, and K. Morishima, "Insect biofuel cells using trehalose included in insect hemolymph leading to an insect-mountable biofuel cell," *Biomed. Microdevices*, vol. 14, no. 6, pp. 1063–1068, 2012, doi: 10.1007/s10544-012-9706-z.
- [50] K. MacVittie, J. Halámek, L. Halámková, M. Southcott, W. D. Jemison, R. Lobel, and E. Katz, "From 'cyborg' lobsters to a pacemaker powered by implantable biofuel cells," *Energy Environ. Sci.*, vol. 6, no. 1, pp. 81–86, 2013, doi: 10.1039/c2ee23209j.
- [51] J. A. Castorena-Gonzalez, C. Foote, K. MacVittie, J. Halámek, L. Halámková, L. A. Martinez-Lemus, and E. Katz, "Biofuel Cell Operating in Vivo in Rat," *Electroanalysis*, vol. 25, no. 7, pp. 1579–1584, 2013, doi: 10.1002/elan.201300136.
- [52] A. Zebda, S. Cosnier, J.-P. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui, and P. Cinquin, "Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices," *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 1516, 2013, doi: 10.1038/srep01516.
- [53] F. C. P. F. Sales, R. M. Iost, M. V. A. Martins, M. C. Almeida, and F. N. Crespilho, "An intravenous implantable glucose/dioxygen biofuel cell with modified flexible carbon fiber electrodes," *Lab Chip*, vol. 13, no. 3, pp. 468–474, 2013, doi: 10.1039/c2lc41007a.
- [54] V. Andoralov, M. Falk, D. B. Suyatin, M. Granmo, J. Sotres, R. Ludwig, V. O. Popov, J. Schouenborg, Z. Blum, and S. Shleev, "Biofuel cell based on microscale nanostructured electrodes with inductive coupling to rat brain neurons," *Sci. Rep.*, vol. 3, pp. 1–11, 2013, doi: 10.1038/srep03270.
- [55] S. El Ichi-Ribault, J. P. Alcaraz, F. Boucher, B. Boutaud, R. Dalmolin, J. Boutonnat, P. Cinquin, A. Zebda, and D. K. Martin, "Remote wireless control of an enzymatic biofuel cell implanted in a rabbit for 2 months," *Electrochim. Acta*, vol. 269, pp. 360–366, 2018, doi: 10.1016/j.electacta.2018.02.156.
- [56] "Définitions : abiotique - Dictionnaire de français Larousse." <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/abiotique/109?q=abiotique#107> (accessed Feb. 01, 2020).
- [57] "ABIOTIQUE : Définition de ABIOTIQUE." <https://www.cnrtl.fr/definition/abiotique> (accessed Feb. 01, 2020).
- [58] J. O. M. Bockris, B. J. Piersma, and E. Gileadi, "Anodic oxidation of cellulose and lower carbohydrates," *Electrochim. Acta*, vol. 9, no. 10, pp. 1329–1332, 1964, doi: 10.1016/0013-4686(64)87009-2.
- [59] P. Feb, "United states patent office 2,310,383," no. 2, pp. 2–5, 1943.
- [60] S. Kerzenmacher, J. Ducreé, R. Zengerle, and F. von Stetten, "An abiotically catalyzed glucose fuel cell for powering medical implants: Reconstructed manufacturing protocol and analysis of performance," *J. Power Sources*, vol. 182, no. 1, pp. 66–75, 2008, doi: 10.1016/j.jpowsour.2008.03.049.
- [61] "The\_Bioautofuel\_Cell\_\_A\_Device\_for\_Pacemaker\_Power.34.pdf." .
- [62] P. Woias, Y. Manoli, T. Nann, and F. Stetten, "Energy harvesting for autonomous microsystems," *MST news*, vol. 4, p. 42, 2005, [Online]. Available: [http://www.imtek.uni-freiburg.de/content/pdf/public/2005/energy\\_harvesting\\_@\\_mstnews\\_2005.pdf](http://www.imtek.uni-freiburg.de/content/pdf/public/2005/energy_harvesting_@_mstnews_2005.pdf).

