



HAL
open science

Bioélectrodes flexibles implantables pour la production d'énergie électrique in vivo

Anastasiia Berezovska

► **To cite this version:**

Anastasiia Berezovska. Bioélectrodes flexibles implantables pour la production d'énergie électrique in vivo. Chimie théorique et/ou physique. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV090 . tel-04332684

HAL Id: tel-04332684

<https://theses.hal.science/tel-04332684v1>

Submitted on 9 Dec 2023

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

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Chimie Physique Moléculaire et Structurale

Unité de recherche : Département de Chimie Moléculaire

Bioélectrodes flexibles implantables pour la production d'énergie électrique in vivo

Implantable flexible bioelectrodes for the production of electrical energy in vivo

Présentée par :

Anastasiia BEREZOVSKA

Direction de thèse :

Serge COSNIER

DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Andrew GROSS

CHARGE DE RECHERCHE, Université Grenoble Alpes

Co-encadrant de thèse

Rapporteurs :

Sophie TINGRY

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Occitanie Est

Florence LAGARDE

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Rhône Auvergne

Thèse soutenue publiquement le **7 décembre 2022**, devant le jury composé de :

Serge COSNIER

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes

Directeur de thèse

Sophie TINGRY

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Occitanie Est

Rapporteuse

Florence LAGARDE

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Rhône Auvergne

Rapporteuse

GUY ROYAL

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Président

Nicole JAFFREZIC-RENAULT

DIRECTRICE DE RECHERCHE EMERITE, CNRS délégation Rhône Auvergne

Examinatrice

Invités :

Andrew Gross

CHARGE DE RECHERCHE, Université Grenoble Alpes

Fabien Giroud

MAITRE DE CONFERENCE, Université Grenoble Alpes



REMERCIEMENTS

Je suis heureuse de partager la fin de cette aventure passionnante qu'a été ma thèse. Ces quatre années de recherche ont été riches en défis, en apprentissage et en découvertes. Cette expérience extraordinaire de PhD student restera gravée dans ma mémoire avec une immense gratitude envers tous ceux et celles qui m'ont accompagnée tout au long.

Je souhaite commencer cette partie de remerciements en m'adressant aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer et de valider mes travaux. Mesdames Sophie TINGRY et Florence LAGARDE, je vous remercie pour le temps et les efforts consacrés à la lecture de mon manuscrit, pour votre intérêt pour mon sujet de recherche et pour nos discussions constructives et intéressantes concernant mes travaux. Monsieur Guy ROYAL, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de présider le jury de thèse, pour votre vif intérêt pour ma recherche, mais aussi pour votre soutien personnel, même avant de me connaître. Madame Nicole JAFFREZIC-RENAULT, merci d'avoir accepté d'être examinatrice et de m'avoir apporté de nombreux commentaires pertinents lors de notre première rencontre au comité de suivi individuel (CSI) et lors de ma soutenance.

Je remercie également mes jurys des CSI, Monsieur Marcello GENNARI, Monsieur Pascal MAILLEY et Monsieur Sami HALILA, pour leur apport essentiel au déroulement de ma thèse durant ces quatre années. Nos discussions inspirantes scientifiques et personnelles et vos conseils pour améliorer ma thèse ont été importants dans mon parcours.

Nous savons tous que la thèse n'est pas seulement "le bébé" de la thésarde, mais aussi un grand investissement de la part de sa direction. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers mon directeur de thèse, Monsieur Serge COSNIER. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir donné la liberté d'explorer mes idées et de faire mes choix tout au long de ces quatre années, d'avoir eu confiance en moi. Vous étiez présent quand j'en avais besoin et toujours là pour m'aider et me conseiller, merci. Je voudrais également remercier mon encadrant de thèse, Monsieur Andrew GROSS. Tu as été le premier à m'accueillir au laboratoire, à m'introduire dans l'équipe et à me montrer les locaux de travail. Merci pour ton optimisme et ta bonne humeur durant toutes ces années et pour ton aide précieuse dans mes corrections d'anglais. Il y a encore une personne que je voudrais remercier en tant que membre de ma direction, Monsieur Fabien GIROUD. Officiellement, tu n'étais pas mon encadrant, mais officieusement, nous savons tous que tu l'étais pour moi. Je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi, pour toutes les fois où tu as dû rester tard pour m'aider à résoudre des problèmes, pour nos discussions scientifiques et personnelles, pour ton soutien et ta patience. Merci aussi de m'avoir ouvert les portes de l'enseignement ! Et un énorme merci pour avoir nourri quelques fois mes frères dans les moments difficiles.

Mon travail de recherche in vivo m'a également permis de travailler au Centre de Recherche en Neurosciences à Lyon avec Monsieur Stéphane MARINESCO et Madame Anne MEILLER. Je tiens à remercier Stéphane pour tous les travaux que nous avons réalisés ensemble, ainsi que pour les nombreuses heures passées ensemble dans la salle de chirurgie à écouter de la

musique et à discuter tout en effectuant les opérations. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de participer en personne à ce processus, ce qui m'a beaucoup appris. Anne, tu m'as introduite dans le monde de la bactériologie. Je te remercie pour tous les travaux que tu as réalisés pour ma thèse, ainsi que pour ton soutien personnel qui était d'une grande importance pour moi. Merci également pour nos discussions scientifiques et personnelles, que ce soit au travail, lors de sorties en Belgique ou même à distance. En ce qui concerne la partie de l'implantation in vivo, je tiens également à remercier la vétérinaire Madame Manon DIRHEIMER, qui nous a aidé à mettre au point nos chirurgies et qui était toujours disponible pour nous conseiller en cas de besoin.

L'équipe BioCEN, dans mon cœur toujours restera BEA, est une petite équipe où tout le monde est toujours prêt à s'entraider et se soutenir. Je suis extrêmement reconnaissante d'avoir été entourée de personnes bienveillantes et attentionnées. Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à toute l'équipe et je vais commencer particulièrement par Madame Chantal GONDRAN. Chantal, dès notre première rencontre, tu m'as encouragée à rester positive et à considérer chaque résultat comme un succès. Merci pour ton soutien personnel à travers les différentes étapes de ma vie durant ces quatre années. Mais surtout, un immense MERCI pour tout ce que tu as fait pour moi au cours des derniers mois de ma thèse. Tu étais toujours disponible, que ce soit en semaine, en soirée ou même le week-end, pour discuter et m'aider. Si j'ai finalement réussi à achever mon manuscrit, c'est en grande partie grâce à toi. Tes encouragements et nos discussions m'ont souvent permis d'écrire un chapitre en seulement 4 ou 5 jours, et tes corrections finales l'ont rendu encore meilleur !

Je souhaite également remercier Madame Arielle LE PELLEC, sans qui nous serions perdus dans le laboratoire et sans rien en stock. Merci beaucoup pour ton travail immense, si nécessaire pour tous au laboratoire. Merci pour toutes nos discussions, pour ton grand soutien envers moi, ma famille, mon peuple. Toi et ta famille, vous nous aviez beaucoup aidés et je te serais éternellement reconnaissante ! Je remercie également Madame Karine GORGY pour sa bonne humeur, sa disponibilité pour discuter et conseiller, ainsi que pour son soutien. Je suis ravie de pouvoir travailler avec toi dans la même équipe. Je tiens à exprimer ma gratitude envers Monsieur Yannig NEDELLEC, un véritable magicien universel pour résoudre les problèmes de tout le monde dans les laboratoires. Personnellement, je te remercie énormément pour tout ce que tu as fait pour moi. J'ai dû courir des milliers de fois vers toi pour demander de l'aide ou des conseils, nous avons passé des heures ensemble à faire des pastilles, à préparer tout pour partir à Lyon, à tester des choses urgentes. Merci pour nos nombreuses discussions et nos moments de rigolade autour de la paillasse ou d'un goûter. Enfin, je souhaite remercier Monsieur Alan LE GOFF et Monsieur Michael HOLZINGER pour leur disponibilité et leur soutien au laboratoire. Nous ne nous sommes pas croisés souvent, mais si j'avais besoin d'un conseil ou d'une aide, vous étiez toujours prêts à aider, merci.

Une thèse c'est à la fois de la recherche scientifique, mais aussi une mission complexe qui nécessite beaucoup d'attention du côté administrative. Je trouve qu'on ne remercie pas assez nos gestionnaires, les personnes qui passent leur journée entière à résoudre nos problèmes en coulisses pour garantir le bon déroulement de nos thèses. Tout d'abord, je voudrais remercier

chaleureusement Madame Régine ROZAND, notre gestionnaire dévouée. Grâce à son aide inestimable, j'ai pu résoudre des problèmes administratifs complexes, même dans des délais très courts, c'est la personne qui faisait l'impossible dans pour que je puisse aller dans tous mes missions urgentes, surtout durant la période COVID ! Merci Régine, pour tous ce que tu fais pour nous tous, et tout ce que tu as fait pour moi personnellement ! Je tiens également à remercier Madame Véronique GINESTE, qui a toujours été disponible pour répondre à mes questions et m'aider à résoudre les problèmes administratifs qui surgissaient. Ta gentillesse et ta disponibilité m'ont été d'un grand secours, surtout pendant la dernière année de ma thèse.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers les membres du personnel technique, qui ont contribué à la réussite de ma thèse. Tout d'abord, je remercie Madame Christine LANCELON-PIN de la plateforme « CERMAV ICMG » pour son aide précieuse dans l'obtention des images MEB malgré les difficultés rencontrées. Je voudrais également remercier Monsieur Hafid BOUCHAFA pour son aide précieuse dans la résolution de problèmes informatiques complexes et Monsieur Hugues BONNET pour son assistance dans les mesures d'angle de contacts dans leurs laboratoires respectifs. Votre travail a été d'une importance cruciale pour la réussite de ma recherche, et je vous en suis profondément reconnaissant.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers Monsieur Anton KORNIENKO pour avoir créé le programme qui m'a permis de venir étudier en France. Sans cette opportunité, je n'aurais pas pu avoir la chance de faire cette thèse passionnante au DCM. Il m'a présenté Messieurs Naoufel HADDOUR et Andrei SABAC qui eux ensuite ont devenu mes directeurs de stage M2. Je voulais remercier en particulièrement Monsieur HADDOUR de m'avoir parlé de Madame GONDRAN et de Monsieur COSNIER et son équipe, où j'ai osé envoyer une candidature spontanée avec comme suite ce doctorat.

J'ai eu de la chance non seulement d'avoir des super permanents dans l'équipe, mais aussi de meilleurs collègues non permanents tous au long de 4 ans !

Cette partie est à vous ! Je commencerai par la meilleure collègue Deborah. Tu sais, la vie nous a réunis en tant que collègues, mais le destin nous a désignées comme des amies, des sœurs. On est arrivées à BEA le même jour, le 7 janvier 2019, et depuis on ne s'est jamais séparé ! Je dois te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi durant ces années, tu étais (tu l'es toujours) ma grande sœur qui était toujours là pour moi, mais je ne pourrai jamais assez te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Je voudrais également remercier la famille BRAZZOLOTTO, ma famille française, qui m'a accueillie comme si j'étais l'une des leurs et qui est devenue ma deuxième famille ici. Je vous aime de tout mon cœur.

À mes chers collègues de bureau Chen, Ilaria et Paulo, je tiens à vous remercier pour toutes les fois où nous avons partagé nos rires, nos histoires et nos cafés. Notre bureau 102 était le cœur de notre équipe et notre force À tous mes amis et collègues, Esso, Umberto, Marie C, les Monicas (italienne, colombienne et iranienne), Kabibi, Bastien, Rosanna, Phoulinh, vous m'avez apporté beaucoup de bonheur et de soutien tout au long de ma thèse. Je suis reconnaissante d'avoir eu la chance de vous connaître et de travailler à vos côtés. Bien évidemment, je tiens à remercier tous nos stagiaires, qui ont été une partie importante de notre équipe et qui nous ont

apporté de la fraîcheur et de nouvelles idées. En particulier, je souhaite remercier Sandy, Emma et le meilleur Leo, mon tout premier stagiaire, pour leur engagement, leur travail acharné et leur enthousiasme. Je vous souhaite une grande réussite dans vos parcours académiques et professionnels.

Maintenant, j'aimerais m'adresser à l'ensemble de ma famille, qui ont été présents pour moi tout au long de ces quatre années, malgré la distance et les difficultés qu'ils ont eux-mêmes traversées. Quatre ans c'est une longue période de vie où j'ai connu des hautes et des bas. Mais je n'étais jamais seule, j'avais toujours une énorme force de soutiens dans mon dos. Ma famille, eux ils n'ont jamais douté de moi et ils ont toujours su de me tenir la main, sans prendre en compte la distance entre nous. La dernière année a été super difficile pour eux, la guerre dans notre pays les a frappés de manière inattendue. Ils ont vécu l'enfer et ils continuent de le vivre. Mais malgré cela ils ont continué à me soutenir, moi avec mes petites inquiétudes insignifiantes. Ils ont cru en moi plus que moi-même et j'ai pu arriver à la fin de cette histoire « La thèse » grâce à eux et pour eux. Je suis reconnaissante envers ceux qui ne sont plus avec nous, je suis sûre qu'ils sont fiers de moi là-haut et je leur dédie ce doctorat.

Mes derniers remerciements vont à la personne qui partage ma vie et qui est là pour moi 24/24 à mes côtés, mon amour Oleh. Son soutien sans relâche m'est précieux et je lui dois beaucoup. Je te remercie chéri de tout mon cœur pour ta patience incroyable (je ne suis pas la fille la plus facile), pour tes encouragements dans toutes les épreuves et pour ton aide au quotidien.

Enfin, je souhaite remercier une dernière fois toutes les personnes qui ont contribué à cette expérience exceptionnelle. Je suis fière d'avoir pu travailler avec vous tous et d'avoir partagé des moments inoubliables, vous faites partie également de cette aventure appelée « La thèse ».

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1,2-NQ : 1,2-naphthoquinone

1,4-NQ : 1,4-naphthoquinone

[Fe(CN₆)]³⁻ : hexacyanoferrate (III) de potassium

[Ru(NH₃)₆]³⁺ : chlorure d'hexaammineruthénium(III)

ABTS : sel de diammonium de 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique)

ADN : acide désoxyribonucléique

AFC : pile à combustible alcaline

Ag/AgCl (sat. KCl) : électrode de référence en solution aqueuse de KCl saturé

Ar : argon

AT : aténolol

ATP : adénosine triphosphate

bis-pyrène ABTS (p₂-ABTS) : bis-pyrène 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique)

BLE : bluetooth low energy

BOx : bilirubine oxydase

BP : buckypaper

BSA : albumine de sérum bovin

CA : chronoampérométrie

cBP : buckypaper commercial

CH₃CN : acétonitrile

CHx : digluconate de chlorhexidine

CNTs : nanotubes de carbone

CueO : oxydase à cuivre

CV : voltampérométrie cyclique

CytC : cytochrome C

CytOx : cytochrome oxydase

DCM : dichlorométhane

DET : transfert direct d'électron

DMF : *N,N* - diméthylformamide

DMFC : pile à combustible à méthanol directe

DMI : dispositifs médicaux implantables

DWCNTs : nanotubes de carbone doublefeuilletés

E-BFC : biopile de type peau électronique
EtO : oxyde d'éthylène
f.e.m. : force électromotrice
FAD : flavine adénine dinucléotide
FAD GDH : FAD-dépendante glucose déshydrogénase
FM : ferromagnétique
f-MWCNTs : nanotubes de carbone multifeuillets fonctionnalisés
GAOx : galactose oxydase
GC : carbone vitreux
GDH : glucose déshydrogénases
GOx : glucose oxydase
GR : graphène
hBP : buckypaper « homemade »
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HRP : peroxydase de raifort
IPA : alcool isopropylique
LB : milieu de culture bactérienne « Lysogeny Broth »
LED : diode électroluminescente
LSV : Voltampérométrie à balayage linéaire (Linear Sweep Voltammetry)
MCFC : pile à combustible à carbonate fondu
MCOs : oxydases multi-cuivres
MEB : microscope électronique à balayage
MET : transfert d'électrons médié
MFC : biopile à combustible microbienne
MWCNTs : nanotubes de carbone multifeuillets
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NADHP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NM : nanomatériaux
NPC : nanoparticule de carbone
NPM : nanoparticule magnétique
O₂ : dioxygène
OCV : Tension en circuit ouvert (Open Circuit Voltage)
OMS : organisation mondiale de la santé

PAFC : pile à combustible à acide phosphorique
PB : tampon phosphate
PBS : tampon phosphate saline
PEMFC : pile à combustible à membrane échangeuse de protons
pI : point isoélectrique
PLA : acide polylactique
PLQ : 1,10-phénanthroline 5,6-dione
PM : poids moléculaire
PPO : polyphénol oxydase
PQ : 9,10-phénanthréne-quinone
PQQ : pyrroloquinoléine quinone
PVA : alcool polyvinylique
SAL : assurance de stérilité
SOFC : pile à combustible à oxyde solide
SWCNTs : nanotubes de carbone monofeuillet
TEMPO : 2,2,6,6-tetraméthylpipéridine-1-oxyl
TNC : centre trinuécléaire
TOF : fréquence de cycle catalytique (Turn Over Frequency)
TON : nombre de cycle catalytique (Turn Over Number)
v/v : volume/volume
VHP : H₂O₂ vaporisé

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	7
CHAPITRE 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
1.1 Quelques généralités sur les (bio) piles à combustible.....	15
1.1.1 La pile à combustible	15
1.1.1.1 Principe de fonctionnement	15
1.1.1.2 Applications	16
1.1.2 Les biopiles à combustible	18
1.1.2.1 Les biopiles microbiennes.....	19
1.1.2.2 Les biopiles à mitochondries	20
1.1.2.3 Les biopiles enzymatiques	20
1.2 Les enzymes et leur connexion à l'électrode.....	23
1.2.1 Enzymes et substrats utilisés dans les biopiles enzymatiques.....	23
1.2.1.1 Généralités	24
1.2.1.2 Enzymes cathodiques.....	27
1.2.1.3 Enzymes anodiques.....	29
1.2.2 Méthodes d'immobilisation d'enzymes	32
1.2.2.1 L'adsorption physique	33
1.2.2.2 La réticulation	33
1.2.2.3 Le greffage covalent	33
1.2.2.4 L'encapsulation.....	34
1.2.2.5 Assemblage supramoléculaire	34
1.2.3 Transfert électronique enzyme – électrode	35
1.3 Matériaux d'électrodes	38
1.3.1 Nanomatériaux	38
1.3.1.1 Nanoparticules d'or.....	39

1.3.1.2	Nanoparticules magnétiques	40
1.3.2	Matériaux carbonés et nanostructurés	40
1.3.2.1	Nanoparticules de carbone	41
1.3.2.2	Graphène et graphite	41
1.3.2.3	Carbone vitreux.....	42
1.3.2.4	Nanotubes de carbone	43
1.3.2.5	“Buckypaper”	47
1.4	Application des biopiles enzymatiques	48
1.4.1	Les biosupercapaciteurs	48
1.4.2	Les biopiles portables.....	49
1.4.3	Les biopiles implantables.....	51
	Bibliographie	55
CHAPITRE 2. BIOELECTRODES COMPRESSEES A BASE D’UN MELANGE MWCNTS /ENZYMES ET/OU MEDIEATEURS		67
	Introduction	71
2.1	Bioélectrodes par compression contenant diverses protéines	72
2.1.1	Fabrication des électrodes	72
2.1.2	Stabilité mécanique	74
2.1.2.1	Influence du poids moléculaire des protéines	74
2.1.2.2	Corrélation selon le point isoélectrique (PI)	75
2.1.2.3	Angle de contact	76
2.2	Pastilles rédox.....	78
2.2.1	Fabrication des électrodes	78
2.2.2	Caractérisation électrochimique.....	79
2.3	Application des bioélectrodes à la bioélectrocatalyse	81
2.3.1	Biocathodes à base de BOx.....	81
2.3.2	Bioanodes à base de FAD GDH.....	84

2.4	Caractérisation par Microscope électronique à balayage (MEB).....	89
	Conclusion	92
	Bibliographie	94
CHAPITRE 3. BIOELECTRODES A BASE DE COMPRESSION DE MWCNTS AVEC L'INSERTION DES MEDIATEURS REDOX ET DES ENZYMES PAR ADSORPTION		
	Introduction	101
3.1	Fabrication d'électrodes	102
3.2	Pastilles de MWCNTs comprimés avec fonctionnalisation par médiateurs.....	105
3.2.1	Adsorption des espèces électroactives	105
3.2.2	Caractérisation électrochimique.....	106
3.3	Electrodes fonctionnalisées par médiateurs avec enzymes	111
3.3.1	Bioélectrodes pour la réduction de O ₂	112
3.3.2	Bioélectrodes pour l'oxydation du glucose.....	113
	Conclusion	120
	Bibliographie	122
CHAPITRE 4. BIOELECTRODES CREUSES (A CAVITE) BASEES SUR L'ASSEMBLAGE DE BUCKYPAPERS.....		
	Introduction	127
4.1	Concept d'électrode à cavité.....	128
4.2	Les bioélectrodes de grandes tailles pour la réduction de O ₂	130
4.2.1	La biocathode à base de BOx.....	130
4.2.2	Optimisation des biocathodes.....	131
4.3	Miniaturisation des biocathodes	135
4.3.1	Cathode non modifiée contenant de la BOx.....	135
4.3.2	Modification de buckypaper.....	136
4.3.3	Bicathode constituée de deux hBP	138
4.4	Les bioanodes à cavité pour l'oxydation du glucose.....	140

4.4.1	Fonctionnalisation du buckypaper par la méthode « one pot ».....	141
4.4.2	Fonctionnalisation du buckypaper par la méthode « drop coating ».....	142
4.4.3	Bioanode constituée de deux hBP.....	144
	Conclusion.....	147
	Bibliographie.....	150
CHAPITRE 5. BIOPILES ENZYMATIQUES <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i>		151
	Introduction.....	155
5.1	Biopiles à base d'électrodes à compression.....	156
5.1.1	Biopiles à compression in vitro.....	156
5.1.2	Stérilisation de systèmes électrochimiques.....	163
5.1.2.1	Stérilisation chimique par la chlorhexidine.....	165
5.1.2.2	Étude bactériologique.....	166
5.1.2.3	Étude d'influence de la stérilisation sur les bioélectrodes et la biopile.....	169
5.1.3	Biopiles à compression vers l'implantation.....	173
5.1.4	Biopile à compression post – in vivo.....	174
5.2	Biopiles aux électrodes à cavité.....	176
5.2.1	Biopiles à cavité in vitro.....	176
5.2.2	Biopiles à cavité in vivo.....	183
5.2.3	Biopile à cavité post - in vivo.....	185
	Conclusion.....	189
	Bibliographie.....	193
CONCLUSION ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES.....		197
EXPERIMENTAL PART.....		205
Chapter 2. Compressed bioelectrodes based on a mixture of MWCNTs/enzymes and/or mediators.....		209
	Materials and reagents.....	209
	Electrode fabrication.....	209

Apparatus & characterization methods.....	209
Chapter 3. Bioelectrodes based on MWCNTs compression with insertion of redox mediators and enzymes by adsorption.....	210
Materials and reagents	210
Apparatus & characterization methods.....	211
Chapter 4. Hollow bioelectrodes (cavity) based on Buckypaper assembly	211
Materials and reagents	211
Electrode fabrication.....	212
Apparatus & characterization methods.....	212
Chapter 5. Enzymatic biofuel cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	213
Materials and reagents	213
Biofuel cell fabrication	214
Apparatus & characterization methods.....	215
Chlorhexidine treatment of bioelectrodes and biofuel cells	216
Microbiology.....	216
Ethics statement	217
Surgical procedure	217
Histology.....	217
PUBLICATIONS	219
PRESENTATIONS.....	220

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La recherche médicale avance à grand pas ces dernières années. Les recherches actuelles de santé sont multidisciplinaires et diverses. Les nouvelles technologies sont à l'honneur comme l'impression 3D, l'intelligence artificielle, les robots, la nanotechnologie. Les chercheurs mettent au point des nouveaux traitements comme l'immunothérapie, des vaccins contre les maladies émergentes, des tests pour détecter précocement des maladies ou pour faire un diagnostic sur le lieu du soin, des implants pouvant répondre aux besoins physiologiques du patient et même des organes artificiels pour supplanter les organes défaillants.

Certaines innovations comme les implants et les organes artificiels nécessitent une alimentation électrique pour fonctionner et actuellement les piles qui fournissent cette énergie sont classiquement au lithium ou zinc-air selon que la pile est interne ou externe au corps. Mais pourquoi utiliser ces piles alors que nos propres organes trouvent leur carburant dans le corps ? C'est ainsi que l'idée d'utiliser notre carburant naturel, c'est à dire le glucose, a émergé. Dans le corps, le glucose correspond à 16 kW g^{-1} avec l'échange de 24 électrons par molécule. C'est une source d'énergie considérable. Les chercheurs ont alors décidé de mimer le vivant pour produire de l'électricité à partir des deux réactions à la base de la vie : l'oxydation du glucose et la réduction du dioxygène.

L'engouement des recherches sur les biopiles implantables a réellement commencé il y a une quinzaine d'année. Ces biopiles sont un sous-groupe des piles à combustible. La recherche actuelle, en vue de l'implantation, se concentre sur les biopiles enzymatiques car les enzymes sont d'excellents catalyseurs pour les deux demi-piles qui transforment le glucose en gluconolactone et le dioxygène en eau.

De plus, selon l'implant ou l'organe artificiel, les puissances nécessaires peuvent aller de quelques microwatts pour le pacemaker ($15 \mu\text{W}$ à $40 \mu\text{W}$) à plusieurs centaines de milliwatts pour le mouvement d'un bras artificiel (300 mW). La pile au lithium a une puissance volumique de 10 à $20 \mu\text{W mL}^{-1}$. L'implanter pour alimenter un organe qui nécessite ne serait-ce que plusieurs centaines de microwatts, comme un neurostimulateur ($300 \mu\text{W}$ à quelques mW) ou une pompe à insuline ($200 \mu\text{W}$ à 2 mW), n'est pas envisageable car la pile serait trop lourde et trop volumineuse. Trouver une alternative à la pile au lithium, en mettant au point une biopile, est un challenge qui peut être relevé. Les biopiles implantables pourraient, à terme, permettre de fournir suffisamment d'énergie mais pour cela il faut les améliorer au niveau de leur durée de vie et de leur biocompatibilité.

Dans ce contexte, mon travail de thèse repose sur le développement de nouvelles architectures d'électrode afin de concevoir une biopile enzymatique glucose/ O_2 suffisamment puissante et stable pour fonctionner dans un organisme vivant.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à la bibliographie et se divise en quatre sections. Dans la première, le contexte général de développement des (bio)piles à combustible ainsi que leurs principes de fonctionnement sont présentés. Les deuxième et troisième parties de ce chapitre se concentrent sur les composants de la biopile, tels que les biocatalyseurs (enzymes) et les matériaux d'électrode. Les différents types d'enzyme et de techniques pour les immobiliser à la surface d'électrode, y compris les méthodes de transfert d'électron des biocatalyseurs, sont décrits. La diversité des matériaux utilisés dans le domaine des biopiles à combustible, notamment les nanomatériaux carbonés est ensuite étudiée. Pour finir, la quatrième partie de ce

chapitre porte sur les applications réelles des biopiles enzymatiques glucose/O₂, en particulier, dans le domaine *in vivo*.

Le deuxième chapitre est consacré au développement et à la fabrication des bioélectrodes par compression mécanique simple, sans ajout d'une couche externe additionnelle. Une grande variété de biocatalyseurs (11 protéines étudiées), ainsi que différentes espèces redox et leurs mélanges ont pu être introduits dans un volume restreint d'électrode et ont pu être étudiés. Les études sur la stabilité mécanique en solution et sur la mouillabilité des électrodes, sont investiguées. Ce chapitre conclut sur la caractérisation électrochimique de bioélectrodes à base de BOx, pour la réduction de O₂ et à base de FAD GDH et GOx, pour l'oxydation du glucose.

Le chapitre 3 explore une nouvelle approche d'optimisation de la fabrication d'électrodes par simple compression. Cette approche consiste à post-fonctionnaliser des pastilles à compression de CNTs par l'espèce redox via une adsorption, puis à poursuivre par l'immobilisation de l'enzyme en solution. Dans un premier temps, la caractérisation d'une matrice à base des CNTs comprimés est investiguée, ainsi que sa morphologie et sa perméabilité à l'électrolyte. Ensuite, une étude d'adsorption d'une large gamme d'espèces redox, qui n'ont pas fonctionné lors des compressions du chapitre 2, est effectuée. Pour terminer, la fabrication de biocathodes et de bioanodes à base de BOx et à base de FAD GDH ou GOx est expliquée. Leur caractérisation électrochimique est présentée.

Le quatrième chapitre se base sur la recherche d'une éventuelle alternative aux bioélectrodes à compression. Un concept innovant de bioélectrode à cavité, construit par l'assemblage de deux buckypapers avec l'enzyme en poudre piégée entre les deux, a été mis au point. Tout d'abord, la majeure partie de ce chapitre est dédiée aux études sur la cathode à base de BOx et aux moyens qui ont été mis en œuvre afin d'en améliorer ses performances. Une miniaturisation des dimensions de cette dernière a aussi été réalisée afin de se rapprocher du format implantable. La dernière partie de ce chapitre est focalisée sur le bref développement d'une bioanode à cavité à base de FAD GDH.

Enfin, le cinquième et dernier chapitre est consacré à l'utilisation des bioélectrodes au sein d'une biopile enzymatique en vue de l'implantation *in vivo*. La première partie de ce chapitre est dédiée aux biopiles basées sur les bioélectrodes décrites dans le chapitre 2. D'abord leurs performances *in vitro* sont décrites. Ensuite, une étude de stérilisation chimique et de son influence sur les systèmes électrochimiques sont développées. Pour terminer cette partie, l'implantation de la biopile à compression dans l'abdomen du rat Sprague-Dawley a été réalisée et étudiée. La deuxième partie de ce chapitre porte sur le développement et la caractérisation des biopiles à cavité. Dans un premier lieu, les performances de la biopile à cavité *in vitro* sont étudiées. Ici, les biopiles sont testées dans des conditions optimums pour chaque demi-piles, ainsi que dans des conditions proches de celles *in vivo*. Ensuite, l'implantation dans le rat et le suivi des systèmes résultant sont décrits. Enfin, une étude *post-in vivo* de la biopile récupérée de l'organisme vivant après 2,5 mois est investiguée.

Ce manuscrit se termine par des conclusions résumant le travail réalisé au cours de mes années de recherche doctorale avec quelques perspectives découlant des bons résultats obtenus.

CHAPITRE 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1	Quelques généralités sur les (bio)piles à combustible.....	15
1.1.1	La pile à combustible	15
1.1.1.1	Principe de fonctionnement	15
1.1.1.2	Applications	16
1.1.2	Les biopiles à combustible	18
1.1.2.1	Les biopiles microbiennes.....	19
1.1.2.2	Les biopiles à mitochondries	20
1.1.2.3	Les biopiles enzymatiques	20
1.2	Les enzymes et leur connexion à l'électrode.....	23
1.2.1	Enzymes et substrats utilisés dans les biopiles enzymatiques.....	23
1.2.1.1	Généralités	24
1.2.1.2	Enzymes cathodiques.....	27
1.2.1.3	Enzymes anodiques.....	29
1.2.2	Méthodes d'immobilisation d'enzymes	32
1.2.2.1	L'adsorption physique	33
1.2.2.2	La réticulation	33
1.2.2.3	Le greffage covalent	33
1.2.2.4	L'encapsulation.....	34
1.2.2.5	Assemblage supramoléculaire	34
1.2.3	Transfert électronique enzyme – électrode	35
1.3	Matériaux d'électrodes	38
1.3.1	Nanomatériaux	38
1.3.1.1	Nanoparticules d'or.....	39
1.3.1.2	Nanoparticules magnétiques	40
1.3.2	Matériaux carbonés et nanostructurés	40

Chapitre 1. Etude bibliographique

1.3.2.1	Nanoparticules de carbone.....	41
1.3.2.2	Graphène et graphite.....	41
1.3.2.3	Carbone vitreux.....	42
1.3.2.4	Nanotubes de carbone.....	43
1.3.2.5	“Buckypaper”.....	47
1.4	Application des biopiles enzymatiques.....	48
1.4.1	Les biosupercapaciteurs.....	48
1.4.2	Les biopiles portables.....	49
1.4.3	Les biopiles implantables.....	51
	Bibliographie.....	55

1.1 Quelques généralités sur les (bio) piles à combustible

1.1.1 *La pile à combustible*

Malgré d'importantes réserves dans les sous-sols de notre planète, les combustibles fossiles s'épuisent rapidement et pourraient ne pas suffire à répondre aux futures demandes d'énergie des populations. Ceci provoquera un écart entre l'offre et la demande dans un avenir proche, ce qui à son tour menacera la sécurité énergétique du monde. En outre, il ne fait aucun doute que les combustibles fossiles polluent l'environnement et provoquent des pluies acides, le réchauffement de la planète et le changement climatique [1], [2].

Un substitut prometteur aux combustibles fossiles pour fournir de l'énergie est la pile à combustible. Les applications nécessitant une énergie électrique essentielle, comme les systèmes d'alimentation sans coupure, les centrales électriques et les systèmes distribués (réseaux et stockage informatiques...), pourraient utiliser les piles à combustible comme source d'énergie. Les piles à combustible présentent un meilleur rendement par rapport aux systèmes énergétiques classiques. Leur conception est simple et leur fonctionnement est fiable. Actuellement elles sont largement en grande majorité encore à l'étape de prototypes. Cependant, on trouve quelques piles à combustibles utilisées dans des applications, telles que les systèmes de production combinée de chaleur et d'électricité, les systèmes d'alimentation mobiles (voiture électrique) et les équipements militaires [3]. De plus, l'utilisation de l'hydrogène, comme combustible en fait la sources énergétique la plus propre et la plus silencieuse pour l'environnement [4]–[6]

Malgré tous ces avantages, l'utilisation des piles à combustible présente certaines limites. Par exemple, la durée de vie des piles à combustible est réduite lors d'une utilisation discontinue et s'il y a des impuretés dans les flux gazeux. La faible densité de puissance par unité de volume, est un autre défi pour le développement de la technologie des piles à combustible.

1.1.1.1 *Principe de fonctionnement*

A la base, la pile à combustible produit de l'électricité et de la chaleur par le biais de la réaction électrochimique qui est en fait la réaction inversée de l'électrolyse de l'eau. Elle se produit entre l'oxygène et l'hydrogène pour former l'eau. Il existe toute une série de conceptions de piles à combustible, mais elles fonctionnent toutes selon les mêmes principes de base. La principale différence entre les différents modèles de piles à combustible réside dans les caractéristiques chimiques de l'électrolyte [7], [8].

Une pile à combustible est composée de trois éléments actifs : une électrode à combustible (anode), une électrode à oxydant (cathode) et un électrolyte entre les deux. Les électrodes sont constituées d'un matériau poreux qui est recouvert d'une couche de catalyseur (souvent du platine). La figure 1.1 illustre le principe de fonctionnement d'une pile à combustible classique.

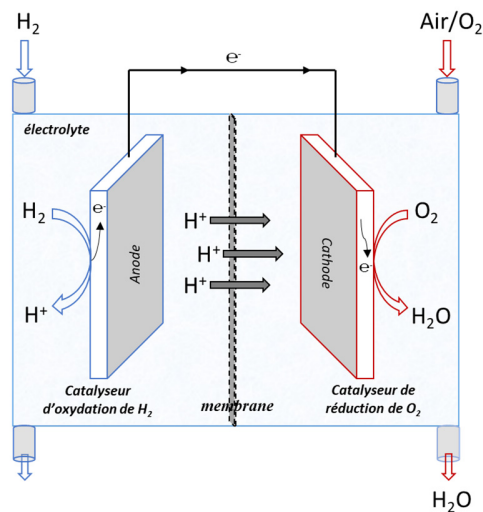
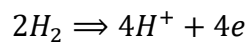
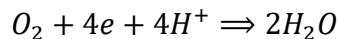


Figure 1.1 : Schéma de la pile à combustible type H_2/O_2

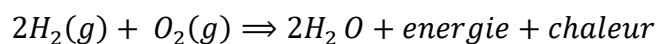
Le dihydrogène (H_2) est amené par un flux gazeux à l'anode où il réagit électrochimiquement. Il est oxydé pour produire des ions hydrogène et des électrons selon l'équation suivante :



Les ions d'hydrogène migrent à travers l'électrolyte acide tandis que les électrons sont déplacés à travers le circuit externe jusqu'à la cathode. À la cathode, les électrons et les ions hydrogène réagissent avec l'oxygène fourni par le second flux de gaz externe pour former de l'eau, selon l'équation suivante :



La réaction globale dans la pile à combustible produit de l'eau, de la chaleur et du courant selon :



La chaleur et les sous-produits (ici l'eau) doivent être éliminés en permanence afin de maintenir un fonctionnement isotherme continu pour une production d'énergie électrique idéale. La gestion de l'eau et de la chaleur est donc un élément clé de la conception et du fonctionnement efficaces des piles à combustible.

Le combustible H_2 peut être obtenu par reformage des hydrocarbures. On a alors un mélange de gaz H_2 et CO . Le H_2 peut aussi être remplacé par le méthanol dans certaines piles à combustible.

1.1.1.2 Applications

Il existe différents types de piles à combustible. En fonction du type de pile à combustible, on a une architecture, une température de fonctionnement, une efficacité, des

applications et des coûts. Elles sont classées selon le choix du combustible et de l'électrolyte en 6 groupes principaux [3], [4]:

- **Pile à combustible alcaline (AFC)**

Les piles à combustibles alcaline utilisent une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (KOH) comme électrolyte. Ce dernier transporte les ions chargés négativement de l'anode à la cathode et libère de l'eau comme sous-produit. Cette pile à combustible permet un démarrage rapide, ce qui est l'un de ses avantages. Son principal inconvénient est qu'elle est très sensible au CO₂, car il consomme l'alcalinité de l'électrolyte, ce qui réduit la concentration d'ions hydroxyde [4], [9]. La NASA (National Aeronautics and Space Administration) a été la première à utiliser les AFC pour alimenter en eau potable et en électricité les missions de la navette spatiale. Actuellement, elles sont employées dans des sous-marins, des bateaux, des chariots élévateurs et des applications de transport de niche [3], [10].

- **Pile à combustible à membrane échangeuse de protons (PEMFC)**

La pile à combustible PEM utilise un électrolyte polymère solide (membrane semblable au Téflon[®]) pour échanger les ions entre deux électrodes poreuses. Cette membrane est un excellent conducteur de protons et un isolant pour les électrons. La température de fonctionnement de la pile à combustible est relativement basse, de l'ordre de 100 °C et même en dessous. Les avantages de la PEMFC sont sa densité de puissance élevée et son démarrage rapide pour les véhicules automobiles. La basse température de fonctionnement rend la technologie crédible dans les transports et les applications commerciales comme les ordinateurs portables, les bicyclettes et les téléphones mobiles [4].

- **Pile à combustible à oxyde solide (SOFC)**

Les piles à combustible à oxyde solide sont des piles à haute température avec un électrolyte céramique d'oxyde métallique solide. Elles utilisent généralement un mélange de dihydrogène et de monoxyde de carbone formé par le reformage interne d'un combustible hydrocarbure et de l'air comme oxydant dans la pile à combustible. La zircone stabilisée à l'yttrium est l'électrolyte le plus couramment utilisé en raison de sa grande stabilité chimique et thermique et de sa conductivité ionique pure [11]. Ces piles peuvent être utilisées comme des systèmes locaux de production d'énergie par exemple pour les zones rurales n'ayant pas accès aux réseaux publics. En outre, elles fonctionnent sans bruit et ont un faible coût de maintenance.

- **Pile à combustible à acide phosphorique (PAFC)**

Les piles à combustible à acide phosphorique sont coûteuses à fabriquer en raison de la nécessité de recourir à des électrodes catalytiques en platine dispersé. Par contre, contrairement aux alcalines, les impuretés dans la vapeur de dihydrogène (CO₂) n'affectent pas ce type de piles. Le rendement électrique de ces piles à combustible se situe entre 40 et 50 %. Elles sont généralement envisagées pour des applications stationnaires (sur site).

- **Pile à combustible directe au méthanol (DMFC)**

Ce type de pile à combustible est relativement nouveau. Comme les PEMFCs, la pile directe au méthanol utilise un électrolyte polymère, mais au lieu du dihydrogène réformé, elle utilise du méthanol ou de l'alcool liquide comme combustible. Ce type de pile à combustible permet d'éviter le reformage catalytique et permet aussi un stockage plus facile du combustible par rapport au dihydrogène. Par contre, on a production de CO₂ à l'anode ce qui est moins vertueux au niveau environnemental. Ces piles moins puissances que les précédentes sont envisagées pour les dispositifs portables (ordinateurs, téléphones...).

- **Pile à combustible à carbonate fondu (MCFC)**

Les piles à combustible à carbonate fondu sont des piles à combustible à haute température (600°C et plus). Elles peuvent être alimentées directement avec du dihydrogène, du monoxyde de carbone, du gaz naturel et aussi du propane. Elles utilisent un mélange de sels de carbonate fondu comme électrolyte en suspension dans une matrice céramique poreuse, chimiquement inerte, constituée d'un électrolyte solide de type bêta-alumine. Ces piles souffrent de problèmes de corrosion dus à l'agressivité des électrolytes utilisés. Elles sont actuellement utilisées pour les centrales électriques au gaz naturel et au charbon dans des applications industrielles et militaires [3].

1.1.2 Les biopiles à combustible

Les piles à combustible sont très attractives pour produire de l'énergie électrique. Cependant, leurs coûts de production (catalyseurs, électrolytes) et de maintenance très élevés, leur durée de vie limitée et leurs dimensions volumiques imposant ralentissent l'essor des piles à combustible présentées précédemment. Pour certaines applications, lorsque la demande en puissance est faible comme pour l'alimentation de petits dispositifs, une alternative intéressante est la biopile à combustible. Les biopiles à combustible ont l'avantage d'utiliser des entités biologiques comme électrocatalyseurs au lieu des catalyseurs traditionnels à base de métaux nobles, coûteux et non renouvelables. Par rapport aux piles à combustible classiques, les biopiles sont capables de fonctionner dans des conditions douces, à température ambiante, à pH neutre, et dans des milieux complexes. Les catalyseurs biologiques sont des ressources renouvelables, ce qui fait de la biopile le candidat idéal.

Comme les piles à combustible classiques, les biopiles sont basées sur l'oxydation du combustible à l'anode (ex. H₂ [12], alcools [13], [14], glucose [15], [16]) et sur la réduction du comburant à la cathode (ex. O₂ ; H₂O₂). La réaction d'oxydation du carburant libère les électrons qui sont consommés à l'autre électrode par la réaction de réduction (Figure 1.2, a). Les potentiels des deux électrodes sont fixés par la valeur des potentiels redox des systèmes responsables de la réponse électrochimique. Les courants obtenus pour chacune des bioélectrodes dépendent de l'activité du biocatalyseur vis-à-vis de son substrat, de la vitesse du transfert d'électrons à chaque électrode, de la température, de la diffusion du combustible et du comburant et de nombreux autres paramètres (Figure 1.2, b).

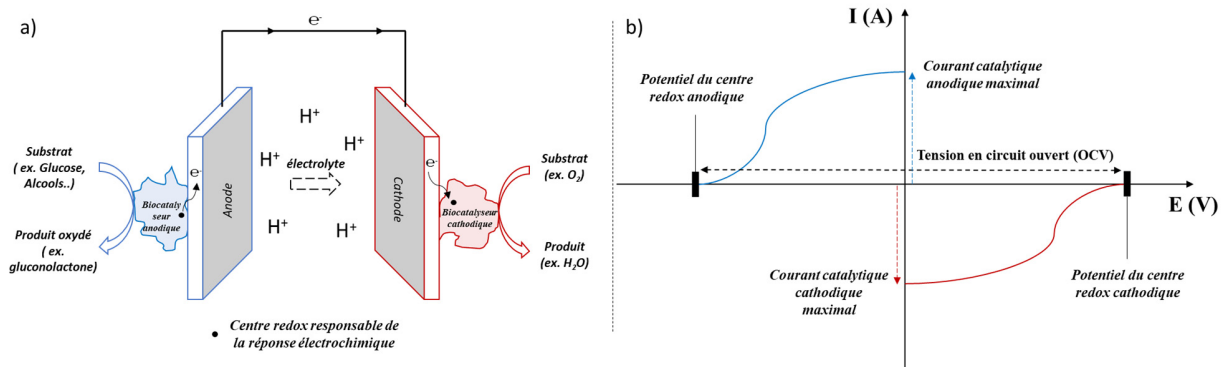


Figure 1.2 : a) Schéma représentatif du fonctionnement d'une biopile à combustible ; b) Représentation du diagramme potentiel-courant avec des contributions anodique et cathodique permettant d'obtenir l'OCV de la biopile et les courants catalytiques

Selon la nature des biocatalyseurs, les biopiles à combustible peuvent être classées en trois groupes : biopiles à combustible microbiennes [17]–[21], biopiles à combustible mitochondriales [22]–[24] et biopiles à combustible enzymatiques [25]–[29]. Les différentes caractéristiques des biocatalyseurs déterminent donc les différentes conditions opérationnelles et les applications de ces biopiles.

1.1.2.1 Les biopiles microbiennes

Les biopiles à combustible microbiennes (MFC) sont des dispositifs qui utilisent des bactéries comme catalyseurs pour oxyder des matières organiques et inorganiques et générer du courant.

Selon les souches microbiennes utilisées, la variété de combustibles oxydables à l'anode est très large, car au sein des bactéries utilisées il y a la présence de nombreuses enzymes redox [30]. Les microorganismes utilisés dans les MFC sont capables de régénérer eux-mêmes les enzymes ou les cofacteurs nécessaires à l'oxydation de la matière organique.

Les biopiles microbiennes ont une durée de vie longue, mais vu la nature de leur biocatalyseur, la réponse initiale prend beaucoup de temps. Cela est dû au fait que les bactéries ont besoin de temps pour croître et former d'un biofilm sur l'électrode. Les principaux désavantages de ce type de biopiles sont un faible transport de masse à travers le biofilm et la nécessité de séparer des compartiments anode/cathode dans le but de les protéger mutuellement contre la croissance parasite des bactéries opposées. Les bactéries sont aussi fragiles et peuvent être désactivées en milieu agressif.

L'une des premières applications pourrait être le développement de réacteurs à l'échelle pilote sur des sites industriels où l'on dispose d'un affluent fiable et de haute qualité. Les eaux usées de l'industrie alimentaire et les effluents de digesteurs sont de bons candidats. À long terme, des substrats plus dilués, tels que les eaux usées domestiques, pourraient être traitées par des MFC, ce qui réduirait la nécessité pour la société d'investir des quantités importantes d'énergie dans leur traitement.

1.1.2.2 Les biopiles à mitochondries

La biopile à combustible mitochondriale a été exploitée ces dernières années comme une solution alternative pour surmonter les limites des biopiles à combustible microbiennes et enzymatiques. Les mitochondries sont des organites présents dans les cellules eucaryotes. Leur rôle physiologique est essentiel puisqu'elles permettent la synthèse et le stockage de l'ATP (Adénosine Triphosphate). En tant que partie intégrante des cellules vivantes, les mitochondries contiennent de multiples enzymes capables d'oxyder très fortement certains substrats organiques, fournissant une efficacité énergétique similaire à celle des MFC. Cependant, ces espèces doivent être immobilisées sur l'électrode pour améliorer leur durée de vie, car elles ne sont pas capables de reproduire elles-mêmes les enzymes redox. Les piles à combustible utilisant ces espèces présentent une densité de puissance plus élevée que les MFC en raison d'un transport de masse plus aisé. Elles possèdent également une durée de vie plus longue que les biopiles enzymatiques en raison de la présence des membranes mitochondriales qui protègent les enzymes.

En 2008, Arechederra et Minteer ont démontré la première bioanode à base de mitochondries capable d'oxyder complètement le pyruvate en dioxyde de carbone en se couplant à une cathode de platine [31]. Ils ont confirmé que ces organites pouvaient transférer directement les électrons à l'électrode grâce à la présence d'une protéine redox membranaire, la cytochrome C oxydase [24]. Cependant, les densités de puissance obtenues dans les publications rapportées sont toujours inférieures aux valeurs théoriques. La même équipe a continué d'étudier l'utilisation des mitochondries et à réaliser des recherches sur les biocapteurs à mitochondries auto-alimentés pour la détection d'explosifs [32].

1.1.2.3 Les biopiles enzymatiques

Une grande attention a été portée à la preuve de concept et à la production de biopiles à combustible enzymatiques, en raison des avantages d'utilisation de catalyseurs d'origine biologique. Ces avantages vont de la capacité à produire une large gamme de catalyseurs basés sur des processus (biologiques) durables, à l'efficacité catalytique inégalable avec des catalyseurs chimiques, à la polyvalence des catalyseurs produits pour oxyder/réduire une large gamme de substrats dans des conditions modérées de pH et de température, et à la spécificité des réactions catalytiques, permettant l'élimination de la membrane de séparation dans certains cas [33].

Malgré les immenses avantages des biopiles enzymatiques par rapport aux piles à combustible traditionnelles, il reste des problèmes spécifiques à résoudre dans ce domaine pour leurs applications dans le monde réel. Le premier défi majeur est le fait que les enzymes sont des protéines, par conséquent, ces biomolécules présentent une structure tridimensionnelle fragile qui doit être préservée, afin de s'assurer que l'activité catalytique soit maintenue [34]. Bien que les enzymes soient des catalyseurs hautement spécifiques et efficaces, ils ont une durée de vie limitée en solution [35], [36]. L'établissement d'un contact électrique entre l'enzyme et l'électrode est également fondamental, car il s'agit de l'un des processus les plus importants dans le domaine de la bioélectrochimie. L'obtention d'un taux élevé de transfert d'électrons du site actif d'une enzyme

immobilisée à la surface de l'électrode est probablement le point le plus critique lors de la construction d'une biopile enzymatique.

Les premières biopiles enzymatiques ont été élaborées par Yahiro et al. en 1964. Elles ont permis d'effectuer l'oxydation du glucose, couplée à la réduction du dioxygène avec une cathode à air [37]. Cependant, les puissances obtenues ont été très faibles ainsi que la durée de vie des enzymes en solution, ce qui a conduit à ce que ces recherches tombent dans l'oubli.

L'intérêt pour les biopiles enzymatiques n'est revenu que depuis quelques décennies grâce aux progrès de l'électrochimie enzymatique notamment en ce qui concerne les électrodes modifiées, avec l'obtention de densités de courant plus élevées et une plus grande stabilité. De plus, les biopiles enzymatiques constituent un moyen d'obtenir une énergie propre et renouvelable. C'est pourquoi, ces dernières années où la question environnementale est prégnante, elles ont acquis une importance scientifique et technologique croissante.

Il existe plusieurs types de biopiles enzymatiques qui sont définis par les substrats que la biopile utilise à la cathode et à l'anode (Tableau 1.1). A la cathode, on ne rencontre que deux substrats (qui sont le dioxygène et le peroxyde d'hydrogène), alors qu'à l'anode il est possible d'utiliser un grand nombre de combustibles. C'est donc l'anode qui procure la diversité des biopiles.

Actuellement, une grande quantité des recherches est concentrée sur les biopiles enzymatiques de type H_2/O_2 qui sont les plus énergétiques. Elles sont basées sur l'utilisation des hydrogénases qui catalysent l'oxydation du H_2 . L'utilisation de cette famille d'enzymes est intéressante car elles ont une grande activité catalytique et elles permettent d'obtenir la force électromotrice la plus élevée possible dans l'eau avec un potentiel très proche du potentiel thermodynamique du couple rédox H^+/H_2 . De plus, si l'on compare aux piles à combustibles classiques, elles permettent d'éviter l'utilisation du platine comme matériau d'électrode qui est cher et non renouvelable [38], [39]. En revanche, la stabilité des hydrogénases reste à être améliorée notamment car leur inactivation par le dioxygène est un obstacle à leur utilisation [25].

Tableau 1.1 : Substrats les plus utilisés aux électrodes des biopiles enzymatiques

Substrat de la cathode	Substrat de l'anode
Oxygène	Glucose
	Fructose
	Lactate
	Méthanol
Peroxyde d'hydrogène	Glycérol
	Dihydrogène
	Formaldéhyde
	Éthanol

L'autre type de biopile enzymatique très étudié est la biopile glucose/O₂. Son intérêt repose sur la biodisponibilité du glucose et du dioxygène dans n'importe quel organisme vivant. Ces biopiles seront décrites plus en détail, car elles sont le centre des recherches développées durant cette thèse.

Biopile enzymatique Glucose / O₂

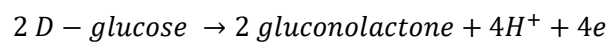
L'attractivité des biopiles enzymatiques type Glucose/O₂, comme il était dit précédemment, provient du fait que les substrats glucose et dioxygène sont présents dans de nombreux milieux physiologiques. De plus, les sous-produits formés lors de leur fonctionnement ne sont pas toxiques pour l'organisme vivant. Cela rend les biopiles glucose/O₂ très intéressantes aux yeux des chercheurs dans le but de leur future utilisation *in vivo*.

L'oxydation du glucose peut être catalysée par plusieurs enzymes telles que la glucose oxydase (GOx) ou la glucose déshydrogénase (FAD GDH). La GOx est l'enzyme la plus utilisée pour l'oxydation du glucose en raison de sa grande stabilité et de son faible coût [16], [40]. Cependant, c'est une enzyme qui utilise le dioxygène comme accepteur naturel d'électrons et qui produit du peroxyde d'hydrogène. Dans le processus électrocatalytique cette enzyme doit transférer les électrons à l'anode et non pas au dioxygène. En présence de dioxygène, on peut donc avoir une perte d'efficacité et une production indésirable de H₂O₂ [41]. Ainsi, une réaction compétitive avec l'O₂ entraîne qu'une fraction des électrons produits au cours de l'oxydation catalytique du glucose ne circulera pas vers la cathode, on a une baisse des performances de la biopile. La GOx est donc sensible au dioxygène dans le cadre de son utilisation comme électrocatalyseur. De plus, le H₂O₂ produit est nocif pour l'activité enzymatique cathodique ce qui là aussi peut entraîner une baisse des performances de la biopile [42]. Les enzymes glucose-déshydrogénases (GDH) sont étudiées comme alternative à la GOx car elles sont insensibles au dioxygène.

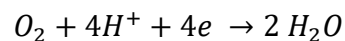
Pour la cathode, la laccase et la bilirubine oxydase sont les deux enzymes les plus utilisées pour la réduction électrocatalytique du dioxygène [43], [44]. Il existe d'autres enzymes, comme l'oxydase multi cuivre (CueO) la polyphénol oxydase (PPO) et la cytochrome oxydase (CytOx), qui peuvent réduire le dioxygène, mais elles sont rarement utilisées pour construire des biocathodes en raison de leurs faibles potentiels par rapport au potentiel thermodynamique de couple O_2/H_2O [45]–[47].

Les enzymes anodiques et cathodiques sont abordées plus en détail dans la suite du chapitre.

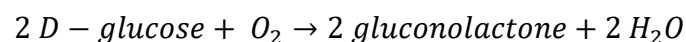
Le principe de la biopile enzymatique Glucose/ O_2 se base sur l'oxydation du glucose en gluconolactone par l'enzyme (ex. la GOx) suivant la réaction :



Les électrons générés lors de cette réaction sont transférés à l'électrode et ensuite transmis à la cathode via le circuit électrique. À la cathode, les électrons participent à la réduction du dioxygène selon :



Il en résulte une équation bilan de la biopile glucose/ O_2 :



La haute sélectivité des enzymes utilisées et l'immobilisation sur les électrodes de ces dernières peuvent permettre, après optimisation, de supprimer la membrane dans cette biopile. Ceci offre de grandes perspectives de miniaturisation et diminution des coûts de la production.

Les perspectives d'implantation des biopiles enzymatiques glucose/ O_2 sont très étudiées en ce moment, mais la mise en œuvre est difficile ce qui limite les développements vers cette direction. D'autre part, les piles à glucose peuvent délivrer des puissances suffisantes pour le fonctionnement des petits dispositifs portables. Par exemple, la compagnie SONY avait monté 4 biopiles glucose/ O_2 en série dans une solution concentrée de glucose et ils ont démontré qu'un tel système pouvait alimenter un lecteur MP3.

Le choix pour les travaux de cette thèse a été de s'orienter vers le développement de bioélectrodes pour une biopile à combustible enzymatique de type glucose/ O_2 avec l'objectif de son application *in vivo*.

1.2 Les enzymes et leur connexion à l'électrode

1.2.1 *Enzymes et substrats utilisés dans les biopiles enzymatiques*

Les protéines sont des macromolécules biologiques et des éléments essentiels à la vie et peuvent avoir un rôle structurel, moteur, régulateur ou catalytique. Parmi les protéines, les enzymes agissent comme catalyseurs dans les processus métaboliques des organismes vivants.

L'activité et la spécificité des enzymes reposent sur leur structure tridimensionnelle, avec un site actif entouré d'une enveloppe protéique. En bioélectrochimie, les oxydoréductases sont un groupe d'enzymes particulièrement intéressantes, car elles catalysent des réactions redox. Ces enzymes nécessitent généralement l'utilisation d'ions inorganiques ou de molécules organiques comme cofacteurs. Les différentes enzymes utilisées pour la conception des bioélectrodes au cours de cette thèse seront présentées dans cette partie du chapitre.

1.2.1.1 Généralités

Les enzymes sont classées en six grands groupes (oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérase et ligases) en fonction de leurs activités catalytiques (Tableau 1.2). Chaque classe d'enzyme est ensuite divisée en sous-classes et finalement à chaque enzyme est associé un numéro de classification, composé de quatre nombres, qui est appelé "EC number".

Tableau 1.2 : Classification des enzymes selon la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie divisant les enzymes en six grandes classes

E. C.	Classification	Type de la réaction catalysée
E.C. 1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C. 2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C. 3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C. 4	Lyases	Elimination de groupement et formation de doubles liaisons
E.C. 5	Isomérase	Isomérisation
E.C. 6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

Les plus utilisées dans les piles à combustible enzymatiques sont évidemment les oxydoréductases [48]. Elles sont constituées par une partie protéique (apoenzyme) et une partie non protéique (cofacteur/métal). Il existe 7 types d'enzymes oxydoréductases en fonction de leur rôle (Tableau 1.3).

Tableau 1.3 : Classification des oxydoréductases selon leurs fonctions

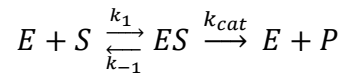
Type d'enzyme oxydoréductase	Leurs fonctions
Oxydases	Catalysent une réaction d'oxydoréduction impliquant une molécule de dioxygène
Réductases	Diminuent l'énergie d'activation d'une réaction d'oxydoréduction
Peroxydases	Catalysent la réaction d'oxydation de substrats spécifiques à l'aide du peroxyde d'hydrogène
Oxygénases	Oxydent un substrat en y transférant un atome d'oxygène issu du dioxygène
Dioxygénases	Assurent l'incorporation de deux atomes d'oxygène dans une molécule
Hydrogénases	Catalysent la conversion des protons en dihydrogène (réaction réversible)
Déshydrogénase	Oxydent un substrat par le transfert d'un ou plusieurs protons à un accepteur généralement un coenzyme tel que la pyrroloquinoléine quinone (PQQ) ou la flavine adénine dinucléotide (FAD)

L'enzyme en tant que catalyseur permet d'augmenter la vitesse d'une réaction sans modifier les fonctions thermodynamiques. Elle va permettre d'abaisser l'énergie d'activation de la réaction et d'augmenter le nombre de molécules susceptibles de réagir. En effet, l'état de transition se retrouve à une énergie inférieure, en présence d'enzyme, ce qui a pour résultat d'abaisser l'énergie d'activation. Cela a pour effet d'augmenter le nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps. Ces phénomènes sont liés aux notions de « Turn Over Number (TON) » et « Turn Over Frequency (TOF) ». Le TON représente le nombre de moles de substrat converties par l'enzyme. Le TOF peut être défini comme le nombre de moles de substrat converties par l'enzyme par unité de temps.

La catalyse enzymatique est très sensible au milieu réactionnel, plusieurs paramètres jouent sur la vitesse et l'efficacité d'une réaction enzymatique, tels que la concentration en substrat, la température, le pH, la nature et la force ionique du tampon utilisé.

Leonor Michaelis et Maud Menten en 1913 sont les premiers à avoir proposé et développé une théorie en catalyse enzymatique en phase homogène [49]. Dans le modèle de Michaelis-Menten, le substrat (S) forme d'abord un complexe avec l'enzyme (E), puis ce complexe (ES) se décompose en produit (P). L'équation de Michaelis & Menten repose sur les deux hypothèses : état stationnaire et état de quasi-équilibre [50]. L'état stationnaire suppose que la première étape de la réaction (formation du complexe) est très rapide ; la concentration en complexe est

instantanément constante. L'état de quasi-équilibre suppose que la première étape est équilibrée (un équilibre s'établi entre les concentrations en enzyme, en substrat et en complexe enzyme-substrat). Enfin, ce modèle n'est valable que pour les vitesses initiales : la concentration totale du substrat $[S]_0$ doit être très supérieure en comparaison à celle de l'enzyme $[E]_0$ et les concentrations de produit restent très faible.



où k_1 , k_{-1} , k_{cat} sont les constantes de vitesse.

La vitesse (V) de formation du produit peut s'écrire selon l'équation suivante :

$$V = \frac{k_{cat}[E]_{tot}[S]}{[S] + \left(\frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}\right)} \leftrightarrow V = \frac{V_m[S]}{[S] + K_M} \text{ avec } K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \text{ et } V_m = k_{cat}[E]_{tot}$$

où V_m c'est la vitesse maximale de la réaction catalytique ; K_M – la constant de Michaelis ; $[S]$ – concentration en substrat ; k_1 – constante de vitesse de la formation du complexe, k_{-1} – constante de vitesse de la disparation du complexe et k_{cat} – constante de vitesse de premier ordre ou constant catalytique de l'enzyme.

La constante de Michaelis (K_M) et la constante de vitesse catalytique (k_{cat}) sont les deux constantes permettant de caractériser la cinétique d'une réaction enzymatique. k_{cat} est une constante de vitesse du premier ordre, elle représente la fréquence à laquelle l'enzyme accomplit l'acte catalytique, c'est-à-dire son « TOF ». La valeur de k_{cat} donne la mesure de l'efficacité de la catalyse du substrat par l'enzyme (l'activité catalytique maximale de cette enzyme). K_M est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Plus la constante est élevée, plus l'affinité est petite. Une enzyme peut avoir, à la fois, une grande affinité envers son substrat (K_M faible) et une faible efficacité catalytique (k_{cat} faible) ou inversement. Dans ce cas-là, la constante catalytique et la constante de Michaelis, prises séparément, ne sont pas suffisantes pour caractériser une enzyme. Il est alors utile de prendre en compte le rapport entre ces deux constantes (k_{cat}/K_M) qui s'apparente à une constante de vitesse du second ordre et représente la spécificité globale d'une enzyme vis-à-vis son substrat et est appelé efficacité catalytique.

Contrairement aux réactions classiques de la catalyse, une augmentation trop importante de la température peut avoir un effet négatif sur la cinétique des réactions enzymatiques. En effet, une température trop élevée pourrait dénaturer de façon irréversible la structure de l'enzyme [51].

Concernant le pH du milieu réactionnel de l'enzyme, il faut savoir que la plupart de ces dernières sont actives que dans un domaine de pH bien défini. Un pH optimal dépend du site actif de l'enzyme et de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Il va influencer l'activité enzymatique via l'état d'ionisation du site actif de l'enzyme (influence sur la conformation de l'enzyme) ou du substrat (une seule forme est catalysée). L'évolution de l'activité enzymatique en fonction du pH se présente sous la forme d'une courbe de Gauss.

La nature de la solution tampon ainsi que la variation de la force ionique vont aussi influencer la vitesse d'une réaction enzymatique. En effet, une enzyme peut présenter une activité plus ou moins grande selon le tampon de travail choisi et sa concentration, et ce pour un même pH [52]. Il est donc indispensable de tenir compte des forces ioniques pour obtenir des résultats reproductibles.

1.2.1.2 Enzymes cathodiques

Les enzymes généralement utilisées à la cathode sont les laccases ou les bilirubines oxydases (BOx). Ces enzymes sont responsables de la réduction de l'oxygène qui est l'oxydant le plus communément utilisé dans les biopiles enzymatiques. Laccase et BOx appartiennent aux enzymes de la famille des oxydases multicuivre (MCOs). Cela vient du fait qu'elles possèdent 4 atomes de cuivre : un cuivre de type 1 au niveau duquel se déroule l'oxydation du substrat, les électrons générés sont alors transférés à un centre trinuécléaire (TNC) composé d'un cuivre de type 2 et 2 cuivres de type 3, où l'oxygène sera réduit en eau (Figure 1.3).

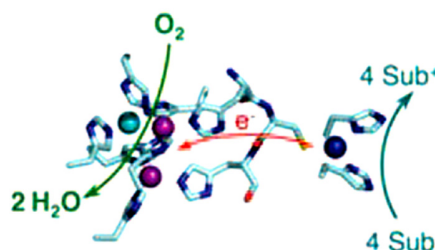


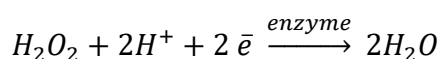
Figure 1.3 : Représentation du centre actifs des MCOs : T1 – en bleu, T2 – en vert, paire T3 – en violet [53]

Le mécanisme de la réduction de dioxygène peut se dérouler de deux façons. Dans un premier cas, l'addition de dioxygène sur la forme réduite des MCOs entraîne la formation d'un intermédiaire peroxyde. Par la suite, une étape rapide permet de réduire directement l'enzyme. Dans le deuxième cas, le mécanisme se compose d'une étape à 4 protons avec libération d'une molécule d'eau donnant la forme oxydée de l'enzyme.

Les céruloplasmines [54], [55] et les ascorbates oxydases [[56]–[58]] font également partie des MCOs. Ces enzymes sont capables d'oxyder de nombreux substrats, dont les phénols, la bilirubine ou l'ascorbate, et surtout elles catalysent la réduction de l'oxygène en eau.

La cytochrome oxydase et le cytochrome C, deux enzymes dont le site actif est composé d'un centre hémique, sont également utilisées [59].

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) peut être également utilisé en tant que substrat au niveau des biocathodes. Cette espèce est hautement réactive avec de fortes propriétés oxydantes. Cela peut être nocif pour les composants biologiques d'où la nécessité d'utiliser les systèmes avec deux compartiments séparés par une membrane. Les enzymes utilisées dans ce cas sont des microperoxydase-11 et la peroxydase de raifort, qui ont les sites actifs en Fe. La demi-réaction dans ce cas là sera :



La bilirubine oxydase

Découverte en 1981 par Tanaka et Murao la bilirubine oxydase (BOx) catalyse l'oxydation de la bilirubine en biliverdine en utilisant le dioxygène comme accepteur d'électrons [60]. La bilirubine oxydase a été principalement utilisée dans la détermination de la bilirubine dans le sérum et dans le diagnostic de la jaunisse [61]. Les BOx ont attiré l'attention pour la réduction de l'O₂ dans des conditions physiologiques, bien que le potentiel de Cu T1 de la BOx se situe autour de 0,40 V vs. Ag/AgCl [62]. Contrairement aux laccases, ces enzymes présentent une activité et une stabilité élevées à pH neutre ainsi qu'une tolérance aux anions chlorure et autres chélateurs. Le travail de cette thèse a pour but d'implanter les biopiles *in vivo*, ce qui explique le choix d'utilisation de la BOx ensuite tout au long de la thèse.

Des bilirubines oxydases fongiques ont été identifiées chez *Myrothecium verrucaria* [63]–[65], *Pleurotus ostreatus* [66], *Trachyderma tsunodae* [67], [68], et surexprimée chez *Aspergillus sojae* [66], [68], *Penicillium janthinellum* [69], et plus récemment, dans le champignon du riz *Magnaporthe oryzae* [70]. Des BOx ont également été identifiées dans des bactéries telles que *CotA* de *Bacillus subtilis* [71], *Bacillus licheniformis* et *Bacillus pumilus* [72].

Les bilirubines oxydases sont utilisées pour des soins de santé, des capteurs à bilirubine et dans les domaines d'environnement, du blanchissement de papier, de la décoloration et de la dépollution. De plus, elles sont beaucoup utilisées dans les cathodes enzymatiques des biopiles à combustible où une activité élevée et une stabilité dans des conditions neutres seraient une exigence. Dans la construction de la biocathode, l'électrode agit à la place du substrat, alimentant la BOx avec des électrons pour la réduction bioélectrocatalytique concomitante du dioxygène en eau.

L'analyse structurale a révélé que la BOx contient deux sites actifs distincts constitués de quatre ions de cuivre, qui sont classés en T1, T2 et une paire de cuivres de T3 en fonction des propriétés optiques et magnétiques (Figure 1.4).

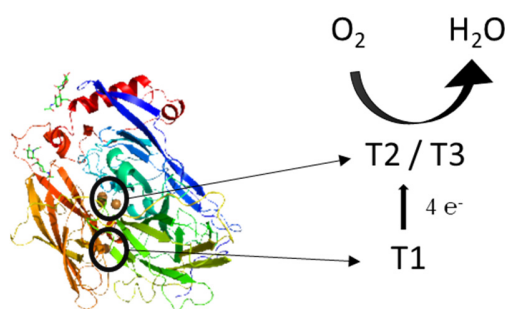


Figure 1.4 : Structure de la bilirubine oxydase from *Myrothecium verrucaria* basée sur le code d'accès PDB 2xll

Les électrons des substrats ou des électrodes sont d'abord transférés au site mononucléaire (T1), puis sont transférés au site trinuéaire (T2/T3) où se produit la réduction de dioxygène à quatre électrons et quatre protons.

Le transfert d'électrons entre la BOx et l'électrode a d'abord été réalisé en utilisant l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) comme médiateur redox soluble [73]. Toutefois les médiateurs redox utilisés pour la BOx sont encore principalement des médiateurs à base de polymères redox fonctionnalisés par des complexes d'osmium qui ont été préalablement employés avec succès pour la connexion électrique de la glucose oxydase [74]–[77]. La bilirubine oxydase est une enzyme relativement petite avec un poids moléculaire d'environ 60 kDa et son site T1 est proche de la surface de la protéine. Par conséquent, la BOx, est bien connue pour sa facilité relative à établir un transfert d'électrons direct avec une électrode.

Outre son coût, l'avantage d'utiliser la BOx par rapport à un catalyseur à base de Pt, réside dans sa capacité à réduire le dioxygène avec une faible surtension. Le potentiel redox du centre T1 à pH neutre est d'environ 0,67 V vs NHE [78], ce qui est proche de la valeur thermodynamique du couple O_2/H_2O (0,82 V vs NHE à 25°C, pH 7) [79].

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la BOx de *Myrothecium verrucaria* [44], l'une des plus étudiées, essentiellement due à sa disponibilité commerciale.

1.2.1.3 Enzymes anodiques

Les principales enzymes utilisées à l'anode sont soit des déshydrogénases qui oxydent un substrat par transfert d'un ou de plusieurs protons à un accepteur (en général son coenzyme), soit des oxydases qui elles vont catalyser une réaction d'oxydoréduction en impliquant une molécule d' O_2 comme accepteur d'électron et qui sera réduite en H_2O ou H_2O_2 .

Les enzymes anodiques peuvent être classées en trois groupes selon le cofacteur auquel elles sont associées [80]. Le premier groupe inclut les enzymes utilisant comme cofacteur la pyrroloquinoléine quinone qui est liée à l'enzyme (PQQ) telles que la glucose déshydrogénase (GDH), l'alcool déshydrogénase et la glycérol déshydrogénase. Le deuxième groupe comprend les enzymes avec soit le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH/NAD⁺), soit le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH/NADP⁺) comme cofacteur (p.ex. aldéhyde déshydrogénase, glucose 1-déhydrogénase (NAD⁺) et etc.). Dans ce type d'enzyme, le cofacteur, centre redox, est faiblement lié à la structure protéique de l'enzyme. Cette caractéristique permet à l'enzyme de transférer des électrons à l'électrode par diffusion du cofacteur. Les enzymes de la troisième catégorie, telles que monoamine oxydase, glucose déshydrogénase et glucose oxydase, ont comme cofacteur la flavine adénine dinucléotide (FAD). Ce cofacteur est étroitement lié à la structure protéique de l'enzyme, de façon covalente ou non. Il est généralement situé très profondément dans la structure de l'enzyme.

Les combustibles principalement utilisés pour le fonctionnement de l'anode dans les biopiles sont : l'hydrogène, les alcools (méthanol, éthanol) et les sucres (glucose, fructose).

Glucose oxydase

La glucose oxydase a été découverte pour la première fois par Muller en 1928 dans des extraits d'*Aspergillus niger*. La séquence d'ADN du gène GOx [81] ainsi que la structure [82] ont ensuite été déterminées. Structurellement, la glucose oxydase est un homodimère composé de

deux sous-unités identiques de 80 kDa et de deux flavines adénine dinucléotides (FAD) liés de manière non covalente (Figure 1.5).

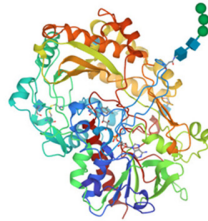
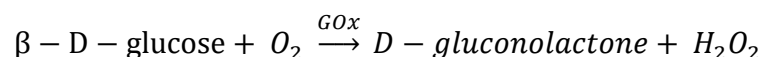


Figure 1.5 : Glucose oxydase from *Aspergillus niger*, image de « Protein data bank (PDB) », 1CF3

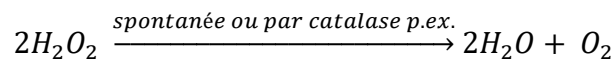
Le coenzyme FAD agit comme transporteur d'électrons pendant la catalyse [83]. La forme la plus couramment disponible de l'enzyme contient environ 20 % en poids de sucre aminé et environ 16 à 19 % en poids de glucides, dont 80 % en poids sont des molécules de mannose liées N- ou O-glycosidiquement [84], [85].

La glucose oxydase est une enzyme produite naturellement par certains champignons et insectes. La fonction principale de GOx est d'agir comme agent antibactérien et antifongique grâce à la production de peroxyde d'hydrogène. Le stress oxydatif permanent par le maintien du peroxyde d'hydrogène à faible concentration via l'activité catalytique continue de la GOx a été rapporté dans la littérature comme étant très efficace contre la croissance bactérienne ou fongique, surtout si le micro-organisme ne produit pas de capteurs de peroxyde d'hydrogène tels que la catalase [86], [87]. D'autres fonctions naturelles intéressantes de GOx incluent l'aide à l'infection des plantes, la dégradation de la lignine, l'abaissement du pH de l'environnement, etc.

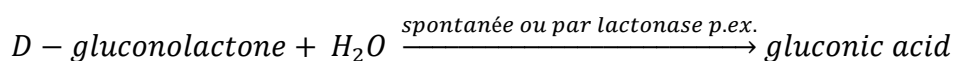
Le degré élevé de spécificité de la GOx pour le glucose et l'application de l'enzyme pour mesurer le glucose en présence d'autres sucres ont été documentés dans les années 1940 [88]. La glucose oxydase catalyse l'oxydation du bêta-D-glucose en D-gluconolactone et en peroxyde d'hydrogène :



Lorsque le peroxyde d'hydrogène s'accumule l'activité enzymatique de GOx peut être réduite et l'enzyme peut se désactiver [89] :

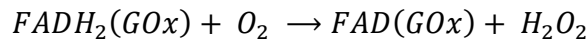
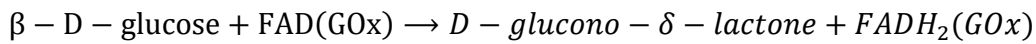


L'accumulation du produit de dégradation de la D-gluconolactone, l'acide gluconique réduit le pH de la solution et peut entraîner une inhibition de l'activité GOx.



Pour le transfert d'électrons entre la GOx et l'électrode, de nombreux chercheurs ont prétendu établir un transfert direct (DET) sur divers matériaux d'électrode (par exemple les

nanotubes de carbone, graphène) sur la base des pics redox observés de FAD/FADH₂ près de -0,47 V par rapport à SCE à pH 7,0.



Cependant, des études structurales suggèrent que le DET est difficile à obtenir en raison du fait que GOx est fortement glycosylé (16 % à 25 %) et qu'il existe une longue distance de transfert d'électrons entre le FAD et la périphérie de la GOx (13 à 18 Å) [90], [91] Compte-tenu de la difficulté d'atteindre un DET, la plupart des bioélectrodes à base de glucose utilisent un médiateur redox pour servir de navette entre le centre actif et l'électrode. Le transfert médié (MET) pour la connexion électrique avec l'électrode est représenté sur la figure 1.6.

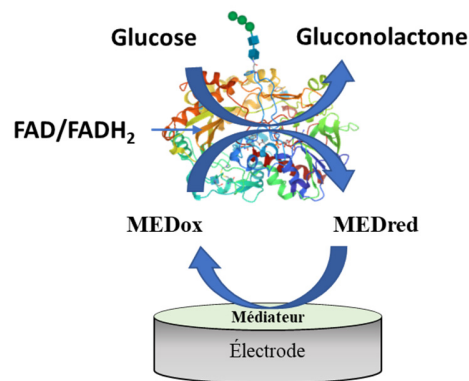


Figure 1.6 : Représentation schématique de la connexion MET de la GOx

FAD dépendant glucose déshydrogénases

Bien que la GOx a été largement employée pour de la biodétection du glucose et le développement de biocapteurs, sa sensibilité au dioxygène peut entraîner des erreurs de mesure dues aux fluctuations du niveau de dioxygène dans les solutions d'échantillonnage (salive, plasma, sang, etc...). De plus, comme nous l'avons présenté précédemment, le dioxygène, en tant qu'accepteur naturel d'électrons de la GOx, entre en compétition avec les médiateurs redox employés dans les biopiles pour la connexion de la GOx dans le compartiment anodique. De plus le dioxygène est le combustible de la biocathode, ce qui entraîne un biais important dans le fonctionnement de la biopile. Pour surmonter cet inconvénient inhérent aux GOx diverses glucose déshydrogénases (GDH) ont été utilisées. Cette enzyme contient le même cofacteur que la GOx, mais elle n'utilise pas le O₂ comme accepteur d'électrons et elle réalise l'oxydation à deux électrons du glucose, ce qui en fait un candidat idéal pour tous les types de biocapteurs de glucose à autosurveillance ou biopiles à combustible.

