



HAL
open science

Électrodes enzymatiques à base d'hydrogels rédox en vue de l'oxydation du glucose

Antonin PrévotEAU

► **To cite this version:**

Antonin PrévotEAU. Électrodes enzymatiques à base d'hydrogels rédox en vue de l'oxydation du glucose. Matériaux. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2010. Français. NNT : . tel-00593715

HAL Id: tel-00593715

<https://theses.hal.science/tel-00593715>

Submitted on 17 May 2011

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.

N° d'ordre : 4102

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX

École doctorale des sciences chimiques

par

ANTONIN PRÉVOTEAU

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : Chimie-Physique

ÉLECTRODES ENZYMATIQUES À BASE D'HYDROGELS RÉDOX EN VUE DE L'OXYDATION DU GLUCOSE.

**Effet de la déglycosylation de la glucose oxydase et mise en évidence d'une
réduction parasite de l'oxygène sur le médiateur rédox.**

Date de soutenance : 16 décembre 2010

Après avis de : Mme Élisabeth Lojou Rapporteur
 M. Pascal Mailley Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mme Chrystel Faure	Professeur ENSCBP	Directeur de thèse
M. Alexander Kuhn	Professeur ENSCBP	Examineur
Mme Élisabeth Lojou	Chargée de recherche CNRS	Rapporteur
M. Pascal Mailley	Maître de conférences UJF	Rapporteur
M. Nicolas Mano	Chargé de recherche CNRS	Directeur de thèse
M. Philippe Richetti	Directeur de recherche CNRS	Président du jury
M. Seiya Tsujimura	Professeur adjoint (Kyoto)	Invité

N° d'ordre : 4102

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX

École doctorale des sciences chimiques

par

ANTONIN PRÉVOTEAU

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : Chimie-Physique

ÉLECTRODES ENZYMATIQUES À BASE D'HYDROGELS RÉDOX EN VUE DE L'OXYDATION DU GLUCOSE.

**Effet de la déglycosylation de la glucose oxydase et mise en évidence d'une
réduction parasite de l'oxygène sur le médiateur rédox.**

Date de soutenance : 16 décembre 2010

Après avis de : Mme Élisabeth Lojou Rapporteur
 M. Pascal Mailley Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mme Chrystel Faure	Professeur ENSCBP	Directeur de thèse
M. Alexander Kuhn	Professeur ENSCBP	Examineur
Mme Élisabeth Lojou	Chargée de recherche CNRS	Rapporteur
M. Pascal Mailley	Maître de conférences UJF	Rapporteur
M. Nicolas Mano	Chargé de recherche CNRS	Directeur de thèse
M. Philippe Richetti	Directeur de recherche CNRS	Président du jury
M. Seiya Tsujimura	Professeur adjoint (Kyoto)	Invité

À mes parents.

À ma famille et mes amis.

NOTICE

PERSONS attempting to find a motive in this narrative will be prosecuted; persons attempting to find a moral in it will be banished; persons attempting to find a plot in it will be shot.

BY ORDER OF THE AUTHOR

MARK TWAIN, *The Adventures of Huckleberry Finn*.

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS

Sur une échelle de trois ans, la réalisation d'une thèse, sans être une sinécure, n'est pas une épreuve hors d'atteinte. Bien sûr il y a les périodes de découragement, d'incompréhension, de questionnement quant à la finalité (collective *et* personnelle) de ces travaux de recherche. Mais à celles-ci succède souvent l'enthousiasme de mieux cerner *son* sujet, de planifier ses manips, de communiquer ses résultats, etc.

Si l'on se réfère uniquement aux six derniers mois, c'est une toute autre histoire. La vie sociale s'amenuise, les nuits se raccourcissent. Le repas du soir évolue brusquement des spaghettis à l'huile d'olive aux traditionnels mets du thésard achevant son manuscrit : deux barres chocolatées Snikers agrémentées d'un Coca-Cola. Comme fortuitement, les premiers cheveux blancs surgissent parfois de l'élégante toison du thésard éprouvé.

Selon les dires, les trois derniers jours de rédaction peuvent même s'approcher du supplice. La consommation de café devient tabou car dépassant toute logique physiologique. La notion d'hygiène semble d'un autre âge. En plus d'être brèves, les nuits deviennent froides et dures : le carrelage du bureau B-125 du CRPP est un piètre matelas. Le futur docteur est-il désabusé ? Agressif ? Il aimerait presque mais n'en a pas le temps...

Puis vient la délivrance : la remise du manuscrit et la vaisselle qui s'ensuit à la maison, l'évier du thésard négligé depuis si longtemps ayant troqué sa vocation première contre celle de bouillon de culture bactériologique. Et enfin, la soutenance et les réjouissances qui vont avec. L'impétrant, lavé et brossé, irréprochable dans son costume trois-pièces, peut enfin partager avec sa famille et ses amis sa joie et les jus d'agrumes rituels. Ainsi stimulé par les sucres et la vitamine C, insatiable de connaissances et de terres inconnues, il s'empresse alors de s'envoler vers de nouvelles aventures chocolatées.

Toutes ces péripéties, bonnes ou moins bonnes, ont bénéficié de la prestation de nombreuses personnes et cela aussi bien professionnellement qu'humainement. Il s'agit donc de leur rendre grâce.

Non seulement par respect convaincu de la hiérarchie, mais aussi en hommage à l'homme et à sa bienveillance, j'entame ces remerciements avec la sommité du Centre de recherche Paul Pascal, j'ai nommé M. Philippe Richetti. Affable directeur, son humour caractéristique et son adresse à la pétanque resteront dans les mémoires. Il fut en outre un excellent directeur de jury.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mme Chrystel Faure, qui a encadré une fraction de mes travaux de recherche. Si la collaboration n'a duré que quelques mois, Chrystel est toujours restée à mon écoute pendant ces trois années, en particulier pendant mes moments de détresse. Je retiendrai de toi ton humanité tout autant que tes qualités de scientifique. Je te souhaite bonne chance dans ton nouveau laboratoire ; que tes *ignons* prolifèrent et restent dépourvus de propriété lacrymale.

Je remercie M. Nicolas Mano qui m'a encadré durant la majeure partie de ma thèse. Seigneur des Anodes, il m'offrit l'opportunité de mettre en pratique mes connaissances théoriques en électrochimie avec des chercheurs de tous bords et un équipement des plus propices. Par ailleurs, Nicolas m'a incité et aidé à participer à plusieurs rencontres scientifiques extrêmement enrichissantes.

Je suis particulièrement reconnaissant envers les autres membres de mon jury de soutenance. Mes deux rapporteurs, Mme Élisabeth Lojou et M. Pascal Mailley, ont su allier la gentillesse à la rigueur scientifique de leurs questions et commentaires. La discussion qui suivit ma présentation fut pour moi un véritable plaisir.

Je remercie aussi M. Alexander Kuhn avec qui il fut très instructif d'échanger à propos de mes travaux lors de ma fin de rédaction.

Enfin, je ne peux oublier M. Seiya Tsujimura qui fut non seulement membre invité de mon jury, mais aussi camarade de paillasse durant ma dernière année au CRPP. Malgré quelques approximations dans nos anglais respectifs, c'est probablement avec Seiya que j'ai partagé les discussions les plus captivantes dans notre domaine de prédilection, l'électrochimie. Bon vivant, Seiya est aussi devenu un ami. J'en profite pour saluer celle qui l'accompagna dans cette aventure aux antipodes de leur Japon natal, l'adorable Ikukochan. わたしはすいかたべます。

Ce travail de thèse doit également beaucoup à certaines personnes avec qui j'ai pu collaborer, en particulier dans l'équipe *Biopile*. Je pense notamment à M. Olivier Courjean qui m'a fourni la majorité des enzymes et m'a difficilement initié à l'enzymologie. J'ai entretenu de nombreux débats scientifiques toujours passionnés avec ce post-doctorant idoine, aussi bon en biologie qu'en physico-chimie. Les conversations à propos de science-fiction ne sont pas en reste.

Je présente mes respects à Mlle Victoria Flexer. Outre la sympathie que je lui porte, Vicky a toujours été disponible pour un coup de main au labo et j'ai souvent mis à profit ses

qualités multilingues pour corriger et enjoliver mon grossier anglais. Charmante mais parfois piquante, rose ou cactus selon l'humeur, je lui souhaite sincèrement une excellente continuation.

Un livre entier ne suffirait pas à remercier et faire l'éloge d'Émmanuel Suraniti. Manu, c'est un peu Jésus-Christ travesti en chippendale. Cet éphèbe au cœur d'or a toujours été à l'écoute de mes jérémiades, en particulier pendant mes moments d'infortune. Je n'ai pas compté les cafés et les menthols qu'il a pu m'offrir, je sais de toute façon qu'il refusera mon chèque. Son soutien et ses relectures de mon manuscrit en fin de rédaction furent une aide irremplaçable. Si ce garçon écoute plus qu'il ne parle, quand il l'ouvre ça vaut toujours le coup !

Je pense aussi à Feng Gao, ami chinois avec qui j'ai partagé de franches rigolades ; à Fabien *Brandy Brandon* qui après deux ans de *Rire et Chansons* en continu dans son labo doit en connaître de bien bonnes ; à la charmante Émilie Tremey qui peut-être croit trop à l'adage associant travail et santé ; à Guodong Liang qui synthétisa le polymère dont j'avais besoin pour achever mon étude ; à tous les stagiaires qui ont pu traverser l'équipe. Une pensée sincère pour Jean-Frédéric Sanchez qui m'initia à la purification d'enzyme et nous quitta bien trop tôt.

Je remercie également Hassan Saadaoui pour les mesures AFM ainsi que Stéphanie Louguet et Christophe Schatz du LCPO pour les mesures de zétamétrie.

N'ayant que rarement eu le temps de relire mes écrits et par ailleurs adepte dans ma jeunesse du zéro pointé en dictée, toute une équipe de correcteurs m'a soutenu lors de ma fin de rédaction. Je rends ici hommage à Clémence et Béatrice, mes agréables voisines du 30 rue Andronne. Je sais gré à Sandy du CRPP ainsi qu'au plus que sympathique Portland, excellent ami à la ville comme à la campagne. J'exprime mon extrême reconnaissance à Anne Vaudron dont la contribution aura été de loin la plus significative, et cela jusqu'à la dernière nuit de labeur. Ton efficacité fait trembler toutes les fautes d'orthographe de la Communauté urbaine de Bordeaux.

J'ai aussi et surtout une pensée émue pour mon Papa qui corrigea tout un chapitre de ma thèse malgré une situation plus que difficile.

J'ai été soutenu ou ai partagé d'excellents moments avec bon nombre de *permanents* du laboratoire. Je remercie mille fois Anne Facq qui est probablement une des personnes les plus gentilles et disponibles du CRPP. S'il fallait organiser une compétition sur ces deux qualités, Mme Odile Viratelle ferait elle aussi incontestablement parti du peloton de tête. Je

remercie également Béatrice et Monique à l'accueil, Christine à la gestion et Corinne à la direction.

J'ai beaucoup apprécié l'aide qu'a pu m'apporter Mgr Frédéric Nallet ainsi que nos rencontres fortuites dans l'enceinte de CRPP. Scientifique de toute première classe et Baron de l'Intégration par changement de variable, son extrême modestie reste pourtant légendaire. Je lui voue aussi une certaine admiration pour son humour décalé et pince-sans-rire.

Lors des pots organisés au labo, c'est toujours un plaisir de partager un verre (parfois deux ?) avec le cordial et sincère Alain Pénicaud.

Je remercie Jean-Yves pour les nombreux coups de main qu'il m'a donné avec les vélos. Je salue Lionel et Stéphane du service bâtiment qui tard le soir me rendaient gentiment visite lors de ma fin de rédaction.

Parler science avec Patrick Snabre fut souvent bien plaisant et enrichissant. Je me souviendrai aussi de Claude Coulon pour sa gouaille et son amour du bon vin, de Jean-Christophe pour les baskets, d'Ahmed et Philippe « Barbot' » pour les belottes endiablées. Après hésitation quant au niveau minimal requis, je place aussi le très sympathique Ashod Aradian dans la catégorie « jeu de carte ».

Je remercie enfin Etienne Harté et Philippe Cluzeau avec qui j'ai participé avec grand plaisir au projet de *Chimie itinérante* dans les collèges et les lycées.

Les *non permanents* du laboratoire ne sont pas en reste dans mes remerciements. C'est généralement avec eux que se crée le plus rapidement des liens de camaraderie, puis parfois d'amitié.

Membre d'or de la confrérie, toujours prompt à dévoiler sa vraie nature, le Dauphin semble a priori nager dans un océan d'insanités. L'observation sans répit de l'individu associée à l'étude acharnée d'un traité de delphinologie* permet finalement de donner un sens à une majorité de ses tentatives de communication. Toutefois, son inimitié à l'encontre des corbeilles à papiers reste encore inexplicée.

Je salue bien bas le Dr Surfi qui nous a offert une magnifique prestation le jour de sa soutenance de thèse. Bien sûr, je parle ici de tes performances nocturnes. J'en profite pour adresser toute mes félicitations au cocasse Thomy dont la constante abnégation t'as finalement permis *d'acquérir la maturité nécessaire à l'achèvement de ton doctorat*, comme l'a d'ailleurs si bien rappelé ton trop indulgent directeur de thèse.

* Robert Stenuit (1967). *Dauphin, mon cousin*, Dargaud. ASIN: B0014P7GQQ

Je me souviendrai des bons moments passés avec Nessim, en particulier les différentes présentations de posters que nous avons pu assidument effectuer dans le cadre de nos thèses respectives. Bonne chance dans tes quêtes scientifiques et musicales.

Émilie Huile d'Olive aura toujours été une vraie crème pour moi. Si les réminiscences de nos quelques pas de danse sur des chansons de Brel sont parfois un peu floues, je n'en garderai pas moins un souvenir ému.

Le laboratoire a récemment reçu l'insigne honneur d'accueillir en son sein deux des plus charmantes doctorantes ayant jamais pu contribuer à l'essor de la recherche bordelaise – je n'ose dire plus, on me taxerait de flagornerie ! Leurs attraits et leur esprit rivalisent en égales à l'apex de la gent féminine. Le plaisir de parachever sa thèse s'éclipse loin derrière le déchirement que constitue mon départ vers d'autres cieux moins exquis, là où le regard de Richa et Sandra, aussi intense soit-il, ne porte pas.*

En quelques mots, je remercie chaleureusement Damien B. Toujours avenant, amateur de cartes, de kebab et de whisky, ce jeune homme a tout pour plaire.