- [63] F. v. Stetten, S. Kerzenmacher, A. Lorenz, V. Chokkalingam, N. Miyakawa, R. Zengerle, and J. Ducree, "A One-Compartment, Direct Glucose Fuel Cell for Powering Long-Term Medical Implants," no. January, pp. 934–937, 2006, doi: 10.1109/memsys.2006.1627954.
- [64] K. Elouarzaki, A. Le Goff, M. Holzinger, J. Thery, and S. Cosnier, "Electrocatalytic oxidation of glucose by rhodium porphyrin-functionalized MWCNT electrodes: Application to a fully molecular catalyst-based glucose/O<sub>2</sub> fuel cell," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 34, pp. 14078–14085, 2012, doi: 10.1021/ja304589m.
- [65] Y. Holade, K. Macvittie, T. Conlon, N. Guz, K. Servat, T. W. Napporn, K. B. Kokoh, and E. Katz, "Pacemaker Activated by an Abiotic Biofuel Cell Operated in Human Serum Solution," *Electroanalysis*, vol. 26, no. 11, pp. 2445–2457, 2014, doi: 10.1002/elan.201400440.
- [66] S. Zhao, P. Gai, W. Yu, H. Li, and F. Li, "High-performance non-enzymatic biofuel cells based on an organic copper complex cathode and a nanoporous gold nanoparticle anode," *Chem. Commun.*, vol. 55, no. 13, pp. 1887–1890, 2019, doi: 10.1039/C8CC09333D.
- [67] R.F. Drake, B. K. Kusserow, S. Messinger, and S. Matsuda, "A Tissue Implantable Fuel Cell Power Supply." American Society for Artificial Internal Organs, pp. 199–205, 1970.
- [68] J. Newnham, "Animal Experiments," *Br. Med. J.*, vol. 1, no. 5794, p. 250, 1972, doi: 10.1136/bmj.1.5794.250.
- [69] A. J. Bard, L. R. Faulkner, N. York, C. @bullet, W. Brisbane, and S. E. Toronto, *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*. 1944.
- [70] E. Yeager, "Dioxygen electrocatalysis: mechanisms in relation to catalyst structure," *J. Mol. Catal.*, vol. 38, no. 1–2, pp. 5–25, 1986, doi: 10.1016/0304-5102(86)87045-6.
- [71] S. Gottesfeld, I. D. Raistrick, and S. Srinivasan, "Oxygen Reduction Kinetics on a Platinum RDE Coated with a Recast Nafion Film," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 134, no. 6, pp. 1455–1462, 1987, doi: 10.1149/1.2100689.
- [72] H. A. Gasteiger, S. S. Kocha, B. Sompalli, and F. T. Wagner, "Activity benchmarks and requirements for Pt, Pt-alloy, and non-Pt oxygen reduction catalysts for PEMFCs," *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 56, no. 1-2 SPEC. ISS., pp. 9–35, 2005, doi: 10.1016/j.apcatb.2004.06.021.
- [73] D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski, and R. S. Ruoff, "The chemistry of graphene oxide," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 1, pp. 228–240, 2010, doi: 10.1039/b917103g.
- [74] Y. Li and Y. Wu, "J. Am. Chem. Soc., 2009, 131 (16), pp 5851–5857.pdf," vol. 43210, no. 22, pp. 5851–5857, 2009.
- [75] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, M. I. Katsnelson, I. V. Grigorieva, S. V. Dubonos, and A. A. Firsov, "Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene," *Nature*, vol. 438, no. 7065, pp. 197–200, 2005, doi: 10.1038/nature04233.
- [76] A. A. Balandin, S. Ghosh, W. Bao, I. Calizo, D. Teweldebrhan, F. Miao, and C. N. Lau, "Superior thermal conductivity of single-layer graphene," *Nano Lett.*, vol. 8, no. 3, pp. 902–907, 2008, doi: 10.1021/nl0731872.
- [77] J. C. Meyer, A. K. Geim, M. I. Katsnelson, K. S. Novoselov, T. J. Booth, and S. Roth, "The structure of suspended graphene sheets," *Nature*, vol. 446, no. 7131, pp. 60–63, 2007, doi: 10.1038/nature05545.
- [78] S. Stankovich, D. A. Dikin, G. H. B. Dommett, K. M. Kohlhaas, E. J. Zimney, E. A. Stach, R. D. Piner, S. B. T. Nguyen, and R. S. Ruoff, "Graphene-based composite materials," *Nature*, vol. 442, no. 7100, pp. 282–286, 2006, doi: 10.1038/nature04969.

- [79] I. Katsounaros, S. Cherevko, A. R. Zeradjanin, and K. J. J. Mayrhofer, "Oxygen electrochemistry as a cornerstone for sustainable energy conversion," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 53, no. 1, pp. 102–121, 2014, doi: 10.1002/anie.201306588.
- [80] H. Yano, M. Kataoka, H. Yamashita, H. Uchida, and M. Watanabe, "Oxygen reduction activity of carbon-supported Pt-M (M = V, Ni, Cr, Co, and Fe) alloys prepared by nanocapsule method," *Langmuir*, vol. 23, no. 11, pp. 6438–6445, 2007, doi: 10.1021/la070078u.
- [81] V. R. Stamenkovic, B. S. Mun, K. J. J. Mayrhofer, P. N. Ross, and N. M. Markovic, "Effect of surface composition on electronic structure, stability, and electrocatalytic properties of Pt-transition metal alloys: Pt-skin versus Pt-skeleton surfaces," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 27, pp. 8813–8819, 2006, doi: 10.1021/ja0600476.
- [82] Y. Zheng, Y. Jiao, M. Jaroniec, Y. Jin, and S. Z. Qiao, "Nanostructured metal-free electrochemical catalysts for highly efficient oxygen reduction," *Small*, vol. 8, no. 23, pp. 3550–3566, 2012, doi: 10.1002/smll.201200861.
- [83] Z. Wu, M. Song, J. Wang, and X. Liu, "Recent progress in nitrogen-doped metal-free electrocatalysts for oxygen reduction reaction," *Catalysts*, vol. 8, no. 5, pp. 1–17, 2018, doi: 10.3390/catal8050196.
- [84] A. Ambrosi, S. Y. Chee, B. Khezri, R. D. Webster, Z. Sofer, and M. Pumera, "Metallic impurities in graphenes prepared from graphite can dramatically influence their properties," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 51, no. 2, pp. 500–503, 2012, doi: 10.1002/anie.201106917.
- [85] L. Wang, A. Ambrosi, and M. Pumera, "'Metal-free' catalytic oxygen reduction reaction on heteroatom-doped graphene is caused by trace metal impurities," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 52, no. 51, pp. 13818–13821, 2013, doi: 10.1002/anie.201309171.
- [86] K. Parvez, S. Yang, Y. Hernandez, A. Winter, A. Turchanin, X. Feng, and K. Müllen, "Nitrogen-doped graphene and its iron-based composite as efficient electrocatalysts for oxygen reduction reaction," *ACS Nano*, vol. 6, no. 11, pp. 9541–9550, 2012, doi: 10.1021/nn302674k.
- [87] Z. Chen, D. Higgins, A. Yu, L. Zhang, and J. Zhang, "A review on non-precious metal electrocatalysts for PEM fuel cells," *Energy Environ. Sci.*, vol. 4, no. 9, p. 3167, 2011, doi: 10.1039/c0ee00558d.
- [88] F. Jaouen, E. Proietti, M. Lefèvre, R. Chenitz, J. P. Dodelet, G. Wu, H. T. Chung, C. M. Johnston, and P. Zelenay, "Recent advances in non-precious metal catalysis for oxygen-reduction reaction in polymer electrolyte fuel cells," *Energy Environ. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 114–130, 2011, doi: 10.1039/c0ee00011f.
- [89] G. Wu and P. Zelenay, "Nanostructured nonprecious metal catalysts for oxygen reduction reaction," *Acc. Chem. Res.*, vol. 46, no. 8, pp. 1878–1889, 2013, doi: 10.1021/ar400011z.
- [90] A. Zitolo, V. Goellner, V. Armel, M. T. Sougrati, T. Mineva, L. Stievano, E. Fonda, and F. Jaouen, "Identification of catalytic sites for oxygen reduction in iron- and nitrogen-doped graphene materials," *Nat. Mater.*, vol. 14, no. 9, pp. 937–942, 2015, doi: 10.1038/nmat4367.
- [91] L. Zheng, Y. Chen, Z. Zhuang, R. Shen, Y. Li, D. Wang, Z. Li, J. Dong, Y. Wang, W. Chen, and S. Ji, "Isolated Single Iron Atoms Anchored on N-Doped Porous Carbon as an Efficient Electrocatalyst for the Oxygen Reduction Reaction," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 56, no. 24, pp. 6937–6941, 2017, doi: 10.1002/anie.201702473.
- [92] W. J. Jiang, L. Gu, L. Li, Y. Zhang, X. Zhang, L. J. Zhang, J. Q. Wang, J. S. Hu, Z. Wei, and L. J. Wan, "Understanding the High Activity of Fe-N-C Electrocatalysts in Oxygen Reduction: Fe/Fe<sub>3</sub>C Nanoparticles Boost the Activity of Fe-N<sub>x</sub>," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 138, no. 10, pp.