Les GDHs portant le FAD comme cofacteur redox peuvent être divisées en trois groupes distincts selon leur origine : les FAD GDHs bactériennes, les FAD GDHs fongiques et les FAD GDHs dérivées des insectes. Compte tenu de la spécificité du substrat et de la disponibilité de

divers médiateurs, les FAD GDHs d'origine fongique (fFAD GDHs) sont actuellement les enzymes les plus populaires. Des FAD GDH fongiques ont été identifiés dans les sous-espèces d'*Aspergillus* avec des structures allant du monomère à l'homooligomère (Figure 1.7) [92]–[94]. Malgré le grand intérêt porté aux FAD GDH, les informations structurales et leur disponibilité restent rares.

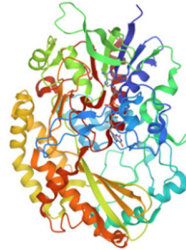


Figure 1.7 : Structure cristalline de la glucose déshydrogénase FAD d'*Aspergillus flavus*, image de « Protein data bank (PDB) », 4YNT

Une étude récente de Yoshida et al. révèle que la structure globale et la structure du site actif de la FAD GDH fongique sont similaires à celles de la GOx, mais avec le cofacteur FAD profondément enfoui sous la surface de la protéine (~1,4 nm) [95]. Il est donc difficile d'obtenir un DET entre la FAD GDH et l'électrode. Muguruma et al. ont rapporté un signal de DET de FAD GDH sur une électrode en or en utilisant des nanotubes de carbone à simple paroi [96]. Cependant le courant d'oxydation en présence de glucose commence à un potentiel relativement élevé.

Pour le MET entre FAD GDH et l'électrode, divers médiateurs peuvent être utilisés, comme ceux utilisés pour les bioélectrodes à base de la GOx [97], mais ils peuvent présenter une constante de vitesse catalytique différente. Dans les travaux de Tsuruoka et al, la vitesse d'oxydation bimoléculaire de différents médiateurs (quinones et phénothiazines) en solution a été étudiée et les résultats ont montré que la constante de vitesse de la FAD GDH est plus élevée que celle de la GOx. Des polymères redox sont également utilisés comme médiateurs pour FAD-GDH. Par exemple, une bioélectrode à base de FAD GDH exhibant des intensités élevées a été construite en utilisant des polymères redox à base d'osmium [98]. Curieusement, la GOx s'est avérée insensible au même polymère redox, n'indiquant aucun courant catalytique en présence de glucose.

Durant cette thèse, les deux enzymes anodiques ont été utilisées pour le développement des bioanodes, la FAD GDH étant la plus employée.

1.2.2 Méthodes d'immobilisation d'enzymes

Dans le domaine de la recherche en bioélectrochimie, l'immobilisation d'enzymes est une étape essentielle dans l'étude des processus de transfert d'électrons d'entités biologiques. En immobilisant les enzymes sur le support d'électrode adéquat, la stabilité des enzymes et l'efficacité du transfert d'électrons peuvent être améliorées [99]. Plus précisément, pour augmenter les performances énergétiques globales des piles à combustible enzymatiques, la

quantité d'enzyme immobilisée sur le support d'électrode joue également un rôle crucial. Pour les applications bioélectroniques, l'immobilisation d'enzymes est souvent nécessaire pour construire des dispositifs miniaturisés [100]. Différents types de techniques d'immobilisation ont été étudiés et sont résumés dans cette section du chapitre.

1.2.2.1 L'adsorption physique

Une méthode simple et largement utilisée est l'adsorption physique d'enzymes sur la surface de l'électrode. Cela peut être fait en recouvrant la surface d'électrode directement par la solution enzymatique sur la surface de l'électrode ou en incubant l'électrode dans la solution enzymatique (Figure 1.8). Les enzymes sont immobilisées sur l'électrode via les interactions non spécifiques impliquant des forces hydrophobes, électrostatiques ou les forces de Van der Waal entre la biomolécule et l'électrode [101]. La majeure partie de l'activité enzymatique est préservée en raison du faible changement de la structure tridimensionnelle de la protéine. Cependant, l'inconvénient est une faible stabilité due à la désorption des enzymes de la surface en raison de forces d'interaction faibles.



Figure 1.8 : Représentation schématique d'immobilisation d'enzymes par simple adsorption physique

1.2.2.2 La réticulation

La réticulation enzymatique se fait à l'aide d'un agent de réticulation (« cross-linker ») formant des agrégats sur la surface de l'électrode (Figure 1.9). Les agents de réticulation couramment utilisés tels que le glutaraldéhyde, l'éther diglycidyle de poly (éthylène glycol) (PEGDGE) et l'ester activé peuvent réticuler les enzymes en réagissant avec les groupes -NH₂ des dernières [102]. L'avantage de cette méthode d'immobilisation d'enzyme est d'être simple à effectuer et de rester plus stable dans le temps par rapport à une simple adsorption, par exemple. Elle présente l'inconvénient de pouvoir dénaturer les enzymes en bloquant leur mobilité conformationnelle conduisant à une activité enzymatique plus faible.

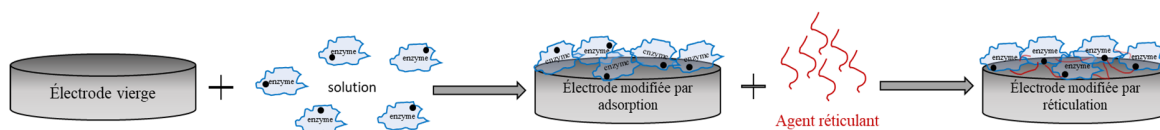


Figure 1.9 : Représentation schématique d'immobilisation d'enzymes par la réticulation

1.2.2.3 Le greffage covalent

Les enzymes peuvent également être immobilisées par greffage covalent à la surface de l'électrode *via* une réaction chimique formant une liaison covalente stable (Figure 1.10). Cette méthode peut empêcher le détachement de l'enzyme de la surface, mais elle diminue également de manière irréversible l'activité enzymatique en raison d'une modification chimique ou d'un changement conformationnel de la biomolécule. Pour former une liaison covalente entre l'enzyme et la surface de l'électrode, une modification préalable du support d'électrode est nécessaire pour

introduire des groupements fonctionnels, par exemple des groupements diazonium, carboxyliques, thiol, etc [103]–[105]. Récemment, des modifications d'enzymes spécifiques au site ont été développées pour immobiliser les protéines redox avec une orientation privilégiée.

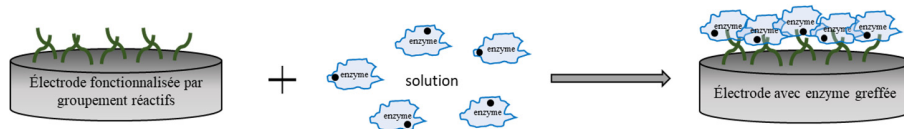


Figure 1.10 : L'immobilisation d'enzymes par le greffage covalent

1.2.2.4 L'encapsulation

L'encapsulation implique l'immobilisation d'enzymes dans une matrice tridimensionnelle (Figure 1.11). Les polymères conducteurs sont largement utilisés pour l'encapsulation d'enzymes. En mélangeant les enzymes et les monomères ensemble, suivi d'une oxydation chimique ou électrochimique, les enzymes peuvent être retenues dans l'environnement tridimensionnel, polymérique ainsi créé. D'autres matrices d'encapsulation sont constituées de polymères non conducteurs (Nafion, alginate, chitosane) et de composite sol-gel inorganique (laponite, HDL, etc) [106]–[109]. L'encapsulation peut retenir une grande quantité d'enzymes et préserver l'activité enzymatique dans la matrice. Cependant, l'épaisseur du film doit être bien ajustée pour réduire la barrière de diffusion. De plus, une fuite d'enzyme et un détachement de la matrice peuvent également se produire et donc limiter la stabilité de la bioélectrode.

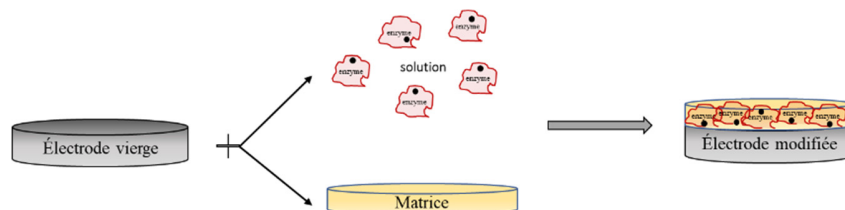


Figure 1.11: Représentation schématique d'immobilisation d'enzymes par l'encapsulation dans une matrice

1.2.2.5 Assemblage supramoléculaire

Une autre méthode pour immobiliser les enzymes exploite les interactions d'affinité entre des groupes fonctionnels spécifiques sur la surface de l'électrode et leur complémentaires affins sur les protéines pour former des assemblages supramoléculaires. Les interactions d'affinité reposent sur des partenaires d'affinité qui peuvent se lier sélectivement ensemble.

Les modifications peuvent être effectuées sur la protéine, mais également à la surface du matériau d'électrode. Il existe de nombreuses méthodes pour fonctionnaliser des surfaces, telles que l'utilisation de polymères, de composés aryle diazoniums ou encore de monocouches autoassemblées (self-assembled monolayer, SAM en anglais). Ces modifications favorisent l'incorporation de groupements chimiques permettant de nombreux types d'interactions [15], [110].

La stratégie d'association d'une vitamine, la biotine, avec une protéine, l'avidine ou la strept-avidine, constitue l'interaction affine la plus largement employée et commercialisée en particulier pour les tests ELISA [111].

Le mimétisme de ce phénomène d'interaction hôte-invité a été étudié et entreprise suivant principalement deux approches. La première méthode repose sur l'inclusion de composés hydrophobes (dérivés de ferrocenes, adamantanes) dans la cavité hydrophobe de cyclodextrine. [112]–[114] (Figure 1.12, a). La deuxième méthode de consiste en la formation d'un complexe de coordination autour d'un ion cuivre ou nickel avec un résidu nitrilotricétique (NTA) et l'enzyme modifié par des groupements histidine (Figure 1.12, b) ou des biotines.

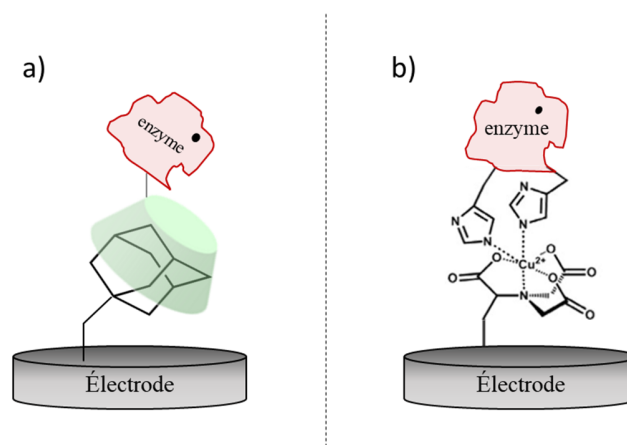


Figure 1.12 : Schémas d'immobilisation d'enzyme sur l'électrode par interactions supramoléculaires : a) interaction entre enzyme fonctionnalisée par cyclodextrine et l'adamantan sur la surface d'électrode ; b) formation d'un complexe NTA – cuivre (II) – enzyme modifiée par des histidines

L'un des plus grands avantages de cette méthode est sa sélectivité, qui permet une immobilisation contrôlée de l'enzyme. En outre, la nature non covalente de la liaison par affinité peut minimiser le changement conformationnel des enzymes. Cependant, cette méthode implique des procédures relativement complexes pour l'introduction de marqueurs spécifiques pour les interactions d'affinité.

1.2.3 Transfert électronique enzyme – électrode

Nous avons déjà évoqué les modes de transfert d'électron lors de la présentation des enzymes. Ce sous chapitre a pour but de décrire leurs effets sur les performances des biopiles. En effet, l'un des paramètres clés de la construction de biopiles enzymatiques à haute puissance est d'obtenir un transfert d'électrons ou un « câblage électrique » efficace entre les enzymes et les électrodes. Pour rappel, il existe deux modes. Le transfert d'électrons entre les centres redox des enzymes et les électrodes peut être réalisé par transfert direct d'électrons (DET) et par transfert d'électrons indirect ou médié (MET), comme illustré sur la figure 1.13.

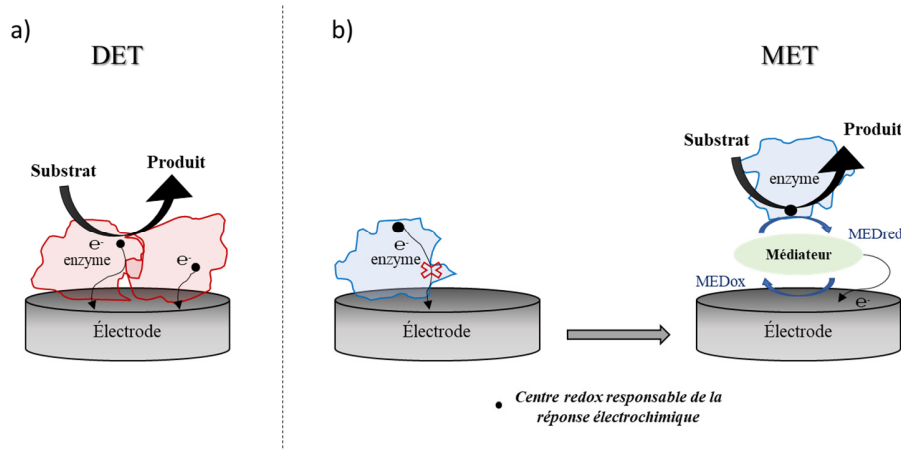


Figure 1.13 : Représentation schématique du transfert d'électron entre l'enzyme et l'électrode : a) direct (DET) et b) médié (MET)

Les enzymes redox sont composées d'une structure protéique contenant un cofacteur redox capable de transférer les électrons du substrat aux cosubstrats. Un transfert électronique efficace ne se produit qu'entre deux sites (enzyme et électrode) ayant des faibles énergies de réorganisation et qui sont séparés par une petite distance. Pour que ce mécanisme ait lieu, le site actif de l'enzyme doit être assez proche de la surface de l'électrode (distance de 15 Å maximum) [25]. Dans ces cas-là, l'enzyme peut échanger directement ses électrons avec l'électrode et le transfert s'appelle direct, DET (Figure 1.13, a).

Conformément à la théorie de Marcus [115], le transfert électronique diminue avec l'augmentation de la distance entre l'électrode et le site actif de l'enzyme. Dans ce cas, le potentiel de catalyse correspond au potentiel d'oxydo-réduction du centre redox de l'enzyme et la surtension est la même que l'enzyme soit connectée à l'électrode dans une biopile ou qu'elle échange ses électrons avec une espèce en solution dans son fonctionnement naturel.

Le transfert d'électrons entre l'enzyme et l'électrode dépend beaucoup du matériau d'électrode et de la nature de l'enzyme. Un certain nombre d'enzymes sont capables de procéder au transfert électronique direct [116], mais d'après *Leech et al.*, elles ne représentent que 5% des enzymes connues [117]. En effet, le DET ne peut pas être observable pour toutes les enzymes. Pour pouvoir étudier les performances bioélectrocatalytiques d'une enzyme pour laquelle le transfert direct n'est pas possible, il est nécessaire d'ajouter un médiateur redox, qui aura pour rôle de transporter les électrons entre l'enzyme et l'électrode (Figure 1.13, b). Cela peut être essentiel lorsque le site actif de l'enzyme est enfoui dans la protéine et donc trop éloigné de la surface de l'électrode. Lors d'une réduction enzymatique, l'enzyme fournit des électrons au substrat et emporte des électrons du médiateur sous sa forme réduite. Le médiateur passe alors de la forme réduite à la forme oxydée et se régénère à la surface de l'électrode. Il sert de relai, prend les électrons à l'un et les donne à l'autre.

Comme nous venons de le préciser, les médiateurs sont donc indispensables si le site actif de l'enzyme est inaccessible et donc incapable d'échanger directement des électrons avec

l'électrode. Mais, ils sont également nécessaires lorsque l'enzyme se fixe préférentiellement à l'électrode dans une orientation qui défavorise le DET.

Lors du choix des médiateurs redox pour les enzymes, les critères suivants doivent être remplis [97], [118] :

1. Le médiateur redox doit avoir un potentiel redox supérieur au potentiel redox du site actif de l'enzyme siège de l'oxydation à l'anode ou inférieur à celui de l'enzyme siège de la réduction à la cathode. D'après la théorie de Marcus la différence de potentiel entre l'enzyme et le médiateur doit être au minimum de 50 mV pour atteindre un transfert électronique efficace [119], [120].
2. Le médiateur doit présenter un taux d'échange d'électrons rapide avec l'enzyme et l'électrode.
3. En lien direct avec les deux précédents points, le potentiel redox du médiateur doit, à la fois, être suffisamment éloigné du potentiel de l'enzyme pour favoriser la cinétique de transfert d'électron (évolution exponentielle avec la surtension) mais aussi être assez proche du potentiel de l'enzyme pour ne pas trop perdre de force électromotrice dans la biopile. C'est un compromis optimal à trouver entre la force électromotrice de la biopile et le potentiel de déclenchement de la réaction. De plus, si le potentiel redox est trop positif pour l'anode (trop négatif pour la cathode), cela peut conduire à une catalyse indésirable avec d'autres espèces dans l'électrolyte.
4. Le médiateur doit présenter un comportement électrochimique réversible.
5. Le médiateur doit être stable sous sa forme réduite et oxydée.

Les avantages et les inconvénients des deux mécanismes de transfert d'électrons, MET et DET, sont opposés :

- Le DET permet que la bioélectrocatalyse se fasse au potentiel redox de l'enzyme. Ce potentiel est généralement thermodynamiquement proche de celui de la réduction ou de l'oxydation du substrat. La biopile, a ainsi la force électromotrice (ou Open Circuit Voltage) la plus grande envisageable. En revanche, l'orientation des enzymes et leur connexion en totalité sur la surface sont difficiles. L'efficacité catalytique est donc faible.
- Au contrario, le MET conduit à l'optimisation de la quantité d'enzyme impliquée dans la bioélectrocatalyse d'où l'augmentation du courant catalytique. On a une meilleure efficacité. Cependant, en transfert d'électrons médié, la catalyse s'effectue au potentiel du médiateur. On a donc une f.é.m. plus faible pour la biopile. De plus, un processus supplémentaire d'immobilisation d'un médiateur est nécessaire.

Pour mieux comprendre, la figure 1,14 illustre l'effet du mode de transfert d'électron sur les performances d'une biopile. On voit ainsi qu'une biopile avec chaque bioélectrode basée sur le DET aura un voltage maximal plus grande. Par contre, la biopile basée sur le MET aux deux bioélectrodes assurera un courant catalytique plus important. (Figure 1.14).

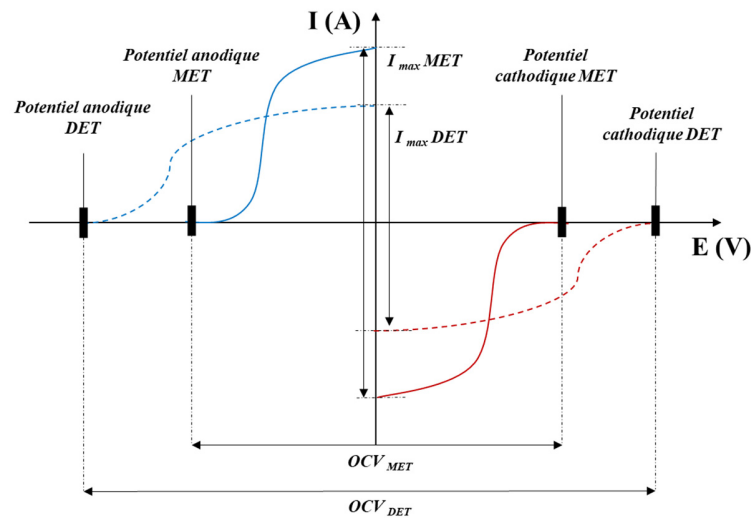


Figure 1.14 : Démonstration de l'impact de l'utilisation d'un médiateur redox (lignes solides) par rapport au transfert d'électrons direct (ligne pointillée)

1.3 Matériaux d'électrodes

Dans cette partie du chapitre, il est important d'aborder le sujet de la nature et de la structuration des matériaux d'électrode, car c'est la partie d'une biopile à combustible qui assure l'immobilisation des biocatalyseurs tout en offrant une connexion électrique optimale entre les enzymes et l'électrode. Comme rapporté par *Yang et al.*, les matériaux d'électrode de la biopile à combustible sont beaucoup plus spécialisés comparés à d'autres biodispositifs ou matériaux biofonctionnels [121]. Outre une conductivité électrique élevée, ces matériaux doivent présenter une surface spécifique importante pour fixer une grande quantité d'enzymes, théoriquement plusieurs monocouches équivalentes. Il est nécessaire évidemment que les matériaux d'électrode soient biocompatibles afin que les enzymes immobilisées ne soient pas endommagées et qu'ils soient stables (électro)chimiquement dans le domaine de potentiel de travail des enzymes. De plus, la stabilité mécanique des matériaux déposés sur les électrodes est également importante, ainsi que leur résistance afin de préserver les contacts électriques et d'éviter les courts-circuits.

1.3.1 Nanomatériaux

Les nanomatériaux (NM) sont composés d'objets dont la taille des éléments structurels est comprise entre 1 et 100 nm. Selon leur structure chimique, les NM peuvent être divisés en deux catégories : organiques et inorganiques. Les NM inorganiques comprennent les métaux et leurs oxydes, les quantum dots, les zéolites. Les avantages des nanoparticules inorganiques sont la simplicité de production, la possibilité d'effectuer diverses modifications de la surface, la catalyse des réactions chimiques, l'accélération du transfert d'électrons, la biocompatibilité et l'amélioration des conditions d'immobilisation des enzymes [122]. Les nanotubes de carbone (CNT), le graphène et l'oxyde de graphène, les calixarènes, etc. sont des NM organiques [123]. Les NM organiques se caractérisent par des propriétés qui contribuent à l'amplification du signal électrochimique et assurent un haut degré de biocompatibilité [124]. Les deux types de NM sont

largement employées pour le développement de capteurs électrochimiques ou des biopiles à combustible [125].

Les propriétés uniques des nanomatériaux, telles que les surfaces spécifiques importantes, la capacité d'adsorption relativement élevée, le fort degré de cristallinité, les facilités de stockage, la stabilité, la durabilité, la réutilisation et le recyclage voire l'activité catalytique contribuent à l'optimisation des biopiles à combustible via une augmentation significative de la surface sensible de la bioélectrode et une immobilisation plus efficace des enzymes.

1.3.1.1 Nanoparticules d'or

La chimie et la physique des nanoparticules d'or sont devenues une nouvelle sous-discipline importante dans le domaine des surfaces. Les propriétés optiques inhabituelles des petites particules d'or, leur électrochimie dépendante de leur taille et leur grande stabilité chimique en ont fait un système modèle de choix pour l'exploration d'un large éventail de phénomènes, notamment l'autoassemblage, le marquage biologique, la catalyse, les théories du transfert d'électrons, le transfert de phase, la fusion et les tests de l'ADN et la croissance des cristaux [126].

Bien que les nanoparticules d'or aient été utilisées à de nombreuses fins différentes, leurs propriétés catalytiques ont été considérées pendant des décennies comme faibles ou absentes. De nouvelles perspectives ont été ouvertes par Haruta et Hutchings qui ont montré simultanément et indépendamment que l'or pouvait être très actif, en particulier pour l'oxydation hétérogène à basse température du CO [127], [128]. Il a été constaté que les nanoparticules d'or non modifiées n'étaient pas actives, mais que lorsqu'elles étaient sur un support d'oxyde métallique, tel que RFe_2O_3 , elles devenaient d'excellents catalyseurs pour l'oxydation du CO.

Les nanoparticules d'or présentent une biocompatibilité élevée et une excellente conductivité. De nombreux exemples de biocapteurs et de biopiles enzymatiques sans médiateur sont ainsi basés sur l'oxydation du glucose et du fructose via des nanoparticules d'or [129], [130]. *Holland et al.* ont attaché une enzyme glucose oxydase génétiquement modifiée à une nanoparticule d'or modifiée par un maléimide. Cette modification a permis le transfert direct d'électrons de l'enzyme à l'électrode. Cette conjugaison spécifique des nanoparticules d'or a été utilisée dans une pile à combustible glucose/ O_2 [131]. *Wang et al.* ont également utilisé des nanoparticules d'or dans la bioélectrode pour obtenir une biopile à combustible glucose/ O_2 sans médiateur capable d'opérer pour travailler dans les fluides physiologiques humains. Ils ont décrit une densité de courant maximale de 40 mA cm^{-2} . Une diminution de 20 % de la densité de courant a été observée pour un fonctionnement continu de cette biopile durant 12 heures [132].

Les avantages fondamentaux des AuNPs ont généré une augmentation exponentielle de leur utilisation dans la détection qui continuera à révolutionner le domaine du diagnostic dans les années à venir.

1.3.1.2 Nanoparticules magnétiques

Les nanoparticules magnétiques (NPM) sont de petites particules (entre 1 et 100 nm de diamètre), qui ont une structure magnétique ou ferromagnétique (FM). Les NPM, en raison de leurs bonnes propriétés magnétiques, sont d'une grande importance pour les chercheurs dans les domaines de la catalyse, de la biotechnologie/biomédecine, des fluides magnétiques, de l'imagerie par résonance magnétique, du stockage d'informations et du traitement de l'environnement [133]–[137]. Les NPM sont employées dans une large variété d'applications, y compris l'immobilisation d'enzymes, l'isolement cellulaire, la purification de protéines et l'administration de médicaments, grâce à leur capacité à être manipulées par un champ magnétique externe et à se libérer en son absence [138], [139].

Les progrès réalisés dans les approches de biodétection utilisant des marqueurs magnétiques ont ouvert la voie à la conception de systèmes permettant d'atteindre des limites de détection ultra-faibles pour la surveillance précoce des maladies dans les applications biomédicales. Actuellement, différentes NPM commerciales sont facilement disponibles avec une variété de tailles, de propriétés magnétiques et de fonctionnalités de surface qui sont exploitées, en particulier, dans le domaine des biocapteurs.

La raison de l'utilisation de ces nanoparticules magnétiques dans les applications biomédicales est de capturer des analytes dans des échantillons complexes (urine, salive, échantillon de sérum, sang, etc.), de les séparer des molécules indésirables et de les marquer [140]. Les capteurs électrochimiques à base de NPMs ont été utilisés aussi pour la détection de drogues. Par exemple, les antagonistes bêta-adrénergiques étant utilisés comme médicament dopant dans les compétitions de plusieurs activités sportives, l'analyse de ces composants est donc importante lors des contrôles anti-dopage. Dans ce contexte, Shaterian *et al.* ont synthétisé un nanocomposite magnétique de ferrite de cobalt/graphène ($\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{GMNC}$) et ont ensuite étudié son comportement de détection électrochimique par voltampérométrie pour la détermination de l'aténolol (AT), un médicament bêta-bloquant [141]. Ils ont rapporté que la présence de graphène et de CoFe_2O_4 à la surface de l'électrode augmente la valeur du courant de pic et diminue le potentiel de pic, respectivement. Un effet synergique entre le GN et le CoFe_2O_4 apparaît donc améliorant ainsi le comportement d'oxydation de l'AT.

Les principaux avantages de l'utilisation des NPM sont donc leur grande surface ainsi que la facilité de leur fonctionnalisation, la modulation de la composition, de la taille et des propriétés magnétiques de ces matériaux, ce qui permet de les utiliser dans une multitude d'outils et de plateformes de biodétection [142].

1.3.2 Matériaux carbonés et nanostructurés

L'utilisation d'électrodes plates ne permet la connexion que d'une monocouche d'enzymes au maximum. Pour augmenter la quantité d'enzymes à la surface de l'électrode et par conséquent la densité de courant, il va falloir augmenter la surface spécifique des électrodes. La nanostructuration permet d'augmenter la surface spécifique des électrodes sans augmenter sa surface géométrique. Il est possible de développer un réseau tridimensionnel par la conception

d'un matériau poreux. Ces matériaux doivent avoir une forte porosité ouverte, une bonne conductivité électrique, et être aisément fonctionnalisables pour la connexion d'enzymes.

Les matériaux carbonés sont les plus utilisés en raison de leur relativement faible coût en comparaison aux autres matières, de leur large fenêtre de potentiel, de leur facilité d'utilisation et de modification. Parmi les matériaux carbonés, les nanotubes de carbone constituent la catégorie la plus largement employée pour une grande diversité d'applications.

1.3.2.1 Nanoparticules de carbone

Les nanoparticules de carbone (NPC) sont des objets présentant une excellente conductivité, une facilité de fonctionnalisation, un rapport surface/volume remarquable et une biocompatibilité. En outre, elles possèdent une nature redox qui permet leur utilisation comme intermédiaires pour le déplacement de l'électron entre le site redox actif des biocatalyseurs et la surface des électrodes [143]

Dans l'approche descendante, les NPC sont synthétisées à partir d'oxyde de graphène, de poudre de graphite, de nanotube de carbone, de suie de charbon, et ainsi de suite, tandis que, dans les méthodes ascendantes, les NPC sont synthétisés à partir de précurseurs plus petits, par exemple par carbonisation de certaines molécules organiques, et ainsi de suite [144].

En 2013, une biopile a été conçue en utilisant des nanoparticules de carbone mésoporeux pour immobiliser l'enzyme. Avant la fabrication de la bioélectrode, les espèces redox ont été emballées dans les vides des nanoparticules de carbone, puis les pores ont été recouverts d'enzymes redox appropriées telles que la GOx et la BOx. Il a été observé que la distance de tunnellation des électrons était réduite en améliorant le transfert de charge médié entre l'enzyme et la surface d'électrode [143].

1.3.2.2 Graphène et graphite

Graphène

Le graphène (GR) est un matériau cristallin bidimensionnel (2D) qui représente la forme allotropique du carbone. Le graphène est composé d'atomes de carbone hybridé sp² avec une structure hexagonale (Figure 1.15). Cette structure hexagonale est l'élément de base de tous les allotropes de carbone tels que le graphite ou les nanotubes de carbone. Les atomes de carbone dans la structure hexagonale sont à une distance C-C régulière de 1,415 Å et ont une énergie de liaison de 167 kJ mol⁻¹ à 15°C. Le graphène possède des propriétés uniques telles qu'une conductivité « balistique », une grande élasticité, une très grande résistance mécanique et une surface spécifique élevée ainsi qu'un transfert hétérogène rapide d'électrons [145].

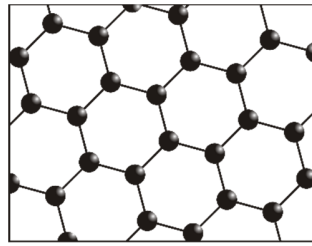


Figure 1.15 : Structure cristalline de Graphène

De plus, dans des conditions ambiantes, la mobilité de charge du graphène peut atteindre de l'ordre de $15\,000\text{ cm}^2\text{ V}^{-1}\text{ s}^{-1}$, ce qui est dix fois supérieur à la mobilité dans le silicium [146]. Il a été également rapporté que des nanofeuillets de graphène ont une conductivité électronique de 64 m S cm^{-1} , presque 60 fois plus élevée que celle des nanotubes de carbone monofeuillets (SWCNTs). La conductivité thermique calculée à l'aide de simulations de dynamique moléculaire était supérieure à celle de ses homologues CNT. Également le graphène possède une surface spécifique de $2630\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$, ce qui est deux fois supérieur à la surface spécifique des CNTs [146]. Grâce à ces propriétés exceptionnelles, le graphène est un matériau prometteur pour les applications énergétiques dans les dispositifs biocatalytiques et l'électrochimie.

Graphite

Le graphite est une structure en couches : les atomes de carbone forment des couches d'hexagones conjugués (Figure 1.16). L'interaction entre les couches s'effectue par des liaisons faibles de Van der Waals, l'énergie de liaison est de 16 kJ mol^{-1} à 15°C . Par conséquent, l'énergie de liaison C-C dans la couche est dix fois supérieure à l'énergie d'interaction entre les couches, ce qui détermine en grande partie à la fois les propriétés physiques et chimiques du graphite et la possibilité de le séparer en couches bidimensionnelle (graphène) [147].

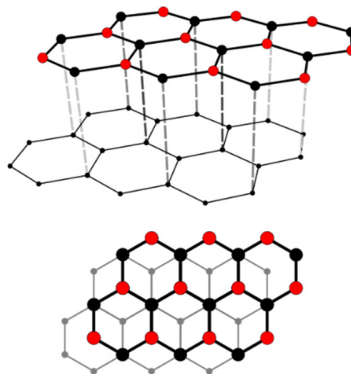


Figure 1.16 : Représentation de la structure cristalline du Graphite

1.3.2.3 Carbone vitreux

Le carbone vitreux (GC, « glassy carbon ») est un matériau à base de carbone peu ordonné, non graphitisant et isotrope, couramment produit par la carbonisation de précurseurs organiques. De nombreuses études ont été réalisées pour élucider sa structure, confirmant l'existence de structures imparfaites liées aux fullerènes dans le matériau. La présence de

nombreux pores structurels entraîne sa faible densité caractéristique. En raison de ses excellentes propriétés chimiques, mécaniques, thermiques et électriques, le GC constitue un matériau prometteur pour de nombreuses applications technologiques. Le carbone vitreux présente une bonne imperméabilité aux gaz et aux liquides, une excellente stabilité chimique et de bonnes conductivités thermique et électrique [148], [149].

Le carbone vitreux constitue une option intéressante pour de nombreuses applications, telles que les capteurs électrochimiques, les dispositifs de stockage d'énergie, les dispositifs électrochimiques pour la décontamination des eaux usées, les outils pour le moulage de précision, les boucliers ablatifs [150]–[152]. En raison de sa bonne biocompatibilité, le GC peut également être utilisé dans de nombreuses applications médicales, telles que les valves cardiaques, les implants neuronaux et les squelettes pour la régénération des tissus [153], [154].

En raison de sa bonne conductivité électrique, le GC peut être considéré comme un excellent matériau à utiliser en tant qu'électrode dans les dispositifs de stockage d'énergie et les systèmes de conversion d'énergie à haute performance. En outre, la porosité ouverte et la surface élevée des mousses de GC diminuent la résistance à l'écoulement des fluides sur le matériau et facilitent la diffusion des ions pour les processus redox [155]. Ainsi, de nombreux travaux de recherche ont été réalisés sur l'utilisation du GC dans des supercondensateurs et des batteries spéciales, qui peuvent être utilisés pour des applications mobiles et pour le stockage de l'énergie éolienne et solaire renouvelable [156].

1.3.2.4 Nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone (CNTs) sont une forme allotropique de matériaux carbonés, qui peuvent être envisagés comme des feuilles de graphène enroulées en cylindres.

En 1991, les CNTs ont été découverts par Sumio Iijima [157]. Ils présentent d'excellentes propriétés chimiques et physiques, telles qu'une résistance élevée à la traction, un poids ultraléger, des structures électroniques spéciales et une grande stabilité chimique et thermique, etc. Ces propriétés exceptionnelles ont suscité un immense intérêt pour ces nanomatériaux auprès des scientifiques. Parmi les nanomatériaux de carbone, les nanotubes de carbone sont les plus exploités pour diverses applications. Les principales applications des nanotubes de carbone comprennent la délivrance de biomolécules, de médicaments et de produits pharmaceutiques aux organes ciblés, ainsi que le diagnostic et l'analyse par biocapteurs [126], [158].

Conformément aux différents articles scientifiques, les nanotubes de carbone sont classés en deux types : les nanotubes monofeuillet et les nanotubes multifeuillets (Figure 1.17, a et b) [159].

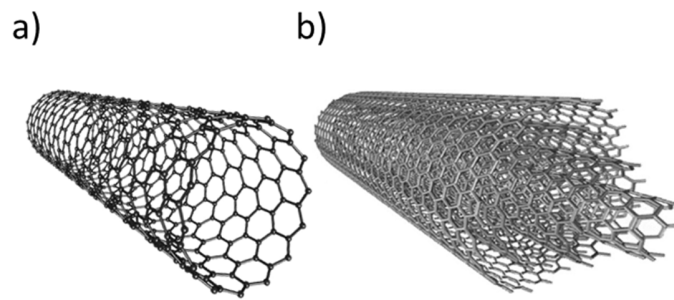


Figure 1. 17 : Représentation des structures de SWCNTs (a) et MWCNTs (b)

Les nanotubes de carbone monofeuillet (SWCNTs)

Entièrement composée de carbone, la structure des SWCNTs non modifiés peut être visualisée comme une enveloppe tubulaire composée d'un enroulement de feuille de graphène, constituée d'anneaux hexagonaux d'atomes de carbone de type benzène (Figure 1.17, a). Les cylindres sont des feuilles de graphène sans raccord représentée par une seule couche atomique de graphite cristallin. La présence de pentagones aux extrémités du tube permet de considérer les nanotubes comme un cas limite de la molécule de fullerène, dont la longueur de l'axe longitudinal dépasse considérablement son diamètre.

Pour les SWCNTs, la structure peut être décrite par la chiralité du tube, qui est défini par les indices (n et m) de leur vecteur chiral, Ch , défini comme :

$$Ch = na_1 + ma_2$$

où n et m sont des entiers, a_1 et a_2 sont des vecteurs unitaires du réseau hexagonal.

Il existe trois différents types possibles de nanotubes de carbone. Ces trois types de CNTs sont les nanotubes de carbone en « arm-chair » ((n, n) , $m = n$), les nanotubes de carbone en « zig-zag » ($(n, 0)$, $m = 0$), et les nanotubes de carbone « chiraux » ((n, m) , $n \neq m$). La différence entre ces trois types dépend de la façon dont le graphite est "enroulé" au cours de son processus de création. Le choix de l'axe d'enroulement par rapport au réseau hexagonal de la feuille de graphène et le rayon du cylindre de fermeture permettent d'obtenir différents types de SWCNTs (Figure 1.18).

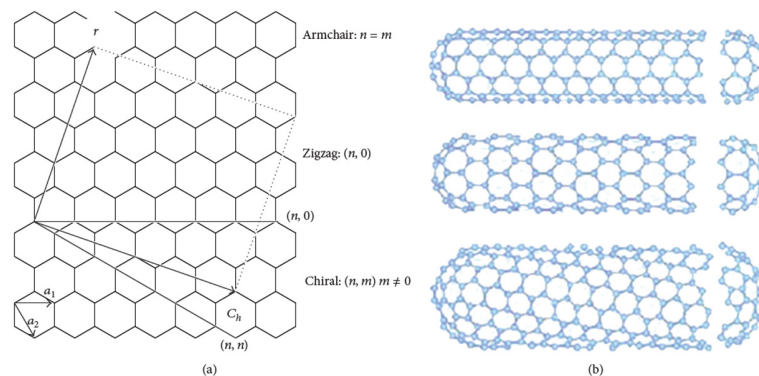


Figure 1. 18 : Représentation schématique (a) de la formation de nanotubes de carbone à paroi unique par enroulement d'une feuille de graphène le long des vecteurs du réseau, ce qui conduit à des tubes en « arm-chair », en « zig-zag » et « chiraux », et (b) des trois types de nanotubes de carbone [160], [161]

La chiralité des SWCNTs détermine également leur propriété électronique, qui peut être semi-conductrice ou métallique selon les calculs de structure de bande électronique [161]–[164]. Lorsque $(2n+m)/3$ est un nombre entier, le tube est considéré comme métallique, sinon il est vu comme semi-conducteur.

Les nanotubes de carbone multifeuillets (MWCNTs)

Les nanotubes multifeuillets sont composés d'un certain nombre concentrique de nanotubes à feuillets uniques maintenus ensemble par des forces de Van der Waals relativement faibles. La structure multicouche de ces nanotubes complique encore la modélisation de leurs propriétés. Le nom MWCNTs est réservé aux nanostructures dont le diamètre extérieur est inférieur à 15 nm, au-delà duquel les structures sont appelées nanofibres de carbone. Les CNTs se distinguent des fibres de carbone, qui ne sont pas des molécules uniques, mais des brins de feuilles de graphite stratifié [160], [163].

Les nanotubes multifeuillets ont une plus grande variété de formes et de configurations que les monofeuillettes. La variété des structures se révèle dans les directions longitudinale et transversale. Les versions possibles de la structure des nanotubes multifeuillets sont divisées en trois catégories [165]. Le premier type de structure consiste en un ensemble de tubes cylindriques monofeuillettes arrangés coaxialement les uns dans les autres. Une seconde catégorie correspond à un ensemble de prismes coaxiaux empilés les uns dans les autres. Enfin, la dernière catégorie rassemble les CNTs élaborés par enroulement plusieurs fois sur lui-même d'un seul feuillet de graphène. Pour toutes les structures, l'amplitude de l'espacement entre les feuillets est typiquement proche de 0,34 nm, ce qui est inhérent à celui du graphite cristallin.

Le tableau 1.4 résume les principales propriétés des SWCNTs et MWCNTs.

Tableau 1.4 : Propriétés des SWCNTs et MWCNTs [166]

Caractéristique	SWCNTs	MWCNTs
<i>Structure</i>	Couche unique de graphène	Multicouche de graphène
<i>Diamètre</i>	1 à 2 nm	2 à ≥ 50 nm
<i>Pureté</i>	Faible	Elevée
<i>Résistance à la traction</i>	50-500 GPa	11-63 GPa
<i>Résistivité</i>	$10^{-4} - 10^{-3}$ c	$1,8 \times 10^{-5} - 6,1 \times 10^{-5}$ Ω m
<i>Densité</i>	> 1 g cm ⁻³	0,8 -1,8 g cm ⁻³
<i>Pliage</i>	Facile	Difficile
<i>Catalyseur requis</i>	Oui	Non
<i>Quantité</i>	Difficile à obtenir beaucoup	Relativement facile à produire
<i>Accumulation corporelle</i>	Faible	Elevé

De nombreuses applications technologiques des nanotubes sont basées sur leur surface spécifique élevée. La tendance des nanotubes à former des structures en spirales à torsions multiples et orientées de manière aléatoire entraîne l'apparition (à l'intérieur du nanotube) d'un grand nombre de cavités de taille nanométrique accessibles pour la pénétration de gaz et de liquides depuis l'extérieur. Une expérience intéressante, utilisant la surface spécifique élevée d'un matériau nanotube, est décrite dans le travail de *C. Niu et al.* [167]. Dans ces travaux, des nanotubes de carbone ont été utilisés comme électrodes pour des condensateurs électrochimiques à haute capacité et à haute puissance spécifique. Les principales exigences imposées à un matériau d'électrode pour un condensateur électrochimique sont liées à sa porosité élevée ainsi qu'à la résistivité élevée du matériau et de l'électrolyte liquide remplissant la structure poreuse d'une électrode.

En raison de leurs propriétés physiques exceptionnelles, les applications technologiques des nanotubes sont à profusion dans divers domaines. De nombreux secteurs sont concernés allant des pneumatiques au renforcement des pâles des éoliennes de grande dimension en passant par le tissage des nanotubes de carbone pour renforcer le kevlar et le renforcement mécanique des structures pour l'allègement des voitures ou des avions.

Bien que les nanotubes de carbone soient déjà utilisés pour améliorer la conductivité des batteries lithium-ion et celle des panneaux photovoltaïques organiques, de nombreuses directions d'utilisation des nanotubes restent à considérer dans le domaine de l'électronique moderne. Les propriétés des nanotubes, telles que leur petite taille, variable dans une large gamme en fonction des conditions de synthèse, leur résistance mécanique et leur stabilité chimique, permettent de les considérer comme des éléments de base précieux pour la microélectronique [168], [169].

Les SWCNTs de haute qualité sont intéressants pour les transistors en raison de leur faible diffusion des électrons et de leur bande interdite, qui dépend du diamètre et de l'angle de chiralité. De plus, les SWCNTs sont compatibles avec les architectures de transistors à effet de champ (FET) et les diélectriques à haut K [170], [171]. Malgré les performances prometteuses des dispositifs individuels à base de SWCNTs, le contrôle du diamètre, de la chiralité, de la densité et du placement des CNTs reste insuffisant pour la production industrielle en microélectronique, en particulier sur de grandes surfaces. Par conséquent, les dispositifs tels que les transistors comprenant des films structurés de dizaines ou de milliers de SWCNTs sont plus immédiatement pratiques. L'utilisation de réseaux de CNTs augmente le courant de sortie et compense les défauts et les différences de chiralité, améliorant ainsi l'uniformité et la reproductibilité des dispositifs [170].

Les caractéristiques uniques des CNTs sont également bénéfiques pour les applications en bioélectrochimie. Les CNTs peuvent former un réseau tridimensionnel à haute porosité pour immobiliser les enzymes. Plus important encore, le faible diamètre des CNTs permet de s'approcher du site actif des enzymes, favorisant ainsi le transfert direct d'électrons [172]. Les CNTs sont principalement utilisées pour améliorer les performances des biopiles à combustible en termes de densité de puissance. Dans la plupart des études, les bioélectrodes des biopiles ont été construites par le dépôt des CNTs sur des supports tels que des électrodes en carbone vitreux pour former des films minces de plusieurs μm . Pour les applications pratiques, des efforts ont été focalisés sur la facilité de manipulation des CNTs en les façonnant sous différentes formes d'électrodes autoportantes, telles que des fils, des pastilles et des papiers [16], [173]–[175].

Les électrodes sous forme de pastilles sont habituellement obtenues par compression mécanique d'une poudre de CNTs. La plupart des biopiles enzymatiques de forte puissance rapportées à ce jour sont basées sur des bioélectrodes à pastilles de CNTs [16], [40], [176]. Bien que la pastille tridimensionnelle puisse accueillir un grand nombre d'enzymes et de médiateurs, l'accessibilité aux enzymes piégées profondément dans le matériau s'avère difficile en raison de l'hydrophobie inhérente des tubes.

1.3.2.5 “Buckypaper”

Le buckypaper (BP) est une feuille mince composée de CNTs enchevêtrées maintenues ensemble par des interactions π - π (Figure 1.19) [177], [178]. Ce matériau est fin (épaisseur $\approx 0,2 - 0,7$ mm), léger, hautement conducteur et facile à manipuler, ce qui en fait un excellent candidat comme matériau d'électrode pour les dispositifs bioélectroniques à interface corporelle. Plus important encore, le BP est autoportant, ce qui le différencie des autres matériaux nanostructurés en carbone.

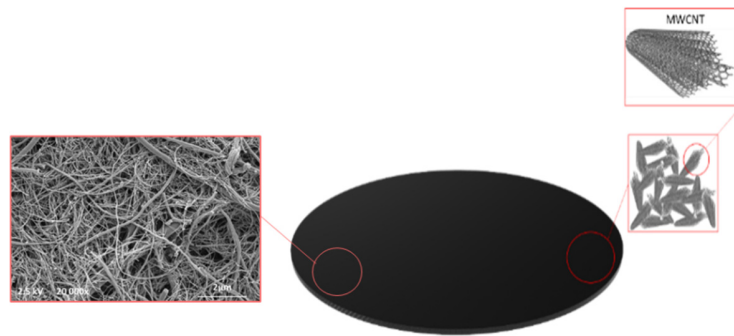


Figure 1.19 : Représentation du "Buckypaper"

Le terme " buckypaper " provient du nom familier des CNTs, " buckytubes ", inspiré par la découverte des " buckyballs " par Smalley, Curl et Krot [179]. Le groupe de Smalley a décrit pour la première fois en 1998 la possibilité de former une feuille autoportante de nanotubes de carbone, le " buckypaper [175]. Buckypaper est maintenant le terme bien accepté pour désigner les feuilles de nanotubes de carbone désordonnées et alignées, y compris les matériaux composites, formées par filtration sous vide de dispersions aqueuses et non aqueuses de nanotubes de carbone à mono-, double- et multicouche (SWCNTs, DWCNTs et MWCNTs, respectivement) [179], [180]. Buckypaper peut également être produit par des méthodes de laminage, telles que la " poussée domino " et l'étirage et l'enroulement de CNTs [181], [182]. La poussée en domino consiste à faire rouler une forêt de CNTs avec une pression constante sur un substrat solide. La méthode alternative de laminage consiste à tirer des CNTs d'une forêt et à enrouler la feuille de nanotubes nouvellement formée sur un rouleau de plastique rotatif [183].

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés au développement d'électrodes en CNTs type pastilles et papier (Buckypaper).

1.4 Application des biopiles enzymatiques

1.4.1 *Les biosupercapaciteurs*

Aujourd'hui, la technologie hybride supercondensateur/pile à biocombustible est la contribution la plus sensationnelle au prototypage pour le développement de dispositifs énergétiques à haute performance pour les applications futures [184]. Cette nouvelle technologie hybride prometteuse a récemment fait l'objet d'une étude selon laquelle les systèmes hybrides ont le potentiel dynamique de contourner les problèmes majeurs de faibles densités de puissance et d'épuisement des substrats dans les biopiles à combustible enzymatiques [185], [186].

Les supercondensateurs électrochimiques peuvent être considérés comme le pont entre les batteries et les condensateurs classiques en raison de leurs propriétés de stockage de densités d'énergie élevées combinées à des cycles de charge-décharge rapides. Ils sont particulièrement intéressants lorsqu'une puissance élevée doit être délivrée ou stockée dans un temps très court [187]. Ces caractéristiques ont débouché sur une grande variété d'applications pour les

supercondensateurs qui vont de l'alimentation des appareils mobiles à faible consommation (plusieurs mW) à leur utilisation dans le secteur automobile (plusieurs kW) [188].

Angen et al. ont proposé un système hybride original utilisant une matrice de CNTs comme supercondensateur et comme matériau d'électrode pour un montage de biopile à combustible. Cet hybride supercondensateur/pile à combustible a permis des cycles de décharge de forte puissance où la matrice de CNTs était continuellement rechargée via une conversion énergétique biocatalytique [184]. *Sode et al.* ont, eux aussi, développé un nouveau biodispositif basé sur des piles à combustible enzymatiques qui génèrent une puissance stable suffisante pour faire fonctionner des dispositifs électriques et des transducteurs, appelés "BioCapacitor". Dans le but d'augmenter la tension, les piles à combustible enzymatiques ont été connectées à une pompe de charge. Un condensateur a été utilisé pour stocker le potentiel généré par cette pompe. La combinaison d'une pompe de charge et d'un condensateur avec la pile à combustible a permis de générer des tensions élevées avec un courant temporairement suffisant pour faire fonctionner un dispositif électrique sans modifier la conception et la construction de la biopile [185].

1.4.2 Les biopiles portables

L'électronique portable a fait l'objet d'une attention particulière, notamment pour les dispositifs biomédicaux pour la surveillance de la santé et de la forme physique [189]. Comme la plupart de ces dispositifs portables sont en contact avec la peau, ils doivent être petits, flexibles, robustes, légers et ne pas être dérangeants pour l'individu porteur du dispositif.

La plupart des efforts actuels reposent sur l'intégration de batteries encombrantes, qui compromettent gravement la portabilité [190], [191]. L'absence de sources d'énergie portables suffisamment fines constitue un obstacle majeur à l'utilisation pratique de dispositifs médicaux. Des efforts ont donc été déployés pour concevoir des batteries minces et extensibles et des supercondensateurs afin de résoudre ce problème [192], [193]. Cependant, ces systèmes ont une capacité de stockage d'énergie limitée et doivent être rechargés fréquemment [194].

Une autre approche consiste à alimenter sans fil le dispositif portable, généralement par l'intermédiaire de puces de communication en champ proche [195], [196]. Cependant, cela nécessite une source d'énergie importante et proche et oblige la personne portant le dispositif à s'immobiliser le temps de la recharge. Une autre approche prometteuse consiste à développer un collecteur d'énergie portable qui récupère l'énergie des mouvements du corps, du soleil, de la chaleur corporelle, et des biofluides [16], [197]–[200]. Parmi ces derniers, l'utilisation des biofluides, en particulier la sueur humaine, pour la production d'électricité par des biopiles à combustible portables est une piste intéressante, car ces systèmes reposent sur des biomolécules inoffensives pour la conversion de l'énergie.

Bandodkar et al. abordent les deux problèmes susmentionnés en développant une biopile de type peau électronique (E-BFC) souple et étirable de manière déterminée, qui peut générer une densité de puissance élevée jusqu'à 1 mW cm^{-2} en piégeant le lactate présent dans la sueur humaine (Figure 1.20). L'E-BFC maintient sa puissance élevée sous des contraintes répétées ($e =$

50 %) et est capable d'exploiter l'énergie de la sueur pour alimenter une radio Bluetooth Low Energy (BLE) et une diode électroluminescente (LED) [176].

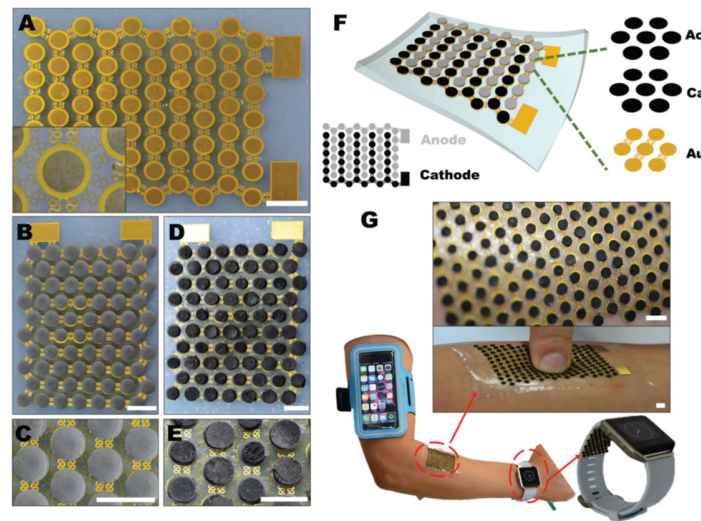


Figure 1.20 : Images et schémas de l'E-BFC. Photo réelle de l'architecture d'îlots connectés en Au (A) nu et (B) revêtu de carbone ; (C) Image agrandie de l'architecture d'or revêtue de carbone ; Photo (D) de la section complète et (E) d'une section rapprochée de l'E-BFC ; (F) Représentation picturale de la vue éclatée du E-BFC, illustrant ses différentes couches (Au, Ca, carbone et Ac, composants bio-anodiques/cathodiques actifs) ; (G) Images montrant la vue complète et zoomée d'un E-BFC orné d'un sujet humain, ainsi que son potentiel pour diverses applications portables. (A, B-E et G) Barre d'échelle, 5 mm [176].

Chen *et al.* ont présenté une biopile à combustible à haute puissance, extensible, flexible et portable grâce à une combinaison unique d'électrodes en buckypaper (BP) pour générer de l'énergie à partir de la transpiration (Figure 1.21).

Pour répondre à l'exigence des dispositifs portables de supporter des mouvements et des déformations rigoureux pendant l'exercice humain, l'extensibilité structurelle et l'extensibilité intrinsèque du matériau est nécessaire. Une biopile à combustible adhérent à la peau qui génère de l'énergie à partir de la sueur a été créée par la combinaison d'un substrat collecteur de courant sérigraphié et de BPs flexibles réticulés par des polymères polynorbornène et modifiés par des enzymes (Figure 1.21). Au cours d'expériences *in vitro*, la biopile assemblée avait un OCV élevé de 0,74 V et une densité de puissance maximale de 0,52 mW cm⁻². Le dispositif à base de BP a pu alimenter une LED commerciale à la fois en mode impulsionnel et en mode continu [201].

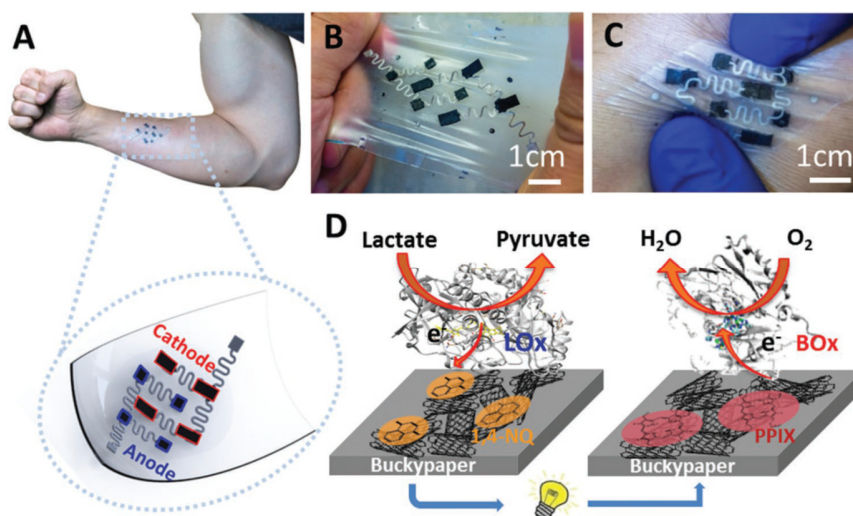


Figure 1.21 : A) Photo du dispositif étirable sur un bras humain, zoom illustration schématique de la biopile à combustible portable sur la peau ; B, C) Photo de la biopile à combustible enzymatique sous étirement et flexion, respectivement ; D) Schémas de la génération d'énergie redox à partir de l'oxydation du lactate de la sueur à l'anode et de la réduction de l'O₂ à la cathode par la BFC [201].

L'intérêt récent pour le développement de capteurs non invasifs portables pour la surveillance continue de la santé a conduit à la réalisation de divers dispositifs ciblés sur l'œil, tels que le moniteur de pression intraoculaire, la correction de la presbytie et les écrans électroniques [202]–[204]. Bien que des sources d'alimentation externes, par exemple l'alimentation sans fil par radiofréquence, aient été explorées, la nécessité d'avoir une telle source externe à proximité de l'œil rend ces systèmes moins attrayants. Les larmes contiennent plusieurs métabolites qui pourraient être récupérés et exploités par des systèmes de biopiles pour générer suffisamment d'énergie pour alimenter les dispositifs à base de lentilles de contact [205]. Contrairement aux sources d'énergie sans fil, les biopile à combustible ne nécessitent aucun composant externe pour générer de l'électricité et peuvent donc être incorporées dans les dispositifs à base de lentilles de contact pour la collecte d'énergie in situ. Le groupe de Shleev a été l'un des premiers à concevoir et exploiter la bioconversion d'énergie couplée à des lentilles de contact [206]. Des études *in vitro* sur des larmes humaines ont démontré que la pile génère une densité de puissance maximale de $1 \mu\text{W cm}^{-2}$ à une tension de 0,5 V, et se caractérise par une demi-vie opérationnelle de plus de 20 heures.

1.4.3 Les biopiles implantables

L'idée de biopile à combustible implantable pour alimenter des appareils, tels que les stimulateurs cardiaques, a été démontrée dès 1970 [199]. Cependant, le manque de techniques efficaces d'immobilisation et de connexion électrique des enzymes et de capacités de bio-ingénierie a entravé la poursuite des recherches dans ce domaine jusqu'au début d'années 2000. Des recherches innovantes menées par plusieurs groupes, notamment ceux de Katz et Cosnier, ont conduit à la démonstration de biopile à combustible implantable dans divers organismes, tels que l'escargot, le cafard, le homard et le rat [207], [208]. Ces biopiles créent de l'énergie à partir du dioxygène et du glucose présent dans l'hémolymphe en libre circulation des invertébrés

(escargots, palourdes, homards) ou dans les vaisseaux sanguins des vertébrés (rats, lapins). Elles présentent des capacités prometteuses pour alimenter des dispositifs implantables tels que des stimulateurs cardiaques et des systèmes d'administration de médicaments. Néanmoins, les procédures chirurgicales de stérilisation pour implanter ces biopiles, la faible concentration en dioxygène *in vivo* ainsi que la toxicité et l'encrassement biologique lors d'un usage chronique sont des obstacles majeurs auxquels sont confrontées ces biopiles implantables.

La recherche dans ce domaine a maintenant fait des progrès considérables pour surmonter les trois problèmes majeurs qui pouvaient réduire la performance des biopiles à glucose et limiter leurs perspectives d'utilisation sous forme implantée. Ces problèmes concernent la durée de vie des enzymes et leur faible activité catalytique à pH physiologique, la biocompatibilité des différents composants de leur configuration dans un corps vivant, et les phénomènes de bioencrassement (biofilm, processus d'inflammatoires, etc.) à la surface de la biopile implantée [209].

La première démonstration d'implantation réussie d'une pile enzymatique dans une matière biologique, en l'occurrence un fruit (un grain de raisin) a été réalisée par Mano et Heller [210]. Dans ce travail, les enzymes à la bioanode et la biocathode ont été câblées électriquement par un polymère redox d'osmium.

La première implantation des biopiles enzymatiques dans un mammifère a été réalisée en 2010 au sein d'équipe de Serge Cosnier en collaboration avec le groupe de Philippe Cinquin. La biopile, implantée dans un rat libre de ses mouvements, était constituée de bioélectrodes élaborées par compression mécanique d'un mélange de particules de graphite, d'enzymes (GOx et polyphénol oxydase) et de médiateurs redox (ubiquinone à l'anode et hydroquinone à la cathode) [211]. La biopile implantée a fourni une puissance maximale de l'ordre de 6,5 μW à 0,13 V avec une tension en circuit ouvert (OCV) de 0,275 V et s'est révélé capable de produire une puissance stable pendant plusieurs jours de 2 μW (Figure 1.22).

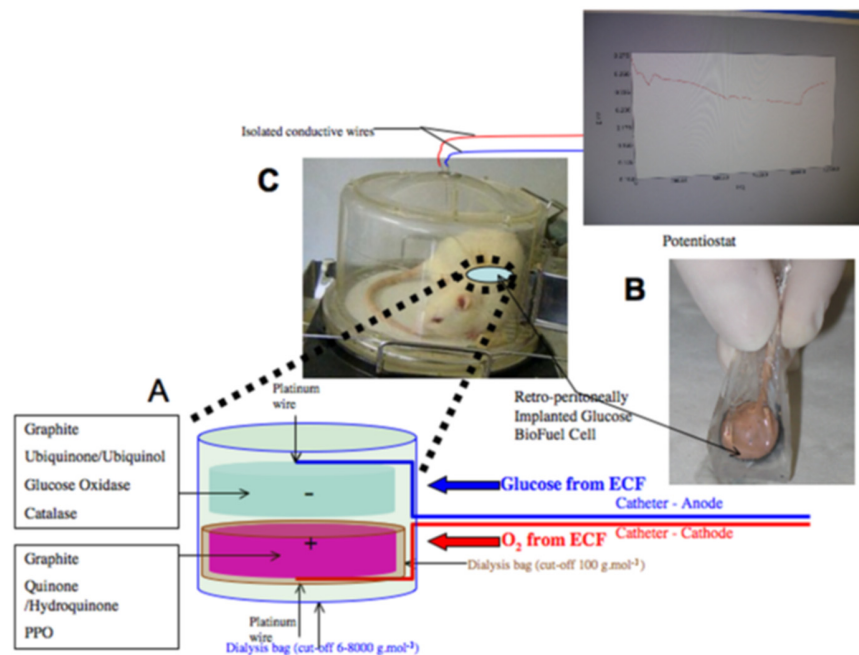


Figure 1.22 : Résumé du principe (A), de la préparation (B), de l'implantation et du fonctionnement d'une cellule implantable "Quinone-Ubiquinone Glucose BioFuel Cell" implantable (C)[211]

En 2013, un nouveau concept d'immobilisation et de connexion électrique d'enzyme par compression d'un mélange contrôlé de protéines et de nanotubes de carbone multifeuillets a conduit à des biopiles extrêmement performantes (1,72 mW à 0,6 V et 0,95 V comme tension maximum). Ce type de biopile a été implantées dans des rats et a réussi pour la première fois à alimenter une LED et un thermomètre électronique à partir d'un animal libre de ses mouvements. Cette biopile basée sur la connexion électrique directe de la glucose oxydase et la laccase, génère, après implantation, 38,7 μW soit 193 $\mu\text{W cm}^{-2}$ ou 161 $\mu\text{W mL}^{-1}$, ce qui correspond à une augmentation par un facteur 24 des performances de la première biopile implantée dans un rat [197].

La même année, *Sales et al.* ont développé une biopile basée sur des électrodes flexibles en fibre de carbone pour une implantation chez un rat [212]. L'anode était fonctionnalisée avec du rouge neutre (chlorure de 3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine) et des GOx réticulées avec du glutaraldéhyde. La cathode a été fonctionnalisée avec des dendrimères et des nanoparticules de platine. La biopile hybride qui en résultait, a été implantée à l'intérieur d'un cathéter en polyéthylène dans la veine jugulaire d'un rat, produisant une puissance de 95 μWcm^{-2} à un potentiel de 0,08 V pendant 24 heures.

Des recherches visant à résoudre les problèmes de biocompatibilité ont été publiées par *El-Ichi et al* qui ont étudié la stabilité d'une biocathode enzymatique implantée pendant 167 jours chez un rat [213]. La biocathode a été fabriquée à partir d'un réseau nanofibreux 3D de chitosan comprimé en présence de génipine comme réticulant, de nanotubes de carbone et de laccase. Pour assurer la biocompatibilité de la biocathode, les auteurs ont recouvert sa surface d'une fine pellicule de chitosane réticulée avec de la génipine. Cette conception de biocathode a minimisé la

réponse inflammatoire au cours des deux premières semaines après l'implantation. Après plusieurs mois, la croissance des macrophages a été observée. Après l'extraction, la biocathode est restée opérationnelle dans les mesures *in vitro* ultérieures. Les mesures de l'OCP (0,45 V à 0,48 V) et du courant délivré ($-0,6 \text{ mA mL}^{-1}$) dans des conditions optimales (pH 5, saturation en oxygène) ont confirmé que les connexions électriques et l'activité catalytique de l'enzyme piégée dans la biocathode ont été conservées pendant quasiment les 6 mois d'implantation.

Pour conclure, après cette immersion dans la littérature scientifique du monde des biopiles enzymatiques, il n'y a pas le moindre doute à propos du grand intérêt qui leur est accordé ces dernières années. Des grands progrès sur leur développement, notamment dans le milieu de la médecine et des implantations ont été réalisés. Notre équipe BioCEN, qui a eu de nombreuses réussites avec le développement des électrodes et des biopiles enzymatiques, en est un bon exemple. Néanmoins, les bioélectrodes et les biopiles ont des points nécessitant d'être améliorés. Par exemple, les travaux faits par notre équipe dans les années 2010-2013, utilisant les bioélectrodes faites via une compression des produits, ont consisté à une fabrication multi-étapes compliquant leur fabrication manuelle. En ce qui concerne les implantations, les performances et la stabilité dans le temps sont à revoir. Les travaux des années 2019, sur l'utilisation des Buckypaper sont une réelle avancée, mais ils nécessitent encore une évaluation *in vivo*.

À partir de ces conclusions tirées de travaux existants, mon travail de thèse a donc consisté, premièrement, au développement et à l'amélioration des bioélectrodes. Plus précisément, je me suis intéressée à la facilitation de leur fabrication et de leur miniaturisation, ainsi qu'à l'amélioration de leurs propriétés physicochimiques et de leurs performances électrochimiques. Deuxièmement, les recherches durant ce doctorat ont été orientées vers un développement de biopiles de nouvelles générations en vue de leur implantation *in vivo*. Et pour cela, ma démarche a été l'évaluation des performances des biopiles enzymatique *in vitro*, l'amélioration de la biocompatible et, bien évidemment, l'étude des performances dans un organisme vivant.

Bibliographie

- [1] K. Sopian and W. R. Wan Daud, “Challenges and future developments in proton exchange membrane fuel cells,” *Renew Energy*, vol. 31, no. 5, pp. 719–727, 2006, doi: 10.1016/j.renene.2005.09.003.
- [2] W. R. W. Daud, R. E. Rosli, E. H. Majlan, S. A. A. Hamid, R. Mohamed, and T. Husaini, “PEM fuel cell system control: A review,” *Renewable Energy*, vol. 113. Elsevier Ltd, pp. 620–638, 2017. doi: 10.1016/j.renene.2017.06.027.
- [3] S. Mekhilef, R. Saidur, and A. Safari, “Comparative study of different fuel cell technologies,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 16, no. 1. Elsevier Ltd, pp. 981–989, 2012. doi: 10.1016/j.rser.2011.09.020.
- [4] A. Kirubakaran, S. Jain, and R. K. Nema, “A review on fuel cell technologies and power electronic interface,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 13, no. 9. pp. 2430–2440, Dec. 2009. doi: 10.1016/j.rser.2009.04.004.
- [5] X. Zhang and Z. Shen, “Carbon fiber paper for fuel cell electrode q.” [Online]. Available: www.fuelfirst.com
- [6] H. Xu, L. Kong, and X. Wen, “Fuel cell power system and high power DC-DC converter,” *IEEE Trans Power Electron*, vol. 19, no. 5, pp. 1250–1255, Sep. 2004, doi: 10.1109/TPEL.2004.833440.
- [7] C. Brian, “An introduction to Fuel cell and Hydrogen technology,” *Heliocentris, Vancouver, BC Canada*, 2001.
- [8] L. Fan, Z. Tu, and S. H. Chan, “Recent development of hydrogen and fuel cell technologies: A review,” *Energy Reports*, vol. 7. Elsevier Ltd, pp. 8421–8446, Nov. 01, 2021. doi: 10.1016/j.egy.2021.08.003.
- [9] M. Farooque and H. C. Maru, “Fuel Cells - The Clean and Efficient Power Generators,” *Proceedings of the IEEE*, vol. 89, no. 12, pp. 1819–1829, 2001, doi: 10.1109/5.975917.
- [10] K. Kordesch, “Alkaline fuel cells applications, innovative energy technology,” *Austria: Institute of High Voltage Engineering, U Graz*, 1999.
- [11] S. C. Singhal, “Advances in solid oxide fuel cell technology,” 2000. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/ssi
- [12] A. F. Wait, A. Parkin, G. M. Morley, L. dos Santos, and F. A. Armstrong, “Characteristics of enzyme-based hydrogen fuel cells using an oxygen-tolerant hydrogenase as the anodic catalyst,” *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 114, no. 27, pp. 12003–12009, Jul. 2010, doi: 10.1021/jp102616m.
- [13] Y. M. Yan, I. Baravik, R. Tel-Vered, and I. Willner, “An ethanol/O₂ biofuel cell based on an electropolymerized bilirubin oxidase/Pt nanoparticle bioelectrocatalytic O₂-reduction cathode,” *Advanced Materials*, vol. 21, no. 42, pp. 4275–4279, Nov. 2009, doi: 10.1002/adma.200900206.
- [14] R. L. Arechederra and S. D. Minter, “Complete Oxidation of Glycerol in an Enzymatic Biofuel Cell,” *Fuel Cells*, vol. 9, no. 1, pp. 63–69, Feb. 2009, doi: 10.1002/face.200800029.
- [15] S. Cosnier, A. J. Gross, A. le Goff, and M. Holzinger, “Recent advances on enzymatic glucose/oxygen and hydrogen/oxygen biofuel cells: Achievements and limitations,” *Journal of Power Sources*, vol. 325. Elsevier B.V., pp. 252–263, Sep. 01, 2016. doi: 10.1016/j.jpowsour.2016.05.133.
- [16] 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, 2011, doi: 10.1038/ncomms1365.
- [17] B. E. Logan *et al.*, “Microbial fuel cells: Methodology and technology,” *Environmental Science and Technology*, vol. 40, no. 17. pp. 5181–5192, Sep. 01, 2006. doi: 10.1021/es0605016.
- [18] C. Santoro, C. Arbizzani, B. Erable, and I. Ieropoulos, “Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review,” *J Power Sources*, vol. 356, pp. 225–244, 2017, doi: 10.1016/j.jpowsour.2017.03.109.
- [19] M. Rahimnejad, A. Adhami, S. Darvari, A. Zirepour, and S. E. Oh, “Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review,” *Alexandria Engineering Journal*, vol. 54, no. 3. Elsevier B.V., pp. 745–756, Sep. 01, 2015. doi: 10.1016/j.aej.2015.03.031.

- [20] V. Chaturvedi and P. Verma, "Microbial fuel cell: a green approach for the utilization of waste for the generation of bioelectricity," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 3, no. 1. Springer, Dec. 01, 2016. doi: 10.1186/s40643-016-0116-6.
- [21] I. Gajda, J. Greenman, and I. A. Ieropoulos, "Recent advancements in real-world microbial fuel cell applications," *Current Opinion in Electrochemistry*, vol. 11. Elsevier B.V., pp. 78–83, Oct. 01, 2018. doi: 10.1016/j.coelec.2018.09.006.
- [22] J. Zhao, F. Meng, X. Zhu, K. Han, S. Liu, and G. Li, "Electrochemistry of mitochondria: A new way to understand their structure and function," *Electroanalysis*, vol. 20, no. 14, pp. 1593–1598, Jul. 2008, doi: 10.1002/elan.200704205.
- [23] D. Bhatnagar, S. Xu, C. Fischer, R. L. Arechederra, and S. D. Minteer, "Mitochondrial biofuel cells: Expanding fuel diversity to amino acids," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, no. 1, pp. 86–92, Jan. 2011, doi: 10.1039/c0cp01362e.
- [24] R. L. Arechederra, K. Boehm, and S. D. Minteer, "Mitochondrial bioelectrocatalysis for biofuel cell applications," *Electrochim Acta*, vol. 54, no. 28, pp. 7268–7273, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.electacta.2009.07.043.
- [25] J. A. Cracknell, K. A. Vincent, and F. A. Armstrong, "Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis," *Chemical Reviews*, vol. 108, no. 7. pp. 2439–2461, Jul. 2008. doi: 10.1021/cr0680639.
- [26] M. Rasmussen, S. Abdellaoui, and S. D. Minteer, "Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements," *Biosens Bioelectron*, vol. 76, pp. 91–102, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.bios.2015.06.029.
- [27] S. C. Barton, J. Gallaway, and P. Atanassov, "Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices," *Chem Rev*, vol. 104, no. 10, pp. 4867–4886, Oct. 2004, doi: 10.1021/cr020719k.
- [28] I. Ivanov, T. Vidaković-Koch, and K. Sundmacher, "Recent advances in enzymatic fuel cells: Experiments and modeling," *Energies*, vol. 3, no. 4. MDPI AG, pp. 803–846, 2010. doi: 10.3390/en3040803.
- [29] S. D. Minteer, B. Y. Liaw, and M. J. Cooney, "Enzyme-based biofuel cells," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 18, no. 3. pp. 228–234, Jun. 2007. doi: 10.1016/j.copbio.2007.03.007.
- [30] D. Pant, G. van Bogaert, L. Diels, and K. Vanbroekhoven, "A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production," *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 6. Elsevier Ltd, pp. 1533–1543, 2010. doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.017.
- [31] R. Arechederra and S. D. Minteer, "Organelle-based biofuel cells: Immobilized mitochondria on carbon paper electrodes," *Electrochim Acta*, vol. 53, no. 23, pp. 6698–6703, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.electacta.2008.01.074.
- [32] M. N. Germain, R. L. Arechederra, and S. D. Minteer, "Nitroaromatic actuation of mitochondrial bioelectrocatalysis for self-powered explosive sensors," *J Am Chem Soc*, vol. 130, no. 46, pp. 15272–15273, Nov. 2008, doi: 10.1021/ja807250b.
- [33] D. Leech, P. Kavanagh, and W. Schuhmann, "Enzymatic fuel cells: Recent progress," *Electrochimica Acta*, vol. 84. pp. 223–234, Dec. 01, 2012. doi: 10.1016/j.electacta.2012.02.087.
- [34] M. J. Cooney, V. Svoboda, C. Lau, G. Martin, and S. D. Minteer, "Enzyme catalysed biofuel cells," *Energy and Environmental Science*, vol. 1, no. 3. pp. 320–337, 2008. doi: 10.1039/b809009b.
- [35] S. D. Minteer, "Enzyme Stabilization and Immobilization Methods and Protocols Second Edition Methods in Molecular Biology 1504." [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/7651>
- [36] L. Gianfreda and M. R. Scarfi, "Enzyme stabilization: state of the art," 1991.
- [37] A. T. Yahiro, S. M. Lee, and D. O. Kimble, "BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 375 BBA 45057 BIOELECTROCHEMISTRY I. ENZYME UTILIZING BIO-FUEL CELL STUDIES."
- [38] O. Rüdiger *et al.*, "Enzymatic anodes for hydrogen fuel cells based on covalent attachment of Ni-Fe hydrogenases and direct electron transfer to SAM-modified gold electrodes," *Electroanalysis*, vol. 22, no. 7–8, pp. 776–783, 2010, doi: 10.1002/elan.200880002.
- [39] C. Baffert, S. Dementin, V. Fourmond, and C. Léger, "L'électrochimie, un outil pour étudier les mécanismes enzymatiques." [Online]. Available: <http://bip.cnrs-mrs.fr/>

- [40] B. Reuillard *et al.*, “High power enzymatic biofuel cell based on naphthoquinone-mediated oxidation of glucose by glucose oxidase in a carbon nanotube 3D matrix,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, no. 14, pp. 4892–4896, 2013, doi: 10.1039/c3cp50767j.
- [41] R. D. Milton, F. Giroud, A. E. Thumser, S. D. Minter, and R. C. T. Slade, “Hydrogen peroxide produced by glucose oxidase affects the performance of laccase cathodes in glucose/oxygen fuel cells: FAD-dependent glucose dehydrogenase as a replacement,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, no. 44, pp. 19371–19379, Nov. 2013, doi: 10.1039/c3cp53351d.
- [42] R. D. Milton, F. Giroud, A. E. Thumser, S. D. Minter, and R. C. T. Slade, “Hydrogen peroxide produced by glucose oxidase affects the performance of laccase cathodes in glucose/oxygen fuel cells: FAD-dependent glucose dehydrogenase as a replacement,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, no. 44, pp. 19371–19379, Nov. 2013, doi: 10.1039/c3cp53351d.
- [43] A. le Goff, M. Holzinger, and S. Cosnier, “Recent progress in oxygen-reducing laccase biocathodes for enzymatic biofuel cells,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 72, no. 5. Birkhauser Verlag AG, pp. 941–952, Mar. 01, 2015. doi: 10.1007/s00018-014-1828-4.
- [44] N. Mano and L. Edembe, “Bilirubin oxidases in bioelectrochemistry: Features and recent findings,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 50. pp. 478–485, Dec. 15, 2013. doi: 10.1016/j.bios.2013.07.014.
- [45] Y. Miura *et al.*, “Direct Electrochemistry of CueO and Its Mutants at Residues to and Near Type I Cu for Oxygen-Reducing Biocathode,” *Fuel Cells*, vol. 9, no. 1, pp. 70–78, Feb. 2009, doi: 10.1002/face.200800027.
- [46] B. Reuillard, A. le Goff, C. Agnès, A. Zebda, M. Holzinger, and S. Cosnier, “Direct electron transfer between tyrosinase and multi-walled carbon nanotubes for bioelectrocatalytic oxygen reduction,” *Electrochem commun*, vol. 20, no. 1, pp. 19–22, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.elecom.2012.03.045.
- [47] H. A. Heering, “Analysis of protein film voltammograms as Michaelis-Menten saturation curves yield the electron cooperativity number for deconvolution,” *Bioelectrochemistry*, vol. 87, pp. 58–64, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.bioelechem.2011.12.008.
- [48] J. D. Newman and S. J. Setford, “Enzymatic Biosensors 249 MOLECULAR BIOTECHNOLOGY Enzymatic Biosensors,” *Mol Biotechnol*, 2006.
- [49] Michaelis Leonor and Maud L. Menten, “Die kinetik der invertinwirkung,” *Biochem Z*, vol. 49, pp. 333–369, 1913.
- [50] A. M. J. et V. A. S. Cornish-Bowden, *Cinétique enzymatique*, EDP Sciences. 2005.
- [51] H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. A Comprehensive Handbook*, Weinheim: Wiley-VCH., vol. Vols. I-III. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.
- [52] S. Kumar, C. J. Tsai, and R. Nussinov, “Thermodynamic differences among homologous thermophilic and mesophilic proteins,” *Biochemistry*, vol. 40, no. 47, pp. 14152–14165, Nov. 2001, doi: 10.1021/bi0106383.
- [53] Z. Xiao and A. G. Wedd, “Metallo-oxidase enzymes: Design of their active sites,” in *Australian Journal of Chemistry*, 2011, vol. 64, no. 3, pp. 231–238. doi: 10.1071/CH10428.
- [54] V. N. Zaitsev, I. Zaitseva, M. Papiz, and P. F. Lindley, “An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma,” 1999. [Online]. Available: <http://www.rcsb.org/pdb/>
- [55] I. Zaitseva *et al.*, “The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centres,” 1996.
- [56] K. Kawahara, S. Suzuki, T. Sakurai, and A. Nakahara, “Characterization of Cucumber Ascorbate Oxidase and Its Reaction with Hexacyanoferrate (II),” 1985.
- [57] A. Messerschmidt *et al.*, “X-ray Crystal Structure of the Blue Oxidase Ascorbate Oxidase from Zucchini Analysis of the Polypeptide Fold and a Model of the Copper Sites and Ligands August0 Marchesini Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante,” 1989.
- [58] J. Hirose *et al.*, “Characterization of Ascorbate Oxidase from *Acremonium* sp. HI-25,” 1994.
- [59] I. Ivanov, T. Vidaković-Koch, and K. Sundmacher, “Recent advances in enzymatic fuel cells: Experiments and modeling,” *Energies*, vol. 3, no. 4. MDPI AG, pp. 803–846, 2010. doi: 10.3390/en3040803.