De nombreux autres camarades du laboratoire mériteraient un petit mot personnalisé. Malheureusement il se fait tard et je dois rendre mon manuscrit définitif demain. En outre le service Gestion du CRPP me rappelle que les frais d'impression de thèse octroyés par le laboratoire ne sont pas infinis et m'incite à moins de prolixité. Soyez certains que dans ma boutique à mercis la vente en gros n'enlève rien à l'intention du détail.

Ainsi, je m'incline devant la très amicale Lucy Viry ; reviens nous vite du pays des kangourous et de la bière insipide ! Je décerne la palme de meilleur collègue de bureau au débonnaire Emerson. J'embrasse la plus délicieuse des stagiaires, l'Andouillette, et lui dis à bientôt pour la prochaine dézu. La transition charcutière est parfaite pour saluer die Wurst, stagiaire germanique de son état (l'Allemagne). Organicien de luxe, le Captain Kelbi fait aussi parti des bons compagnons à citer dans ce panthéon de la physico-chimie. Parce que sans elle la soirée de départ de Surfi ne serait pas restée dans les annales, je remercie Fabiene aux enivrants effluves. Pour éviter l'immanquable jalousie que ne manquerait de lui porter sa comparse, je salue cette dernière, la charmante mais si prude Tatiana. Le couple intra-labo le plus sympathique du CRPP m'offre l'opportunité de faire d'une pierre deux coups en baisant la main de Ramona de la gauche tout en serrant la robuste poigne de Duch'val de la droite. Je me découvre finalement devant quelques personnes que j'ai pu apprécier durant ces trois

* Je compte sur les copains pour leur offrir une traduction non biaisée de cette apologie on ne peut plus méritée. Etant donné ses qualités linguistiques, je pense que le Dr Surfi devrait faire l'affaire.

années : Guillaume Vidal, le truculent José, Alessandro *Cazzo!*, Marie Péliissier, Simon, Jeanne-Marie, Karell, Mathieu D., Julien V. ainsi que sa ravissante amie Ie-Rang, Mélanie F., Gaëtane, Nico Petit Ours, Damien D.D.E.

Permanents ou non, je remercie tous ceux que j'ai oublié afin qu'ils ne m'en tiennent pas rigueur.

J'exprime également ma gratitude aux amis extra-laborantins qui sont venus assister à ma soutenance et/ou au pot qui s'ensuivit Annelise, Ismaboule, Pierre, François ainsi que Gaby, tenancier de la meilleure taverne de la région : *La Cabane* (28 Place de la Ferme de Richemont à Bordeaux, excellents rhum-coco et gingembre, 2^{ème} verre offert sur présentation de ce manuscrit). En particulier, je conserverai une profonde reconnaissance à ceux qui sont venus de loin : Karen le Bébé, Gegos et Bigor No, et m'ont de ce fait procuré un plaisir incommensurable. Je remercie en outre Hélène belfortaine vu qu'elle me l'a demandé et qu'on ne saurait lui refuser. Je suis par ailleurs redevable à Dominique Favory, entre autres pour avoir sponsorisé mon pot de thèse. Je n'oublie pas tous les autres amis de Nancy, Grenoble, Bordeaux ou d'ailleurs, qui se reconnaîtront.

Pour conclure, je remercie de tout cœur ma famille et en tout premier lieu ma Maman que j'aime si fort. En élevant trois enfants, elle accomplit sans se plaindre une tâche autrement plus ardue que celle qui m'incomba durant ces trois années et qui pourtant me donna si souvent l'occasion de maugréer. J'embrasse aussi ma sœur Elise et mon frère Bertrand et leur souhaite bonne continuation dans leur route respective. Je remercie mon Papi « pour le bon gigot ». Je tiens enfin à exprimer une extrême reconnaissance aux autres membres de ma famille pour tout ce qu'ils ont pu faire pour nous, particulièrement ces derniers temps.

Je pense très fort à Papi Jean, à Mamée, à mon Papa.

SOMMAIRE

SYMBOLES ET ABREVIATIONS.....	xxv
-------------------------------	-----

<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	1
---	----------

CHAPITRE I : ANODES ENZYMATIQUES POUR L'OXYDATION DU GLUCOSE

INTRODUCTION.....	9
1. LES ENZYMES EMPLOYEES POUR L'OXYDATION DU GLUCOSE.....	10
1.1. Introduction	10
1.2. La glucose oxydase	11
1.3. La glucose déshydrogénase	12
1.3.1. La PQQ-glucose déshydrogénase.....	13
1.3.2. La NAD-glucose déshydrogénase.....	14
1.3.3. La FAD-glucose déshydrogénase.....	14
2. LES BIOCAPTEURS A GLUCOSE	15
2.1. Introduction, le diabète et la mesure de la glycémie	15
2.2. Les biocapteurs à glucose de première génération, la dépendance à l'oxygène	17
2.3. Les biocapteurs à glucose de deuxième génération, la médiation artificielle	19
2.3.1. Principe.....	19
2.3.2. Caractéristiques du médiateur idéal	20
2.3.3. Médiateur en solution.....	21
2.3.4. Médiateur et enzyme immobilisés.....	23
2.4. Les biocapteurs à glucose de troisième génération : le transfert direct.....	25
2.5. Conclusion.....	27

3. LES BIOPILES ENZYMATIQUES GLUCOSE/O₂	28
3.1. Introduction : les biopiles	28
3.2. La biopile enzymatique (implantable) glucose/O ₂	30
3.2.1. Introduction	30
3.2.2. Principe.....	32
3.2.3. Choix du potentiel des médiateurs	34
3.2.4. Quelques exemples d'implantation	36
3.3. Conclusion.....	38
4. L'HYDROGEL REDOX	39
4.1. Introduction, principe	39
4.2. Avantages	40
4.3. Constituants de l'hydrogel rédox	42
4.3.1. La chaîne polymérique	42
4.3.2. Le médiateur : un complexe d'osmium.....	42
4.3.3. L'agent réticulant	45
4.3.4. Optimisations du polymère rédox	45
4.4. Conclusion.....	47
CONCLUSION	48
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	49

CHAPITRE II : DEGLYCOSYLATION DE LA GLUCOSE OXYDASE

INTRODUCTION.....	59
1. DEGLYCOSYLATION DE LA GLUCOSE OXYDASE.....	63
1.1. Principe.....	63
1.2. Protocole de déglycosylation	64
1.3. Purification de la glucose oxydase déglycosylée	64
1.4. Caractérisation de la glucose oxydase déglycosylée.....	65
1.4.1. Masse moléculaire et diamètre hydrodynamique.....	65
1.4.2. Conservation de l'activité enzymatique	66
1.4.3. Charge apparente de surface.....	67
1.4.4. Tableau résumé	69
2. REPONSES ELECTROCHIMIQUES DANS L'HYDROGEL REDOX	70
2.1. Matériels et méthodes.....	70
2.1.1. Préparation des électrodes modifiées	70
2.1.2. Cellule électrochimique.....	71
2.2. Résultats préliminaires et choix d'une méthode comparative.....	71
2.2.1. Réponses électrochimiques en absence de glucose.....	71
2.2.2. Courant catalytique en présence de glucose.....	79
2.3. Nouvelle stratégie.....	87
2.3.1. Modifications dans la préparation des électrodes.....	87
2.3.2. Comparaison des courants catalytiques.....	88
2.3.3. Comparaison des voltampérogrammes cycliques en absence de glucose.....	90
2.3.4. Une hypothèse rationnelle : l'effet de la déglycosylation sur le volume de l'hydrogel	92
CONCLUSION	94
ANNEXE	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	99

CHAPITRE III : REDUCTION DE L'OXYGENE SUR LES COMPLEXES D'OSMIUM

INTRODUCTION.....	109
1. REDUCTION DE L'OXYGENE SUR UN POLYMERE REDOX	112
1.1. Réponse électrochimique du polymère sous argon et oxygène.....	112
1.2. Distinctions entre réduction de l'oxygène sur le médiateur et sur la surface de l'électrode.....	114
1.3. Soustraction de la composante de réduction de l'oxygène sur le carbone vitreux, facteur limitant la densité de courant	117
1.3.1. Regard préliminaire sur le transfert de matière	117
1.3.2. Analyse de la réduction de l'oxygène sur les complexes d'osmium.....	120
1.4. Espèces produites par la réduction de l'oxygène sur le polymère rédox	126
1.4.1. Généralités.....	126
1.4.2. Principe de l'électrode tournante à disque et anneau	127
1.4.3. Test préliminaire	128
1.4.4. Etude avec disque modifié	130
1.4.5. Transport de matière dans l'hydrogel et absence de dismutation	132
1.4.6. Réduction du peroxyde d'hydrogène sur l'électrode modifiée	134
1.4.7. Fraction de peroxyde d'hydrogène réduit	135
1.4.8. Conclusion.....	137
2. INFLUENCE DU POTENTIEL STANDARD DU COMPLEXE D'OSMIUM.....	138
2.1. Electrode modifiée simultanément avec deux polymères de potentiels standards largement différents.....	138
2.2. Cinétique de la réaction en fonction du potentiel standard du complexe.....	140
2.2.1. Evolution exponentielle de la cinétique de réaction avec la baisse de E°	140
2.2.2. Le cas limite du PVP-Os [+ 0,07 V]	144
2.2.3. Dépendance en température selon le polymère rédox.....	147
3. EFFET DE L'OXYGENE SUR LA REPOSE DE BIOCAPTEURS A GLUCOSE... 	156
3.1. Introduction	156
3.2. Biocapteurs à base de GOx	157
3.2.1. Modifié avec le polymère rédox non réactif à l'oxygène.....	157

3.2.2. Modifié avec le polymère rédox réactif à l'oxygène.....	158
3.3. Biocapteurs à base de GDH	161
3.3.1. Modifié avec le polymère rédox non réactif à l'oxygène.....	161
3.3.2. Modifié avec le polymère rédox réactif à l'oxygène.....	162
3.4. Examen de la forme des courbes sous oxygène par étude hydrodynamique	164
3.4.1. Introduction	164
3.4.2. Etude hydrodynamique de l'électrode à base de GOx et PVP-Os [- 0,17 V]....	166
3.4.3. Etude hydrodynamique de l'électrode à base de GDH et PVP-Os [- 0,17 V]...	173
3.5. Effet de l'épaisseur de l'hydrogel sur la forme des courbes sous oxygène.....	177
3.5.1. Introduction	177
3.5.2. Electrodes à base de GOx et PVP-Os [-0,17 V]	178
3.5.3. Electrodes à base de GDH et PVP-Os [-0,17 V]	182
CONCLUSION, DISCUSSION, PERSPECTIVES	185
ANNEXES	191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	192
<u>CONCLUSION GENERALE</u>.....	201

SYMBOLES ET ABBREVIATIONS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
AFM	microscope à force atomique (<i>atomic force microscopy</i>)
α	facteur de symétrie de transfert électronique
BOD	bilirubine oxydase
CV	voltampérométrie cyclique (<i>cyclic voltammetry</i>) ou voltampérogramme cyclique (<i>cyclic voltammogram</i>)
D	coefficient de diffusion d'une espèce en solution
D_e	coefficient de diffusion apparent de l'électron dans l'hydrogel rédox hydraté
dGOx	glucose oxydase déglycosylée
DLS	diffusion dynamique de la lumière (<i>dynamic light scattering</i>)
DET	transfert électronique direct (<i>direct electron transfer</i>)
DMF	diméthyl ferrocène
Δ	distance caractéristique du saut d'électron
ΔE_p	différence de potentiel pic à pic
e^-	électron
E	potentiel d'électrode
E°	potentiel standard d'un couple rédox
ENH	électrode normale à hydrogène
F	constante de Faraday (96 485 C.mol ⁻¹)
FAD/FADH ₂	couple rédox de la flavine adénine dinucléotide
f.e.m.	force électromotrice d'un générateur électrique
GC	carbone vitreux (<i>glassy carbon</i>)
GOx	glucose oxydase (extraite d' <i>Aspergillus Niger</i> sauf indication contraire)
GDH	glucose déshydrogénase
HRP	peroxydase de raifort (<i>horseradish peroxidase</i>)
Γ_{enz}	concentration molaire surfacique d'enzyme (pmol.cm ⁻²)
Γ_{tot}	masse surfacique d'hydrogel déshydraté (μg.cm ⁻²)
i	courant électrique
I_{pl}	courant électrique de plateau de courbe de polarisation

$I_{pl/sat}$	courant électrique de plateau à saturation en glucose
I_{enz}	courant électrique de plateau relatif à une quantité molaire d'enzymes immobilisées
j	densité de courant électrique
j_{pa}	densité de courant de pic anodique
j_{pc}	densité de courant de pic cathodique
j_{pic}	densité de courant de pic
k°	constante standard de vitesse de transfert électronique hétérogène
k_{ex}	constante de vitesse d'auto-échange électronique
K_m	constante de Michaëlis (caractéristique de l'enzyme)
K'_m	constante de Michaëlis apparente (caractéristique du système)
κ	nombre moyen d'électrons échangés par seconde et par complexe d'osmium avec l' O_2
λ	amplitude de mouvement du complexe rédox autour de son point d'ancrage
MET	transfert électronique par médiateur (<i>mediated electron transfer</i>)
MG	vert de méthylène (<i>methylene green</i>)
N	rendement de capture d'une électrode tournante à disque-anneau
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
ox	espèce oxydée d'un couple rédox
ν	viscosité cinématique
PAA	polyacrylamide
PEGDGE	polyéthylène glycol diglycidyl éther
PEMFC	pile à combustible à membrane d'échange de protons (<i>proton exchange membrane fuel cell</i>)
pI	point isoélectrique de l'enzyme
PMS	méthosulfate de phénazine (<i>phenazine methosulfate</i>)
PQQ	pyrroloquinoléine quinone
p_T	(pseudo) pente de Tafel (exprimée en $mV.dec^{-1}$)
PVI	polyvinylimidazole
PVP	polyvinylpyridine
SDS	dodécylsulfate de sodium (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'SDS (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)

Symboles et abréviations

SOFC	pile à combustible à oxyde solide (<i>solid oxide fuel cell</i>)
réd	espèce réduite d'un couple rédox
rpm	rotations par minute
U	unité d'activité enzymatique (1 U correspond à la quantité d'enzyme consommant $1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ de substrat)
v_b	vitesse de balayage en potentiel de l'électrode de travail
Ω	vitesse de rotation de l'électrode tournante
$\%_m(i)$	pourcentage massique de l'espèce i (souvent dans l'hydrogel sec)

INTRODUCTION GENERALE

En ce début 2011, l'entrée « bioélectrochimie » ne recueille que 1290 résultats sur la version française du sacro-saint Google. Les inconditionnels du moteur de recherche reconnaîtront la modestie du résultat. A titre de comparaison, plus de 12 millions de réponses sont obtenues pour « chimie », et encore 51200 pour « électrochimie », terme qui pourtant interpelle déjà le *profane*. De même, si l'électrochimie est ignorée du Littré, elle peut se targuer d'avoir son entrée chez ses petites cousines en ligne Wikipédia ou Encyclopædia Universalis ; ce n'est plus le cas quand le préfixe *bio* lui est accolé. Cependant, l'émergence rapide de ce néologisme reflète bien l'intérêt croissant que suscite cette science pluridisciplinaire, et plus généralement l'engouement scientifique récent et sans précédent à coupler des savoirs dont les frontières respectives restaient souvent hermétiques l'une à l'autre à l'aube du XX^{ème} siècle.