3570–3578, 2016, doi: 10.1021/jacs.6b00757.

- [93] Y. Li, W. Zhou, H. Wang, L. Xie, Y. Liang, F. Wei, J.-C. Idrobo, S. J. Pennycook, and H. Dai, “An oxygen reduction electrocatalyst based on carbon nanotube–graphene complexes,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 6, pp. 394–400, 2012, doi: 10.1038/nnano.2012.72.
- [94] H. Zhang, S. Hwang, M. Wang, Z. Feng, S. Karakalos, L. Luo, Z. Qiao, X. Xie, C. Wang, D. Su, Y. Shao, and G. Wu, “Single Atomic Iron Catalysts for Oxygen Reduction in Acidic Media: Particle Size Control and Thermal Activation,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 139, no. 40, pp. 14143–14149, 2017, doi: 10.1021/jacs.7b06514.
- [95] Y. Zheng, D.-S. Yang, J. M. Kweun, C. Li, K. Tan, F. Kong, C. Liang, Y. J. Chabal, Y. Y. Kim, M. Cho, J.-S. Yu, and K. Cho, “Rational design of common transition metal-nitrogen-carbon catalysts for oxygen reduction reaction in fuel cells,” *Nano Energy*, vol. 30, no. August, pp. 443–449, 2016, doi: 10.1016/j.nanoen.2016.10.037.
- [96] W. Yang, X. Liu, X. Yue, J. Jia, and S. Guo, “Bamboo-like carbon nanotube/Fe<sub>3</sub>C nanoparticle hybrids and their highly efficient catalysis for oxygen reduction,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, no. 4, pp. 1436–1439, 2015, doi: 10.1021/ja5129132.
- [97] K. Strickland, E. Miner, Q. Jia, U. Tylus, N. Ramaswamy, W. Liang, M. T. Sougrati, F. Jaouen, and S. Mukerjee, “Highly active oxygen reduction non-platinum group metal electrocatalyst without direct metal-nitrogen coordination,” *Nat. Commun.*, vol. 6, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1038/ncomms8343.
- [98] U. I. Kramm, J. Herranz, N. Larouche, T. M. Arruda, M. Lefèvre, F. Jaouen, P. Bogdanoff, S. Fiechter, I. Abs-Wurmbach, S. Mukerjee, and J. P. Dodelet, “Structure of the catalytic sites in Fe/N/C-catalysts for O<sub>2</sub>-reduction in PEM fuel cells,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 14, no. 33, pp. 11673–11688, 2012, doi: 10.1039/c2cp41957b.
- [99] J. A. Varnell, E. C. M. Tse, C. E. Schulz, T. T. Fister, R. T. Haasch, J. Timoshenko, A. I. Frenkel, and A. A. Gewirth, “Identification of carbon-encapsulated iron nanoparticles as active species in non-precious metal oxygen reduction catalysts,” *Nat. Commun.*, vol. 7, pp. 1–9, 2016, doi: 10.1038/ncomms12582.
- [100] R. Cao, R. Thapa, H. Kim, X. Xu, M. G. Kim, Q. Li, N. Park, M. Liu, and J. Cho, “Promotion of oxygen reduction by a bio-inspired tethered iron phthalocyanine carbon nanotube-based catalyst,” *Nat. Commun.*, vol. 4, no. May, pp. 1–7, 2013, doi: 10.1038/ncomms3076.
- [101] P. Chen, T. Zhou, L. Xing, K. Xu, Y. Tong, H. Xie, L. Zhang, W. Yan, W. Chu, C. Wu, and Y. Xie, “Atomically Dispersed Iron–Nitrogen Species as Electrocatalysts for Bifunctional Oxygen Evolution and Reduction Reactions,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 56, no. 2, pp. 610–614, 2017, doi: 10.1002/anie.201610119.
- [102] H. Tan, J. Tang, J. Henzie, Y. Li, X. Xu, T. Chen, Z. Wang, J. Wang, Y. Ide, Y. Bando, and Y. Yamauchi, “Assembly of Hollow Carbon Nanospheres on Graphene Nanosheets and Creation of Iron-Nitrogen-Doped Porous Carbon for Oxygen Reduction,” *ACS Nano*, vol. 12, no. 6, pp. 5674–5683, 2018, doi: 10.1021/acsnano.8b01502.
- [103] A. R. Paulraj, Y. Kiros, B. Skårman, and H. Vidarsson, “Core/shell structure nano-iron/iron carbide electrodes for rechargeable alkaline iron batteries,” *J. Electrochem. Soc.*, vol. 164, no. 7, pp. A1665–A1672, 2017, doi: 10.1149/2.1431707jes.
- [104] Y. J. Sa, D. J. Seo, J. Woo, J. T. Lim, J. Y. Cheon, S. Y. Yang, J. M. Lee, D. Kang, T. J. Shin, H. S. Shin, H. Y. Jeong, C. S. Kim, M. G. Kim, T. Y. Kim, and S. H. Joo, “A General Approach to Preferential Formation of Active Fe-N<sub>x</sub> Sites in Fe-N/C Electrocatalysts for Efficient Oxygen