- [60] S. Koikeda *et al.*, “Molecular cloning of the gene for bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* and its expression in yeast,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 25, pp. 18801–18809, 1993, doi: 10.1016/s0021-9258(17)46699-3.
- [61] B. T. Dumas, B. Perry, B. Jendrzczak, and L. Davis, “Measurement of Direct Bilirubin by Use of Bilirubin Oxidase,” 1987. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/clinchem/article/33/8/1349/5653562>
- [62] S. Tsujimura, M. Fujita, H. Tatsumi, K. Kano, and T. Ikeda, “Bioelectrocatalysis-based dihydrogen/dioxygen fuel cell operating at physiological pH,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 3, no. 7, pp. 1331–1335, Apr. 2001, doi: 10.1039/b009539g.
- [63] N. Tanaka, “Purification and Some Properties of Bilirubin Oxidase of *Myrothecium verrucaria* MT-1,” 1982.
- [64] G. Jian, L. Xi-Xian, M. O. Pei-Sheng, and L. I. Gao-Xiang, “Purification and Properties of Bilirubin Oxidase from *Myrothecium verrucaria*.”
- [65] N. Tanaka and S. Murao, “Reaction of Bilirubin Oxidase Produced by *Myrothecium verrucaria* MT-1,” 1985.
- [66] I. Masuda-Nishimura, K. Ichikawa, O. Hatamoto, K. Abe, and Y. Koyama, “cDNA cloning of bilirubin oxidase from *Pleurotus ostreatus* strain Shinshu and its expression in *Aspergillus sojae*: an efficient screening of transformants, using the laccase activity of bilirubin oxidase,” 1999.
- [67] J. Hirose *et al.*, “Anions binding to bilirubin oxidase from *Trachyderma tsunoda* K-2593,” 1998.
- [68] T. Sakurai *et al.*, “Authentic and Recombinant Bilirubin Oxidases Are in Different Resting Forms,” 2003. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/bbb/article/67/5/1157/5944554>
- [69] Y. Seki, M. Takeguchi, and I. Okura, “Purification and properties of bilirubin janthinellum oxidase from *Penicillium*.”
- [70] F. Durand, S. Gounel, C. H. Kjaergaard, E. I. Solomon, and N. Mano, “Bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae*: An attractive new enzyme for biotechnological applications,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 96, no. 6, pp. 1489–1498, Dec. 2012, doi: 10.1007/s00253-012-3926-2.
- [71] S. I. Sakasegawa, H. Ishikawa, S. Imamura, H. Sakuraba, S. Goda, and T. Ohshima, “Bilirubin oxidase activity of *Bacillus subtilis* CotA,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 72, no. 1, pp. 972–975, Jan. 2006, doi: 10.1128/AEM.72.1.972-975.2006.
- [72] F. Durand *et al.*, “Bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*: A promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells,” *Biosens Bioelectron*, vol. 35, no. 1, pp. 140–146, May 2012, doi: 10.1016/j.bios.2012.02.033.
- [73] H. T. J. O. S. S. K. K. T. I. Seiya Tsujimura, “Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water at neutral pH using bilirubin oxidase as an enzyme and 2,2%-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) as an electron transfer mediator,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 496, pp. 69–75, 2001.
- [74] P. A. Jenkins, S. Boland, P. Kavanagh, and D. Leech, “Evaluation of performance and stability of biocatalytic redox films constructed with different copper oxygenases and osmium-based redox polymers,” *Bioelectrochemistry*, vol. 76, no. 1–2, pp. 162–168, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.bioelechem.2009.04.008.
- [75] N. Mano, J. L. Fernandez, Y. Kim, W. Shin, A. J. Bard, and A. Heller, “Oxygen Is Electroreduced to Water on a ‘Wired’ Enzyme Electrode at a Lesser Overpotential than on Platinum,” *J Am Chem Soc*, vol. 125, no. 50, pp. 15290–15291, Dec. 2003, doi: 10.1021/ja038285d.
- [76] E. Suraniti, V. Studer, N. Sojic, and N. Mano, “Fast and easy enzyme immobilization by photoinitiated polymerization for efficient bioelectrochemical devices,” *Anal Chem*, vol. 83, no. 7, pp. 2824–2828, Apr. 2011, doi: 10.1021/ac200297r.
- [77] N. Lalaoui, B. Reuillard, C. Philouze, M. Holzinger, S. Cosnier, and A. le Goff, “Osmium(II) Complexes Bearing Chelating N-Heterocyclic Carbene and Pyrene-Modified Ligands: Surface Electrochemistry and Electron Transfer Mediation of Oxygen Reduction by Multicopper Enzymes,” *Organometallics*, vol. 35, no. 17, pp. 2987–2992, Sep. 2016, doi: 10.1021/acs.organomet.6b00508.

- [78] A. Christenson, S. Shleev, N. Mano, A. Heller, and L. Gorton, "Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases," *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, vol. 1757, no. 12, pp. 1634–1641, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.08.008.
- [79] S. Shleev, V. Andoralov, D. Pankratov, M. Falk, O. Aleksejeva, and Z. Blum, "Oxygen Electroreduction versus Bioelectroreduction: Direct Electron Transfer Approach," *Electroanalysis*, vol. 28, no. 10. Wiley-VCH Verlag, pp. 2270–2287, Oct. 01, 2016. doi: 10.1002/elan.201600280.
- [80] M. H. Osman, A. A. Shah, and F. C. Walsh, "Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, no. 7. pp. 3087–3102, Mar. 15, 2011. doi: 10.1016/j.bios.2011.01.004.
- [81] M. Kriechbaum *et al.*, "Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL-3," 1989.
- [82] S. W. J. H. D. S. H. M. K. and H.-J. H. Gerd Wohlfahrt, "1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes," *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, vol. D55, pp. 969–977, 1999.
- [83] R. Wilson and A. P. F. Turner, "Glucose oxidase: an ideal enzyme," 1992.
- [84] B. E. P. Swoboda and V. Massey, "Purification and Properties of the Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*." [Online]. Available: <http://www.jbc.org/>
- [85] S. Nakamura and S. Fujiki, "Comparative Studies on the Glucose Oxidases of *Aspergillus niger* and *Penicillium amagasakiense*," 1968.
- [86] M. Tiina and M. Sandholm, "Antibacterial effect of the glucose oxidase-glucose system on food-poisoning organisms," *Int J Food Microbiol*, vol. 8, no. 2, pp. 165–174, 1989, doi: 10.1016/0168-1605(89)90071-8.
- [87] D. Dobbenie, M. Uyttendaele, and J. Debevere, "Antibacterial activity of the glucose oxidase/glucose system in liquid whole egg," *J Food Prot*, vol. 58, no. 3, pp. 273–279, 1995, doi: 10.4315/0362-028X-58.3.273.
- [88] D. KEILIN and E. F. HARTREE, "The use of glucose oxidase for the determination of glucose in biological material and for the study of glucose-producing systems by manometric methods," *Biochem J*, vol. 42, no. 2, pp. 230–238, 1948, doi: 10.1042/bj0420230.
- [89] Kjel Kleppe, "The Effect of Hydrogen Peroxide *Aspergillus niger*," vol. 5, no. 1, pp. 1–5, 1966.
- [90] H. J. Hecht, H. M. Kalisz, J. Hendle, R. D. Schmid, and D. Schomburg, "Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution," *Journal of Molecular Biology*, vol. 229, no. 1. pp. 153–172, 1993. doi: 10.1006/jmbi.1993.1015.
- [91] A. PrévotEAU, O. Courjean, and N. Mano, "Deglycosylation of glucose oxidase to improve biosensors and biofuel cells," *Electrochem Commun*, vol. 12, no. 2, pp. 213–215, 2010, doi: 10.1016/j.elecom.2009.11.027.
- [92] Y. OGURA, "STUDIES ON THE GLUCOSE By YASUYUKI," vol. 38, no. 1, 1950.
- [93] J. Okuda-Shimazaki, H. Yoshida, and K. Sode, "FAD dependent glucose dehydrogenases – Discovery and engineering of representative glucose sensing enzymes –," *Bioelectrochemistry*, vol. 132, p. 107414, 2020, doi: 10.1016/j.bioelechem.2019.107414.
- [94] S. Tsujimura *et al.*, "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.
- [95] H. Yoshida, G. Sakai, K. Mori, K. Kojima, S. Kamitori, and K. Sode, "Structural analysis of fungus-derived FAD glucose dehydrogenase," *Sci Rep*, vol. 5, pp. 1–13, 2015, doi: 10.1038/srep13498.
- [96] H. Muguruma, H. Iwasa, H. Hidaka, A. Hiratsuka, and H. Uzawa, "Mediatorless Direct Electron Transfer between Flavin Adenine Dinucleotide-Dependent Glucose Dehydrogenase and Single-Walled Carbon Nanotubes," *ACS Catal*, vol. 7, no. 1, pp. 725–734, 2017, doi: 10.1021/acscatal.6b02470.
- [97] P. Kavanagh and D. Leech, "Mediated electron transfer in glucose oxidising enzyme electrodes for application to biofuel cells: Recent progress and perspectives," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, no. 14, pp. 4859–4869, 2013, doi: 10.1039/c3cp44617d.

- [98] S. Tsujimura, K. Murata, and W. Akatsuka, "Exceptionally high glucose current on a hierarchically structured porous carbon electrode with 'wired' flavin adenine dinucleotide-dependent glucose dehydrogenase," *J Am Chem Soc*, vol. 136, no. 41, pp. 14432–14437, 2014, doi: 10.1021/ja5053736.
- [99] W. Schuhmann, C. Lehn, H. L. Schmidt, and B. Gründig, "Comparison of native and chemically stabilized enzymes in amperometric enzyme electrodes," *Sens Actuators B Chem*, vol. 7, no. 1–3, pp. 393–398, 1992, doi: 10.1016/0925-4005(92)80331-Q.
- [100] S. D. Minteer, *Enzyme Stabilization and Immobilization*. 2017.
- [101] F. A. Armstrong and G. S. Wilson, "Recent developments in faradaic bioelectrochemistry," *Electrochim Acta*, vol. 45, no. 15–16, pp. 2623–2645, 2000, doi: 10.1016/S0013-4686(00)00342-X.
- [102] T. de Lumley-Woodyear *et al.*, "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.
- [103] B. Kowalewska and K. Jakubow, "The impact of immobilization process on the electrochemical performance, bioactivity and conformation of glucose oxidase enzyme," *Sens Actuators B Chem*, vol. 238, pp. 852–861, 2017, doi: 10.1016/j.snb.2016.07.138.
- [104] Y. Gao and I. Kyratzis, "Covalent immobilization of proteins on carbon nanotubes using the cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide - A critical assessment," *Bioconjug Chem*, vol. 19, no. 10, pp. 1945–1950, 2008, doi: 10.1021/bc800051c.
- [105] M. A. Alonso-Lomillo, C. Yardimci, O. Domínguez-Renedo, and M. J. Arcos-Martínez, "CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed electrodes by diazonium salt and thiols monolayers," *Anal Chim Acta*, vol. 633, no. 1, pp. 51–56, 2009, doi: 10.1016/j.aca.2008.11.033.
- [106] S. el Ichi *et al.*, "Chitosan improves stability of carbon nanotube biocathodes for glucose biofuel cells," *Chemical Communications*, vol. 50, no. 93, pp. 14535–14538, 2014, doi: 10.1039/c4cc04862h.
- [107] J. Lia, S. N. Tana, and H. Geb, "Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for hydrogen peroxide," *Anal Chim Acta*, vol. 335, pp. 137–145, 1996.
- [108] C. M. Moore, N. L. Akers, A. D. Hill, Z. C. Johnson, and S. D. Minteer, "Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying nafion with tetraalkylammonium bromides," *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 4, pp. 1241–1247, 2004, doi: 10.1021/bm0345256.
- [109] R. E. Ionescu, K. Abu-Rabeah, S. Cosnier, and R. S. Marks, "Improved enzyme retention from an electropolymerized polypyrrole-alginate matrix in the development of biosensors," *Electrochem commun*, vol. 7, no. 12, pp. 1277–1282, 2005, doi: 10.1016/j.elecom.2005.09.009.
- [110] D. Samanta and A. Sarkar, "Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: Methods and sensor applications," *Chem Soc Rev*, vol. 40, no. 5, pp. 2567–2592, 2011, doi: 10.1039/c0cs00056f.
- [111] S. Takahashi, K. Sato, and J. I. Anzai, "Layer-by-layer construction of protein architectures through avidin-biotin and lectin-sugar interactions for biosensor applications," *Anal Bioanal Chem*, vol. 402, no. 5, pp. 1749–1758, 2012, doi: 10.1007/s00216-011-5317-4.
- [112] R. Villalonga, R. Cao, and A. Frago, "Supramolecular chemistry of cyclodextrins in enzyme technology," *Chem Rev*, vol. 107, no. 7, pp. 3088–3116, 2007, doi: 10.1021/cr050253g.
- [113] M. Holzinger, L. Bouffier, R. Villalonga, and S. Cosnier, "Adamantane/ β -cyclodextrin affinity biosensors based on single-walled carbon nanotubes," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, no. 5, pp. 1128–1134, 2009, doi: 10.1016/j.bios.2008.06.029.
- [114] G. v. Dubacheva *et al.*, "Electrochemically controlled adsorption of Fc-functionalized polymers on β -CD-modified self-assembled monolayers," *Langmuir*, vol. 26, no. 17, pp. 13976–13986, 2010, doi: 10.1021/la102026h.
- [115] L. J. C. Jeuken, "Conformational reorganisation in interfacial protein electron transfer," *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, vol. 1604, no. 2, pp. 67–76, 2003, doi: 10.1016/S0005-2728(03)00026-4.
- [116] F. A. Armstrong, H. A. O. Hill, and N. J. Walton, "Direct Electrochemistry of Redox Proteins," *Acc Chem Res*, vol. 21, no. 11, pp. 407–413, 1988, doi: 10.1021/ar00155a004.

- [117] U. Salaj-Kosla *et al.*, “Mediated electron transfer of cellobiose dehydrogenase and glucose oxidase at osmium polymer-modified nanoporous gold electrodes,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 405, no. 11, pp. 3823–3830, 2013, doi: 10.1007/s00216-012-6657-4.
- [118] A. Chaubey and B. D. Malhotra, “Mediated biosensors,” *Biosens Bioelectron*, vol. 17, no. 6–7, pp. 441–456, 2002, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00313-X.
- [119] A. Heller, “Miniature biofuel cells,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 6, no. 2, pp. 209–216, 2004, doi: 10.1039/b313149a.
- [120] R. A. Marcus, N. Sutin, and A. Amos, “Electron transfers in chemistry and biology,” 1985.
- [121] X. Y. Yang, G. Tian, N. Jiang, and B. L. Su, “Immobilization technology: A sustainable solution for biofuel cell design,” *Energy Environ Sci*, vol. 5, no. 2, pp. 5540–5563, 2012, doi: 10.1039/c1ee02391h.
- [122] M. M. Hussain, A. M. Asiri, M. N. Arshad, and M. M. Rahman, “Fabrication of a Ga³⁺ sensor probe based on methoxybenzylidenebenzenesulfonohydrazide (MBBSH) by an electrochemical approach,” *New Journal of Chemistry*, vol. 42, no. 2, pp. 1169–1180, 2018, doi: 10.1039/c7nj01891f.
- [123] G. Maduraiveeran and W. Jin, “Nanomaterials based electrochemical sensor and biosensor platforms for environmental applications,” *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, vol. 13, pp. 10–23, 2017, doi: 10.1016/j.teac.2017.02.001.
- [124] S. Kurbanoglu, S. A. Ozkan, and A. Merkoçi, “Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications,” *Biosens Bioelectron*, vol. 89, no. June 2016, pp. 886–898, 2017, doi: 10.1016/j.bios.2016.09.102.
- [125] H. Li and D. Xu, “Silver nanoparticles as labels for applications in bioassays,” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 61, pp. 67–73, 2014, doi: 10.1016/j.trac.2014.05.003.
- [126] D. Kumar, N. Saini, N. Jain, R. Sareen, and V. Pandit, “Gold nanoparticles: An era in bionanotechnology,” *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 10, no. 3, pp. 397–409, Mar. 2013, doi: 10.1517/17425247.2013.749854.
- [127] R. M. Torres Sanchez, A. Ueda, K. Tanaka, and M. Haruta, “Selective oxidation of CO in hydrogen over gold supported on manganese oxides,” *J Catal*, vol. 168, no. 1, pp. 125–127, 1997, doi: 10.1006/jcat.1997.1636.
- [128] A. S. K. Hashmi and G. J. Hutchings, “Gold Catalysis,” *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 45, no. 47, pp. 7896–7936, 2006, doi: 10.1002/anie.200602454.
- [129] K. Murata, M. Suzuki, K. Kajiya, N. Nakamura, and H. Ohno, “High performance bioanode based on direct electron transfer of fructose dehydrogenase at gold nanoparticle-modified electrodes,” *Electrochem commun*, vol. 11, no. 3, pp. 668–671, 2009, doi: 10.1016/j.elecom.2009.01.011.
- [130] H. A., “Activity of Platinum–Gold Alloys for Glucose Habrioux 2007.pdf.”
- [131] J. T. Holland, C. Lau, S. Brozik, P. Atanassov, and S. Banta, “Engineering of glucose oxidase for direct electron transfer via site-specific gold nanoparticle conjugation,” *J Am Chem Soc*, vol. 133, no. 48, pp. 19262–19265, 2011, doi: 10.1021/ja2071237.
- [132] X. Wang *et al.*, “Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes,” *Biosens Bioelectron*, vol. 31, no. 1, pp. 219–225, 2012, doi: 10.1016/j.bios.2011.10.020.
- [133] A. B. Mapossa, J. Dantas, M. R. Silva, R. H. G. A. Kiminami, A. C. F. M. Costa, and M. O. Daramola, “Catalytic performance of NiFe₂O₄ and Ni_{0.3}Zn_{0.7}Fe₂O₄ magnetic nanoparticles during biodiesel production,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 13, no. 2, pp. 4462–4476, 2020, doi: 10.1016/j.arabjc.2019.09.003.
- [134] S. Dutz, N. Buske, J. Landers, C. Gräfe, H. Wende, and J. H. Clement, “Biocompatible magnetic fluids of co-doped iron oxide nanoparticles with tunable magnetic properties,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 6, 2020, doi: 10.3390/nano10061019.
- [135] O. Veiseh, J. W. Gunn, and M. Zhang, “Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 62, no. 3, pp. 284–304, 2010, doi: 10.1016/j.addr.2009.11.002.
- [136] H. Lee, E. Lee, D. K. Kim, N. K. Jang, Y. Y. Jeong, and S. Jon, “Antibiofouling polymer-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential magnetic resonance contrast agents for in

- vivo cancer imaging,” *J Am Chem Soc*, vol. 128, no. 22, pp. 7383–7389, 2006, doi: 10.1021/ja061529k.
- [137] D. Huang, C. Deng, and X. Zhang, “Functionalized magnetic nanomaterials as solid-phase extraction adsorbents for organic pollutants in environmental analysis,” *Analytical Methods*, vol. 6, no. 18, pp. 7130–7141, 2014, doi: 10.1039/c4ay01100g.
- [138] C. C. S. Fortes, A. L. Daniel-da-Silva, A. M. R. B. Xavier, and A. P. M. Tavares, “Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions,” *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 117, no. March, pp. 1–8, 2017, doi: 10.1016/j.cep.2017.03.009.
- [139] M. M. Ramadan, M. A. Mohamed, H. Almoammar, and K. A. Abd-Elsalam, *Magnetic nanomaterials for purification, detection, and control of mycotoxins*. Elsevier Inc., 2019. doi: 10.1016/B978-0-12-817998-7.00005-7.
- [140] G. Rajeev, A. J. Cowin, N. H. Voelcker, and B. P. Simon, “Magnetic nanoparticles enhance pore blockage-based electrochemical detection of a wound biomarker,” *Front Chem*, vol. 7, no. JUN, 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00438.
- [141] M. Shaterian, A. Aghaei, M. Koohi, M. Teymouri, and A. Mohammadi-Ganjgah, “Synthesis, characterization and electrochemical sensing application of CoFe₂O₄/graphene magnetic nanocomposite for analysis of atenolol,” *Polyhedron*, vol. 182, p. 114479, 2020, doi: 10.1016/j.poly.2020.114479.
- [142] F. Mollarasouli, E. Zor, G. Ozcelikay, and S. A. Ozkan, “Magnetic nanoparticles in developing electrochemical sensors for pharmaceutical and biomedical applications,” *Talanta*, vol. 226, no. October 2020, p. 122108, 2021, doi: 10.1016/j.talanta.2021.122108.
- [143] N. Chatterjee, P. Kumar, K. Kumar, and S. K. Misra, “What makes carbon nanoparticle a potent material for biological application?,” *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, vol. 14, no. 3, pp. 1–30, 2022, doi: 10.1002/wnan.1782.
- [144] S. N. Baker and G. A. Baker, “Luminescent carbon nanodots: Emergent nanolights,” *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 49, no. 38, pp. 6726–6744, 2010, doi: 10.1002/anie.200906623.
- [145] M. Pumera, “Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry,” *Chem Soc Rev*, vol. 39, no. 11, pp. 4146–4157, 2010, doi: 10.1039/c002690p.
- [146] A. Karimi, A. Othman, A. Uzunoglu, L. Stanciu, and S. Andreescu, “Graphene based enzymatic bioelectrodes and biofuel cells,” *Nanoscale*, vol. 7, no. 16, pp. 6909–6923, Apr. 2015, doi: 10.1039/C4NR07586B.
- [147] D. D. L. Chung, “Review: Graphite,” *J Mater Sci*, vol. 37, no. 8, pp. 1475–1489, 2002, doi: 10.1023/A:1014915307738.
- [148] L. A. Pesin, “Review: Structure and properties of glass-like carbon,” *J Mater Sci*, vol. 37, no. 1, pp. 1–28, 2002, doi: 10.1023/A:1013100920130.
- [149] L. de S. Vieira, “A review on the use of glassy carbon in advanced technological applications,” *Carbon N Y*, vol. 186, pp. 282–302, 2022, doi: 10.1016/j.carbon.2021.10.022.
- [150] “Intl J of Energy Research - 2020 - Vazquez-Samperio - Incorporation of heteroatoms into reticulated vitreous carbon foams.pdf.” 2020.
- [151] M. T. Islam, M. M. Hasan, M. F. Shabik, F. Islam, Y. Nagao, and M. A. Hasnat, “Electroless deposition of gold nanoparticles on a glassy carbon surface to attain methylene blue degradation via oxygen reduction reactions,” *Electrochim Acta*, vol. 360, p. 136966, 2020, doi: 10.1016/j.electacta.2020.136966.
- [152] J. F. Guan, J. Zou, Y. P. Liu, X. Y. Jiang, and J. G. Yu, “Hybrid carbon nanotubes modified glassy carbon electrode for selective, sensitive and simultaneous detection of dopamine and uric acid,” *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 201, no. April, p. 110872, 2020, doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110872.
- [153] K. Tadzyszak, J. Litowczenko, Ł. Majchrzycki, P. Jeżowski, K. Załęski, and B. Scheibe, “Sucrose based cellular glassy carbon for biological applications,” *Mater Chem Phys*, vol. 239, no. May 2019, 2020, doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.122033.

- [154] G. M. Jenkins and C. J. Grigson, "The fabrication of artifacts out of glassy carbon and carbon-fiber-reinforced carbon for biomedical applications," *J Biomed Mater Res*, vol. 13, no. 3, pp. 371–394, 1979, doi: 10.1002/jbm.820130304.
- [155] O. Calixto-Lozada, J. Vazquez-Samperio, E. Córdoba-Tuta, E. Reguera, and P. Acevedo-Peña, "Growth of cobalt hexacyanoferrate particles through electrodeposition and chemical etching of cobalt precursors on reticulated vitreous carbon foams for Na-ion electrochemical storage," *Solid State Sci*, vol. 116, no. July 2020, 2021, doi: 10.1016/j.solidstatesciences.2021.106603.
- [156] Q. Wang and W. A. Daoud, "Reaction kinetics of cerium on glassy carbon with in situ electrochemical treatment for cerium-based flow battery," *Electrochim Acta*, vol. 315, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1016/j.electacta.2019.05.083.
- [157] S. Iijima, "Helical microtubules of graphitic carbon," *Nature*, vol. 354, pp. 56–58, 1991.
- [158] R. Hirlekar, H. Garse, M. Vij, M. Yamagar, and K. Vilasrao, "CARBON NANOTUBES AND ITS APPLICATIONS: A REVIEW," *Carbon Nanotubes And Its Applications: A Review Article in Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 2, no. 4, [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/228338965>
- [159] R. Vetrivel, C. Navinselvakumar, and P. S. Samuel Ratna Kumar, "Carbon nanotubes and its applications – A review," *International Journal of Mechanical and Production Engineering Research and Development*, vol. 8, no. Special Issue 7, pp. 288–293, 2018.
- [160] N. Saifuddin, A. Z. Raziah, and A. R. Junizah, "Carbon nanotubes: A review on structure and their interaction with proteins," *J Chem*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/676815.
- [161] R. Saito, T. Takeya, T. Kimura, G. Dresselhaus, and M. Dresselhaus, "Raman intensity of single-wall carbon nanotubes," *Phys Rev B Condens Matter Mater Phys*, vol. 57, no. 7, pp. 4145–4153, 1998, doi: 10.1103/PhysRevB.57.4145.
- [162] M. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P. Eklund, and R. Saito, "Carbon nanotubes," vol. 11, no. 1, 1998.
- [163] T. Lin, V. Bajpai, T. Ji, and L. Dai, "Chemistry of carbon nanotubes," *Aust J Chem*, vol. 56, no. 7, pp. 635–651, 2003, doi: 10.1071/CH02254.
- [164] T. W. Odom, J. L. Huang, P. Kim, and C. M. Lieber, "Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes," *Nature*, vol. 391, no. 6662, pp. 62–64, 1998, doi: 10.1038/34145.
- [165] H. Kuzmany, *Physics and Chemistry of Fullerenes and Derivatives: Proceedings of the International Winterschool on Electronic Properties of Novel Materials*, vol. 3, no. April. Scientifi World, 2015.
- [166] R. Das, *Nanohybrid Catalyst based on Carbon Nanotube*. Cham: Springer International Publishing, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-58151-4.
- [167] C. Niu, E. K. Sichel, R. Hoch, D. Moy, and H. Tennent, "High power electrochemical capacitors based on carbon nanotube electrodes," *Appl Phys Lett*, vol. 70, no. 11, pp. 1480–1482, 1997, doi: 10.1063/1.118568.
- [168] A. v. Eletskaa, "Carbon nanotubes," pp. 0–26, 1997.
- [169] M. F. L. de Volder, S. H. Tawfick, R. H. Baughman, and A. J. Hart, "Carbon nanotubes: Present and future commercial applications," *Science (1979)*, vol. 339, no. 6119, pp. 535–539, 2013, doi: 10.1126/science.1222453.
- [170] Q. Cao and J. A. Rogers, "Advanced Materials - 2009 - Cao - Ultrathin Films of Single-Walled Carbon Nanotubes for Electronics and Sensors A Review.pdf."
- [171] A. M. Ionescu and H. Riel, "Tunnel field-effect transistors as energy-efficient electronic switches," *Nature*, vol. 479, no. 7373, pp. 329–337, 2011, doi: 10.1038/nature10679.
- [172] L. Hussein *et al.*, "A highly efficient buckypaper-based electrode material for mediatorless laccase-catalyzed dioxygen reduction," *Biosens Bioelectron*, vol. 26, no. 10, pp. 4133–4138, 2011, doi: 10.1016/j.bios.2011.04.008.
- [173] C. H. Kwon *et al.*, "High-power biofuel cell textiles from woven bistructured carbon nanotube yarns," *Nat Commun*, vol. 5, pp. 1–7, 2014, doi: 10.1038/ncomms4928.
- [174] M. D. Lima *et al.*, "Bistructuring nanotube sheets and functional guests into yarns," *Science (1979)*, vol. 331, no. 6013, pp. 51–55, 2011, doi: 10.1126/science.1195912.

- [175] A. G. Rinzler *et al.*, “Large-scale purification of single-wall carbon nanotubes: Process, product, and characterization,” *Appl Phys A Mater Sci Process*, vol. 67, no. 1, pp. 29–37, 1998, doi: 10.1007/s003390050734.
- [176] A. J. Bandodkar *et al.*, “Soft, stretchable, high power density electronic skin-based biofuel cells for scavenging energy from human sweat,” *Energy Environ Sci*, vol. 10, no. 7, pp. 1581–1589, 2017, doi: 10.1039/c7ee00865a.
- [177] L. Hussein, G. Urban, and M. Krüger, “Fabrication and characterization of buckypaper-based nanostructured electrodes as a novel material for biofuel cell applications,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, no. 13, pp. 5831–5839, 2011, doi: 10.1039/c0cp02254c.
- [178] F. Hennrich *et al.*, “Preparation, characterization and applications of free-standing single walled carbon nanotube thin films,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 4, no. 11, pp. 2273–2277, 2002, doi: 10.1039/b201570f.
- [179] R. F. C. and H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O’Brien and R. E. Smalley, “C60: Buckminsterfullerene,” *Nature*, no. 318, pp. 162–163, 1985.
- [180] J. Y. Oh *et al.*, “Easy preparation of self-assembled high-density buckypaper with enhanced mechanical properties,” *Nano Lett*, vol. 15, no. 1, pp. 190–197, 2015, doi: 10.1021/nl5033588.
- [181] A. E. A. M. Zhang, S. Fang, A. A. Zakhidov, S. B. Lee and K. R. A. and R. H. B. C. D. Williams, “Strong, Transparent, Multifunctional, Carbon Nanotube Sheets,” *Science (1979)*, vol. 309, no. 5738, pp. 1215–1219, 2005.
- [182] D. Wang, P. Song, C. Liu, W. Wu, and S. Fan, “Highly oriented carbon nanotube papers made of aligned carbon nanotubes,” *Nanotechnology*, vol. 19, no. 7, 2008, doi: 10.1088/0957-4484/19/7/075609.
- [183] A. J. Gross, M. Holzinger, and S. Cosnier, “Buckypaper bioelectrodes: Emerging materials for implantable and wearable biofuel cells,” *Energy Environ Sci*, vol. 11, no. 7, pp. 1670–1687, 2018, doi: 10.1039/c8ee00330k.
- [184] C. Agnès *et al.*, “Supercapacitor/biofuel cell hybrids based on wired enzymes on carbon nanotube matrices: Autonomous reloading after high power pulses in neutral buffered glucose solutions,” *Energy Environ Sci*, vol. 7, no. 6, pp. 1884–1888, 2014, doi: 10.1039/c3ee43986k.
- [185] K. Sode, T. Yamazaki, I. Lee, T. Hanashi, and W. Tsugawa, “BioCapacitor: A novel principle for biosensors,” *Biosens Bioelectron*, vol. 76, pp. 20–28, 2016, doi: 10.1016/j.bios.2015.07.065.
- [186] D. Pankratov, Z. Blum, and S. Shleev, “Hybrid Electric Power Biodevices,” *ChemElectroChem*, vol. 1, no. 11, pp. 1798–1807, 2014, doi: 10.1002/celec.201402158.
- [187] B. E. Conway and W. G. Pell, “Double-layer and pseudocapacitance types of electrochemical capacitors and their applications to the development of hybrid devices,” *Journal of Solid State Electrochemistry*, vol. 7, no. 9, pp. 637–644, 2003, doi: 10.1007/s10008-003-0395-7.
- [188] H. D. Abruña, Y. Kiya, and J. C. Henderson, “Batteries and electrochemical capacitors Present and future applications of electrical energy storage devices are stimulating research into innovative new materials and novel architectures,” *Phys Today*, no. December, pp. 1–7, 2008, [Online]. Available: http://ptonline.aip.org/servlet/PrintPTJFigure1URL:http://ptonline.aip.org/journals/doc/PHTOAD-ft/vol_61/iss_12/43_1.shtml
- [189] M. Stoppa and A. Chiolerio, “Wearable electronics and smart textiles: A critical review,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 14, no. 7, pp. 11957–11992, 2014, doi: 10.3390/s140711957.
- [190] S. Pan, Z. Yang, P. Chen, J. Deng, H. Li, and H. Peng, “Wearable Solar Cells by Stacking Textile Electrodes,” *Angewandte Chemie*, vol. 126, no. 24, pp. 6224–6228, 2014, doi: 10.1002/ange.201402561.
- [191] R. Zhou, W. Guo, R. Yu, and C. Pan, “Highly flexible, conductive and catalytic Pt networks as transparent counter electrodes for wearable dye-sensitized solar cells,” *J Mater Chem A Mater*, vol. 3, no. 45, pp. 23028–23034, 2015, doi: 10.1039/c5ta05377c.
- [192] J. H. Bahk, H. Fang, K. Yazawa, and A. Shakouri, “Flexible thermoelectric materials and device optimization for wearable energy harvesting,” *J Mater Chem C Mater*, vol. 3, no. 40, pp. 10362–10374, 2015, doi: 10.1039/c5tc01644d.

- [193] K. N. Kim *et al.*, “Highly Stretchable 2D Fabrics for Wearable Triboelectric Nanogenerator under Harsh Environments,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 6, pp. 6394–6400, 2015, doi: 10.1021/acsnano.5b02010.
- [194] A. J. Bandodkar and J. Wang, “Wearable Biofuel Cells: A Review,” *Electroanalysis*, vol. 28, no. 6, pp. 1188–1200, 2016, doi: 10.1002/elan.201600019.
- [195] X. Xie *et al.*, “Three-dimensional carbon nanotube-textile anode for high-performance microbial fuel cells,” *Nano Lett*, vol. 11, no. 1, pp. 291–296, 2011, doi: 10.1021/nl103905t.
- [196] L. Su, W. Jia, C. Hou, and Y. Lei, “Microbial biosensors: A review,” *Biosens Bioelectron*, vol. 26, no. 5, pp. 1788–1799, 2011, doi: 10.1016/j.bios.2010.09.005.
- [197] A. Zebda *et al.*, “Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices,” *Sci Rep*, vol. 3, pp. 1–5, 2013, doi: 10.1038/srep01516.
- [198] 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.
- [199] S. M. R. F. Drake, B. K. Kusserow, S. Messinger, “A TISSUE IMPLANTABLE FUEL CELL POWER SUPPLY,” *American Society for Artificial Internal Organs*, p. <https://news.ge/anakliis-porti-aris-qveynis-momava>, 1970.
- [200] M. Zhou and J. Wang, “Biofuel Cells for Self-Powered Electrochemical Biosensing and Logic Biosensing: A Review,” *Electroanalysis*, vol. 24, no. 2, pp. 197–209, 2012, doi: 10.1002/elan.201100631.
- [201] and J. W. Xiaohong Chen, Lu Yin, Jian Lv, Andrew J. Gross, Minh Le, Nathaniel Georg Gutierrez, Yang Li, Itthipon Jeerapan, Fabien Giroud, Anastasiia Berezovska, Rachel K. O’Reilly, Sheng Xu, Serge Cosnier, “Stretchable and Flexible Buckypaper-Based Lactate Biofuel Cell for Wearable Electronics.” 2019.
- [202] I. Sánchez *et al.*, “Prototype of a nanostructured sensing contact lens for noninvasive intraocular pressure monitoring,” *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 52, no. 11, pp. 8310–8315, 2011, doi: 10.1167/iovs.10-7064.
- [203] H. E. Milton, P. B. Morgan, J. H. Clamp, and H. F. Gleeson, “Electronic liquid crystal contact lenses for the correction of presbyopia,” *Opt Express*, vol. 22, no. 7, p. 8035, 2014, doi: 10.1364/oe.22.008035.
- [204] J. de Smet, A. Avci, P. Joshi, D. Schaubroeck, D. Cuypers, and H. de Smet, “Progress toward a liquid crystal contact lens display,” *J Soc Inf Disp*, vol. 21, no. 9, pp. 399–406, 2013, doi: 10.1002/jsid.188.
- [205] A. J. Bandodkar and J. Wang, “Non-invasive wearable electrochemical sensors: A review,” *Trends Biotechnol*, vol. 32, no. 7, pp. 363–371, 2014, doi: 10.1016/j.tibtech.2014.04.005.
- [206] M. Falk *et al.*, “Biofuel cell as a power source for electronic contact lenses,” *Biosens Bioelectron*, vol. 37, no. 1, pp. 38–45, 2012, doi: 10.1016/j.bios.2012.04.030.
- [207] P. Cinquin *et al.*, “A glucose BioFuel cell implanted in Rats,” *PLoS One*, vol. 5, no. 5, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010476.
- [208] S. Cosnier, A. le Goff, and M. Holzinger, “Enzymatic Fuel Cells: From Design to Implantation in Mammals,” *Implantable Bioelectronics*, vol. 9783527335, pp. 347–362, 2014, doi: 10.1002/9783527673148.ch16.
- [209] Abdelkader Zebda, J.-P. Alcaraz, F. B. K.Martin, Pankaj Vadgama, Sergey, Shleev, Shelley D.Minteer, P. K. M. Cinquin, and Donald, “Challenges for successful implantation of biofuel cells,” *Bioelectrochemistry*, vol. 124, pp. 57–72, 2018.
- [210] N. Mano, F. Mao, and A. Heller, “Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O₂ biofuel cell and its operation in a living plant,” *J Am Chem Soc*, vol. 125, no. 21, pp. 6588–6594, 2003, doi: 10.1021/ja0346328.
- [211] P. Cinquin *et al.*, “A glucose BioFuel cell implanted in Rats,” *PLoS One*, vol. 5, no. 5, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010476.
- [212] 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.

Chapitre 1. Etude bibliographique

- [213] S. el Ichi *et al.*, “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.

**CHAPITRE 2. BIOELECTRODES COMPRESSEES
A BASE D'UN MELANGE MWCNTS /ENZYMES
ET/OU MEDIATEURS**

Introduction	71
2.1 Bioélectrodes par compression contenant diverses protéines	72
2.1.1 Fabrication des électrodes	72
2.1.2 Stabilité mécanique	74
2.1.2.1 Influence du poids moléculaire des protéines	74
2.1.2.2 Corrélation selon le point isoélectrique (PI)	75
2.1.2.3 Angle de contact	76
2.2 Pastilles rédox.....	78
2.2.1 Fabrication des électrodes	78
2.2.2 Caractérisation électrochimique.....	79
2.3 Application des bioélectrodes à la bioélectrocatalyse	81
2.3.1 Biocathodes à base de BOx.....	81
2.3.2 Bioanodes à base de FAD GDH.....	84
2.4 Caractérisation par Microscope électronique à balayage (MEB).....	89
Conclusion	92
Bibliographie	94

Introduction

Aujourd'hui, les matériaux les plus largement utilisés pour la fabrication des bioélectrodes sont les matériaux à base de carbone. De nombreux travaux récents se sont concentrés sur l'utilisation de nanotubes de carbone (CNTs) en raison de leur conductivité électrique élevée, de leur surface spécifique élevée, de leur fonctionnalisation facile, de leur inertie chimique, de leurs propriétés mécaniques attractives et de leur biocompatibilité [1, 2]. À partir de dispersions aqueuses ou non aqueuses de CNT, il est possible d'obtenir des électrodes modifiées par des dépôts de CNT voire même de créer des électrodes sous forme d'un tissu de CNTs sans support appelé «buckypaper» [3, 4].

Ces types d'électrodes sont une plateforme efficace pour l'immobilisation d'une large gamme de molécules redox et de biomolécules, allant des coenzymes aux bactéries pour des applications dans les biocapteurs et biopiles à combustible [2, 5, 6]. Ils permettent aussi d'immobiliser et de connecter électriquement les enzymes pour le transfert d'électron direct ou médié (DET, MET) facilité par la proximité et l'affinité entre les enzymes et les CNTs modifiés ou non modifiés. L'immobilisation en surface des CNTs est réalisée par simple adsorption de protéines ou par des réactions de greffage chimique, par exemple via des groupements esters activés tels que l'ester N-hydroxysuccinimide [7 – 10]. Malgré leur légèreté, leur simplicité de fonctionnalisation et leurs bonnes propriétés électrochimiques, les buckypapers ne peuvent être fonctionnalisés que par une monocouche d'enzymes voire partiellement par quelques monocouches dans le cas de l'adsorption. L'un des avantages majeurs des dépôts de CNTs et des buckypapers est leur forte surface électroactive spécifique pour l'électrocatalyse ou l'électroanalyse. Toutefois, pour l'immobilisation par adsorption des protéines, l'hydrophobie des CNTs et la densité des réseaux de CNTs (créés lors de leurs dépôts ou agrégations comme buckypapers) empêchent la pénétration des enzymes profondément à l'intérieur des réseaux, limitant ainsi l'immobilisation des enzymes aux CNTs situés à l'extérieur des dépôts ou des buckypapers.

Parallèlement à la fabrication de bioélectrodes à base de films de CNTs comme les buckypapers, une autre approche originale consiste à mélanger et à comprimer des poudres de CNTs avec des protéines pour obtenir des électrodes sous forme de pastilles solides [11]. Le mélange d'enzyme et de CNTs avant la fabrication des électrodes assure la distribution de l'enzyme dans tout le volume du matériau composite et ainsi la quantité d'enzyme immobilisée est significativement plus élevée que celle correspondant à une monocouche formée par adsorption ou greffage chimique. En plus de la possibilité d'immobiliser et de connecter électriquement une plus grande quantité de protéines, un autre avantage réside dans un effet «réservoir» dans lequel les enzymes piégées peuvent devenir actives avec le temps, conduisant à une prolongation de la durée de vie de la bioélectrode. Une stabilité impressionnante d'un an a été démontrée en utilisant des compressions de CNTs à base de catalase-glucose oxydase (GOx) ou NAD-glucose déshydrogénase, pour les bioanodes dédiées à l'oxydation du glucose, et à base de la laccase, pour la réduction de l'oxygène, en solution tamponnée [11, 12]. Dans la majorité des études existantes, la surface des électrodes est recouverte d'une membrane en cellulose [13, 14], en

chitosane [15, 16], en polymère organique [17] ou en Nafion® [11, 12, 17, 18], nécessitant donc une étape complémentaire pour l'élaboration de bioélectrodes.

Dans ce chapitre nous avons développé et exploré les limitations d'une procédure de fabrication des biopastilles plus simple et plus rapide pour obtenir une large gamme de bioélectrodes autoportantes à grande surface, ne nécessitant pas la formation additionnelle d'une couche externe voire une étape supplémentaire de fixation ou de stabilisation de surface. Nous avons étudié la possibilité de former des bioélectrodes par compression en utilisant des protéines ayant différents poids moléculaires (PM) et différents points isoélectriques (pI). La réalisation de disques compressés contenant des médiateurs redox neutres ou chargés positivement ou négativement a également été entreprise pour évaluer l'influence de la charge sur la stabilité mécanique et électrochimique des électrodes redox qui en résultent. Les mesures d'angle de contact ont été effectuées pour déterminer s'il existait une corrélation entre leur hydrophobie et leur stabilité mécanique. Nous avons également réalisé des caractérisations de la surface des électrodes par microscopie électronique à balayage (MEB) afin d'observer les potentiels changements morphologiques de la pastille en fonction de son contenu.

2.1 Bioélectrodes par compression contenant diverses protéines

2.1.1 *Fabrication des électrodes*

Les biopastilles de 13 mm en diamètre composées de CNTs multifeuillets (MWCNTs) ont été obtenues par malaxage d'un mélange de 100 μ L d'eau distillée, 15 mg de protéines et 35 mg de MWCNTs. Les pâtes homogènes résultantes ont ensuite été comprimées dans une presse hydraulique en pastilles de $0,9 \pm 0,2$ mm d'épaisseur. Les biopastilles de 6 mm en diamètre ont été obtenues comme expliqué ci-dessus, mais en utilisant 50 μ L d'eau distillée, 7,5 mg de protéine et 17,5 mg de MWCNTs pour $1,8 \pm 0,2$ mm d'épaisseur. Un fil de cuivre plaqué argent a été fixé à l'arrière du disque avec de la pâte de carbone. La face arrière et le bord du disque ont ensuite été recouverts de silicone pour isoler et stabiliser le disque connecté. La représentation schématique de la procédure de fabrication des pastilles est illustrée sur la Figure 2.1 avec, comme exemple, des électrodes de 6 mm de diamètre.

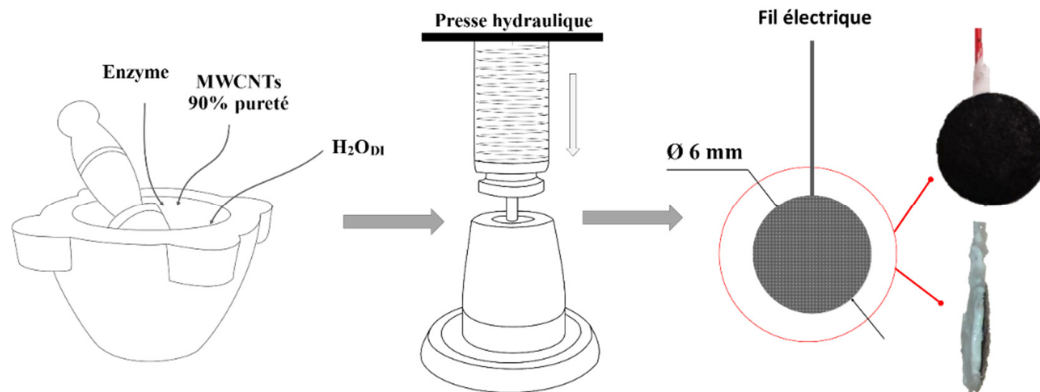


Figure 2.1 : Schéma de la procédure de fabrication des pastilles par compression

La surface géométrique est de 1,32 cm² et 0,28 cm² pour les pastilles de diamètre de 13 et 6 mm respectivement.

Des biopastilles compressées ont été élaborées avec 11 protéines, dont des enzymes du type oxydoréductases, avec un large éventail de propriétés et de structures. La liste des protéines est présentée dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Influence du poids moléculaire et du point isoélectrique des protéines sur la stabilité mécanique des biopastilles en milieu aqueux (0,1 M tampon phosphate (PB), pH 7,4)

Protéine	PM (kDa)	pI	Stabilité dans PB pH 7,4	
			Ø 6 mm	Ø 13 mm
Cytochrome C (from <i>Horse heart</i>)	12,4	10-10,5	×	×
Diaphorase (from <i>Clostridium kluyveri</i>) [19]	40,0	6,8	✓	✓
Peroxydase de raifort (type 2) [20]	44,0	9,1	×	×
Albumine de sérum bovin [21]	66,0	4,7-4,9	×	×
Laccase (from <i>Trametes versicolor</i>) [22]	70,0	3,5	✓	gonflement
Galactose oxydase (from <i>Dactylium dendroides</i>) [23]	68,0	12	×	×
Bilirubine oxydase (from <i>Myrothecium verrucaria</i>)	68,0	4,1	✓	✓
FAD dépendant glucose déshydrogénases (from <i>Aspergillus sp.</i>)	130,0	4,4	✓	gonflement
Glucose oxydase (from <i>Aspergillus niger</i>)	160,0	4,2	×	×
Catalase (from <i>bovine liver</i>)	250,0	5,4	✓	✓
Uréase (from <i>Jack Beans</i>)	450,0	5,0-5,2	✓	✓

2.1.2 Stabilité mécanique

Les biopastilles à base de diaphorase, de bilirubine oxydase (BOx), de catalase ou d'uréase, ont conduit à des pastilles stables sans changement apparent de forme après immersion dans PB 0,1 mol L⁻¹ à pH 7,4 (ex. Figure 2.2, a). Avec la laccase et FAD-dépendante glucose déshydrogénase (FAD GDH), un gonflement significatif de la pastille a été observé, sans entraîner la destruction de cette dernière (ex. Figure 2.2, b). En revanche, les bioélectrodes contenant le cytochrome C (Cyt C), l'albumine de sérum bovin (BSA), la galactose oxydase (GAOx), la glucose oxydase (GOx) ou la peroxydase de raifort (HRP), sont décompressées, s'ouvrant immédiatement au contact avec le tampon et induisant la libération de CNTs et des protéines en solution (ex. Figure 2.2, c).

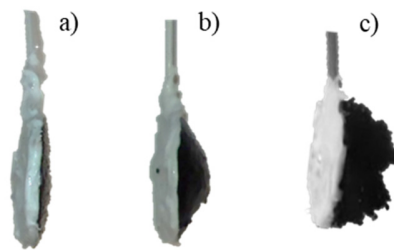


Figure 2.2 : Stabilité mécanique des pastilles après l'immersion dans une solution aqueuse : a) stables sans changement, b) gonflement, c) ouverture de la compression et décomposition

Des pastilles de MWCNTs de 6 et 13 mm de diamètre ont été préparées pour étudier l'effet des paramètres géométriques sur la stabilité mécanique des bioélectrodes. En termes de stabilité mécanique, les résultats sont identiques à l'exception des biodisques de 6 mm de diamètre comprenant la laccase et la FAD GDH qui n'ont pas gonflé et ont donc montré une résistance améliorée au tampon (Tableau 2.1). L'influence de la nature des CNTs (SWCNTs (monofeuillets) vs MWCNTs) sur la stabilité des disques ($\varnothing = 6$ mm) a été également examinée avec deux enzymes donnant des résultats opposés avec les MWCNTs (HRP et BOx). L'utilisation de SWCNTs conduit à un comportement des biopastilles similaire à celui enregistré pour les MWCNTs, à savoir une instabilité avec HRP et une stabilité avec BOx. Ces résultats montrent que les dimensions et le type de CNTs n'ont pas d'impact significatif sur la stabilité des bioélectrodes.

2.1.2.1 Influence du poids moléculaire des protéines

L'influence du poids moléculaire des protéines sur la stabilité mécanique des biopastilles a également été étudiée dans une gamme allant de 12,4 à 450 kDa. Le tableau 2.1 résume l'influence du poids moléculaire de 11 protéines sur la stabilité mécanique des biopastilles placées en solution aqueuse. Il apparaît une forte instabilité (c'est-à-dire une ouverture et une décomposition du disque dans les premières minutes d'immersion) pour les bioélectrodes contenant des protéines de poids moléculaires compris entre 11,7 et 160 kDa. Alors que, des pastilles stables sont obtenues avec des protéines de PM compris entre 44 kDa à 450 kDa. Contrairement à l'hypothèse d'un effet de masse des protéines, il n'apparaît donc aucune

corrélation évidente entre le poids moléculaire des protéines et la stabilité mécanique des biopastilles.

Il faut toutefois signaler que, quelle que soit la masse de la protéine, le processus de compression des MWCNTs et des protéines conduit toujours à un disque mécaniquement stable. C'est uniquement son immersion en milieu qui peut entraîner, suivant la nature de la protéine, une dégradation du disque.

2.1.2.2 Corrélation selon le point isoélectrique (PI)

L'hypothèse selon laquelle la charge globale de la protéine pourrait affecter la stabilité des biopastilles a été examinée en testant des protéines exhibant une très large gamme de points isoélectriques (Tableau 2.1).

Le point isoélectrique d'une protéine est défini comme le pH pour lequel sa charge globale est nulle, c'est-à-dire le pH pour lequel la protéine est électriquement neutre. Si le pH de la solution utilisée est inférieur au pI de la protéine, la charge globale de la dernière est positive. Au contraire, si le pH est supérieur au pI, la charge globale est négative.

Dans une optique d'application « *in vivo* » des bioélectrodes, le pH du milieu d'étude a été fixé à 7,4, valeur de pH des liquides extracellulaires des mammifères. Les protéines comme Cyt C (pI 10-10,5), HRP (pI 9,1) et GAOx (pI 12), présentent une charge globale « fortement » positive à pH 7,4. La présence dans les pastilles de ces protéines chargées positivement n'a pas permis la formation d'électrodes stables. De même, les protéines telles que BSA (pI 4,7-4,9) et GOx (pI 4,2), qui ont une charge globale « fortement » négative, ne conduisent pas non plus à des biopastilles stables. En revanche, les enzymes à charge globale négative « plus faible » permettent d'obtenir des biopastilles stables, à savoir la catalase (pI 5,4), la diaphorase (pI 6,8) et l'uréase (pI 5,0-5,2). Ces résultats indiquent que de fortes interactions électrostatiques négatives ou positives entre la protéine et les CNTs ne favorisent pas la stabilité des biopastilles. Trois exceptions à cette règle ont été observées : il s'agit de biopastilles stables obtenues en piégeant la laccase (pI 3,5), la BOx (pI 4,1) et la FAD-GDH (pI 4,4) qui, toutes, présentent une forte charge négative.

Outre des interactions électrostatiques défavorables à la stabilité du disque, nos résultats semblent indiquer la présence de forces intermoléculaires favorables à l'association protéine-CNT, qui peuvent s'avérer prépondérantes comme, par exemple, des interactions hydrophobes, π - π et de Van der Waals entre les parois des CNTs et la surface de la protéine. Pour la laccase, la stabilité des biopastilles peut être facilitée par de fortes interactions hydrophobes entre les CNTs et une poche hydrophobe à la surface de l'enzyme [24, 25]. Concernant la BOx, des interactions complexes avec les CNTs ont déjà été rapportées mettant en jeu non seulement de l'électrostatique, mais aussi des interactions hydrophobes et des empilements π - π [26].

La formation de biopastilles stables à base de FAD GDH peut sembler surprenante au premier abord étant donné que les pastilles à base GOx se sont révélées instables alors que les deux enzymes sont issues de la même source de champignon et ont des structures très similaires [27]. Une différence majeure entre les deux enzymes réside dans leur PM, l'enzyme GOx étant

significativement plus importante (environ 23% à 68%). L'instabilité de la biopastille à base de GOx pourrait être attribuée à sa plus grande taille, susceptible d'induire lors de sa solubilisation une plus grande capacité de gonflement par incorporation d'eau conduisant à un affaiblissement des interactions avec les CNTs aboutissant à la destruction éventuelle du composite. La validité de cette hypothèse pourrait être remise en question, étant donné que les deux plus grandes protéines, la catalase et l'uréase ont toutes deux conduits à des biopastilles stables. Toutefois, il faut noter que la catalase et l'uréase sont respectivement un tétramère et un hexamère susceptible de se séparer lors de la compression faussant ainsi l'évaluation de l'effet de la masse totale de la protéine.

2.1.2.3 Angle de contact

Une série de mesures d'angle de contact statique a été également entreprise afin de déterminer une possible corrélation entre la mouillabilité du disque et l'évolution de la bioélectrode lors de son immersion en milieu aqueux, à savoir l'état stable, le gonflement ou la décomposition.

L'angle de contact est défini comme l'angle formé entre la tangente tracée à la surface de la phase liquide/gaz et une surface solide avec un sommet situé au point de contact des trois phases, et classiquement mesuré toujours à l'intérieur de la phase liquide (Figure 2.3). L'angle de contact est une caractéristique quantitative du processus de mouillage et sa valeur détermine l'interaction intermoléculaire (atomique, ionique) des particules de la surface des solides avec les liquides.

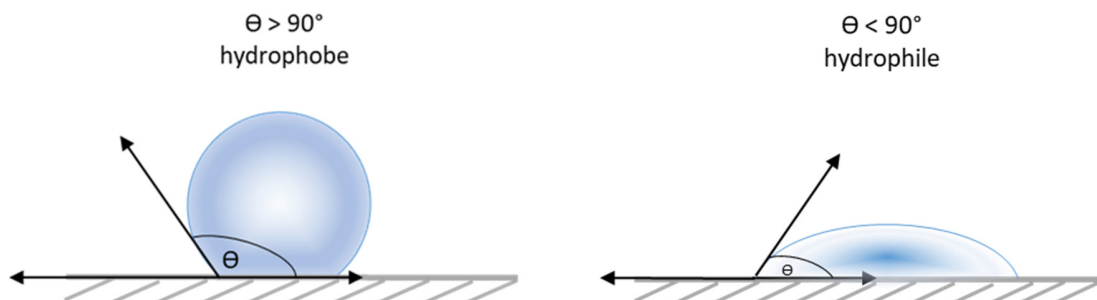


Figure 2.3 : Exemple de mesure d'angle de contact sur une surface hydrophobe ou hydrophile

Les angles de contact statiques avec l'eau ont été obtenus à la température ambiante en déposant une gouttelette de 5 μL d'eau distillée sur la surface de l'échantillon sur une platine horizontale à l'aide d'un système Dataphysics OCA 35. Plusieurs mesures de gouttelettes (2-3 par type d'échantillon) ont été enregistrées. La valeur d'angle de contact était mesurée lors des premières secondes (1-2 s) du contact de la goutte d'eau avec la surface.

Afin de définir un angle de référence, les mesures d'angle de contact ont tout d'abord été effectuées sur les pastilles composées uniquement de CNTs. Dans un premier temps, les mesures d'angle de contact ont été réalisées sur un disque de CNTs sans aucun support en silicone et sans connexion sur la face arrière du disque et comparées aux mesures effectuées sur un disque

« appareillé » comme électrode, c'est-à-dire avec la pâte de carbone, le fil de contact et le silicone.

La Figure 2.4 présente les résultats obtenus pour une compression de CNTs avec et sans connexion électrique. Dans le cas d'une électrode complète (appareillés) (Figure 2.4, a) la surface est très hydrophobe (136°), alors qu'une pastille seule (Figure 2.4, b) est complètement hydrophile (36°). Cela peut être expliqué par le fait que dans le cas d'une pastille seule, l'eau peut passer facilement à travers les pores de la compression. En revanche, dans le cas d'une électrode complète, le bord et la face arrière du disque sont recouvert d'une couche étanche de silicone qui emprisonne l'air présent dans la compression, empêchant ainsi la pénétration de l'eau dans la pastille. Ces études nous ont permis d'observer une énorme différence en termes de mouillabilité des pastilles suivant si la pastille est connectée comme une électrode ou pas.

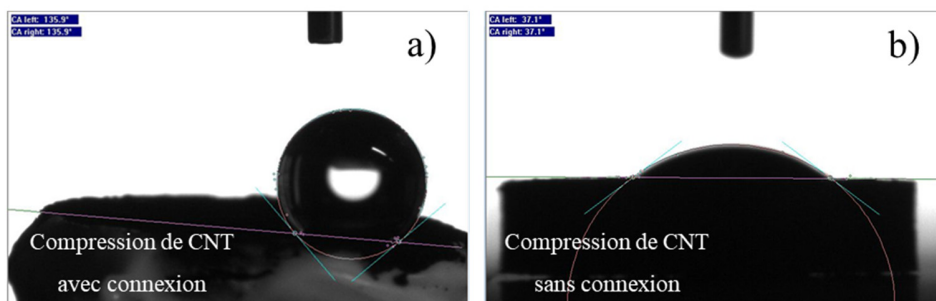


Figure 2.4 : Angle de contact entre une goutte d'eau et la surface d'une électrode appareillée (a) et d'une compression de CNTs (b)

Ces expériences ont été poursuivies par des mesures d'angles de contact sur les bioélectrodes complètes (c'est-à-dire des mélanges de CNTs et protéines dans leur configuration finale, prête à être électriquement connectés), afin de trouver une corrélation entre l'état de la surface et la stabilité mécanique. Ci-dessous, le tableau 2.2 résume les résultats obtenus pour 10 bioélectrodes.

Tableau 2.2 : Variation des angles de contacts d'électrodes à base de compression de CNTs purs ou mixés avec des protéines

<i>Protéine</i>	<i>Angle de contact, $\pm 2-3^\circ$</i>
-	136
<i>Urease</i>	130
<i>CytC</i>	122
<i>GalO</i>	115
<i>Diaphorase</i>	110
<i>Catalase</i>	100
<i>HRP</i>	99
<i>BOx</i>	97

FAD GDH	95
GOx	95
<i>Laccase</i>	73

Les biopastilles « stables » présentent des angles de contact hydrophiles et hydrophobes avec des valeurs comprises entre 73 et 130 °. Les pastilles « déconstruites » ont présenté des valeurs variant de 85 à 122 °. Bien qu'aucune corrélation entre les angles de contact et le type de biopastilles ne puisse être clairement établie, il apparaît que les biopastilles étaient dans tous les cas plus mouillables (73 à 130 °) par rapport aux pastilles avec CNTs uniquement (136 °). L'intégration de la protéine rend donc la surface des pastilles plus perméable à l'eau. La Figure 2.5 présente les images relatives à la mesure d'angle de contact de bioélectrodes réalisées avec les enzymes les plus utilisées dans cette thèse (BOx, FAD GDH et GOx).

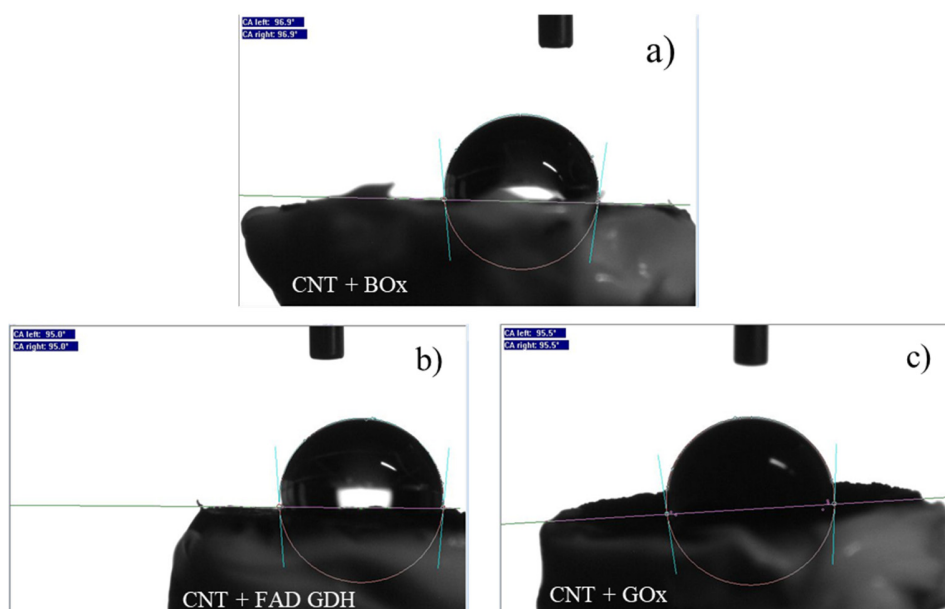


Figure 2.5 : Angle de contact entre une goutte d'eau et la surface d'une électrode contenant la BOx (a), la FAD GDH (b) ou la GOx (c)

2.2 Pastilles rédox

2.2.1 Fabrication des électrodes

Pour examiner plus en détail l'effet de la charge électrique globale de la protéine sur la stabilité des biopastilles, des pastilles ont été préparées par compression de MWCNTs et des médiateurs rédox présentant des charges négatives, positives ou neutre : sel de diammonium de 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) (ABTS), sel de diammonium de bis-pyrène 2, 2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) (bis-pyrène-ABTS, p₂-ABTS), 1, 10 phénanthroline 5, 6 quinone (PLQ), hexacyanoferrate (III) de potassium ([Fe(CN)₆]³⁻),

chlorure d'hexaammineruthénium(III) ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$), 1,4-naphthoquinone (1,4-NQ) et hémine (Tableau 2.3).

L'élaboration des pastilles rédox a été entreprise suivant la même procédure que celle employée pour la fabrication des biopastilles (Figure 2.1), mais en utilisant seulement des CNTs ($\varnothing = 13 \text{ mm}$, 35mg et $\varnothing = 6 \text{ mm}$, 17,5 mg) et un médiateur redox ($\varnothing = 13 \text{ mm}$, 5mg et $\varnothing = 6 \text{ mm}$, 2,5 mg). Un fil de cuivre plaqué argent a été fixé à l'arrière du disque avec de la pâte de carbone. Du silicone a été ajouté à l'arrière et sur les côtés pour isoler et stabiliser le disque connecté.

Les pastilles résultantes sont mécaniquement stables ou instables sans relation directe avec la charge ou l'absence de charge des espèces redox compressées dans les CNTs. De plus, le type de charge (positive ou négative et son intensité) ne semble pas affecter la stabilité de la biopastille bien que la densité des charges soit plus importante que celle présentée par les différentes protéines. Ce résultat renforce l'importance du phénomène de solubilisation et d'un possible gonflement des protéines et, au moins dans certains cas, de la taille des protéines sur la stabilité des biopastilles.

2.2.2 Caractérisation électrochimique

Les propriétés électrochimiques des pastilles rédox ont été étudiées par voltampérométrie cyclique. Les pastilles présentent le comportement électrochimique conventionnel attendu des médiateurs redox avec des potentiels de demi-vague quasi identiques à ceux de ces espèces en solution (Tableau 2.3).

Tableau 2.3 : Influence des espèces redox immobilisées sur la stabilité mécanique des pastilles et leur électroactivité en termes de potentiels de demi-vague en milieu aqueux (0,1 mol L⁻¹ PB, pH 7,4).

Espèces redox (orienteur)	Pastille Redox stable	$E_{1/2}$ pratique, V vs Ag/AgCl (KCl sat)	$E_{1/2}$ théorique V vs Ag/AgCl (KCl sat)
p ₂ -ABTS	non	ND	
ABTS	non	ND	
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	oui	0,28	0,23
$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$	oui	-0,27	-0,27
PLQ	non	ND	
1,4-NQ	oui	-0,20	-0,15
Hémine	oui	0,37	0,39

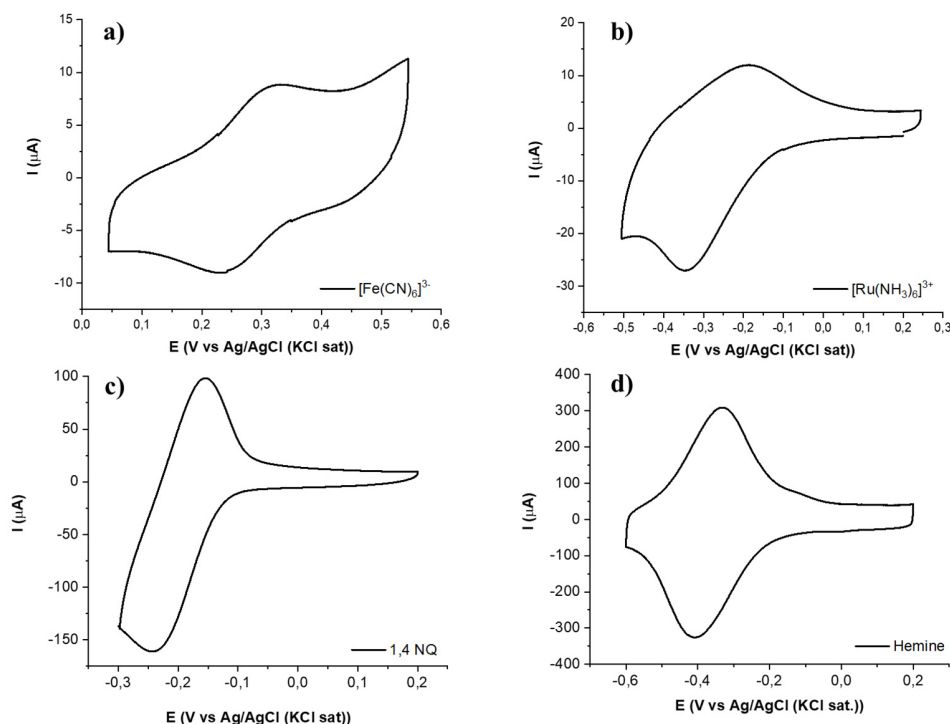


Figure 2.6 : Voltampérogrammes cycliques de pastilles redox de \varnothing 13 mm (a, b) et de \varnothing 6 mm (c, d) comprenant respectivement : $[Fe(CN)_6]^{3-}$, $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$, 1,4-NQ et Hémine. Conditions expérimentales : $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB, pH 7,4, $0,5 \text{ mV s}^{-1}$, sous Ar

L'électroactivité des pastilles présente le comportement électrochimique classique de ces espèces rédox incorporées dans les disques avec des systèmes quasi réversibles à $E_{1/2} = 0,28 \text{ V}$ ($\Delta E_p = 101 \text{ mV}$) pour $[Fe(CN)_6]^{3-}$, $E_{1/2} = -0,27 \text{ V}$ ($\Delta E_p = 160 \text{ mV}$) pour $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$, $E_{1/2} = -0,20 \text{ V}$ ($\Delta E_p = 90 \text{ mV}$) pour 1,4-NQ et $E_{1/2} = -0,37 \text{ V}$ ($\Delta E_p = 60 \text{ mV}$) pour hémine (Figure 2.6). Il faut souligner que l'enregistrement des voltampérogrammes n'a été réalisé qu'après 30 minutes d'immersion des pastilles rédox afin d'éliminer la réponse électrochimique d'espèces rédox faiblement adsorbées à la surface de la compression de nanotubes.

Après 6 semaines d'immersion dans $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB pH 7,4, la perte d'électroactivité des médiateurs redox immobilisés n'était que de 10%, 21%, 25% et 15% pour respectivement $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$, $[Fe(CN)_6]^{3-}$, 1,4-NQ et hémine, mettant en évidence une excellente stabilité au stockage aqueux pour les pastilles redox. La perte d'électroactivité a été calculée à partir de la valeur moyenne obtenue après intégration de la charge des pics anodiques et cathodiques. Outre son extrême simplicité, ce principe de réalisation d'une électrode exhibant une électroactivité rédox particulièrement stable, constitue une approche innovante et facile pour l'élaboration de systèmes (bio)électrocatalytiques.

2.3 Application des bioélectrodes à la bioélectrocatalyse

Afin d'illustrer les potentialités bioélectrocatalytiques de ces biodisques à base de compression de MWCNTs, de protéines voire de médiateurs rédox, l'activité de bioélectrodes à base de BOx pour la réduction de l'oxygène et celle de bioélectrodes à base de FAD GDH pour l'oxydation du glucose ont été examinées via différents processus de connexion de ces enzymes mettant en jeu des transferts directs ou médiés d'électron.

2.3.1 Biocathodes à base de BOx

L'enzyme BOx ayant la particularité d'avoir un centre actif près de la surface de son enveloppe, elle peut échanger directement des électrons avec une électrode (DET). Nous avons donc d'abord caractérisé les propriétés électrocatalytiques de compression contenant uniquement la BOx.

Ainsi le comportement électrochimique de la bioélectrode à base de BOx a été étudié par voltampérométrie cyclique en milieu aqueux désoxygéné (sous argon), en présence d'air et sous saturation de dioxygène (Figure 2.7). En présence de dioxygène, un courant catalytique apparaît reflétant sa réduction électro-enzymatique en eau et donc la connexion directe de la BOx immobilisée à l'électrode. Les valeurs de courant catalytique diminué du courant capacitif sont de -0,2 mA (-0,71 mA cm⁻²) à l'air et sous des conditions saturantes en dioxygène atteignent -0,6 mA (2,12 mA cm⁻²) à 0,1 V par rapport à Ag / AgCl ; la vague électrocatalytique, apparaissant à partir de + 475 mV.

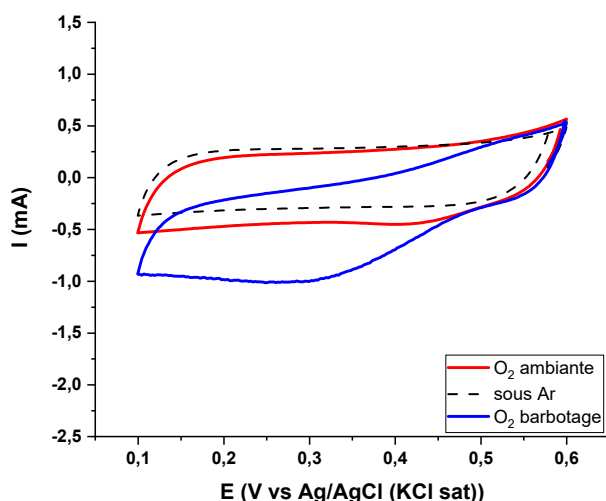


Figure 2.7 : Voltampérogrammes cycliques des biocathodes MWCNTs/ BOx, sous Ar (ligne rouge), à l'air (ligne noire) et sous barbotage de O₂ (ligne bleue). Conditions expérimentales : 0,1 mol L⁻¹ PB, pH 7,4, 0,5 mV s⁻¹

Etant donné la disposition aléatoire des enzymes dans la compression, il est probable qu'une partie des enzymes ne soit pas correctement connectée et que le site actif de ces enzymes

ne soit pas de contact direct avec un nanotube de carbone. Ces enzymes, ne pouvant pas transférer leurs électrons aux nanotubes, restent inactives.

L'ajout d'un médiateur rédox, dont la taille est nettement inférieure à celle d'un nanotube, devrait améliorer la connexion électrique des BOx. Son ajout a donc été envisagé dans la composition de la compression. L'ABTS étant le substrat rédox communément utilisé avec la bilirubine oxydase pour la réduction de O₂, il a été introduit dans la composition de la biocathode. Malheureusement, les pastilles qui en résultent, ne sont pas mécaniquement stables et mènent à l'éclatement des bioélectrodes au contact de l'eau (Figure 2.8, a).

Afin de renforcer la stabilité mécanique de la compression, nous avons utilisé un dérivé de l'ABTS fonctionnalisé par deux motifs pyrène. Ces groupes, par interaction π - π avec les parois des nanotubes de carbone peuvent réticuler les nanotubes entre eux tout en conservant les propriétés électrochimiques de l'ABTS [8]. Bien qu'une agrégation des CNTs soit réalisée, les pastilles faites par compression avec l'ABTS bis pyrène s'éclatent immédiatement au contact de l'eau (Figure 2.8, b) empêchant tout usage de ce médiateur rédox. Pour rappel, ces deux molécules même sans enzymes avaient déjà posé un problème dans la réalisation des pastilles. L'ajout des enzymes n'a pas amélioré la tenue des compressions.