La présente thèse se base et explore souvent des notions appartenant à la bioélectrochimie. Cette dernière « peut être définie, dans un premier temps, comme la discipline qui a en charge l'application des concepts, des théories et des méthodes de l'électrochimie, à l'étude des molécules et des systèmes biologiques organisés¹ ». La bioélectrochimie c'est donc... l'électrochimie au service de la bio ! Certains lecteurs facétieux ne manqueraient pas d'y remarquer une certaine forme de lapalissade, tout du moins tant que l'on ne leur aurait pas introduit le concept même d'électrochimie.

On peut définir l'électrochimie comme « une science qui décrit les relations mutuelles entre l'électricité et la chimie [*sic*], ou qui décrit les phénomènes chimiques couplés à des échanges réciproques d'énergie électrique² ». De manière plus adaptée à l'étude à venir, quoique incomplète, nous dirons que l'électrochimie permet de mieux appréhender les phénomènes d'oxydo-réduction, c'est-à-dire mettant en jeu un (des) transfert(s) d'électron entre plusieurs entités chimiques. Ainsi, en simplifiant pour notre compte, nous résumerons en définissant la bioélectrochimie comme la discipline étudiant les transferts d'électrons impliquant au moins une entité biochimique.

La Nature met à profit ces réactions d'oxydo-réduction dans de nombreux processus biologiques indispensables à la vie, que ce soit le métabolisme, la respiration ou la photosynthèse. Toute une famille d'enzymes, les oxydoréductases, catalysent spécifiquement ces réactions. Depuis quelques décennies, les chercheurs tirent parti de la possibilité d'échange électronique entre ces enzymes et un matériau conducteur en réalisant des électrodes à surfaces modifiées. Leurs applications sont diverses dans des secteurs tels que la

¹ M. Comtat, Journal de Physique IV 4:185 (1994)

² C. Lefrou, Les bases de l'électrochimie, polycopié de cours ENSEEG, version du 19/10/2004.

biochimie analytique, la médecine, l'environnement ou la conversion de l'énergie. La famille d'électrodes enzymatiques la plus étudiée et employée à ce jour est celle catalysant l'oxydation du glucose. C'est un sous-ensemble de cette dernière qui est considéré dans le cadre de ces travaux de thèse : des électrodes mettant à profit une architecture particulière afin d'immobiliser les enzymes et de transférer efficacement leurs électrons. Cet édifice, formé d'un polymère hydrophile sur lequel sont greffés des complexes d'osmium de nombres d'oxydation variables, est un hydrogel rédox.

Ce type d'électrode a été élaboré pour la première fois il y a une vingtaine d'années. Les recherches à leur sujet ne se sont pas tariées depuis. Cependant, l'étude rigoureuse de ces systèmes complexes relève parfois de la gageure : la synthèse de l'hydrogel n'est pas toujours contrôlée, les interdépendances entre les multiples paramètres sont variées et souvent sous-jacentes, les hypothèses abondent. Ainsi, de nombreux phénomènes advenant au niveau de ces électrodes restent à mieux appréhender afin de les optimiser. En particulier, des caractéristiques telles que les densités de courants, leur stabilité ou leur sélectivité par rapport au glucose peuvent encore être limitantes. Les présents travaux espèrent offrir une réflexion sur quelques résultats obtenus avec ces systèmes bioélectrochimiques.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit de thèse, une présentation générale des électrodes enzymatiques en vue de l'oxydation du glucose sera effectuée. Les enzymes pouvant entrer dans leur composition seront sommairement présentées ainsi que les applications auxquels peuvent prétendre ces dispositifs. En particulier, les différents moyens disponibles pour transférer efficacement les électrons depuis l'enzyme jusqu'à l'électrode seront évoqués. Parmi ceux-ci, l'accent sera particulièrement mis sur les avantages qu'offrent les caractéristiques de l'hydrogel rédox, fondement de notre étude.

Dans le deuxième chapitre, nous entreprendrons de modifier biochimiquement une enzyme, la glucose oxydase, en lui retirant une large fraction des oligosaccharides l'entourant naturellement. L'hypothèse initiale sera que cette *déglycosylation* pourrait induire une diminution de la distance du saut d'électron entre le centre rédox de l'enzyme et le médiateur rédox. Dans ce cas, une augmentation des densités de courants serait a priori escomptée. A la suite d'une caractérisation de la nouvelle enzyme obtenue, nous évaluerons l'impact de la modification sur les densités de courant délivrées par l'électrode et discuterons des résultats obtenus.

Enfin, le dernier chapitre de cette thèse se focalisera sur une réduction parasite de l'oxygène dissous sur le médiateur rédox, le cas échéant des complexes d'osmium. Cette réduction, non envisagée jusqu'à aujourd'hui, sera mise en évidence et étudiée. Les conséquences possibles sur les caractéristiques du dispositif seront finalement discutées selon l'application envisagée.

CHAPITRE I

ANODES ENZYMATIQUES POUR L'OXYDATION DU GLUCOSE

INTRODUCTION

La possibilité de convertir l'activité catalytique d'une enzyme oxydoréductase en un courant électrique a permis le développement d'une très grande diversité d'électrodes enzymatiques. Parmi elles, les anodes catalysant l'oxydation du glucose font partie des plus étudiées. En effet, le glucose ne s'oxyde qu'avec des cinétiques particulièrement lentes sur des électrodes *conventionnelles*. Si des recherches se développent dans le but d'oxyder le glucose sur des anodes non biologiques [1], les électrodes mettant à profit la catalyse enzymatique restent à ce jour largement plus efficaces.

Elles sont déjà largement employées dans des applications de biocapteurs à glucose, en particulier pour la mesure de la glycémie chez les diabétiques. Dans ce contexte, elles sont encore constamment optimisées.

Par ailleurs, ces électrodes enzymatiques sont utilisées pour mettre au point des prototypes de piles biologiques glucose/oxygène. Ces générateurs électrochimiques particuliers sont envisagés pour deux utilisations distinctes. Ils pourraient d'une part faire office de batteries *zéro émission* facilement rechargeables pour des appareils réclamant de faibles puissances. D'autre part et dans certaines conditions, ces biopiles pourrait être utilisées *in vivo* et profiter du glucose et de l'oxygène naturellement présents dans l'organisme pour alimenter des dispositifs médicaux implantés comme des capteurs.

Les stratégies pour préparer des électrodes enzymatiques sont nombreuses et se développent. Parmi elles, celle mettant en jeu un édifice particulier, l'hydrogel rédox, a permis l'obtention d'excellents résultats pour les applications précédemment citées.

Ce premier chapitre se propose de présenter un aperçu des électrodes enzymatiques utilisées pour l'oxydation du glucose, de leurs principes de fonctionnement et de leurs applications. Les enzymes majoritairement utilisées dans ces systèmes bioélectrochimiques seront tout d'abord succinctement décrites. Par la suite, la présentation des différents concepts de biocapteurs à glucose permettra d'introduire les fondements du transfert électronique depuis l'enzyme jusqu'à électrode. L'intérêt que suscitent les biopiles sera ensuite explicité, en particulier dans les cas où le glucose et l'oxygène sont employés comme réactifs. Enfin, une dernière partie s'articulera sur un des moyens permettant de réaliser des électrodes modifiées performantes pour ces applications : l'hydrogel rédox.

1. LES ENZYMES EMPLOYEES POUR L'OXYDATION DU GLUCOSE

1.1. Introduction

Les enzymes sont des macromolécules biologiques qui catalysent les réactions métaboliques. Elles possèdent les caractéristiques habituelles des catalyseurs :

- elles se retrouvent inchangées en fin de réaction et ne font donc pas partie des produits de la réaction ;
- elles ne modifient ni la nature ni la thermodynamique de la réaction ; elles permettent d'abaisser significativement son énergie d'activation. Ceci peut accroître la vitesse de la réaction de plusieurs ordres de grandeur.

Une particularité des enzymes est qu'elles sont généralement hautement spécifiques d'une réaction donnée. Cette spécificité est due à l'interaction complémentaire entre le substrat et l'enzyme, résultant de la conformation de cette dernière. Le substrat est d'abord fixé au site actif de l'enzyme pour former un complexe enzyme/substrat, puis est transformé en produit de réaction. Cette spécificité permet d'éviter des réactions secondaires et la formation de produits dérivés. Elle fait des enzymes des catalyseurs particulièrement intéressants pour la conception de capteurs chimiques.

Cependant, leurs structures tridimensionnelles complexes, qui leur confèrent ces propriétés, les rendent plus sensibles à la dénaturation. La perte d'activité d'une enzyme dépend largement des conditions de son environnement (T, pH, etc.). Comme les catalyseurs non biologiques, certaines d'entre elles peuvent subir une perte d'activité en présence d'inhibiteurs de façon réversible ou irréversible.

Dans leur extrême diversité, une classe d'enzyme intéresse tout particulièrement le bioélectrochimiste : celle des oxydoréductases. Comme leur nom l'indique, elles catalysent des réactions mettant en jeu des transferts d'électrons. Plusieurs oxydoréductases catalysent l'oxydation du glucose et sont utilisées pour la préparation de bioanodes. Nous nous proposons de les décrire sommairement ici.

1.2. La glucose oxydase

A ce jour, la glucose oxydase (GOx, E.C. 1.1.3.4) est l'enzyme qui a été la plus étudiée et utilisée pour des applications mettant en jeu l'oxydation biocatalytique du glucose. Parmi les nombreuses utilisations dont elle peut faire l'objet, son emploi dans des biocapteurs est probablement la plus cruciale [2, 3]. La GOx la plus communément employée est extraite d'un champignon : *Aspergillus niger*. C'est une enzyme homodimérique, c'est-à-dire formée de deux sous-unités polypeptidiques identiques. Chacune de ces sous-unités possède un site actif dans lequel se trouve un centre rédox* indispensable à l'activité enzymatique : la flavine adénine dinucléotique (FAD). Les transferts d'électrons intervenant depuis la GOx sont réalisés par le biais de ce centre rédox. Le potentiel standard apparent (E°) du couple FAD/FADH₂ immobilisé dans la GOx est d'environ $-0,32$ V vs. Ag/AgCl** à pH 7,2 [4, 5].

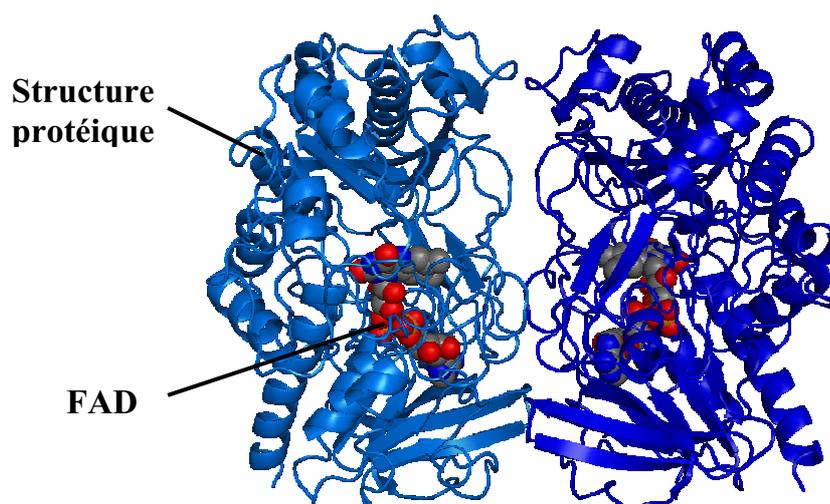
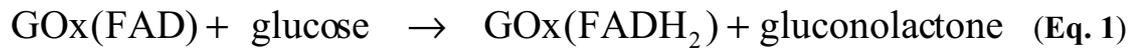


Figure 1. Représentation de la GOx dimérique. Chaque monomère contient un centre rédox FAD au sein de sa structure protéique.

* Le biochimiste parlerait de *cofacteur* ou, comme dans le cas de la GOx, de *groupement prosthétique* (cofacteur maintenu dans la structure protéique de l'enzyme). La présente étude se focalisant plus sur des aspects (bio)électrochimiques, nous avons préféré le terme *centre rédox*.

** Tous les potentiels cités dans ce manuscrit seront relatifs à l'électrode de référence Ag/AgCl.

En lui captant deux électrons, la GOx oxyde le glucose en gluconolactone (qui s'hydrolyse ensuite en acide gluconique) :



La GOx est ensuite oxydée par l'oxygène (O_2), son accepteur naturel d'électrons :



Le biocatalyseur est alors à nouveau disponible pour un nouveau cycle catalytique.

Pour les applications dans des bioanodes à glucose, la GOx se démarque par plusieurs caractéristiques :

- elle présente une stabilité remarquable dans des environnements variables, en particulier en milieu pseudo physiologique (37°C , $\text{pH} \sim 7,4$) ;
- elle catalyse l'oxydation du glucose de façon très spécifique, c'est-à-dire qu'elle n'oxyde pas, ou de manière négligeable, les autres oses éventuellement présents dans le milieu considéré ;
- elle est très rapidement réoxydée par l' O_2 . Nous verrons par la suite que si ce fait est mis à profit pour certains types de biocapteur à glucose, il est préjudiciable pour d'autres, ainsi que pour les biopiles glucose/ O_2 .

La GOx issue d'*Aspergillus niger* sera l'enzyme majoritairement utilisée dans le cadre de ce travail de thèse.

1.3. La glucose déshydrogénase

La glucose déshydrogénase (GDH) est un nom générique désignant plusieurs types d'enzymes apparentées qui oxydent le glucose en gluconolactone mais ne réduisent pas l' O_2 . Les principales GDH utilisées dans des bioanodes à glucose sont sommairement décrites ci-dessous.