- Reduction Reaction," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 138, no. 45, pp. 15046–15056, 2016, doi: 10.1021/jacs.6b09470.
- [105] L. Lin, Q. Zhu, and A. W. Xu, "Noble-metal-free Fe-N/C catalyst for highly efficient oxygen reduction reaction under both alkaline and acidic conditions," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 31, pp. 11027–11033, 2014, doi: 10.1021/ja504696r.
- [106] Z. S. Wu, S. Yang, Y. Sun, K. Parvez, X. Feng, and K. Müllen, "3D nitrogen-doped graphene aerogel-supported Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as efficient electrocatalysts for the oxygen reduction reaction," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 22, pp. 9082–9085, 2012, doi: 10.1021/ja3030565.
- [107] H. Zhu, S. Zhang, Y. Huang, L. Wu, and S. Sun, "Monodisperse M," vol. 4, pp. 3–7, 2013.
- [108] Y. Su, H. Jiang, Y. Zhu, X. Yang, J. Shen, W. Zou, J. Chen, and C. Li, "Enriched graphitic N-doped carbon-supported Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as efficient electrocatalysts for oxygen reduction reaction," *J. Mater. Chem. A*, vol. 2, no. 20, pp. 7281–7287, 2014, doi: 10.1039/c4ta00029c.
- [109] N. A. Kumar, S. Gambarelli, F. Duclairoir, G. Bidan, and L. Dubois, "Synthesis of high quality reduced graphene oxide nanosheets free of paramagnetic metallic impurities," *J. Mater. Chem. A*, vol. 1, no. 8, p. 2789, 2013, doi: 10.1039/c2ta01036d.
- [110] S. Kaur and G. S. Dhillon, "The versatile biopolymer chitosan: Potential sources, evaluation of extraction methods and applications," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 40, no. 2, pp. 155–175, 2014, doi: 10.3109/1040841X.2013.770385.
- [111] H. Merzendorfer and L. Zimoch, "Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases," *J. Exp. Biol.*, vol. 206, no. 24, pp. 4393–4412, 2003, doi: 10.1242/jeb.00709.
- [112] Q. Wu, "3D Printing Of Multifunctional Chitosan-Based Hydrogel and Nanocomposites," 2018.
- [113] I. Younes and M. Rinaudo, "Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications," *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 3, pp. 1133–1174, 2015, doi: 10.3390/md13031133.
- [114] K. Tokuyasu, H. Ono, M. Mitsutomi, K. Hayashi, and Y. Mori, "Synthesis of a chitosan tetramer derivative,  $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcN through a partial N-acetylation reaction by chitin deacetylase," *Carbohydr. Res.*, vol. 325, no. 3, pp. 211–215, 2000, doi: 10.1016/S0008-6215(00)00004-5.
- [115] T. Philibert, B. H. Lee, and N. Fabien, "Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 181, no. 4, pp. 1314–1337, 2017, doi: 10.1007/s12010-016-2286-2.
- [116] G. A. F. Roberts, "Structure of Chitin and Chitosan," in *Chitin Chemistry*, London: Macmillan Education UK, 1992, pp. 1–53.
- [117] H. K. No and S. P. Meyers, "Preparation and characterization of chitin and chitosan- a review," *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, vol. 4, no. 2, pp. 27–52, 1995, doi: 10.1300/J030v04n02\_03.
- [118] Y. C. Wei, S. M. Hudson, J. M. Mayer, and D. L. Kaplan, "The crosslinking of chitosan fibers," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 30, no. 10, pp. 2187–2193, 1992, doi: 10.1002/pola.1992.080301013.
- [119] E. R. Welsh and R. R. Price, "Chitosan cross-linking with a water-soluble, blocked diisocyanate. 2. Solvates and hydrogels," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 5, pp. 1357–1361, 2003, doi: 10.1021/bm034111c.