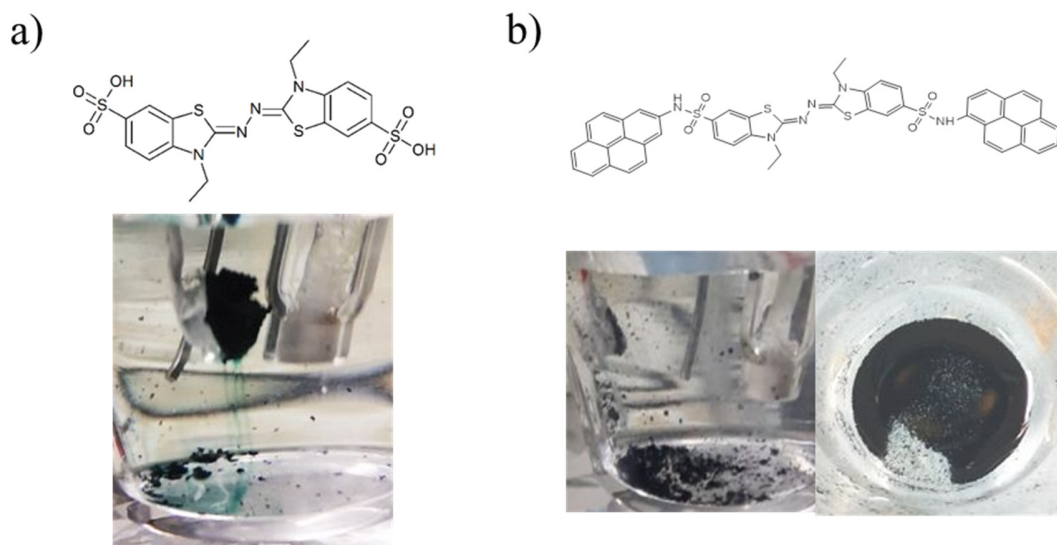


Figure 2.8: Photos illustrant des décompositions de biocathodes à base de MWCNTs, BOx et (a) ABTS ou (b) p₂-ABTS

Etant donné l'excellente stabilité mécanique et électrochimique précédemment observée pour des pastilles rédox à base de ferricyanure de potassium [Fe(CN)₆]³⁻ et l'adéquation entre le potentiel du couple rédox ($E_{1/2} = 0,28$ V) avec l'électroactivité de BOx, des compressions de CNTs, BOx et [Fe(CN)₆]³⁻ ont été préparées. L'introduction de [Fe(CN)₆]³⁻, contrairement à l'ABTS, n'entraîne pas de déstabilisation de la biocathode et un système de pics réversibles apparaît à $E_{1/2} = 0,22$ mV correspondant au potentiel redox du ferricyanure (Figure 2.9). Sous conditions saturantes de O₂, une légère augmentation du courant catalytique est observée par rapport aux électrodes ne contenant que la BOx : (-0,65 vs -0,6 mA et -2,3 vs -2,12 mA cm⁻²). Ce

phénomène reflète une connexion médiée de l'enzyme additionnée à la connexion directe de cette dernière. Toutefois, en présence seulement d'air, l'augmentation de courant est nulle indiquant un rôle très peu efficace de ce médiateur rédox.

Une autre stratégie pour améliorer la connexion électrique de la BOx, consiste à jouer sur l'orientation de l'enzyme immobilisée à la surface des CNTs. Dans cet objectif, des molécules d'hémine, une porphyrine de Fe, ont été incorporées à la composition de la compression. En raison de leur structure porphyrinique, ces molécules adhèrent à la paroi des nanotubes par interaction π - π et leur confèrent des charges négatives. Ces charges négatives induisent une interaction électrostatique avec la BOx conduisant à une orientation de la protéine favorisant le transfert direct d'électron.

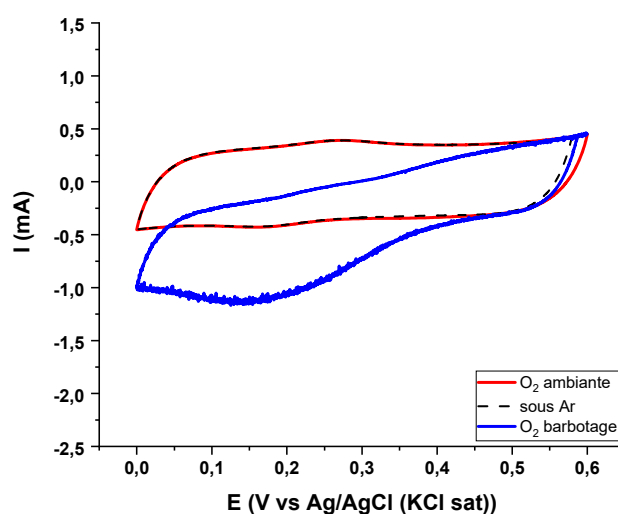


Figure 2.9: Voltampérogrammes cycliques des biocathodes à base de MWCNTs, BOx et $[Fe(CN_6)]^{3-}$ sous Ar (ligne rouge), à l'air (ligne noire) et sous barbotage de O₂ (ligne bleue). Conditions expérimentales : 0,1 mol L⁻¹ PB, pH 7,4, 0,5 mV s⁻¹

La figure 2.10 représente les voltampérogrammes effectués avec la biocathode CNTs/BOx/Hémine. Il apparaît clairement que la présence d'hémine améliore fortement le phénomène d'électrocatalyse de la BOx induisant dans des conditions saturantes de O₂, un quasi doublement de l'intensité du courant de réduction (-1,11 vs 0,6 mA et -3,93 vs -2,12 mA cm⁻²).

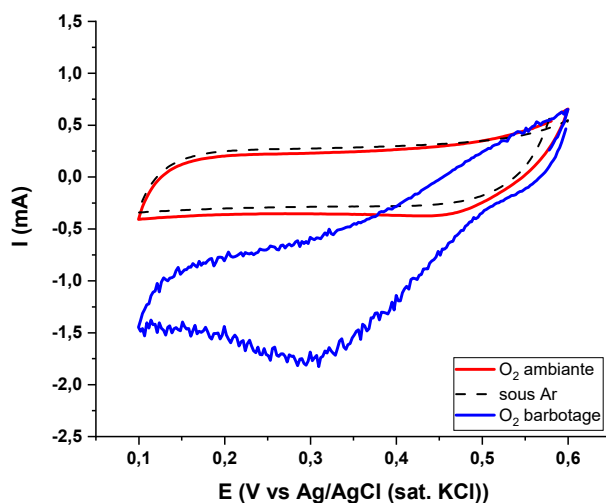


Figure 2.10 : Voltampérogrammes cycliques des biocathodes à base de MWCNTs, BOx et Hémine sous Ar (ligne rouge), à l'air (ligne noire) et sous barbotage de O₂ (ligne bleue). Conditions expérimentales : 0,1 mol L⁻¹ PB pH 7,4 à 0,5 mV s⁻¹

2.3.2 Bioanodes à base de FAD GDH

Concernant l'oxydation du glucose, nous avons privilégié l'utilisation de la FAD GDH comme une alternative attractive aux bioanodes à base de GOx. En effet, les compressions à base de FAD GDH sont stables contrairement à celles incorporant la GOx qui nécessitent des membranes externes à la surface du disque pour éviter sa décompression. De plus, FAD GDH présente des propriétés catalytiques similaires à celles de la GOx tout en étant insensible à l'oxygène. Cette dernière propriété évite la formation enzymatique de H₂O₂ qui peut diminuer les performances des biopiles glucose/O₂ en dénaturant les enzymes. La FAD GDH fongique n'exhibant pas un phénomène de DET prépondérant seule, la formation d'une bioanode par compression a été entreprise en associant un médiateur susceptible de connecter cette enzyme. Un tel médiateur doit avoir le potentiel supérieur à celui de l'enzyme et son système électroactif doit être réversible.

Concernant le développement de bioanodes, plusieurs espèces redox ont été testées pour générer un phénomène de MET avec la FAD GDH. Eu égard au potentiel redox attractif ($E_{1/2} = -0,27$ V) pour connecter FAD GDH et à l'excellente stabilité mécanique précédemment observée pour des pastilles redox à base de [Ru(NH₃)₆]³⁺, l'élaboration de bioanodes à base de FAD GDH et de ce médiateur a été entreprise conduisant à des bioélectrodes mécaniquement stables.

La détection du glucose par ces bioanodes a été étudiée par voltampérométrie cyclique en présence (150 mM) et absence de glucose (Figure 2.11). Comme attendu, le comportement électrochimique de la bioanode présente le système redox réversible correspondant au [Ru(NH₃)₆]³⁺ au potentiel de $E_{1/2} = -0,27$ mV, par contre aucune bioélectrocatalyse n'est observée.

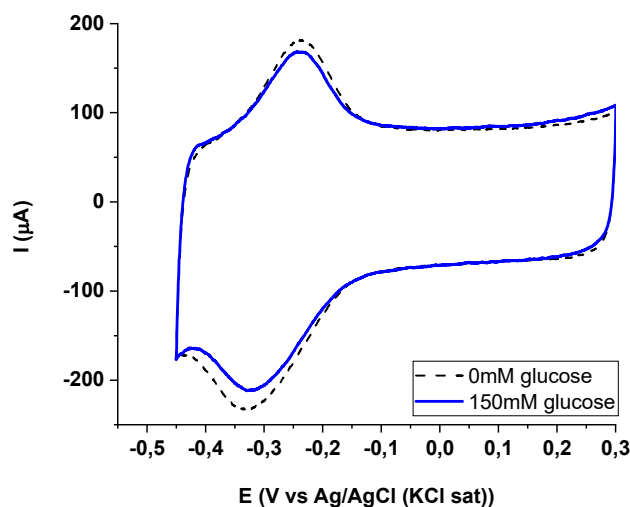


Figure 2.11: Voltampérogrammes cycliques de bioanode ($\text{Ø}13\text{mm}$) à base de MWCNTs, FAD GDH et $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en l'absence (ligne noire) et présence de 150 mmol L^{-1} de glucose (ligne rouge). Conditions expérimentales : $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB pH 7,4, $0,5 \text{ mVs}^{-1}$

Le $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ ne permettant pas une catalyse, nous avons étudié une série de médiateurs quinoniques présentant un squelette aromatique favorisant l'adsorption sur les CNTs et donc théoriquement la connexion électrique de l'enzyme par les CNTs. La structure aromatique de ces composés (1,4-NQ, 1,2-NQ, PLQ et PQ) diminue également leur solubilité en milieu aqueux.

Concernant la bioélectrode à base de 1,4-NQ, outre la stabilité du disque, les voltampérogrammes montrent un système redox à $E_{1/2} = -0,16 \text{ V}$ correspondant parfaitement à l'électroactivité de ce médiateur redox. Toutefois, aucune activité électrocatalytique n'est observée en présence de 5 mmol L^{-1} de glucose. Cependant, à concentration de glucose (150 mmol L^{-1}) quasi saturante pour l'enzyme, une augmentation du courant anodique apparaît à $-0,1 \text{ V}$ qui atteint un maximum de $1,8 \text{ mA}$ ($6,4 \text{ mA cm}^{-2}$ à $0,2 \text{ V}$) correspondant à l'oxydation de 2 électrons du glucose en gluconolactone (Figure 2.12, a).

Quant à la 1,2 - NQ, l'incorporation de ce médiateur ne déstabilise pas la compression mais conduit à un couple de pics beaucoup plus lents et moins réversibles qui induisent des courants catalytiques plus faibles que ceux enregistrés avec la 1,4-NQ (Figure 2.12, b).

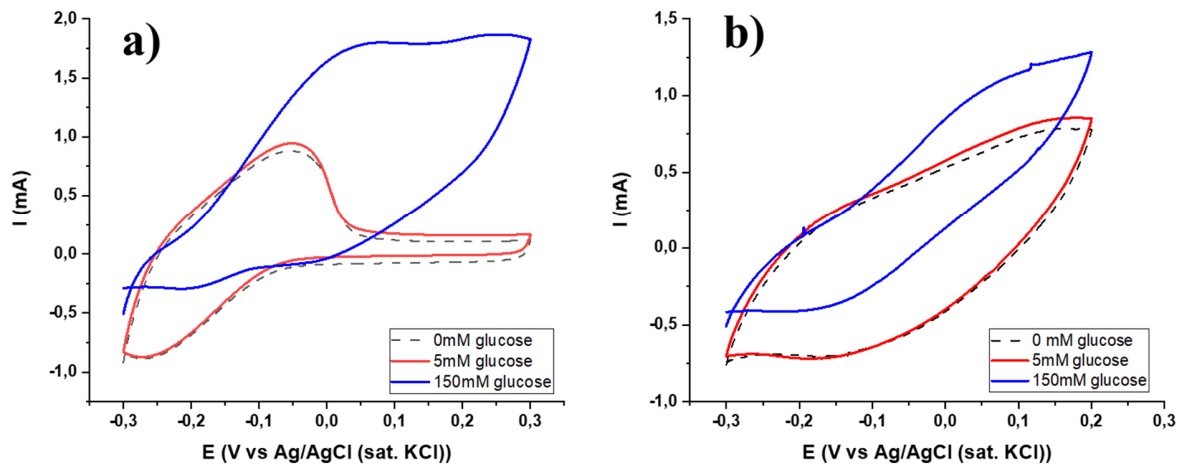


Figure 2.12: Voltampérométries cycliques des bioanodes ($\varnothing 6\text{mm}$) à base de MWCNTs, FAD GDH avec 1,4-NQ(a) et 1,2-NQ (b) en l'absence (lignes noires) et en présence de 5 mmol L^{-1} (lignes rouges) et 150 mmol L^{-1} de glucose (lignes bleues). Conditions expérimentales : 0,1 mol L^{-1} PB pH 7,4, 0,5 $mV s^{-1}$

Récemment, la FAD GDH en solution aqueuse a été électriquement connectée par le PQ. Ce dernier, en raison de sa faible solubilité en milieu aqueux ($7,5 \text{ mg } L^{-1}$), était inséré dans des motifs β -cyclodextrine d'une glyconanoparticule et a conduit à la conversion médiée du glucose par la FAD GDH en solution [29]. Eu égard aux excellents résultats rapportés, nous nous sommes également intéressés à ce médiateur rédox. Concernant la stabilité de la compression, l'incorporation de PQ n'entraîne aucun changement mécanique. La figure 2.13 présente les voltampérométries obtenus avec les bioanodes à base de FAD GDH et PQ. On peut remarquer sur les courbes qu'en l'absence de glucose un système de pics réversibles à $E_{1/2} = -0,19\text{V}$ apparaît reflétant l'électroactivité de PQ. Il faut souligner qu'en présence de glucose (150 mmol L^{-1}), une forte augmentation du courant d'oxydation du glucose est enregistrée conduisant aux meilleures performances des différents systèmes.

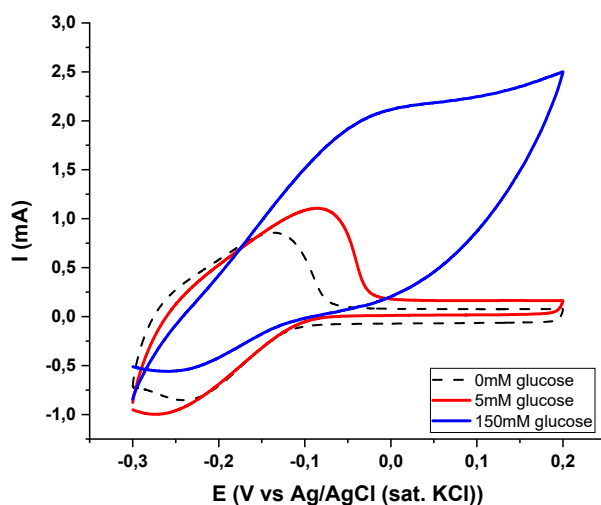


Figure 2.13: Voltampérogrammes cycliques de bioanode ($\text{\O}6\text{mm}$) à base de MWCNTs, FAD GDH et de PQ en l'absence (ligne noire) et en présence de 5 mmol L^{-1} (ligne rouge) et 150 mmol L^{-1} de glucose (ligne bleue). Conditions expérimentales : $0,1\text{ mol L}^{-1}$ PB pH 7,4, $0,5\text{ mV s}^{-1}$

Enfin de la réalisation de bioélectrode à base de FAD GDH et de PLQ a également été envisagée. En effet, il a été décrit que ce médiateur solubilisé dans du DMF, s'adsorbait parfaitement sur les nanotubes de carbone et aboutissait à des buckypapers rédox extrêmement efficaces pour la connexion de FAD GDH absorbée à leurs surfaces [9]. Malheureusement, les bioélectrodes élaborées par compression incluant FADGDH et PLQ se sont avérées mécaniquement instables et donc n'ont pas pu être testées vis-à-vis de la détection du glucose (Figure 2.14).



Figure 2.14 : Photos des bioanodes mécaniquement instables à base de MWCNTs, FAD GDH et de PLQ en tant que médiateur rédox

Ces différentes configurations de biocompression rédox basées sur la FAD GDH, n'ont pas été comparées à celles à base de GOx en raison de leur instabilité mécanique. Il avait été démontré par notre équipe que la co-immobilisation de catalase et de GOx par compression conduit à des biodisques stables dont une face était recouverte d'un film de cellulose pour empêcher toute diffusion d'enzyme ou de nanotube hors de l'électrode vers l'électrolyte [13, 14, 17]. De plus, la co-incorporation de 1,4-NQ conduisait à une communication électrique efficace avec la GOx. Tenant compte de ces résultats, nous avons testé la réalisation d'une électrode bi-enzymatique par simple compression, sans ajout de film externe et obtenu une bioélectrode stable à base de GOx, catalase et 1,4-NQ. La figure 2.15 représente les voltampérogrammes obtenus à l'absence et présence de glucose (5 et 100 mmol L^{-1}).

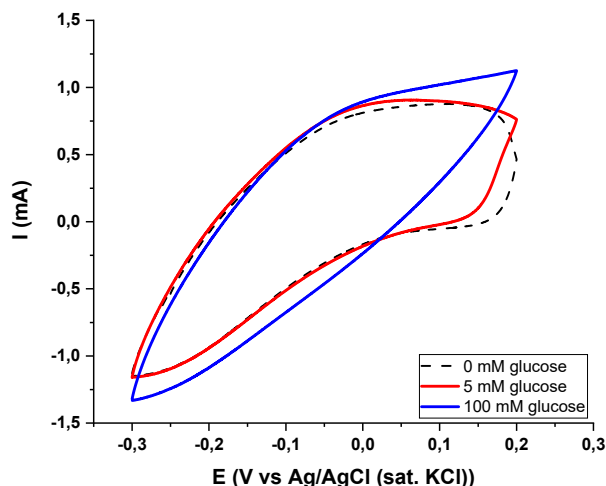


Figure 2.15: Voltampérogrammes cycliques de bioanode ($\text{\O}6\text{mm}$) à base de MWCNTs, GOx, catalase et 1,4-NQ en l'absence (ligne noire) et en présence de 5 mmol L^{-1} (ligne rouge) et 100 mmol L^{-1} de glucose (ligne bleue). Conditions expérimentales : $0,1\text{ mol L}^{-1}$ PB pH 7, $0,5\text{ mVs}^{-1}$

Une légère catalyse est observée en présence de 5mM de glucose qui augmente avec la concentration du glucose : 100 mmol L^{-1} . Toutefois, l'électroactivité du médiateur rédox est quasiment indécélable et l'intensité de l'électrocatalyse s'avère bien inférieure à celles précédemment enregistrées pour la FAD GDH. La mauvaise connexion entre le médiateur et l'enzyme, voire entre l'enzyme et les CNTs pourrait être due à la présence de la catalase qui est uniquement présente pour annihiler la production délétère de H_2O_2 par la GOx en présence de glucose et O_2 .

Dans le tableau 2.4 l'ensemble des bioélectrodes réalisées dans ce travail et leurs performances électrochimiques dans les conditions saturées sont présentées.

Tableau 2.4 : Récapitulatif des performances des bioélectrodes obtenus par la méthode de compression

Type d'électrode	I, mA	$j_{\text{cat}}, \text{mAcm}^{-2}$
Cathodes @ 0.1V		
CNTs/BOx	-0,6	-2,12
CNTs/ABTS/BOx	x	x
CNTs/ p ₂ -ABTS /BOx	x	x
CNTs/[Fe(CN) ₆] ³⁻ /BOx	-0,65	-2,3
CNTs/Hemine/BOx	-1,11	-3,93
Anodes @ 0.2V		
CNTs/[Ru(NH ₃) ₆] ³⁺ /FAD GDH	0,005	0,018
CNTs/PLQ/FAD GDH	x	x
CNTs/1,2-NQ/FAD GDH	0,5	1,79
CNTs/1,4-NQ/FAD GDH	1,73	6,16
CNTs/PQ/FAD GDH	2,5	8,93
CNTs/1,4-NQ/catalase/GOx	0,66	2,36

2.4 Caractérisation par Microscope électronique à balayage (MEB)

Le mode de fabrication des électrodes conditionne leur état de surface qui s'avère un des paramètres clés pour l'utilisation de ces bioélectrodes. En particulier, la rugosité et la morphologie jouent un rôle principal dans l'électrobiocatalyse et nécessitent une caractérisation microscopique de nos électrodes les plus utilisées. Il existe plusieurs techniques d'analyse de surface qui servent à contrôler les caractéristiques au niveau macro-, micro- et nano échelle impliquant des méthodologies destructives ou non-destructives.

Etant donné la petite taille de nos échantillons et le besoin de les caractériser à l'échelle nanométrique, sans avoir le besoin d'usiner les échantillons à partir des électrodes, parmi les techniques à notre disposition, la microscopie électronique à balayage (MEB) s'avère la méthodologie la plus adaptée à ces caractérisations. La microscopie électronique à balayage permet d'analyser la morphologie de la surface. Elle nous donne une très grande profondeur de champ et des vues qualitatives des surfaces.

Les caractérisations par microscope à balayage ont été effectuées sur la plateforme de « CERMAV ICMG » via un microscope électronique à balayage Quanta 250 FEG par FEI. Les surfaces et compositions internes de deux catégories de bioélectrodes (biocathode et bioanode) ont été étudiées. Ainsi, deux électrodes représentant les électrodes les plus utilisées en configuration « pastilles » pendant la thèse : cathode MWCNTs/Hémine/BOD et anode MWCNTs/GOx/catalase/1,4-NQ ont été analysées par microscopie et comparées à une électrode constituée uniquement de MWCNTs comme référence.

Les images MEB de la pastille de MWCNTs montrent l'extérieure (Figure 2.16, a) et l'intérieur (Figure 2.16, b,c) de la pastille. On remarque que les pastilles sont constituées des plaques compactes superposées qui laissent peu d'espaces à la pénétration de l'électrolyte. Cette configuration pourrait expliquer le caractère hydrophobe de la surface précédemment déterminée pour ce type d'électrode.

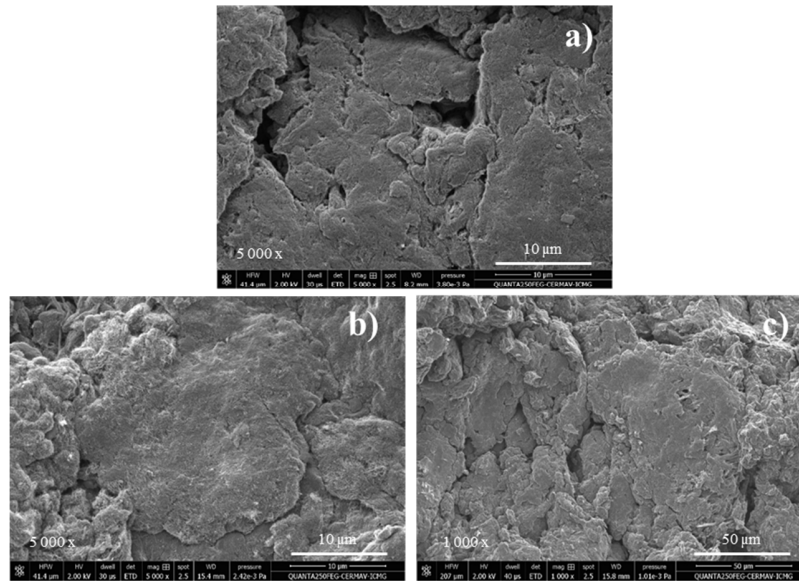


Figure 2.16 : Images MEB de la surface extérieure (a) et de la composition interne (b,c) de la pastille constituée uniquement de MWCNTs

Contrairement aux disques constitués uniquement de MWCNTs, l'introduction d'enzymes dans la compression, que ce soit pour la biocathode (Figure 2.17) ou la bioanode (Figure 2.18), conduit à des disques ne présentant pas de blocs compacts.

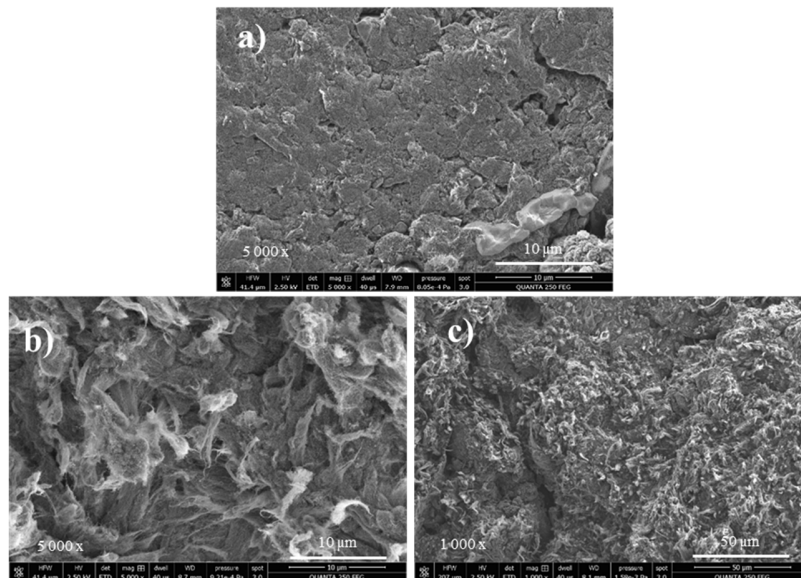


Figure 2.17: Images MEB de la surface extérieure (a) et intérieure (b,c) de la cathode MWCNTs/Hémimine/BOx

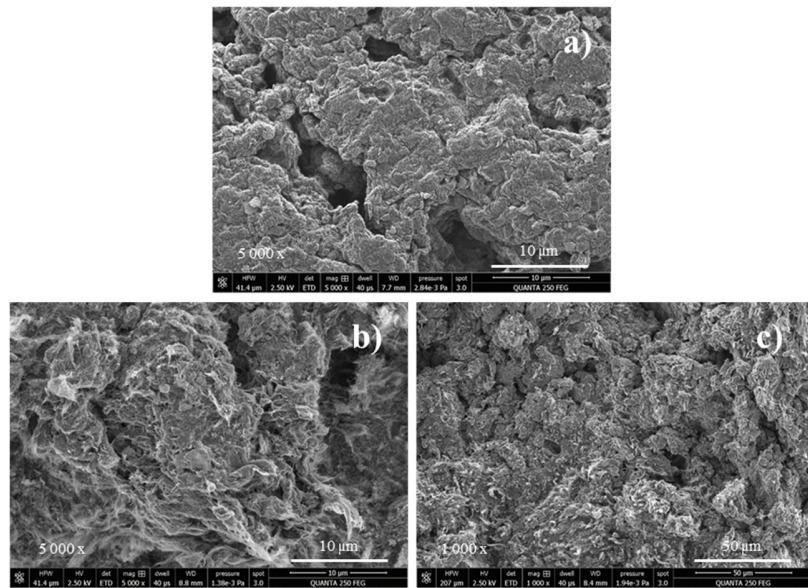


Figure 2.18 : Images MEB de la surface extérieure (a) et intérieure (b,c) d'anode MWCNTs/GOx/catalase/1,4-NQ

Le mélange de protéines et de CNTs semble gêner, voire empêcher, l'agrégation des CNTs hydrophobes en blocs compacts lors de la compression et devrait donc augmenter la porosité des compressions CNTs/protéines. Cette hypothèse serait à rapprocher des résultats d'angle de contact, qui indiquaient une hydrophobie moindre des pastilles avec protéines par rapport aux pastilles uniquement composées de CNTs.

Conclusion

La première partie du chapitre s'est portée sur l'élaboration d'une large gamme de biopastilles par simple compression de nanotubes de carbone et de poudres de protéines.

Eu égard à la simplicité et la rapidité de cette méthode de fabrication d'électrodes enzymatiques, cette étude a consisté à évaluer les limites d'application de cette procédure qui peut être utilisée pour développement de biocapteurs et de biopiles. Suite à l'incorporation de 11 protéines exhibant des poids moléculaires et des points isoélectriques différents, il est apparu que la masse moléculaire des protéines n'avait pas d'effet sur la stabilité mécanique des biopastilles. Il n'est donc pas possible d'extrapoler un enseignement sur la stabilité du disque uniquement à partir de la masse moléculaire de la protéine.

Cependant, en ce qui concerne l'influence des points isoélectriques, quelques enseignements peuvent en être tirés : les enzymes présentant une faible charge négative conduisent à des disques mécaniquement stables, alors que les protéines exhibant une forte densité de charges positives ou négatives aboutissent à des compressions instables. Il faut toutefois noter quelques exceptions : la laccase, BOx et FAD GDH qui, quoique présentant une forte charge négative, conduisent à des pastilles stables illustrant par là même l'influence importante d'autres paramètres comme les interactions hydrophobes entre les CNTs et une partie de la protéine.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, l'élaboration de pastilles rédox par compression de CNTs et de médiateurs rédox a été abordée. Cette approche génère des électrodes comprimées présentant l'électroactivité des espèces rédox. Les électrodes rédox étant immergées dans une solution aqueuse, cette électroactivité peut être stable durant plusieurs semaines. Contrairement à l'immobilisation de protéines, il n'y a aucun impact de la nature et de l'importance de la charge des molécules rédox sur la stabilité des compressions.

La troisième partie a consisté à fabriquer les biocathodes et bioanodes incluant différentes molécules redox qui sont rajoutée afin de faciliter le transfert d'électron. Les biocathodes à base de BOx ont mis en évidence un phénomène de DET pour la réduction de O₂. La présence ou non de médiateur a été étudiée avec la BOx. Peu de gain a été mis en évidence lors de l'ajout de [Fe(CN)₆]³⁻. Ce médiateur n'est pas très intéressant. Par contre, l'incorporation d'hémine dans la compression favorise via des interactions électrostatiques, une orientation de l'enzyme à la surface des CNTs induisant une meilleure connexion des sites actifs de BOx et donc une augmentation des performances de la biocathode.

La conception des bioanodes basées sur la connexion MET de la FAD GDH avec différents médiateur redox tels que [Ru(NH₃)₆]³⁺, 1,4-NQ, 1,2-NQ, PQ et PLQ, a été explorée. Les meilleures activités électrocatalytiques vis-à-vis de l'oxydation du glucose ont été observées en présence de 1,4-NQ et de PQ.

La quatrième et dernière partie de ce chapitre est axée sur une brève étude de la structure interne et externe de nos bioélectrodes. Les caractérisations ont été effectuées par MEB sur de trois échantillons : pastilles de CNTs seules, biocathodes CNTs/BOx/Hémine et bioanode CNTs/GOx/catalase/1,4-NQ. Il apparaît que les électrodes à base uniquement de CNTs compressées, sont constituées de blocs massifs générant une hydrophobie de surface corroborée par des mesures d'angle de contact. L'introduction de protéines dans la composition de l'électrode, diminue le phénomène d'agrégation en blocs compacts, augmente la porosité du disque et diminue leur caractère hydrophobe.

Bibliographie

- [1] A. J. Gross, M. Holzinger, and S. Cosnier, "Buckypaper bioelectrodes: Emerging materials for implantable and wearable biofuel cells," *Energy Environ. Sci.*, vol. 11, no. 7, pp. 1670–1687, 2018, doi: 10.1039/c8ee00330k.
- [2] N. Mano, "Recent advances in high surface area electrodes for bioelectrochemical applications," *Curr. Opin. Electrochem.*, vol. 19, pp. 8–13, 2020, doi: 10.1016/j.coelec.2019.09.003.
- [3] X. Chen, A. J. Gross, F. Giroud, M. Holzinger, and S. Cosnier, "Comparison of Commercial and Lab-made MWCNT Buckypaper: Physicochemical Properties and Bioelectrocatalytic O₂ Reduction," *Electroanalysis*, vol. 30, no. 7, pp. 1511–1520, 2018, doi: 10.1002/elan.201800136.
- [4] G. P. M. K. Ciniciato, C. Lau, A. Cochrane, S. S. Sibbett, E. R. Gonzalez, and P. Atanassov, "Development of paper based electrodes: From air-breathing to paintable enzymatic cathodes," *Electrochim. Acta*, vol. 82, pp. 208–213, 2012, doi: 10.1016/j.electacta.2012.06.094.
- [5] S. Cosnier, M. Holzinger, and A. Le Goff, "Recent advances in carbon nanotube-based enzymatic fuel cells," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 2, no. OCT, pp. 1–6, 2014, doi: 10.3389/fbioe.2014.00045.
- [6] L. Fritea, A. J. Gross, K. Gorgy, R. K. O'Reilly, A. Le Goff, and S. Cosnier, "A bifunctional triblock polynorbornene/carbon nanotube buckypaper bioelectrode for low-potential/high-current thionine-mediated glucose oxidation by FAD-GDH," *J. Mater. Chem. A*, vol. 7, no. 4, pp. 1447–1450, 2019, doi: 10.1039/c8ta10644d.
- [7] L. Halámková, J. Halámk, V. Bocharova, A. Szczupak, L. Alfonta, and E. Katz, "Implanted biofuel cell operating in a living snail," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 11, pp. 5040–5043, 2012, doi: 10.1021/ja211714w.
- [8] A. J. Gross, M. P. Robin, Y. Nedellec, R. K. O'Reilly, D. Shan, and S. Cosnier, "Robust bifunctional buckypapers from carbon nanotubes and polynorbornene copolymers for flexible engineering of enzymatic bioelectrodes," *Carbon N. Y.*, vol. 107, pp. 542–547, 2016, doi: 10.1016/j.carbon.2016.06.027.
- [9] A. J. Gross *et al.*, "A High Power Buckypaper Biofuel Cell: Exploiting 1,10-Phenanthroline-5,6-dione with FAD-Dependent Dehydrogenase for Catalytically-Powerful Glucose Oxidation," *ACS Catal.*, vol. 7, no. 7, pp. 4408–4416, 2017, doi: 10.1021/acscatal.7b00738.
- [10] S. Cosnier, R. Haddad, D. Moatsou, and R. K. O'Reilly, "Biofunctionalizable flexible bucky paper by combination of multi-walled carbon nanotubes and polynorbornene-pyrene - Application to the bioelectrocatalytic reduction of oxygen," *Carbon N. Y.*, vol. 93, pp. 713–718, 2015, doi: 10.1016/j.carbon.2015.05.099.
- [11] B. Reuillard *et al.*, "One-year stability for a glucose/oxygen biofuel cell combined with pH reactivation of the laccase/carbon nanotube biocathode," *Bioelectrochemistry*, vol. 106, pp. 73–76, 2015, doi: 10.1016/j.bioelechem.2015.04.009.
- [12] A. Ben Tahar *et al.*, "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.
- [13] C. Abreu *et al.*, "Assembly and Stacking of Flow-through Enzymatic Bioelectrodes for High Power Glucose Fuel Cells," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 28, pp. 23836–23842, 2017, doi: 10.1021/acsaami.7b06717.
- [14] 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, 2011, doi: 10.1038/ncomms1365.
- [15] S. El Ichi-Ribault *et al.*, "Performance and stability of chitosan-MWCNTs-laccase biocathode: Effect of MWCNTs surface charges and ionic strength," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 799, no. April, pp. 26–33, 2017, doi: 10.1016/j.jelechem.2017.05.018.
- [16] S. El Ichi-Ribault *et al.*, "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.
- [17] B. Reuillard *et al.*, “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.
- [18] S. El Ichi-Ribault *et al.*, “Laccase-based biocathodes: Comparison of chitosan and Nafion,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 937, pp. 43–52, 2016, doi: 10.1016/j.aca.2016.07.029.
- [19] X. Lang, L. Zhu, Y. Gao, and I. Wheeldon, “Enhancing Enzyme Activity and Immobilization in Nanostructured Inorganic-Enzyme Complexes,” *Langmuir*, vol. 33, no. 36, pp. 9073–9080, 2017, doi: 10.1021/acs.langmuir.7b02004.
- [20] H. Delincee and B. J. Radola, “Determination of isoelectric points in thin-layer isoelectric focusing: The importance of attaining the steady state and the role of CO₂ interference,” *Anal. Biochem.*, vol. 90, no. 2, pp. 609–623, 1978, doi: 10.1016/0003-2697(78)90154-9.
- [21] C. Biology and D. Medicine, “Points of Proteins :,” *Anal. Biochem.*, vol. 647, pp. 620–647, 1978, doi: 10.1016/0003-2697(78)90790-X.
- [22] K. Piontek, M. Antorini, and T. Choinowski, “Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 40, pp. 37663–37669, 2002, doi: 10.1074/jbc.M204571200.
- [23] H. Ikemoto, S. L. Mossin, J. Ulstrup, and Q. Chi, “Probing structural and catalytic characteristics of galactose oxidase confined in nanoscale chemical environments,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 42, pp. 21939–21950, 2014, doi: 10.1039/c4ra00653d.
- [24] C. F. Blanford, R. S. Heath, and F. A. Armstrong, “A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O₂ reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface,” *Chem. Commun.*, no. 17, pp. 1710–1712, 2007, doi: 10.1039/b703114a.
- [25] A. E. Russell, “Faraday discussions: Preface,” *Faraday Discuss.*, vol. 140, pp. 9–10, 2008, doi: 10.1039/b814058h.
- [26] I. Mazurenko *et al.*, “How the intricate interactions between carbon nanotubes and two bilirubin oxidases control direct and mediated O₂ reduction,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 35, pp. 23074–23085, 2016, doi: 10.1021/acsami.6b07355.
- [27] J. Okuda-Shimazaki, H. Yoshida, and K. Sode, “FAD dependent glucose dehydrogenases – Discovery and engineering of representative glucose sensing enzymes -,” *Bioelectrochemistry*, vol. 132, p. 107414, 2020, doi: 10.1016/j.bioelechem.2019.107414.
- [28] A. Berezovska, Y. Nedellec, F. Giroud, A. J. Gross, and S. Cosnier, “Freestanding biopellet electrodes based on carbon nanotubes and protein compression for direct and mediated bioelectrocatalysis,” *Electrochem. commun.*, vol. 122, p. 106895, 2021, doi: 10.1016/j.elecom.2020.106895.
- [29] J. L. Hammond, A. J. Gross, F. Giroud, C. Travelet, R. Borsali, and S. Cosnier, “Solubilized Enzymatic Fuel Cell (SEFC) for Quasi-Continuous Operation Exploiting Carbohydrate Block Copolymer Glyconanoparticle Mediators,” *ACS Energy Lett.*, vol. 4, no. 1, pp. 142–148, 2019, doi: 10.1021/acsenerylett.8b01972.
- [30] T. D. Phong, “Synthèse et caractérisation de précurseurs de cuivre, or et iridium et études des dépôts de films métalliques correspondants par CVD pour des applications en microélectronique,” no. September, pp. 1–175, 2007.

**CHAPITRE 3. BIOELECTRODES A BASE DE
COMPRESSION DE MWCNTS AVEC
L'INSERTION DES MEDIATEURS REDOX ET DES
ENZYMES PAR ADSORPTION**

Chapitre 3. Bioélectrodes à base de compression de MWCNTs avec l'insertion des médiateurs redox et des enzymes par adsorption

Chapitre 3. Bioélectrodes à base de compression de MWCNTs avec l'insertion des médiateurs redox et des enzymes par adsorption

Introduction	101
3.1 Fabrication d'électrodes	102
3.2 Pastilles de MWCNTs compressés avec fonctionnalisation par médiateurs	105
3.2.1 Adsorption des espèces électroactives	105
3.2.2 Caractérisation électrochimique	106
3.3 Electrodes fonctionnalisées par médiateurs avec enzymes	111
3.3.1 Bioélectrodes pour la réduction de O ₂	112
3.3.2 Bioélectrodes pour l'oxydation du glucose	113
Conclusion	120
Bibliographie	122

Chapitre 3. Bioélectrodes à base de compression de MWCNTs avec l'insertion des médiateurs redox et des enzymes par adsorption

Introduction

Au cours de la dernière décennie, notre groupe a étudié intensivement de multiples configurations de bioélectrodes enzymatiques dont celles appelées biopastilles. Ces électrodes sont obtenues par une compression simple de matériaux conducteurs, redox et biologiques (enzymes). Cette approche, peu coûteuse, permet un contact intime entre les parois des CNTs et les composés electrocatalytiques (médiateurs redox et enzymes). Les premiers rapports bibliographiques évoquent la compression de pétales de graphite comme matériau conducteur avec différents couples de médiateurs redox et d'enzymes. Grâce à la combinaison appropriée de médiateurs redox avec la glucose oxydase (GOx) et à la polyphénol oxydase (PPO), il a été possible de catalyser l'oxydation du glucose et la réduction de dioxygène au laboratoire [1], [2]. Ces bioélectrodes ont également été implantées *in vivo* avec succès dans des rats vivants et utilisées comme des biopiles à combustible enzymatiques complètes glucose/O₂. Néanmoins, le faible niveau de nanostructuration de ces bioélectrodes à base de graphite a conduit à des puissances électriques relativement faibles de l'ordre du μW .

Les générations suivantes de biopastilles ont rapidement évolué avec une transition entre l'utilisation du graphite (matériau 2D) aux matériaux à base de CNTs (matériaux 3D). Cela a considérablement amélioré les performances globales des électrodes en raison de l'augmentation de la quantité de matériaux redox immobilisés dans ces nouvelles électrodes carbonées offrant une grande surface spécifique. De plus, l'utilisation de nanomatériaux comme les CNTs a permis de confectionner des électrodes accomplissant un transfert d'électron direct avec des enzymes telles que la glucose oxydase, la laccase ou la polyphénol oxydase [3], [4] qui ont été utilisées dans des biopiles à combustible *in vivo* implantées là encore, chez le rat [5] ou *in vitro* dans des biosupercondensateurs [6]. Le défi et le manque de reproductibilité au niveau de la bioanode pour accomplir le DET de la GOx ont conduit à poursuivre les recherches sur des bioélectrodes assurant un transfert d'électron médié (MET) avec des médiateurs redox intégrés [7]. Malgré leur durée de vie catalytique relativement bonne [8], ces électrodes de taille millimétriques présentaient souvent de mauvaises efficacités de transport de masse causées par la diffusion lente des substrats dans la masse du réseau de CNTs et conduisant à leur épuisement progressif. Cette limitation était observable par la forme non sigmoïdale des courbes obtenues par voltampérométrie cyclique dans des conditions catalytiques (« turn-over »). Plus généralement, cela se traduit par des chutes de courant rapides lors des mesures ampérométriques dans les solutions sans agitation. Pour résoudre ce problème, des biopastilles ont été réalisées par le confinement mécanique du mélange identique « CNT/médiateur/enzyme » directement dans des boîtiers en Plexiglas®. Ces électrodes étaient conçues pour fonctionner comme des dispositifs à flux (tangential ou orthogonal) [9], [10], mais cela impliquait l'utilisation de pompes supplémentaires qui, elles aussi, consomment de l'énergie électrique. On peut donc raisonnablement soulever la question du rapport de production d'énergie électrique produit par les biopiles par rapport à la consommation électrique nécessaire au fonctionnement des pompes.

Dans le but d'aller plus loin dans la description de la fabrication des biopastilles et de leur stabilité, une étude, décrite dans le chapitre 2, donne de nouveaux aperçus de notre rapport précédent sur les biopastilles autosupportées. Cette étude a révélé que les électrodes de type pastilles à base de CNTs ont tendance à être fragiles et difficiles à manipuler en raison du gonflement excessif de la pastille lors du processus de rehydratation lors de l'immersion en milieu aqueux. Cela entraîne une déstabilisation mécanique des électrodes et une libération potentielle des CNTs dans l'électrolyte. Par exemple, la fabrication de biopastilles stables était limitée ou impossible avec sept de onze protéines différentes (telles que le Cyt C, la HRP, la laccase, la galactose oxydase, la glucose oxydase et la FAD-glucose déshydrogénase) [11]. Les médiateurs redox communs tels que l'ABTS, le bis-pyrène-ABTS (p₂-ABTS) et la PLQ ont également conduit à la destruction complète de la pastille redox obtenues dès son immersion dans une solution tampon, même en l'absence des protéines redox appropriées. Il est cependant intéressant de noter que ces autodestructions n'ont jamais été observées pour des bioélectrodes fabriquées en laboratoire à partir d'une dispersion contenant le même mélange de CNTs et de médiateur redox (électrodes type Buckypaper), ce qui peut indiquer des interactions π - π plus élevées entre les parois des CNTs dans les BP que dans la pastille [12]. Par conséquent, pour surmonter la destruction de biopastilles vue de notre travail précédent, une stratégie alternative pour leur conception a été évaluée et sera l'enjeu décrit dans ce chapitre.

Ici, nous avons proposé une nouvelle méthode de fabrication de bioélectrodes comprimées mécaniquement qui permet potentiellement l'utilisation et la combinaison de tout couple médiateur redox/enzyme sans déconstruction des architectures. Cette nouvelle approche de fabrication consiste en trois étapes principales : (1) construction des électrodes par compression de CNTs, (2) adsorption du médiateur redox et (3) modification des pastilles fonctionnalisées par l'adsorption d'enzyme. Chaque étape de fabrication a été caractérisée et décrite. Une étude sommaire d'hydratation de pastilles non modifiées par rapport à un film mince de CNTs sur des électrodes de carbone vitreux a été effectuée dans ce travail dans le but d'évaluer la perméabilité de la pastille en CNTs. Ensuite, les études électrochimiques et bioélectrocatalytiques ont été menées en utilisant les méthodes de voltampérométrie cyclique et de chronoampérométrie pour différentes (bio)électrodes en absence ou en présence des substrats enzymatiques.

3.1 Fabrication d'électrodes

Dans cette partie du chapitre, la fabrication de bioélectrodes décrite précédemment (étape 1 à 3) est rapidement énoncée.

Étape 1 – Construction de la pastille

Sur la base de notre procédure précédemment rapportée dans le chapitre 2 (partie 2.2.1), des pastilles de MWCNTs ($\varnothing = 6$ mm, $1,8 \pm 0,2$ mm d'épaisseur) ont été obtenues par broyage doux d'un mélange de 50 μ L d'eau distillée et de 17,5 mg de poudre de CNTs. Les pâtes homogènes résultantes ont ensuite été comprimées en disques à l'aide d'une presse hydraulique manuelle sous

une pression d'environ 0,5 t pendant une durée de 60s. Un fil de Cu plaqué Ag a été connecté à l'arrière du disque avec de la pâte de carbone. Du silicone a été ajouté à l'arrière et sur les côtés pour isoler et stabiliser mécaniquement le disque connecté (Figure 3.1, a). La surface géométrique (surface directement exposée à l'électrolyte) de telles électrodes est de $0,283 \text{ cm}^2$ et représente un volume de $0,051 \pm 0,006 \text{ cm}^3$.

À cette étape, l'électrode ainsi fabriquée était étudiée en détail, à savoir sa morphologie et son hydratation. Les surfaces et compositions internes d'électrodes résultantes ont été étudiées via microscopie électronique à balayage. Des images à haute résolution de la morphologie des pastilles ont été obtenues à l'aide d'un microscope FEI/Quanta FEG 250 (MEB, Hillsboro, OR, USA) avec une tension d'accélération de 2 kV (Figure 3.1, b, c).

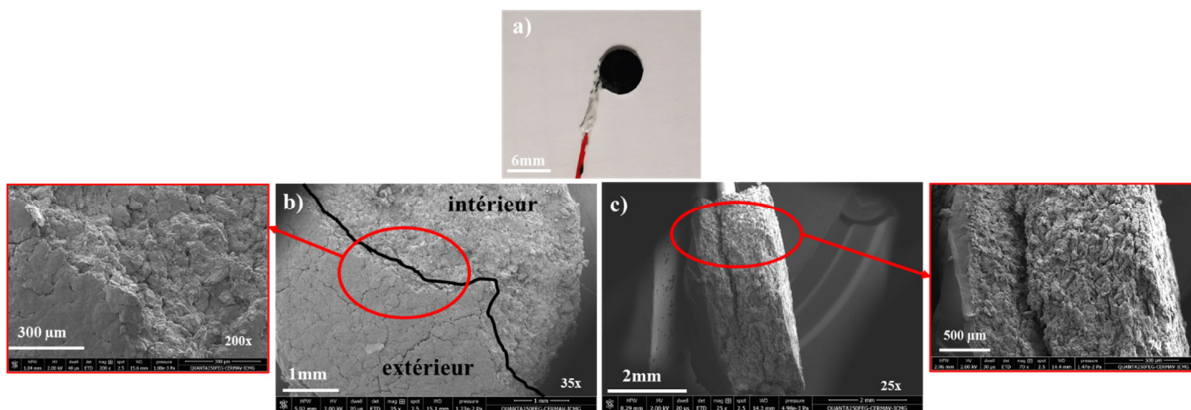


Figure 3.1 : Illustrations des électrodes en CNTs obtenues à la première étape : a) les photos d'électrode en CNTs compressées ; b) les images MEB d'électrode face externe ; c) les images MEB d'électrode de côté (dépourvue de silicone).

Comme décrit dans la partie 2.4 du chapitre 2 (Figure 2.16), la surface externe du disque est plus lisse que l'intérieur (Figure 3.1, b). La surface externe se compose d'agglomérats compacts de nanotubes de carbone superposés qui sont en contact avec la solution et donc qui empêche la pénétration d'électrolyte. Pour l'intérieur, la matrice principale de l'électrode (vue de côté, figure 3.1, c) présente l'aspect désordonné et stratifié habituellement rencontrés dans les nanomatériaux à base de CNTs. Seule la face externe étant en contact direct avec l'électrolyte (silicone sur les autres cotés), ces observations renforcent encore une fois l'aspect hydrophobe de ces pastilles.

La nature hydrophobe des électrodes en CNTs non modifiées a été aussi confirmée par des mesures en voltampérométrie cyclique (CV) (Figure 3.2). Pour cela, des expériences identiques ont été réalisées en utilisant les électrodes en carbone vitreux modifiées avec un film mince de CNTs ($\approx 20 \text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur). Pour permettre la comparaison de l'hydratation entre un film de CNTs et la pastille en CNTs, les densités de courant seront données en fonction du volume du film de CNTs (et non de la surface géométrique). Grâce à l'utilisation du courant capacitif issu de la double couche électrochimique, ces résultats nous permettront d'estimer quel volume d'électrode est réellement en contact avec l'électrolyte.

Cette estimation suppose que les deux couches de CNTs (compression et film mince) ont des densités proches même s'ils n'ont pas été obtenus de la même façon (pression mécanique et aspiration sous vide).

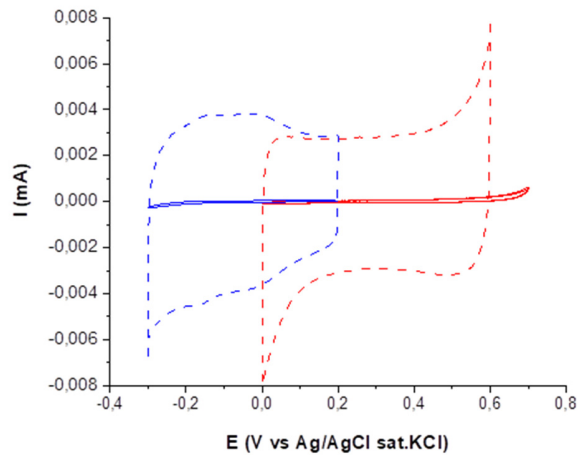


Figure 3.2 : Voltampérogrammes cycliques du carbone vitreux/CNTs non modifiés (ligne pointillée) et de la pastille à base de CNT (ligne pleine). Zone anodique en bleu, zone cathodique en rouge. Conditions expérimentales : 5 mV s^{-1} dans $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB (pH 7,4).

Les électrodes de carbone vitreux modifiées avec une couche de CNTs affichaient une densité de courant capacitif non négligeable ($7,97 \pm 1,00 \text{ mA cm}^{-3}$). Les pastilles en CNTs non modifiées, elles, présentaient une contribution capacitive extrêmement faible ($0,80 \pm 0,38 \text{ } \mu\text{A cm}^{-3}$). Cela signifie que seule une fraction extrêmement limitée du réseau de nanotubes formant la pastille est réellement en contact avec l'électrolyte. Hypothétiquement, si l'on considère que le film mince de CNTs sur carbone vitreux est complètement hydraté, alors seulement un volume de 0,01% de la pastille est en contact avec le tampon.

Étape 2 – Adsorption des médiateurs redox

Les électrodes précédentes ont été immergées ensuite dans une solution aqueuse (ou mélange aqueux/organique) contenant un médiateur redox. L'incorporation/adsorption des espèces redox a été suivie par CV à intervalles réguliers ($t = 0, 30, 60, 120$ et 180 min). Pour les espèces de la famille des quinones, l'électrolyte a été préalablement purgé avec l'argon pendant 10 min avant l'immersion de la pastille ceci afin de limiter 1- la contribution de la réduction de O_2 connue pour être observée dans la même gamme de potentiel sur CNTs non modifiés, 2- la réduction de O_2 via les quinones. Les CV ont été réalisées dans des solutions en absence de barbotage. Entre les acquisitions, les conditions hydrodynamiques (convection mécanique) ont été maintenues pour permettre un transport de masse rapide de l'électrolyte (et donc des médiateurs) à l'intérieur de la matrice de l'électrode. Une période d'incubation de 180 min était suffisante pour atteindre une valeur limite du signal faradique enregistré pour toutes les espèces redox. Ces électrodes ont été rincées avec de l'eau distillée pour éliminer les espèces faiblement

adsorbées avant les mesures électrochimiques pour les études suivantes de la stabilité et de bioélectrocatalyse. Le suivi de cette étape et les études de ces pastilles fonctionnalisées par le médiateur seront plus expliqués et décrits dans la partie 3.2.2 (« Caractérisation électrochimique »).

Étape 3 – Immobilisation des enzymes

Les électrodes conçues dans l'étape 1 et 2 ont été finalement incubées dans 1 mL de solution contenant les protéines redox (1 mg mL^{-1}) pendant une nuit à une température de $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Ces pastilles modifiées ont été rincées avec de l'eau distillée avant d'être testées électrochimiquement. Pour une facilité de lecture, les pastilles compressées en MWCNTs, fonctionnalisées par les médiateurs adsorbés et modifiées par les enzymes seront appelées bioélectrodes compressées dans la suite du chapitre. Leurs études seront présentées dans la partie 3.3 (« Bioélectrodes »).

3.2 Pastilles de MWCNTs compressés avec fonctionnalisation par médiateurs

La fonctionnalisation des pastilles à base de CNTs seuls a été opérée avec des espèces électroactives telles que deux dérivés de l'ABTS (ABTS et p₂-ABTS) et quatre quinones (PLQ, PQ, 1,4-NQ et 1,2-NQ). Ces molécules redox présentent différentes solubilités et différents potentiels d'oxydoréduction variant de $-0,2 \text{ V}$ à $0,5 \text{ V}$ par rapport à Ag/AgCl. Toutes ces espèces électroactives sont connues pour servir de relai électronique lors du MET entre des enzymes et l'interface de l'électrode. Les médiateurs à haut potentiel redox (ABTS, p₂-ABTS) sont utilisés avec les oxydases multicuivres pour la réduction du dioxygène tandis que les espèces à bas potentiel (les quinones) le sont avec la glucose oxydase/déshydrogénase pour l'oxydation du glucose.

3.2.1 Adsorption des espèces électroactives

Nous procédons à l'adsorption des médiateurs redox. L'inconvénient majeur réside dans le fait que certains médiateurs redox ne sont que faiblement solubles en solutions aqueuses. Pour pallier ce problème, nous avons décidé de réaliser les adsorptions dans des mélanges CH₃CN/PB pour favoriser leur dissolution.

Avant cette étape, nous avons évalué l'influence du ratio solution aqueuse/solvant organique sur les CNTs compressés (mais non modifiés) pour être certains de conserver l'intégrité de la pastille. Il est apparu que la perte d'intégrité de la pastille due à un gonflement important de l'électrode était atteinte pour un ratio excédant 50% v/v CH₃CN/PB (Figure 3.3). Un ratio de 10% v/v CH₃CN/PB a donc été utilisé dans les expériences suivantes d'adsorption en se basant sur le fait que cette proportion est suffisante pour solubiliser les espèces redox tout en causant le minimum d'effet négatif sur la stabilité de la compression de CNTs.

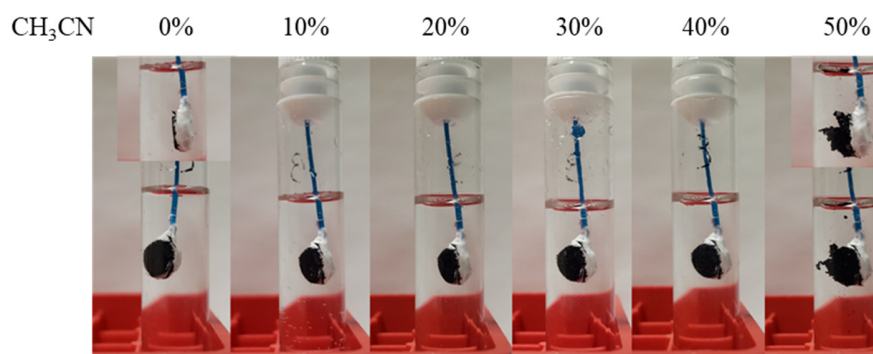


Figure 3.3 : Photos d'une pastille de CNTs immergée dans différents rapports v/v CH₃CN/PB

Pour effectuer l'inclusion des espèces redox solubles en milieu aqueux (ABTS, PLQ), seul le tampon PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) a été utilisé. Les médiateurs redox peu solubles dans le tampon aqueux (PQ, 1,4-NQ, 1,2-NQ), comme il a été dit précédemment, ont donc été dissouts dans un mélange de 10% v/v de CH₃CN/PB. L'adsorption des composés redox a été suivie par voltampérométrie cyclique, voir les détails ensuite dans la partie 3.2.2.

3.2.2 Caractérisation électrochimique

La deuxième étape de fabrication des électrodes présentées dans ce chapitre consiste à adsorber le médiateur redox dans le volume du disque de CNTs par immersion de la pastille dans la solution aqueuse ou aqueuse/organique contenant ce dernier. Cette adsorption est suivie par voie électrochimique. Dans cette étape, des balayages en tension sont imposés à l'électrode dans le domaine de potentiel du couple redox utilisé. Ces cycles alternent avec des périodes d'incubation de 30 minutes jusqu'à obtenir, après une augmentation continue de l'intensité des courants de pics, une stabilisation de ces derniers (la saturation).

De manière intéressante, et comme la montre la figure 3.4 sur l'exemple du suivi d'adsorption de l'ABTS, sa présence dans les pastilles de CNTs est non seulement responsable de l'augmentation du courant faradique mais aussi de celle du courant capacitif. L'augmentation de la contribution faradique est liée à l'adsorption continue de l'espèce redox. Le courant capacitif plus important suggère une inclusion régulière de l'électrolyte à l'intérieur de la pastille et favorisée par l'incorporation continue de l'espèce redox dans le réseau de CNTs. Par conséquent, la densité de courant capacitif pour la pastille modifiée par l'ABTS a atteint $0,77 \pm 0,1 \text{ mA cm}^{-3}$. Cela, en lien avec les résultats évoqués pour les pastilles non fonctionnalisées vu en partie 3.1, correspondrait à un taux d'hydratation de la pastille de l'ordre de $\approx 9,6 \%$. Les figures 3.4 et 3.5 nous confirment qu'il est possible de faire pénétrer et d'immobiliser par adsorption l'ensemble des sondes redox évaluées par la méthode proposée avant d'entreprendre sa modification par une enzyme d'intérêt. Grâce à cette nouvelle approche de fabrication d'électrode, nous avons pu évaluer toute une série de combinaison médiateur redox/enzyme y compris celles qui montraient jusqu'alors de fortes instabilités par la méthode de compression classique « one-pot » (décrite dans le chapitre 2) comme le p₂-ABTS ou la PLQ.

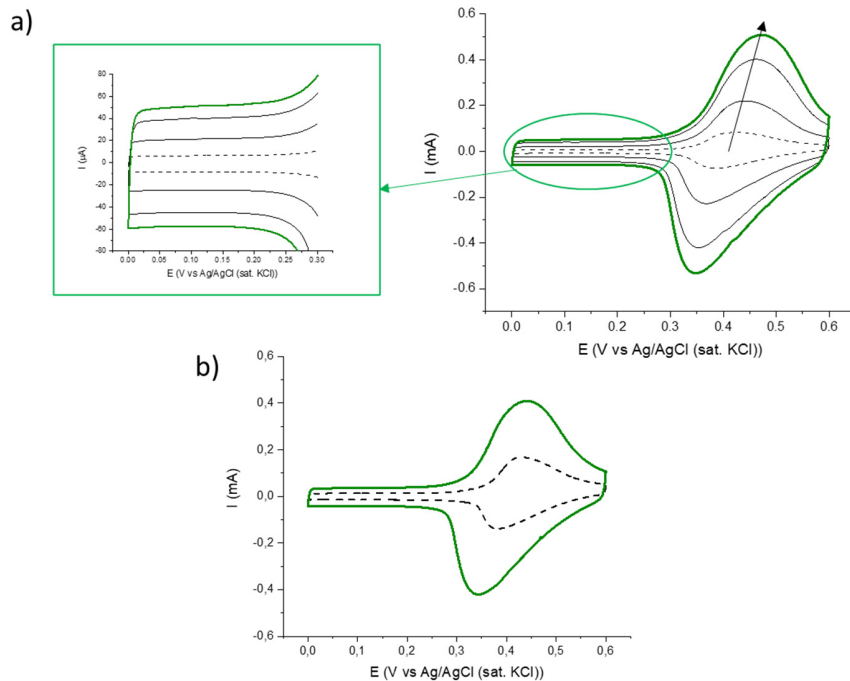


Figure 3.4 : Voltampérogrammes cycliques de pastille CNTs enregistrés dans une solution à : a) - 2 mmol L^{-1} d'ABTS à $t=0 \text{ min}$ (ligne pointillée), $t= 60$ et 120 min (lignes noires) et $t= 180 \text{ min}$ (ligne verte). Conditions expérimentales : à 5 mV s^{-1} dans $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB (pH 7,4). La flèche montre l'augmentation du courant faradique en fonction de l'augmentation de la durée d'adsorption ; b) - 2 mmol L^{-1} de p_2 -ABTS dans $10\% \text{ v/v}$ de $\text{CH}_3\text{CN/PB}$ à $t=0 \text{ min}$ (ligne pointillée) et $t= 180 \text{ min}$ (ligne solide épaisse) à 5 mV s^{-1}

Sur le voltampérogramme qui présente la fonctionnalisation par la PLQ (Figure 3.5, a) deux systèmes quasi-réversibles mais mal définis sont observés ($\Delta E_{p, \text{PLQ1}} = 78 \text{ mV}$, $\Delta E_{p, \text{PLQ2}} = 148 \text{ mV}$) après avoir atteint la limite d'adsorption. Ce phénomène pourrait être attribué au « schéma carré », où l'inter-conversion entre la forme oxydée et la forme réduite de la quinone se passe en 4 étapes successives à 2 électrons et 2 protons. Nous n'avons pas cherché à caractériser plus en détail l'allure de ce voltampérogramme car ce signal complexe évolue dans le temps. En effet, après immersion dans une solution tampon exempte de PLQ, un seul signal redox quasi-réversible ($\Delta E_{p, \text{PLQ}} = 170 \text{ mV}$) avec un potentiel redox apparent de $E^{\circ'} = -150 \text{ mV}$ (voir plus bas) est visible. Pour les autres quinones, PQ, 1,4-NQ et 1,2-NQ, la fin de l'adsorption au sein d'électrode est marquée par l'obtention d'un unique pic quasi-réversible ($\Delta E_{p, \text{PQ}} = 103 \text{ mV}$, $\Delta E_{p, 1,4\text{-NQ}} = 199 \text{ mV}$ et $\Delta E_{p, 1,2\text{-NQ}} = 213 \text{ mV}$) (Figure 3.5, b-d).

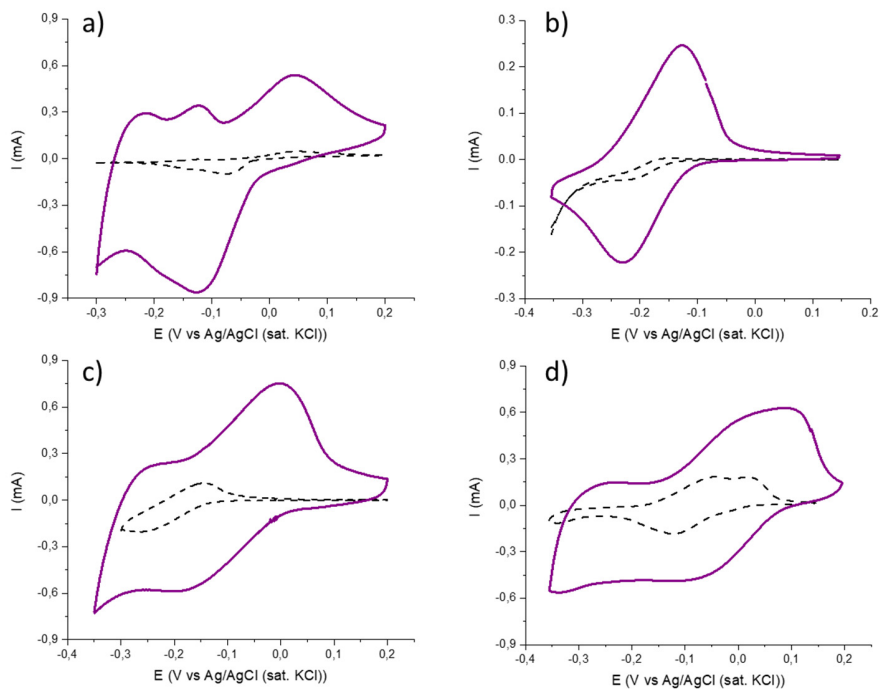


Figure 3.5 : Voltampérogrammes cycliques de pastille CNTs enregistrés dans 2 mmol L^{-1} de : a) PLQ dans $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB (pH 7,4) ; b) PQ, c) 1,4-NQ et d) 1,2-NQ dans 10% v/v de $\text{CH}_3\text{CN/PB}$ à $t=0 \text{ min}$ (ligne pointillée) et $t= 180 \text{ min}$ (ligne pleine) à 5 mV s^{-1}

Il est à noter que la même tendance d'hydratation par l'électrolyte a été observée pour toutes les espèces redox évaluées (sauf PQ) dans cette étude (Figures 3.4 et 3.5). L'hydratation, mesurée à partir du courant capacitif, est donc globalement de 10 % pour l'ensemble des mesures réalisées. Afin de comprendre l'origine de l'inclusion de l'électrolyte dans les électrodes cylindriques, une étude complémentaire a été effectuée dans le but d'évaluer l'influence de la présence de solvant organique dans l'électrolyte sur le gonflement des pastilles (et donc réciproquement sur l'augmentation de leur porosité). Pour cela, des pastilles en CNTs non fonctionnalisées ont été immergées dans un mélange de solution organique et solution aqueuse (10 % $\text{CH}_3\text{CN/PB}$) sans aucune présence du médiateur. Ces électrodes ont subi des polarisations par voltampérométrie cyclique sur la même gamme de potentiel que celles en présence de sonde redox (Figure 3.6). Contre toute attente, nous n'avons pas constaté de modification entre les tests en présence ou en absence de CH_3CN dans l'électrolyte. Le solvant organique ne favorise pas l'hydratation de la pastille en CNTs. En effet, après un temps d'immersion de 90 minutes, l'augmentation du courant capacitif restait négligeable ($\Delta I_{dc} = 0,6 \mu\text{A}$ tandis que $\Delta I_{dc} = 60 \mu\text{A}$ en présence de médiateurs redox).

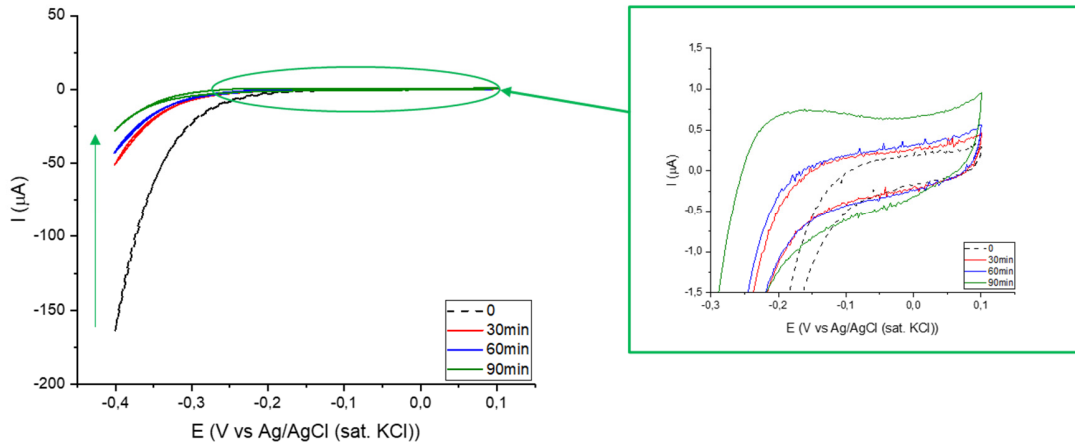


Figure 3.6 : Voltampérogrammes cycliques de la pastille CNTs enregistrée dans 10% v/v de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{PB}$ à $t=0$ min (ligne pointillée) et $t=30-90$ min (ligne solide épaisse) à 5 mV s^{-1}

Pour évaluer la quantité de médiateurs redox adsorbés au sein de la matrice de CNTs des électrodes fonctionnalisées, une immersion prolongée dans une solution exempte d'espèces redox pendant 24 à 48h a été conduite. Cela a permis le relargage des espèces faiblement adsorbées qui n'avaient pas pu être enlevées par simple rinçage des électrodes. Les voltampérogrammes ont montré les pics caractéristiques des espèces électroactives confirmant l'efficacité relativement bonne de l'approche pour la fonctionnalisation des pastilles (Figures 3.7 et 3.8).

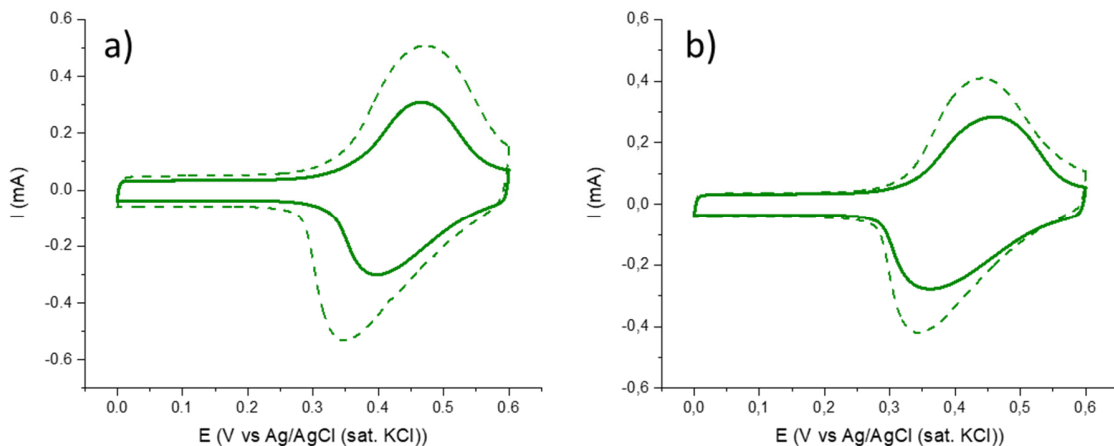


Figure 3.7 : Voltampérogrammes cycliques de pastilles CNTs fonctionnalisées enregistrés dans une solution redox à $t=180$ min (linge pointillée) et après 48 h d'échange dans $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB (pH 7,4) et passage dans une nouvelle solution de PB à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) (ligne pleine) pour : a) ABTS et b) p_2 -ABTS. Conditions expérimentales : 5 mV s^{-1} .

La figure 3.7, a représente l'évolution de l'adsorption d'ABTS dans une pastille de CNTs. On peut constater qu'après une immersion de 48 h dans une solution tampon, 60% d'espèce redox est toujours adsorbés au sein de l'électrode. Concernant le p_2 -ABTS, on peut dire que

presque 70 % est adsorbé sur l'électrode (Figure 3.7, b). Une petite amélioration d'adsorption entre ABTS et p₂-ABTS pourra être dû à la présence des fonctionnalités « -pyrène » qui améliorent l'adsorption du p₂-ABTS sur la surface des CNTs par interactions π - π .

La suite de la caractérisation électrochimique des pastilles a concerné les médiateurs redox anodiques situés à bas potentiel. Il faut remarquer que les deux couples redox initialement visibles dans les voltampérogrammes de la PLQ évoqués précédemment ont disparu au profit d'un seul signal redox (Figure 3.5, a), après avoir placé l'électrode fonctionnalisée dans une solution tampon exempte de quinone pendant 24h (Figure 3.8, a). On peut donc supposer qu'il y a eu une modification du mécanisme de transfert d'électron pour ce médiateur en lien avec son adsorption sur la surface des CNTs (par opposition à sa forme libre en solution).

Les autres quinones sont bien adsorbées sur la surface des électrodes et au sein de la pastille elle-même, comme l'indique les voltampérogrammes cycliques (Figure 3.8, b-d).

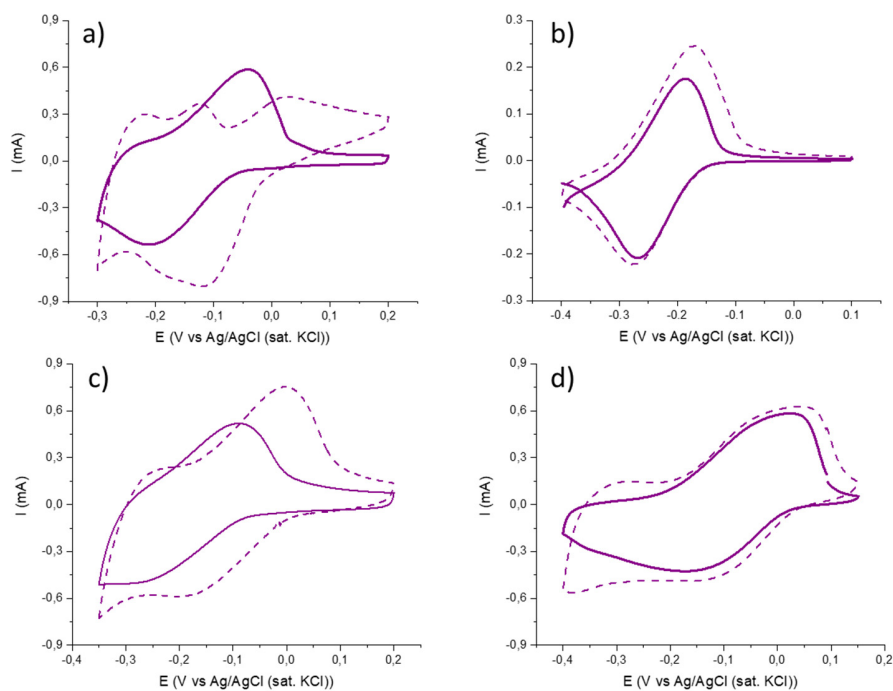


Figure 3.8 : Voltampérogrammes cycliques de pastilles CNTs fonctionnalisées enregistrés dans une solution redox à $t=180$ min (ligne pointillée) et après 24 à 48 h d'échange dans $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB (pH 7,4) et passage dans une nouvelle solution de PB à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) (ligne pleine) pour : a) PLQ, b) PQ, c) 1,4-NQ et d) 1,2-NQ. Conditions expérimentales : 5 mV s^{-1} .

La stabilité de l'immobilisation des médiateurs redox à l'intérieur des électrodes en fonction du temps d'immersion été étudiée. Après la préparation d'électrodes et leur fonctionnalisation, la caractérisation électrochimique par voltampérométrie cyclique était répétée régulièrement. Les mesures par CV ont été effectuées dans des solutions exemptes d'espèce

électroactive afin d'avoir un aperçu de la stabilité de la couche redox adsorbée dans les pastilles précédentes (Figure 3.9). Les résultats montrent trois comportements de stabilité différents qui ne sont pas spécifiquement corrélés à la solubilité des médiateurs redox connus.

La PLQ et la 1,4-NQ étaient les composés les moins stables car seulement 35 % des signaux ont été mesurés après 5 jours d'immersion dans le tampon PB. Après 15 jours, cette valeur est passée en dessous de 20 % (Figure 3.9, ligne verte).

De manière intéressante, il apparaît que dans ce montage expérimental, la présence de groupements pyrène chez le p₂-ABTS ne conduisait pas à une augmentation significative de la stabilité par rapport au précurseur ABTS pour de longue période d'immersion. En effet, après 5 jours, les signaux redox ont chuté à 43 % de leur valeur initiale pour les deux composés, mais sont restés stables pendant les 15 jours suivants (Figure 3.9, ligne bleue).

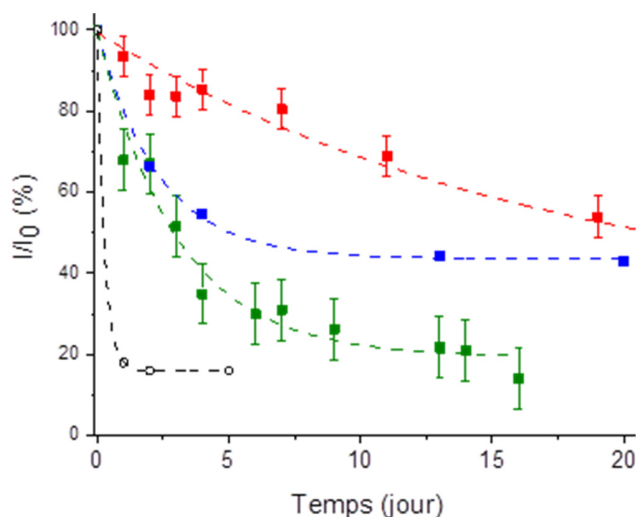


Figure 3.9 : Courant résiduel (I/I_0) extrait des courants anodiques et cathodiques de pointe des balayages CV à (5 mV s^{-1}) pour ABTS et p₂-ABTS (ligne bleue), PLQ et 1,4-NQ (ligne verte), PQ et 1,2-NQ (ligne rouge) et TEMPO (ligne noire) en fonction de la durée de stockage (en tirets, les courbes d'ajustement d'une fonction de décroissance exponentielle).

Au cours des tests de stabilité, les sondes redox les plus stables se sont avérées être la PQ et la 1,2-NQ, avec des signaux encore supérieurs à 80 % et 50 % de leurs valeurs initiales au jour 5 et 20, respectivement (Figure 3.9, ligne rouge).

Cependant, il convient tout de même de mentionner que les six médiateurs redox qui portent tous des groupes aromatiques ont clairement montré une meilleure stabilité par rapport à une espèce non aromatique (TEMPO) qui a perdu 82 % de son signal initial après seulement 24 h d'immersion dans une solution tampon (Figure 3.9, ligne noire).