1.3.1. La PQQ-glucose déshydrogénase

La PQQ-glucose déshydrogénase (PQQ-GDH, E.C. 1.1.5.2) a suscité un fort engouement ces dernières années pour des utilisations en bioanodes. A l'origine, elle est issue de la bactérie d'*Acinetobacter calcoaceticus*. Son centre rédox est la pyrroloquinoléine quinone (PQQ/PQQH₂), dont le E°' avoisine - 0,2 V dans l'enzyme [6]. A l'instar de la GOx, elle est dimérique et oxyde le glucose en gluconolactone [7]. Elle est largement utilisée pour la mesure de la glycémie sur bandelettes réactives.

La PQQ-GDH présente deux qualités remarquables pour des applications de biocapteurs ou de biopiles :

- elle est insensible à l'O₂. Cela permet d'éviter une réaction qui est souvent considérée comme parasite dans les bioanodes à glucose [8] ;
- elle possède une forte activité d'oxydation du glucose et permet généralement un meilleur transfert électronique vers un médiateur artificiel que la GOx. Les courants d'oxydation biocatalytiques du glucose sont donc d'autant plus élevés [9].

Deux faits sont cependant préjudiciables pour son usage :

- elle affiche une stabilité toute relative [10], ce qui restreint son utilisation pour des applications à long terme. Elle est cependant largement employée pour des usages jetables (bandelettes réactives pour la mesure de la glycémie) [11], même si son emploi pourrait prochainement diminuer ;
- en effet elle n'est pas sélective du glucose et oxyde d'autres sucres tels que le maltose, le galactose et le xylose, entre autres. Si ce fait peut même être considéré comme un avantage pour une utilisation en biopile, il s'avère dans certains cas particulièrement néfaste pour des applications de biocapteurs à glucose. En effet divers traitements de maladies peuvent contenir ou métaboliser certains de ces sucres dans le sang du patient [12, 13]. L'utilisation de biocapteurs à base de PQQ-GDH peut alors entraîner des mesures de glycémie faussement élevées (jusqu'à 25 fois la valeur réelle). Chaque année, plusieurs cas de décès sont à déplorer de ce fait. Aux Etats-Unis, la Food and Drug Administration a récemment mis en garde patients et praticiens sur l'emploi de biocapteurs à base de PQQ-GDH [11, 14].

La PQQ-GDH sera brièvement utilisée au chapitre 3 de cette thèse, en mettant à profit son insensibilité à l'O₂.

1.3.2. La NAD-glucose déshydrogénase

La NAD-glucose déshydrogénase (E.C. 1.1.1.47) utilise comme cofacteur le nicotinamide adénine dinucléotide (couple NAD^+/NADH). Elle est souvent issue des bactéries *Bacillus subtilis* ou *Thermoplasma acidophilum*. Comme la PQQ-GDH, elle présente l'intérêt de ne pas réagir avec l' O_2 . Un atout supplémentaire est sa bonne sélectivité envers le glucose, même si elle réagit encore avec le xylose et légèrement avec le maltose [11]. Cependant, son cofacteur n'est que très faiblement lié à sa structure protéique et réagit de manière séparée à l'enzyme [15]. De plus, l'oxydation du NADH, même non lié à l'enzyme, nécessite de fortes surtensions sur une électrode conventionnelle. Elle réclame alors l'utilisation de médiateurs d'électrons [16, 17] ou d'une enzyme catalysant l'oxydation du NADH : la diaphorase [18].

1.3.3. La FAD-glucose déshydrogénase

La FAD-GDH (E.C. 1.1.99.10) a été récemment découverte dans *Aspergillus terreus* et présente des propriétés tout à fait intéressantes [19]. A l'instar de GOX, cette GDH a pour centre rédox le FAD. Elle est cependant complètement insensible à l' O_2 . [20]. En outre, elle possède une excellente thermostabilité par rapport à la PQQ-GDH et n'oxyde que très faiblement le maltose [21]. Une sensibilité encore trop forte au xylose a toutefois été remarquée [22]. La FAD-GDH est déjà utilisée dans certains biocapteurs commerciaux et pourrait remplacer la PQQ-GDH dans les prochaines années [11, 23].

2. LES BIOCAPTEURS A GLUCOSE

2.1. Introduction, le diabète et la mesure de la glycémie

Les biocapteurs à glucose ont un domaine d'application varié. Par exemple, ils peuvent être employés dans le secteur agroalimentaire pour évaluer la fraîcheur d'une viande ou suivre un processus de fermentation [24]. Cependant, la très grande majorité de la recherche et des applications actuelles est focalisée sur la mesure de la glycémie. Chaque année, environ six milliards de contrôles glycémiques sont réalisés par des malades atteints de diabète [25], ce qui fait du glucose la substance la plus communément analysée [26].

Le diabète est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline (diabète de type 1) ou que l'organisme développe une résistance à l'insuline qu'il produit (type 2). L'insuline est une hormone qui régule la concentration de glucose dans le sang et les tissus. Ainsi, les personnes atteintes de diabète sont affectées de fortes variations dans leur glycémie. Quand un patient sain présente des concentrations de glucose dans le sang généralement comprises entre 4 mM et 8 mM, la glycémie du diabétique peut rapidement varier dans une large gamme entre 2 mM et 30 mM [25]. Sans traitement adapté, les conséquences d'un diabète peuvent s'avérer particulièrement graves pour la santé du patient. Entre autres, le diabète peut largement accroître les risques de maladies cardiovasculaires, d'insuffisance rénale chronique, de neuropathie ou de cécité [26]. Le risque général de décès chez les diabétiques serait au minimum deux fois plus important que chez les patients sains. Par ailleurs, la prévalence du diabète est en très forte augmentation dans toutes les régions du monde. Le nombre de cas estimé était de 30 millions en 1985 et a presque décuplé en 25 ans (285 millions). Les dernières projections prévoient 440 millions de malades en 2030 [27] et l'Organisation mondiale de la santé estime que le nombre de décès par diabète va doubler entre 2005 et 2030 [28].

Si une composante génétique semble indiscutable [29, 30], l'augmentation récente et considérable des cas ainsi que leur emplacement géographique mettent en évidence une forte corrélation entre l'évolution du mode de vie et l'incidence du diabète. Ainsi, le meilleur traitement est probablement préventif et résiderait dans une alimentation plus saine et une activité physique régulière [31]. En attendant, les personnes atteintes de diabète sont contraintes d'équilibrer leur glycémie pour éviter autant que possible les complications de santé susmentionnées. Pour ce faire, elles doivent rapidement consommer un aliment sucré à

l'apparition d'une hypoglycémie ou s'administrer la bonne proportion d'insuline lors d'une hyperglycémie. Attendre les symptômes d'une mauvaise glycémie pour agir n'étant que peu recommandable, cela met en relief l'impérieuse nécessité qu'a le diabétique de pouvoir contrôler sa glycémie de manière simple, fiable, rapide et bon marché à l'aide d'un capteur à glucose.

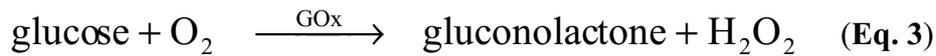
Aujourd'hui, la majorité des mesures de glycémie effectuées par les patients eux-mêmes sont réalisées de manières électrochimiques à l'aide de bandelettes réactives jetables contenant des enzymes. Ces mesures ponctuelles contribuent largement à améliorer la qualité de vie des diabétiques qui y ont accès. Il est cependant vrai que l'information ainsi fournie n'est que parcellaire et ne permet pas toujours d'établir un équilibre glycémique idoine. De ce fait, de nombreuses recherches ont aussi été effectuées pour parvenir à une mesure de la glycémie *en continu*. Depuis une dizaine d'années, des biocapteurs à glucose implantables dans les tissus sous-cutanés permettent d'évaluer la glycémie d'un patient pendant quelques jours consécutifs. Ce type de capteurs *in vivo* utilise généralement la GOx comme biocatalyseur [25], mettant à profit sa bonne stabilité en milieu physiologique.

Les recherches sont encore colossales dans l'optique d'améliorer les propriétés de ces capteurs à glucoses et de proposer des modèles *ad hoc*. L'objectif ultime serait de mettre au point un dispositif correspondant à un pancréas artificiel. Il pourrait coupler un biocapteur à glucose *in vivo* de longue durée de vie à un appareil capable d'injecter automatiquement la quantité strictement nécessaire d'insuline.

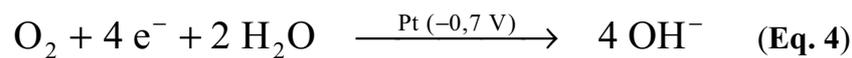
Que les mesures de glycémie soient réalisées de manière ponctuelle par bandelettes ou en continu *in vivo*, elles sont très majoritairement électrochimiques et effectuées à l'aide de bioélectrodes enzymatiques. Les mesures peuvent parfois être coulométriques, mais restent ampérométriques dans la plupart des cas [11, 25, 26]. Depuis presque un demi siècle, de nombreuses méthodes ont été mises au point pour permettre de mesurer des concentrations de glucose par ampérométrie. Etant donnée la quantité phénoménale de travaux effectués à ce sujet, nous nous proposons de présenter sommairement les grandes familles de biocapteurs, leurs principes généraux ainsi que les principaux atouts et inconvénients qui leur sont attribués. Le présent descriptif nous permettra, par la même occasion, d'introduire les fondements du transfert des électrons depuis l'enzyme jusqu'à électrode.

2.2. Les biocapteurs à glucose de première génération, la dépendance à l'oxygène

Les biocapteurs de première génération utilisent la réactivité de la GOx avec son collecteur d'électrons naturel, l'O₂. Le concept initial de biocapteur à glucose a été mis au point par Clark et Lyons en 1962 [32]. En substance, il s'agit d'un capteur à O₂ ampérométrique* sur lequel est immobilisée de la GOx. Quand du glucose est présent en solution, la GOx l'oxyde tout en réduisant l'O₂ :



La déplétion en O₂ ainsi créée induit une baisse du courant de réduction de l'O₂ sur la cathode en platine :



Cette baisse est proportionnelle à la concentration de glucose dans la solution testée. Naturellement, il est nécessaire de connaître le courant que délivrerait la cathode en absence de glucose, proportionnel à la concentration en O₂. Ainsi, la mesure du glucose nécessite une connaissance précise de la concentration en O₂ dans le milieu considéré, qui est obtenue grâce à un second capteur à O₂ qui lui n'est pas modifié avec la GOx.

Cette limitation a été en partie palliée par une nouvelle stratégie consistant à mesurer le courant d'oxydation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) généré par la GOx suite à la réaction 3. Cette oxydation, dont l'amplitude est dépendante de la concentration en glucose de la solution testée (idéalement proportionnelle), était d'abord réalisée sur une électrode en platine, à environ + 0,6 V :



A l'origine, l'inconvénient majeur de cette technique est que pour ce potentiel d'électrode relativement élevé, plusieurs espèces naturellement présentes en milieu physiologique comme l'ascorbate (vitamine C) ou l'urate, s'oxydent sur le platine. Certaines substances exogènes,

* Une électrode de Clark.

tel que le paracétamol, peuvent aussi s'oxyder. En plus d'interagir sur la mesure par le biais du transfert d'électrons correspondant, cette oxydation tend à détériorer l'électrode et donc la durée de vie du biocapteur [33]. Plusieurs méthodes permettent d'éviter ou d'atténuer ces interférences. Par exemple l'immobilisation de la GOx dans un film polymère électrosynthétisé sur l'électrode [34, 35] permet de limiter le flux d'interférents par exclusion stérique [36]. Une membrane négativement chargée, par exemple en Nafion [37], peut aussi être utilisée pour induire une répulsion électrostatique envers les interférents, souvent anioniques. Des études pour améliorer les propriétés catalytiques pour l'oxydation du H₂O₂ et ainsi diminuer le potentiel d'électrode nécessaire ont également été menées [38].

Si l'oxydation du H₂O₂ peut-être mesurée, il en est de même de sa réduction. Les potentiels d'électrode alors requis sont typiquement compris entre - 0,2 V et 0 V [26], ce qui permet d'éviter l'oxydation des interférents susmentionnés. La réduction peut s'effectuer sur du platine, du palladium ou de nombreuses électrodes modifiées avec des catalyseurs inorganiques [25]. Naturellement, il faut préalablement s'assurer que l'O₂ n'est pas simultanément réduit à ces faibles potentiels, ce qui peut rester envisageable pour des électrodes présentant par définition de bonnes propriétés electrocatalytiques [39]. L'utilisation d'une seconde enzyme dans le dispositif, la peroxydase, a également été largement étudiée. Cette enzyme biocatalyse la réduction du H₂O₂. La forme oxydée de l'enzyme est alors soit directement réduite sur la surface de l'électrode, soit par le biais de médiateurs artificiels [25]. Ces concepts de transferts d'électrons directs ou médiés, pour une enzyme, sont abordés dans la présentation des deuxième et troisième générations de biocapteurs.

Le désavantage majeur usuellement cité pour ce type de biocapteur tient à leur essence même : l'utilisation de l'O₂ comme agent de réoxydation de la GOx. Or, la concentration en O₂ dans le sang ou les tissus sous-cutanés est d'une part variable selon plusieurs facteurs (cf. introduction du chapitre 3), mais surtout et souvent, limitante par rapport à la concentration en glucose à mesurer [40-43]. Ce phénomène peut provoquer une rapide limitation de la gamme dynamique du biocapteur (perte de linéarité). Plusieurs méthodes permettent d'atténuer ce « déficit en oxygène » [26]. Certaines seront évoquées au chapitre 3 de ce manuscrit. Le concept le plus radical a été de s'efforcer d'obtenir une mesure du glucose totalement indépendante de la concentration en O₂. Il a donné lieu à l'apparition des biocapteurs à glucose de deuxième génération.

2.3. Les biocapteurs à glucose de deuxième génération, la médiation artificielle

2.3.1. Principe

Ce type de biocapteur se propose de s'affranchir de la contribution de l' O_2 dans la mesure du glucose par l'emploi de médiateurs artificiels. Ces derniers sont des molécules rédox qui font office de collecteurs d'électrons de la GOx en lieu et place de l' O_2 . Les électrons sont ensuite transmis à l'électrode par réoxydation du médiateur qui est alors à nouveau disponible pour réagir avec l'enzyme. Un des intérêts de ce type de biocapteur est que sa non-dépendance à l' O_2 permet l'utilisation d'autres enzymes que la GOx, oxydant le glucose mais non réactives à l' O_2 (cf. § 1.). Selon l'espèce chimique utilisée comme médiateur, ce dernier peut capter un ou deux électrons à l'enzyme.