- [120] S. C. Chen, Y. C. Wu, F. L. Mi, Y. H. Lin, L. C. Yu, and H. W. Sung, "A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 96, no. 2, pp. 285–300, 2004, doi: 10.1016/j.jconrel.2004.02.002.
- [121] J. Jin, M. Song, and D. J. Hourston, "Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties," *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 1, pp. 162–168, 2004, doi: 10.1021/bm034286m.
- [122] M. Rinaudo, "Materials Based on Chitin and Chitosan," *Bio-Based Plast. Mater. Appl.*, pp. 63–87, 2014, doi: 10.1002/9781118676646.ch4.
- [123] N. Picollet-D'hahan, S. Gerbaud, F. Kermarrec, J. P. Alcaraz, P. Obeid, R. Bhajun, L. Guyon, E. Sulpice, P. Cinquin, M. E. Dolega, J. Wagh, X. Gidrol, and D. K. Martin, "The modulation of attachment, growth and morphology of cancerous prostate cells by polyelectrolyte nanofilms," *Biomaterials*, vol. 34, no. 38, pp. 10099–10108, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.093.
- [124] S. El Ichi, A. Zebda, J. P. Alcaraz, A. Laaroussi, F. Boucher, J. Boutonnat, N. Reverdy-Bruas, D. Chaussy, M. N. Belgacem, P. Cinquin, and D. K. Martin, "Bioelectrodes modified with chitosan for long-term energy supply from the body," *Energy Environ. Sci.*, vol. 8, no. 3, pp. 1017–1026, 2015, doi: 10.1039/c4ee03430a.
- [125] S. El Ichi, A. Zebda, A. Laaroussi, N. Reverdy-Bruas, D. Chaussy, M. Naceur Belgacem, P. Cinquin, and D. K. Martin, "Chitosan improves stability of carbon nanotube biocathodes for glucose biofuel cells," *Chem. Commun.*, vol. 50, no. 93, pp. 14535–14538, 2014, doi: 10.1039/c4cc04862h.
- [126] M. I. Baker, S. P. Walsh, Z. Schwartz, and B. D. Boyan, "A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 100 B, no. 5, pp. 1451–1457, 2012, doi: 10.1002/jbm.b.32694.
- [127] C. Curley, J. C. Hayes, N. J. Rowan, and J. E. Kennedy, "An evaluation of the thermal and mechanical properties of a salt-modified polyvinyl alcohol hydrogel for a knee meniscus application," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 40, pp. 13–22, 2014, doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.08.003.
- [128] V. R. Binetti, G. W. Fussell, and A. M. Lowman, "Evaluation of two chemical crosslinking methods of poly(vinyl alcohol) hydrogels for injectable nucleus pulposus replacement," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 131, no. 19, pp. 1–8, 2014, doi: 10.1002/app.40843.
- [129] J. Thomas, A. Lowman, and M. Marcolongo, "Novel associated hydrogels for nucleus pulposus replacement," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 67, no. 4, pp. 1329–1337, 2003, doi: 10.1002/jbm.a.10119.
- [130] M. Qi, Y. Gu, N. Sakata, D. Kim, Y. Shirouzu, C. Yamamoto, A. Hiura, S. Sumi, and K. Inoue, "PVA hydrogel sheet macroencapsulation for the bioartificial pancreas," *Biomaterials*, vol. 25, no. 27, pp. 5885–5892, 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.050.
- [131] M. Ye, P. Mohanty, and G. Ghosh, "Morphology and properties of poly vinyl alcohol (PVA) scaffolds: Impact of process variables," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 42, pp. 289–294, 2014, doi: 10.1016/j.msec.2014.05.029.
- [132] D. Killeen, M. Frydrych, and B. Chen, "Porous poly(vinyl alcohol)/sepiolite bone scaffolds: Preparation, structure and mechanical properties," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 32, no. 4, pp. 749–757, 2012, doi: 10.1016/j.msec.2012.01.019.

- [133] Y. Hou, C. Chen, K. Liu, Y. Tu, L. Zhang, and Y. Li, "Preparation of PVA hydrogel with high-transparence and investigations of its transparent mechanism," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 31, pp. 24023–24030, 2015, doi: 10.1039/c5ra01280e.
- [134] R. Yin MA and D. Sheng XIONG, "Synthesis and properties of physically crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels," *J. China Univ. Min. Technol.*, vol. 18, no. 2, pp. 271–274, 2008, doi: 10.1016/S1006-1266(08)60057-7.
- [135] Y. Liu, N. E. Vrana, P. A. Cahill, and G. B. McGuinness, "Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: Structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 90 B, no. 2, pp. 492–502, 2009, doi: 10.1002/jbm.b.31310.
- [136] G. Leone, M. Consumi, G. Greco, C. Bonechi, S. Lamponi, C. Rossi, and A. Magnani, "A PVA/PVP hydrogel for human lens substitution: Synthesis, rheological characterization, and in vitro biocompatibility," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 97 B, no. 2, pp. 278–288, 2011, doi: 10.1002/jbm.b.31813.
- [137] G. Fundueanu, M. Constantin, and P. Ascenzi, "Poly(vinyl alcohol) microspheres with pH- and thermosensitive properties as temperature-controlled drug delivery," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 10, pp. 3899–3907, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.04.026.
- [138] M. J. D. Nugent and C. L. Higginbotham, "Preparation of a novel freeze thawed poly(vinyl alcohol) composite hydrogel for drug delivery applications," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 67, no. 2, pp. 377–386, 2007, doi: 10.1016/j.ejpb.2007.02.014.
- [139] S. M. Shaheen, K. Ukai, L. Dai, and K. Yamaura, "Properties of hydrogels of atactic poly(vinyl alcohol)/NaCl/H<sub>2</sub>O system and their application to drug release," *Polym. Int.*, vol. 51, no. 12, pp. 1390–1397, 2002, doi: 10.1002/pi.1061.
- [140] W. C. Hueper, "Carcinogenic Studies on Water-Soluble and Insoluble Macromolecules," *Arch. Pathol.*, vol. 67, pp. 589–617, 1959, [Online]. Available: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19592704524>.
- [141] C. C. Demerlis and D. R. Schoneker, "Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA) - PDF Free Download," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 41, no. 3, pp. 319–326, 2003, [Online]. Available: <https://kundoc.com/pdf-review-of-the-oral-toxicity-of-polyvinyl-alcohol-pva-.html>.
- [142] M. Kobayashi, J. Toguchida, and M. Oka, "Preliminary study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus," *Biomaterials*, vol. 24, no. 4, pp. 639–647, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00378-2.
- [143] S. Maruoka, T. Matsuura, K. Kawasaki, M. Okamoto, H. Yoshiaki, M. Kodama, M. Sugiyama, and M. Annaka, "Biocompatibility of polyvinylalcohol gel as a vitreous substitute," *Curr. Eye Res.*, vol. 31, no. 7–8, pp. 599–606, 2006, doi: 10.1080/02713680600813854.
- [144] G. Penven, "Thèse Encapsulation de dispositifs symbiotiques implantables :"
- [145] E. A. Kamoun, X. Chen, M. S. Mohy Eldin, and E. R. S. Kenawy, "Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers," *Arab. J. Chem.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2015, doi: 10.1016/j.arabjc.2014.07.005.
- [146] İ. Uslu, S. Keskin, A. Gül, T. C. Karabulut, and M. L. Aksu, "Preparation and Properties of Electrospun Poly ( vinyl alcohol ) Blended Hybrid Polymer with Aloe vera and HPMC as Wound Dressing," *Hacettepe J. Biol. Chem.*, vol. 38, no. 1, pp. 19–25, 2010, [Online]. Available: <http://gazi.academia.edu/ibrahimUSLU/Papers>.