3.3 Electrodes fonctionnalisées par médiateurs avec enzymes

Sur la base de résultats précédents, des électrodes sous forme de pastilles nouvellement fonctionnalisées ont été modifiées avec différentes oxydoréductases afin d'évaluer leur capacité à

obtenir et entretenir des courants électrocatalytiques. C'est la dernière étape d'approche proposée dans ce chapitre. La BOx a été immobilisée sur les pastilles contenant l'ABTS et p₂-ABTS tandis que la GOx ou la FAD-GDH ont été immobilisées sur des pastilles fonctionnalisées par les quinones, respectivement.

3.3.1 Bioélectrodes pour la réduction de O₂

La figure 3.10 illustre les performances des biocathodes conçues pour la réduction du dioxygène. En présence d'un barbotage de d'oxygène, les voltampérogrammes ont montré la réduction électrocatalytique efficace de O₂ par la BOx seule *via* le mécanisme de DET et par la BOx avec l'ABTS ou le bis-pyrène-ABTS *via* le mécanisme de MET.

La cathode à base de BOx seule (c'est-à-dire sans la couche de médiateur redox dans le réseau de CNTs) a donné un courant de réduction de l'oxygène extrêmement limité provenant de la connexion directe de l'enzyme sur les nanotubes de carbone ($-5 \mu\text{A cm}^{-3}$). Ce constat confirme que le courant enregistré aux électrodes avec les dérivées d'ABTS provenait plus exclusivement grâce au mécanisme MET. Ceci confirme également que la surface des pastilles non modifiées est trop hydrophobe pour permettre l'adsorption de la BOx.

La forme sigmoïdale des courbes obtenues sous catalyse est un indicateur du transport de masse rapide des substrats dans les électrodes tridimensionnelles. La densité de courant électrocatalytique rapportée au volume total de l'électrode ($j_{v,cat}$) a atteint 12,58 et 10,52 mA cm⁻³ à 0,2 V pour les biocathodes avec ABTS et p₂-ABTS, respectivement. Les performances électrocatalytiques semblent donc similaires quel que soit le dérivé ABTS utilisé.

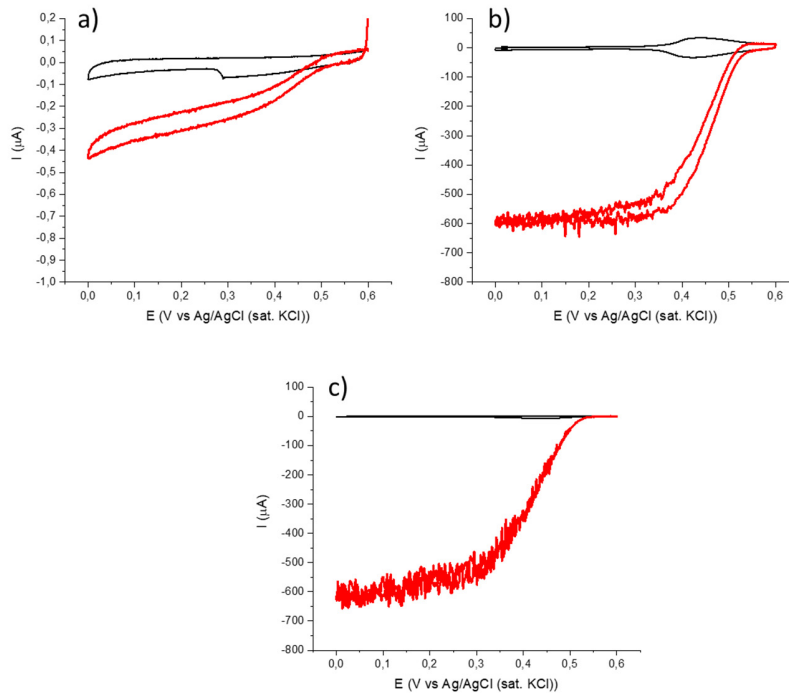


Figure 3.10 : Voltampérogrammes cycliques représentatifs pour les biopastilles modifiées par BOx en présence d'Ar (lignes noires) et sous barbotage de O_2 (lignes rouges). a) Pastille non fonctionnalisée, b) pastille fonctionnalisée par ABTS et c) fonctionnalisation par p_2 -ABTS. Conditions expérimentales : $0,5 \text{ mV s}^{-1}$, dans $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB, pH 7,4

3.3.2 Bioélectrodes pour l'oxydation du glucose

Pour les bioanodes, nous avons réussi à fabriquer et à tester les bioélectrodes contenant les quinones comme médiateurs et la GOx ou la FAD-GDH comme enzyme. Hors résultat électrochimique, cela représente une nette amélioration dans la préparation des bioélectrodes compressées puisque des pastilles similaires obtenues par fabrication « one-pot » ne sont pas stables mécaniquement.

En présence de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de glucose, aucune des bioélectrodes modifiées par la GOx n'a montré la forme sigmoïdale typique d'un phénomène catalytique efficace. Seule les électrodes fonctionnalisées par la PLQ affichaient un courant electrocatalytique non négligeable de l'ordre de $0,49 \text{ mA cm}^{-3}$. On remarque que les CV pour PQ et 1,4-NQ possèdent toujours une forme en « canard », ce qui indique l'absence d'échange électronique entre la GOx et les médiateurs redox connus même en présence de glucose. Ces résultats sont à contraster avec les bioélectrodes modifiées par la FAD-GDH, seconde enzyme catalysant toujours l'oxydation du glucose. En effet, les quatre différentes quinones agissaient comme des navettes redox entre le centre actif FAD de l'enzyme et le matériau d'électrodes, permettant ainsi d'observer facilement l'oxydation electrocatalytique du glucose par l'enzyme (Figure 3.11 et 3.12). Les courants catalytiques obtenus pour les bioélectrodes étaient compris entre $0,84$ et $11,76 \text{ mA cm}^{-3}$. L'efficacité du MET

n'était pas directement liée au potentiel redox apparent des médiateurs quinones (E°). D'un point de vue purement thermodynamique, on s'attend à ce que plus la force électromotrice entre le cofacteur FAD de l'enzyme et le médiateur redox (ΔE) est grande, plus l'électrocatalyse suivant le mécanisme MET est efficace. En effet, cela n'était pas vérifié pour la PLQ par rapport à la 1,4-NQ ($E^{\circ}_{1,4-NQ} < E^{\circ}_{PLQ}$ mais $j_{max\ 1,4-NQ} > j_{max\ PLQ}$). De plus, le taux de recouvrement des quinones ne pouvait pas expliquer entièrement les courants électrocatalytiques enregistrés sous oxydation. En comparant deux médiateurs redox partageant approximativement le même E° et le même taux de recouvrement, par exemple, PQ et 1,4-NQ (Γ_{PQ} étant 1,4 fois plus faible que $\Gamma_{1,4-NQ}$), la réponse électrocatalytique était beaucoup plus faible pour le cas de PQ ($j_{cat} = 0,84\ \text{mA cm}^{-3}$) que pour les électrodes modifiées par la 1,4-NQ ($j_{cat} = 11,31\ \text{mA cm}^{-3}$), ce qui représente une différence d'un facteur 13. Ceci montre que la thermodynamique (ΔE) n'est pas suffisante pour prédire les propriétés électrocatalytiques d'un médiateur. Par conséquent, la structure des médiateurs redox a également un impact important sur la réponse électrocatalytique.

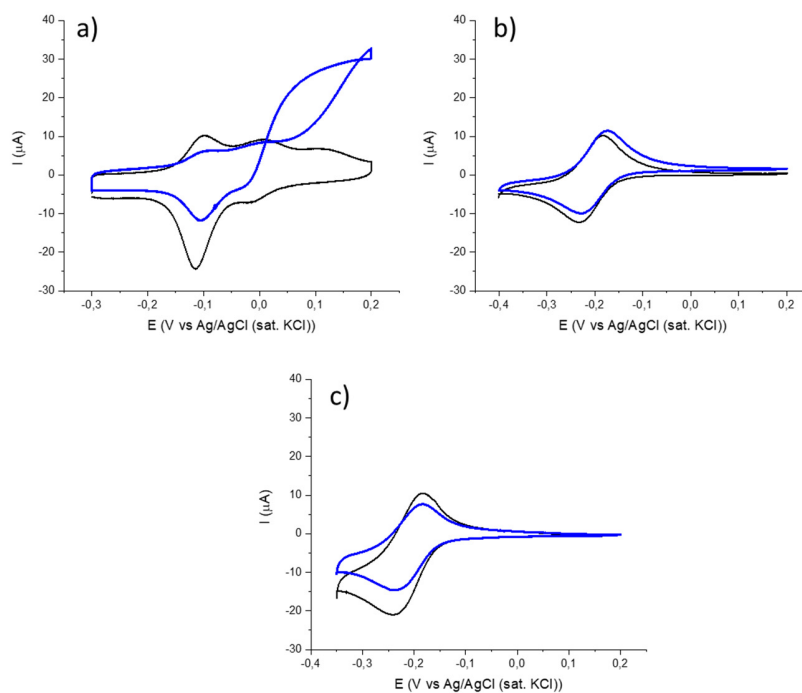


Figure 3.11 : Voltampérogrammes cycliques représentatifs pour les biopastilles fonctionnalisées par a) PLQ, b) PQ et c) 1,4-NQ et modifiées par la GOx en absence de glucose (lignes noires) et en présence de glucose à $0,15\ \text{mol L}^{-1}$ (lignes bleues). Conditions expérimentales : $0,5\ \text{mV s}^{-1}$, $0,1\ \text{mol L}^{-1}$ de PB, pH 7,4.

Les bioanodes à base de la GOx n'ont pas donné de résultats satisfaisants pour tous les candidats quinones (Figure 3.11). D'autre part, les bioanodes à base de la FAD-GDH ont montré des capacités intéressantes pour l'oxydation du glucose sans forte limitation de diffusion par rapport aux bioanodes à base de la GOx (Figure 3.12).

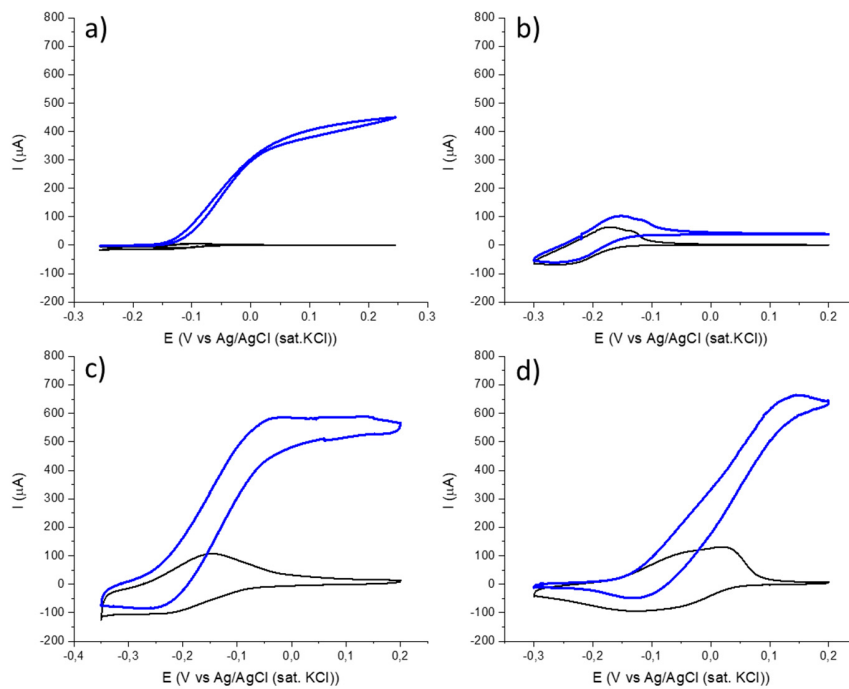


Figure 3.12 ; Voltampérogrammes cycliques représentatifs pour les biopastilles fonctionnalisées par a) PLQ, b) PQ, c) 1,4-NQ et d) 1,2-NQ et modifiées par la FAD-GDH sans glucose (lignes noires) et en présence de glucose à $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ (lignes bleues). Conditions expérimentales : $0,5 \text{ mV s}^{-1}$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PB, pH 7,4.

Sur la base des poids moléculaires des enzymes, de leur cofacteur FAD commun et des différents rapports trouvés dans la littérature, ces résultats confirment que la structure globulaire relativement plus importante de la GOx (160 kDa) a un impact négatif sur ses capacités à assurer un transfert d'électron avec des espèces adsorbées à la surface d'une électrode, contrairement à la FAD-GDH (130 kDa) [13], [14].

Pour résumer, un tableau comparatif des électrodes faites par la compression « one-pot » et par la nouvelle méthode présentée dans ce chapitre est donné (Tableau 3.1). Dans ce tableau les valeurs de densité de courant $j_{v,cat}$ (mA cm^{-3}) des biocathodes et bioanodes de deux types sont présentées.

Tableau 3.1 : Résumé de la densité de courant electrocatalytique $j_{v,cat}$ enregistrée pour différentes biopastilles à base de BOx ou de FAD-GDH obtenues dans ce travail et la comparaison avec l'approche « one-pot » obtenue au chapitre 2. Les concentrations des substrats spécifiques étaient $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de O_2 (saturé) et $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de glucose pour l'évaluation des biocathodes et des bioanodes respectivement.

Type d'électrodes	Pastille post-fonctionnalisée	Pastille "One-pot" ^[11]	
Biocathode	Potentiel "Onset" (mV)	$j_{v,cat}$ @ 0.2 V (mA cm^{-3})	
ABTS/BOx	548	-12,61	Pas stable
p ₂ ABTS /BOx	560	-10,50	Pas stable
BOx	521	-0,006	-14,12
Bioanode		J_{cat} @ 0.1 V (mA cm^{-3})	
PLQ/FAD-GDH	-189	8,00	Pas stable
PQ/ FAD-GDH	-220	0,84	44,56
1,4-NQ/ FAD-GDH	-277	11,31	32,78
1,2-NQ/ FAD-GDH	-146	6,22	7,78

Nous avons effectué une étude de la stabilité des biocathodes et des bioanodes les plus performantes (Figure 3.13, lignes noires). Les critères de choix des médiateurs redox étaient basés sur la prise en compte du potentiel de début d'électrocatalyse pour l'ORR ou pour l'oxydation du glucose et des densités de courant maximales. Nous avons donc choisi le p₂-ABTS et la 1,4-NQ comme médiateur redox pour la BOx et la FAD-GDH respectivement. Les mesures de chronoampérométrie ont été réalisées pendant 3 heures de fonctionnement continu à des potentiels de 0,2 V et 0,1 V pour les biopastilles avec p₂-ABTS/BOx et 1,4-NQ/FAD-GDH, respectivement. Les concentrations en substrats étaient en quantité saturante pour les enzymes. Pendant le premier jour d'opération, les biocathodes p₂-ABTS /BOx ont montré un fort signal electrocatalytique de $-12,94 \pm 1,66 \text{ mA cm}^{-3}$ en condition de barbotage de O_2 , ce qui est en accord avec la valeur trouvée par mesures faites en CV avec des vitesses de balayage lentes. Cependant, plus de 95 % du signal catalytique a disparu après trois jours d'immersion continue dans l'électrolyte. Les biopastilles 1,4-NQ/FAD-GDH ont donné une densité de courant stable de $1,053 \pm 0,010 \text{ mA cm}^{-2}$ ($5,84 \pm 0,06 \text{ mA cm}^{-3}$) en présence de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de glucose (après un pic de densité de courant atteignant $1,725 \pm 0,010 \text{ mA cm}^{-2}$ ($9,57 \pm 0,06 \text{ mA cm}^{-3}$) lors de l'injection de glucose). Les bioanodes sont plus stables dans le temps que les biocathodes. Après 3 et 6 jours, les bioanodes présentaient encore 34 % et 15 % de leur courant electrocatalytique initial à la même concentration de glucose. Ces électrodes ont perdu 95 % de leurs performances après 10 jours.

Afin de régénérer l'activité catalytique de nos architectures, les bioélectrodes ont été soumises à un nouveau processus d'incubation dans un électrolyte contenant des enzymes BOx ou FAD-GDH (Figure 3.13, lignes rouge et bleue, respectivement). Les biocathodes ont récupéré

jusqu'à 40 % de leurs propriétés électrocatalytiques initiales. Inversement, les bioanodes n'ont montré aucun nouveau signal de catalyse. Ces résultats tendent à démontrer que l'adsorption des enzymes dans la matrice de la pastille dépend fortement de la taille des protéines redox. En se basant sur les poids moléculaires des enzymes, la BOx est deux fois plus petite que la FAD-GDH (68 kDa vs. 130 kDa respectivement). On peut donc faire l'hypothèse que la BOx peut pénétrer plus facilement dans le réseau de CNTs mais qu'elle est aussi plus certainement prompte à être lessivée par désorption naturelle (perte d'activité complète en seulement 2 jours et nouvelle activité après incubation). Au contraire, la FAD-GDH, plus volumineuse, est plus facilement emprisonnée dans le réseau de CNTs compressés, ce qui conduit à une perte d'activité plus lente (perte complète d'activité au bout de 10 jours et aucune nouvelle activité après incubation). Par conséquent, il semble que les protéines volumineuses dénaturées restent dans l'échafaudage de CNTs et empêchent l'adsorption de nouvelles protéines actives.

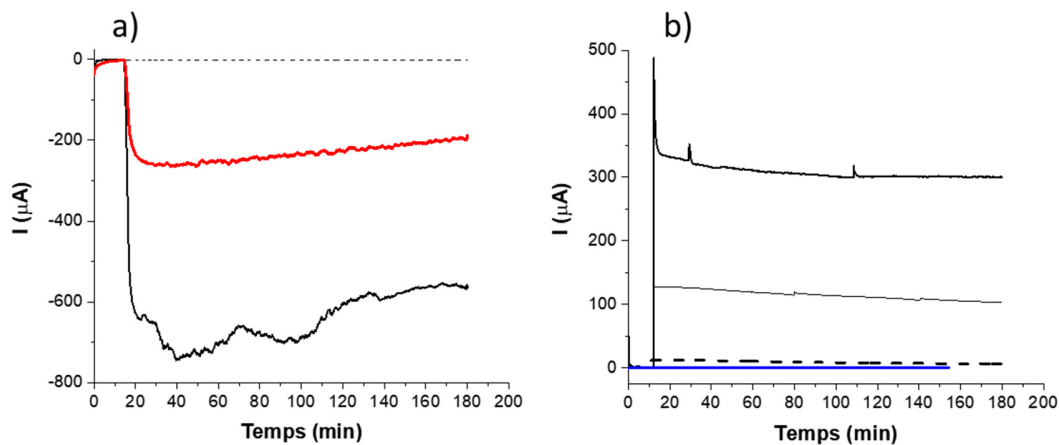


Figure 3.13 : Chronoampérommes représentatifs pour les biopastilles a) BOx/p₂-ABTS en présence d'un barbotage de O₂ et b) FAD-GDH/1,4-NQ en présence de 0,15 mol L⁻¹ de glucose, enregistrés dans 0,1 mol L⁻¹ de PB (pH = 7,4) à 0,2 V et 0,1 V respectivement ; au jour 0 – ligne noire pleine, au jour 2 et au jour 10 lorsque I_{cat} < 5% pour a) et b) respectivement - noire pointillée. Nouvelle incubation dans une solution enzymatique de 1 mg mL⁻¹ – ligne rouge (cathode) et bleue (anode).

Enfin, nous avons effectué une enquête approfondie sur les performances des biopastilles précédentes trouvées dans la littérature afin d'obtenir une comparaison valable avec notre travail (Tableau 3.2). Pour ce faire, nous avons pris en compte les données disponibles à partir des mesures de demi-piles obtenues par voltampérométrie cyclique à un potentiel identique (*note* : toutes les expériences n'ont pas été réalisées à la même vitesse de balayage. Lorsque cela n'était pas applicable, nous avons utilisé les données fournies par les mesures ampérométriques à un potentiel donné.) Pour établir cette comparaison, les paramètres expérimentaux tels que le matériau de carbone, les médiateurs redox, les enzymes et leurs masses respectives, la surface, l'épaisseur et le courant électrocatalytique en condition de saturation en O₂ ou en présence de 0,15 mol L⁻¹ de glucose ont été extraits. Il apparaît que l'utilisation de cette nouvelle configuration est bien adaptée pour obtenir des bioélectrodes efficaces. Cela est confirmé par les valeurs élevées de J_v (>10 mA cm⁻³). Il est également remarquable de comparer la valeur du

courant en fonction de la quantité de biocatalyseur utilisée lors de la procédure de fabrication indiqué ici grâce au rapport $|j_v/m_{enzyme}|$. Cette valeur démontre clairement que notre nouvelle conception de fabrication des biopastilles médiées est la procédure la plus efficace tout en minimisant la quantité d'enzymes redox utilisées. Pour les électrodes à base de graphite, cette valeur était de $0,48 \pm 0,28 \text{ mA cm}^{-3} \text{ mg}^{-1}$.

Ce rapport n'avait finalement pas évolué lorsque le matériau carboné a été remplacé par des CNTs $0,43 \pm 0,31 \text{ mA cm}^{-3} \text{ mg}^{-1}$. L'amélioration nette du rapport $|j_v/m_{enzyme}|$ a été obtenue lorsque la FAD-GDH a été introduit pour la première fois dans les pastilles ($3,05 \pm 0,92 \text{ mA cm}^{-3} \text{ mg}^{-1}$) pour remplacer l'enzyme oxydante la GOx. Enfin, avec la procédure d'adsorption, nous avons pu améliorer le $|j_v/m_{enzyme}|$ à $10,84 \pm 1,56 \text{ mA cm}^{-3} \text{ mg}^{-1}$ en considérant les bioélectrodes les plus efficaces (*note 1*: les bioanodes à base de PQ et les biocathodes de type DET ont été écartées pour le calcul, *note 2*: la quantité d'enzyme (en mg) fait référence à la quantité totale utilisée pendant la fabrication des biopastilles et ne reflète pas la quantité immobilisée de biocatalyseur.).

Tableau 3.2 : Résumé des biopastilles réalisées au laboratoire avec divers médiateurs redox et protéines (les biopastilles de type DET n'ont pas de médiateurs redox). Les courants sont donnés à 0,2 V et 0,1 V vs SCE pour les biocathodes et les bioanodes respectivement, sauf indication contraire.

Type de matériaux carboné	Médiateur	Enzyme (m_{enzyme} (mg))	S (cm ²)	Épaisseur (cm)	I (mA)	j_{cat} (mA cm ⁻²)	$j_{v,cat}$ (mA cm ⁻³)	$ j_{v,cat}/m_{enzyme} $ (mA cm ⁻³ mg ⁻¹)	Reference
Graphite	TTF	PPO (5)	0,196	0,2	-0,151	-0,77	-3,85	0,77	[2]
Graphite	PQ	GOx (13)			0,191	0,97	4,86	0,37	
Graphite	ABTS	Laccase (20)	1,327	0,15	-3,72	-2,80	-14,0	0,70	[15]
Graphite	Fc	GOx (20)			0,400	0,30	1,50	0,08	
MWCNT	-	Laccase (50)	1,327	0,3	-7,70	-5,80	-19,3	0,39	[4] a
MWCNT	-	GOx (50)			6,37	4,80	16,0	0,32	
MWCNT	-	PPO (5)	0,196	0,1	-0,11	-0,56	-5,61	1,12	[3]
MWCNT	-	Laccase (15)	0,196	0,4	-0,650	-3,31	-8,28	0,55	[7] b
MWCNT	1,4-NQ	GOx (15)			0,565	2,88	7,19	0,48	
MWCNT	-	Laccase (15)	0,950	0,2	-0,237	-0,25	-1,25	0,08	[8]
f-MWCNT	-	BOx (15)	1,327	0,2	-1,81	-1,36	-6,82	0,45	[10]
MWCNT	1,4-NQ	GOx (15)			0,128	0,096	0,482	0,03	
MWCNT	-	BOx (7.5)	0,283	0,18	-0,662	-2,34	-13,0	1,73	[11]
MWCNT	1,4-NQ	FAD GDH (7.5)			1,67	5,91	32,8	4,38	
MWCNT	ABTS	BOx (1)	0,283	0,18	-0,640	-2,27	-12,59	12,59	Ce travail
MWCNT	p2-ABTS	BOx (1)			-0,536	-1,90	-10,52	10,52	
MWCNT	-	BOx (1)			-0,0003	-0,001	-0,005	0,005	
MWCNT	PLQ	FAD GDH (1)			0,408	1,44	8,02	8,02	
MWCNT	PQ	FAD GDH (1)			0,043	0,15	0,84	0,84	
MWCNT	1,4-NQ	FAD GDH (1)			0,576	2,04	11,31	11,31	
MWCNT	1,2-NQ	FAD GDH (1)			0,600	2,12	11,78	11,78	

a: valeurs extraites à partir de mesure de chronoampérométrie à 0,0 V, b: valeurs extraites à partir de mesure de chronoampérométrie à 0,3 V

Conclusion

Ce chapitre est le prolongement de nos recherches décrites dans le chapitre 2. Dans le chapitre précédent, bien que la méthode de fabrication des électrodes par compression « one-pot » soit simple et rapide, nous avons constaté qu'un nombre limité de pastilles ou biopastilles pouvaient être obtenues. En effet, un certain nombre de combinaison matériau carboné/médiateur, matériau carboné/protéine ou matériau carboné /médiateur/protéine conduisaient à des électrodes mécaniquement instables.

La nouvelle approche menée dans ce chapitre 3 repose sur trois étapes de conception qui reprend les étapes de fonctionnalisation et modification traditionnelles faites sur les films fins de nanotubes de carbone déposés sur carbone vitreux. Brièvement, cela consiste à former dans un premier temps la matrice de l'électrode à base des seuls CNTs (pastilles). Ces pastilles sont ensuite fonctionnalisées avec des espèces électroactives toutes connues pour jouer le rôle de médiateurs redox avec des enzymes spécifiques. Finalement, les électrodes fonctionnalisées sont modifiées par des protéines redox.

Dans la première partie du chapitre, nous avons procédé à la caractérisation des pastilles en CNTs par l'acquisition d'image en MEB et en électrochimie. La compression des CNTs conduit à la formation d'amas de CNTs au niveau du disque décrit par la pastille tandis que l'imagerie des parois indique la présence de strates de CNTs. Cette configuration nous oblige à recouvrir les parois de pâte de carbone et silicone pour une meilleure tenue mécanique. Lors des tests effectués en électrochimie, nous avons pu mettre en évidence ces observations par la mesure du courant capacitif issu de double couche électrochimique présente à la surface des électrodes. Nous avons constaté que le courant capacitif mesuré pour une pastille est négligeable ($0,945 \mu\text{A}$) en comparaison d'un film mince déposé sur une surface de carbone vitreux ($5,7 \mu\text{A}$). Ce résultat implique donc qu'une infime fraction de la pastille est réellement en contact avec l'électrolyte.

La deuxième partie de ce chapitre s'est consacrée à la fonctionnalisation de pastilles en CNTs par différentes entités redox (dérivés ABTS et quinones). Ici, l'immobilisation des six espèces utilisées était possible ce qui n'était pas le cas pour le procédé « one-pot » en absence de protéine. L'inclusion des espèces redox a été suivi par voltampérométrie cyclique à intervalle de temps réguliers. Nous avons pu constater que non seulement le courant faradique augmentait avec le temps (signe de l'adsorption progressive des sondes redox) mais que le courant capacitif connaissait lui aussi une augmentation. Ce dernier point indiquait donc une pénétration de l'électrolyte à l'intérieur même de la matrice de CNTs constituant la pastille. En comparant nos résultats avec ceux obtenus sur films fins de CNTs, nous avons estimé une hydratation de l'ordre de 10 % des pastilles lorsque l'adsorption maximale en espèce électroactive était accomplie. Nous avons également procédé au suivi des stabilités de ces couches redox. Contre toute attente, la stabilité de celles-ci n'était pas corrélée à la solubilité des différents médiateurs redox.

La troisième partie s'est portée sur l'étude de réactions électrocatalytiques conduites après modification des pastilles redox obtenues précédemment par des enzymes redox. La fabrication des biocathodes et des bioanodes a été réalisée en utilisant la bilirubine oxydase ou la FAD-glucose déshydrogénase pour la réduction de O₂ et l'oxydation du glucose respectivement. Pour les biocathodes, la BOx étant connue pour assurer un transfert direct d'électron, une biopastille ne contenant pas de dérivé ABTS a également été conçue. En lien avec la deuxième partie, le courant électrocatalytique de la réduction de O₂ était négligeable. En effet, le caractère hydrophobe des pastilles ne permet pas l'adsorption efficace de l'enzyme sur la surface de l'électrode. Dans les autres configurations, les espèces redox ont bien contribué au transfert médié des électrodes entre les centres actifs des enzymes et des CNTs. En effet, les courbes obtenues par voltampérométrie cyclique ont montré une évolution d'un signal classique d'une espèce redox adsorbée à des courbes sigmoïdales traduisant un phénomène électrocatalytique (la régénération enzymatique des médiateurs suivi de leur réduction ou oxydation électrochimique aux électrodes dans le cas des biocathodes et bioanodes respectivement). Ces bioélectrodes ont affiché des performances satisfaisantes avec des densités de courant proche de 2 mA cm⁻² pour les meilleures électrodes. En revanche, la stabilité des bioélectrodes reste un point critique à améliorer puisque les biocathodes et les bioanodes perdent 95 % de leurs activités après seulement deux et dix jours d'utilisation respectivement.

Enfin, dans la dernière partie, nous avons voulu établir une comparaison avec les multiples configurations de bioélectrodes obtenues par compression réalisées au laboratoire. En effet, les nombreux rapports bibliographiques diffèrent dans les matériaux carbonés, les médiateurs, les protéines et leurs masses, les surfaces géométriques des électrodes et leurs épaisseurs. Pour faciliter ces comparaisons, nous avons décidé de nous focaliser sur deux valeurs qui selon nous ont le plus de sens. Nous avons donc opté pour énoncer les densités de courant en fonction des volumes des électrodes ($j_{v,cat}$ en mA cm⁻³) et non pas de la surface géométrique décrite par celles-ci. Ainsi, cela permet de prendre en compte l'électrode dans sa globalité. Enfin, pour une plus grande finesse dans nos comparaisons, nous avons choisi d'exprimer les courants électrocatalytiques en fonction de la quantité de biocatalyseurs réellement utilisés lors de la fabrication des électrodes avec la grandeur ($|j_{v,cat}/m_{enzyme}|$ en mA cm⁻³ mg⁻¹). Grâce à cela, nous pouvons constater que nos électrodes offrent des performances bien supérieures en termes de rendement électrocatalytique avec bien souvent des courants d'un ordre de grandeur plus élevé que les bioélectrodes « one-pot » utilisant de grandes quantités d'enzyme.

En perspective, une nouvelle approche de fabrication des bioélectrodes compressées pourra être étudiée. Elle consistera en la fabrication des électrodes en CNTs avec l'enzyme par «one-pot» suivi de l'adsorption des médiateurs. Cette approche est intéressante à deux points de vue. Premièrement, cela permet d'assurer une meilleure immobilisation des enzymes dans le volume de l'électrode, en minimisant leur désorption comme dans le cas d'une monocouche à la surface. Un deuxième objectif serait de procurer un réservoir d'enzymes dans le volume d'électrode, qui pourront s'activer une fois les premières couches externes d'enzymes dénaturées.

Bibliographie

- [1] P. Cinquin *et al.*, “A glucose BioFuel cell implanted in Rats,” *PLoS One*, vol. 5, no. 5, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010476.
- [2] F. Giroud, C. Gondran, K. Gorgy, V. Vivier, and S. Cosnier, “An enzymatic biofuel cell based on electrically wired polyphenol oxidase and glucose oxidase operating under physiological conditions,” *Electrochim Acta*, vol. 85, pp. 278–282, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.electacta.2012.08.072.
- [3] B. Reuillard, A. le Goff, C. Agnès, A. Zebda, M. Holzinger, and S. Cosnier, “Direct electron transfer between tyrosinase and multi-walled carbon nanotubes for bioelectrocatalytic oxygen reduction,” *Electrochem commun*, vol. 20, no. 1, pp. 19–22, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.elecom.2012.03.045.
- [4] 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, 2011, doi: 10.1038/ncomms1365.
- [5] A. Zebda *et al.*, “Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices,” *Sci Rep*, vol. 3, pp. 1–5, 2013, doi: 10.1038/srep01516.
- [6] C. Agnès *et al.*, “Supercapacitor/biofuel cell hybrids based on wired enzymes on carbon nanotube matrices: Autonomous reloading after high power pulses in neutral buffered glucose solutions,” *Energy Environ Sci*, vol. 7, no. 6, pp. 1884–1888, 2014, doi: 10.1039/c3ee43986k.
- [7] B. Reuillard *et al.*, “High power enzymatic biofuel cell based on naphthoquinone-mediated oxidation of glucose by glucose oxidase in a carbon nanotube 3D matrix,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, no. 14, pp. 4892–4896, 2013, doi: 10.1039/c3cp50767j.
- [8] B. Reuillard *et al.*, “One-year stability for a glucose/oxygen biofuel cell combined with pH reactivation of the laccase/carbon nanotube biocathode,” *Bioelectrochemistry*, vol. 106, pp. 73–76, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.bioelechem.2015.04.009.
- [9] C. Abreu *et al.*, “Assembly and Stacking of Flow-through Enzymatic Bioelectrodes for High Power Glucose Fuel Cells,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 9, no. 28, pp. 23836–23842, Jul. 2017, doi: 10.1021/acsami.7b06717.
- [10] C. Abreu *et al.*, “Glucose oxidase bioanodes for glucose conversion and H₂O₂ production for horseradish peroxidase biocathodes in a flow through glucose biofuel cell design,” *J Power Sources*, vol. 392, no. April, pp. 176–180, 2018, doi: 10.1016/j.jpowsour.2018.04.104.
- [11] A. Berezovska, Y. Nedellec, F. Giroud, A. J. Gross, and S. Cosnier, “Freestanding biopellet electrodes based on carbon nanotubes and protein compression for direct and mediated bioelectrocatalysis,” *Electrochem commun*, vol. 122, p. 106895, 2021, doi: 10.1016/j.elecom.2020.106895.
- [12] A. J. Gross *et al.*, “A High Power Buckypaper Biofuel Cell: Exploiting 1,10-Phenanthroline-5,6-dione with FAD-Dependent Dehydrogenase for Catalytically-Powerful Glucose Oxidation,” *ACS Catal*, vol. 7, no. 7, pp. 4408–4416, Jul. 2017, doi: 10.1021/acscatal.7b00738.
- [13] H. Tsuge, O. Natsuaki, and K. Ohashi, “Purification, Properties, and Molecular Features of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*,” 1975.
- [14] Sekisui Diagnostics LLC., “Glucose Dehydrogenase FAD Dependent, Origin *Aspergillus sp.*,” 2017. [Online]. Available: www.sekisuienzymes.com
- [15] A. Zebda, C. Gondran, P. Cinquin, and S. Cosnier, “Glucose biofuel cell construction based on enzyme, graphite particle and redox mediator compression,” *Sens Actuators B Chem*, vol. 173, pp. 760–764, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.snb.2012.07.089.

CHAPITRE 4. BIOELECTRODES CREUSES (A CAVITE) BASEES SUR L'ASSEMBLAGE DE BUCKYPAPERS

Chapitre 4. Bioélectrodes creuses (à cavité) basées sur l'assemblage des buckypapers

Introduction	127
4.1 Concept d'électrode à cavité.....	128
4.2 Les bioélectrodes de grandes tailles pour la réduction de O ₂	130
4.2.1 La biocathode à base de BOx.....	130
4.2.2 Optimisation des biocathodes.....	131
4.3 Miniaturisation des biocathodes	135
4.3.1 Cathode non modifiée contenant de la BOx.....	135
4.3.2 Modification de buckypaper.....	136
4.3.3 Biocathode constituée de deux hBP	138
4.4 Les bioanodes à cavité pour l'oxydation du glucose	140
4.4.1 Fonctionnalisation du buckypaper par la méthode « one pot ».....	141
4.4.2 Fonctionnalisation du buckypaper par la méthode « drop coating ».....	142
4.4.3 Bioanode constituée de deux hBP	144
Conclusion	147
Bibliographie	150

Introduction

Les biopiles à combustible enzymatiques qui convertissent l'énergie chimique en énergie électrique par des réactions électroenzymatiques offrent des potentialités intéressantes pour alimenter des systèmes électroniques jetables [1], [2]. Cependant, le développement des piles à biocombustible enzymatiques est confronté à deux obstacles technologiques majeurs, à savoir leur courte durée de vie opérationnelle et de stockage en solution et, dans une moindre mesure, leur faible puissance de sortie [3], [4]. La faible stabilité des bioélectrodes des biopiles enzymatiques est liée à la désactivation des enzymes immobilisées. Concernant la puissance des piles à combustible, celle-ci est en partie liée à la quantité d'enzyme immobilisée par unité de surface conductrice et à l'efficacité de la connexion électrique entre l'enzyme et l'électrode.

Les électrodes enzymatiques des biopiles résultent de l'immobilisation de différentes enzymes redox sur les surfaces des électrodes pour leur connexion électrique. Cette fixation de l'enzyme peut être obtenue par greffage chimique, par interactions d'affinité ou par piégeage physique (plus détaillée dans le chapitre 1). En ce qui concerne l'immobilisation par la liaison covalente ou non-covalente, cette configuration offre un bon accès du substrat et des médiateurs redox à l'enzyme immobilisée, mais la quantité de biocatalyseur est limitée à une quasi-monocouche à l'interface électrode modifiée - solution limitant ainsi fortement la puissance. Bien que l'immobilisation dans une matrice 3D augmente la densité de surface des enzymes, ce processus de piégeage peut induire un processus de la dénaturation dû à l'environnement non biocompatible. De plus, l'activité de l'enzyme piégée peut être affectée par la perméabilité et l'hydrophobie de la structure hôte. Les contraintes stériques peuvent réduire considérablement la diffusion des substrats et des médiateurs redox, voire bloquer la flexibilité conformationnelle de la protéine. L'une des stratégies pour augmenter la puissance des biopiles à biocombustible est de développer des électrodes poreuses qui augmentent la surface efficace des électrodes. Cependant, cette approche ne résout pas le problème de la stabilité du stockage.

Récemment, un nouveau type de biopile à combustible basé sur la non-immobilisation des catalyseurs a été développé à partir de compartiments basés sur une membrane de dialyse qui contenait des enzymes, des nanoparticules redox et une électrode [5]. Comme les enzymes et les médiateurs en solution peuvent librement diffuser et pivoter, des configurations optimales au transfert d'électron enzyme/médiateur redox sont facilement atteignables. Cependant, le procédé proposé nécessitait une pompe péristaltique pour fournir un flux constant de combustible. Il semble donc difficile de miniaturiser les dispositifs de ce type. Plus récemment, Li et *al.* ont rapporté une nouvelle conception de bioélectrode basée sur une électrode en feutre de carbone et une suspension aqueuse comprenant la glucose oxydase, un médiateur et un nanomatériau dispersé (Ti_3C_2 MXene semblable au graphène) le tout confiné dans une enveloppe acrylique et une membrane de dialyse [6]. La densité de courant maximale de cette bioanode était maintenue à 25 % de sa valeur initiale après 9 jours, illustrant la relative bonne stabilité de stockage d'électrode. En outre, pour une décharge à faible courant continu ($5 \mu\text{A}$), la pile à biocombustible hybride résultante présente une bonne stabilité opérationnelle, ne perdant que 34 % de sa puissance initiale ($2,75 \mu\text{W}$) après 19 jours. Cependant, la configuration basée sur un récipient acrylique enveloppé dans une membrane de dialyse et la stabilité de la dispersion du

nanomatériau peuvent être des facteurs limitants pour la miniaturisation de la pile et pour sa stabilité.

Dernièrement, notre équipe a démontré qu'un dépôt d'une fine couche de nanotubes de carbone sur un support non-conducteur pouvait jouer le rôle d'une électrode tout en offrant une bonne perméabilité aux composés de faible poids moléculaire en milieu aqueux [7]. Compte tenu de cette propriété, nous avons créé une bioélectrode originale creuse (à cavité) de très faible épaisseur et de grande surface contenant l'enzyme sous forme de poudre. L'enzyme est piégée lors du collage de deux feuilles conductrices constituées de nanotubes de carbone (buckypapers). Le volume de la microcavité est défini par l'épaisseur du film de colle conductrice liant les deux buckypapers (plus l'épaisseur du fil métallique présent dans la colle) et par la surface non collée de chaque buckypaper. Les buckypapers étant perméables à l'eau et aux petites molécules, ils ne permettent pas la perméation des enzymes. La bioélectrode présente donc une forte concentration de protéines dans un microvolume. De plus, la bioélectrode peut être stockée à sec et l'enzyme n'est solubilisée que lors de l'utilisation de la bioélectrode.

Pour illustrer ce concept innovant, une configuration de bioélectrode creuse, appliquée à la réduction électroenzymatique de O_2 et à l'oxydation du glucose, est présentée dans ce chapitre. Les performances électrocatalytiques de la biocathode contenant la BOx sont décrites en fonction de la composition du buckypaper, du pH, de la température, de la quantité d'enzyme piégée et des dimensions d'électrode. La stabilité opérationnelle et de stockage de la biocathode en solution a été déterminée par l'évolution du courant catalytique.

Dans un second temps, les bioanodes contenant l'enzyme FAD GDH en tant qu'enzyme sont décrites en fonction du médiateur choisi et de la façon avec laquelle ce dernier a été déposé sur les buckypapers. La stabilité dans le temps a ici aussi été évaluée. Enfin, l'influence du type de buckypaper utilisé (un fabriqué au laboratoire et un commercial) est présentée.

4.1 Concept d'électrode à cavité

Le modèle d'électrode enzymatique proposée dans ce chapitre est basé sur la constitution originale d'une microcavité de très faible épaisseur et de grande surface contenant des enzymes sous forme de poudre dans des assemblages de buckypapers (BPs) (Figure 4.2, a). Dans le concept proposé, deux types de BP peuvent être utilisés. Initialement, un BP commercial (cBP : commercial buckypaper) a été choisi comme support pour sa stabilité mécanique et pour sa disponibilité. Par contre, l'hydrophobicité des cBPs étant très élevée, un BP fabriqué au laboratoire (hBP : homemade buckypaper) a été utilisé en tant que deuxième couche pour fermer la cavité. Le cBP présente une structure plus poreuse que le hBP facilitant ainsi la pénétration de l'électrolyte et des substrats à l'intérieur de la cavité. Contrairement au cBP, le hBP présente une structure plus dense et plus compacte que le cBP qui est composée de nanotubes beaucoup plus petits (diamètres 10-20 nm) qui permettent un meilleur transfert direct d'électrons avec les enzymes redox [8].

Le hBP a été préparé en se basant sur une méthode de filtration sous vide précédemment décrite par notre groupe de recherche [9]. Dans notre étude deux protocoles de fabrication du

Chapitre 4. Bioélectrodes creuses (à cavité) basées sur l'assemblage des buckypapers

hBP ont été élaborés conduisant à différentes compositions du matériau final. Le premier processus de fabrication correspond aux étapes nécessaires classiques pour fabriquer un BP contenant seulement les CNTs autoassemblés. Pour commencer une suspension de CNTs dans le N,N-diméthylformamide (DMF) a été réalisée (ration : 1 mg CNTs/1 mL DMF), ensuite cette suspension a été soumise aux ultrasons pendant 1h30 afin d'obtenir une bonne dispersion. Pour finir, la suspension obtenue a été filtrée à l'aide d'une pompe à diaphragme et séchée à l'air durant 24h (Figure 4.1). Le deuxième protocole concerne la fabrication par la méthode «one-pot» des BPs modifiés. Dans ce cas-là, lors de la dispersion par les ultrasons de la suspension CNTs/DMF, au bout d'une heure on ajoute la molécule souhaitée et on laisse sous ultrasons encore 30 minutes afin d'obtenir une modification des CNTs dispersés par adsorption de la molécule par interactions π . Le reste est identique au premier protocole (Figure 4.1, cas de la modification).

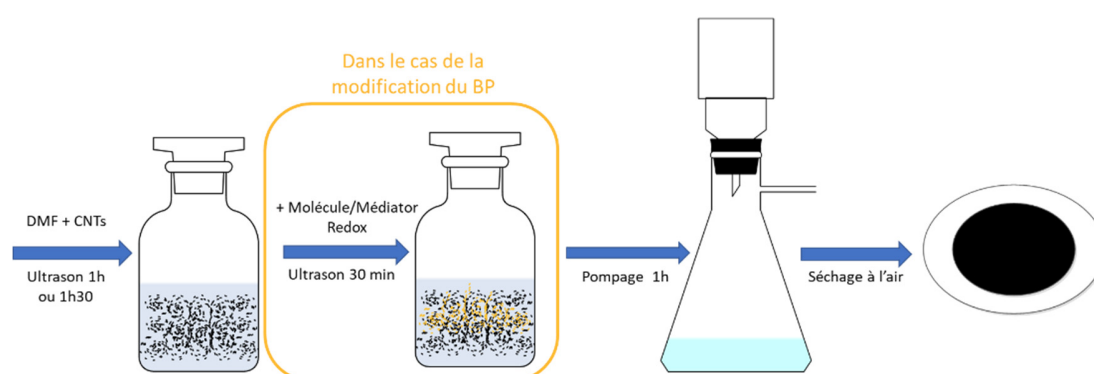


Figure 4.1 : Représentation schématique de la procédure de fabrication du buckypaper.

L'assemblage des deux buckypapers pour l'obtention de l'électrode finale est réalisé en quelques étapes. D'abord, les supports en BPs sont découpés sous forme d'un disque au diamètre souhaité (30 mm pour grandes électrodes et 12 mm pour les petites électrodes). Ensuite, sur une face du disque du cBP, on colle le fil électrique tout autour du diamètre externe avec une pâte de carbone conductrice en conservant une cavité interne intacte via un gabarit (13 et 7 mm de diamètre, respectivement pour une grande et une petite électrode). Ce diamètre interne définit la surface et puis le volume spécifique de la microcavité de l'électrode. L'enzyme sous forme de poudre, est ensuite déposée directement sur le cBP, sur la surface interne, au centre de la cavité. Pour terminer, le deuxième disque en hBP est rajouté par-dessus. Ainsi, les deux couches de BP sont collées entre elles grâce à la pâte de carbone conductrice tout en emprisonnant la poudre d'enzyme entre les deux faces de BP (Figure 4.2, a). Les électrodes résultantes sont séchées à l'air pendant 4 h.

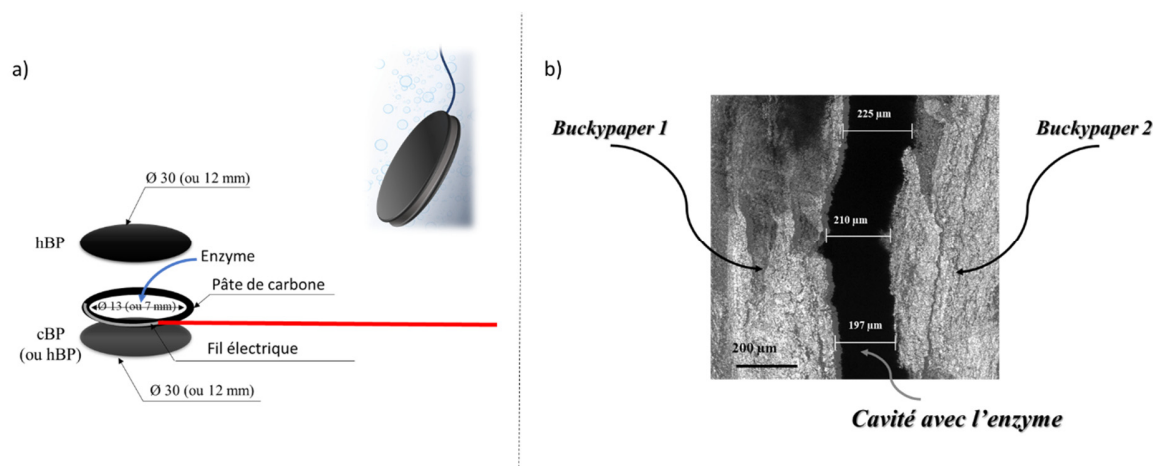


Figure 4.2 : a) Représentation schématique d'une électrode à cavité ; b) Image de la section d'une grande électrode, obtenue au microscope confocal à balayage laser (MCBL).

La figure 4.2, b représente une image de la section d'une électrode de grande taille ($\text{Ø}_{\text{ext}} = 30$ mm, $\text{Ø}_{\text{int}} = 13$ mm) faite au microscope confocal à balayage. On peut constater la présence de la cavité entre les deux couches des BPs, dans laquelle l'enzyme en poudre est stockée.

4.2 Les bioélectrodes de grandes tailles pour la réduction de O_2

Pour faciliter la mise au point des électrodes à cavité, la majorité des réalisations a été faite en utilisant des grandes surfaces, telles que 30 mm en diamètre externe et 13 mm en diamètre interne, afin d'avoir une fabrication manuelle simple et un collage plus sûr.

Dans le but d'illustrer le concept de piégeage et de câblage électrique d'une enzyme dans une bioélectrode à cavité, nous avons choisi de travailler sur les cathodes contenant la bilirubine oxydase (BOx) comme modèle d'enzyme. Les raisons qui nous ont poussés à faire ce choix sont : la robustesse de l'enzyme, la possibilité du transfert direct d'électron entre l'enzyme et le matériau conducteur et une possible maîtrise sur la concentration constante en substrat (par barbotage de O_2). De plus, les cathodes sont en général les électrodes limitantes dans une biopile implantable, d'où l'intérêt de les étudier plus en détail.

4.2.1 La biocathode à base de BOx

Pour commencer, les cathodes creuses basées sur une couche de hBP et une couche de cBP avec la BOx comme enzyme ont été fabriquées. Dans ce concept la réduction de O_2 par DET est étudiée.

Ainsi, 2 mg de poudre de BOx ont été déposés dans la cavité (diamètre 13 mm) avant la fermeture de l'électrode par le hBP extérieur. Ensuite, les deux couches de BP ont été collées et l'électrode a été séchée à l'air. La bioélectrode résultante a été immergée dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5), avec une agitation de 250 tr/min et l'électroactivité potentielle de la BOx envers la réduction de O_2 a été étudiée par voltampérométrie cyclique (Figure 4.3, a).

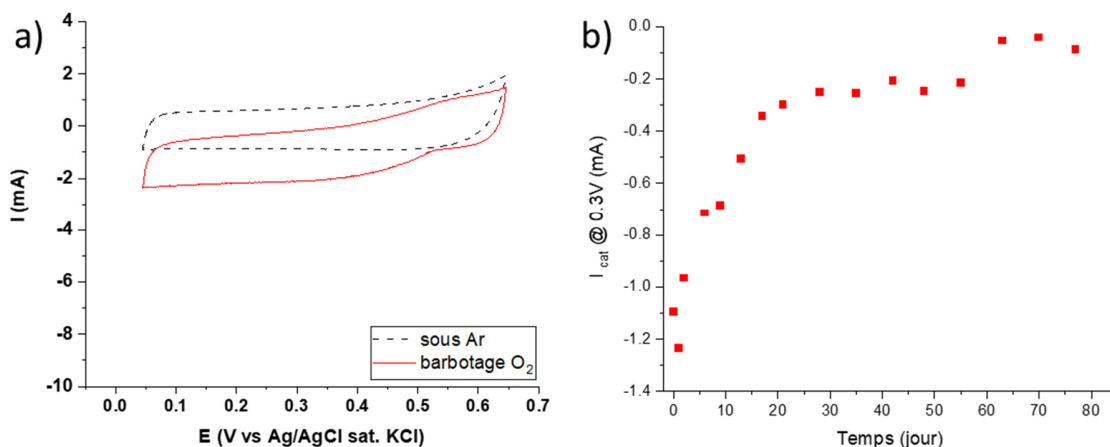


Figure 4.3 : a) Voltampérogrammes cycliques de la biocathode hBP / BOx / cBP (grande taille) sous Ar (ligne pointillée, noire) et sous barbotage de O₂ (ligne pleine, rouge) et b) sa stabilité dans le temps. Conditions expérimentales : 0,1 mol L⁻¹ PB, pH 6,5 à 1 mV s⁻¹, 25°C, 250 tr/min.

La figure 4.3, a montre les voltampérogrammes cycliques enregistrés à 1 mV s⁻¹ dans des conditions sous argon (sans le substrat) et avec saturation en O₂ par barbotage continu. En présence de O₂, un courant catalytique apparait clairement à un potentiel d'environ 0,53 V qui correspond à la catalyse classique observée pour les bioélectrodes basées sur un DET avec la BOx immobilisée [10], [11]. Ce courant catalytique confirme aussi la pénétration de l'électrolyte et du substrat à travers les BPs, la solubilisation des enzymes initialement en poudre dans la microcavité interne et la capacité de l'électrode creuse à établir un câblage électrique de BOx.

La stabilité de stockage de la biocathode creuse maintenue dans une solution aqueuse a été étudiée en enregistrant périodiquement son courant catalytique pour la réduction de O₂ à 0,3V en fonction du temps (Figure 4.3, b). Entre les mesures, la biocathode était stockée à 4°C en solution aqueuse tamponnée. Il faut noter que la bioélectrode perd presque la totalité de son électroactivité après 75 jours.

4.2.2 Optimisation des biocathodes

L'étape suivante, à laquelle nous nous sommes intéressés est l'amélioration de l'activité électrocatalytique de la biocathode à cavité.

Orientation d'enzyme

Comme il a été précédemment rapporté par notre équipe, la présence de différents types de porphyrines adsorbées sur des MWCNTs ou des buckypapers induit généralement une orientation de la BOx favorable à un DET entre son centre T1 et les nanotubes de carbone. Cela augmente ainsi l'intensité du courant catalytique pour la réduction de O₂ [11].

L'amélioration de l'activité électrocatalytique de la biocathode creuse a donc été étudiée via la modification du hBP par une protoporphyrine de fer (hémine). Dans ce but, l'hémine a été solubilisée dans la dispersion des CNTs et fermement adsorbée sur leurs parois par de fortes

interactions π - π avant l'étape de filtration. La concentration d'hémine employée pour l'adsorption est fixée à 0,6 mM.

La bioélectrode résultante, basée sur un hBP / Hémine collé avec un cBP et contenant la BOx, a été testée pour la réduction de O₂ (Figure 4.4, a).

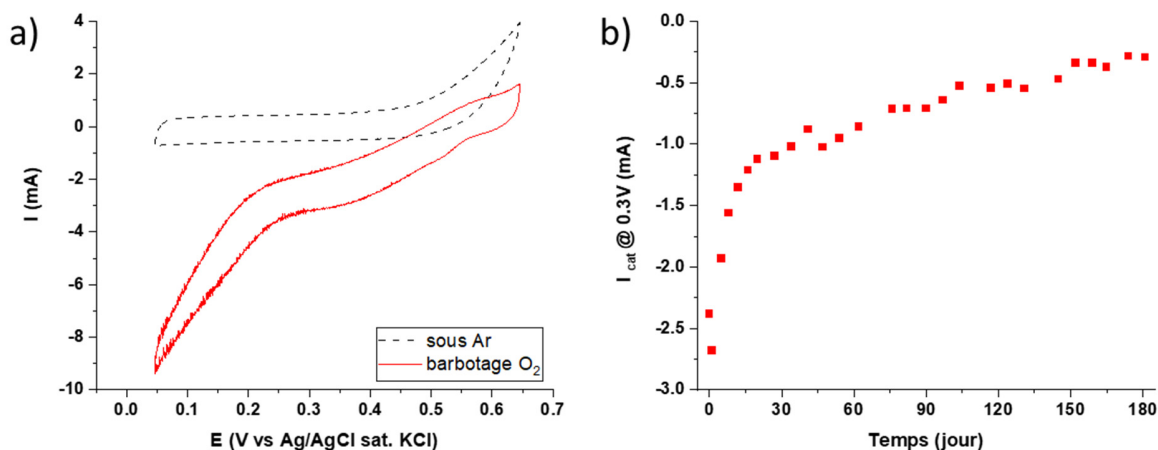


Figure 4.4 : a) Voltampérogrammes cycliques de la biocathode hBP Hémine « one pot » / BOx / cBP (grande taille) sous Ar (ligne pointillée, noire) et sous barbotage de O₂ (ligne pleine, rouge) et b) sa stabilité dans le temps. Conditions expérimentales : 0,1 mol L⁻¹ PB, pH 6,5 à 1 mV s⁻¹, 25°C, 250 tr/min.

Comme attendu, la présence d'hémine entraîne une augmentation remarquable de l'intensité du courant (2 fois plus intense à 0,3 V, 1,24 mA vs 2,67 mA) et une amélioration du potentiel (vers environ 0,57 V), confirmant l'orientation efficace de la BOx induite par l'hémine (Figure 4.4, a).

La stabilité de stockage de cette électrode a été aussi étudiée. Après une diminution initiale importante du courant catalytique pendant environ 20 jours, une quasi-stabilisation du processus catalytique se produit, présentant une faible diminution continue du courant catalytique de $5,2 \pm 0,3 \mu\text{A jour}^{-1}$. Contrairement à l'électrode basée sur des BPs non modifiés qui a perdu ses performances après 75 jours, la bioélectrode à base du hBP / Hémine conserve 30 % de son activité initiale après 3 mois et 11 % du courant initial au bout de 6 mois (Figure 4.4, b).

En plus de l'orientation des BOx par des interactions électrostatiques bénéfiques au DET, la présence de groupes carboxyliques sur l'hémine confère un caractère moins hydrophobe aux MWCNTs et donc au hBP facilitant ainsi sa mouillabilité. Cette hypothèse a été confirmée par les mesures d'angle de contact effectuées avec les différents BPs. Les angles de contact avec l'eau du cBP et hBP étaient respectivement de $131 \pm 3^\circ$ et $128 \pm 7^\circ$ (Figure 4.5, a et b). En revanche, la formation d'une goutte d'eau sur le hBP / Hémine n'a pas pu être réalisée (l'eau diffusant immédiatement à travers le matériau) rendant impossible la détermination de l'angle de contact. Ce phénomène confirme que la modification des MWCNTs par l'hémine a rendu la surface hydrophile (Figure 4.5, c). De plus, les images faites au microscope à balayage des différents buckypapers ont montré un changement morphologique subtil pour le hBP / Hémine par rapport à hBP (Figure 4.5).

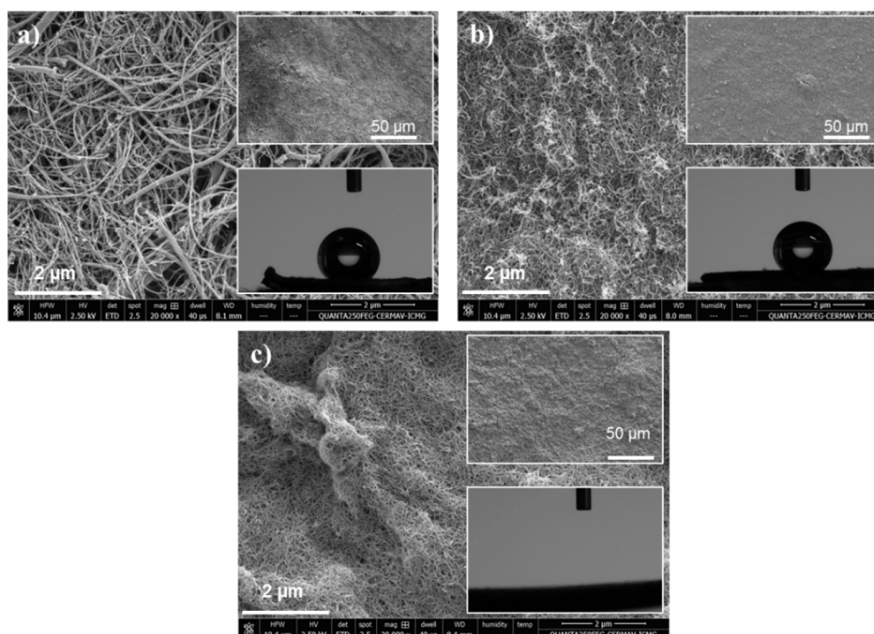


Figure 4.5 : Images MEB et leurs angles de contact respectifs pour : a) cBP, b) hBP et c) hBP / Hémine.

Le concept de l'électrode creuse proposé dans ce chapitre permet de moduler facilement la quantité d'enzyme piégée à l'intérieur de l'électrode. Dans ce contexte, l'influence de la quantité de BOx piégée (0,16-4 mg) sur les propriétés électrocatalytiques des bioélectrodes résultantes basées sur hBP / Hémine a été examinée (Figure 4.6, a). Le courant catalytique augmente avec la quantité de BOx en poudre jusqu'à 1 mg et atteint un plateau pour les quantités supérieures. Au-delà de 1 mg d'enzyme piégée, la réaction électroenzymatique pourrait être limitée par la surface électroactive ou la diffusion d'oxygène à l'intérieur de la cavité. Afin d'éliminer l'influence de la quantité d'enzyme sur les performances de la bioélectrode et de disposer d'une réserve de catalyseur enzymatique, les expériences ont été poursuivies avec 2 mg de BOx dans la cavité.

L'influence de la température sur l'électroactivité de la cathode a également été explorée. La réponse en courant de la biocathode creuse (avec 2 mg de BOx et hBP/Hémine) a été mesurée dans la gamme de température de 15 à 60°C. Le courant catalytique augmente jusqu'à une valeur maximale continue de 25 à 37°C, reflétant une augmentation de l'activité enzymatique puisque la concentration d'oxygène décroît avec l'augmentation de la température (par exemple – 18% entre 15 et 25°C et – 19% entre 25 et 37°C). Le courant diminue ensuite fortement, reflétant d'une part la désactivation de l'enzyme et d'autre part la diminution de la concentration de O₂ (Figure 4.6, b). Concernant l'influence du pH, les expériences ont été réalisées dans des tampons phosphate avec une gamme de pH entre 4 et 8,5. Il apparaît que la réponse bioélectrocatalytique est bonne à des valeurs de pH allant de 6 à 7 (83% de l'activité), le courant maximum étant enregistré à pH 6,0. Compte tenu du fait qu'une forte diminution de l'activité est observée entre pH 5 et 6, les expériences ont été réalisées à pH 6,5 pour éviter des effets dus à des faibles variations de pH (Figure 4.6, c).

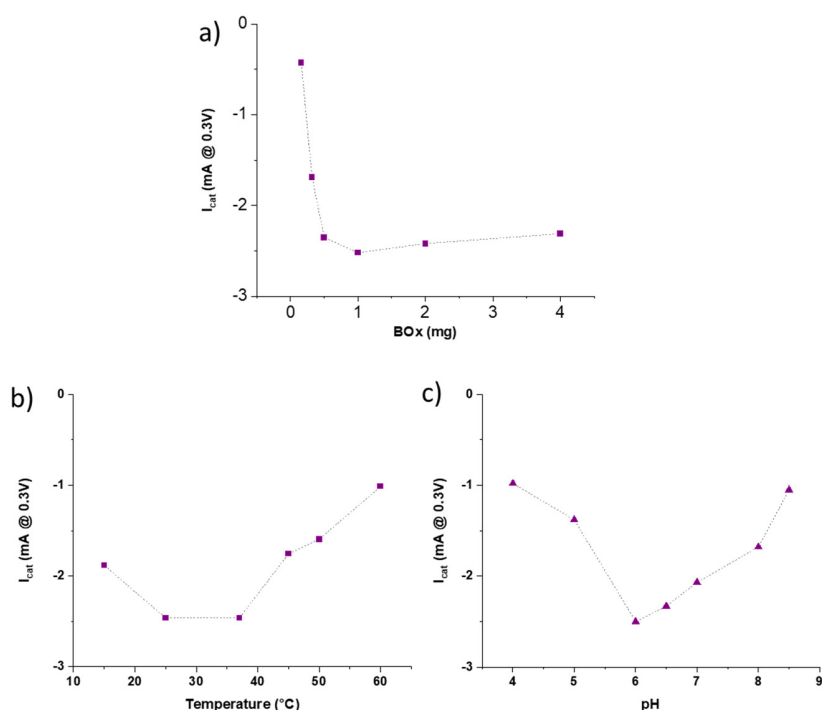


Figure 4.6 : a) Influence de la quantité de BOx piégée à l'intérieur de l'électrode creuse avec une face hBP Hémine sur la réduction électrocatalytique de O_2 , 25°C et 0,1 mol L⁻¹ PB pH 6,5, 250 tr/min ; b) influence de la température (0,1 mol L⁻¹ PB pH 6,5, 250 tr/min) sur le fonctionnement de la biocathode avec 2 mg de BOx et c) influence du pH (0,1 mol L⁻¹ PB, 25°C, 250 tr/min) sur le fonctionnement de cette même électrode. Potentiel appliqué par rapport à Ag/AgCl = 0,3V.

Combinaison du DET et MET pour la réduction de O_2

Une possibilité pour améliorer le courant catalytique serait d'introduire un médiateur redox diffusant librement dans la solution confinée pour connecter électriquement la BOx en solution via un transfert d'électrons médié (MET).

L'ABTS ayant déjà été utilisé avec succès pour le MET avec les BOx, ce médiateur a été intégré dans la cavité pour combiner le DET et le MET [12]. Une électrode a donc été fabriquée selon le processus décrit précédemment pour les électrodes avec la BOx orientée par l'hémine, avec comme différence l'ajout de 0,5 mg d'ABTS en plus des 2,0 mg de BOx à l'intérieur de la cavité.

La biocathode qui en résulte a été testée de la même façon que toutes les autres cathodes. La figure 4.7, a montre une nette augmentation (+43%) de la valeur du courant catalytique faradique de -2,67 à -3,83 mA (-1,45 mA cm⁻²) à 0,3 V, confirmant le câblage électrique de la BOx par les deux phénomènes : DET et MET grâce à la présence de l'ABTS.

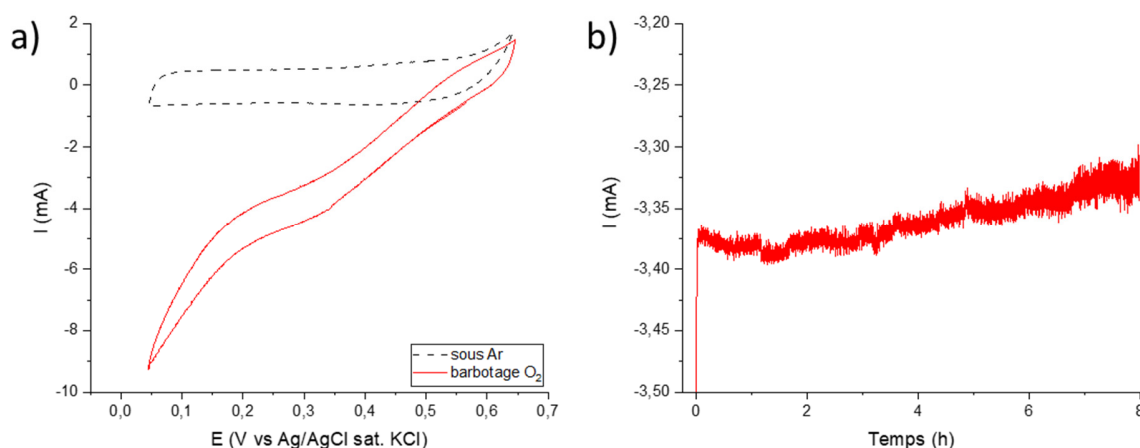


Figure 4.7 : a) Voltampérogrammes cycliques de la biocathode hBP Hémine « one pot » / BOx + ABTS / cBP (grande taille) sous Ar (ligne pointillée, noire) et sous barbotage de O₂ (ligne pleine, rouge) et b) sa stabilité opérationnelle en continu. Conditions expérimentales : 0,1 mol L⁻¹ PB, pH 6,5 à 1 mV s⁻¹, 25°C, 250 tr/min.

De plus, la stabilité opérationnelle à long terme de la bioélectrode contenant de la BOx et de l'ABTS a été étudiée par chronoampérométrie à 0,3 V. Une stabilité remarquable du courant cathodique (perte de seulement 2% après 8 h) semble indiquer l'absence de libération d'ABTS (Figure 4.7, b). Après 23 h de fonctionnement intermittent sur 7 jours la perte de courant catalytique n'était que de 54%.

4.3 Miniaturisation des biocathodes

Une optimisation des électrodes vis-à-vis de leurs dimensions est indispensable en vue de l'implantation *in vivo*. En effet, les électrodes mises au point ne présentent pas un volume compatible pour une implantation dans le rat. C'est pour cela qu'une étape de miniaturisation est nécessaire.

4.3.1 Cathode non modifiée contenant de la BOx

Dans cette partie du chapitre, nous allons présenter les cathodes optimisées pour la réduction de O₂ par le DET. C'est-à-dire les électrodes à base de BPs non modifiés avec la BOx. La procédure de la fabrication d'électrode est la même que pour les grandes tailles, sauf que les BP cette fois auront un diamètre externe de 12 mm et un interne de 7 mm. La quantité d'enzyme piégée reste la même, pour pouvoir évaluer l'influence exactement que des dimensions d'électrode (de la surface spécifique précisément) sur ses performances électrochimiques.

La biocathode de petite taille a été immergée dans un tampon phosphate 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5) et étudiée par la voltampérométrie cyclique. La figure 4.8 présente les voltampérogrammes obtenus dans les conditions sous Ar (ligne pointillée) et sous barbotage de O₂ (ligne pleine).

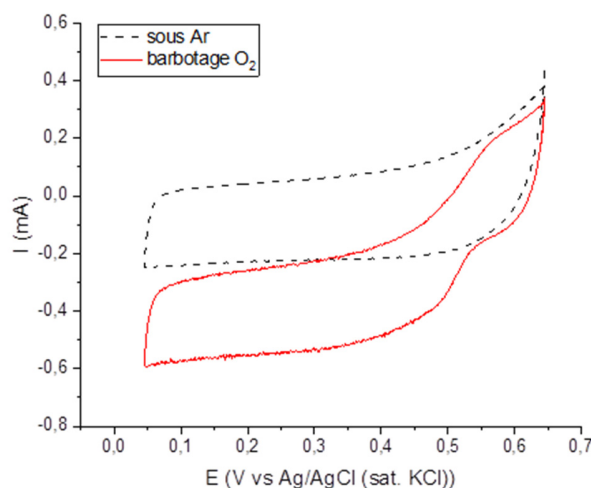


Figure 4.8 : Voltampérogrammes cycliques de la biocathode hBP / BOx / cBP (petite taille) sous Ar (ligne pointillée, noire) et sous barbotage de O₂ (ligne pleine, rouge). Conditions expérimentales : 0,1 mol L⁻¹ PB, pH 6,5 à 1 mV s⁻¹, 25°C, 250 tr/min.

On peut constater qu'en absence du substrat, le courant capacitif est de -0,22 mA, ce qui est 4 fois moins que le courant capacitif de la même électrode en grande taille. Cette différence est à peu près attendue, vu qu'en miniaturisant l'électrode on a diminué la surface spécifique presque de 4 fois (de 2,65 cm² à 0,77 cm²). Par contre, les densités de courant sont presque identiques pour les grandes et les petites électrodes (-0,47 mA cm⁻² et -0,42 mA cm⁻², respectivement). Ce phénomène pourrait être attribué à une meilleure conductivité des buckypapers dû au cercle de plus petit diamètre du connecteur métallique.

4.3.2 Modification de buckypaper

Étant donné que la meilleure cathode de grande taille pour la réduction de O₂ via un DET a été la cathode avec l'orientation de la BOx par l'hémine, cette configuration en petite taille a également été étudiée.

La figure 4.9 représente les voltampérogrammes de la petite cathode avec l'orientation de BOx. Le courant capacitif de cette électrode en absence du substrat est assez proche de celui sans l'hémine (-0,14 mA et -0,22 mA, respectivement). Ceci souligne la reproductivité de la surface d'électrode. Concernant les performances électrocatalytiques de la petite cathode avec l'hémine sur une face, le courant catalytique est presque deux fois plus grand que celui de la grande (respectivement, -1,90 mA cm⁻² vs -1,01 mA cm⁻²). Ici, on voit que, même si l'orientation des enzymes est meilleure du fait de la présence de l'hémine sur le hBP, en ayant plus d'enzymes par unité de surface de l'électrode, on obtient un meilleur courant. Comme attendu, l'orientation des enzymes par l'hémine entraîne bien une augmentation notable du courant. La comparaison avec les configurations de plus grand diamètre semble indiquer, une augmentation du courant avec la concentration enzymatique. Pourtant, l'effet de la concentration en enzyme avait été étudiée et nous avons observé un plateau en courant pour des quantités d'enzyme supérieures à 1mg. Une explication pourrait résider dans le fait que ce plateau ne serait pas lié à la saturation en

Chapitre 4. Bioélectrodes creuses (à cavité) basées sur l'assemblage des buckypapers

catayseur enzymatique mais plutôt à une limitation par le substrat plus importante pour les grandes cathodes que pour les petites.

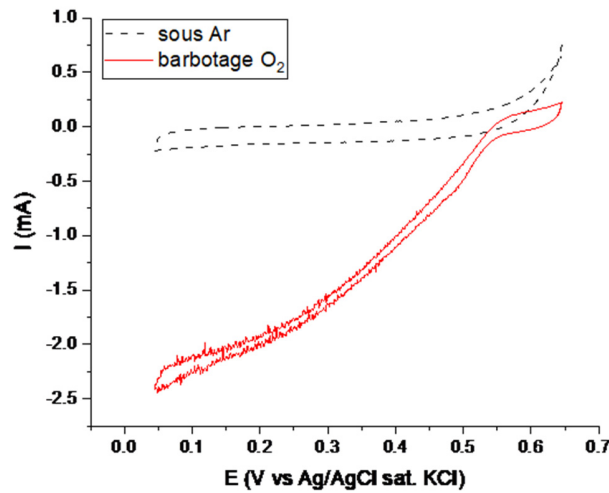


Figure 4.9 : Voltampérogrammes cycliques de la biocathode hBP Hémine « one pot » / BOx / cBP (petite taille) sous Ar (ligne pointillée, noire) et sous barbotage de O₂ (ligne pleine, rouge). Conditions expérimentales : 0,1 mol L⁻¹ PB, pH 6,5 à 1 mV s⁻¹, 25°C, 250 tr/min.

Considérant que le but principal est d'implanter les électrodes miniaturisées *in vivo* il faut prendre en compte les principaux paramètres physiologiques, tels que la température et le pH. Précédemment, il est apparu que la température physiologique de 37°C n'impactera pas les performances de la cathode, en revanche le pH de 7,4 aura une influence négative sur ses performances electrocatalytiques. Afin d'estimer cet impact sur les biocathodes de faibles dimensions, ces dernières ont été testées dans un tampon phosphate à pH 7,4 indiquant une baisse du courant catalytique d'environ 18,5% (-1,46 mA vs -1,19 mA).

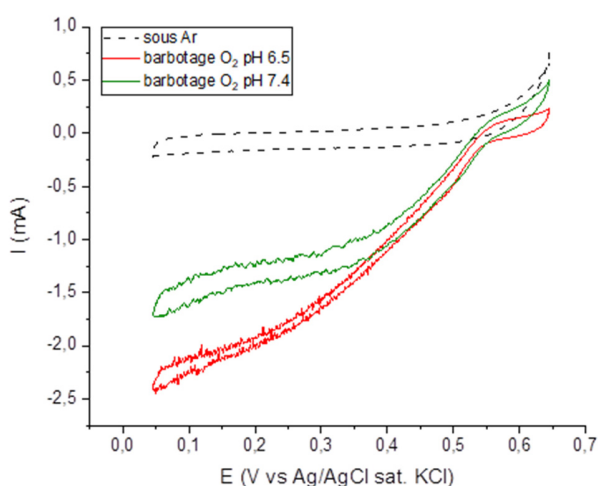


Figure 4.10 : Voltampérogrammes cycliques de la biocathode hBP Hémine « one pot » / BOx / cBP (petite taille) enregistrés dans $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB à 1 mV s^{-1} sous Ar (ligne pointillée, noire) et sous barbotage d' O_2 dans $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB pH 6,5 (ligne pleine, rouge) et dans $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB pH 7,4 (ligne pleine, vert). Agitation 250 tr/min.

4.3.3 Bicathode constituée de deux hBP

Une étude complémentaire concernant la nature des BP a été entreprise avec les électrodes de petite taille en utilisant uniquement des BPs fabriqués au laboratoire pour l'élaboration de ces électrodes et leur application à la réduction de O_2 . Les premières expériences ont visé l'exploration du phénomène DET et de l'association des deux types de transferts (DET et MET) pour la réduction de O_2 par la BOx.

La figure 4.11 montre les courbes de la voltampérométrie cyclique obtenue pour une électrode élaborée avec deux hBPs préalablement modifiés par l'hémine et contenant la BOx dans la cavité. Il apparaît que cette nouvelle configuration basée sur deux BPs faits au laboratoire et modifiés par l'hémine conduit à une augmentation du courant catalytique de 33% (-1,46 mA vs -1,95 mA). Cette amélioration peut être liée à la modification par l'hémine des deux hBP, rendant ainsi ces matériaux plus hydrophiles. Les deux côtés de l'électrode deviennent plus perméables à l'électrolyte facilitant par là même la solubilisation des enzymes à l'intérieur de la cavité et les échanges ioniques avec la solution aqueuse extérieure. Mais surtout, dans cette configuration, contrairement aux électrodes comprenant un cBP, les deux côtés orientent et connectent l'enzyme.