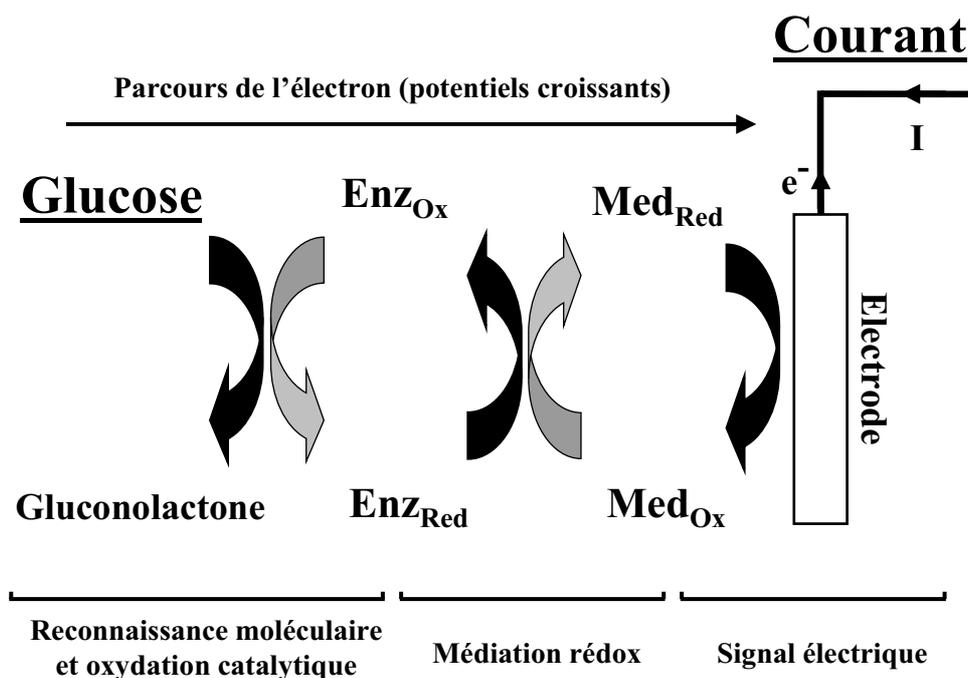


Schéma 1. Du glucose au courant électrique : le parcours de l'électron dans un biocapteur de deuxième génération. Une paire de flèches accolées représente une réaction rédox. Les flèches noires et grises correspondent respectivement à des oxydations et à des réductions. Enz : enzyme ; Med : médiateur rédox ; Ox : état oxydé ; Red : état réduit.

Le principe du biocapteur à glucose de deuxième génération est présenté sur le Schéma 1. Ce dernier met en relief le parcours des électrons, qui passent par trois espèces réduites de couples rédox différents avant d'être collectés à l'électrode. Pour assurer ce transfert, la thermodynamique impose un gradient positif de potentiel rédox entre chaque couple mis en jeu. Un moyen simplifié mais particulièrement pratique pour connaître la possibilité du transfert électronique est de comparer les potentiels standards apparents (E°) des différents couples rédox, tels que :

$$E^{\circ}_{\text{gluconolactone/glu cose}} \leq E^{\circ}_{\text{Enz}_{\text{Ox}}/\text{Enz}_{\text{Red}}} \leq E^{\circ}_{\text{Med}_{\text{Ox}}/\text{Med}_{\text{Red}}} (\leq E_{\text{électrode}})$$

Naturellement, il convient de rester prudent, en particulier en ce qui concerne les transferts d'électrons mettant en jeu les enzymes, bien plus complexes qu'une réaction rédox *ordinaire*.

2.3.2. Caractéristiques du médiateur idéal

Pour transmettre efficacement les électrons du glucose jusqu'à l'électrode et obtenir de bonnes propriétés pour le biocapteur (linéarité, sensibilité, sélectivité, etc.), l'étape de médiation est cruciale. Elle est à l'évidence largement dépendante de la nature du médiateur choisi. Idéalement, celui-ci doit présenter plusieurs caractéristiques [25, 26, 41, 42, 44]^{*} :

- une bonne stabilité chimique dans son état réduit et oxydé ;
- il ne devrait pas être toxique (en particulier pour des applications *in vivo* !)
- sa forme oxydée doit réagir rapidement avec la forme réduite de l'enzyme. Ceci permet d'une part d'augmenter la sensibilité du capteur, mais aussi d'éviter ou d'atténuer une possible compétition de l'O₂ pour les électrons de l'enzyme si la GOx est utilisée^{**}. Notons que la valeur du E° du médiateur n'est pas anodine dans la mesure où elle définit sa différence de potentiel avec le centre rédox de l'enzyme et donc sa force motrice pour capter ses électrons ;
- le E° du médiateur doit être suffisamment faible pour réaliser son oxydation à un potentiel d'électrode minime et ainsi éviter l'oxydation des espèces interférentes telles

* Remarquons que la majorité de ces considérations seront toujours valables pour des bioanodes à médiateur rédox dans des applications en biopiles. D'ailleurs, un article de revue sur les biopiles met en avant les mêmes propriétés, à l'exception notable d'éventuelles interférences de l'O₂ sur la bioanode [45].

** Cette compétition entre l'O₂ et le médiateur rédox sera plus largement décrite dans le chapitre 3 du présent manuscrit.

l'urate ou l'ascorbate. Remarquons que cette considération est à mettre en balance avec la précédente, qui requiert entre autre un E° plutôt élevé ;

- l'oxydation hétérogène doit être rapide et se produire à de faibles surtensions d'électrode ;
- le E° du médiateur devrait être indépendant de la valeur du pH.
- certains auteurs rappellent à juste titre que la forme réduite du médiateur ne devrait pas réagir avec l' O_2 [41, 42, 44].
- un faible coût associé à une forte disponibilité offrirait un avantage certain.

D'autres caractéristiques peuvent être à prendre en considération* selon le type de médiation à pourvoir, en particulier si le médiateur est utilisé dissous en solution ou immobilisé sur la surface de l'électrode.

2.3.3. Médiateur en solution

Les premières recherches sur les biocapteurs de deuxième génération ont porté sur la médiation en solution, dont le principe est résumé dans le Schéma 2. Dans ce cas, le médiateur doit aussi être soluble et présenter de bonnes propriétés diffusionnelles [26].

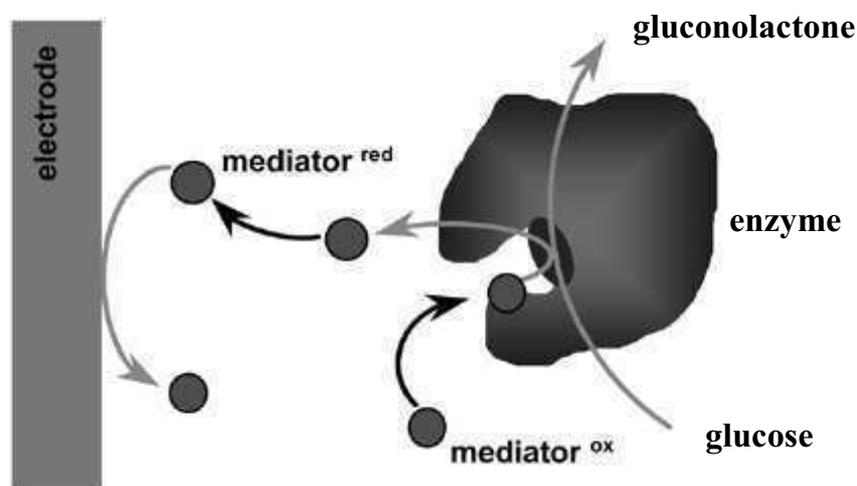


Schéma 2. Principe de la médiation en solution. Tiré de [46], adapté pour le cas de l'oxydation du glucose.

* Les droits de propriété intellectuelle à propos d'un médiateur rédox (ou d'un biocapteur dans son ensemble) ne seront pas abordés dans ce manuscrit, dont l'objectif est scrupuleusement scientifique. Si des biocapteurs de quelques laboratoires pharmaceutiques seront cités à titre d'exemples, l'auteur se défend de tout conflit d'intérêt.

Pour les biocapteurs commerciaux utilisant des bandelettes réactives à usage unique, la médiation est généralement de ce type. L'électrode de travail est recouverte d'un mélange d'enzyme, de médiateur rédox et d'autres adjuvants. Quand le sang atteint l'électrode, le mélange est dissous et la réaction a lieu en solution. Le Tableau 1 présente quelques couples enzyme/médiateur des mélanges déposés sur les bandelettes réactives commerciales. La diversité des composés met en relief la constante évolution dans la recherche pour de nouveaux biocapteurs et le fait que chaque couple présente nécessairement avantages et inconvénients.

Fabricant	Enzyme	Médiateur
Abbott Diabetes Care (FreeStyle®)	PQQ-GDH [†]	Complexe d'osmium
Roche (Accucheck Aviva®)	PQQ-GDH	Non disponible
Arkray (Arkray®)	PQQ-GDH	Hexaamine de ruthénium
Bayer Health Care (Ascencia Countour +®)	FAD-GDH	Ferricyanure
Medisense (Precision Xtra®)	NAD-GDH	Phénanthroline quinone
BD Diagnostic (BD Test Strip®)	GOx	Ferricyanure
Home Diagnostic, Inc (True Track Smart System®)	GOx	Ferricyanure

[†] Prévus d'être remplacés par la FAD-GDH fin 2010 [23]

Tableau 1. Enzymes et médiateurs utilisés dans les bandelettes réactives jetables de quelques compagnies majeures dans le marché des biocapteurs à glucose (liste non exhaustive).

Les médiateurs présentés dans le tableau sont assez représentatifs de ceux généralement utilisés. On peut notamment distinguer le ferricyanure, les complexes d'osmium ou de ruthénium, la phénothiazine et de nombreux dérivés du ferrocène ou des quinones ainsi que des colorants organiques (bleu ou vert de méthylène, bleu de Würster). Bien sûr, de nombreux autres médiateurs peuvent être employés*.

* Un article de revue fort bien documenté a les moyen de satisfaire tout éventuel curieux [6]. En plus d'une pléthore de médiateurs rédox, la revue recense de nombreuses oxydoréductases avec leur E°.

Outre le fait que ce type de médiation ne permet qu'une seule mesure, la contamination de l'échantillon proscrit un usage *in vivo*. Notons cependant que le caractère homogène de la réaction rédox en solution est encore largement utilisé pour établir des modèles théoriques ou obtenir des valeurs cinétiques précises, ce qui est largement plus complexe quand l'enzyme et le médiateur sont confinés sur l'électrode. Remarquons encore que de nombreuses méthodes innovantes d'immobilisation d'enzymes sur des électrodes sont aussi évaluées à l'aide de médiateurs en solution. Elles ne seront pas traitées dans ce manuscrit.

Dans le but d'éviter les contaminations dues au relargage d'espèces et de pouvoir effectuer plusieurs mesures avec le même capteur, l'enzyme et son médiateur ont ensuite été immobilisés sur la surface de l'électrode.

2.3.4. Médiateur et enzyme immobilisés

Une proportion importante des recherches s'est alors focalisée sur des électrodes sur lesquelles sont immobilisés à la fois l'enzyme et le médiateur rédox. De nombreuses techniques ont été proposées et ne seront pas détaillées [42, 47]. Une méthode simple est la coadsorption des deux espèces sur la surface de l'électrode [48]. Il est aussi possible d'immobiliser l'enzyme et le médiateur sur l'électrode à l'aide de pâte de carbone [49-51]. Dans ces conditions, si les espèces électroactives ne sont pas maintenues stériquement ou par des liaisons chimiques fortes sur l'électrode, alors il est envisageable d'être confronté à leur rejet dans la solution, en particulier lors de variations dans le milieu environnant (T, pH, force ionique, convection) [52]. Il s'en suit alors une dégradation de la réponse du biocapteur et la contamination de l'échantillon. Ajouter une membrane sur l'électrode peut permettre d'empêcher cette expulsion [53, 54]. La membrane peut être électropolymérisée par-dessus l'enzyme et le médiateur adsorbés. Une électropolymérisation *in situ* de pyrrole dans un mélange de pâte de carbone et de GOx a permis une excellente rétention de l'enzyme sur l'électrode modifiée [55]. La membrane ne doit pas pour autant empêcher la diffusion du glucose vers l'électrode ni l'évacuation de son produit de réaction*.

* Toutefois, l'ajout d'une membrane est souvent mis à profit pour ralentir la diffusion du glucose et ainsi accroître le domaine de linéarité du capteur (au détriment de sa sensibilité). Elle peut aussi permettre l'exclusion stérique de certains interférents [26].

Modifier les enzymes pour assurer leur immobilisation est une technique qui, quoique plus complexe, présente des résultats tout à fait intéressants qui peuvent permettre de mieux appréhender les phénomènes de transferts électroniques depuis le biocatalyseur. Une technique élégante a été de reconstituer la GOx à partir de son apoenzyme (enzyme dépourvue de son cofacteur) sur des centres FAD, eux même greffés sur un médiateur (PQQ) attaché à une électrode d'or [56]. Son principe est présenté sur le Schéma 3.

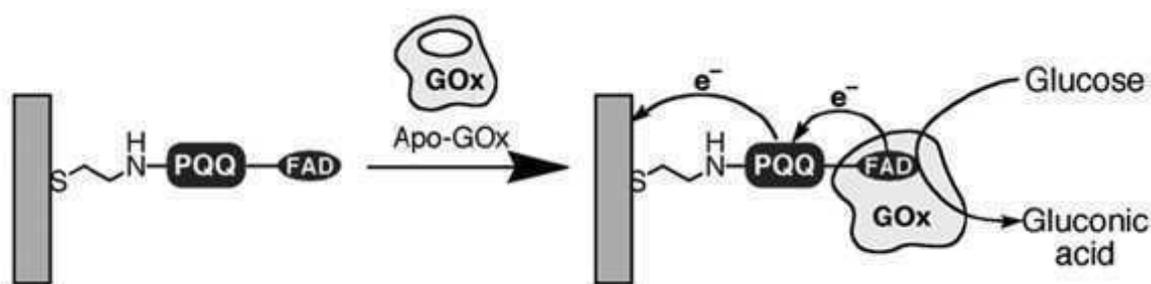


Schéma 3. Reconstitution de la GOx sur une électrode d'or modifiée. Sur une monocouche cystéamine-PQQ-FAD, l'apo-GOx vient se greffer sur son FAD manquant. Suite à l'oxydation de glucose le transfert d'électron est médié par la PQQ. Tiré de [57].