- [147] M. Wu, B. Bao, F. Yoshii, and K. Makuuchi, "Irradiation of crosslinked, poly(vinyl alcohol) blended hydrogel for wound dressing," *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 250, no. 2, pp. 391–395, 2001, doi: 10.1023/A:1017988822121.
- [148] S. V. Madhally and H. W. T. Matthew, "Porous chitosan scaffolds for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 20, no. 12, pp. 1133–1142, 1999, doi: 10.1016/S0142-9612(99)00011-3.
- [149] M. S. Ahmed, D. Kim, H. S. Han, H. Jeong, and S. Jeon, "Covalent hybridization of thiolated graphene sheet and platinum nanoparticles for electrocatalytic oxygen reduction reaction," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 12, no. 11, pp. 8349–8355, 2012, doi: 10.1166/jnn.2012.6674.
- [150] D. Qazzazie, M. Beckert, R. Mülhaupt, O. Yurchenko, and G. Urban, "A nitrogen-doped graphene electrocatalyst for selective oxygen reduction in presence of glucose and D-gluconic acid in pH-neutral media," *Electrochim. Acta*, vol. 186, pp. 579–590, 2015, doi: 10.1016/j.electacta.2015.11.017.
- [151] J. Black, *Biological Performance of Materials-Fundamentals of Biocompatibility*, vol. 53, no. 9. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.
- [152] D. F. Williams, "Biomaterials On the mechanisms of biocompatibility q," pp. 1–13, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
- [153] A. Remes and D. F. Williams, "Immune response in biocompatibility1," *Biomater. Silver Jubil. Compend.*, vol. 13, no. 11, pp. 79–91, 2006, doi: 10.1016/B978-008045154-1.50012-5.
- [154] J. P. Alcaraz, P. Cinquin, and D. K. Martin, "Tackling the Concept of Symbiotic Implantable Medical Devices with Nanobiotechnologies," *Biotechnol. J.*, vol. 13, no. 12, pp. 1–36, 2018, doi: 10.1002/biot.201800102.
- [155] N. Wisniewski and M. Reichert, "Methods for reducing biosensor membrane biofouling," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 18, no. 3–4, pp. 197–219, 2000, doi: 10.1016/S0927-7765(99)00148-4.
- [156] C. S. A. (CSA), "Iso 10993-5," *Int. Organ.*, vol. 2007, pp. 1–11, 2009, doi: 10.1021/es0620181.
- [157] T. Koyano, N. Minoura, M. Nagura, and K. Kobayashi, "Attachment and growth of cultured fibroblast cells on chitosan/PHEA-blended hydrogels," *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, vol. 18, no. 1, pp. 109–111, 2002, doi: 10.1002/(sici)1097-4636(19980305)39:3<486::aid-jbm20>3.3.co;2-#.
- [158] M. Srikanth, "In vitro cytotoxicity tests of nanomaterials on 3T3 and I929 cancerous cells," no. May, p. 72, 2012, [Online]. Available: [https://soar.wichita.edu/bitstream/handle/10057/5422/t12040\\_Srikanth.pdf?sequence=259&isAllowed=y%0Ahttp://hdl.handle.net/10057/5422](https://soar.wichita.edu/bitstream/handle/10057/5422/t12040_Srikanth.pdf?sequence=259&isAllowed=y%0Ahttp://hdl.handle.net/10057/5422).
- [159] M. Wojtoniszak, X. Chen, R. J. Kalenczuk, A. Wajda, J. Łapczuk, M. Kurzewski, M. Drozdziak, P. K. Chu, and E. Borowiak-Palen, "Synthesis, dispersion, and cytocompatibility of graphene oxide and reduced graphene oxide," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 89, no. 1, pp. 79–85, 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.08.026.
- [160] T. Mori, M. Okumura, M. Matsuura, K. Ueno, S. Tokura, Y. Okamoto, S. Minami, and T. Fujinaga, "Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro," *Biomaterials*, vol. 18, no. 13, pp. 947–951, 1997, doi: 10.1016/S0142-9612(97)00017-3.
- [161] E. J. Cho, A. Rahman, S. W. Kim, Y. M. Baek, H. J. Hwang, J. Y. Oh, H. S. Hwang, S. H. Lee, and J. W. Yun, "Chitosan oligosaccharides inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes," *J. Microbiol.*

*Biotechnol.*, vol. 18, no. 1, pp. 80–87, 2008.

- [162] Y. Y. Chang, S. J. Chen, H. C. Liang, H. W. Sung, C. C. Lin, and R. N. Huang, "The effect of galectin 1 on 3T3 cell proliferation on chitosan membranes," *Biomaterials*, vol. 25, no. 17, pp. 3603–3611, 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.039.
- [163] P. Zilla, D. Bezuidenhout, and P. Human, "Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing," *Biomaterials*, vol. 28, no. 34, pp. 5009–5027, 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.017.
- [164] J. Chlupáč, E. Filová, and L. Bačáková, "Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery," *Physiol. Res.*, vol. 58, no. SUPPL.2, pp. 119–140, 2009.
- [165] C. Singh, C. Wong, and X. Wang, "Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries," *J. Funct. Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 500–525, 2015, doi: 10.3390/jfb6030500.
- [166] R. Y. Kannan, H. J. Salacinski, P. E. Butler, G. Hamilton, and A. M. Seifalian, "Current status of prosthetic bypass grafts: A review," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 74, no. 1, pp. 570–581, 2005, doi: 10.1002/jbm.b.30247.
- [167] L. T. Directeur, D. M. Co-directeur, P. C. Universit, G. Alpes, E. Doctorale, and E. Biotechnologie, "Thèse Encapsulation de dispositifs symbiotiques implantables :"
- [168] P. A. Ramires and E. Milella, "Biocompatibility of poly(vinyl alcohol)-hyaluronic acid and poly(vinyl alcohol)-gellan membranes crosslinked by glutaraldehyde vapors," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 13, no. 1, pp. 119–123, 2002, doi: 10.1023/A:1013667426066.
- [169] M. Southcott, K. MacVittie, J. Halánek, L. Halámková, W. D. Jemison, R. Lobel, and E. Katz, "A pacemaker powered by an implantable biofuel cell operating under conditions mimicking the human blood circulatory system-battery not included," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 17, pp. 6278–6283, 2013, doi: 10.1039/c3cp50929j.
- [170] A. Zebda, S. Cosnier, J. P. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui, and P. Cinquin, "Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices," *Sci. Rep.*, vol. 3, pp. 1–5, 2013, doi: 10.1038/srep01516.
- [171] C. Lemoine, L. Dubois, T. W. Napporn, K. Servat, and K. B. Kokoh, "Electrochemical Energy Conversion from Direct Oxidation of Glucose on Active Electrode Materials," *Electrocatalysis*, 2019, doi: 10.1007/s12678-019-00570-1.
- [172] J. Fiedurek and A. Gromada, "Screening and mutagenesis of molds for improvement of the simultaneous production of catalase and glucose oxidase," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 20, no. 5, pp. 344–347, 1997, doi: 10.1016/S0141-0229(96)00148-2.
- [173] J. Wang, "Electrochemical glucose biosensors," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 2, pp. 814–825, 2008, doi: 10.1021/cr068123a.
- [174] S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal, and L. Ananthanarayan, "Glucose oxidase - An overview," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 4, pp. 489–501, 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.003.
- [175] D. G. Hatzinikolaou and B. J. Macris, "Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 17, no. 6, pp. 530–534, 1995, doi: 10.1016/0141-0229(95)91708-7.
- [176] B. Reuillard, "Elaboration de bioélectrodes à base de nanotubes de carbone pour la réalisation