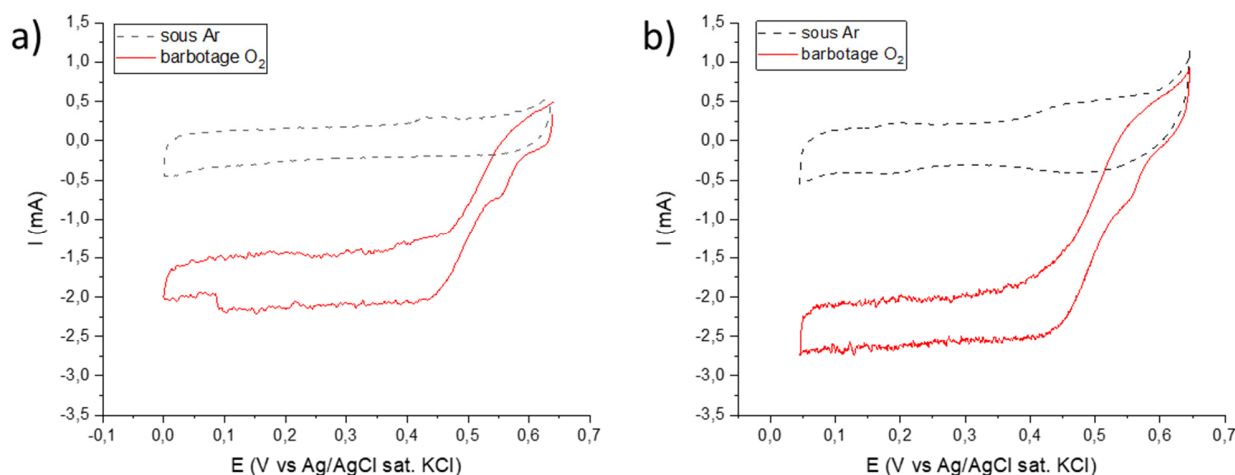


Figure 4.11 : Voltampérommes cycliques de la biocathode a) - hBP Hémine « one pot » / BOx / hBP Hémine « one pot » (petite taille) et b) - hBP Hémine « one pot » / BOx + ABTS / hBP Hémine « one pot » (petite taille) sous Ar (ligne pointillée, noire) et sous barbotage de O₂ (ligne pleine, rouge). Conditions expérimentales : 0,1 mol L⁻¹ PB, pH 6,5 à 1 mV s⁻¹, 25°C, 250 tr/min.

Concernant l'association des mécanismes de transfert direct et indirect, le médiateur rédox ABTS sous forme de poudre a été ajouté dans la cavité lors de l'élaboration de ces électrodes. Les voltampérommes sous argon et dioxygène sont présentés sur la figure 4.11, b.

Ces biocathodes avec deux hBP semblent être les plus efficaces parmi celles étudiées, mais des expériences supplémentaires seront nécessaires pour confirmer leur reproductibilité. De plus, il faut faire des études complémentaires pour évaluer l'influence de différents facteurs, tels que la température, le pH, la quantité d'ABTS, sur les performances électrochimiques. Une estimation de la stabilité dans le temps constitue également un paramètre vital pour déterminer leur capacité à être implantée *in vivo*. Ces premiers résultats semblent indiquer que même si la présence de l'ABTS améliore le courant catalytique, le gain n'est pas aussi important que celui observé avec les électrodes de grande taille (+ 13,4% contre + 43%). Pour les électrodes de faible surface, puisque le gain en DET dû à l'utilisation de hBP modifié par l'hémine est plus fort que celui observé avec les grandes électrodes, l'effet du MET dû à la présence de l'ABTS s'avère plus faible en tenant compte que le phénomène de catalyse est vraisemblablement limité par la surface électroactive et la diffusion de O₂.

Bilan sur les électrodes à cavité à base de BOx

Le tableau 4.1 résume les performances catalytiques obtenues à 0,3V avec les différentes catégories d'électrodes à cavité à base de BOx présentées dans ce chapitre. Cette présentation permet de mettre en exergue les différents paramètres influençant le phénomène de électrocatalyse enzymatique, comme l'apport de l'orientation des enzymes par l'hémine, l'apport du médiateur ABTS, l'effet de la miniaturisation et l'effet de la nature des parois de l'électrode.

Tableau 4.1 : Récapitulatif des performances des biocathodes à cavité enregistrées dans 0,1 mol L⁻¹ PB à pH 6,5 et 25°C

Type d'électrode	I , mA	j _{cat} , mAcm ⁻²
Électrodes de grande taille (Ø_{ext} = 30 mm, Ø_{int} = 13 mm)		
<i>hBP / BOx / cBP</i>	1,24	0,47
<i>hBP+Hémimine "one pot" / BOx / cBP</i>	2,67	1,01
<i>hBP+Hémimine "one pot" / BOx + ABTS / cBP</i>	3,83	1,45
Électrodes miniaturisées (Ø_{ext} = 12 mm, Ø_{int} = 7 mm)		
<i>hBP / BOx / cBP</i>	0,32	0,42
<i>hBP+Hémimine "one pot" / BOx / cBP</i>	1,46	1,90
<i>hBP+Hémimine "one pot" / BOx / cBP</i> <i>à pH 7,4</i>	1,19	1,55
<i>hBP+Hémimine "one pot" / BOx / hBP+Hémimine "one pot"</i>	1,95	2,53
<i>hBP+Hémimine "one pot" / BOx + ABTS / hBP+Hémimine "one pot"</i>	2,22	2,88

4.4 Les bioanodes à cavité pour l'oxydation du glucose

Nous avons démontré l'application des bioélectrodes creuses à la réduction électroenzymatique d'O₂ par le transfert direct d'électrons et également par le transfert d'électrons médié. Ce résultat implique que l'utilisation de ce concept d'électrode peut être étendu au piégeage dans la cavité des électrodes creuses d'une large variété de biocatalyseurs n'exhibant pas de DET. Dans cette perspective, nous nous sommes intéressés à l'application de ce type d'électrode comme bioanode pour l'oxydation du glucose, l'objectif à terme étant la fabrication d'une biopile implantable. Pour le développement de cette bioanode, l'enzyme FAD GDH a été choisie comme le biocatalyseur. Cette enzyme présente un grand intérêt dans le domaine d'implantation *in vivo*, car elle est insensible au dioxygène et donc ne génère pas de H₂O₂ qui peut s'avérer délétère pour les protéines.

Les bioanodes ne seront pas l'élément limitant dans le processus de la production du courant. En effet, compte tenu de la faible concentration en dioxygène *in vivo*, ce sont les biocathodes qui vont limiter les performances des biopiles. Dans ces conditions la caractérisation des bioanodes n'a pas été systématiquement conduite comme celle des biocathodes présentées précédemment.

La FAD GDH nécessite un médiateur pour effectuer un transfert d'électrons, le transfert direct étant quasi-inexistant. Deux médiateurs rédox aromatiques (1,10- phénanthroline-5,6-dione

(PLQ) et 1,4 - naphthoquinone (1,4-NQ)) ont été sélectionnés et deux méthodes de fonctionnalisation (« one-pot » et « drop coating ») des buckypapers ont été testées. Les solutions envisagées et étudiées sont regroupées dans les sous-chapitres suivants.

4.4.1 Fonctionnalisation du buckypaper par la méthode « one pot »

La fonctionnalisation par la méthode « one pot » suppose que le médiateur soit introduit directement dans les buckypapers pendant leur fabrication (Figure 4.1, le cas de modification). Comme expliqué précédemment, lors de l'étape de sonication pour disperser la suspension des CNTs, les médiateurs sont introduits sous forme de poudre dans la solution organique, puis après une période d'incubation, la solution est filtrée conduisant au BP. Le hBP fabriqué avec des nanotubes incubés avec $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de PLQ, est découpé sous forme d'un disque et assemblé avec un cBP piégeant ainsi 4 mg de FAD GDH. Comme précédemment, le hBP est le seul disque fonctionnalisé par le médiateur.

Les bioanodes fabriquées ont ensuite été immergées dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) à 25°C sous Ar et sous agitation (250 tr/min) pendant une heure afin de laisser l'électrolyte pénétrer dans la cavité et de bien solubiliser l'enzyme. Après cette étape, les électrodes ont été testées en voltampérométrie cyclique en milieu aqueux en absence et en présence de 100 mM de glucose (Figure 4.12, a).

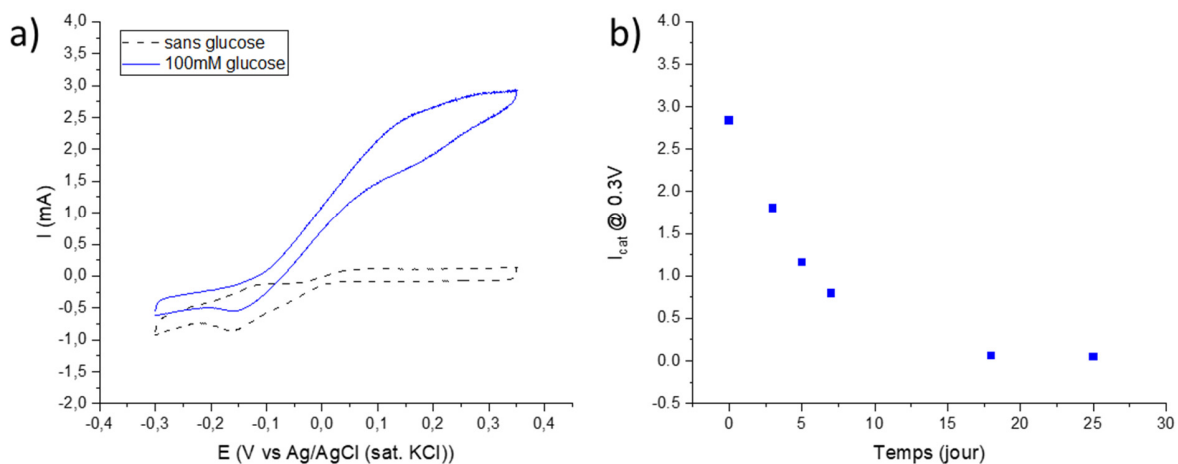


Figure 4.12 : a) Voltampérogrammes cycliques de la bioanode hBP PLQ « one pot » / FAD GDH / cBP (petite taille) en absence du glucose (ligne pointillée, noire) et en présence du glucose à 100 mmol L^{-1} (ligne pleine, bleue) et b) sa stabilité dans le temps. Conditions expérimentales : $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB, pH 7,4 à 1 mV s^{-1} , 25°C , 250 tr/min .

En absence du glucose un système de pics réversible apparaît à $E_{1/2} = -0,13 \text{ V}$, proche du potentiel redox du PLQ. En présence du glucose, à un potentiel supérieur à $-0,12 \text{ V}$, une oxydation électrocatalytique apparaît pour les électrodes creuses à base de hBP / « one pot » PLQ. Le courant catalytique atteint une valeur $2,76 \text{ mA}$ ($3,58 \text{ mA cm}^{-2}$) à $0,3 \text{ V}$.

La stabilité dans le temps de ce type d'électrode a été étudiée en testant périodiquement par voltampérométrie cyclique les électrodes qui ont été stockées en solution tamponnée à 4°C

entre les expériences. La figure 4.12, b présente l'évolution du courant catalytique enregistré à 0,3V en fonction du temps de stockage. Une forte chute des performances est observée durant les premiers 7 jours suivie ensuite d'une dégradation beaucoup plus lente. Au bout de 25 jours, la bioélectrode ne produit plus de courant et donc pas de catalyse.

Le deuxième médiateur choisi pour les études des bioanodes est la 1,4-NQ. Le hBP a été modifié via la méthode « one pot » par la NQ de la même façon que cela a été fait par le PLQ. L'électrode résultante a été testée par voltampérométrie cyclique dans le tampon phosphate ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) en l'absence et présence de 100 mmol L^{-1} de glucose (Figure 4.13).

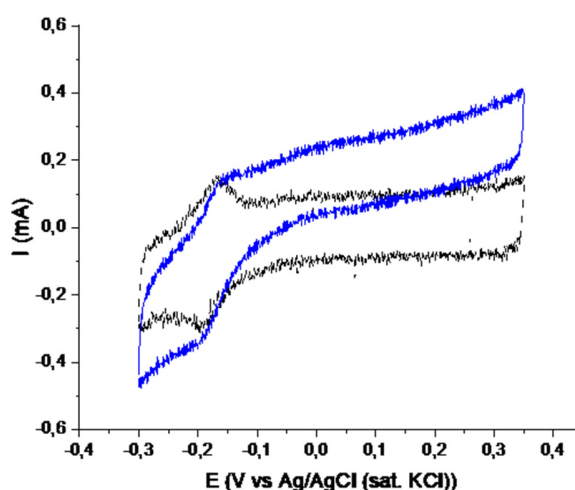


Figure 4.13 : Voltampérogrammes cycliques de la bioanode hBP 1,4-NQ « one pot » / FAD GDH / cBP (petite taille) en absence du glucose (ligne pointillée, noire) et en présence du glucose à 100 mmol L^{-1} (ligne pleine, bleue). Conditions expérimentales : $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB, pH 7,4 à 1 mV s^{-1} , 25°C , 250 tr/min.

Sur le voltampérogramme un signal réversible apparaît à $E_{1/2} = 0,19\text{V}$ corroborant la présence du 1,4-NQ sur le hBP. Par contre, au niveau de l'électrocatalyse, cette configuration n'est pas très efficace. En effet, le courant anodique enregistré à 0,3V ($0,254 \text{ mA}$ soit $0,330 \text{ mA cm}^{-2}$) est 14 fois moins important que celui produit par l'anode de type hBP / « one pot » PLQ. Cela semble indiquer que la structure aromatique plus importante en taille de PLQ par rapport à celle de 1,4-NQ permet une accessibilité plus efficace au site prosthétique de l'enzyme.

4.4.2 Fonctionnalisation du buckypaper par la méthode « drop coating »

Pour approfondir les études de comparaison entre les médiateurs PLQ et 1,4-NQ pour les anodes, une deuxième méthode de fabrication, type « drop coating » a été envisagée. Cette méthode consiste à déposer des gouttes d'une solution organique de médiateur rédox sur la face du disque des BPs qui se retrouvera à l'intérieur de la cavité. Le médiateur est ainsi solubilisé dans le dichlorométhane (DCM) et $200 \mu\text{L}$ sont déposés sur le disque ($\text{Ø } 7 \text{ mm}$) des deux types de buckypapers, ceux fabriqués au laboratoire et les commerciaux. Après 24h de séchage et évaporation du solvant organique, les électrodes ont été assemblées en présence d'enzyme. Les bioanodes qui en résultent, ont été immergées dans le tampon pendant 1 h et testées par la voltampérométrie cyclique (Figures 4.14 et 4.15).

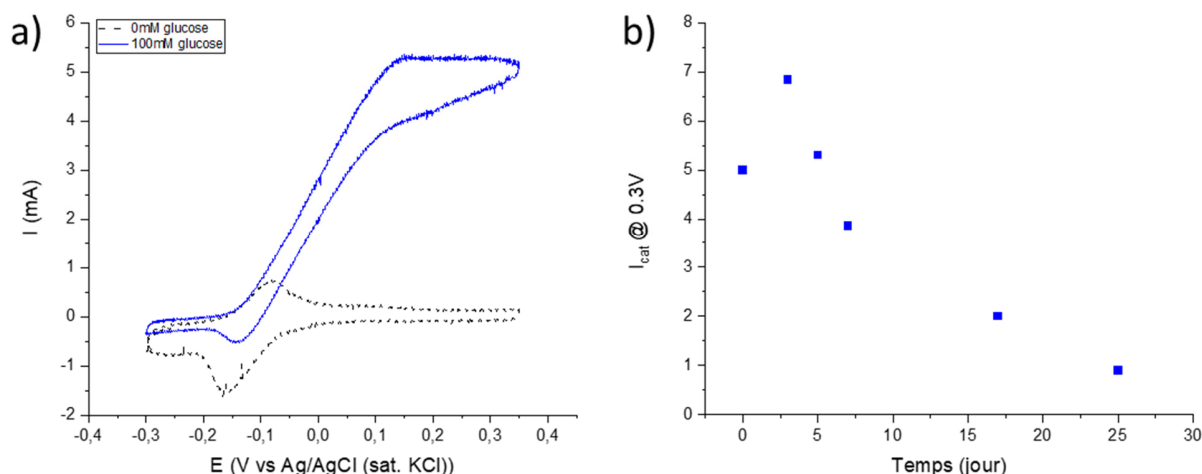


Figure 4.14 : a) Voltampérogrammes cycliques de la bioanode hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / cBP PLQ « drop coating » (petite taille) en absence du glucose (ligne pointillée, noire) et en présence du glucose à 100 mmol L^{-1} (ligne pleine, bleue) et b) sa stabilité dans le temps. Conditions expérimentales : $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB, pH 7,4 à 1 mV s^{-1} , 25°C , 250 tr/min.

La figure 4.14, illustre les courbes correspondantes à l'électrocatalyse réalisée par les bioanodes de type BP / « drop coating » PLQ. Outre une forte augmentation du courant catalytique à 0,3V soit $5,13 \text{ mA}$ ($6,67 \text{ mA cm}^{-2}$) par rapport à celui généré par la bioanode basée sur le PLQ « one pot », cette bioélectrode ne présente pas une forte chute du courant durant les 7 premiers jours (Figure 4.14, b). Un aspect très intéressant de cette bioanode est que, pendant les 4 premiers jours, une augmentation du courant est observée. Ceci pourrait correspondre à un accroissement de la perméabilité des BPs due à une dissolution de PLQ. En effet, la structure aromatique importante de PLQ peut donner lieu à un empilement des médiateurs par interactions π sur les nanotubes lors du séchage de la solution organique. De plus, le relargage d'une partie de PLQ dans la solution de la microcavité devrait également accroître la connexion électrique de l'enzyme. Il faut noter qu'après 25 jours, cette bioanode présente encore 17% de l'activité initiale, tandis que la bioanode avec PLQ « one pot » ne présente plus d'activité dans la même période.

La figure 4.15 montre que le dépôt de la 1,4-NQ sur le BP par le procédé de « drop coating » permet d'obtenir des bioanodes exhibant un système rédox efficace pour l'oxydation électroenzymatique du glucose. En particulier, le signal rédox du 1,4-NQ correspond parfaitement au potentiel classique du médiateur en solution et les intensités des courants de pics sont beaucoup plus élevées que précédemment (6 fois plus de 1,4-NQ électroactif). Quant au courant catalytique, $3,97 \text{ mA}$ ($5,15 \text{ mA cm}^{-2}$) à 0,3V, il correspond à 16 fois la valeur du courant enregistré pour la bioanode avec le 1,4-NQ déposé par « one pot », et à 0,77 fois celle observée pour la bioanode avec le PLQ par « drop coating ».

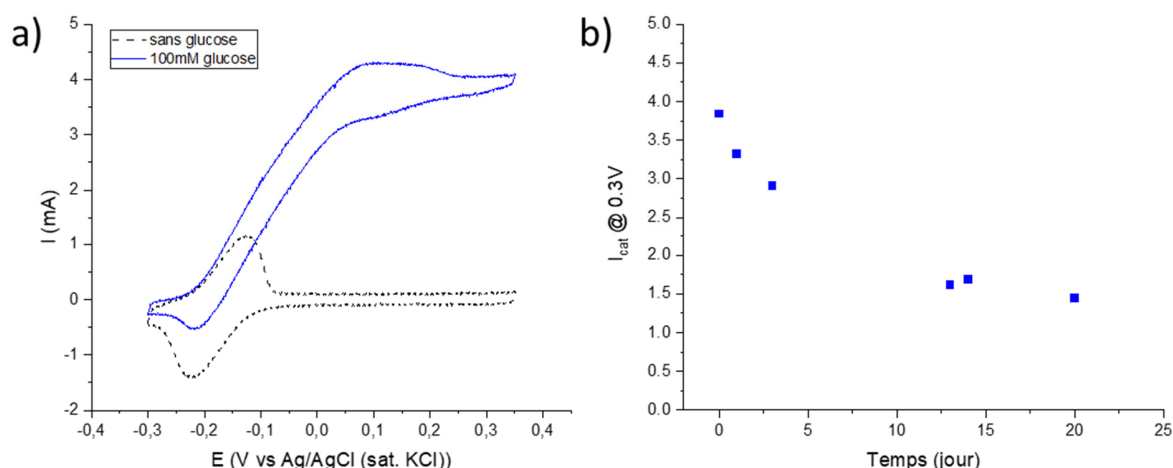


Figure 4.15 : a) Voltampérogrammes cycliques de la bioanode hBP 1,4-NQ « drop coating » / FAD GDH / cBP 1,4-NQ « drop coating » (petite taille) en absence du glucose (ligne pointillée, noire) et en présence du glucose à 100 mmol L⁻¹ (ligne pleine, bleue) et b) sa stabilité dans le temps. Conditions expérimentales : 0,1 mol L⁻¹ PB, pH 7,4 à 1 mV s⁻¹, 25°C, 250 tr/min.

Pour conclure, une augmentation de l'oxydation électrocatalytique a été observée pour les bioanodes creuses modifiées par le dépôt de gouttes (« drop coating ») par rapport aux bioanodes creuses modifiées en une seule fois (« one pot »). Il faut rappeler que dans le cas de la modification par « one pot » seulement le BP fabriqué au laboratoire a été fonctionnalisé par le médiateur, tandis que dans la méthode de « drop coating » les deux cotés (hBP et cBP) ont été fonctionnalisés. Le PLQ en tant que médiateur, permet de produire les courants les plus élevés quelle que soit la méthode de fabrication des BPs modifiés. À partir des résultats obtenus dans cette partie, une bioanode de type BP / PLQ « drop coating » a été choisie comme l'anode pour la future biopile.

4.4.3 Bioanode constituée de deux hBP

Une étude supplémentaire concernant les bioanodes creuses a été effectuée. Dans cette partie, une anode composée de deux buckypapers fabriqués au laboratoire a été explorée.

En se basant sur les résultats précédents, on a pris comme modèle d'électrode une bioanode avec PLQ déposé par le « drop coating » sur les deux faces de l'électrode. La méthode de fabrication d'électrode est la même que celle de la partie 4.5.2, avec la différence qu'une des deux faces n'est plus le BP commercial. Ce dernier est, ici, remplacé par celui fait au laboratoire. Les étapes préparatoires et analytiques sont les mêmes que précédemment.

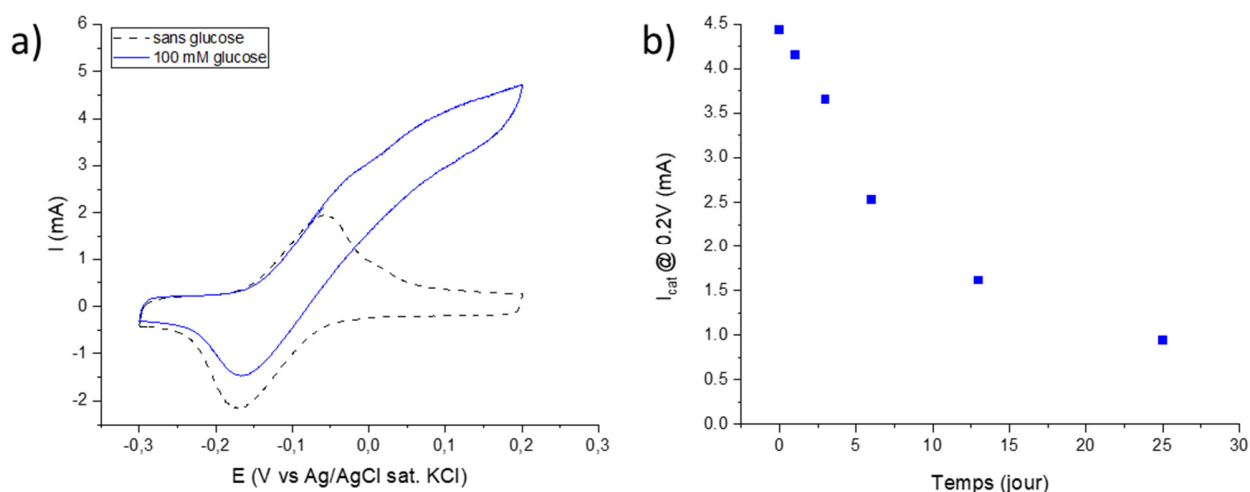


Figure 4.16 : a) Voltampérogrammes cycliques de la bioanode hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / hBP PLQ « drop coating » (petite taille) en absence du glucose (ligne pointillée, noire) et en présence du glucose à 100 mmol L^{-1} (ligne pleine, bleue) et b) sa stabilité dans le temps. Conditions expérimentales : $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB, pH 7,4 à 1 mV s^{-1} , 25°C , 250 tr/min.

La figure 4.16, a représente les voltampérogrammes cycliques de la bioanode basée sur deux hBPs et le PLQ déposé par la méthode de « drop coating ». Il apparaît que l'intensité du signal rédox afférent à PLQ est presque 2 fois plus élevée que celle observée pour l'électrode hybride élaborée avec deux types de BP. Par contre, au niveau de la catalyse l'anode de type hybride est plus performante, que celle avec les deux BPs de laboratoire ($5,13 \text{ mA}$ vs. $4,46 \text{ mA}$ à $0,2\text{V}$). Ce comportement pourrait être expliqué par le fait que les BPs fabriqués au laboratoire à partir de nanotubes beaucoup plus petits que ceux constituant les buckypapers commerciaux, présentent une porosité moins importante que celle des cBPs et donc une diffusion du glucose plus faible.

Bilan sur les électrodes à cavité à base de FAD GDH

Le tableau 4.2 résume les performances électrocatalytiques des bioanodes à cavité en fonction de la nature du médiateur et de l'effet de la méthode de fabrication des buckypapers. Pour rappel, les bioanodes n'étant pas les électrodes qui vont limiter les performances des biopiles, l'optimisation n'a pas été approfondie comme cela a pu être fait avec les biocathodes.

Tableau 4.2 : Récapitulatif des performances des bioanodes à cavité enregistrées dans 0,1 mmol L⁻¹ PB à pH 7,4 et 25°C, valeurs mesurées à 0,3V

Type d'électrode	I, mA	j_{cat}, mAcm⁻²
<i>hBP+PLQ "one pot" / FAD GDH / cBP</i>	2,76	3,58
<i>hBP+1,4-NQ "one pot" / FAD GDH / cBP</i>	0,254	0,330
<i>hBP+PLQ "drop coating" / FAD GDH / cBP+PLQ "drop coating"</i>	5,13	6,67
<i>hBP+1,4-NQ "drop coating" / FAD GDH / cBP+1,4-NQ "drop coating"</i>	3,97	5,15
<i>hBP+PLQ "drop coating" / FAD GDH / hBP+PLQ "drop coating" à 0,2V</i>	4,46	5,79

Conclusion

Ce chapitre s'est focalisé sur l'élaboration d'un nouveau concept d'électrode visant à utiliser les biocatalyseurs de type BOx et FAD GDH pour, respectivement, la réduction du dioxygène et l'oxydation du glucose.

La première partie a permis de décrire le concept lui-même, ainsi que l'originalité et l'intérêt de ce nouveau type d'électrode. Outre, la procédure de la fabrication des matériaux à base de nanotubes de carbone, la méthode de fabrication des bioélectrodes creuses (électrode à cavité) a été expliquée. Ces électrodes consistent en une association par collage de deux feuilles de buckypapers modifiés ou pas, formant une microcavité capable du piégeage des enzymes.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, l'élaboration d'une biocathode à cavité visant la réduction de O₂ a été décrite. En premier lieu, les électrodes de grande taille ont été élaborées pour faciliter l'étape de fabrication manuelle. Les biocathodes initiales simplement basées sur l'incorporation de BOx ont été testées vis à vis de la réduction de O₂ par le DET. Les systèmes simples avec la BOx en tant qu'enzyme ont été donc élaborés et décrits. Les résultats obtenus confirment qu'une réduction de O₂ par le DET avec cette configuration de biocathode est possible. Ensuite, les recherches ont été orientées vers l'optimisation des cathodes. Pour cela, le hBP a été modifié avec l'hémine dans le but d'orienter les enzymes sur la surface des buckypapers afin d'améliorer la connexion directe des enzymes. Grâce à ces modifications, on a pu avoir un doublement de l'intensité du courant catalytique (-2,67 mA vs -1,24 mA soit -1,01 mA cm⁻² vs -0,47 mA cm⁻²). La stabilité au stockage en solutions de ces deux types de cathode a été aussi évaluée. Les cathodes simples n'ayant que la BOx pour effectuer la réduction de O₂ sont opérationnelle pendant 75 jours avec 7% de l'activité initiale à ce terme, alors que les cathodes avec la BOx orientée peuvent fournir du courant jusqu'à 6 mois, leur activité électrocatalytique représentant 11% de l'activité initiale à ce terme. Pour confirmer l'intérêt de la modification du BP par l'hémine, une analyse des différents BPs a été effectuée. L'hydrophobicité a été examinée par la méthode d'angle du contact et la structure morphologique a été explorée par MEB. En conclusion de cette étude, on peut dire que l'hémine rend la surface du BP complètement hydrophile toute en changeant sa morphologie.

Prenant en compte que le concept d'électrode creuse présente la possibilité de moduler la quantité d'enzyme emprisonnée dans la cavité selon le besoin, une étude de l'influence de la quantité de BOx sur les performances catalytiques a été explorée. Cela nous a montré que l'utilisation de 2 mg d'enzyme est raisonnable vis-à-vis des performances, tout en constituant une réserve de catalyseur pour les électrodes de grande taille. L'influence de la température et du pH a été aussi décrite, montrant que la température de 37°C n'a pas d'impact sur la biocathode, cependant, le pH physiologique de 7,4 a une influence négative.

La deuxième recherche visant l'optimisation de la cathode a été basée sur la combinaison des processus de transfert direct et indirect d'électron pour la même électrode. Pour cela, le médiateur redox ABTS sous forme de poudre a été ajouté dans la cavité avec l'enzyme. Cette modification a permis encore d'amplifier les performances de la cathode de 43 % par rapport aux

performances observées avec la biocathode basée seulement sur le processus DET par la BOx orientée (-3,83 mA vs -2,67 mA soit -1,45 mA cm⁻² vs -1,01 mA cm⁻²).

La troisième partie de ce travail a consisté à miniaturiser les biocathodes dans le but de réduire la taille des futures biopiles en vue de leur implantation dans un animal. Les dimensions de la cathode ont donc été diminuées d'environ un facteur 4 (réduction de la surface géométrique de 2,65 cm² à 0,77 cm²). Les électrodes de petite taille simple avec la BOx seule et avec la BOx orientée par l'hémine ont été élaborées. Comme résultat, les performances par unité de surface d'électrode avec la BOx seule sont équivalentes à celles des électrodes semblables à grande taille (-0,32 mA vs -1,24 mA et -0,42 mA cm⁻² vs -0,47 mA cm⁻²). Par contre, pour les biocathodes avec la BOx orientée, leurs performances par unité de surface sont deux fois plus élevées que celles des grandes tailles (-1,46 mA vs -2,67 mA et -1,90 mA cm⁻² vs -1,01 mA cm⁻²).

Pour terminer les études sur les cathodes, une nouvelle approche n'utilisant que des hBP a été proposée. Deux types d'électrodes ont été étudiées : les cathodes avec la BOx orientée pour DET et les cathodes avec la BOx orientée et médiée par l'ABTS pour la combinaison du DET et MET. Ces études ont montré que les deux configurations proposées semblent être les plus performantes parmi toutes celles étudiées. Ces électrodes, n'ayant pas pu être reproduites par manque de temps, nécessiteront d'être plus évaluées plus profondément avant d'envisager leur implantation.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre s'est focalisée sur le bref développement d'une bioanode à cavité, pour pouvoir former une biopile dans le futur. Pour les bioanodes creuses, la FAD GDH a été utilisée en tant qu'enzyme. Etant donné que cette enzyme nécessite un médiateur pour effectuer le transfert d'électron, les études de deux types de médiateurs tels que le PLQ et le 1,4-NQ et deux façons de les déposer ont été explorées.

Pour commencer, une méthode « one pot » d'ajout du médiateur a été proposée. Cette méthode consiste en la modification des nanotubes de carbone avant la formation du hBP. Les deux électrodes faites avec le hBP modifié par « one pot » par le PLQ et 1,4-NQ ont été analysées. L'utilisation du PLQ dans cette configuration permet d'obtenir une anode efficace qui fournit en présence de glucose jusqu'à 2,76 mA en courant anodique et qui est fonctionnelle pendant 25 jours, contrairement au 1,4-NQ qui ne s'avère pas performant. Une autre méthode d'ajout du médiateur a donc ensuite été proposée. Cette méthode consiste en la modification des deux BPs (hBP et cBP) par « drop coating ». Cela signifie qu'on ajoute le médiateur en solution en déposant des gouttes de celui-ci sur la surface des BPs. En utilisant cette méthode, on a pu améliorer les performances des anodes avec le PLQ en tant que médiateur de 86% (5,13 mA vs 2,76 mA et 6,67 mA cm⁻² vs 3,58 mA cm⁻²). En ce qui concerne le 1,4-NQ, la nouvelle méthode a permis de réaliser une bioanode électrocatalytiquement performante qui fournit 3,97 mA de courant. Par contre, cette dernière reste moins efficace que celle à base de PLQ. Pour terminer les études sur les bioanodes, une approche d'utilisation de deux hBP a aussi été explorée. Cette étude a confirmé que la concentration de PLQ sur l'électrode est bien doublée, en revanche, au niveau de ces performances en courant l'anode hybride reste la meilleure.

Chapitre 4. Bioélectrodes creuses (à cavité) basées sur l'assemblage des buckypapers

En perspective, pour développer les recherches sur les biocathodes à cavité, il serait intéressant d'étudier en détail les performances des électrodes à base de deux disques de hBP. De plus, une étude de l'influence de la quantité d'ABTS dans la cavité pourrait être intéressante afin de pouvoir augmenter le courant catalytique. Enfin, une étude de la quantité d'enzyme à l'intérieur de la cavité des petites électrodes en comparaison aux résultats obtenus pour les grandes électrodes pourrait confirmer ou infirmer l'hypothèse proposée selon laquelle le plateau observé pour les grandes électrodes serait liés à une limitation du courant par la diffusion du dioxygène.

Pour améliorer les bioanodes, il serait intéressant d'approfondir les recherches concernant les médiateurs. Par exemple, étudier l'influence de la quantité de médiateur voire tester d'autres types de médiateurs. Les explorations sur l'influence de la température, du pH ou de la quantité d'enzyme dans la cavité sur les performances des bioanodes sont aussi souhaitables.

A ce stade, nous avons mis au point les deux électrodes, biocathode et bioanode. La réalisation d'une biopile complète avec une implantation *in vivo* peut donc être envisagée.

Bibliographie

- [1] L. Wang, X. Wu, B. S. Q. Su, R. Song, J.-R. Zhang, and J.-J. Zhu, “Enzymatic Biofuel Cell: Opportunities and Intrinsic Challenges in Futuristic Applications,” *Advanced Energy and Sustainability Research*, vol. 2, no. 8, p. 2100031, Aug. 2021, doi: 10.1002/aesr.202100031.
- [2] X. Xiao *et al.*, “Tackling the Challenges of Enzymatic (Bio)Fuel Cells,” *Chemical Reviews*, vol. 119, no. 16. American Chemical Society, pp. 9509–9558, Aug. 28, 2019. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00115.
- [3] J. L. Zhang, Y. H. Wang, K. Huang, K. J. Huang, H. Jiang, and X. M. Wang, “Enzyme-based biofuel cells for biosensors and in vivo power supply,” *Nano Energy*, vol. 84. Elsevier Ltd, Jun. 01, 2021. doi: 10.1016/j.nanoen.2021.105853.
- [4] A. Nasar and R. Perveen, “Applications of enzymatic biofuel cells in bioelectronic devices – A review,” *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 44, no. 29. Elsevier Ltd, pp. 15287–15312, Jun. 07, 2019. doi: 10.1016/j.ijhydene.2019.04.182.
- [5] J. L. Hammond, A. J. Gross, F. Giroud, C. Travelet, R. Borsali, and S. Cosnier, “Solubilized Enzymatic Fuel Cell (SEFC) for Quasi-Continuous Operation Exploiting Carbohydrate Block Copolymer Glyconanoparticle Mediators,” *ACS Energy Lett*, vol. 4, no. 1, pp. 142–148, Jan. 2019, doi: 10.1021/acseenergylett.8b01972.
- [6] Z. Li, Z. Kang, B. Wu, and Z. Zhu, “A MXene-based slurry bioanode with potential application in implantable enzymatic biofuel cells,” *J Power Sources*, vol. 506, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.jpowsour.2021.230206.
- [7] Y. Nedellec *et al.*, “Microcapsule-based biosensor containing catechol for the reagent-free inhibitive detection of benzoic acid by tyrosinase,” *Biosens Bioelectron*, vol. 180, May 2021, doi: 10.1016/j.bios.2021.113137.
- [8] X. Chen, A. J. Gross, F. Giroud, M. Holzinger, and S. Cosnier, “Comparison of Commercial and Lab-made MWCNT Buckypaper: Physicochemical Properties and Bioelectrocatalytic O₂ Reduction,” *Electroanalysis*, vol. 30, no. 7, pp. 1511–1520, 2018, doi: 10.1002/elan.201800136.
- [9] A. J. Gross *et al.*, “A High Power Buckypaper Biofuel Cell: Exploiting 1,10-Phenanthroline-5,6-dione with FAD-Dependent Dehydrogenase for Catalytically-Powerful Glucose Oxidation,” *ACS Catal*, vol. 7, no. 7, pp. 4408–4416, Jul. 2017, doi: 10.1021/acscatal.7b00738.
- [10] E. I. Solomon, R. K. Szilagy, S. DeBeer George, and L. Basumallick, “Electronic Structures of Metal Sites in Proteins and Models: Contributions to Function in Blue Copper Proteins,” *Chemical Reviews*, vol. 104, no. 2. American Chemical Society, pp. 419–458, 2004. doi: 10.1021/cr0206317.
- [11] N. Lalaoui, A. le Goff, M. Holzinger, and S. Cosnier, “Fully Oriented Bilirubin Oxidase on Porphyrin-Functionalized Carbon Nanotube Electrodes for Electrocatalytic Oxygen Reduction,” *Chemistry - A European Journal*, vol. 21, no. 47, pp. 16868–16873, 2015, doi: 10.1002/chem.201502377.
- [12] N. Mano and L. Edembe, “Bilirubin oxidases in bioelectrochemistry: Features and recent findings,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 50. pp. 478–485, Dec. 15, 2013. doi: 10.1016/j.bios.2013.07.014.

**CHAPITRE 5. BIOPILES ENZYMATIQUES *IN*
VITRO ET *IN VIVO***

Introduction	155
5.1 Biopiles à base d'électrodes à compression	156
5.1.1 Biopiles à compression in vitro	156
5.1.2 Stérilisation de systèmes électrochimiques	163
5.1.2.1 Stérilisation chimique par la chlorhexidine	165
5.1.2.2 Étude bactériologique	166
5.1.2.3 Étude d'influence de la stérilisation sur les bioélectrodes et la biopile	169
5.1.3 Biopiles à compression vers l'implantation	173
5.1.4 Biopile à compression post – in vivo	174
5.2 Biopiles aux électrodes à cavité.....	176
5.2.1 Biopiles à cavité in vitro.....	176
5.2.2 Biopiles à cavité in vivo	183
5.2.3 Biopile à cavité post - in vivo.....	185
Conclusion	189
Bibliographie	193

Introduction

Les dispositifs médicaux implantables (DMI) alimentés par les batteries, tels que les stimulateurs cardiaques, les pompes d'administration de médicaments et les biocapteurs de glucose, révolutionnent la surveillance et la gestion des soins de santé. Les biopiles enzymatiques qui convertissent l'énergie chimique en l'énergie électrique, à partir de substrats naturellement présents dans le corps, via des électrodes enzymatiques, constituent une alternative écologique aux batteries miniatures pour la production d'énergie [1]. Ces dernières années ont vu l'émergence des biopiles enzymatiques de type glucose/O₂ comme sources d'énergie implantables prometteuses pour l'électronique de faible puissance, malgré des problèmes majeurs à résoudre, notamment une puissance de sortie, une durée de vie, une biocompatibilité et une possibilité de leur stérilisation qui sont limitées [2], [3]. Le glucose et le dioxygène étant abondants dans le corps humain, les DMI implantables pourraient être alimentés à partir des ressources du corps de manière autonome. Des progrès significatifs dans le domaine des biopiles *in-vivo* ont été réalisés depuis 2010, lorsque notre équipe a rapporté le premier exemple d'une biopile à combustible enzymatique implantée dans un animal qui produisait de l'énergie à partir de glucose et de dioxygène [4]. Katz *et al.*, ainsi que d'autres équipes, ont réalisé de nombreux développements sur les biopiles *in-vivo* fonctionnant chez les invertébrés et d'autres mammifères [5]–[11], tandis que Lee *et al.* ont récemment étendu leurs recherches à l'implantation de biopile enzymatique chez les oiseaux [12]. La possibilité d'alimenter des dispositifs électroniques *in-vivo* ou dans des biofluides artificiels avec une gestion appropriée de la puissance a été démontrée pour alimenter des dispositifs électroniques tels qu'une LED, un stimulateur cardiaque, un capteur de température et un neurostimulateur [7], [10], [12], [13]. Les puissances de sortie sont typiquement de l'ordre de 10 à 100 μ W et loin des plusieurs mW qui peuvent être atteints avec des biopiles à combustible fonctionnant à l'extérieur du corps. Les performances limitées *in-vivo* sont dues à des facteurs tels que la faible concentration en dioxygène, l'encrassement biologique qui limite la diffusion des substrats, la réaction de rejet à la présence de corps étrangers et la désactivation et/ou l'inhibition des enzymes des électrodes de la biopile. Les derniers développements sur les biopiles implantées incluent une gestion avancée de l'énergie et des systèmes sans fil pour surveiller et contrôler l'activité des biopiles [5], [10], [12], [14], ainsi que la démonstration *in-vivo* du fonctionnement pendant 1 à 2 mois [5], [15]. Des progrès récents ont été réalisés dans le développement d'interfaces antisalissures biocompatibles, par exemple à base d'alcool polyvinylique (PVA), de chitosane réticulé et de matrices zwitterionique [5], [15], [16].

Dans ce chapitre nous présentons deux types de biopiles : une biopile à base d'électrodes à compression et une biopile à base d'électrodes à cavité. Ces deux configurations de biopiles sont basées sur nos recherches précédemment présentées dans le Chapitre 2 et le Chapitre 4, concernant les études sur les demi-piles.

Les biopiles implantables destinées à entrer en contact avec des tissus, des vaisseaux ou des fluides corporels stériles doivent être exempts de toute contamination microbienne susceptible d'entraîner la transmission de maladies. La désinfection et la stérilisation des biopiles enzymatiques implantables est un sujet difficile et largement négligé en raison de l'incompatibilité des composants biocatalytiques fragiles avec les traitements classiques. Ici on

présente le développement d'un traitement chimique "doux" et pratique, basé sur l'immersion des bioélectrodes enzymatiques et de la biopile dans une solution de digluconate de chlorhexidine (CHx) aqueuse diluée. Les bioélectrodes et la biopile à compression ont été choisis pour réaliser ce travail. L'effet du traitement à la chlorhexidine sur les biopile glucose/O₂ en l'absence et en présence d'un sac de dialyse perméable en ester de cellulose est également décrit.

Enfin, les premiers fonctionnements de deux types de biopiles dans un sac de dialyse sont rapportés après l'implantation dans l'abdomen d'un rat, ainsi que leur exploration *post-in vivo* après avoir retiré la biopile de l'animal.

5.1 Biopiles à base d'électrodes à compression

Précédemment, dans le chapitre 2, nous avons développé une procédure simplifiée de fabrication des bioélectrodes autoportantes à compression et nous avons aussi exploré leurs performances électrocatalytiques. Pour continuer nos recherches avec ce type d'électrode, nous avons sélectionné une biocathode de composition « CNTs / hémine / BO_x » et une bioanode de composition « CNTs / 1,4-NQ / GO_x / catalase ». Le but de nos recherches est de fabriquer une biopile à base de ces deux électrodes et de l'implanter *in vivo* dans un rat. Dans cette partie du chapitre, les brèves études d'une biopile à compression *in vitro* et une étude de stérilisation avec son effet sur les performances électrocatalytiques sont présentées. Pour finir cette partie, les premières expériences *in vivo* avec ce type de biopile, ainsi que leur exploration *post in vivo* sont également décrites.

5.1.1 *Biopiles à compression in vitro*

Tout d'abord, les deux bioélectrodes choisies pour former une biopile à compression sont fabriquées par la méthode présentée dans le chapitre 2 (partie 2.1.1, figure 2.1). Ensuite, la bioanode et la biocathode ont été connectées dans une configuration de biopile sur un support polymérique imprimé en 3D, comme le montre la figure 5.1, a. Nous avons utilisé un support 3D en acide polylactique (PLA) pour fixer les électrodes afin d'éviter les courts-circuits, les contacts indésirables de l'électrode avec d'autres interfaces ou une diffusion limitée des substrats. Ce support permet aussi de maintenir une configuration face à face reproductible avec un espacement inter-électrodes contrôlé. Dans le cas de l'implantation, la biopile fabriquée sera introduite dans un nécessaire sac de dialyse hydrophile rempli d'électrolyte (Figure 5.1, b). L'ajout d'un sac de dialyse est important pour l'implantation *in vivo*, car cela permet de protéger l'organisme de l'influence de la pile en cas de problème comme sa destruction et/ou des réactions indésirables. On verra plus tard que le sac de dialyse sera associé à un autre matériau biocompatible (un tissu chirurgical) qui lui, protégera la pile de l'influence de l'organisme.

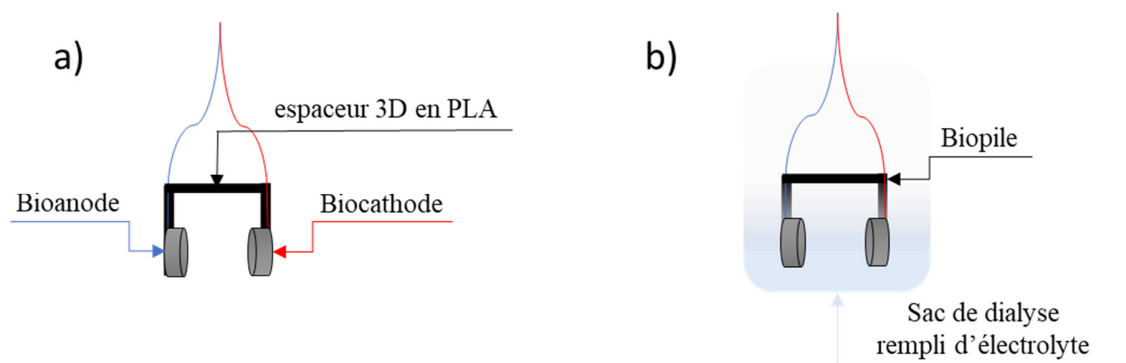


Figure 5.1 : Représentation schématique d'une biopile à compression a) – sans le sac de dialyse et b) – dans un sac de dialyse.

Pour commencer, les performances de la biopile à compression de configuration 1 (directement comme elle est fabriquée) et de la configuration 2 (avec le sac de dialyse en plus) sont étudiées. La figure 5.2, a présente les courbes de polarisation et de puissance d'une biopile à compression telle qu'elle est fabriquée. Les expériences ont été effectuées dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ à pH 7,4 avec la saturation en substrats enzymatiques (barbotage de O_2 , 100 mmol L^{-1} de glucose). Les performances de la biopile ont été étudiées par la méthode de voltampérométrie à balayage linéaire (linear sweep voltammetry, LSV).

On peut constater qu'une telle biopile à compression peut fournir $98 \mu\text{W}$ en puissance (soit $350 \mu\text{W cm}^{-2}$ en densité de puissance) avec un courant maximum de $0,292 \text{ mA}$ et une f.é.m. de $0,51 \text{ V}$.

Ensuite, la biopile enchâssée dans un sac de dialyse a été caractérisée. Un sac de dialyse avec un « cut-off » de $3,5\text{-}5 \text{ kDa}$ a été choisi. Ce choix est fait avec le but de permettre une diffusion libre des substrats (O_2 et glucose), et d'empêcher une diffusion possible des composants d'électrode (enzymes, médiateurs, nanotubes de carbone) dans l'organisme. La figure 5.2, b montre les courbes de polarisation et de puissance correspondantes. Une biopile dans le sac de dialyse a une f.é.m. de $0,51 \text{ V}$, un courant maximum de $0,214 \text{ mA}$ et fournit $77 \mu\text{W}$ en puissance (soit $275 \mu\text{W cm}^{-2}$ en densité de puissance). Une perte de la puissance autour de 21% est observée. Cette perte peut être causée par la diffusion ralentie des substrats à travers les parois du sac de dialyse. C'est ce que montre les courbes de polarisation puisque l'on voit apparaître une limitation du courant avec le sac de dialyse qui n'est pas visible avec la biopile sans le sac. Par ailleurs, la f.é.m. est similaire avec ou sans sac.

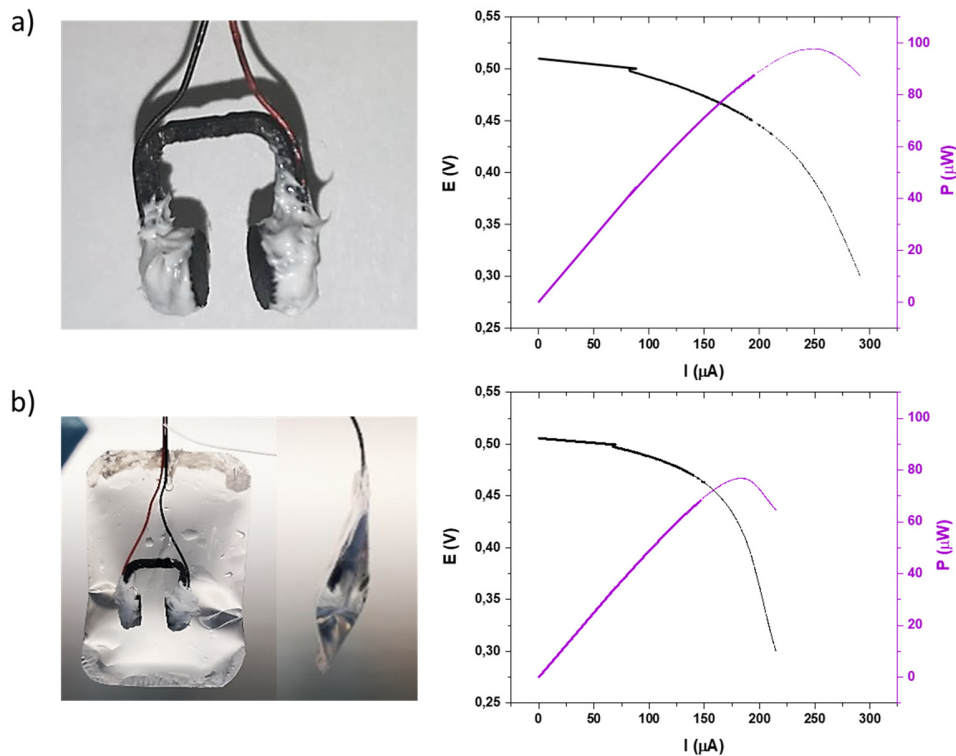


Figure 5.2 : Courbes de polarisation et de puissance obtenues par la méthode LSV d'une biopile composée de la biocathode à compression CNTs / Hémine / BOx et de la bioanode à compression CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase : a) sans le sac de dialyse, b) – dans le sac de dialyse (« cut-off » 3,5 – 5 kDa). Conditions expérimentales : barbotage de O₂, 100 mmol L⁻¹ de glucose, PB 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, 1 mV s⁻¹, 25°C.

À présent, on s'intéresse aux performances de nos biopiles dans des conditions qui se rapprochent des conditions *in vivo*.

Nous avons testé la biopile de configuration 1 (telles qu'elle a été fabriquée) dans le tampon phosphate salin (PBS) à pH 7,4. Le tampon choisi présente une osmolalité et des concentrations ioniques (10 mmol L⁻¹ PB + 137 mmol L⁻¹ NaCl + 2,7 mmol L⁻¹ KCl) qui correspondent à celles du corps humain (isotonie). Les concentrations des substrats dans l'organisme vivant sont autour de 5 mmol L⁻¹ en glucose et 42 μmol L⁻¹ en O₂ [17], [18]. Ces concentrations sont extrêmement basses et vont être des obstacles pour le fonctionnement de la pile. Dans ce travail, nous avons décidé de réaliser nos expériences *in vitro* avec 5 mmol L⁻¹ de glucose ce qui correspond à la concentration physiologique mais sans contrôle de la concentration en O₂, c'est-à-dire en solution tampon directement équilibrée à l'air. Ceci afin d'évaluer les performances dans des conditions faciles à mettre en œuvre. La concentration de O₂ dans la solution tampon à l'air est de l'ordre 200 μmol L⁻¹, mais tenant compte de la difficulté de contrôler la concentration de O₂ au laboratoire, nous assumons de travailler à l'air supposant qu'on se rapproche au maximum de la réalité du fonctionnement *in vivo*.

Les mesures ont été effectuées par la méthode LSV avec une vitesse de balayage en potentiel à 1 mV s⁻¹. La figure 5.3, a présente les courbes de polarisation et de puissance de la biopile à compression dans le PBS avec les conditions en substrats non saturés. On constate que, dans ces

conditions la biopile peut fournir $14 \mu\text{W}$ ($50 \mu\text{W cm}^{-2}$). La f.é.m. est égale à $0,42 \text{ V}$ alors que le courant maximum est de l'ordre de $0,036 \text{ mA}$. En parallèle, pour évaluer l'influence des concentrations de substrats nous avons effectué une caractérisation dans le même tampon, mais en condition saturé en substrats (100 mmol L^{-1} de glucose et barbotage de O_2) (Figure 5.3, b). La puissance de notre biopile en conditions saturées a doublé par rapport à celle en conditions non saturées ($28 \mu\text{W}$ vs $14 \mu\text{W}$), son courant maximum a triplé ($0,092 \text{ mA}$ vs $0,036 \text{ mA}$), alors que la f.é.m. a légèrement diminué de $0,42 \text{ V}$ vers $0,39 \text{ V}$. Nous confirmons donc, que les performances de la biopile à compression seront limitées par les concentrations en substrats. Nous pouvons aussi constater que le changement de tampon sans changement de pH (PBS au lieu de PB) met à mal les performances de la biopile alors que les substrats sont en forte concentration ($28 \mu\text{W}$ contre $98 \mu\text{W}$ pour la puissance maximale, $0,092 \text{ mA}$ contre $0,292 \text{ mA}$ pour le courant maximum et $0,39 \text{ V}$ contre $0,51 \text{ V}$ pour la f.é.m.). On peut supposer que l'ion chlorure présent dans le tampon PBS, qui est un inhibiteur des oxydases multicuivre [19], est le responsable des baisses de la puissance, du courant et de la f.é.m. observés.

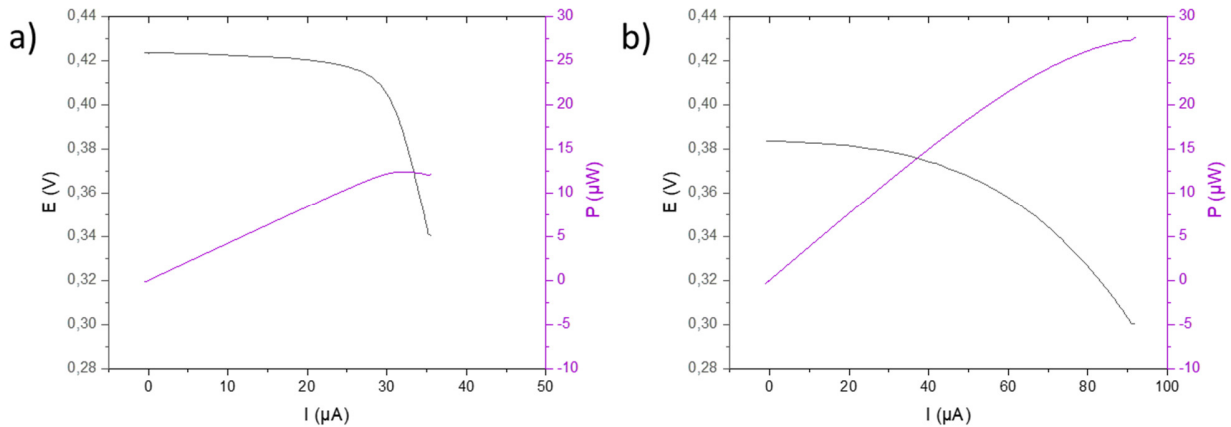


Figure 5.3 : Courbes de polarisation et de puissance obtenues par la méthode LSV d'une biopile composée de la biocathode à compression CNTs / Hémine / BOx et de la bioanode à compression CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase sans le sac de dialyse. Conditions expérimentales : a) - O_2 à l'air, 5 mmol L^{-1} de glucose, PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH $7,4$, 1 mV s^{-1} , 25°C ; b) - barbotage de O_2 , 100 mmol L^{-1} de glucose, PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH $7,4$, 1 mV s^{-1} , 25°C

En effectuant les mesures par LSV, avec une vitesse de balayage en potentiel de 1 mV s^{-1} , on n'est pas dans un régime stationnaire et les valeurs de puissances peuvent être différentes de celles qui seraient obtenues en régime parfaitement stationnaire. De ce fait, on a effectué une caractérisation électrochimique par la méthode de « charge/décharge » via la méthode de chronopotentiométrie (CP) à courant imposé pendant 15 s en faisant varier le courant imposé de chaque cycle de « charge/décharge ». De cette manière, on pourra comparer les deux méthodes de détermination des caractéristiques de la biopile.

Les valeurs des potentiels mesurés correspondant à chaque cycle de charge/décharge obtenu à courant constant sont notées et la puissance de la pile a été calculée selon la formule suivante :

$$I_{\text{appliqué}} \times E_{\text{enregistré}} = P$$

Chapitre 5. Biopiles enzymatiques in vitro et in vivo

La figure 5.4 représente les courbes de polarisation et de puissance de la biopile à compression dans le PBS dans les conditions en substrats non saturés. Elle fournit jusqu'à $64 \mu\text{W}$ de puissance ($229 \mu\text{W cm}^{-2}$) à une courant maximum de $0,6 \text{ mA}$, son f.é.m. est de $0,43 \text{ V}$. On voit que la puissance et le courant maximum sont plus élevés alors que la f.é.m. reste quasiment identique à celle de la même biopile étudiée par la méthode LSV. Comme attendu, on voit que la méthode « charge/décharge » ne donne pas les mêmes valeurs que la méthode LSV. De plus, la méthode « charge/décharge » est la méthode qui permet récupérer les valeurs de puissance et de courant les plus élevés de la biopile.

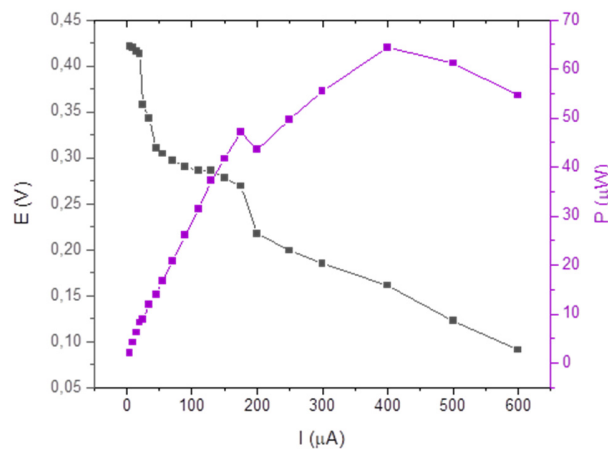


Figure 5.4 : Courbes de polarisation obtenues par la méthode « charge/décharge » par CP d'une biopile composée de la biocathode à compression CNTs / Hémine / BOx et de la bioanode à compression CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase sans le sac de dialyse. Conditions expérimentales : O_2 à l'air, 5 mmol L^{-1} de glucose, PBS $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, 1 mV s^{-1} , 25°C

La prochaine étape est l'étude de la biopile à compression dans un milieu mimant parfaitement le vivant. On prévoit d'implanter nos biopiles dans la zone de l'abdomen chez un animal, donc entre les organes. Pour mimer le milieu correspondant un électrolyte représentant un milieu extracellulaire artificiel à pH 7,4 est utilisé. Sa composition chimique est donnée dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Composition d'un milieu extracellulaire artificiel

<i>Electrolyte extracellulaire artificiel</i>	
Composant	Concentration
PBS (tampon phosphate salin)	10 mmol L ⁻¹
NaCl (chlorure de sodium)	154 mmol L ⁻¹
KCl (chlorure de potassium)	3 mmol L ⁻¹
MgCl ₂ (chlorure de magnésium)	1 mmol L ⁻¹
CaCl ₂ (chlorure de calcium)	2 mmol L ⁻¹
C ₆ H ₇ NaO ₆ (ascorbate de sodium)	0,5 mmol L ⁻¹
albumine	10 g L ⁻¹
C ₆ H ₁₂ O ₆ (glucose)	5 mmol L ⁻¹

Les caractérisations électrochimiques de la biopile à compression dans ce milieu extracellulaire artificiel ont été réalisées à 37°C pour se rapprocher des conditions *in vivo* en utilisant la température physiologique.

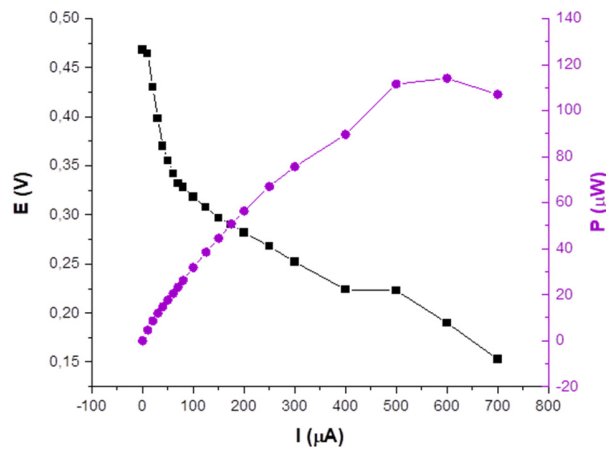


Figure 5.5 : Courbes de polarisation et de puissance obtenues par la méthode « charge/décharge » par CP d'une biopile composée de la biocathode à compression CNTs / Hémine / BOx et de la bioanode à compression CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase. Conditions expérimentales : O₂ à l'air, 5 mmol L⁻¹ de glucose, milieu extracellulaire artificiel, pH 7,4, 1 mV s⁻¹, 37°C

Sur l'exemple de la courbe de polarisation et de puissance présenté sur la figure 5.5 nous notons que la biopile a une f.é.m. de 0,47 V et est capable de fournir une puissance de 114 µW (407 µW cm⁻²) à 0,6 mA dans un milieu et dans des conditions très rapprochés du milieu physiologique. Le courant maximum est égal à 0,7 mA. Les biopiles ont été également testées dans le temps et sont capables de fournir de l'énergie au moins pendant une semaine en subissant des processus de charge-décharge de manière quotidienne (données non présentées).

Pour pouvoir implanter la biopile, elle doit être protégée du contact direct avec le corps pour diminuer les réactions inflammatoires de l'organisme et protéger la pile d'un possible développement fibreux de capsule par l'activation des monocytes et des macrophages de cellules immunitaires qui pourraient se fixer à la surface de l'électrode ou sur le sac de dialyse. Il nous faut donc trouver un matériau de protection externe permettant la diffusion des substrats et qui soit biocompatible. Ce matériau sera rajouté par-dessus le sac de dialyse.

Nous avons envisagé d'utiliser un tissu chirurgical stérile de type SWING-MESH®. Il s'agit d'un tissu compatible pour des implants abdominaux utilisé dans des applications cliniques chez l'homme. Ce tissu très fin à l'avantage d'être parfaitement perméable à la solution.

Nous avons donc effectué une caractérisation de la biopile sans et enchâssée dans le tissu chirurgical. Nous n'avons pas utilisé le sac de dialyse dans cette étude pour pouvoir étudier l'influence du tissu chirurgical seul sur la biopile. L'image de la biopile dans le tissu chirurgical est présenté sur la figure 5.6, b. On peut voir avec cette photo que la biopile est visible en transparence à l'intérieur du sac chirurgical.

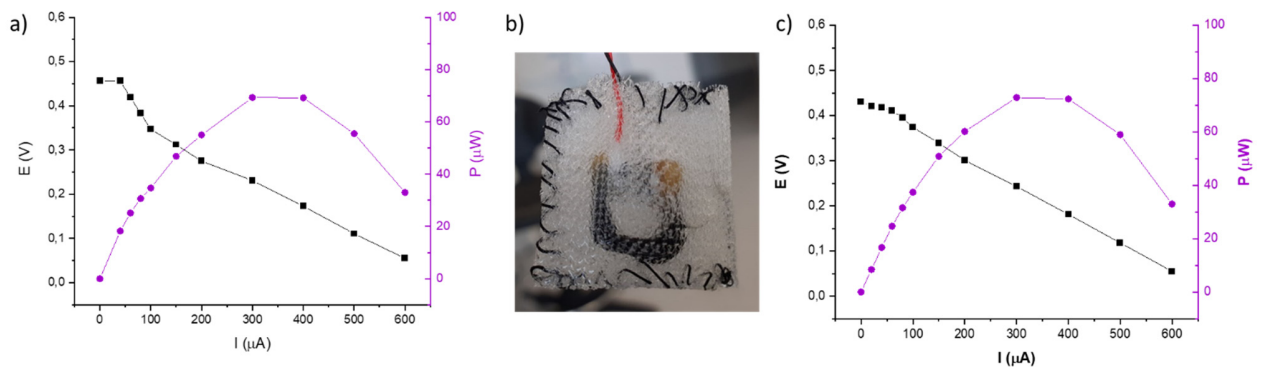


Figure 5.6 : Courbes de polarisation et de puissance obtenues par la méthode « charge/décharge » par CP d'une biopile composée de la biocathode à compression CNTs / Hémine / BOx et de la bioanode à compression CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase sans le sac de dialyse : a) - telle que fabriquée, c) – dans le tissu chirurgical. Conditions expérimentales : O_2 à l'air, 5 mmol L^{-1} de glucose, milieu extracellulaire artificiel, pH 7,4, 1 mV s^{-1} , 37°C ; b) – Photo de la biopile dans le tissu chirurgical.

La caractérisation de la pile sans et avec tissu (Figures 5.6, a et 5.6, c, respectivement) nous ont montré que le tissu, qui sert habituellement pour les implants abdominaux stériles, assure une bonne diffusion des substrats et permet de faire fonctionner la biopile. La puissance de la pile sans et avec le tissu correspond à $69 \mu\text{W}$ et $73 \mu\text{W}$, respectivement avec un courant maximum de $0,6 \text{ mA}$ identique dans les deux cas. La f.é.m. de la biopile dans les deux configurations est du même ordre de grandeur ($0,46 \text{ V}$ et $0,43 \text{ V}$). L'augmentation de la puissance observée, confirme une meilleure activation des électrodes dans le temps. Les tests quotidiens ont également montré que la pile est stable pendant 9 jours (données non présentées). Ainsi, le tissu chirurgical permet que la biopile fonctionne en gardant des caractéristiques identiques à celles obtenues sans le tissu. Ce matériau sera par la suite utilisé pour ensacher la biopile avant son implantation.

Chapitre 5. Biopiles enzymatiques *in vitro* et *in vivo*

Après avoir étudié nos biopiles *in vitro* dans différentes conditions proches des conditions *in vivo*, on peut envisager leur implantation chez l'animal. Par contre, une implantation dans un organisme vivante exige un dispositif stérile, c'est-à-dire sans microorganismes et bactéries dangereuses pour l'animal. Dans la partie suivant de ce chapitre, nous proposons une méthode de stérilisation possible de nos systèmes avant de passer aux implantations *in vivo*.

Le tableau 5.2 résume les résultats obtenus pour la biopile aux bioélectrodes à compression testée dans de différentes conditions. Cette présentation permet de mettre en évidence les différents paramètres influençant les performances d'une biopile à compression. On remarquera que les f.e.m. sont du même ordre de grandeur pour un même pH ; que les puissances sont plus élevées avec la méthode « charge/décharge » qu'avec la méthode LSV ; qu'en abaissant les concentrations en substrats des enzymes, on obtient des puissances plus faibles ; qu'à 37°C les puissances sont plus élevées qu'à 25°C pour une même biopile et enfin que l'ajout du sac de dialyse ou du tissu chirurgical n'est pas dramatique pour les performances de la biopile même si le sac de dialyse a tendance à limiter la diffusion des substrats des enzymes.

Tableau 5.2 : Récapitulatif des performances des biopiles à compression dans de différentes conditions.

Biopile	Méthode de caractérisation	Concentration des substrats	Tampons, pH	f.é.m., V	I _{max} , mA	P _{max} , μW	J _{Pmax} , μW cm ⁻²
<i>Température 25°C</i>							
C: « CNTs / hémine / BOx » A: « CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase » telle que préparée	LSV	O ₂ saturé 100 mM glucose	PB; 6,5	0,51	0,292	98	350
C: « CNTs / hémine / BOx » A: « CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase » dans le sac de dialyse (3,5-5 kDa)				0,51	0,214	77	275
C: « CNTs / hémine / BOx » A: « CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase » telle que préparée	LSV	O ₂ à l'air 5 mM glucose	PBS; 7,4	0,42	0,036	14	50
		O ₂ saturé 100 mM glucose		0,39	0,092	28	100
C: « CNTs / hémine / BOx » A: « CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase » telle que préparée	« charge/décharge » via CP	O ₂ à l'air 5 mM glucose	PBS; 7,4	0,43	0,6	64	229
<i>Température 37°C</i>							
C: « CNTs / hémine / BOx » A: « CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase » telle que préparée	« charge/décharge » via CP	O ₂ à l'air 5 mM glucose	Milieu extracellulaire artificielle; 7,4	0,47	0,7	114	407
C: « CNTs / hémine / BOx » A: « CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase » telle que préparée	« charge/décharge » via CP	O ₂ à l'air 5 mM glucose	Milieu extracellulaire artificielle; 7,4	0,46	0,6	69	246
C: « CNTs / hémine / BOx » A: « CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase » dans le tissu chirurgical				0,43	0,6	73	260

5.1.2 Stérilisation de systèmes électrochimiques

L'infection bactérienne est un problème majeur associé aux dispositifs implantables au cours du processus chirurgical et de leur utilisation quotidienne. C'est donc un sujet important bien qu'il soit très peu étudié. Les bactéries *Staphylococcus à Gram positif*, notamment *S. epidermis*, *S. aureus*, *S. capitis*, *S. schleiferi* et *S. hominis*, sont une cause majeure d'infections liées aux dispositifs médicaux [20], [21]. Ces bactéries commensales de l'homme sont largement présentes à la surface de la peau et des mains en particulier. Pour prévenir les infections, la stérilisation est une étape essentielle de la préparation des dispositifs introduits dans la circulation sanguine ou en contact avec des tissus de l'organisme. Un dispositif médical stérile est un

dispositif qui est généralement accepté comme étant exempt de microorganismes viables, c'est-à-dire théoriquement à un niveau de $\leq 1 \times 10^{-6}$ microorganismes. Certaines recommandations différencient les dispositifs médicaux thermorésistants et thermosensibles. Par exemple, ces derniers nécessiteraient un "faible niveau de stérilisation" à un niveau d'assurance de stérilité (SAL) de 10^{-3} plutôt que le SAL de "stérilisation pharmaceutique" de 10^{-6} [22].

Les technologies de stérilisation des dispositifs médicaux les plus largement utilisées et acceptées sont la chaleur (vapeur ou sèche), l'oxyde d'éthylène gazeux (EtO) et les traitements par rayonnement (gamma, rayons X ou électrons) [23]. Les méthodes alternatives de stérilisation comprennent notamment les traitements au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et à l'ozone (O_3).

La stérilisation par la chaleur « humide » (par exemple autoclave) ou « sèche » est généralement réalisée à des températures respectives de ≥ 120 °C pendant 30 min et ≥ 170 °C pendant des durées plus longues. Ces méthodes sont à écarter pour les systèmes à base d'enzymes, sauf si des enzymes thermophiles développées de manière appropriée sont utilisées. *Ohsaka et al.* ont signalé la présence de glucose déshydrogénase et de laccase PQQ thermostables avec une activité même à 85 °C - 100 °C, bien que la performance énergétique ait été inférieure à des températures plus basses de 25 °C - 40 °C [24].

L'oxyde d'éthylène est un agent de stérilisation médical aussi couramment utilisé, mais il présente des inconvénients majeurs. Il est extrêmement inflammable et reconnu comme cancérigène, de plus il nécessite des installations spécialisées. Les installations et les méthodes sont strictement contrôlées mais, néanmoins plusieurs, parmi elles dans le monde, ont été fermées ces dernières années en raison des niveaux d'exposition élevés. L'EtO pourrait potentiellement être utilisé pour les biopiles *in-vivo*, d'autant plus qu'il est cité comme méthode de stérilisation des matrices de biocapteurs enzymatiques dans plusieurs brevets [25]–[27].

Dans les années 2000, *Ahmed et al.* ont procédé à une évaluation perspicace des traitements chimiques et d'irradiation gamma. Ils ont conclu que la dose « d'étalon d'or » pour la stérilisation finale à l'irradiation au rayon gamma est de 25 kGy. Cette dose était bien tolérée et assurait la stérilité du dispositif pour des électrodes enzymatiques à glucose [28]. *Martin et al.* ont rapporté une dose optimale de 12 kGy pour une biocathode à laccase. Cette dose était suffisante pour montrer l'absence d'infection de l'implant et pour "neutraliser" les spores de *Geobacillus stearothermophilus* tout en maintenant environ 70% de l'activité bioélectrocatalytique initiale [29], [30]. La même dose d'irradiation a également été utilisée pour une bioanode de glucose oxydase et une biopile glucose/ O_2 [5].

Les autres approches de stérilisation chimique comprennent l'utilisation de H_2O_2 vaporisé (VHP), d'ozone et de stérilisants chimiques liquides à base de H_2O_2 , de glutaraldéhyde, d'alcool isopropylique (IPA) et d'un mélange de digluconate de chlorhexidine (CHx) avec l'IPA [28], [31]–[33]]. Les méthodes VHP sont maintenant approuvées pour la stérilisation relativement rapide des dispositifs médicaux (par exemple, 30 min - 45 min) mais, comme l'EtO, elles nécessitent une manipulation particulière d'un produit chimique toxique. Les premières recherches sur l'utilisation des bioélectrodes de glucose suggèrent une dégradation substantielle de la réponse avec l'IPA et le mélange CHx/IPA et une très bonne « sensocompatibilité » pour les

traitements par une solution de glutaldéhyde alcanisée à 2 % (0,5 h à 8 h) et par du H₂O₂ à 0,6 % (4 jours), mais pas pour les traitements par du H₂O₂ à 0,93 % [28], [31]. Néanmoins, le traitement au glutaraldéhyde n'a pas permis de réduire le nombre de bactéries en dessous de 10⁻² spores dans les conditions testées contre *Bacillus subtilis* [28].

5.1.2.1 Stérilisation chimique par la chlorhexidine

La chlorhexidine est bien connue comme agent antimicrobien efficace contre les bactéries à *Gram positif*, les bactéries à *Gram négatif*, les champignons et les virus. À faible concentration (0,02 % - 0,06 %), la CHx a une activité bactériostatique tandis que des concentrations plus élevées, comme 0,12 %, sont connues pour être bactéricides [34].

La molécule CHx est cationique à pH neutre (Figure 5.7) et se lie aux membranes cellulaires (par exemple, par l'intermédiaire de phospholipides chargés négativement). Elle perturbe la fonction et la structure cellulaires, entraînant finalement la mort cellulaire par cytolyse avec libération de composants intracellulaires [34], [35]. La capacité antifongique est liée à la prévention de la formation de biofilms plutôt qu'à la perturbation de la membrane cellulaire.

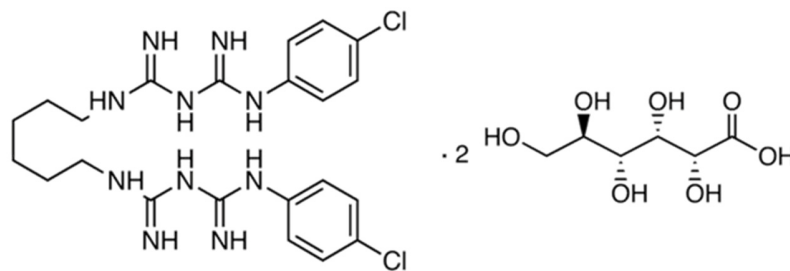


Figure 5.7 : Structure moléculaire du digluconate de chlorhexidine

La CHx est largement utilisé en milieu clinique pour la désinfection de la peau avant et pendant les interventions chirurgicales et les injections, pour stériliser les instruments et les dispositifs chirurgicaux (par exemple, les cathéters). Elle est aussi utilisée dans tout le domaine de la dentisterie et dans divers dispositifs d'administration de médicaments [34], [36].

Les dispositifs imprégnés de CHx chez l'animal montrent une activité anti-infectieuse prometteuse. Par exemple, la chlorhexidine a été associée à la sulfadiazine d'argent sur des cathéters veineux centraux Arrowgard Blue[®] [37], [38]. En 2011, un cathéter enduit de CHx a été autorisé pour un usage humain [39]. Plus tard, un implant orthopédique en Ti à base d'époxy libérant du CHx a montré une puissante activité bactéricide contre *S. aureus* et a été bien toléré *in-vivo* chez la souris, sans aucun signe de toxicité par l'analyse histologique malgré des concentrations locales élevées du CHx (5 à 10 % en poids) [40]. Les réactions d'hypersensibilité et les réactions graves sont rares mais elles existent. C'est pour cela que les directives générales consistent donc à limiter l'exposition directe du CHx avec le corps. Par exemple, les bains de bouche à base de CHx ne sont autorisés que pour une utilisation de 30 jours successifs. Les solutions ou gels de digluconate de CHx (jusqu'à 4 à 5 %) figurent dans la liste 2021 des médicaments essentiels de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). L'utilisation du CHx comme une méthode alternative de stérilisation des bioélectrodes a été proposée par *Ahmed et al.*

Chapitre 5. Biopiles enzymatiques in vitro et in vivo

dont l'étude portait sur les aiguilles de bioélectrodes avec la GOx pour les biocapteurs implantables [31]. Dans ce travail, des solutions mixtes de gluconate de chlorhexidine à 0,5 % dans de l'IPA à 70% ont été utilisées pour des traitements de 2, 10 et 30 minutes. Après 2 minutes de "stérilisation", environ 40% du courant électrocatalytique a été perdu dans une gamme de concentration de glucose allant de 2 à 30 mmol L⁻¹. Le temps de réponse n'a pas été affectée négativement mais aucune donnée d'étude de stérilité ou antibactérienne n'a été rapportée. Enfin à notre connaissance, aucune donnée n'a été rapportée pour l'utilisation de la chlorhexidine sans solvant organique.