Pour immobiliser efficacement l'enzyme et le médiateur sur la surface de l'électrode, l'utilisation de polymères hydrophiles sur lesquels des médiateurs rédox ont été préalablement greffés a donné lieu à de nombreuses études depuis une vingtaine d'années [58]. Les médiateurs ainsi fixés peuvent, par auto-échanges d'électrons, « connecter électriquement » l'enzyme à l'électrode (voir Schéma 4).

Ce type de méthode est réputé pour l'obtention de fortes densités de courant (donc de bonnes sensibilités) ainsi que pour une bonne protection contre la compétition de l'O₂ pour les électrons de la GOx si c'est cette dernière qui est utilisée [26, 59]. On dénote ainsi plusieurs techniques d'immobilisation de l'enzyme. L'enzyme peut être immobilisée par l'électropolymérisation de monomères (typiquement du pyrrole) dont une fraction est liée à un médiateur rédox [60, 61].

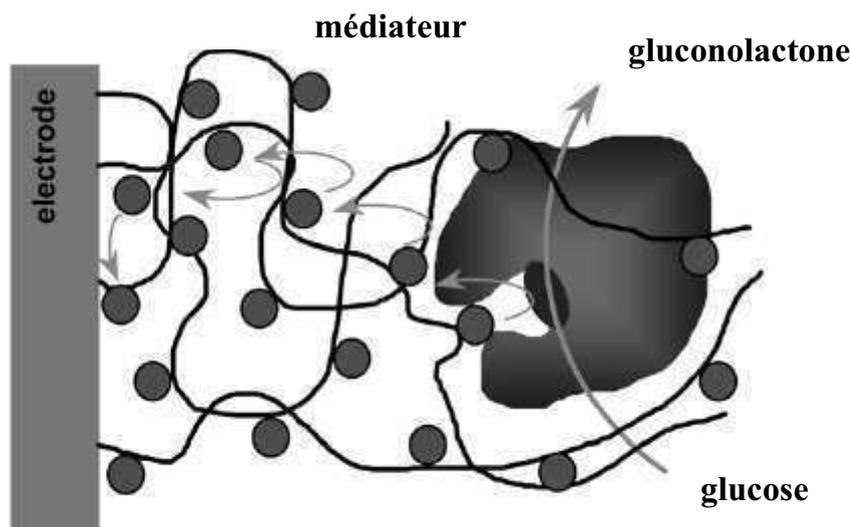


Schéma 4. Médiation électronique sur une électrode modifiée. Cas d'une enzyme immobilisée dans un hydrogel rédox. L'électron va de l'enzyme à l'électrode par auto-échanges électroniques entre les médiateurs rédox. Tiré de [46], adapté pour le cas de l'oxydation du glucose.

Des adsorptions successives de monocouches de GOx et de polymère rédox à base d'osmium sur des électrodes d'or fonctionnalisées ont aussi présenté d'intéressants résultats. Le parfait contrôle du nombre de couches immobilisées, entre autre, a permis d'élégantes analogies avec des modèles théoriques [62, 63]. Enfin, un mélange d'enzyme et de polymère rédox peut être déposé sur la surface de l'électrode et chimiquement lié par un agent réticulant [64, 65]. C'est cette dernière méthode qui sera mise à profit tout au long de cette thèse. Etant donnée l'importance majeure de l'hydrogel rédox dans les deux études proposées dans ce manuscrit, une partie lui sera intégralement dédiée à la fin du présent chapitre.

2.4. Les biocapteurs à glucose de troisième génération : le transfert direct

Le principe d'un biocapteur de troisième génération consiste à collecter les électrons de l'enzyme directement, sans passer par l'intermédiaire d'un médiateur rédox qu'il soit naturel ($l'O_2$) ou artificiel. L'intérêt majeur de ce type de capteur serait l'obtention d'une excellente sélectivité grâce à la possibilité de mesurer une concentration en glucose à des potentiels d'électrode proches du E° de l'enzyme [26]. L'oxydation d'espèces interférentes serait alors impossible à de si faibles potentiels*.

* Selon les matériaux d'électrodes, il faudrait même s'assurer de l'absence de réduction d'une autre espèce endogène : $l'O_2$.

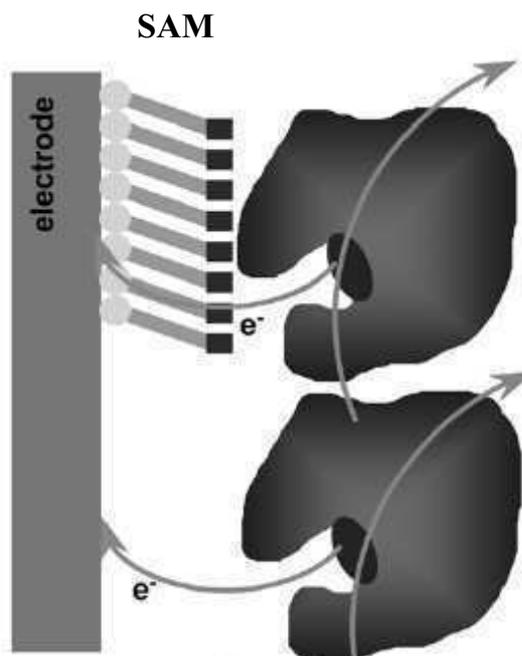


Schéma 5. Transfert électronique direct depuis le centre rédox de l'enzyme jusqu'à l'électrode nue (en bas) ou fonctionnalisée avec une monocouche auto-assemblée (SAM) (en haut). Tiré de [46].

Un certain nombre d'obstacles entrave le développement de prototypes ayant les qualités requises pour un biocapteur à glucose [26]. En premier lieu, le transfert électronique direct entre les enzymes et l'électrode est souvent difficile voire impossible ; en particulier dans le cas de la GOx dont le centre rédox est profondément enfoui dans la structure protéique, elle-même entourée localement de glycosylation (polysaccharides liés à certains acides aminés) [66]. Si l'oxydoréduction réversible et *directe* du centre rédox FAD/FADH₂ est assez souvent observée, elle n'est que rarement couplée à l'oxydation électrocatalytique du glucose.* Quelques cas notables d'observation de cette activité peuvent cependant être cités [71-74]. Pour l'instant, des densités de courants faibles ou des stabilités limitées semblent restreindre les possibilités d'utilisation des capteurs à glucose de troisième génération.

* Depuis quelques années, les études mettant en avant le transfert électronique direct depuis la GOx pour des applications de biocapteur se multiplient. L'auteur du présent manuscrit ne peut s'empêcher de s'interroger, avec réserve et toute proportion gardée, sur la pertinence de la démonstration pour certaines d'entre elles. Les résultats avancés semblent parfois plus suggérer une redécouverte de l'électrode de Clark de 1962 plutôt qu'un biocapteur de troisième génération [67-70].

2.5. Conclusion

Depuis un demi siècle les recherches relatives aux biocapteurs à glucose ampérométriques n'ont pas cessé, ce qui est reflété par l'innovation constante et la diversité des prototypes proposés par les chercheurs ainsi que par la variété des produits commerciaux. Une des nombreuses pistes parcourues pour l'obtention de biocapteurs *in vivo ad hoc* est celle des électrodes modifiées à partir d'hydrogels rédox [75]. Par ailleurs, les biocapteurs ampérométriques utilisés pour mesurer la glycémie correspondent à peu de chose près à de potentielles anodes pour des applications en biopile enzymatique glucose/O₂. Celles-ci seront présentées dans le prochain chapitre.

3. LES BIOPILES ENZYMATIQUES GLUCOSE/O₂

3.1. Introduction : les biopiles

Les biopiles sont des piles *à combustible* qui reposent sur des réactions biocatalytiques pour convertir l'énergie chimique en énergie électrique. Les biopiles utilisent des micro-organismes (bactéries ou levures pour des piles dites *microbiennes*) ou des enzymes pour catalyser les réactions aux électrodes. La biodiversité met à disposition une multitude de biocatalyseurs dont l'activité pourrait être mise à profit. Ceci est reflété par la disparité des combustibles pouvant être oxydés à l'anode. Il est en effet possible de capter biologiquement des électrons au dihydrogène, aux alcools (méthanol, éthanol, glycérol etc.), aux aldéhydes, à des acides organiques (acide lactique, gluconique, etc.) ainsi qu'aux glucides (glucose, fructose, etc.), entre autres [76]. En combinant la réactivité de différentes enzymes pour leur produits de réactions successifs, des réactions *en cascade* sont possibles pour collecter un maximum d'électrons à une molécule organique [77, 78]. Par exemple, le méthanol peut être oxydé en formaldéhyde, ce dernier en acide formique, lui-même en dioxyde de carbone [79]. Comme pour les piles à combustible *classique*, le réactif utilisé à la biocathode est généralement l'oxygène provenant de l'air, qui est réduit en eau. Les différents moyens disponibles pour échanger les électrons entre l'électrode et le biocatalyseur sont globalement les mêmes que ceux précédemment présentés pour les biocapteurs à glucose (cf. §§ 2.2. à 2.4.).

Les intérêts majeurs des biopiles sont liés à la nature de leurs catalyseurs et de certains de leurs combustibles. En effet :

- une pile à combustible *classique* requiert l'utilisation de catalyseurs inorganiques pour accélérer les cinétiques de réactions aux électrodes. Ces catalyseurs contiennent souvent des métaux nobles (p.ex. dans les PEMFC^{*}) ou des terres rares (p.ex. dans les SOFC^{*}). Ces catalyseurs, tel le platine, sont rares, chers, et polluants. Un biocatalyseur, tel une bactérie, une levure ou une enzyme, peut être produit en grande quantité et de manière renouvelable ;

* Il s'agit des deux piles à combustible les plus étudiées :

PEMFC : pile à combustible à membrane d'échange de protons / SOFC : pile à combustible à oxyde solide.

- une PEMFC fonctionne généralement entre 50°C et 100°C et une SOFC entre 600°C et 1200°C. Au contraire, le fonctionnement optimal d'une biopile est communément obtenu pour des températures ambiantes ou physiologiques ;
- dans la majorité des cas, un générateur électrochimique requiert l'utilisation d'une membrane semi-perméable conductrice ionique séparant les compartiments anodique et cathodique. Cette membrane peut être chère, se dégrader, et augmente la résistance interne du générateur. L'emploi de biocatalyseurs sélectifs (cas général des enzymes) et immobilisés sur leur électrode respective peut permettre de s'affranchir de la nécessité d'une membrane. Ceci autorise en outre une miniaturisation extrême des biopiles, ce qui présente certains avantages ;
- le type de combustible utilisé peut aussi présenter un intérêt incontestable. En effet le glucose, par exemple, est une source d'énergie naturelle produite par les plantes grâce à la photosynthèse. Au contraire, l'hydrogène est un vecteur énergétique qu'il s'agit de produire, essentiellement par vaporeformage d'hydrocarbures*, avant de le consommer de manière *propre*. L'oxydation de déchets organiques d'origine anthropique est aussi envisagée pour des biopiles microbiennes. Cette technique aurait le double intérêt de produire de l'énergie électrique renouvelable à partir de combustible gratuit et rarement valorisé, tout en assainissant les eaux usées [81].

Tous ces atouts apparaîtraient comme particulièrement attrayants pour faire des biopiles une des principales sources d'énergie de demain si ce n'était une limitation fondamentale : les densités de puissance que peuvent délivrer les biopiles sont infimes par rapport à celle de leurs analogues non biologiques. A ce jour, les densités de puissance des biopiles microbiennes dépassent difficilement les 100 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ [82-84], tandis que les biopiles enzymatiques les plus performantes délivrent environ 1 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ [78, 85-87]. Ces puissances minimales sont largement dues à la difficulté d'établir de bons transferts électroniques entre les biocatalyseurs et les électrodes [88]. En comparaison, les PEMFC permettent d'obtenir des densités de puissance de plusieurs dizaines de $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ à température ambiante et de plusieurs centaines dès 60°C [89].

Par ailleurs, le caractère biologique des biopiles permet rarement d'égaliser les stabilités à long terme des piles à combustibles standards [90].

* Il faut toutefois noter l'intérêt grandissant quant à la production d'hydrogène par voie biologique [80].

La production d'énergie électrique à grande échelle est donc remise en question pour les biopiles. En outre, leur utilisation pour des applications nécessitant de très fortes puissances, par exemple la propulsion d'un véhicule, semble même hors de propos*.

Cependant, l'énergie *gratuite* et dépolluante que peuvent fournir les biopiles microbiennes reste intéressante, même si celles-ci ne fournissent que de faibles puissances. La stabilité de ces dispositifs microbiens est généralement meilleure que celle des biopiles enzymatiques, les microorganismes étant généralement moins altérables et pouvant proliférer sur l'électrode.

Par ailleurs, l'utilisation de biopiles enzymatiques reste envisagée pour des dispositifs portatifs réclamant de faibles puissances et pouvant être aisément rechargeables [91]. Par exemple, une société japonaise en collaboration avec l'équipe de Kenji Kano a récemment proposé un prototype de biopile enzymatique glucose/O₂ délivrant 50 mW (~ 1,5 mW.cm⁻²). Quatre d'entre elles, connectées en série, permettent d'alimenter un baladeur numérique [92].

Enfin, une application biomédicale est proposée pour un type de pile enzymatique : la biopile glucose/O₂ sans membrane.

3.2. La biopile enzymatique (implantable) glucose/O₂

3.2.1. Introduction

Une application réclamant de très faibles puissances est donc envisagée pour les biopiles enzymatiques sans membrane (c.-à-d. où enzymes et médiateurs sont immobilisés sur leur électrode respective) ; il s'agit d'une micropile implantable *in vivo* qui consommerait des réactifs naturellement présents dans l'organisme. Le glucose et l'oxygène étant naturellement présents dans l'organisme, le combustible et le comburant sont tout trouvés. Cette biopile générerait une puissance suffisante ($\geq 3 \mu\text{W}$ [75]) pour alimenter de manière autonome un dispositif biomédical implanté, comme un capteur par exemple. Selon le besoin du patient, le capteur pourrait mesurer localement une augmentation de température (inflammation), de pression (obturation de vaisseaux sanguins), ou des variations anormales de concentrations d'espèces chimiques, par exemple du glucose [93]. Il pourrait alors transmettre les informations à un récepteur externe qui permettrait au patient de prendre les décisions qui s'imposent. Mieux, le capteur pourrait être couplé à un dispositif délivrant automatiquement

* Une exception un brin anecdotique peut toutefois être citée : <http://www.physorg.com/news183975981.html>.

un principe actif dès que le besoin s'en fait sentir, localement, et dans les proportions strictement nécessaires. Dans les deux cas, cela nécessite aussi de l'énergie électrique, qui serait fournie par la biopile [75].