de biopiles enzymatiques Glucose / O<sub>2</sub> To cite this version : HAL Id : tel-01304246 Elaboration de bioélectrodes à base de nanotubes de carbone pour la réalisation de biopiles ,” 2016.

- [177] S. Witt, G. Wohlfahrt, D. Schomburg, H. J. Hecht, and H. M. Kalisz, “Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of  $\beta$ -o-glucose,” *Biochem. J.*, vol. 347, no. 2, pp. 553–559, 2000, doi: 10.1042/0264-6021:3470553.
- [178] C. Abreu, “Conception et optimisation de piles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub> pour la gestion de puissance To cite this version : HAL Id : tel-01827016 Conception et optimisation de piles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub> pour la gestion de,” 2018.
- [179] C. Tanne, G. Göbel, and F. Lisdat, “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.*, vol. 26, no. 2, pp. 530–535, 2010, doi: 10.1016/j.bios.2010.07.052.
- [180] S. Ferri, K. Kojima, and K. Sode, “Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: A bird’s eye view of glucose sensing enzymes,” *J. Diabetes Sci. Technol.*, vol. 5, no. 5, pp. 1068–1076, 2011, doi: 10.1177/193229681100500507.
- [181] S. Tsujimura, S. Kojima, K. Kano, T. Ikeda, M. Sato, H. Sanada, and H. Omura, “Novel FAD-dependent glucose dehydrogenase for a dioxygen-insensitive glucose biosensor,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 70, no. 3, pp. 654–659, 2006, doi: 10.1271/bbb.70.654.
- [182] M. N. Zafar, N. Beden, D. Leech, C. Sygmund, R. Ludwig, and L. Gorton, “Characterization of different FAD-dependent glucose dehydrogenases for possible use in glucose-based biosensors and biofuel cells,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 402, no. 6, pp. 2069–2077, 2012, doi: 10.1007/s00216-011-5650-7.
- [183] O. Yehezkeli, R. Tel-Vered, S. Raichlin, and I. Willner, “Nano-engineered flavin-dependent glucose dehydrogenase/gold nanoparticle-modified electrodes for glucose sensing and biofuel cell applications,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 3, pp. 2385–2391, 2011, doi: 10.1021/nn200313t.
- [184] T. de Lumley-Woodyear, P. Rocca, J. Lindsay, A. Heller, P. Rocca, Y. Dror, and A. Freeman, “Polyacrylamide-Based Redox Polymer for Connecting Redox Centers of Enzymes to Electrodes,” *Anal. Chem.*, vol. 67, no. 8, pp. 1332–1338, 1995, doi: 10.1021/ac00104a006.
- [185] P. Ó Conghaile, S. Pöllner, D. MacAodha, W. Schuhmann, and D. Leech, “Coupling osmium complexes to epoxy-functionalised polymers to provide mediated enzyme electrodes for glucose oxidation,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 43, no. 1, pp. 30–37, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.11.036.
- [186] B. Krajewska, “Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 35, no. 2–3, pp. 126–139, 2004, doi: 10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.
- [187] T. Klotzbach, M. Watt, Y. Ansari, and S. D. Minteer, “Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization,” *J. Memb. Sci.*, vol. 282, no. 1–2, pp. 276–283, 2006, doi: 10.1016/j.memsci.2006.05.029.
- [188] A. Ben Tahar, A. Szymczyk, S. Tingry, P. Vadgama, M. Zelsmanne, S. Tsujumura, P. Cinquin, D. Martin, and A. Zebda, “One-year stability of glucose dehydrogenase confined in a 3D carbon nanotube electrode with coated poly-methylene green: Application as bioanode for a glucose biofuel cell,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 847, no. April, p. 113069, 2019, doi: 10.1016/j.jelechem.2019.04.029.
- [189] G. V. Dubacheva, A. Van Der Heyden, P. Dumy, O. Kaftan, R. Auzély-Velty, L. Coche-Guerente,