Dans cette partie de chapitre nous explorons l'utilisation de solutions diluées de la chlorhexidine préparées dans l'eau (sans solvant organique) comme traitement rapide et pratique de désinfection et de potentielle stérilisation pour les bioélectrodes enzymatiques et les biopiles implantables. Les effets antimicrobiens des solutions de CHx en fonction de la concentration et du temps sont examinés, ainsi que l'effet du traitement au CHx sur les bioanode à base de GOx et biocathode à base de BOx. Une influence de la stérilisation au CHx sur une biopile est aussi présentée.

5.1.2.2 Étude bactériologique

Les premières expériences ont porté sur l'évaluation de l'efficacité de divers traitements à la chlorhexidine en tant que désinfection de haut niveau.

Pour cela une étude de microbiologie a été effectuée. Dans un premier temps, sous une hotte à flux laminaire, 150 mL du bouillon nutritif de milieu de culture bactérienne "lysogeny broth" (LB) stérile ont été introduits dans un flacon Erlenmeyer. Ensuite, la bioélectrode traitée ou non traitée a été immergée dans cette solution LB. Chaque erlenmeyer a été bouché et placé à 37 °C sur un agitateur rotatif d'incubateur (Figure 5.8).

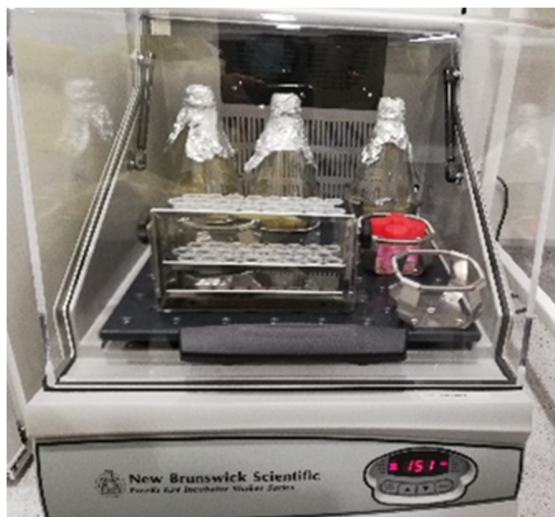


Figure 5.8 : Photo d'Erlenmeyer avec LB et système de bioélectrodes sur un agitateur rotatif d'incubateur à 37 °C

Des échantillons du milieu ont été prélevés après 26 heures d'incubation. Ensuite, 100 µL ont été ajoutés à une boîte de Pétri contenant du LB-Agar avant d'être étalés puis placés dans un

incubateur à 37 °C pendant une nuit pour la croissance des bactéries. La figure 5.9 ressemble toutes les étapes utilisées dans les études microbiologiques.

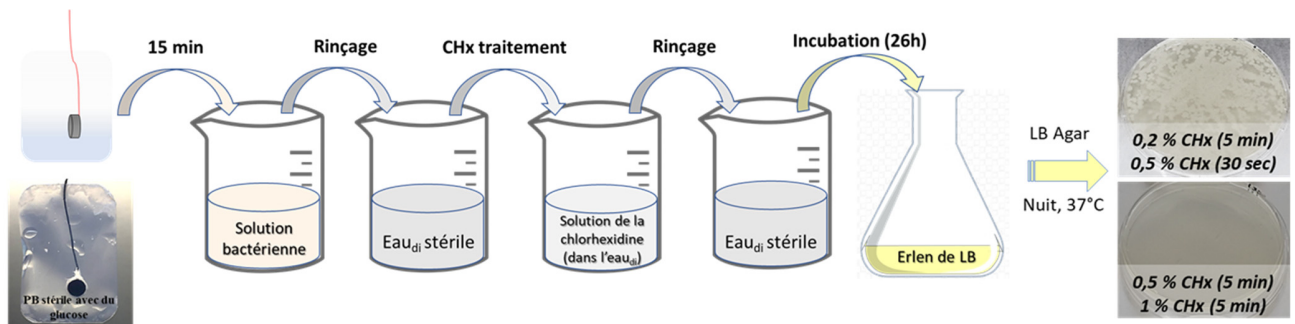


Figure 5.9 : Représentation étape par étape de la méthodologie utilisée depuis l'introduction de la bioélectrode délibérément plongée dans des bactéries pendant 15 minutes, puis le traitement à la chlorhexidine, puis l'incubation à 37 °C pendant 26 h dans du bouillon nutritif LB, et enfin le dépôt de 100 µL de LB sur une plaque d'agar pour l'incubation pendant une nuit à 37 °C avant de compter les colonies

Tout d'abord, un échantillon témoin préparé sans l'électrode (LB uniquement) sous une hotte à flux laminaire dans de l'eau stérile a été étudié. Au bout de 26 h d'incubation on n'observe aucune bactérie, validant ainsi la fiabilité d'expérience témoin.

Pour le reste des expériences un système modèle composé d'une biocathode à compression insérée dans un sac de dialyse en présence d'une solution de glucose à 5 mmol L⁻¹ dans le PB stérile est utilisé.

Pour commencer, nous avons examiné la bioélectrode enzymatique (telle que préparée) qui a été fabriquée dans notre laboratoire dans des conditions non stériles puis assemblée dans un sac de dialyse avec l'électrolyte sous une hotte à flux laminaire. Comme résultat, aucune bactérie de type *Staphylococci* n'a été observée sur les plaques de gélose après 26 h. Ces résultats révèlent que notre façon de fabrication de bioélectrodes à compression n'était pas sensible à la contamination bactérienne. Nous avons aussi effectué une stérilisation du système avec du CHx, mais en sachant que le système est déjà assez propre, ces expériences n'ont pas fourni d'informations sur l'efficacité du traitement au CHx.

Afin d'évaluer l'efficacité du traitement au CHx et de trouver un protocole adapté ensuite, nous avons assuré des conditions reproductibles par une contamination intentionnelle des bioélectrodes dans les sacs de dialyse. Pour cela, nous avons immergé nos systèmes dans un inoculum de *S. hominis* (10⁷ bactéries mL⁻¹) pendant 15 min puis, après un rinçage à l'eau distillée stérile, les systèmes ont été soumis au test de croissance des colonies bactériennes.

Nous avons étudié l'utilisation du CHx, en tant que méthode de stérilisation chimique, en fonction de sa concentration et du temps du traitement. Les solutions de CHx dans l'eau distillé à 0,2%, 0,5% et 1% en masse ont été étudiées. Le choix de ces valeurs exactes a été fait puisque dans la littérature des effets bactériostatiques et bactéricides ont été observés à ces concentrations. En effet, l'utilisation de 0,12% à 2% de CHx est très répandue en dentisterie (par exemple pour les bains de bouche) [34,35]. Des concentrations plus élevées de 0,5% à 5% (et

Chapitre 5. Biopiles enzymatiques in vitro et in vivo

même jusqu'à 10 % en poids) sont employées pour la désinfection de la peau et des outils chirurgicaux et pour les revêtements antibactériens des dispositifs médicaux [36], [41]. Les temps de traitement choisis ont été de 30 s, 1 min et 5 min. Le tableau 5.3 montre le nombre d'unités formant des colonies après une incubation de 26 heures pour les bioélectrodes contaminées par *S. Hominis* qui n'ont pas été traitées ou qui ont été traitées avec des solutions diluées de chlorhexidine pendant différentes durées et à des concentrations couramment utilisées.

Tableau 5.3: Influence des traitements à la chlorhexidine sur les colonies de culture cellulaire (CFU mL⁻¹) des bioélectrodes telles que préparées ou intentionnellement inoculées par des bactéries dans des sacs de dialyse avec du tampon et du glucose stérile

Type d'électrode	Traitement chimique	Milieu de culture	N° des colonies CFU mL ⁻¹ après 26 h d'incubation
Pas d'électrode	Pas de traitement	LB, 37 °C	0
Électrode initiale	Pas de traitement		0
	0,5 % CHx (5 min)		0
Électrode après immersion dans la solution bactérienne	PB seulement		> 17950
	0,2 % CHx (5 min)		> 17950
	0,5 % CHx (30 sec)		> 17950
	0,5 % CHx (1 min)		180
	0,5 % CHx (5 min)		0
	1 % CHx (5 min)		0

Pour la bioélectrode pré-contaminée qui n'a pas été traitée avec le CHx, une accumulation dense et non dénombrable de bactéries *Staphylococci* a été observée. Une croissance bactérienne tout aussi forte et indénombrable a également été observée lors d'un traitement au CHx à 0,2% pendant 5 minutes ou moins, ou lors d'un traitement de courte durée de 30 secondes avec du CHx à 0,5% (voir Figure 5.9 pour une image d'une plaque de gélose contaminée représentative). De tels traitements au CHx étaient clairement inadaptés et n'ont pas été étudiés d'avantage. Nos résultats peuvent indiquer que la souche bactérienne utilisée dans notre étude est résistante à ce traitement. Pour le traitement à 0,5% de CHx pendant 30 sec, le temps de traitement semble être trop court.

Le traitement à la CHx avec des concentrations plus élevées pendant une période minimale de 1 minute ont été beaucoup plus efficaces sur des bioélectrodes contaminées par *S. Hominis* (Tableau 5.3). L'utilisation du CHx à 0,5% pendant 1 min s'est avérée bactériostatique après 26 h alors qu'un traitement prolongé de 5 min s'est avéré bactéricide après la même période. Nous avons également testé l'utilisation d'une solution à 1% pendant 5 min et avons observé le

même effet bactéricide que pour 0,5 %. Ces résultats montrent clairement l'importance de la concentration et du temps sur le comportement antimicrobien de la chlorhexidine contre *S. hominis*, et surtout, ils nous ont permis d'identifier le traitement le plus efficace et le moins dangereux pour l'organisme : c'est une solution aqueuse de CHx à 0,5% pendant 5 minutes. Ce traitement a été adopté pour les recherches sur les bioélectrodes et les biopiles décrites ci-dessous.

5.1.2.3 Étude d'influence de la stérilisation sur les bioélectrodes et la biopile

En premier lieu, une influence de la stérilisation à la CHx sur le fonctionnement de la biocathode a été évaluée. Pour cela, une biocathode à composition « CNTs / hémine / BOx » a été fabriquée. Ces performances ont été examinées par voltampérométrie cyclique dans le PB 0,1 mmol L⁻¹ à pH 7,4 dans trois conditions : sous Ar, sous barbotage de O₂ sans le traitement à la CHx et sous barbotage de O₂ après le traitement à la CHx. Le traitement de stérilisation a été effectué selon la méthodologie présentée précédemment. Une bioélectrode a été d'abord rincée à l'eau pour enlever les résidus du tampon, ensuite elle a été plongée dans la solution de CHx à 0,5 % pendant 5 minutes. Après, l'électrode a été abondamment rincée à l'eau distillée pour éliminer l'excès de CHx et ensuite elle a été testée par voltampérométrie cyclique.

La figure 5.10, a présente les voltampérogrammes enregistrés pour la biocathode. En présence d'argon, aucun courant catalytique n'est observé. Seul le courant capacitif de fond inhérent aux bioélectrodes MWCNTs est présent (Figure 5.10, ligne pointillée noire). En présence de dioxygène saturé pour la biocathode non traitée, un courant de réduction bioélectrocatalytique bien défini apparaît à un potentiel d'amorçage d'environ 0,52 V qui est proche du potentiel redox du centre Cu T1 de BOx, ce qui confirme l'efficacité de la réduction bioélectrocatalytique de O₂ par DET. On observe un maximum de courant catalytique de 0,64 mA à 0,36 V et un quasi-plateau de 0,48 mA à 0,1 V (Figure 5.10, ligne pleine rouge). Après le traitement à la CHx, la bioélectrode conserve le pic de réduction de O₂ ainsi que le plateau de courant à des potentiels similaires. Un maximum de courant catalytique de 0,55 mA à 0,40 V et un plateau de courant catalytique de 0,40 mA à environ 0,1 V sont observés (Figure 5.10, ligne pleine verte). Cela représente une perte de 13% et de 27% de la catalyse, pour le pic et le quasi-plateau respectivement.

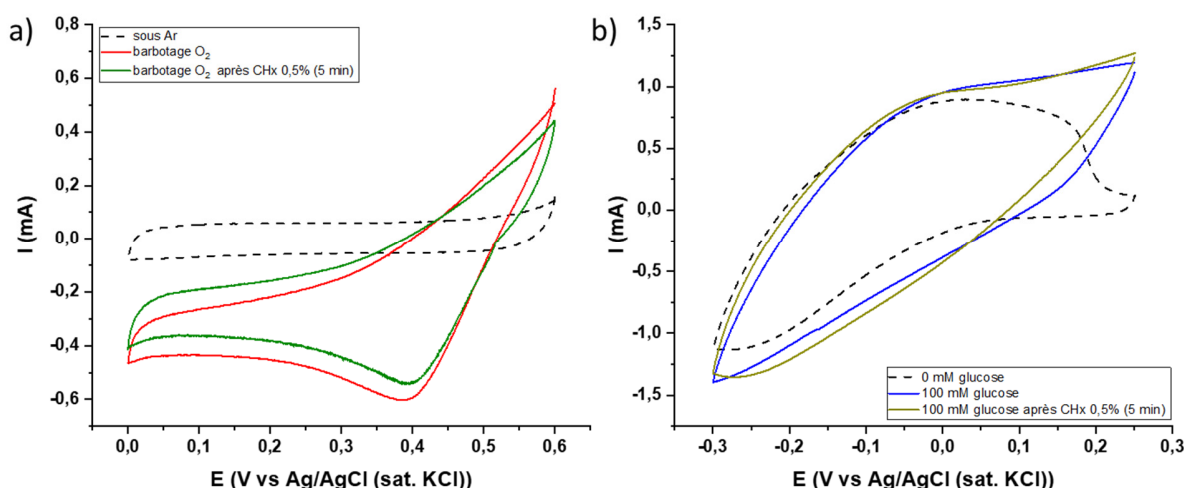


Figure 5.10: a) Voltampérométries de la réduction bioélectrocatalytique d'O₂ aux biocathodes à base de BOx (sous Ar - trait pointillé noir, sous barbotage d'O₂ - trait solide rouge) et à base de BOx traité au CHx (sous barbotage d'O₂ - trait solide vert) dans des solutions PB pH 7,4; b) Voltampérométries d'oxydation bioélectrocatalytique du glucose aux bioanodes à base de GOx-catalase (sans glucose - trait pointillé noir, 100 mmol L⁻¹ du glucose - trait solide bleu) et à base de GOx-catalase traité au CHx (100 mmol L⁻¹ du glucose - trait solide doré) dans une solution PB pH 7,4. Enregistrés à 25°C, 0,2 mV s⁻¹.

Puisque les pentes catalytiques sont très similaires, reflétant une cinétique de transfert d'électrons semblable, la perte de 13 à 27% dans les courants catalytiques serait plus probablement due à la perte d'enzyme de la surface ou à des effets de blocage des pores par des molécules de CHx (ou des composés résiduels) adsorbés qui limitent la diffusion de O₂ à l'électrode. De plus, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'orientation de l'enzyme pourrait être entravée par des interactions entre les molécules de CHx dicationique et les groupes porphyriniques chargés négativement.

En second lieu, une étude d'influence de la CHx sur la bioanode a été effectuée. Pour cela, une bioanode à composition « CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase » a été fabriquée. Le protocole de la stérilisation est le même que celui utilisé pour la cathode. La bioanode a donc été testée en absence et présence du glucose à 100 mmol L⁻¹ sans traitement au CHx et en présence du glucose à 100 mmol L⁻¹ après le traitement au CHx.

La figure 5.10, b montre les voltampérométries enregistrés pour la bioanode. En l'absence de glucose à la bioanode non traitée, nous avons observé l'activité redox du médiateur 1,4-NQ à E_{1/2} = -0,13V (Figure 5.10 trait pointillée noire). En présence de glucose, une augmentation marquée du courant anodique apparaît à partir de 0 V qui atteint un courant catalytique quasi-maximal de 1,10 mA à 0,25 V (Figure 5.10 ligne pleine bleue). Après le traitement au CHx, le courant de réduction de la 1,4-NQ et le courant d'oxydation catalytique du glucose restent très similaires sauf que, de manière inattendue, un courant catalytique plus important de 1,267 mA à 0,25 V est observé, ce qui correspond à une augmentation mineure de 14,5%. La modification mineure du CV catalytique semble montrer qu'il n'y a pas d'interactions défavorables entre le CHx et les composants biocatalytiques (y compris les espèces médiatrices quinones réduites) ou de limitations en termes de transport de masse du glucose.

La résistance très prometteuse des performances de la biocathodes et l'augmentation mineure apparente pour la bioanode après traitement au CHx confirment la compatibilité de cette méthode chimique pour son utilisation sur des bioélectrodes électrochimiques.

Pour finir, l'effet de traitement de stérilisation chimique sur la biopile complète a été évalué. Une bioanode et une biocathode à compression ont été connectées dans une biopile comme il est décrite dans la partie 5.1.1 (Figure 5.1, a).

La production d'énergie à partir de la biopile a été étudiée dans du PB à pH 7,4 saturé en dioxygène en présence de 100 mmol L⁻¹ de glucose. Les courbes de polarisations et de puissance de la biopile sans traitement au CHx sont présentées sur la Figure 5.11, a. Cette biopile fournit 97 μW de puissance (soit 346 μW cm⁻²) pour une courant de 0,237 mA. La f.é.m. de cette biopile est de 0,51 V.

Suite à un rinçage à l'eau distillée, suivi du traitement au CHx 0,5% pendant 5 minute et d'un second rinçage complet à l'eau distillée, les performances de la biopile traitée sont évaluées. Une augmentation de la puissance de 8,5% est observée (106 μW vs 97 μW), ainsi qu'une légère diminution du courant maximal (0,241 mA vs 0,260 mA) et d'une légère augmentation de la f.é.m. (0,54 V vs 0,51 V). Une puissance légèrement supérieure peut être expliquée par faible gain de tension. La puissance de sortie de la biopile traitée au CHx s'est moins bien comportée que celle de la biopile non traitée une fois la puissance maximale dépassée. Dans ces conditions de test "extrêmes", le courant de la biopile traitée au CHx a chuté brusquement, tandis celui de la biopile non traitée a atteint un courant de sortie catalytique plus élevé lorsque la tension a été ramenée vers 0,3 V. Les données montrent clairement que le traitement au CHx provoque de petits changements sur la forme des courbes de polarisation et de puissance. Mais surtout, cela montre que la biopile a très bien tolérée le traitement bactéricide court et pratique et que la performance énergétique n'a pas chuté.

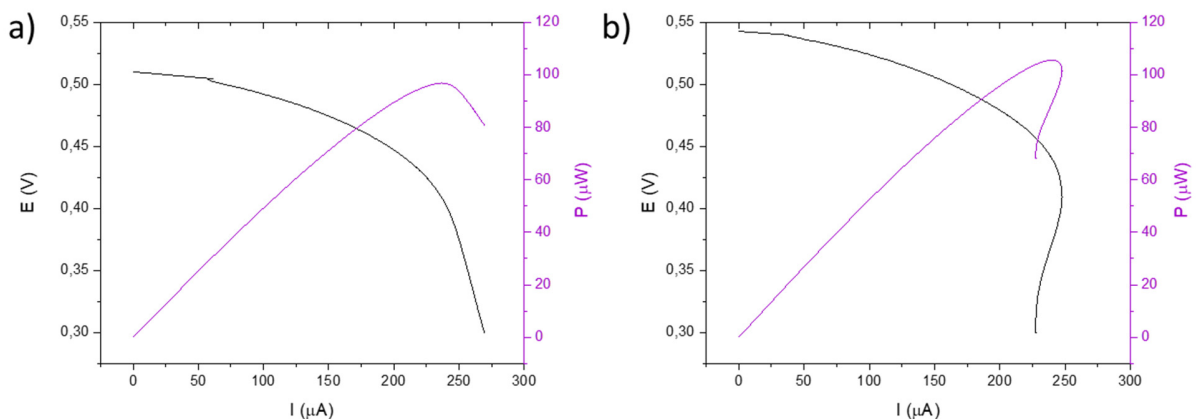


Figure 5.11 : Courbes de polarisation et de puissance obtenues par la méthode LSV d'une biopile composée de la biocathode à compression CNTs / Hémine / BOx et de la bioanode à compression CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase : a) - telles que préparées, b) - traitées à 0,5 % de CHx pendant 5 minutes. Conditions expérimentales : sous barbotage de O₂, PB 100 mmol L⁻¹, 25°C, 1 mV s⁻¹

Ensuite, nous avons évalué la performance des biopiles compartimentées dans des sacs de dialyses telles que préparées mais aussi traitées au CHx (Figure 5.12). Le montage de la biopile

en sac de dialyse est illustré à la figure 5.1, b avec le sac de dialyse (« cut-off » 3,5 - 5 kDa) contenant du PB pH 7,4 avec 100 mmol L⁻¹ de glucose.

Pour la biopile non traitée dans le sac de dialyse on observe une f.é.m. initiale de 0,51 V qui est similaire à la f.é.m. de la biopile non traitée sans sac de dialyse (Figure 5.12, a). La puissance maximale de 77 μW (soit 275 μW cm⁻²) à 0,184 mA est cependant nettement inférieure aux 96 μW obtenus sans le sac de dialyse. Les courbes de polarisation montrent que la chute caractéristique de la tension de la biopile est observée à des courants plus faibles lorsque le sac de dialyse est présent, ce qui correspond à une limitation accrue de la diffusion des substrats des enzymes à travers le sac de dialyse.

Enfin, la biopile dans le sac de dialyse traitée au CHx, après un rinçage complet, a produit la même f.é.m. que la biopile non traitée avec le sac de dialyse (0,51 V) et un peu moins que la f.é.m. de la biopile traitée à la CHx sans le sac de dialyse (0,54 V). En revanche, la puissance maximale de sortie pour la biopile dans le sac de dialyse traitée au CHx était inférieure (66 μW) par rapport à la biopile non traitée dans le sac de dialyse (77 μW), ce qui correspond à une diminution de 14%. Ces résultats révèlent un effet insignifiant, du traitement au CHx sur les performances de la biopile enchâssée, dans le sac de dialyse. L'explication est que le sac de dialyse restreint le transport des substrats et encore plus après le traitement au CHx. La diminution de diffusion des substrats peut être expliquée par un blocage partiel des pores du sac de dialyse par des molécules de CHx et des composés résiduels adsorbés. Par exemple, le CHx est connu pour former des précipités avec les ions chlorure. Dans les expériences de contrôle, nous avons observé des précipités sur le sac de dialyse avant le lavage de la biopile. Cependant, après un lavage complet avec de l'eau distillée, les précipités ont été visuellement éliminés.

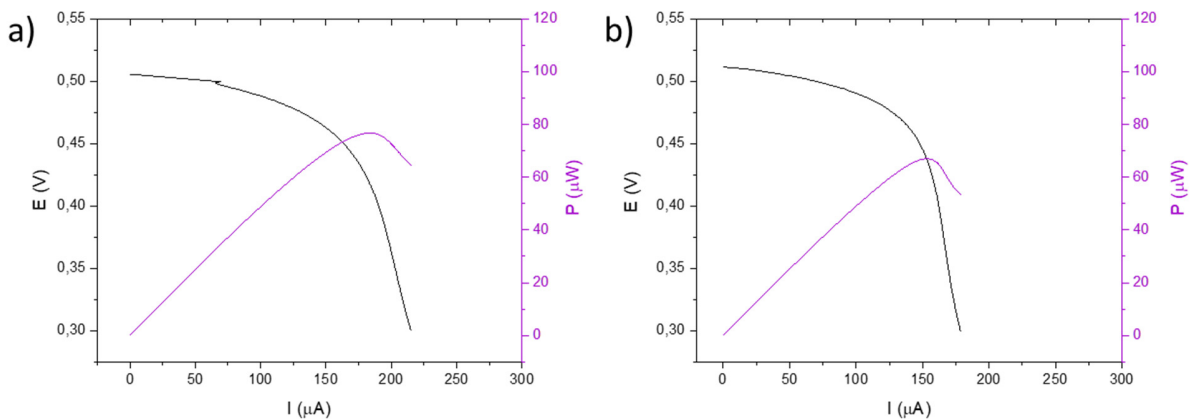


Figure 5.12 : Courbes de polarisation et de puissance obtenues par la méthode LSV d'une biopile composée de la biocathode à compression CNTs / Hémine / BOx et de la bioanode à compression CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase dans un sac de dialyse : a) - telles que préparées, b) - traitées à 0,5 % de CHx pendant 5 minutes. Conditions expérimentales : sous barbotage de O₂, PB 100 mmol L⁻¹, 25°C, 1 mV s⁻¹

Le tableau 5.4 résume les performances des biopiles sans et avec le sac de dialyse, traitées et non traitées au CHx. On peut voir que le traitement au CHx amoindrit très peu les performances de la biopile enchâssée dans le sac de dialyse et pas du tout les performances de la biopile sans sac.

Tableau 5.4 : Récupératifs de performances des biopiles avant et après un traitement au CHx.

Biopile	Méthode de caractérisation	Concentration des substrats	Tampons, pH	f.é.m., V	I _{max} , mA	P _{max} , μW	J _{Pmax} , μW cm ⁻²
<i>Température 25°C</i>							
C: « CNTs / hémine / BOx » A: « CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase » <i>Telle que préparée</i>	LSV	O ₂ saturé 100 mM glucose	PB; 7,4	0,51	0,260	97	346
C: « CNTs / hémine / BOx » A: « CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase » <i>Traitée à la CHx 0,5% pendant 5 minutes</i>				0,54	0,241	106	379
C: « CNTs / hémine / BOx » A: « CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase » dans les sac de dialyse <i>Telle que préparée</i>				0,51	0,215	77	275
C: « CNTs / hémine / BOx » A: « CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase » dans les sac de dialyse <i>Traitée à la CHx 0,5% pendant 5 minutes</i>				0,51	0,178	67	239

5.1.3 Biopiles à compression vers l'implantation

Après avoir démontré la performance des biopiles traitées au CHx *in vitro*, nous avons procédé à des premières expériences d'implantation. Les implantations ont été effectuées dans le Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon avec Stéphane MARINESCO et Anne MEILLER, équipe « Recherche Translationnelle et Intégrative en Epilepsie (TIGER) ».

La biopile dans le sac de dialyse traitée au CHx a ensuite été enveloppée dans un tissu chirurgical SWING-MESH® (Figure 5.13, a) et placée sur les viscères abdominaux d'un rat Sprague-Dawley anesthésié (Figure 5.13, b). Pour rappel, le tissu chirurgical est nécessaire pour protéger la biopile et le rat.

Les câbles électriques de la biopile *in-vivo* ont été tunnelliés sous la peau du rat jusqu'à un système de connectique installé au-dessus du crâne du rat. Ainsi, la biopile *in vivo* pouvait être reliée à un potentiostat Origaflex. Des injections sous-cutanées quotidiennes de 5 mL de glucose à 5 % ont été effectuées pour faciliter la stabilisation du poids corporel de l'animal ainsi que le fonctionnement de la biopile via la consommation de glucose et de O₂. La f.é.m. de la biopile implantée a été enregistrée périodiquement pendant 60 secondes pendant que le rat se déplaçait librement (Figure 5.13, c).

La tension obtenue au jour 0, environ 1 heure après l'implantation, était de 0,17 V. La f.é.m. a baissé au cours des premiers jours, ce qui est très classique pour de telles biopiles

Chapitre 5. Biopiles enzymatiques in vitro et in vivo

implantées. Cela est dû au fait que le rat a besoin d'un temps de récupération après la chirurgie et durant cette période il ne mange pas et ne bouge pas beaucoup, ce qui limite la production du glucose et son transport dans l'organisme. La forte chute de la f.é.m. de 0,17 V à 0,07 V peut être aussi liée à la faible diffusion des substrats et à la présence de substances toxiques au stade précoce de la réaction inflammatoire. On remarque qu'à partir du 3^{ème} jour la tension de la pile commence à monter, cela correspond classiquement au début de la récupération du rat et confirme que les performances de la biopile dépendent de l'état de santé de l'animal.

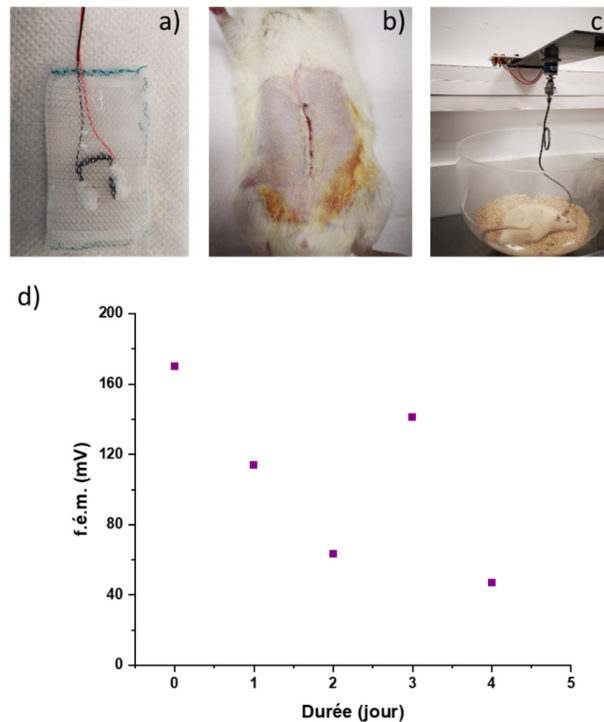


Figure 5.13 : Photo de la biopile à combustible traitée au CHx dans un sac de dialyse avec du tissu chirurgical poreux en polypropylène de qualité médicale (taille des mailles $0,7 \times 0,7$ mm) (a) avant l'implantation, (b) après l'implantation et la suture, et (c) pendant la mesure in-vivo chez le rat. d) mesure de la f.é.m. in-vivo de la biopile à combustible traitée au CHx, enregistrées périodiquement sur le rat en mouvement pendant 4 jours.

Malheureusement au 4^{ème} jour la f.é.m. a chuté fortement et les mesures n'ont plus été faisables. Le rat a dû être euthanasié.

5.1.4 Biopile à compression post – in vivo

Il était important qu'après la mort du rat, la biopile soit récupérée pour savoir ce qui a provoqué l'arrêt de mesure et pour pouvoir y remédier. Pour cela, on a réalisé une autopsie et on a pu extraire le dispositif et l'étudier *post-in vivo*. La suite de ces expériences est présentée dans cette partie du chapitre.

La biopile récupérée est présentée sur la figure 5.14, a. On observe la présence partielle des tissus biologiques. Cela confirme que la biopile a été initialement acceptée par l'organisme. Ensuite, nous avons extrait la biopile du tissu chirurgical pour pouvoir la caractériser *in vitro*. En arrivant au niveau du sac de dialyse, on a remarqué une forte présence des CNTs dans l'ensemble

du sac, qui était dû à la destruction des électrodes (Figure 5.14, b). Nous supposons, que les bioélectrodes ont pu se casser sous la pression du poids de l'animal ou à l'occasion de ses mouvements.

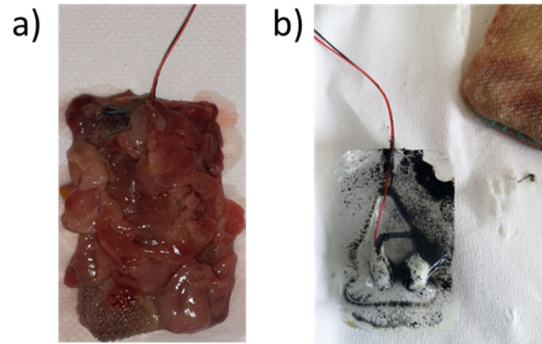


Figure 5.14 : Photos du dispositif implanté chez le rat : a) – récupéré d'organisme et b) – récupéré de tissu chirurgical avec les tissus d'organisme

La destruction des bioélectrodes s'est produit dans à peu près 50% des cas d'implantations. Pour protéger l'animal, tout en continuant l'implantation, il a été décidé de changer le positionnement de la biopile dans le sac de dialyse, afin de protéger les bords des électrodes du contact directe avec la paroi de l'abdomen. Ainsi les deux électrodes n'étaient plus placées à plat dans l'abdomen avec une électrode à gauche et l'autre à droite mais tournées d'un quart de tour afin qu'une électrode soit vers l'intérieur de l'abdomen et l'autre vers l'extérieur comme présenté sur la Figure 5.15, b.

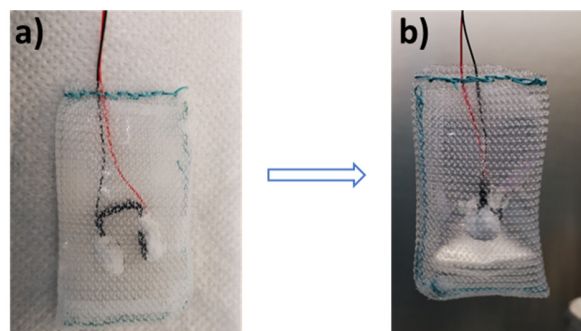


Figure 5.15 : Photos du dispositif : a) – emplacement de la pile dans le sac de dialyse initialement choisi ; b) – nouveau emplacement de la pile dans le sac de dialyse.

Cette nouvelle configuration de la biopile, où les deux électrodes sont placées perpendiculairement à la peau de l'abdomen, nous a permis d'éliminer le risque d'effritement des bioélectrodes implantées. Malgré cela, tous les problèmes n'étaient pas réglés. Une forte probabilité d'un court-circuit est apparue. Le support 3D étant partiellement souple, il a eu tendance à se plier sous la pression de l'animal, et cela avait comme conséquence que les électrodes mises face à face pouvaient se toucher.

A ce stade, les implantations des biopiles à compression ont été arrêtées. Sans avoir réglé les problèmes de court-circuit, il n'était plus envisageable de sacrifier des animaux.

Pour pouvoir continuer l'implantation de ce type de biopile il faudra développer un nouveau design de support pour les électrodes. Ce design devra prendre en compte la complexité des bioélectrodes, éviter qu'elles ne se touchent, permettre une bonne diffusion des substrats enzymatiques, ainsi que protéger mécaniquement les bioélectrodes d'une destruction possible. De plus, ce design devra relever deux autres défis, il devra être biocompatible et non-invasif pour l'animal. Il faudra que le système soit suffisamment solide pour protéger les électrodes et le moins anguleux possible pour ne pas risquer de blesser l'animal.

5.2 Biopiles aux électrodes à cavité

Nous avons démontré dans le chapitre 4 le concept et l'application des bioélectrodes à cavité à la réduction de O₂ et à l'oxydation du glucose. Les performances élevées et prometteuses dans le temps de ces bioélectrodes nous ont poussé à les étudier en les associant pour former une biopile. Pour rappel, les bioélectrodes à cavité sont basées sur des buckypapers. Elles sont plus compactes (moins épaisses) et apparemment moins cassantes que les électrodes à compression. Elles sont donc moins susceptibles de souffrir d'écrasement *in vivo*. Dans cette partie de chapitre, les études des biopiles à cavité *in vitro*, *in vivo* et *post-in vivo* seront présentées.

5.2.1 *Biopiles à cavité in vitro*

Pour commencer, une simulation des performances de la biopile étudiée a été réalisée à partir des données obtenues au cours des études de chaque demi-pile séparée (chapitre 4). Cela nous permet de voir ce que l'on peut attendre de la biopile souhaitée composée des bioélectrodes choisies précédemment. Pour rappel, dans le travail susmentionné, nous avons choisi l'électrode « hBP Hémine « one pot » / BOx / cBP » en tant que biocathode et « hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / cBP PLQ « drop coating » en tant que bioanode.

La figure 5.16, a présente les voltampérogrammes de chaque demi-pile. À partir des valeurs de ces deux courbes, nous avons effectué une simulation mathématique de la puissance de la biopile qui nous a permis de tracer les courbes de polarisation et de puissance correspondantes représentées sur la figure 5.16, b. Cette simulation ne tient pas compte de la chute ohmique dans l'électrolyte situé entre les deux bioélectrodes. Cela montre que la f.é.m. attendue pour la pile est de l'ordre de 0,8 V alors que le courant maximum sera de l'ordre de 2,4 mA.

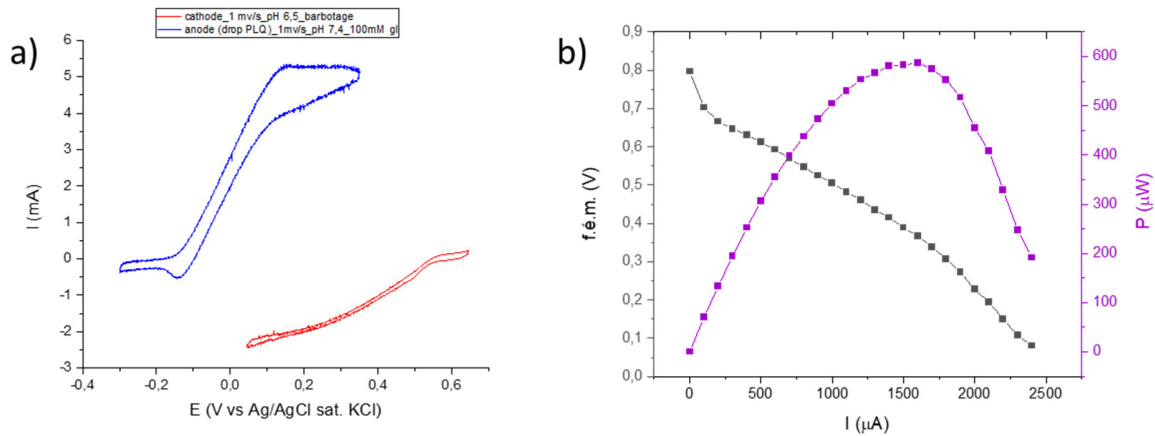


Figure 5.16 : a) – voltampérogrammes cycliques de la petite biocathode creuse hBP Hémine « one pot » / BOx / cBP sous barbotage de O_2 dans le PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5, 1 mV s^{-1} , 25°C , 250 rt/min (ligne rouge) et de la bioanode creuse hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / cBP PLQ « drop coating » en présence de 100 mmol L^{-1} de glucose dans le PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, 1 mV s^{-1} , 25°C , 250 rt/min (ligne bleue) ; b) – courbes de polarisation et de puissance d’une biopile simulées à partir des voltampérogrammes cycliques des bioélectrodes présentées sur la figure a.

De plus, basé sur les résultats obtenus suite à cette simulation, nous pouvons aussi supposer que notre biopile à cavité pourra fournir jusqu’à $600 \mu\text{W}$ dans les conditions saturées en substrats.

Ensuite nous avons procédé à la fabrication d’une biopile avec les bioélectrodes à cavité. Les performances de la biopile résultante ont été étudiées via la méthode « charge/décharge ». Cette méthode a consisté à décharger la biopile en imposant un courant pendant 10 s et, ensuite, à la laisser se recharger jusqu’à ce qu’elle recouvre son état quasi-initial totalement chargée. Pour cela, on attend qu’elle revienne au plus proche de la f.e.m. initiale. Plus le courant appliqué est élevé, plus de temps qu’il faut pour que la biopile se charge à nouveau est important. La figure 5.17 présente les courbes de polarisation et de puissance obtenues au cours de cette étude.

On peut constater que dans les conditions saturées en substrats et de fait optimales pour l’activité des enzymes des bioélectrodes *in vitro* (tampon, pH, agitation, etc) ainsi qu’avec la méthode d’étude qui assure un régime parfaitement stationnaire, la biopile à cavité peut fournir une puissance réelle jusqu’à $807 \mu\text{W}$. La f.e.m. de la biopile est de $0,625 \text{ V}$ alors que le courant maximum est égal à $3,15 \text{ mA}$. On retrouve les mêmes ordres de grandeurs pour les 3 paramètres (f.e.m., courant maximum et puissance maximum) que ce qui avaient été calculés par simulation. La puissance et le courant sont tout de même plus grands, alors que la f.e.m. est un peu plus petite.

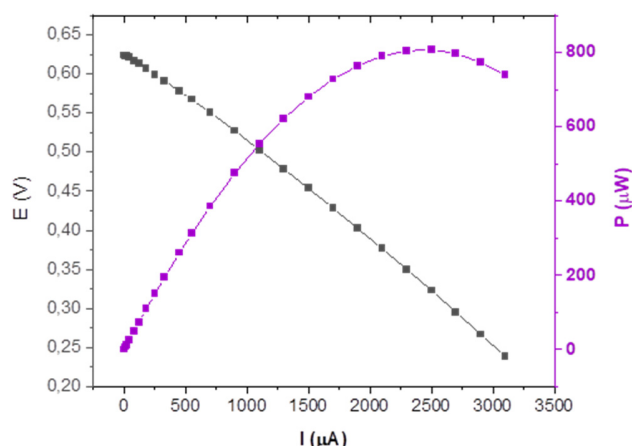


Figure 5.17 : Courbes de polarisation et de puissance obtenues par la méthode « charge/décharge » via des CP à courant constant d'une biopile composée de la petite biocathode creuse hBP Hémine « one pot » / BOx / cBP et de la bioanode creuse hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / cBP PLQ « drop coating ». Conditions expérimentales : barbotage de O_2 , 100 mmol L^{-1} de glucose, PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5, $0,2 \text{ mV s}^{-1}$, 25°C , 250 rt/min

La méthode utilisée dans ces expériences nous permet d'étudier les performances réelles des biopiles en fonctionnement stationnaire. Le temps de récupération après chaque décharge, facilite le fonctionnement de la biopile. Par contre, utiliser la méthode de « charge/décharge » prend beaucoup de temps. Pour réaliser la courbe présentée sur la figure 5.17 cela a pris 12 heures, ce qui est très long. C'est pourquoi nous avons décidé de réaliser toutes nos futures expériences sur les biopiles à cavité avec la méthode LSV avec une petite vitesse de balayage en potentiel : $0,2 \text{ mV s}^{-1}$. En effectuant les mesures par LSV nous pouvons suivre l'évolution des différents paramètres étudiés tels que la durée de vie ou l'influence de tampon avec une durée d'expériences raisonnable. Par exemple, pour balayer 800 mV , la mesure dure un peu plus d'une heure.

Pour effectuer un suivi dans le temps de la biopile testée précédemment (Figure 5.17) nous avons poursuivi son étude avec une série de mesures LSV. La figure 5.18, a présente les courbes de polarisation et de puissance de la biopile obtenues par LSV le quatrième jour de fonctionnement, j_4 . La f.é.m. de la pile est de 620 mV , ce qui est cohérent avec ce qui a été obtenu le premier jour. Le courant maximum est lui beaucoup plus faible que le premier jour (de l'ordre de $0,63 \text{ mA}$). La puissance fournie par la pile est alors de 266 µW . On peut supposer qu'au bout de 4 jours les performances de la biopile ont tout de même baissé puisque l'étude des électrodes séparées avait mis en évidence une baisse du courant de 40% pour la biocathode au bout de 5 jours. Mais surtout, ce résultat confirme que la méthode LSV n'est pas la plus favorable pour enregistrer les fortes puissances même si c'est la seule envisageable pour un suivi régulier des performances d'une biopile. Ainsi, même à faible vitesse de balayage en potentiel, le système électrochimique n'étant pas en régime stationnaire, les valeurs enregistrées sont plus faibles que celles qu'on aurait eu par la méthode de charge/décharge.

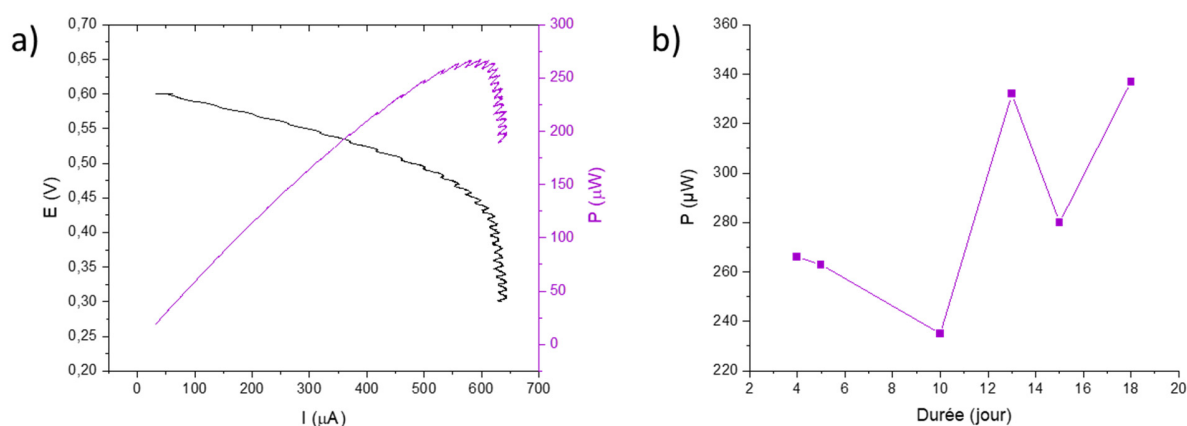


Figure 5.18 : a) - courbes de polarisation et de puissance obtenues par la méthode LSV d'une biopile composée de la petite biocathode creuse hBP Hémine « one pot » / BOx / cBP et de la bioanode creuse hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / cBP PLQ « drop coating » à jour 4 ; b) – représentations de la stabilité dans le temps de la biopile étudiée à partir de son 4^{em} jour. Conditions expérimentales : barbotage de O_2 , 100 mmol L^{-1} de glucose, PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5, $0,2 \text{ mV s}^{-1}$, 25°C , 250 rt/min

L'étude de la stabilité de la pile dans le temps a été enregistrée pendant 18 jours et est illustrée sur la figure 5.18, b. On peut observer qu'au cours du temps de fonctionnement périodique, avec le stockage à 4°C entre temps, notre biopile ne perd plus sa puissance. On ne peut pas noter une tendance définie pour la stabilité, mais on peut souligner qu'il n'y a pas une chute de puissance à j₁₈.

Ayant confirmé le concept de la biopile à base de bioélectrodes à cavité, nous nous sommes intéressés à l'étude concernant la distance entre les deux demi-piles. La puissance de la biopile a été évaluée pour différentes distances : 0,2, 0,5, 1,0 et 2,0 cm par une chronoampérométrie (CA) à 0,5V pendant 10s. Les courants résultants mesurés au bout de 10 s ont été utilisés pour déterminer la puissance de la biopile.

La figure 5.19 montre que la distance entre les demi-piles égale à 0,5 cm est la distance optimale. Par rapport à un espacement de 0,5 cm, un espacement plus petit de 0,2 cm, entre les bioélectrodes creuses, entraîne une diminution de la puissance de la biopile d'environ 20 %. Tandis que des espacements supérieurs ou égaux à 1,0 cm entraînent une diminution progressive de la puissance. Ces dépendances peuvent être expliquées du fait que les électrodes très rapprochées limitent la diffusion des substrats tandis que les électrodes trop espacées introduisent une chute ohmique dans la biopile, ce qui entraîne une chute de tension et par conséquent une chute de performances de la biopile. Ainsi, la distance 0,5 cm permet une diffusion suffisante des substrats des enzymes tout en limitant la chute ohmique dans la biopile.

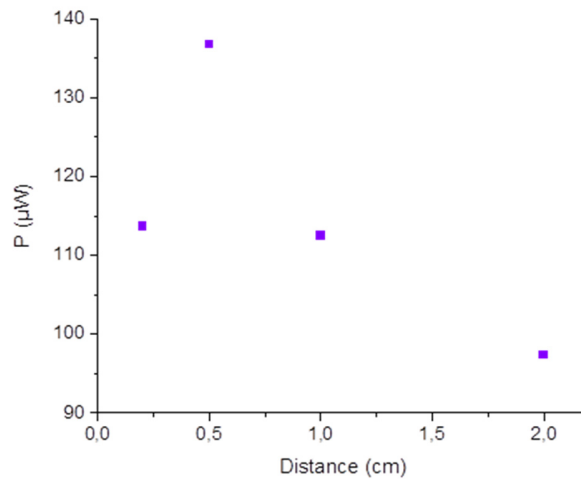


Figure 5.19 : Évolution de la puissance de la biopile creuse en fonction de la distance entre les bioélectrodes. Conditions expérimentales : CA, barbotage de O_2 , 100 mmol L^{-1} de glucose, PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5, 1 mVs^{-1} , 25°C , 250 rt/min

Puisque le concept final de la biopile est mis au point et que la biopile à cavité est stable dans le temps pendant au moins une vingtaine de jours, on peut envisager son implantation *in vivo*.

Nous avons donc effectué une étude de l'influence du tampon, brièvement présentée ci-dessous. Pour commencer, on a reproduit les expériences dans des conditions *in vitro* idéales pour avoir un étalon de comparaison, c'est-à-dire, les tests réalisés dans le tampon phosphate $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ à pH 6,5 sous barbotage de O_2 , en présence de 100 mmol L^{-1} de glucose et avec l'agitation en 250 rt/min. La figure 5.20, a représente les courbes de polarisation et de puissance pour une biopile dans le PB à pH 6,5 obtenus suite à une LSV. Une puissance de $226 \mu\text{W}$ a été obtenue avec une f.é.m. de 0,66 V, un courant maximum de 0,4 mA.

Ensuite, pour se rapprocher de la manipulation *in vivo* une caractérisation d'une biopile identique mais dans du tampon HEPES avec du NaCl (pH 6,5) a été effectuée. Le choix de ce tampon est basé sur des études *in vivo* réalisées précédemment dans l'équipe [42]. La figure 5.20, b montre les courbes de polarisation et de puissance correspondantes. La biopile à cavité, avec une f.é.m. de 0,47 V, un courant maximum de 0,28 mA fournit $88 \mu\text{W}$ dans l'HEPES $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ + NaCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. Cette puissance est 2,6 fois inférieure à celle de la biopile dans le PB. De plus, on voit que la f.é.m. comme le courant maximum ont diminué. Ainsi, ce n'est pas seulement l'activité enzymatique qui est abaissée puisque la f.é.m. a changé, elle aussi. Une telle chute des paramètres peut être expliquée par la présence des ions Cl^- qui sont connus en tant qu'inhibiteur des oxydases multicuivre [19].

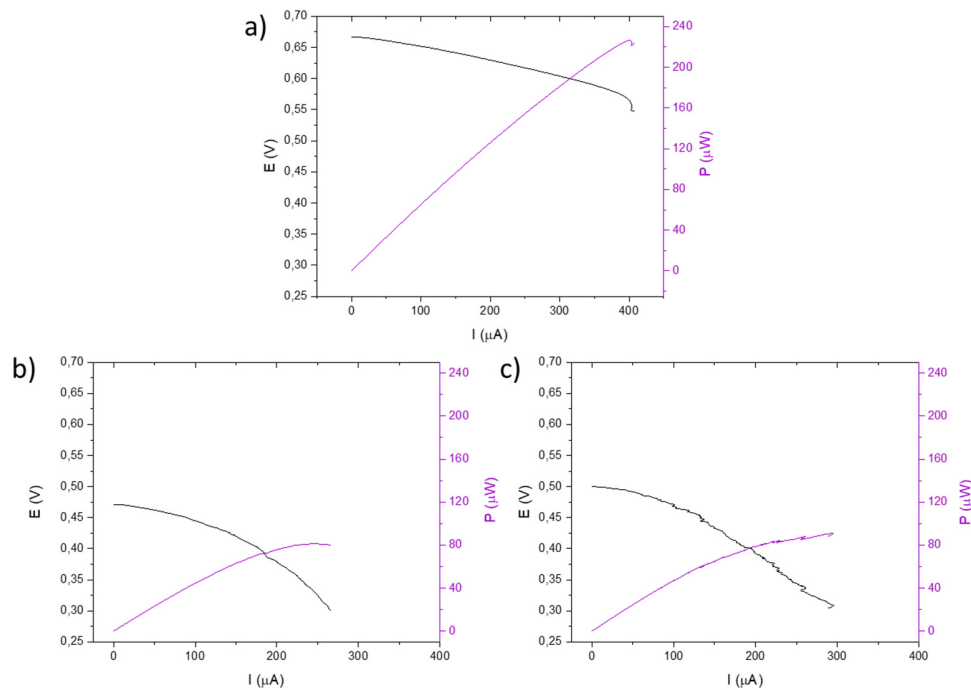


Figure 5.20 : Courbes de polarisation obtenues par la méthode LSV d'une biopile composée de la petite biocathode creuse hBP Hémine « one pot » / BOx / cBP et de la bioanode creuse hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / cBP PLQ « drop coating » dans le : a) - PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5 ; b) - HEPES $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ + NaCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5 ; c) - PBS $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4. Conditions expérimentales : barbotage de O_2 , 100 mmol L^{-1} de glucose, $0,2 \text{ mV s}^{-1}$, 25°C , 250 rt/min .

Pour se rapprocher encore plus du milieu physiologique, on a décidé d'étudier les performances d'une troisième biopile à cavité dans le PBS à pH 7,4 qui correspond au pH physiologique, comme il était dit dans la partie précédente. Les courbes de polarisation de la biopile dans le PBS à pH 7,4 sont illustrées sur la figure 5.20, c. La f.é.m. est égale à 0,5 V alors que le courant maximum est de l'ordre de 0,3 mA. La puissance maximale pour cette configuration de biopile est de $92 \mu\text{W}$, cela correspond à 1,1 fois de valeur de la puissance pour la pile dans l'HEPES + NaCl et à 0,4 fois de la puissance de la pile dans le PB. La dégradation de performances pour cette biopile par rapport au tampon PB peut être liée aux composants du tampon qui à leur tour peuvent inhiber l'activité enzymatique, mais aussi au changement du pH. Dans le chapitre précédent, on avait démontré que les performances de la biocathode dépendent du pH du milieu et sont inférieures à pH 7,4 par rapport au pH 6,5.

La biopile à cavité fonctionne encore lorsque les conditions sont proches de celles du *in vivo*. Bien entendu, les performances enregistrées sont moins importantes que celles que l'on avait avec des quantités en substrats plus élevées, l'absence d'ions chlorures et avec un pH de 6,5. Cependant, les valeurs de f.é.m., de courant maximum et de puissance sont suffisantes pour envisager l'implantation de la biopile à base de bioélectrodes à cavité chez le rat.

Avant de passer aux expériences d'implantation, nous avons souhaité effectuer une étude supplémentaire concernant les biopiles d'une autre configuration que celles choisies. Pour rappel,

dans le chapitre 4 avec les études des demi-piles, nous avons introduit les bioélectrodes basées seulement sur les buckypapers « home made », hBPs. On a décrit leur fabrication et fait les premiers pas vers les études de leurs performances. Nous avons trouvé que les biocathodes fabriquées avec deux hBPs sont plus performantes que celles de type « hybride » avec un hBP et un cBP. En nous basant sur ces résultats, nous nous sommes intéressées à des biopiles composées avec ces bioélectrodes à deux hBPs.

Dans un premier temps, nous avons étudié une biopile avec une électrode « hBP Hémine « one pot » / BOx / hBP Hémine « one pot » » comme cathode et « hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / hBP PLQ « drop coating » » en tant qu'anode. La Figure 5.21, a montre les courbes de polarisation et puissance d'une telle biopile dans le PB 0,1 mol L⁻¹ à pH 6,5. Les mesures ont été effectuées par la méthode de LSV. Une puissance de 293 μW a été fournie. Les biopile de cette configuration sont 29 % plus puissantes que celles de type « hybride » (293 μW vs 226 μW). La f.é.m. est légèrement inférieure (0,64 V contre 0,66 V) et le courant maximum augmente fortement (1 mA contre 0,4 mA). On peut dire que ces résultats concordent avec les résultats obtenus pour les demi-piles. Pour rappel, les biocathodes de ce type avaient une augmentation du courant autour de 33% et l'anode avait une perte de 10%.

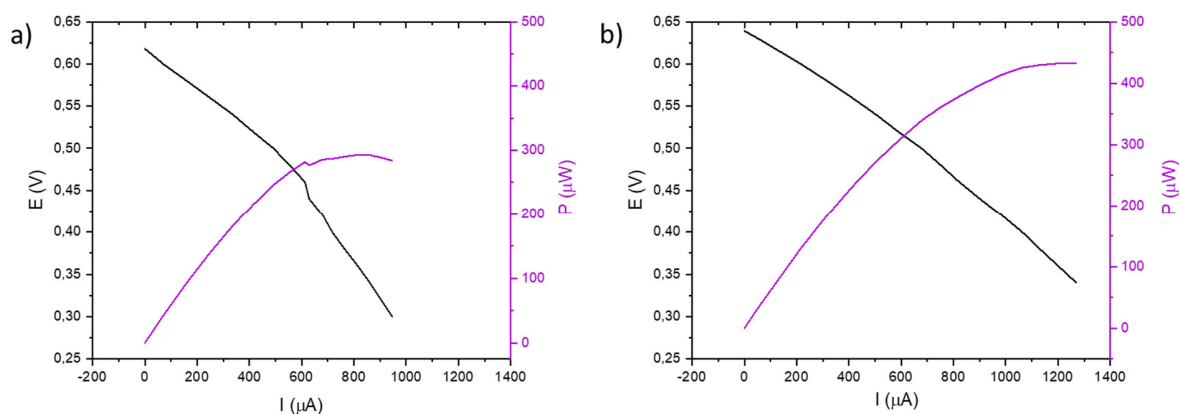


Figure 5.21 : Courbes de polarisation et puissance obtenues par la méthode LSV d'une biopile composée de : a) - la petite biocathode creuse hBP Hémine « one pot » / BOx / hBP Hémine « one pot » et la bioanode creuse hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / hBP PLQ « drop coating » ; b) - la petite biocathode creuse hBP Hémine « one pot » / BOx + ABTS / hBP Hémine « one pot » et la bioanode creuse hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / hBP PLQ « drop coating ». Conditions expérimentales : barbotage de O₂, 100 mmol L⁻¹ de glucose, PB 0,1 mol L⁻¹, pH 6,5, 0,2 mV s⁻¹, 25°C, 250 rt/min

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux biopiles avec les biocathodes aux doubles hBPs avec l'association de DET et MET. On a étudié donc une biopile de concept : cathode – « hBP Hémine « one pot » / BOx + ABTS / hBP Hémine « one pot » » et anode - « hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / hBP PLQ « drop coating » ».

Une telle biopile peut fournir 432 μW de puissance avec un courant maximum de 1,3 mA et une f.é.m. de 0,64 V (Figure 5.21, b). La puissance est supérieure de 48% par rapport à la biopile à deux hBPs avec la cathode fonctionnant sur DET (432 μW vs 293 μW).

Chapitre 5. Biopiles enzymatiques *in vitro* et *in vivo*

Les résultats obtenus concernant des biopiles composées des demi-piles à cavité avec deux hBPs semblent être très prometteuses pour les implantations *in vivo*, vu que ces biopiles montrent des performances bien plus élevées que les biopiles hybrides. Pour envisager leurs implantations, il faudra cependant développer les études des demi-piles comme cela a été suggéré dans le chapitre 4. Ensuite, il sera nécessaire d'étudier les performances de ces biopiles dans le temps et dans des conditions proches des conditions *in vivo*.

Le tableau 5.5 ci-dessous, résume les résultats obtenus pour les différentes biopiles à cavité et les conditions dans lesquelles elles ont été obtenues. Cette vue d'ensemble permet de visualiser l'effet des conditions sur les performances.

Tableau 5.5 : Récapitulatif des performances des biopiles à cavité.

Biopile	Méthode de caractérisation	Concentration des substrats	Tampons, pH	f.é.m., V	I _{max} , mA	P _{max} , μW	J _{Pmax} , μW cm ⁻²
<i>Température 25°C</i>							
C: « hBP Hémine « one pot » / BOx / cBP » A: « hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / cBP PLQ « drop coating »	Simulation	O ₂ saturé 100 mM glucose	PB; 6,5	0,80	2,40	600	779
	« charge/décharge » via CP		PB; 6,5	0,63	3,15	807	1049
	LSV (j ₄)		PB; 6,5	0,62	0,63	266	346
	LSV (j ₁₈)		PB; 6,5	0,58	0,9	337	438
	LSV		PB; 6,5	0,66	0,40	226	294
	LSV		HEPES+NaCl; 6,5	0,47	0,28	82	114
	LSV		PBS; 7,4	0,5	0,30	92	120
C: « hBP Hémine « one pot » / BOx / hBP Hémine « one pot » A: « hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / hBP PLQ « drop coating »	LSV		PB; 6,5	0,64	1,0	293	381
C: « hBP Hémine « one pot » / BOx +ABTS / hBP Hémine « one pot » A: « hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / hBP PLQ « drop coating »	LSV		PB; 6,5	0,64	1,3	432	561

5.2.2 Biopiles à cavité *in vivo*

Dans cette partie, une étude d'implantation de la biopile chez l'animal sera présentée.

Pour commencer, les bioélectrodes ont été fabriquées et ensuite associées formant une biopile. Les bioélectrodes ont été fixées en parallèle les unes sur les autres par trois petits espaceurs en Téflon[®] de 0,5 cm (Figure 5.22). Le contact électrique a été obtenu par un fil métallique fixé à la pâte de carbone dans chaque bioélectrode creuse.

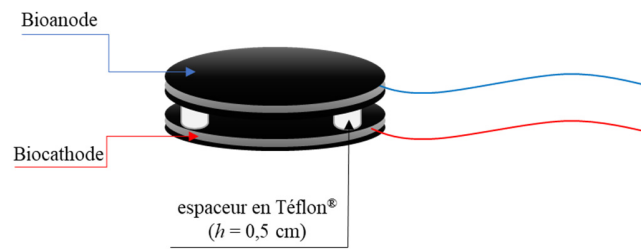


Figure 5.22 : Représentation schématique de la biopile pour l'implantation in vivo

La biopile résultante a d'abord été insérée dans un sac de dialyse contenant 5 mL de PBS à pH 7,4 avec 5 mmol L⁻¹ de glucose, préalablement stérilisée. Le système résultant a ensuite été inséré dans le tissu chirurgical de même façon que cela a été fait pour les biopiles à compressions précédemment décrites. La figure 5.23 montre une photo de face et de côté (c) de la biopile creuse dans le sac de dialyse, ainsi que le système final avant l'implantation (b).

Un rat Sprague-Dawley a été anesthésié et une incision de 6-7 cm a été pratiquée à travers la peau et la paroi abdominale. Le dispositif a ensuite été soigneusement placé sur les viscères, puis la paroi abdominale et la peau ont été suturées indépendamment à l'aide des fils de suture résorbables. La procédure de chirurgie est la même que celle pour les biopiles à compression.

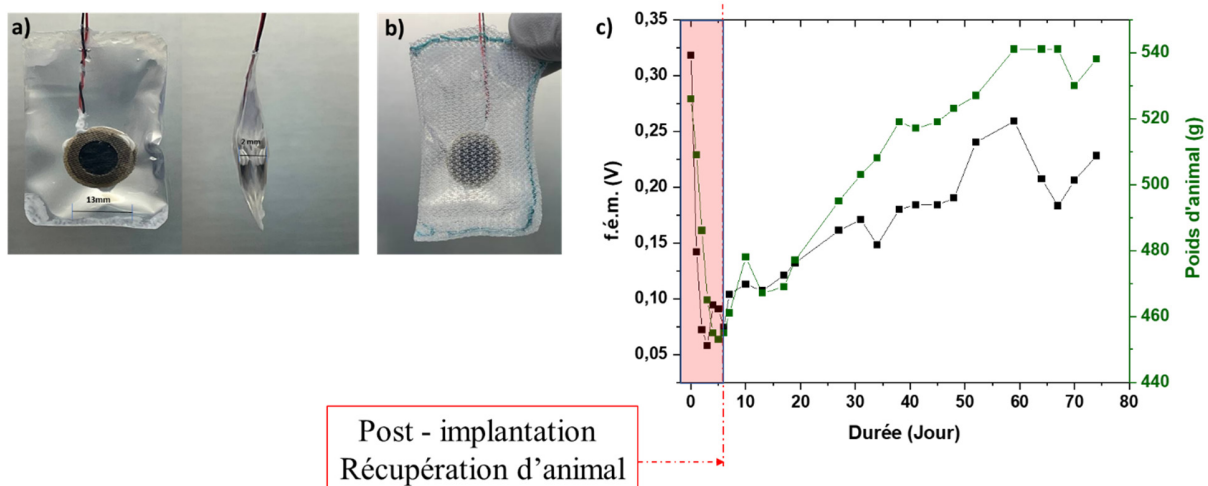


Figure 5.23 : Photos de la biopile avant l'implantation : a) – dans le sac de dialyse avec le PBS 0,15 mol L⁻¹ stérilisé, pH 7,4 et 5 mmol L⁻¹ de glucose stérile, b) – de la système précédente dans le tissu chirurgical ; c) – l'évolution des valeurs de la f.é.m. (ligne pointillée noire) de la biopile implantée en fonction du temps et l'évolution du poids du rat (ligne pointillée verte) après la chirurgie d'implantation de biopile.

Nous avons ensuite étudié la f.é.m. de la biopile implantée au cours du temps pour connaître son comportement dans le milieu interstitiel dans l'organisme vivant. Le poids de l'animal opéré a aussi été suivi pour contrôler son état de santé (Figure 5.23, c).

Après que le rat se soit réveillé de l'anesthésie, une première mesure de la f.é.m. de la pile a été effectuée, elle a présenté une valeur de 0,318 V. Les valeurs de la f.é.m. ont été mesurées périodiquement pendant 74 jours. Comme prévu, une petite perte de poids a été observée au

début en raison de l'intervention chirurgicale. La période de la chute du poids de l'animal est appelée la période de récupération de l'animal post-implantation. On remarque que durant cette période une chute de la f.é.m. a été aussi observée. Cela est dû au fait que l'animal ne se nourrit pas correctement et il ne bouge pas. Par conséquent il se retrouve dans un état d'hypoglycémie ce qui entraîne un manque de substrat pour la biopile. À partir du 5^{ème} jour, où le poids du rat avait présenté le poids le plus bas (453 g) et également la f.é.m. la plus basse (0,074 V), une augmentation du poids du rat a été observée, accompagnée d'une augmentation de la f.é.m. Cela confirme que la f.é.m. dépend de la quantité de glucose chez le rat. À partir du 59^{ème} jour, la biopile creuse implantée a présenté une stabilité relative de la f.é.m. d'environ 0,227 V. Au bout de 2,5 mois, il a été décidé d'euthanasier le rat selon le règlement imposé par le comité d'éthiques. Au 74^{ème} jour la dernière mesure de la f.é.m. a été effectuée et elle était de 0,228 V.

5.2.3 Biopile à cavité post - in vivo

Après la mort du rat, une autopsie a été effectuée pour extraire la biopile et étudier ces performances *post in vivo*. Les résultats de ces études sont présentés ici.

Pour commencer, il faut noter que la région abdominale du rat où le dispositif a été implanté a révélé une récupération complète de la peau du rat après 74 jours (Figure 5.24, a). En outre, l'autopsie n'a révélé aucun signe de rejet ou d'inflammation dans la région des viscères, où le dispositif a été implanté, comme on peut le voir sur la figure 5.24, b. L'implant est complètement entouré par des vaisseaux sanguins et des tissus biologiques.

Pour rappel, la figure 5.24, c présente une photo du dispositif de biopile à bioélectrodes creuses avant l'implantation. En comparaison, la photo de la biopile implantée qui a été récupérée dans le rat est présentée sur la figure 5.24, d. L'implant est entouré par un tissu adipeux adhérent et complètement recouvert d'une épaisse couche de tissu vascularisé. Ces observations assurent l'excellente biocompatibilité du dispositif de la biopile implantée.

Pour examiner plus précisément le système, le dispositif recouvert de tissu adipeux a été immergé dans le PB pH 7,4 en présence de 100 mmol L⁻¹ de glucose et sous saturation en O₂. Après 4h d'exposition, il a été observé une augmentation de la f.é.m. à 0,419 V et à nouveau à 0,590 V après 48h. Ces résultats démontrent clairement que le dispositif de pile à cavité a été capable de récupérer son état d'équilibre même après 74 jours d'implantation. Cependant, on a remarqué une limitation de la diffusion du substrat (glucose) à travers les tissus adipeux vers la biopile, même si la vascularisation des tissus qui recouvraient le dispositif était évidente.

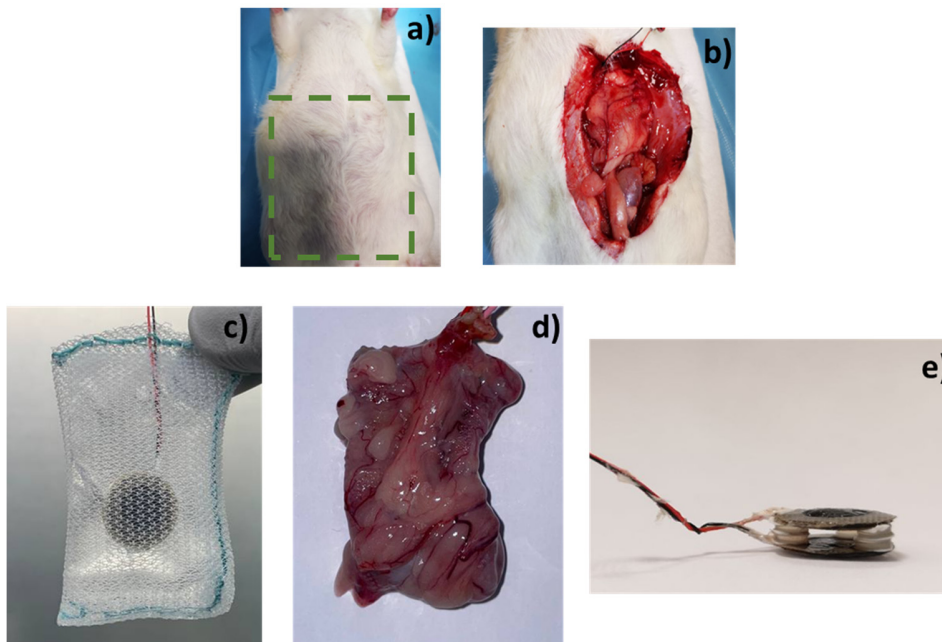


Figure 5.24 : Photos de : a) – l'abdomen du rat au bout de 74 jours après la chirurgie ; b) – l'abdomen ouvert avec le dispositif encore intégré dans l'organisme ; c) – le dispositif avant l'implantation ; d) – le dispositif récupéré du rat après 74 jours d'implantation ; e) – la biopile récupérée après 74 jours d'implantation dans le rat.

L'étape suivante a été l'extraction de la biopile du sac de dialyse entouré du tissu chirurgical et tissu vasculaire. Pour cela on a découpé très délicatement l'entourage de la biopile sans abimer ou détruire la biopile située à l'intérieur. Nous avons récupéré la biopile qui a montré une excellente stabilité mécanique dans le temps *in vivo*, sans aucun défaut visible à l'œil (Figure 5.24, e).

Une étude d'histologie a été effectuée sur un morceau du tissu biologique qui entourait la biopile.

Les échantillons de tissus biologiques ont été plongés dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 48h avant d'être déshydratés et imprégnés de paraffine. Les blocs de paraffine ont ensuite été découpés en tranches de 5 μm d'épaisseur qui ont été colorées en hématoxyline-éosine-safran à l'aide d'un appareil Autostainer XL. Les tranches de tissu résultantes ont ensuite été mises sur des lamelles de verre et les images ont été réalisées à l'aide d'un scanner de lames Axioscan Z1 (Figure 5.25).

Comme on peut l'observer sur la figure 5.25, a les fibres du tissu chirurgical (blanc) étaient recouvertes de tissu conjonctif sans signe d'inflammation ou d'infection. La figure 5.25, b illustre une partie du tissu qui était en contact direct avec l'intestin. Ce morceau de tissu présente des villosités saines sans altération grossière du tissu de la paroi intestinale. Ces études complémentaires d'histologie nous ont confirmé que notre dispositif était bien toléré par l'organisme vivant.

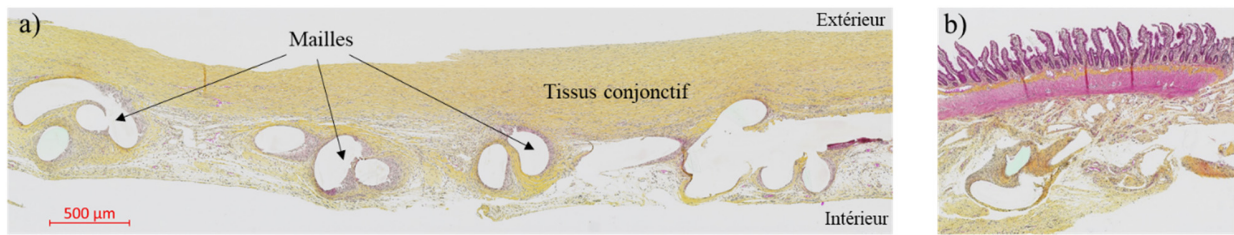


Figure 5.25 : Coloration à l'éosine-hématoxiline de la paroi du sac entourant la biopile. a) - les fibres du filet, mailles (blanc) étaient recouvertes de tissu conjonctif ; b) - une partie du sac étant en contact avec l'intestin.

Pour finir nos explorations sur la biopile *post in vivo*, nous avons effectué une caractérisation de ces performances électrochimiques, ainsi que les performances de chaque demi-pile séparée.

Tout d'abord, nous avons remis la biopile dans ces conditions optimales, c'est-à-dire dans le PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ à pH 6,5, en présence de glucose 100 mmol L^{-1} et sous barbotage de O_2 , avec une agitation de 250 rt/min à 25°C . Une LSV a été effectuée et les courbes de polarisation ont été tracées (Figure 5.26, a). Cette biopile qui a été implantée *in vivo* pendant 2,5 mois présente encore une puissance de $31 \mu\text{W}$ (soit $40,3 \mu\text{W cm}^{-2}$), une f.é.m. de $0,48\text{V}$ et un courant maximum de $0,170 \text{ mA}$ dans des conditions *in vitro*.

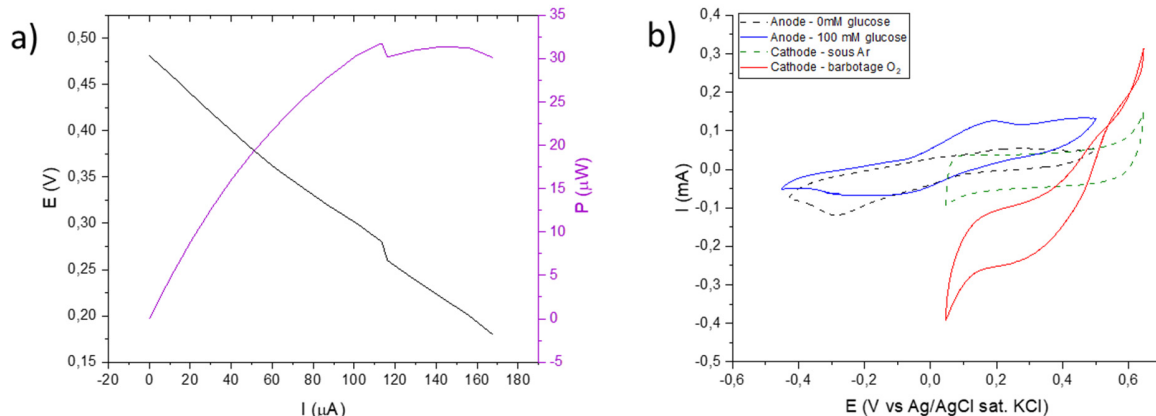


Figure 5.26 : a) - courbes de polarisation obtenues par la méthode LSV d'une biopile implantée dans le rat durant 74 jours. Conditions expérimentales : barbotage de O_2 , 100 mmol L^{-1} de glucose, PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5, 1 mVs^{-1} , 25°C , 250 rt/min ; b) - voltampérogrammes cycliques de la biocathode implantée chez le rat pendant 74 jours (sous Ar - ligne pointillée verte, sous barbotage de O_2 - ligne pleine rouge) et de la bioanode implantée chez le rat pendant 74 jours (absence de glucose - ligne pointillée noire, 100 mmol L^{-1} de glucose - ligne pleine bleue). Conditions expérimentales : PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5, 1 mVs^{-1} , 25°C , 250 rt/min

Ensuite, chaque bioélectrode a été testée séparément. Sur la figure 5.26, b les voltampérogrammes cycliques enregistrés pour les demi-piles sont présentées.

Tout d'abord, nous avons étudié les performances de la bioanode dans l'électrolyte sans le glucose (Figure 5.26, b ligne pointillée noire). Ensuite nous avons rajouté du glucose de 100 mmol L^{-1} et un CV a été réalisé (Figure 5.26, b ligne solide bleue). La bioanode a fourni

Chapitre 5. Biopiles enzymatiques in vitro et in vivo

0,064 mA en courant ce que correspond à $0,08 \text{ mA cm}^{-2}$ en densité de courant. En comparaison avec des courants obtenus dans les mêmes conditions avant l'implantation, notre bioanode a perdu 98,8% de ces performances (il lui en reste 1,2% du courant initial).

Les caractérisations de la biocathode ont été effectuées ensuite. D'abord une CV a été effectuée en absence de O_2 , c'est-à-dire sous Ar (Figure 5.26, b ligne pointillée verte) et après une autre CV a été effectuée en présence de O_2 saturé par barbotage (Figure 5.26, b ligne solide rouge). La biocathode étudiée donne -0,176 mA en courant soit $-0,23 \text{ mA cm}^{-2}$ en densité de courant. Cela correspond à 13 % de valeurs initiales avant l'implantation.

Le tableau 5.6 résume les performances catalytiques en condition *in vitro* des bioélectrodes extraites du rat après 2,5 mois d'implantation. Cette présentation permet de comprendre comment évoluent les bioélectrodes dans le temps *in vivo*. Ainsi, elle permet de mettre en évidence laquelle des deux demi-piles est moins stable dans le temps. Les résultats obtenus pour les bioélectrodes post implantées sont cohérentes avec les résultats obtenus pour les bioélectrodes *in vitro*. On confirme que c'est l'anode qui est moins stable dans le temps même si au départ c'est cette électrode qui donne les courants les plus élevés.

Tableau 5.6 : Représentations des performances des bioélectrodes *in vitro* et post-implantation *in vivo*

	I_{cat} de la bioanode @0,3V, mA	J_{cat} de la bioanode @0,3V, mA/cm²	J_{cat} de la bioanode restant, %	I_{cat} de la biocathode @0,3V, mA	J_{cat} de la biocathode @0,3V, mA/cm²	J_{cat} de la biocathode restant, %
Avant l'implantation	5,13	6,67	1,2	-1,46	-1,89	12
Post in vivo (après 2,5 mois)	0,064	0,08		-0,176	-0,23	

Conclusion

Ce chapitre s'est porté sur les études concernant les biopiles enzymatiques. Deux types de biopiles, celles à compression et celles à cavité, ont été explorés.