Dans cette optique, les avantages théoriques de la biopile glucose/O₂ sont évidents par rapport à des piles *classiques* :

- une possibilité de miniaturisation extrême. En effet, les deux réactifs nécessaires à la génération d'énergie sont présents dans l'organisme. Ils n'ont donc pas à être intégrés à la pile au préalable. De même l'électrolyte est ici constitué par les fluides physiologiques et les tissus^{*}. Enfin, nous avons vu que la sélectivité des enzymes pour leur substrat permet de s'affranchir de la nécessité d'une membrane. Au final, il est possible de considérer le volume de la biopile comme uniquement composé des deux électrodes et de leur connexion électrique. Ceci implique aussi une simplicité de conception relativement à une pile nécessitant de confiner tous les composants susmentionnés dans un boîtier hermétique ;
- des produits de réaction inoffensifs et déjà présents dans l'organisme : l'eau et le gluconolactone/acide gluconique [93] ;
- une forte énergie spécifique, idéalement *infinie* [45] du fait du renouvellement constant des réactifs par l'intermédiaire de l'alimentation et de la respiration du patient implanté ;
- éventuellement, la possibilité de la produire à bas coût [45, 93].

Evidemment, les principales limitations restent les densités de puissance et surtout la stabilité de la biopile implantée [45]. En effet une durée de vie de quelques semaines serait un minimum pour que la biopile puisse avoir un véritable intérêt pour certaines applications *in vivo* [93]. Les stabilités des enzymes utilisées et du dispositif dans son entier doivent donc être améliorées. Les compromis à faire sont nombreux. Par exemple, la GOx est une enzyme particulièrement stable et semble toute désignée pour être immobilisée sur la bioanode ; cependant, sa réactivité avec l'O₂ peut diminuer la puissance d'une pile [94] et surtout produire du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Outre que la production de H₂O₂ n'est pas recommandable *in vivo*, elle tend à diminuer la stabilité de l'enzyme et donc la durée de vie de la biopile [95]. De plus, et même si l'utilisation d'enzyme permet une bonne sélectivité des réactions à chaque électrode, il est toujours possible, comme pour les biocapteurs, que des

* A la fois boîtier, réactifs et électrolyte, la question se pose de savoir si l'individu implanté fait partie intégrante de la pile. Que le lecteur ne s'y trompe pas : aucune considération éthique ne tourmente l'auteur de ces lignes. Pragmatique, il pense seulement aux puissances spécifiques que son dispositif pourrait afficher.

espèces endogènes (p.ex. l'urate ou l'ascorbate) ou exogènes (p.ex. le paracétamol) puissent s'oxyder sur les électrodes et diminuer leur durée de vie [96].

3.2.2. Principe

Le principe de la biopile glucose/O₂ par MET sans membrane est relativement simple. Il est représenté sur le Schéma 6. Le principe de l'anode est identique à celui des biocapteurs de deuxième génération où l'enzyme et le médiateur sont immobilisés sur l'électrode (cf. § 2.3.). La différence intervient sur le choix des constituants et la géométrie de l'électrode dans un but de maximisation de la densité de puissance de la pile. Remarquons qu'à ce jour, la GOx reste l'enzyme la plus communément utilisée dans les anodes de biopiles [88].

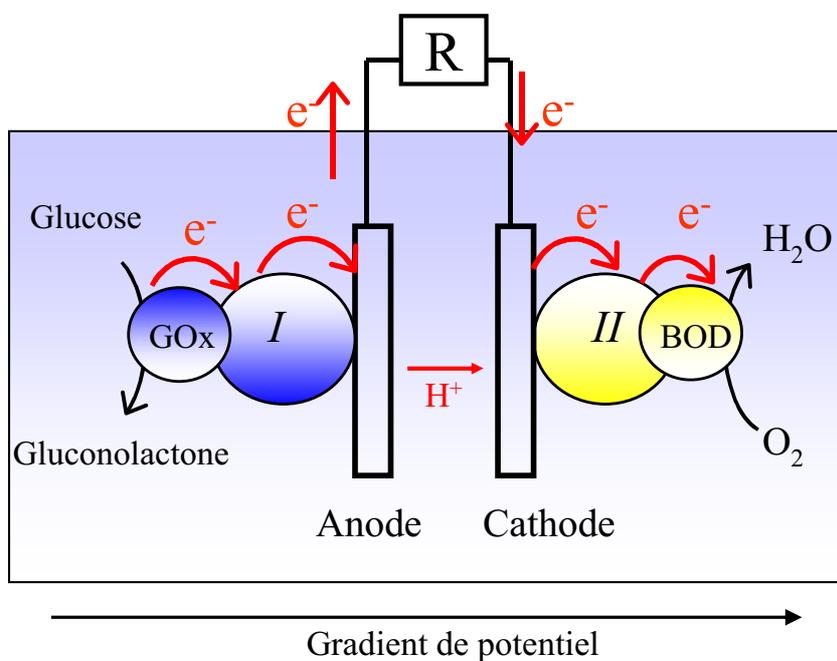


Schéma 6. Principe d'une biopile glucose/O₂ sans membrane : enzymes et médiateurs rédox sont immobilisés sur les électrodes. A partir du glucose, les électrons transitent jusqu'à l'O₂, qui se réduit en eau. Au total, ils auront traversé six espèces rédox. I et II représentent respectivement le médiateur rédox anodique et cathodique. Tiré de [99].

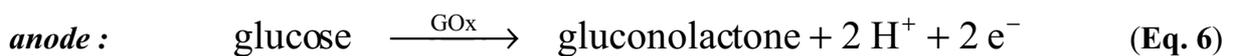
A la cathode, une enzyme catalysant la réduction de l'O₂ en eau est immobilisée. Les plus utilisées pour cette application sont les laccases et les bilirubine oxydases (BOD). Si les premières ont l'avantage d'être très actives à pH 5 et de présenter de forts E°(jusqu'à + 0,57 V à pH 6 [6]), elles sont très peu actives en milieu pseudo-physiologique (pH 7,4 et

présence de chlorure). Les BOD, quoique plus actives à pH 5, conservent de bonnes activités en solutions neutres et en présence de chlorure et sont donc préférées pour certaines applications.

On peut noter que les cathodes enzymatiques fournissent d'excellentes performances pour la réduction de l'O₂ dans des pH modérés par rapport aux catalyseurs inorganiques [97, 98]. En particulier, l'O₂ est intégralement réduit en eau par un processus à quatre électrons, et cela à de faibles surtensions d'électrode.

Quand l'anode et la cathode baignant dans une même solution sont électriquement connectées, la pile ainsi formée délivre un courant du fait de la bonne sélectivité des électrodes pour leur substrat respectif qu'induit l'utilisation d'enzymes. Rappelons toutefois que la GOx peut aussi réagir avec l'O₂, ce qui reste un problème récurrent [88].

Au final, le bilan réactionnel théorique de la biopile glucose/O₂ du Schéma 6 est :



Comme pour les biocapteurs de deuxième génération, les potentiels des différentes espèces rédox mises en jeu doivent être tels que les transferts d'électrons soient facilités. Le Schéma 7 est une échelle de potentiel où les E°' des six couples rédox intervenant dans la biopile sont représentés. L'exemple correspond à une biopile où les deux enzymes (la GOx et la BOD) étaient immobilisées dans des hydrogels rédox à base d'osmium spécifiques sur leurs électrodes respectives [99]. Dans ce type de dispositif où les réactions hétérogènes sont rapides, la tension de fonctionnement pour laquelle une puissance maximale est délivrée avoisine généralement la différence des E°' des deux médiateurs utilisés.

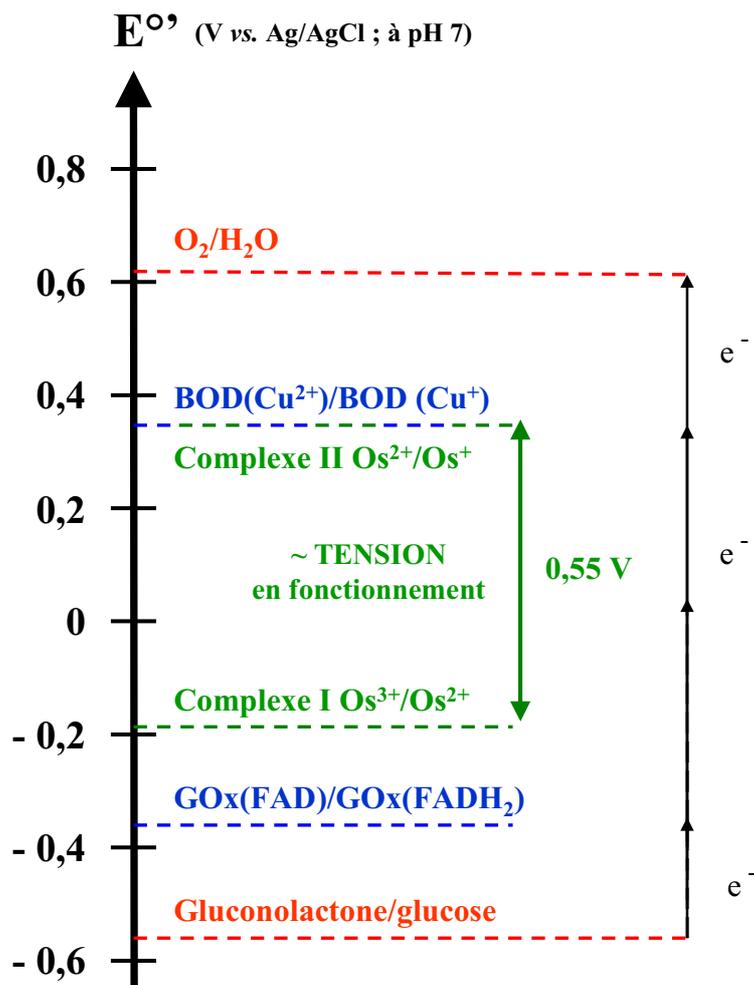


Schéma 7. Echelle des potentiels standards des couples rédox mis en jeu dans une biopile glucose/O₂. L'exemple correspond à une biopile caractérisée dans la référence [99]. Les deux médiateurs sont des complexes d'osmium, immobilisés avec leurs enzymes respectives dans des hydrogels rédox.

Les E°' du glucose et de l'O₂ sont naturellement fixés pour un pH donné. Le choix dans les enzymes est limité par leur nombre et donc, *a fortiori*, celui de leur potentiel. Au contraire, l'extrême diversité de médiateurs disponibles rend possible une large gamme de E°' pour ces derniers.

3.2.3. Choix du potentiel des médiateurs

Naturellement, de nombreux autres paramètres que le E°' interviennent dans le choix du médiateur. Ceux-ci sont globalement identiques à ceux recensés pour les biocapteurs de deuxième génération (cf. § 2.3.2.). Cependant, le choix des E°' des médiateurs a une

importance majeure qui va définir plusieurs caractéristiques essentielles de la pile. Pour une famille donnée de médiateurs présentant une large gamme de E° accessibles*, le choix du E° va souvent consister en un compromis entre le courant que la pile peut délivrer et sa tension [102]. En effet, plus la différence de potentiel entre une enzyme et son médiateur est importante, plus la force motrice du transfert électronique entre les deux espèces rédox augmente. Celle-ci étant souvent limitante pour la valeur du courant, ce dernier s'accroît en conséquence, jusqu'à un certain E° [101, 102]. En outre, si la GOx est immobilisée à l'anode, un transfert d'électron plus rapide limitera la compétition parasite de l' O_2 pour les électrons du $FADH_2$ [103]. Cependant, favoriser la cinétique par ce biais diminue la force électromotrice de la pile (f.e.m.) et donc, le plus souvent, sa tension de fonctionnement optimale. La puissance fournie par la pile étant le produit du courant traversant les électrodes par la tension à leurs bornes, on comprend mieux la réflexion qu'induit en amont le choix d'un médiateur de E° donné (schématisée sur le Schéma 8).

Compromis pour la densité de puissance

$$P = U \times j \quad (W.cm^{-2})$$

Tension de la pile (via la f.e.m.) vs. Courant (via le transfert d' e^- depuis l'enzyme)

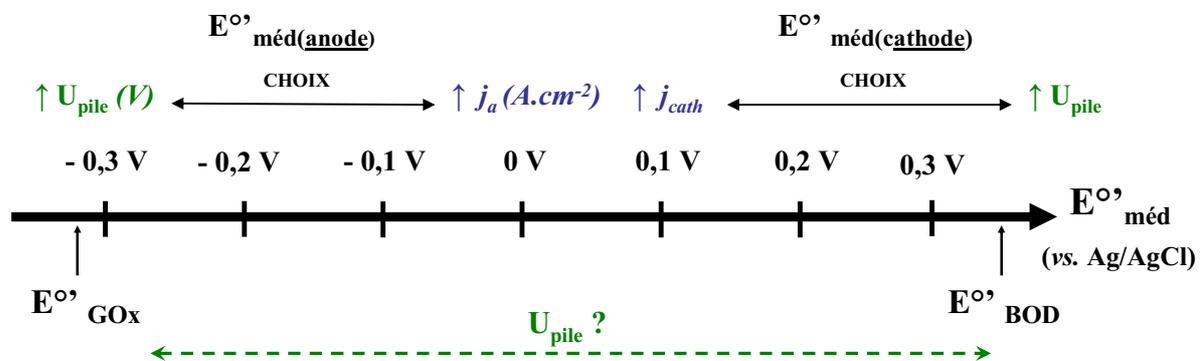


Schéma 8. Le choix du $E^{\circ}_{\text{méd}}$ d'un médiateur rédox, toutes autres considérations exclues, consiste souvent en un compromis entre le courant maximal que l'électrode peut délivrer et la tension de la pile.

Un article de revue de 2010 sur les biopiles enzymatiques a recensé bon nombre de médiateurs utilisés pour l'anode à glucose [88]. Leurs potentiels varient dans une large gamme de $-0,27$ V à $+0,34$ V.

* Par exemple les complexes d'osmium [100], dont une étude résume bien l'effet du E° sur le courant maximal et la tension d'une biopile quand ils sont immobilisés à la cathode [101].