- and P. Labbé, "Electrochemically controlled adsorption of Fc-functionalized polymers on  $\beta$ -CD-modified self-assembled monolayers," *Langmuir*, vol. 26, no. 17, pp. 13976–13986, 2010, doi: 10.1021/la102026h.
- [190] M. Holzinger, L. Bouffier, R. Villalonga, and S. Cosnier, "Adamantane/ $\beta$ -cyclodextrin affinity biosensors based on single-walled carbon nanotubes," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 5, pp. 1128–1134, 2009, doi: 10.1016/j.bios.2008.06.029.
- [191] M. R. Tarasevich, A. I. Yaropolov, V. A. Bogdanovskaya, and S. D. Varfolomeev, "293 - Electrocatalysis of a cathodic oxygen reduction by laccase," *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 6, no. 3, pp. 393–403, 1979, doi: 10.1016/0302-4598(79)80006-9.
- [192] A. I. Yaropolov, M. R. Tarasevich, and S. D. Varfolomeev, "192 - Electrochemical Properties of Peroxidase," *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 5, no. 1, pp. 18–24, 1978, doi: 10.1016/0302-4598(87)87002-2.
- [193] A. L. Ghindilis, P. Atanasov, and E. Wilkins, "Enzyme-Catalyzed Direct Electron Transfer: Fundamentals and Analytical Applications," *Electroanalysis*, vol. 9, no. 9, pp. 661–674, 1997, doi: 10.1002/elan.1140090902.
- [194] S. D. Varfolomeev, I. N. Kurochkin, and A. I. Yaropolov, "Direct electron transfer effect biosensors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 11, no. 9, pp. 863–871, 1996, doi: 10.1016/0956-5663(96)89435-8.
- [195] F. A. Armstrong, H. A. O. Hill, N. J. Walton, H. A. Hill, and J. Walton, "Direct electrochemistry of redox proteins Direct Electrochemistry of Redox Proteins," *Acc. Chem. Res.*, vol. 21, no. May, pp. 407–413, 2002, doi: 10.1021/ar00155a004.
- [196] H. Allen, O. Hill, and N. I. Hunt, "[19] Direct and Indirect Electrochemical Investigations of Metalloenzymes," *Methods Enzymol.*, vol. 227, no. C, pp. 501–522, 1993, doi: 10.1016/0076-6879(93)27021-8.
- [197] M. J. Cooney, C. Lau, M. Windmeisser, B. Y. Liaw, T. Klotzbach, and S. D. Minter, "Design of chitosan gel pore structure: Towards enzyme catalyzed flow-through electrodes," *J. Mater. Chem.*, vol. 18, no. 6, pp. 667–674, 2008, doi: 10.1039/b710082e.
- [198] P. N. Bartlett and F. A. Al-Lolage, "There is no evidence to support literature claims of direct electron transfer (DET) for native glucose oxidase (GOx) at carbon nanotubes or graphene," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 819, no. June 2017, pp. 26–37, 2018, doi: 10.1016/j.jelechem.2017.06.021.
- [199] Y. Degani and A. Heller, "Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. 2. Methods for bonding electron-transfer relays to glucose oxidase and D-amino-acid oxidase," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, no. 8, pp. 2615–2620, 1988, doi: 10.1021/ja00216a040.
- [200] A. Guiseppi-Elie, C. Lei, and R. H. Baughman, "Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes," *Anal. Biochem.*, vol. 332, no. 1, pp. 75–83, 2004, doi: 10.1016/j.ab.2004.05.057.
- [201] C. Hou, Q. Lang, and A. Liu, "Tailoring 1,4-naphthoquinone with electron-withdrawing group: Toward developing redox polymer and FAD-GDH based hydrogel bioanode for efficient electrocatalytic glucose oxidation," *Electrochim. Acta*, vol. 211, pp. 663–670, 2016, doi: 10.1016/j.electacta.2016.06.078.
- [202] R. D. Milton, D. P. Hickey, S. Abdellaoui, K. Lim, F. Wu, B. Tan, and S. D. Minter, "Rational design of quinones for high power density biofuel cells," *Chem. Sci.*, vol. 6, no. 8, pp. 4867–

4875, 2015, doi: 10.1039/c5sc01538c.

- [203] R. L. McCreery, "Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 7, pp. 2646–2687, Jul. 2008, doi: 10.1021/cr068076m.
- [204] M. Holzinger, A. Le Goff, and S. Cosnier, "Carbon nanotube/enzyme biofuel cells," *Electrochim. Acta*, vol. 82, pp. 179–190, 2012, doi: 10.1016/j.electacta.2011.12.135.
- [205] P. Asuri, S. S. Karajanagi, H. Yang, T. J. Yim, R. S. Kane, and J. S. Dordick, "Increasing protein stability through control of the nanoscale environment," *Langmuir*, vol. 22, no. 13, pp. 5833–5836, 2006, doi: 10.1021/la0528450.
- [206] F. Davis and S. P. J. Higson, "Structured thin films as functional components within biosensors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–20, 2005, doi: 10.1016/j.bios.2004.10.001.
- [207] E. W. Wong, P. E. Sheehan, and C. M. Lieber, "Nanobeam mechanics: Elasticity, strength, and toughness of nanorods and nanotubes," *Science (80-. )*, vol. 277, no. 5334, pp. 1971–1975, 1997, doi: 10.1126/science.277.5334.1971.
- [208] O. Lourie and H. D. Wagner, "Evaluation of Young's Modulus of Carbon Nanotubes by Micro-Raman Spectroscopy," *J. Mater. Res.*, vol. 13, no. 9, pp. 2418–2422, Sep. 1998, doi: 10.1557/JMR.1998.0336.
- [209] R. S. Ruoff and D. C. Lorents, "Mechanical and thermal properties of carbon nanotubes," *Carbon N. Y.*, vol. 33, no. 7, pp. 925–930, 1995, doi: 10.1016/0008-6223(95)00021-5.
- [210] S. Iijima, C. Brabec, A. Maiti, and J. Bernholc, "Structural flexibility of carbon nanotubes," *J. Chem. Phys.*, vol. 104, no. 5, pp. 2089–2092, 1996, doi: 10.1063/1.470966.
- [211] B. Reuillard, A. Le Goff, C. Agnès, M. Holzinger, A. Zebda, C. Gondran, K. Elouarzaki, and S. Cosnier, "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.*, vol. 15, no. 14, pp. 4892–4896, 2013, doi: 10.1039/c3cp50767j.
- [212] A. Zitolo, V. Goellner, V. Armel, M.-T. Sougrati, T. Mineva, L. Stievano, E. Fonda, and F. Jaouen, "Identification of catalytic sites for oxygen reduction in iron- and nitrogen-doped graphene materials," *Nat. Mater.*, vol. 14, no. 9, pp. 937–42, 2015, doi: 10.1038/nmat4367.