La première partie a été orientée vers les études de la biopile à base des bioélectrodes à compression développées dans le chapitre 2. Les performances de ces biopiles *in vitro* ont été d'abord évaluées. Pour commencer, les paramètres de la biopile dans le PB à pH 7,4 et des conditions saturées en substrats enzymatiques via une méthode de caractérisation LSV ont été étudiés. Ensuite, une influence de sac de dialyse sur les performances électrocatalytiques de la biopile a été examinée. Comme résultats, nous avons déterminé que la présence du sac de dialyse autour de la biopile entraîne une diminution de 21% de la puissance. Cette perte est causée par la limitation de la diffusion des substrats (O_2 et glucose) à travers les parois du sac.

Ensuite, une étude portée sur l'influence des concentrations en substrats enzymatiques sur les performances de la biopile à compression dans le PBS à pH 7,4 est présentée. Nous avons constaté que la biopile fournit le double de sa puissance (28 μW vs 14 μW) et le triple de son courant maximum (0,036 mA vs 0,092 mA) dans des conditions saturées en O_2 et 100 mmol L^{-1} de glucose par rapport aux conditions non saturées avec O_2 à l'air et 5 mmol L^{-1} de glucose. Les f.é.m. de la biopile dans les deux cas sont relativement proches de 0,42 V pour les conditions saturées en substrat et 0,39 V pour les non saturées. Pour évaluer les performances de la biopile dans des conditions proches de celles *in vivo* (PBS, pH 7,4, 5 mmol L^{-1} de glucose, sous air) nous avons aussi effectué une caractérisation par la méthode « charge/décharge ». Cela nous a permis d'apprendre que la biopile dans ces conditions peut fournir jusqu'à 64 μW de puissance soit 229 $\mu W cm^{-2}$ en densité de puissance.

Les investigations suivantes, présentée dans ce chapitre, ont été orientées vers la caractérisation de la biopile à compression dans des conditions extrêmement proches de celles du vivant. Ces conditions incluent un milieu extracellulaire artificiel en tant qu'électrolyte, une température physiologique de 37°C, un pH de 7,4 et des concentrations en substrats enzymatiques non saturées (5 mmol L^{-1} de glucose et sous air). Il a été démontré que la biopile est capable de fournir 114 μW en puissance à un courant maximum de 0,7 mA, avec une f.é.m. de 0,47 V. Ayant besoin d'un matériau de protection pour recouvrir notre dispositif avant l'implantation *in vivo*, nous avons effectué l'étude de la biopile enchâssée dans un tissu chirurgical type SWING-MESH®. En sa présence, la biopile ne perd pas de puissance (69 μW sans tissu vs 73 μW avec). Pour la suite, nous avons enchâssé nos systèmes de biopile dans un sac de dialyse puis dans le tissu chirurgical avant leur implantation chez l'animal.

La deuxième partie de ce chapitre porte sur une méthode de stérilisation chimique à la chlorhexidine pour les systèmes électrochimiques avant leur implantation *in vivo*. Tout d'abord, les études bactériologiques ont été effectuées, afin de définir un protocole adapté. Différentes concentrations de CHx, telles que 0,2%, 0,5 % et 1 % ont été explorées, ainsi que le temps de traitement de 30s, 1 min et 5 min. Comme résultats, une stérilisation à 0,5% en masse du CHx dans l'eau pendant 5 minutes, se présente comme parfaitement bactéricide, et a été choisie pour la suite.

Une influence de la stérilisation par la CHx sur les performances des bioélectrodes et de la biopile a ensuite été démontrée. Au cours de cette étude, nous avons appris que le traitement au CHx à 0,5% pendant 5 minutes cause une perte de performances de 13 à 27% sur la biocathodes. Cependant, le même traitement n'introduit pas de dégradation sur les bioanode, au contraire la CHx contribue à une légère augmentation de ses performances.

Pour finir les études sur la stérilisation, son effet sur la biopile telle qu'est fabriquée et la biopile enchâssée dans le sac de dialyse ont été aussi investiguées. Premièrement, une caractérisation de la biopile dans le PB $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ à pH 7,4, à 25°C avec des conditions saturées en substrats avant et après le traitement au CHx 0,5% pendant 5 minutes a été effectuée. Pour résultats, une puissance de $97 \mu\text{W}$ (f.é.m. 0,51 V, courant 0,260 mA) a été obtenue pour la biopile non traitée. Tandis que, pour la biopile traitée au CHx les valeurs sont légèrement augmentées : la puissance est de $106 \mu\text{W}$, la f.é.m. est de 0,54 V et le courant maximum est de 0,241 mA. Cette croissance des performances de la biopile peut être liée à l'augmentation des performances de la bioanode grâce au CHx vue précédemment. Deuxièmement, les mêmes études ont été effectuées sur la biopile dans le sac de dialyse rempli d'électrolyte. Une telle biopile non traitée fournie $77 \mu\text{W}$ en puissance à 0,215 mA. Après le traitement au CHx les performances de la biopile dans le sac de dialyse ont été diminuées. Une perte de puissance de 13% est enregistrée, de plus le courant maximal a chuté de 15% aussi, tandis que la f.é.m. est égale dans les deux cas, 0,51 V. La perte en puissance et en courant sont liées à la limitation de la diffusion des substrats enzymatiques à travers les parois du sac de dialyse, ses pores pouvant être partiellement bouchés par des résidus de CHx adsorbées.

La dernière partie sur les biopiles à compression, est dédiée à leur implantation *in vivo*. La biopile dans le sac de dialyse rempli de PBS à pH 7,4 avec 5 mmol L^{-1} de glucose a été placée dans le tissu chirurgical, stérilisée selon le protocole défini et implantée dans l'abdomen du rat Sprague-Dawley. Un suivi de la f.é.m. de la biopile a été effectué. Une valeur de 0,17 V a été obtenue environ 1 heure après l'implantation, ensuite une chute pendant 2 jours a été obtenue. Cette chute est causée par l'étape de récupération post-chirurgicale de l'animal qui est initialement dans un état d'hypoglycémie. Au 3^{ème} jour une f.é.m. proche de celle initiale (autour de 0,16 V) est observée, ce qui indique le début de la récupération de l'animal et un meilleur apport des substrats. Cependant, au jour 4 la tension de la pile a brusquement diminué et les expériences n'ont pas pu être poursuivies. Pour étudier la cause d'un tel comportement, le rat a été euthanasié et la biopile a été extraite. Le système récupéré du rat était recouvert de tissus biologiques ce qui indique une tolérance par l'organisme vivant. Par contre, le sac de dialyse était rempli de CNTs dus à la destruction des électrodes. Cette destruction a été causée par la pression du corps du rat sur les bords des pastilles qui sont finalement très fragiles. Pour continuer l'implantation de ces biopiles, il faudra développer un nouveau support pour les bioélectrodes. En perspective, ce support doit être à la fois rigide et ne pas présenter de risque de blesser l'animal. Une fois qu'un tel dispositif sera mis en place, les études sur les biopiles à compression implantées pourront être poursuivies.

Chapitre 5. Biopiles enzymatiques *in vitro* et *in vivo*

La partie suivante de ce chapitre décrit les études sur les biopiles à base des bioélectrodes à cavité développées dans le chapitre 4 de ce manuscrit. Tout d'abord, leurs performances ont été évaluées dans des conditions *in vitro*.

Pour commencer, une simulation mathématique a été effectuée à partir des voltampérogrammes de chaque demi-piles. Cela nous a permis de construire des courbes de polarisation et de puissance, estimant donc une puissance de la biopile étudiée. À partir de ce calcul nous avons pu supposer que notre biopile fournira jusqu'à 600 μW en puissance à un courant maximal de 2,4 mA avec une f.é.m. de 0,8 V. Ensuite, une caractérisation par la méthode charge/décharge a été effectuée sur une biopile réelle dans le PB 0,1 mmol L⁻¹ à pH 6,5 avec la saturation en substrats, tout en assurant un régime stationnaire des mesures. On a retrouvé les mêmes ordres de grandeur pour les trois paramètres de la biopile que ceux simulés. La biopile à compression peut donc fournir jusqu'à 807 μW de puissance dans les conditions optimales *in vitro*. Une stabilité dans le temps de la biopile étudiée a été explorée. On peut noter que pendant 18 jours de fonctionnement périodique notre biopile n'a pas perdu sa puissance.

Par la suite, une étude sur la distance entre les deux demi-piles a été décrite. Quatre distances ont été étudiées : 0,2, 0,5, 1 et 2 cm. Une distance de 0,5 cm a été définie comme optimale, car au-dessous de cette valeur une limitation de la diffusion des substrats est présente et au-dessus il y a une forte chute ohmique causant des pertes au niveau de la tension et de la puissance.

La partie suivante porte sur l'influence des tampons et de leur pH sur le fonctionnement de la pile. Trois solutions ont été utilisées : PB 0,1 mmol L⁻¹ à pH 6,5, HEPES 0,25 mmol L⁻¹ + NaCl 0,15 mol L⁻¹ à pH 6,5 et le PBS 0,15 mol L⁻¹ à pH 7,4. Dans le premier tampon, qui représente les conditions optimums, la biopile à cavité fournit 226 μW en puissance à courant maximal de 0,4 mA avec une f.é.m. de 0,66 V. Ensuite, dans le tampon HEPES 0,25 mmol L⁻¹ + NaCl 0,15 mol L⁻¹ à pH 6,5 couramment utilisé *in vivo* les performances de la biopile diminuent de 2,6 fois par rapport à celles dans PB (88 μW vs 226 μW), son courant maximal est de 0,28 mA et sa f.é.m. de 0,47 V. Une telle perte de puissance est causée par l'inhibition enzymatique par les ions Cl⁻. Dans le PBS à pH 7,4, la biopile fournit 92 μW de puissance, cette valeur correspond à 1,1 fois la valeur dans le HEPES + NaCl et à 0,4 fois dans le PB. Dans ce cas-là, la perte n'est pas seulement causée par une possible inhibition due aux ions Cl⁻, mais aussi par le changement de pH de 6,5 à 7,4. Cette influence du pH avait été explorée dans le chapitre 4 du manuscrit.

Avant de passer aux études *in vivo*, la partie suivante de ce chapitre a visé à mettre en évidence un concept de biopile à cavité fabriquée à partir des buckypapers home made. Pour rappel, toutes les biopiles à cavité précédente sont de type « hybride ». Elles sont composées avec deux types de BPs : commercial et home made. Premièrement, une biopile à base de deux bioélectrodes creuses « non hybrides » avec la cathode fonctionnant via DET a été étudiée. Cette biopile a montré des bonnes performances : 293 μW de puissance ce qui est 29% plus élevé que celle de la biopile « hybride », la f.é.m. de 0,64 V et le courant maximal de 1 mA (l'hybride – 0,4 mA). Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus pour des bioélectrodes séparées dans le chapitre 4. La deuxième biopile à base de bioélectrodes à cavité « non hybride » diffère par sa

biocathode. Ici la biocathode fonctionne avec un mécanisme double, DET et MET. La biopile de cette composition a montré d'excellentes performances, avec une augmentation de puissance de 48% (432 μ W vs 293 μ W). Ces deux biopiles sont très prometteuses pour l'implantation *in vivo*, par contre elles nécessitent d'abord des études supplémentaires.

Pour terminer les études sur les biopiles à cavité « hybrides », leur implantation et le suivi *in vivo* ont été réalisés. Les biopiles à cavité placées dans le sac de dialyse ont été enchâssées par du tissu chirurgical et implantées dans l'abdomen du rat. L'évolution de la f.é.m. *in vivo*, ainsi que l'évolution du poids de l'animal ont été étudiées pendant 2,5 mois. Une f.é.m. de 0,318 V après l'implantation a été enregistrée. Comme attendu, une chute de la tension due à la récupération du rat au cours de premières 3-5 jours est observée. Au jours 74, avant l'euthanasie du rat, la f.é.m. était de 0,228 V, cette valeur était stable pendant une vingtaine de jours.

La dernière partie de ce chapitre porte sur les études *post in vivo* de la pile implantée chez le rat pendant 2,5 mois. Il faut surtout signaler que la plaie chirurgicale sur le ventre de l'animal était parfaitement cicatrisée sans aucun signe d'irritation, à l'ouverture du ventre un système parfaitement vascularisé a été retrouvé. Après l'euthanasie de l'animal, la biopile extraite représentait les mêmes dimensions qu'avant l'implantation, elle était recouverte par des tissus biologiques et vasculaires. Cela indique que la biopile a été très bien tolérée par l'organisme sans aucun rejet ou infection. Pour le confirmer, une étude d'histologie a été effectuée. Cette étude a affirmé l'absence d'un quelconque signe d'inflammation ou d'infection. La biopile elle-même, à l'intérieur du sac de dialyse était mécaniquement intacte.

Pour conclure, les études électrochimiques *post in vivo* de la biopile à cavité implantée chez le rat pendant 2,5 mois sont présentées dans la dernière partie du chapitre. La biopile extraite du sac de dialyse a été testée dans des conditions optimales *in vitro*. L'évaluation de ses performances a révélé qu'au bout de 2,5 mois il restait 30 μ W de puissance maximum avec un courant de 0,17 mA et une f.é.m. de 0,48 V. En ce qui concerne les bioélectrodes séparées, après une étude par voltampérométrie cyclique, un courant égal à 13% de la valeur initiale pour la biocathodes et de 1,2 % de la valeur initiale pour la bioanodes ont été retrouvées. On a confirmé les données obtenues pour les demi-piles *in vitro* dans le chapitre 4, c'est-à-dire que la bioanode qui a au départ des courants plus élevés est beaucoup moins stable dans le temps. En perspective, pour ces biopiles il serait intéressant de développer et d'étudier les bioanodes « hybrides » de manière plus approfondie. De plus, il serait intéressant d'explorer davantage les biocathodes « non hybrides » et les biopiles correspondantes.

Bibliographie

- [1] S. Cosnier, A. J. Gross, A. le Goff, and M. Holzinger, “Recent advances on enzymatic glucose/oxygen and hydrogen/oxygen biofuel cells: Achievements and limitations,” *Journal of Power Sources*, vol. 325. Elsevier B.V., pp. 252–263, Sep. 01, 2016. doi: 10.1016/j.jpowsour.2016.05.133.
- [2] A. Zebda *et al.*, “Challenges for successful implantation of biofuel cells,” *Bioelectrochemistry*, vol. 124. Elsevier B.V., pp. 57–72, Dec. 01, 2018. doi: 10.1016/j.bioelechem.2018.05.011.
- [3] S. Cosnier, A. le Goff, and M. Holzinger, “Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review,” *Electrochemistry Communications*, vol. 38. pp. 19–23, 2014. doi: 10.1016/j.elecom.2013.09.021.
- [4] P. Cinquin *et al.*, “A glucose BioFuel cell implanted in Rats,” *PLoS One*, vol. 5, no. 5, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010476.
- [5] S. el Ichi-Ribault *et al.*, “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.
- [6] E. Katz, “Implantable Biofuel Cells Operating In Vivo—Potential Power Sources for Bioelectronic Devices,” *Bioelectron Med*, vol. 2, no. 1, pp. 1–12, Jun. 2015, doi: 10.15424/bioelectronmed.2014.00011.
- [7] A. Zebda *et al.*, “Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices,” *Sci Rep*, vol. 3, pp. 1–5, 2013, doi: 10.1038/srep01516.
- [8] 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, Feb. 2013, doi: 10.1039/c2lc41007a.
- [9] K. Shoji, Y. Akiyama, M. Suzuki, N. Nakamura, H. Ohno, and K. Morishima, “Biofuel cell backpacked insect and its application to wireless sensing,” *Biosens Bioelectron*, vol. 78, pp. 390–395, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.bios.2015.11.077.
- [10] P. Bollella, I. Lee, D. Blaauw, and E. Katz, “A Microelectronic Sensor Device Powered by a Small Implantable Biofuel Cell,” *ChemPhysChem*, vol. 21, no. 1, pp. 120–128, Jan. 2020, doi: 10.1002/cphc.201900700.
- [11] J. A. Castorena-Gonzalez *et al.*, “Biofuel Cell Operating in Vivo in Rat,” *Electroanalysis*, vol. 25, no. 7, pp. 1579–1584, Jul. 2013, doi: 10.1002/elan.201300136.
- [12] D. Lee *et al.*, “Totally implantable enzymatic biofuel cell and brain stimulator operating in bird through wireless communication,” *Biosens Bioelectron*, vol. 171, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2020.112746.
- [13] M. Southcott *et al.*, “A pacemaker powered by an implantable biofuel cell operating under conditions mimicking the human blood circulatory system-battery not included,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, no. 17, pp. 6278–6283, May 2013, doi: 10.1039/c3cp50929j.
- [14] L. di Trocchio *et al.*, “Wireless in Vivo Biofuel Cell Monitoring,” *IEEE J Electromagn RF Microw Med Biol*, vol. 5, no. 1, pp. 25–34, Mar. 2021, doi: 10.1109/JERM.2020.2998325.
- [15] Y. Guo *et al.*, “An Anti-Biofouling Flexible Fiber Biofuel Cell Working in the Brain,” *Small Methods*, vol. 6, no. 5, May 2022, doi: 10.1002/smt.202200142.
- [16] L. Wang *et al.*, “Designing Porous Antifouling Interfaces for High-Power Implantable Biofuel Cell,” *Adv Funct Mater*, vol. 31, no. 51, Dec. 2021, doi: 10.1002/adfm.202107160.
- [17] C. Boss, E. Meurville, J. M. Sallese, and P. Ryser, “A viscosity-dependent affinity sensor for continuous monitoring of glucose in biological fluids,” *Biosens Bioelectron*, vol. 30, no. 1, pp. 223–228, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.bios.2011.09.016.
- [18] Y. Yi Lau and A. G. Ewing, “Voltammetric Measurement of Oxygen in Single Neurons Using Platinized Carbon Ring Electrodes,” 1992.
- [19] A. de Poulpiquet *et al.*, “Mechanism of Chloride Inhibition of Bilirubin Oxidases and Its Dependence on Potential and pH,” *ACS Catal*, vol. 7, no. 6, pp. 3916–3923, Jun. 2017, doi: 10.1021/acscatal.7b01286.

- [20] M. G. Bongiorno *et al.*, “Microbiology of cardiac implantable electronic device infections,” *Europace*, vol. 14, no. 9, pp. 1334–1339, Sep. 2012, doi: 10.1093/europace/eus044.
- [21] M. T. McCann, B. F. Gilmore, and S. P. Gorman, “Staphylococcus epidermidis device-related infections: pathogenesis and clinical management,” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 60, no. 12, pp. 1551–1571, Nov. 2008, doi: 10.1211/jpp/60.12.0001.
- [22] “The limits of sterility assurance Die Grenzen der Sterilisationsicherheit OPEN ACCESS.”
- [23] L. S. Fifield *et al.*, “Direct comparison of gamma, electron beam and X-ray irradiation effects on single-use blood collection devices with plastic components,” *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 180, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.radphyschem.2020.109282.
- [24] X. Wang *et al.*, “A Glucose/O₂ Biofuel Cell Using Recombinant Thermophilic Enzymes,” 2012. [Online]. Available: <http://www>.
- [25] Z. Liu, “Analyte sensors with ethylene oxide immunity,” 2018.
- [26] SHAH, Rajiv, YANG, Qingling, MUCIC, Robert C., et al. Enzyme matrices for use with ethylene oxide sterilization. U.S. Patent Application No 14/532,364, 7 mai 2015.
- [27] YIDA, Xu, CHEN, Rui, et CHEN, Liu. Method for sterilizing membrane comprising glucose oxidase and associated bio-sensor. U.S. Patent Application No 14/402,453, 11 juin 2015..
- [28] T. von Woedtke, W.-D. Jülich, V. Hartmann, M. Stieber, and P. U. Abel, “Sterilization of enzyme glucose sensors: problems and concepts,” 2002. [Online]. Available: www.elsevier.com
- [29] S. el Ichi *et al.*, “Bioelectrodes modified with chitosan for long-term energy supply from the body,” *Energy Environ Sci*, vol. 8, no. 3, pp. 1017–1026, Mar. 2015, doi: 10.1039/c4ee03430a.
- [30] J.-P. Alcaraz, “Conception guidée par la physiologie de biopiles bioinspirées implantables,” Grenoble, Oct. 2016. [Online]. Available: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01473414v2>
- [31] S. Ahmed, G. P. Rigby, P. Crump, and P. M. Vadgama, “Comparative assessment of chemical and g-irradiation procedures for implantable glucose enzyme electrodes,” 2000. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/bios
- [32] T. von Woedtke *et al.*, “The influence of antimicrobial treatments on the cytocompatibility of polyurethane biosensor membranes,” *Biosens Bioelectron*, vol. 19, no. 3, pp. 269–276, Nov. 2003, doi: 10.1016/S0956-5663(03)00217-3.
- [33] B. McEvoy and N. J. Rowan, “Terminal sterilization of medical devices using vaporized hydrogen peroxide: a review of current methods and emerging opportunities,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 127, no. 5. Blackwell Publishing Ltd, pp. 1403–1420, Nov. 01, 2019. doi: 10.1111/jam.14412.
- [34] A. K. S. T. M. Karpiński, “Chlorhexidine – pharmaco-biological activity and application,” 2015.
- [35] Z. L. S. Brookes, R. Bescos, L. A. Belfield, K. Ali, and A. Roberts, “Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review,” *Journal of Dentistry*, vol. 103. Elsevier Ltd, Dec. 01, 2020. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103497.
- [36] M. R. Leonardo, M. T. Filho, L. A. B. Silva, P. N. Filho, K. C. Bonifacio, and I. Y. Ito, “In Vivo Antimicrobial Activity of 2% Chlorhexidine Used as a Root Canal Irrigating Solution,” 1999.
- [37] R. O. Darouiche, M. D. Mansouri, and E. M. Kojic, “Antifungal activity of antimicrobial-impregnated devices,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 12, no. 4, pp. 397–399, 2006, doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01369.
- [38] S. Bassetti, J. Hu, J. D’Agostino, and R. J. Sherertz, “Prolonged antimicrobial activity of a catheter containing chlorhexidine-silver sulfadiazine extends protection against catheter infections in vivo,” *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 45, no. 5, pp. 1535–1538, 2001, doi: 10.1128/AAC.45.5.1535-1538.2001.
- [39] M. A. Winkler *et al.*, “Clinical experience with a chlorhexidine-coated PICC: A prospective, multicenter, observational study,” *J Vasc Access*, p. 112972982110496, Oct. 2021, doi: 10.1177/11297298211049648.
- [40] M. Riool *et al.*, “A chlorhexidine-releasing epoxy-based coating on titanium implants prevents Staphylococcus aureus experimental biomaterial-associated infection,” *Eur Cell Mater*, vol. 33, pp. 143–157, Jan. 2017, doi: 10.22203/eCM.v033a11.

Chapitre 5. Biopiles enzymatiques in vitro et in vivo

- [41] A.-J.-D. S. and A.-B. M. A. Tweij-Thu-Alfeqar Razzaq, “Sterilization of Surgical Tools: Removing Bacterial Endospores with a Combination of Povidone-iodine, Chlorhexidine Gluconate, Ethanol, and Methanol,” *J Pure Appl Microbiol*, vol. 13, no. 4, pp. 2449–2457, 2019.
- [42] P. Cinquin *et al.*, “A glucose BioFuel cell implanted in Rats,” *PLoS One*, vol. 5, no. 5, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010476.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES

Ce travail de recherche comportait deux objectifs principaux. L'un était de développer et d'optimiser des bioélectrodes de différentes configurations, l'autre était de proposer un concept de biopile enzymatique capable de produire de l'énergie *in vivo*.

En tout premier lieu, le chapitre 1 de ce manuscrit porte sur une étude bibliographique. Cette étude propose une revue des différents types de pile et biopile à combustible, présentant leurs principes de fonctionnement, leur classification, ainsi que leurs applications. Un intérêt particulier a été apporté aux biopiles enzymatiques glucose/O₂ et leurs composants, tels que les biocatalyseurs (enzymes) et les matériaux d'électrode. Les différents types d'enzyme, les techniques qui permettent de les immobiliser à la surface d'une électrode et les méthodes de transfert électronique entre enzyme et électrode, ont été également décrits. Un accent a été mis sur l'intégration de nanomatériaux carbonés dans la conception de tels systèmes. Enfin, des applications particulières des biopiles enzymatiques, telles que les systèmes portables ou implantables, ont été explorées.

À la suite de cette étude bibliographique, le deuxième chapitre de ce manuscrit a permis de décrire le développement et l'exploration d'une procédure simplifiée de fabrication d'une large gamme de bioélectrodes autoportantes de grande surface. La fabrication d'électrodes par la simple compression de nanotubes de carbone et de poudres de protéines a été étudiée en utilisant une série de 11 protéines. Les points isoélectriques (pI) des protéines étaient compris entre 3,5 et 12 et les poids moléculaires entre 12,4 et 480 kDa. La compression de CNTs avec la diaphorase, la laccase, la BOx, la FAD-GDH, la catalase et l'uréase a donné des biopastilles mécaniquement stables dans une solution aqueuse. Pour la Cyt C, la BSA, la GAOx, la GOx, et la HRP, le contact avec le tampon déstabilisait la biopastille induisant une destruction rapide du composite. En parallèle, des pastilles ont été fabriquées avec des médiateurs redox différemment chargés : hémine, [Ru(NH₃)₆]³⁺, [Fe(CN)₆]³⁻, 1,4-NQ, ABTS, p₂-ABTS ou PLQ. La présence des trois derniers conduisait à la destruction mécanique de la pastille. Plusieurs paramètres ont été explorés afin d'étudier les facteurs qui déterminent la stabilité de ces électrodes. Il est apparu que la masse moléculaire des protéines n'avait pas d'effet, tandis que le point isoélectrique peut exercer une influence. En effet, si la charge globale de l'enzyme est fortement positive ou négative, les compressions sont mécaniquement instables, alors que les charges plus faibles conduisent à des électrodes stables. Cependant, il y a trois exceptions à cette règle, la BOx, la FAD GDH, et la laccase, qui, tout en ayant une forte charge négative, permettent de former les pastilles stables. Il a aussi été montré qu'il n'y avait aucun impact de la nature et de la charge des molécules redox sur la stabilité des compressions. Des électrodes stables ont ensuite été élaborées, pour la réduction de O₂ et l'oxydation du glucose. Les biocathodes à base de BOx ont mis en évidence un phénomène de DET pour la réduction de O₂, ainsi qu'une favorisation d'une orientation de la BOx par l'hémine via des interactions électrostatiques (-2,12 mA cm⁻² vs -3,93 mA cm⁻²). La conception des bioanodes basées sur la connexion MET de la FAD GDH avec différents médiateur redox a été explorée. Les meilleures activités électrocatalytiques ont été observées en présence de 1,4-NQ et de PQ (6,16 mA cm⁻² et 8,93 mA cm⁻², respectivement). Enfin, parallèlement à une étude de la morphologie des bioélectrodes via l'imagerie MEB, l'étude d'hydrophobicité des pastilles par des mesures d'angle de contacte a été effectuée. Ceci a permis

d'émètre l'hypothèse que l'introduction de protéines dans la composition de l'électrode augmente la porosité du disque et diminue leur caractère hydrophobe. En perspective pour ces travaux, une gamme d'études des différentes combinaisons médiateur/enzymes pourrait être explorées afin d'accroître les données et de confirmer l'hypothèse. De plus, une stabilité opérationnelle à long terme serait un élément intéressant à explorer vis-à-vis de ces bioélectrodes. Avec l'intention d'étendre les applications de ces bioélectrodes, il serait bénéfique d'explorer leurs stabilités mécaniques dans des solutions non aqueuses.

Le troisième chapitre s'est focalisé sur la recherche d'une nouvelle méthode de fabrication de bioélectrodes compressées qui permet potentiellement l'utilisation et la combinaison de tout couple médiateur redox/enzyme sans problème de déconstruction mécanique. Ici, une fabrication d'électrode en trois étapes a été proposée. Dans un premier temps, une matrice (pastille) à base de CNTs compressés est préparée, ensuite elle est fonctionnalisée avec les espèces électroactives (médiateurs) par adsorption suivie électrochimiquement. Pour finir, les électrodes fonctionnalisées sont modifiées par les enzymes. Dans la première partie de ce chapitre, les caractérisations des pastilles en CNTs sans additif ont été effectuées afin de connaître leur structure morphologique et leur perméabilité à l'électrolyte. Les images MEB ont révélé que la compression des CNTs mène à des blocs denses au niveau de la surface externe, tandis que les autres parois et l'intérieur se composent plutôt en strates. La caractérisation électrochimique a permis de mettre en évidence que le courant capacitif mesuré pour une pastille est négligeable ($0,945 \mu\text{A}$) en comparaison de celui d'un film mince de CNTs déposé sur une surface de GC ($5,7 \mu\text{A}$). Cela indique qu'une fraction étroite de la pastille est réellement en contact avec l'électrolyte, d'où son caractère hydrophobe. Dans la deuxième partie du chapitre 3, la fonctionnalisation des pastilles en CNTs par six différentes entités redox (dérivés ABTS et quinones) a été possible contrairement à ce qui avait pu être fait avec les pastilles à compression du chapitre 2. L'adsorption des espèces redox a été suivie par voltampérométrie cyclique à intervalle de temps réguliers. Outre l'augmentation du courant faradique avec le temps, signe de l'adsorption progressive de la sonde redox, cette étude a montré l'augmentation concomitante du courant capacitif pouvant indiquer une pénétration de l'électrolyte à l'intérieur de la pastille et donc une augmentation de sa perméabilité. En se basant sur les résultats obtenus, on peut estimer une hydratation des pastilles de l'ordre de 10% pendant l'adsorption du médiateur. La fabrication des biocathodes et des bioanodes à base de BOx pour la réduction de O_2 et à base de FAD GDH pour l'oxydation du glucose, a ensuite été réalisée. Pour la BOx, compatible avec le DET, une pastille sans espèce redox a été élaborée. Son courant catalytique négligeable a confirmé l'aspect hydrophobe de la pastille, qui empêche la pénétration de la solution enzymatique en limitant son adsorption. Les bioélectrodes, avec des combinaisons médiateur/enzyme, ont présenté des performances satisfaisantes avec des densités de courant proche de 2 mA cm^{-2} . En revanche, leur stabilité reste un point critique à étudier. Les biocathodes et les bioanodes perdent 95 % de leur activité après seulement deux et dix jours d'utilisation respectivement. Une autre perspective de cette étude est l'exploration d'une nouvelle approche de fabrication qui consisterait à la compression des CNTs avec l'enzyme suivie de l'adsorption des médiateurs. Cette nouvelle méthodologie devrait permettre une meilleure immobilisation des enzymes dans le volume de l'électrode en procurant un réservoir d'enzymes sur toute l'épaisseur de la compression.

Le quatrième chapitre est consacré à la recherche d'alternatives originales aux bioanodes et biocathodes compressées. Un concept innovant d'électrode a été mis en œuvre. Ce chapitre décrit une configuration de bioélectrode creuse (à cavité) basée sur l'assemblage de deux disques de buckypapers différents (un fabriqué au laboratoire, hBP et un commercial, cBP) scellés par leurs périmètres créant une microcavité qui contient et piège le biocatalyseur en poudre. Une majeure partie de ce chapitre est dédiée à l'étude des biocathodes à base de BO_x pour la réduction de O₂. Dans un premier temps, les électrodes de grande taille (S = 2,65 cm²) ont été étudiées. Une biocathode simplement basée sur l'incorporation de la BO_x a délivré une densité de courant de -0,47 mA cm⁻² par DET avec une stabilité de 75 jours. L'optimisation de ces électrodes par modification du hBP avec l'hémine a permis d'assurer une orientation des enzymes et une amélioration de leur connexion à l'électrode. Cette optimisation a conduit au triplement de la densité du courant catalytique (-1,01 mA cm⁻²) et à une durabilité d'au moins 6 mois. La combinaison du DET et du MET pour la biocathode par l'ajout d'ABTS dans la cavité a amplifié les performances de la cathode de 43 %. Dans la deuxième partie du chapitre, l'influence de la quantité de BO_x piégée dans la cavité sur les performances catalytiques a montré que la quantité de 2 mg était optimale. L'effet de la température et du pH a montré que la température de 37°C n'a pas d'impact sur la biocathode, alors que le pH de 7,4 a une influence négative. La troisième partie de ce chapitre, sur la miniaturisation des bioélectrodes par un facteur 4 en surface (0,77 cm²) a permis de mettre en évidence que les biocathodes avec la BO_x orientée ont leurs performances par unité de surface qui sont deux fois plus élevées que celles des grandes tailles (-1,90 mA cm⁻²). Pour terminer l'étude des cathodes, une nouvelle approche utilisant seulement des hBP a été proposée. Cette étude a montré que ces configurations sont les plus performantes parmi toutes celles étudiées. Ce travail reste toutefois à être confirmé et détaillé. La dernière partie de ce chapitre s'est focalisée sur le développement d'une bioanode à cavité à base de FAD GDH. Deux médiateurs redox, le PLQ et le 1,4-NQ, ainsi que deux façons de les déposer ont été explorées pour assurer le MET avec l'enzyme. La méthode pour déposer le médiateur par « one pot » a été utilisée, sur le côté hBP de la bioélectrode. Alors que la méthode « drop coating » a été utilisée sur les deux côtes (hBP + cBP). Dans le premier cas, la modification du hBP par PLQ a conduit à une bioanode 10 fois plus performante que par 1,4-NQ, alors que la méthode « drop coating » assure la fabrication de bioanodes de performances identiques avec les deux médiateurs. Pour terminer l'étude des bioanodes, une approche utilisant deux hBP pour fabriquer la cavité a également été explorée avec leurs modifications par PLQ avec la méthode « drop coating ». La concentration en PLQ électroactif a doublé, mais les performances électrocatalytiques d'oxydation du glucose sont restées inférieures à celles des bioanodes de type « hybride ». En perspective pour ces électrodes à cavité, une investigation approfondie sur la bioanode sera requise, à savoir l'influence de la quantité de médiateur, la diversité des espèces redox, l'influence de la température, et du pH. Il serait aussi intéressant d'étudier en détail les performances des bioélectrodes à base de deux disques de hBP qui n'ont pas pu être explorées suffisamment pour être correctement caractérisées.

Le cinquième et dernier chapitre décrit la conception de biopiles enzymatiques pour la production d'énergie *in vitro* et *in vivo*. Deux types de biopiles ont été étudiés : une conception

réalisée grâce aux électrodes compressées du chapitre 2 et l'autre conception réalisée grâce aux électrodes à cavité du chapitre 4.

La première partie du chapitre 5 est consacrée aux biopiles à compression qui se composent de la biocathode « CNTs / hémine / BOx » et la bioanode « CNTs / 1,4-NQ / GOx / catalase ». Tout d'abord, la biopile a été étudiée *in vitro*. Dans le PBS, à pH 7,4 avec des substrats saturés (100 mmol L⁻¹ de glucose et barbotage de O₂), la biopile a une f.é.m. de 0,51 V et elle peut fournir jusqu'à 98 μW de puissance. Lorsque la biopile est enchâssée dans le sac de dialyse, une perte de 21% de la puissance est observée. L'effet des concentrations en substrats enzymatiques, étant le point faible pour les expériences *in vivo* (faibles concentrations dans l'organisme), les performances de la biopile ont été vérifiées et cela a montré une perte de 50% en conditions non saturées en substrats (5 mmol L⁻¹ de glucose et sous air) par rapport aux conditions saturées. Grâce à un électrolyte qui mime le milieu extracellulaire artificielle, à pH 7,4 et à température de 37°C, avec 5 mmol L⁻¹ de glucose et sous air, la biopile à compression est capable de fournir 114 μW de puissance maximum avec une f.é.m. de 0,47 V. De plus, l'utilisation du tissu biocompatible chirurgical de type SWING-MESH® en tant que couche externe du dispositif implantable n'a aucune influence sur les performances de la biopile.

Avant de passer à l'implantation de ces biopiles, l'étude de stérilisation chimique à la chlorhexidine et son influence sur les performances électrochimiques ont été effectuées. Différentes concentrations de CHx, telles que 0,2%, 0,5 % et 1 %, ainsi que le temps de traitement de 30 s, 1 min et 5 min, ont été explorées afin de définir un protocole de stérilisation adapté. La stérilisation à 0,5% pendant 5 minutes a été choisie. Au cours de l'étude, il a été découvert que le traitement au CHx à 0,5% pendant 5 minutes cause une perte de performances de 13 à 27% sur la biocathode. Cependant, le même traitement n'introduit pas de dégradation sur la bioanode. Pour finir, la puissance est égale à 97 μW (f.é.m. 0,51 V, courant maximum 0,260 mA) pour la biopile non traitée, tandis qu'elle est égale à 106 μW (f.é.m. 0,54 V, courant maximum 0,241 mA) pour la biopile traitée au CHx. Les mêmes études ont été effectuées sur les biopiles enchâssées dans le sac de dialyse. Après le traitement de la pile dans le sac, une perte de 13% en puissance est notée. La dernière partie sur les biopiles à compression est dédiée à leur implantation *in vivo*. La biopile dans le sac de dialyse enchâssée par le tissu chirurgical a été implantée dans l'abdomen du rat Sprague-Dawley. Une valeur de la f.é.m. de 0,17 V a été obtenue environ 1 heure après l'implantation, la même valeur a été retrouvée le jour 3 après la période de récupération post-chirurgicale. Au bout de 4 jours, les mesures *in vivo* sont devenues impossibles, donc le rat a été euthanasié et la biopile a été extraite. La biopile récupérée du rat avait des tissus biologiques, qui confirment une tolérance par l'organisme. Cependant, la biopile elle-même était mécaniquement détruite, certainement par le poids d'animal. En perspective, pour continuer l'implantation de ces biopiles, il est nécessaire de développer un support qui sera à la fois rigide et sans risque de blesser l'animal.

La deuxième partie du chapitre 5 est dédiée aux biopiles à cavité composées d'une biocathode « hBP Hémine « one pot » / BOx / cBP » et d'une bioanode « hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / cBP PLQ « drop coating ». Une estimation des performances de la biopile a été faite via une simulation mathématique. Ceci a démontré qu'une telle biopile devrait

pouvoir fournir jusqu'à 600 μW en puissance avec une f.é.m. de 0,8 V dans des conditions optimales (PB, pH 6,5, conditions en substrat saturées). Ensuite, l'étude d'une biopile par méthode « charge/décharge » a permis de confirmer les ordres des grandeurs pour les paramètres estimés. De plus, cette biopile a été stable dans le temps pendant au moins 18 jours. Une influence de la distance entre deux demi-piles a permis de déterminer une distance optimale de 0,5 cm. L'influence des tampons et du pH sur le fonctionnement de la pile a été évaluée avec trois solutions : PB 0,1 mmol L⁻¹ à pH 6,5 ; HEPES 0,25 mmol L⁻¹ + NaCl 0,15 mol L⁻¹ à pH 6,5 et le PBS 0,15 mol L⁻¹ à pH 7,4. Les performances de la biopile dans le HEPES + NaCl à pH 6,5 diminuent de 2,6 fois par rapport à celles dans PB. Dans le PBS à pH 7,4, la biopile fournit 92 μW de puissance, cette valeur correspond à 1,1 fois de la valeur dans le HEPES+NaCl et à 0,4 fois dans le PB. La partie suivante du chapitre vise à mettre en évidence un concept de biopile à cavité fabriquée à partir des buckypapers home made (biopile type non hybride). Une première biopile étudiée est de concept : cathode – « hBP Hémine « one pot » / BOx +ABTS / hBP Hémine « one pot » » et anode - « hBP PLQ « drop coating » / FAD GDH / hBP PLQ « drop coating » ». Cette biopile a fourni 293 μW de puissance ce qui est 29% plus élevé que celle de la biopile « hybride », la f.é.m. de 0,64 V et le courant maximal de 1 mA (l'hybride – 0,4 mA). La deuxième biopile étudiée à base de bioélectrodes à cavité « non hybride » diffère par la biocathode qui fonctionne sur un mécanisme DET et MET. Une augmentation de puissance de 48% (293 μW vs 432 μW) a été observée.

La biopile à cavité de type « hybride » a été implantée dans l'abdomen du rat, selon la même procédure utilisée pour les biopiles à compression. Une f.é.m. de 0,318 V après l'implantation a été enregistrée. Après 2,5 mois, avant l'euthanasie du rat, la f.é.m. était de 0,228 V.

La dernière partie de ce chapitre est consacrée à l'étude *post in vivo* de la pile à cavité récupérée après 2,5 mois d'implantation. La biopile extraite du rat présentait un système vasculaire et des tissus biologiques denses. L'étude d'histologie sur les tissus biologiques a révélé une absence totale d'inflammation ou d'infection. Au bout de 2,5 mois, il ne reste que 30 μW de puissance à la pile avec une f.é.m. de 0,48 V. En ce qui concerne les demi-piles, des courants de 13% de la valeur initiale pour la biocathode et de 1,2 % de la valeur initiale pour la bioanode, ont été retrouvés. Pour ces biopiles, il serait intéressant de développer et d'étudier la bioanode afin qu'elle garde une activité plus importante. L'exploration des biopiles type double couche de hBP pourrait être une piste intéressante pour une nouvelle génération de biopile.

En résumé, pour un bon fonctionnement de la biopile enzymatique *in vivo*, les conditions sont complexes et cela demande beaucoup de mises au point. Dans mon travail de thèse, je me suis appliquée à travailler sur tous les aspects : l'amélioration de l'électrocatalyse de chaque électrode, le design des électrodes et de la biopile, l'amélioration des performances et de la durée de vie de la biopile, la biocompatibilité. J'ai pu ainsi proposer des nouveaux concepts d'électrode et de biopile que j'ai caractérisés avec différentes méthodes, principalement électrochimiques. De plus, les deux types de biopile que j'ai conçus ont montré qu'elles étaient compatibles avec l'implantation. Une grande partie des objectifs est atteinte même si la biopile implantée devra encore progresser avant de supplanter les piles classiques.

EXPERIMENTAL PART

Chapter 2. Compressed bioelectrodes based on a mixture of MWCNTs/enzymes and/or mediators	209
Materials and reagents	209
Electrode fabrication.....	209
Apparatus & characterization methods.....	209
Chapter 3. Bioelectrodes based on MWCNTs compression with insertion of redox mediators and enzymes by adsorption.....	210
Materials and reagents	210
Apparatus & characterization methods.....	211
Chapter 4. Hollow bioelectrodes (cavity) based on Buckypaper assembly	211
Materials and reagents	211
Electrode fabrication.....	212
Apparatus & characterization methods.....	212
Chapter 5. Enzymatic biofuel cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	213
Materials and reagents	213
Biofuel cell fabrication	214
Apparatus & characterization methods.....	215
Chlorhexidine treatment of bioelectrodes and biofuel cells	216
Microbiology.....	216
Ethics statement	217
Surgical procedure	217
Histology.....	217

Chapter 2. Compressed bioelectrodes based on a mixture of MWCNTs/enzymes and/or mediators

Materials and reagents

Enzymes: GOx from *Aspergillus niger* (Type X-S, 163 U mg⁻¹ solid), catalase from *bovine liver*, laccase from *Trametes versicolor*, Cyt C from *Horse heart*, HRP (Type 2), diaphorase from *Clostridium kluyveri*, GAOx from *Dactylium dendroides*, BSA, urease (type IX from *Canavalia ensiformis*) were purchased from Sigma-Aldrich. BOx from *Myrothecium verrucaria* (≥ 1.2 U mg⁻¹) was sourced from Amano. FAD-GDH from *Aspergillus sp.* was purchased from Sekisui Diagnostics (> 900 U mg⁻¹). All proteins were commercially sourced and lyophilized according to manufacturer treatments and used as received without further treatment to remove possible impurities.

All reagents (analytical grade): [Fe(CN)₆]³⁻, [Ru(NH₃)₆]³⁺, and 1,4 naphthoquinone (1,4-NQ) were purchased from Sigma-Aldrich. Multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) were purchased from Nanocyl (NC7000, $\varnothing = 10$ nm, 1.5 μ m length) and used as received. Single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) were obtained from Thomas Swan. Sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄) and sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄) for the phosphate buffer preparation were purchased from Sigma-Aldrich. Deionized H₂O (15 M Ω cm⁻¹) was obtained from a demineralization station PF210MKIISR from Veolia. High purity O₂ and Ar were obtained from Air Liquide.

Electrode fabrication

MWCNT biopellets ($\varnothing = 13$ mm, 0.9 ± 0.2 mm thick) were obtained by soft grinding of a mixture of 100 μ L distilled H₂O, 15 mg of protein, and 35 mg of CNTs. The resulting homogeneous pastes were then compressed into disks using a manual hydraulic press (Specac, Eurolabo) with a pressure of ca. 0.5 ton for 60 s. MWCNT and SWCNT biopellets ($\varnothing = 6$ mm, 1.8 ± 0.2 mm thick) were obtained as above but using 50 μ L distilled H₂O, 7.5 mg of protein, and 17.5 mg of CNTs. For redox biopellets ($\varnothing = 6$ mm), the same protocol as above was used but with 2.5 mg of the mediator. For redox pellets ($\varnothing = 13$ and 6 mm), the same method as for the biopellets was used, but without enzyme and using 5 mg or 2.5 mg redox mediator, respectively. An Ag-plated Cu wire was connected to the back of the disk with carbon paste (Henkel). Silicone was added to the back and sides to insulate and stabilize the connected disk. The electroactive surface areas are based on the geometric area: 1.33 cm² (13 mm) and 0.28 cm² (6 mm). Redox pellet and biopellet electrodes were rinsed with distilled H₂O to remove weakly adsorbed species before electrochemistry.

Apparatus & characterization methods

Electrochemical measurements were performed using either an Ivium CompactStat potentiostat with Iviumsoft software or a Biologic potentiostat with a three-electrode cell containing a CNT pellet as the working electrode, a Pt wire counter electrode and an Ag/AgCl (sat. KCl) reference

electrode. Electrochemical tests (including stability tests) were performed in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer (PB) pH 7.4 at 25°C.

Scanning Electron Microscopy. High-resolution images of pellet morphology were obtained using a FEI/Quanta FEG 250 scanning electron microscope (SEM, Hillsboro, OR, USA) with an accelerating voltage of 2 kV.

Water contact angles were obtained at room temperature by delivering a 5 µL droplet of deionized water onto the sample surface on a horizontal stage using a Dataphysics OCA 35 system. Multiple droplet measurements (at least 3) were recorded per sample type.

Chapter 3. Bioelectrodes based on MWCNTs compression with insertion of redox mediators and enzymes by adsorption

Materials and reagents

Enzyme: GOx from *Aspergillus niger* (Type X-S, 163 U mg⁻¹ solid), was purchased from Sigma-Aldrich. BOx from *Myrothecium verrucaria* (≥1.2 U mg⁻¹) was purchased from Amano. FAD-GDH from *Aspergillus sp.* was obtained from Sekisui Diagnostics (>900 U mg⁻¹). All proteins were commercially sourced and used as received without further treatment.

All reagents (analytical grade): 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 1,4-naphthoquinone (1,4-NQ), 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ), 1,10-phenanthroline-5,6-dione (PLQ), 9,10-phenanthrenequinone (PQ), 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO), were purchased from Sigma-Aldrich. Acetonitrile (CH₃CN) was obtained from Fluka. Bis-pyrene 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (p₂-ABTS) was synthesized according to previous literature (Gross et al., 2017). Multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) were obtained from Nanocyl (NC7000, $\varnothing = 10$ nm, 1.5 µm length) and used as received. Deionized H₂O (15 MΩ cm⁻¹) was obtained from a demineralization station PF210MKIISR from Veolia. Sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄) and sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄) for the phosphate buffer preparation were purchased from Sigma-Aldrich. High-purity O₂ and Ar were obtained from Air Liquide.

Electrode preparation

Electrode fabrication: Based on our previously reported procedure, MWCNT pellets ($\varnothing = 6$ mm, 1.8 ± 0.2 mm thick) were obtained by soft grinding of a mixture of 50 µL distilled H₂O and 17.5 mg of CNTs. The resulting homogeneous pastes were then compressed into disks using a manual hydraulic press (Specac, Eurolabo) with a pressure of ca. 0.5 ton for 60 s. An Ag-plated Cu wire was connected to the back of the disk with carbon paste (Henkel). Silicone was added to the back and sides to insulate and stabilize the connected disk. The surface area (0.283 cm²) is based on the geometric area of the electrodes directly exposed to the electrolyte (or a volume of 0.050 ± 0.006 cm³).

Mediator functionalization: The above-mentioned electrodes were immersed in an aqueous solution containing 2 mmol L⁻¹ ABTS or PLQ in 0.1 mol L⁻¹ PB (10 mL). For low solubility

species in aqueous buffers (i.e. p2-ABTS, PQ, 1,4-NQ, and 1,2-NQ), a mixture of 10% v/v CH₃CN/PB was used to completely dissolve the redox probes. Incorporation/adsorption of the redox species was followed by cyclic voltammetry (CV) and recorded at 5 mV s⁻¹ at regular intervals (t = 0, 30, 60, 120 and 180 min). For quinone species, the electrolyte was purged with Ar for 10 min before immersion of the pellet. CVs were performed in quiescent solutions. Between CV experiments, the hydrodynamic condition was kept allowing fast mass transport in the electrolyte. A 180 min incubation period was sufficient to reach saturation of the faradaic signal recorded from all redox species at the modified pellet electrode. Modified pellet electrodes were rinsed with distilled H₂O to remove weakly adsorbed species before electrochemical measurements for stability survey.

Enzyme modification: The above-mentioned functionalized electrodes were incubated in 1 mL of 1 mg mL⁻¹ enzyme solution overnight at 4 °C. These modified pellets were subsequently rinsed with distilled H₂O before electrochemical testing.

Apparatus & characterization methods

Electrochemical measurements were performed using an Ivium CompactStat potentiostat with Iviumsoft software or a Metrohm Autolab potentiostat with Nova 2 software. All experiments were performed at room temperature (21 ± 1 °C) in 0.1 mol L⁻¹ PB pH 7.4 with a three-electrode cell containing a CNT pellet as the working electrode, a Pt wire counter electrode, and an Ag/AgCl (KCl sat.) reference electrode. All solutions for voltammetric studies were purged with argon or oxygen for 15 min before measurements and a gas flow was maintained on top of the solution during analysis. Oxygen gas was used only for electrocatalytic ORR studies, as specified in the chapter. Cyclic voltammograms (CVs) for electrochemical characterization of pellet were performed at 5 mV s⁻¹. CVs for enzyme-catalyzed oxygen reduction or glucose oxidation were recorded at a slow scan rate of 0.5 mV s⁻¹ to minimize the capacitive current contribution. To best depict the putative diffusion issue from the volumetric electrodes encountered during catalytic turnover, only second scans were used for data extraction.

Scanning Electron Microscopy. High-resolution images of pellet morphology were obtained using a FEI/Quanta FEG 250 scanning electron microscope (SEM, Hillsboro, OR, USA) with an accelerating voltage of 2 kV.

Chapter 4. Hollow bioelectrodes (cavity) based on Buckypaper assembly

Materials and reagents

Enzyme: BOx from *Myrothecium verrucaria* (≥1.2 U mg⁻¹) was obtained from Amano. FAD-GDH from *Aspergillus* sp. was purchased from Sekisui Diagnostics (>900 U mg⁻¹). All proteins were commercially sourced and used as received without further treatment.

All reagents (analytical grade): *N,N*-dimethylformamide (DMF, 99.9%), dichloromethane (DCM), iron-protoporphyrin IX (hemin; ≥ 97%) and 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS, ≥ 98%), 1,10-phenanthroline-5,6-dione (PLQ, 97%), and 1,4 naphthoquinone (1,4-NQ, 97%) were purchased from Sigma-Aldrich. Multiwalled carbon

nanotubes (MWCNTs) were obtained from Nanocyl (NC7000, $\varnothing = 10$ nm, 1.5 μm length) and used as received. Stability and electrochemical tests were performed in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer (PB) at various pH values prepared in distilled H₂O (15 M Ω cm⁻¹). Sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄) and sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄) for the phosphate buffer preparation were purchased from Sigma-Aldrich. High-purity O₂ and Ar were obtained from Air Liquide.

Electrode fabrication

Laboratory-Made Buckypaper Preparation according to previous reported methods (Chen et al., 2018; Gross et al., 2017):

- Laboratory-made buckypaper (hBP): 66 mg of MWCNTs (1 mg mL⁻¹) was added in 66 mL of DMF followed by sonication using a Bandelin Sonorex RK100 ultrasonic bath for 90 min. The resulting suspension was then filtrated using a diaphragm pump (MZ 2C NT model, Vaccubrand) on a Millipore PTFE filter (JHWP, 0.45 μm pore size). The Lbp was rinsed with water and left under vacuum for 1 h. Finally, the Lbp was removed from the filter and then left to dry in the air overnight.
- Laboratory-made buckypaper modified by the “one pot” method by redox species like hemin, PLQ or 1,4-NQ (hBP/hemin; hBP/PLQ “one pot”, hBP/1,4-NQ “one pot”): 0.6 mmol L⁻¹ of redox species was added in 66 mL of DMF with 66 mg of MWCNTs followed by sonication using a Bandelin Sonorex RK100 ultrasonic bath for 90 min in a one-pot procedure. The resulting suspension was then treated following the previous procedure.

Modifications of BPs by the “drop coating” method with redox species like PLQ and 1,4-NQ was obtained by depositions of the 200 μL of mediator’s solution on the BP’s disks. The mediator’s solution was obtained by dissolving of redox species powder in the dichloromethane with final concentration of 5 mmolL⁻¹.

Hollow Bioelectrode Preparation: a MWCNT commercial buckypaper (cBP; 60 gsm, reference number NTL-12218) from Nano-TechLab was first cut into an individual conductive disk ($\varnothing = 30$ mm or 12 mm) to be used as a support. The circumference of the cBP disk was coated with carbon paste to create a hollow cylinder with a diameter of $\varnothing = 12$ mm or 7 mm dedicated to the trapping of biocatalyst. An electrical wire was attached to the carbon paste and the electrode was subsequently sealed using a hBP or hBP/hemin sheets ($\varnothing = 30$ mm or 12 mm). After the deposition of enzyme powder in the microcavity (the BOx from 1 to 4 mg, the FAD GDH 4 mg), the hollow bioelectrodes were left to dry in the air for 4h. Thereafter, the bioanodes were subsequently sealed using chemically functionalized home-made buckypapers disks ($\varnothing = 13$ mm) by the “drop-coat” or “one pot” method. Finally, the hollow bioelectrodes were left to dry in the air for 4h.

Apparatus & characterization methods

Electrochemical measurements were performed using a PGSTAT 100 potentiostat operated by Nova 2 software and a Biologic potentiostat. All experiments were performed at room

temperature (21 ± 1 °C) in 0.1 mol L⁻¹ PB pH at various pH values with agitation (250 rpm), a three-electrode cell containing the hollow electrodes as the working electrode, a Pt wire counter electrode and an Ag/AgCl (KCl sat.) reference electrode. Cyclic voltammograms (CVs) for electrochemical characterization of electrodes were performed at 1 mV s⁻¹.

Scanning electron microscopy images of buckypaper surfaces were carried out using an FEI/Quanta FEG 250 scanning electron microscope (SEM, Hillsboro, OR, USA) with an accelerating voltage of 5 kV.

Water contact angles were measured after delivering a 5 μL droplet of deionized water at room temperature onto buckypaper surfaces using a Dataphysics OCA 35 system.

Laser-intensity images of the electrode cavities were carried out using a Keyence VK-X200 3D laser scanning confocal microscope.

Chapter 5. Enzymatic biofuel cells *in vitro* and *in vivo*

Materials and reagents

Enzyme: GOx was purchased from *Aspergillus niger* (Type X-S, 163 U mg⁻¹ solid), catalase from *bovine liver* was purchased from Sigma-Aldrich. BOx from *Myrothecium verrucaria* (≥ 1.2 U mg⁻¹) was obtained from Amano. FAD-GDH from *Aspergillus sp.* was purchased from Sekisui Diagnostics (>900 U mg⁻¹).

All reagents (analytical grade): Phosphate buffers (Sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄), sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄)), NaOH, potassium chloride, 1,10-phenanthroline-5,6-dione (PLQ, 97%), 1,4 naphthoquinone (1,4-NQ), iron-protoporphyrin IX (hemin), *N,N*-dimethylformamide (DMF, 99.9%), dichloromethane (DCM), glucose, chlorhexidine digluconate (CHx), sterile physiological solution with 0.9 % NaCl (physiodose, 0.154 mol L⁻¹) were purchased from Sigma-Aldrich. Deionized water was purified to a minimum resistivity of 15 MΩ cm⁻¹ using a Millipore 5Ultrapure system). Sterile purified water for cell culture and in-vivo experiments was purchased from Aguettant (Otec 600500). Sterile glucose (Lavoisier, injectable solution in ampoule 1665 mmol L⁻¹ (G30%)). Commercial grade thin multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs, Ø = 9.5 nm; 1.5 μm length, 90% purity, NC7000) were obtained from Nanocyl and used as received without purification. High purity argon was obtained from Messer.

Chemicals used for bacteria cultures and identification: LB broth medium (Sigma L3022), LB-Agar medium (Miller, VWR Chemicals, 84684.0500), Cell spreader (Biologix, 65-1001), Incubator (Thermo scientific), Incubator shaker (Excella E24, New Brunswick Scientific). 3D printing Ultimaker 2 extended and 3D printer filament, PLA (RS PRO, 832-0264). Biotech Dialysis bag (cut-off = 3.5 – 5 kDa) from Spectrum Labs, polypropylene SWING-MESH® SMX 3030S surgical tissue (mesh size = 0.7 mm × 0.7 mm), Loctite superglue-3 power flex gel (Henkel). Glucose solutions were left to mutarotate overnight to β-D-glucose prior to use.

Chemicals for implantation experiments: Buprenorphine (0.05 mg/kg), carprofen (5 mg/kg), isoflurane (4-5% for induction, 1.8-2.5 % for maintenance), iodide (10%, Vetedine, Vetoquinol,

Magny-Vernois, France), BETADINE (10% dermal solution (Povidone iodized)), Betadine Scrub (4% Povidone iodized foaming solution), dental cement (superbond, Sun Medical, Beauvais, France), glucose 5% (from 30% Lavoisier, injectable solution in ampoule), absorbable suture (from Ethicon Vicryl).

Biofuel cell fabrication

Biofuel cells with biopellets electrodes.

Preparation of bioanode and biocathode biopellets:

Following our previously reported procedure, MWCNT redox biopellet electrodes ($\varnothing = 6$ mm, ca. 1.8 ± 0.2 mm thick) were obtained by soft grinding of the following mixture: GOx-1,4-NQ-catalase bioanode: 50 μ L distilled H₂O, 7.5 mg of GOx; 5 mg of catalase (cat), 2.5 mg of 1,4-NQ, and 17.5 mg of CNTs; BOx-hemin biocathode: 50 μ L distilled H₂O, 7.5 mg of BOx; 2.5 mg of hemin, and 17.5 mg of CNTs. The resulting homogeneous pastes were then compressed into disks using a manual hydraulic press with a pressure of ca. 0.5 ton for 60 s. An Ag-plated multifilament Cu wire was connected to the back of the disk with carbon paste. Silicone was added to the back and sides to insulate and stabilize the connected disk. The electroactive surface areas are based on the geometric area: 0.28 cm². Redox biopellet electrodes were rinsed with distilled H₂O to remove weakly adsorbed species prior to use.

Preparation of 3D printed biofuel cells:

Enzymatic biofuel cells for *in vitro* experiments in 0.1 molL⁻¹ phosphate buffer pH 7.4 were prepared by mounting the bioanode and biocathode vis-à-vis on a 3D printed U-shaped polylactic acid (PLA) template. Biopellets connected individually to metal wires were attached to the PLA template using carbon paste and silicone, ensuring that the wire and the back and sides of the CNT biopellet were insulated. The maximum dimensions of the holder are 12 × 11 × 6 mm (height, width, depth) with inter-electrode spacing of 5 mm. For the case where a dialysis bag was used, the biofuel cell was inserted into the bag prefilled with 100 mmol L⁻¹ glucose in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 7.4 then sealed with Loctite super glue powerflex gel. The final dimensions of the dialysis bag biofuel cell were 40 ± 10 × 25 ± 5 × 10 ± 5 mm. All biofuel cells were left in a beaker containing 0.1 mol L⁻¹ PB pH 7.4 for 2 h prior to characterization; in the case that dialysis bags were used, this assured humidification of the bags. All biofuel cells were rinsed with distilled H₂O prior to use.

The *in vivo* biofuel cells were prepared as described previously, but with the use of an additional sterile surgical porous tissue outer layer that was wrapped around the biofuel cell then sealed by non-absorbable surgical sutures, after pre-filling with 5 mmol L⁻¹ sterile glucose in sterile 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 7.4. The final dimensions of the implanted dialysis bag biofuel cell were 50 ± 10 × 30 ± 5 × 20 ± 5 mm (height, width, depth). The preparation of the biofuel cell in the dialysis bag and surgical tissue was performed in a laminar flow hood while the bioelectrodes and mounting of the biofuel cell on the 3D holder were not performed in a sterile environment.

Biofuel cells with hollow bioelectrodes.

Hollow bioelectrode preparation:

As reported previously, MWCNT commercial buckypaper (cBP; 60 gsm) was first cut into an individual conductive disk ($\varnothing = 30$ mm or 12 mm) to be used as a support. The circumference of the cBP disk was coated with carbon paste to create a hollow cylinder with a diameter of $\varnothing = 12$ mm or 7 mm dedicated to the trapping of a biocatalyst. An electrical wire was attached to the carbon paste and the electrode was subsequently sealed using a hBP or hBP/hemin disk ($\varnothing = 30$ mm or 12 mm). After the deposition of enzyme powder in the microcavity (the BOx 2 mg, the FAD GDH 4 mg), the hollow bioelectrodes were left to dry in the air for 4h. Thereafter, the bioanodes were subsequently sealed using chemically functionalized home-made buckypapers disks ($\varnothing = 13$ mm) by the drop-coat method. Finally, the hollow bioelectrodes were left to dry in the air for 4h.

Hollow biofuel cells preparation:

The hollow bioelectrode based biofuel cells for experiments *in vitro* were established through the combination of two half-cells (hollow bioelectrodes) set and fixed parallel to one another and separated with Teflon[®] spacers. Electrical contact was obtained via a metal wire attached to the carbon paste on each hollow bioelectrode.

The hollow bioelectrode based biofuel cells for experiments *in vivo* were first inserted into a dialysis bag (45 x 20 mm; cut-off = 3.5 – 5 kDa) containing 5 mL of a previously sterilized phosphate-buffered saline with 5 mM of glucose using an autoclave. The resulting system was sealed using Loctite Superglue-3 and thereafter inserted into a second wall repair artificial mesh SWING-MESH[®]. The system was then re-immersed in a sterilized phosphate buffer (5 mmol L⁻¹ of glucose) and maintained in a sterilized container until its implantation. All biofuel cell preparation steps prior to the implantation were realized in a laminar flow hood.

Apparatus & characterization methods

Biofuel cells with biopellets electrodes.

Electrochemical measurements performed “*in vitro*” were made in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.4) in the absence or presence of substrates using a Biologic VMP3 Multi Potentiostat with EC-lab software or an Ivium CompactStat potentiostat with Iviumsoft software, respectively. Half-cell characterization experiments were performed with a three-electrode cell comprising a biopellet working electrode ($\varnothing = 6$ mm; thickness = 1.8 ± 0.2 cm), a silver-silver chloride reference electrode (Ag/AgCl with saturated KCl), and a Pt wire counter electrode. Electrodes were rinsed with distilled H₂O prior to use. For biocathode characterization, oxygen and argon saturated solution experiments were made after purging the solution with the gas for 15 min; light gas purging was continued during the experiments. Bioelectrodes were stored in fresh buffer solution between experiments at 4°C in the fridge then slowly warmed to room temperature prior to characterization by cyclic voltammetry. *In vitro* biofuel cell experiments were performed by recording a linear sweep polarization from the open circuit voltage to 0.3 V with the anode connected to the counter and reference leads and the cathode connected to the working lead (1 mV s⁻¹). Biofuel cell tests were performed after a stable OCV was reached (ca. 15 min). Current

and power densities were estimated based on the geometric surface area of the working electrode (0.28 cm²). Biofuel cell polarization and power curves were also recorded by galvanostatic discharge during 15 s, where the currents were controlled, and the resulting voltages measured.

Biofuel cells with hollow bioelectrodes.

Hollow biofuel cell polarization and power curves were recorded in the presence of 100 mmol L⁻¹ glucose under oxygen-saturated conditions by galvanostatic discharge during 10 s, where the currents were controlled, and the resulting voltages measured. In vitro biofuel cell experiments were also performed by recording linear sweep polarizations from the open circuit voltage to 0.3 V. For this experiment the anode was connected to the counter and reference leads, and the cathode was connected as the working electrode.

Open circuit voltage *in vivo* was measured daily on the connector secured to the rat's head, using a rotating swivel and an Origaflex potentiostat (Origalys, Rillieux la Pape, France).

Chlorhexidine treatment of bioelectrodes and biofuel cells

Electrically addressable bioelectrodes and biofuel cells were immersed in a beaker containing CHx (0.2 %, 0.5% or 1 % w/v) prepared freshly in distilled H₂O (or sterile water for microbiology and implantation). The treatment was carried out during 30 s, 60 s or 300 s. All electrodes and biofuel cells were rinsed with distilled H₂O prior to use.

Microbiology

In an aseptic laminar flow hood, the electrically addressable biopellet electrode was inserted in the cellulose ester dialysis membrane bag containing a sterile 5 mmol L⁻¹ glucose solution prepared in sterile 0.1 mol L⁻¹ PB 7.4. The whole bioelectrode in a dialysis bag was immersed, or not, in a bacterial inoculum of *Staphylococcus hominis* (10⁷ bacteria mL⁻¹). After 15 min, the biopellet electrode was rinsed with sterile distilled water and then immersed or not in CHx solution. Following treatment, the biopellet electrode in a dialysis bag was rinsed with sterile distilled water.

At the same time, in a laminar flow hood, 150 mL of sterile LB broth medium was introduced into an Erlenmeyer flask. The treated or untreated bioelectrode was then immersed in sterile LB solution. Each Erlenmeyer flask was capped and placed at 37 °C on a rotary incubator shaker. Samples of the medium were taken after 26 h incubation. 100 µL of this solution was subsequently added to a petri dish containing prepared LB-Agar before being spread and placed in an incubator at 37 °C overnight for bacteria growth. Bacterial colonies were observed and manually counted. Results are expressed in colony forming units (CFU m L⁻¹). *Staphylococcus hominis* was used as a model gram-positive bacterium of the bacterial genus, *Staphylococcus*, to test the antimicrobial activity. The presence or not of *S.hominis* bacteria was confirmed the next day by counting colonies on LB Agar.

Ethics statement

Experimental protocols were approved by the CELYNE (CEA-042) committee on animals in research and registered by the French Ministry of Research under reference APAFIS#10019-201704211705870. All animals were treated according to European Directive 2010/63/UE and experiments abode to the ARRIVE guidelines.

Surgical procedure

Before surgery, rats received buprenorphine (0.05 mg kg^{-1}) and carprofen (5 mg kg^{-1}) for analgesia and were anesthetized with isoflurane in 30% oxygen – 70% air (4-5% for induction, 1.8-2.5 % for maintenance). The abdomen and the head were shaved and cleaned with povidone iodide (10%, Vetedine). A small incision was performed on the skull, then the animal was placed in dorsal decubitus and a second 6-7 cm incision was prepared through the skin and the abdominal wall. The biofuel cell was gently placed on the viscera, then the abdominal wall and the skin were sutured independently using resorbable sutures. The conducting wires connected to the anode and cathode were tunneled subcutaneously to the neck and exited through the small incision present on the skull. The animal was then placed in ventral decubitus. The two wires were soldered to a 5-pin connector that was cemented to the skull using dental cement. The wound was then cleaned with Vetedine and sutured.

After surgery, rats received 5 mL of glucose 5% subcutaneously with 0.05 mg kg^{-1} buprenorphine and were left undisturbed and heated with a lamp for 12h. An analgesic treatment consisting of buprenorphine (0.05 mg kg^{-1}) was administered during the first two days, followed by Carprofen (5 mg kg^{-1}) for three more days. Animals were offered moistened food and fresh fruits and received a daily subcutaneous injection of 5 mL of glucose 5% until their body weight stabilized, usually during the first 5-6 days post-surgery.

Histology

Tissue samples surrounding the biofuel cells were fixed in 4% paraformaldehyde during 24-48h before being dehydrated and impregnated in paraffin (ASP 300, Leica microsystems, Nanterre France). Paraffin blocks were then cut into $5 \mu\text{m}$ thick slices that were stained in hematoxylin-eosin-safran using an Autostainer XL apparatus (Leica Microsystems, Nanterre, France). Tissue slices were then mounted on glass coverslips and images using an Axioscan Z1 slide scanner (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany).

PUBLICATIONS

Accepted and submitted:

- Chen, X., Yin, L., Lv, J., Gross, A. J., Le, M., Gutierrez, N. G., Li, Y., Jeerapan, I., Giroud, F., Berezovska, A., O'Reilly, R. K., Xu, S., Cosnier, S., Wang, J., *Stretchable and Flexible Buckypaper-Based Lactate Biofuel Cell for Wearable Electronics*. *Advanced Functional Materials* 2019, 29, 1905785. <https://doi.org/10.1002/adfm.201905785>
- Berezovska A., Nedellec Y., Giroud F., Gross A. J., Cosnier S., *Freestanding biopellet electrodes based on carbon nanotubes and protein compression for direct and mediated bioelectrocatalysis*. *Electrochemistry Communications* 2021, 122, 106895. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106895>.
- Cosnier S., Nedellec Y., Berezovska A., Maciel Buzzetti P. H., *Electrode enzymatique à réservoir intégré*. French Patent FR 2110940 submitted October 14, 2021. PCT Patent submitted October 14, 2022.
- Buzzetti, P.H.M.; Berezovska, A.; Nedellec, Y.; Cosnier, S. *Hollow Bioelectrodes Based on Buckypaper Assembly. Application to the Electroenzymatic Reduction of O₂*. *Nanomaterials* 2022, 12, 2399. <https://doi.org/10.3390/nano12142399>.

Manuscript under preparation:

- Berezovska A., Meiller A., Marinesco S., Nedellec Y., Giroud F., Gross A. J., Cosnier S., *Chlorhexidine Digluconate Exerts Bactericidal Activity vs. Gram Positive Staphylococci with Bioelectrocatalytic Compatibility: High Level Disinfection for Implantable Biofuel Cells*.
- Berezovska A., Maciel Buzzetti P. H., Nedellec Y., Gondran C., Giroud F., Gross A. J., Meiller A., Marinesco S., Cosnier S., *Hollow Enzymatic Biofuel Cell*.
- Berezovska A., Maciel Buzzetti P. H., Nedellec Y., Gross A. J., Cosnier S., Giroud F., *Bioelectrodes based on MWCNTs Compression with Insertion of Redox Mediators and Enzymes by (Electro)Adsorption*.

PRESENTATIONS

Flash communications:

- **International Conference “New Trends on Sensing-Monitoring-Telediagnosis for Life Sciences” – NT SMT–LS 2020, NOMARES workshop held online.** *Poster/flash communication “Development of Bioelectrodes based on Carbon Nanotubes with Protein Compression”, Berezovska A., Nedellec Y., Gross A. J., Giroud F., Cosnier S., Romania, July 2020*

Oral communications:

- **XXVII International symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics.** *Biofuel cell based on hollow bioelectrodes containing enzymes in solution, Berezovska A., Nedellec Y., Maciel Buzzetti P. H., Cosnier S., Antwerp (Belgium), April 2022*

Poster presentations:

- **Journée de la Section Rhône-Alpes de la Société Chimique de France.** *Biocathodes creuses contenant des enzymes en solution, Berezovska A., Nedellec Y., Maciel Buzzetti P. H., Cosnier S., Le Bourget du Lac (France), June 2022*

Plenary lectures:

- **NANOMAT22 Global Summit on Nanomaterials: Applications and Properties.** *Composite Biomaterials Based on Polymers, Carbon Nanotubes Glyconanoparticles and Enzymes for Energy Conversion or Sensor Design, Cosnier S., Gross A.J. , Berezovska A., Giroud F., Gorgy K., M. Buzzetti P. H., Nedellec Y., Dubai (United Arab Emirates) March 2022*

Keynote lectures:

- **241st Meeting of The Electrochemical Society, Vancouver (Canada).** *Bioelectrocatalytic Systems Based on Microcapsules, Glyconanoparticles and Microcavities, Cosnier S., M. Buzzetti P. H., Nedellec Y., Brachi M., Berezovska A., Gorgy K., Gondran C., Shan D., Borsali R., Vancouver (Canada), May - June 2022.*

Bioélectrodes flexibles implantables pour la production d'énergie électrique *in vivo*

Résumé : Les biopiles enzymatiques sont une sous-catégorie de piles à combustible qui convertit l'énergie chimique en énergie électrique par des réactions bioélectrochimiques, ont attiré une attention, considérable au cours de la dernière décennie en raison de leurs applications potentielles dans le domaine biomédical et de l'électronique portable. Ces biopiles utilisent principalement des enzymes d'oxydo-réduction pour l'oxydation ciblée spécifique de saccharides (tels que le glucose) à l'anode et la réduction du dioxygène ou de H₂O₂ à la cathode. Une motivation pour le développement des biopiles réside dans leur implantation dans le corps humain comme une source d'énergie autonome théoriquement illimitée. Dans ce contexte, le projet de thèse est focalisé sur la réalisation d'une nouvelle génération de biopiles à combustibles flexibles implantables combinant des avancées technologiques faisant l'objet de dépôt récent de brevets et de nouveaux développements dans les matériaux d'électrodes nanostructurées.

Ce mémoire est consacré, donc, au développement et à l'optimisation de différentes bioélectrodes, qui entrent en jeu dans la conception d'une biopile. Un premier type d'électrodes présenté dans ce travail concerne les bioélectrodes à compression qui sont basées sur la compression de nanotubes de carbone (CNTs) englobant des espèces redox et/ou des biocatalyseurs. Les électrodes qui en résultent ont permis de concevoir une biopiles. Une étude sur leur stérilisation chimique par la chlorhexidine est aussi abordée dans ce travail, ainsi que leur implantation *in vivo*. Un deuxième modèle de bioélectrodes est une déclinaison ingénieuse de la première stratégie qui ouvre de plus larges perspectives en termes de possibilités de composition et de stabilité : les matrices nanostructurée en CNTs compressés sont modifiées par adsorption successive de médiateurs et/ou biocatalyseurs. Cette nouvelle approche permet de réaliser des compositions médiateur/enzyme non réalisables par la première approche (ex : ABTS/BO_x, bis-pyrène ABTS/BO_x ou PLQ/FAD GDH, etc.). La dernière configuration des bioélectrodes présentée et le cœur de ce travail consiste en la création d'électrodes comportant une micro-cavité. Les bioélectrodes réalisées à partir d'un assemblage de buckypapers flexibles comportent une cavité dans la couche centrale, piégeant ainsi les enzymes sous forme de poudre. Cet aspect permet d'avoir finalement une biopile capable de fournir jusqu'à 0,8 mW en puissance avec un courant maximal de 3,21 mA une tension maximum de 0,62 V. Ce type de biopile a été implantée chez le rat sur une durée de 2,5 mois. Après son extraction du rat, cette biopile donne à la sortie 30 μW en puissance, une tension maximum de 0,48 V et un courant maximum de 0,170 mA.

Mots clés : bioélectrocatalyse, électrodes en CNTs, buckypaper, bioélectrodes à cavité, enzymes redox, récupération d'énergie, stérilisation des systèmes électrochimiques, biopiles enzymatique implantables.

Implantable flexible bioelectrodes for the production of electrical energy in vivo

Abstract: Enzymatic biofuel cells are a subcategory of fuel cells that convert chemical energy into electrical energy via bioelectrochemical reactions. They have attracted considerable attention during the last decade owing to their potential application in the biomedical field for powering portable electronics. These biofuels exploit redox enzymes for the targeted specific oxidation of saccharides (for example, glucose) at the anode and the reduction of oxygen or H₂O₂ at the cathode. The main motivation for the development of biofuel cells lies in their implantation in the human body as a theoretically unlimited autonomous source of energy. In this context, the thesis project focuses on the realization of a new generation of flexible implanted biofuel cells that will include technological innovations subject to recent patent filings and new developments in nanostructured electrodes.

This thesis is dedicated, therefore, to the development and optimization of different bioelectrodes, resulting in a biofuel cell. The first type of electrodes presented in this work is the compressed bioelectrodes. This approach is denoted as the “one-pot” method. The electrodes are based on a nanostructured matrix of CNTs mixed and compressed with redox species and/or biocatalyst. The resulting electrodes have been used to construct a complete biofuel cell. A study on their chemical sterilization by chlorhexidine is also addressed in this work as well as their *in vivo* implantation in living rats. The second model of bioelectrodes focuses on the optimization of the first one, modifying the fabrication methodology. In this case, a nanostructured matrix of compressed CNTs is obtained in a first step. They are then functionalized sequentially by the adsorption of the redox mediators and the biocatalysts. This new approach allows the realization of mediator/enzyme compositions that were not feasible by the “one-pot” method (e.g., ABTS/BOx, bis-pyrene ABTS/BOx or PLQ/FAD GDH, etc.). The final configuration of the bioelectrodes presented is a hollow “cavity” type. Bioelectrodes made from an assembly of flexible buckypapers have a cavity in the central layer, thus trapping allowing to entrap the enzymes in powder form. Finally, this approach has proven to conceive biofuel cells able to provide up to 0.8 mW in power at a maximum current of 3.21 mA with an OCV of 0.62 V. This biofuel cell was implanted in the rat for 2.5 months, providing a power output of 30 μW, an OCV of 0.48 V, and a maximum current of 0.170 mA.

Keywords: bioelectrocatalysis, CNTs electrodes, buckypaper, hollow bioelectrodes, redox enzymes, energy recovery, sterilization of electrochemical systems, implantable enzymatic biofuel cells.