3.2.4. Quelques exemples d'implantation

a) Le raisin

Une biopile glucose/O₂ a été implantée dans un grain de raisin (Figure 2) [94]. Elle était particulièrement miniaturisée : les électrodes étaient formées de fibres de carbone de 7 µm de diamètre et 2 cm de long sur lesquelles étaient immobilisés des hydrogels rédox contenant enzymes et complexes d'osmium.

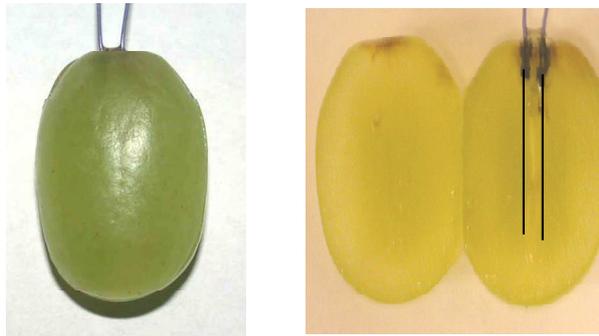
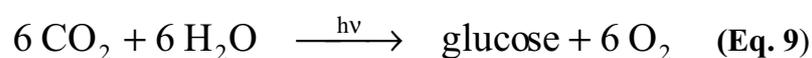


Figure 2. Biopile glucose/O₂ dans un grain de raisin. Electrodes en fibre de carbone de 2 cm de long et 7 µm de diamètre, modifiées avec la GOx ou la BOD immobilisée dans des hydrogels rédox à base de complexes d'osmium ; cépage non spécifié. Les électrodes sont représentées par deux traits, car trop fines pour être visibles à l'œil nu. Tiré de [94].

La pile présentait une f.e.m. de 0,8 V et délivrait une densité de puissance maximale de 240 µW.cm⁻². Cette dernière a baissé de 22 % après 24 h en fonctionnement continu.

b) Le cactus

La photosynthèse est le processus par lequel les plantes et certaines bactéries fixent du dioxyde de carbone (CO₂) et forment du glucose sous l'effet de l'énergie solaire. Si le processus est complexe, il peut être représenté par un bilan de matière global :



Une étude a démontré qu'il était possible de mesurer la génération de glucose et d'O₂ dans des cactus suite à leur d'illumination grâce aux électrodes utilisées dans une biopile glucose/O₂ à base d'hydrogels rédox (Figure 3) [104]. Les courants d'oxydation du glucose et de réduction de l'O₂ augmentaient ou diminuaient selon qu'une lampe éclairait (ON) ou non (OFF) le cactus.

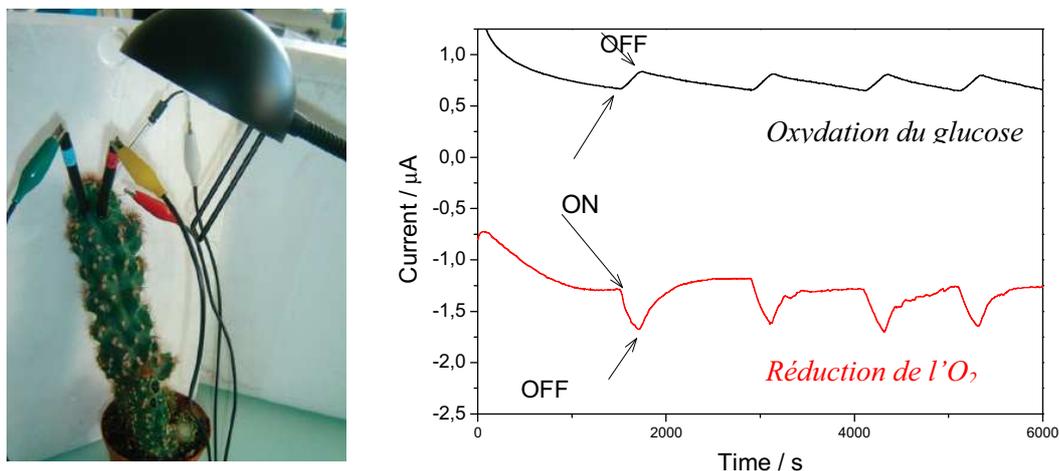


Figure 3. (Gauche) Biopile implantée dans un cactus du genre *Echinocereus*. Electrodes en carbone vitreux modifiées avec la GOx ou la BOD immobilisées dans des hydrogels rédox à base de complexes d'osmium. Notons qu'elle est ici en mode *capteur* (avec une contre-électrode en platine) pour mesurer l'effet de l'illumination sur les courants maximaux des électrodes respectives (**droite**). Tiré de [104].

Quand les électrodes étaient branchées en mode pile, la f.e.m. à leurs bornes était supérieure à 0,6 V. La densité de puissance maximale sous illumination a été mesurée à 9 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, une valeur de 70 % supérieure à celle obtenue à l'obscurité.

Il est intéressant de noter que si la plante a du arracher 24 électrons à des molécules d'eau pour former une molécule de glucose (Eq. 9), la bioanode n'en récupère que deux en oxydant ce dernier en gluconolactone (Eq. 6).

c) Le rat

Une biopile a récemment été implantée dans un rat [105]. Sa configuration était différente de celles précédemment présentées. Pour chaque électrode, le collecteur d'électron (graphite), l'enzyme et le médiateur rédox étaient confinés dans une membrane semi-

perméable. Celle-ci autorisait le passage du glucose, de l'O₂ et de leurs produits de réaction sans permettre aux espèces exogènes de contaminer l'organisme de l'animal.

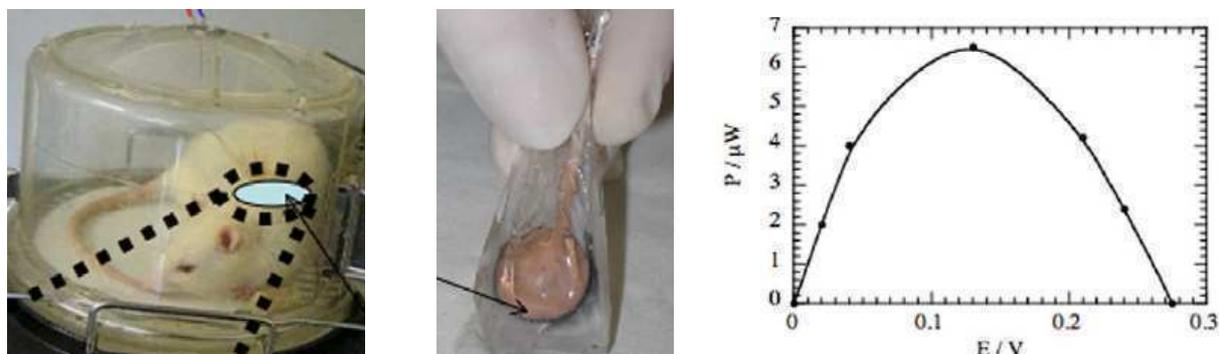


Figure 4. Implantation d'une biopile glucose/O₂ dans un rat de l'espèce *Rattus norvegicus*. De gauche à droite : le rat, la biopile, et la courbe de puissance mesurée *in vivo*. La GOx et l'ubiquinone sont utilisées à l'anode ; la polyphénol oxydase et la quinone à la cathode.

La biopile implantée dans le rat a atteint une puissance maximale de 6,5 μW et présentait une f.e.m. de 0,275 V. Elle délivrait une puissance de manière continue pendant plusieurs heures. On peut noter que de la catalase était ajoutée dans le compartiment anodique. Cette enzyme permettait une meilleure stabilité du dispositif en catalysant la dismutation du H₂O₂ qui peut être généré par la compétition de l'O₂ pour les électrons de la GOx.

3.3. Conclusion

En quelques années, les recherches concernant les biopiles se sont énormément développées. Parmi la grande variété de combinaisons de réactifs possibles, il ressort que les biopiles enzymatiques glucose/O₂ sont les plus étudiées. A l'avenir, elles pourraient être mises à profit pour des applications portatives réclamant de faibles puissances ou dans des dispositifs médicaux implantés. Dans ce dernier cas, les différents éléments constituant les électrodes doivent rester étroitement confinés afin de maintenir la puissance du dispositif et surtout d'éviter leur dispersion dans leur organisme d'accueil. Entre tous les concepts de biopiles testés jusqu'à aujourd'hui, celui d'électrodes modifiées avec des hydrogels rédox à base d'osmium présente les caractéristiques les plus séduisantes pour cette application [88]. La dernière partie de ce chapitre se propose d'en expliciter les raisons.

4. L'HYDROGEL REDOX

4.1. Introduction, principe

La catalyse des réactions électrochimiques a suscité un fort engouement pour la recherche de nouvelles électrodes modifiées. Parmi ces dernières, celles utilisant des hydrogels rédox ont donné lieu à bon nombre d'investigations du fait de leur intéressantes propriétés [106-108]. L'immobilisation d'enzymes dans ces hydrogels a été introduite par les travaux pionniers de Gregg et Heller il y a de cela vingt ans [64, 65, 109]. Depuis, l'intérêt que suscite ce type d'électrodes modifiées ne s'est pas tari [86, 100].

Un hydrogel rédox consiste en un réseau tridimensionnel de chaînes polymères hydrophiles dans lequel sont immobilisés des médiateurs rédox. Dans le contexte des électrodes enzymatiques, ces médiateurs peuvent donc faire office de relais d'électrons entre le biocatalyseur et l'électrode pour des biocapteurs de deuxième génération réutilisables (cf. § 2.3.4.) ou des biopiles sans membrane (cf. § 3.2.). Le transfert des électrons dans l'hydrogel rédox est assez particulier. En effet, le médiateur rédox est généralement lié de manière covalente aux chaînes polymères. De ce fait, si une certaine mobilité lui est permise grâce aux mouvements qu'autorise la bonne flexibilité du polymère hydrophile, le médiateur ne peut pas diffuser physiquement jusqu'à l'électrode. Le transfert d'électrons se fait par auto-échanges électroniques entre les espèces réduites et oxydées du médiateur. Ce mécanisme de transfert de charge peut être décrit comme une diffusion, selon le modèle de Dahms-Ruff [106, 110-112]. Le modèle a été élargi pour le cas des hydrogels rédox par Blauch et Savéant [113, 114]. Au final, c'est un gradient de concentration en médiateurs réduits et oxydés (c.-à-d. en électrons* et en trous d'électrons) induit par la catalyse rédox et la réaction à l'électrode qui permet la *diffusion électronique*. La faculté qu'a un hydrogel de convoier les électrons peut alors être définie par un coefficient de diffusion apparent des électrons (D_e).

Ces transferts d'électrons successifs entre les médiateurs rajoutent une nouvelle étape qu'il s'agit de prendre en compte dans le parcours global de l'électron à travers la bioanode. Ce parcours et les étapes la composant sont résumés sur le Schéma 9. Les différentes espèces rédox représentées correspondent à celles qui seront majoritairement utilisées dans le cadre de cette thèse, à savoir le glucose, la GOx et des complexes d'osmium en guise de médiateurs.

* Tout au long de cette thèse, les *électrons* de l'hydrogel rédox, d'une enzyme, du glucose, etc., ne feront bien sûr référence qu'aux seuls électrons échangeables entre espèces réduites et oxydées.

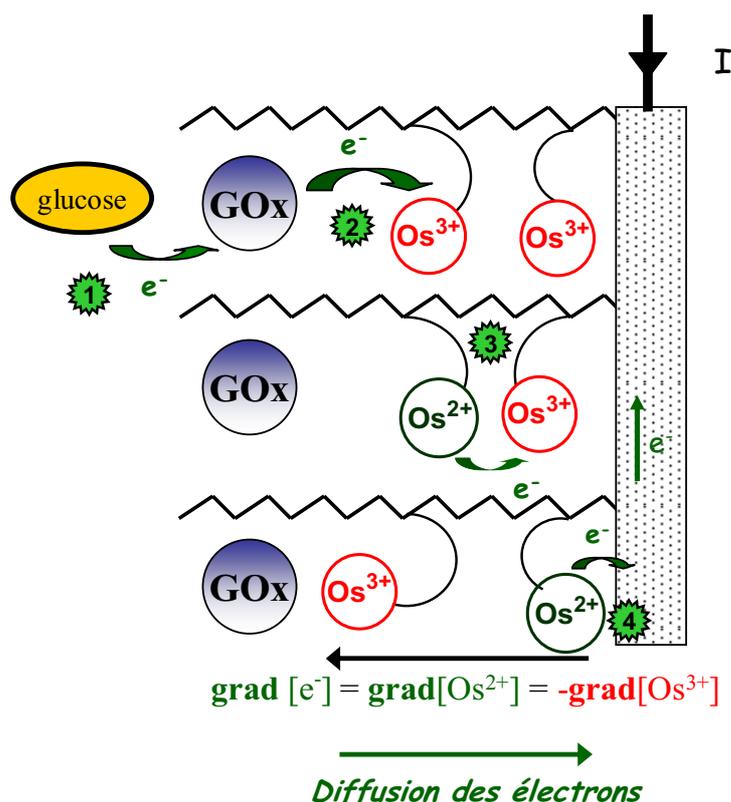


Schéma 9. Représentation des différents transferts d'électrons intervenant dans la bioanode majoritairement étudiée dans cette thèse : GOx dans un hydrogel à base de complexe d'osmium (couple $\text{Os}^{3+}/\text{Os}^{2+}$). 1) Transfert du glucose à la GOx ; 2) de la GOx au complexe oxydé ; 3) diffusion de l'électron par auto-échanges entre les complexes ; 4) transfert hétérogène à l'électrode.

Si les hydrogels rédox sont proposés comme un moyen efficace pour préparer des électrodes enzymatiques, c'est qu'ils présentent toute une panoplie d'avantages. Nous verrons que d'une certaine manière, ils tirent à la fois parti des bénéfices qu'apportent une médiation en solution et une médiation immobilisée.

4.2. Avantages

Dans le cadre de la réalisation d'électrodes enzymatiques, presque tous les avantages de l'hydrogel rédox pourraient se résumer ainsi : il permet d'immobiliser des biocatalyseurs dans une phase majoritairement aqueuse et pourtant capable de *conduire* les électrons. Ceci implique que :

- les enzymes immobilisées dans tout le volume de l'hydrogel rédox sont *connectées électriquement* à la surface de l'électrode. Il est donc possible d'immobiliser une grande quantité d'enzyme ;
- l'immobilisation de l'enzyme dans un hydrogel est relativement douce ce qui permet de ne pas induire de fortes déformations de sa structure tridimensionnelle qui pourrait altérer ses propriétés catalytiques ;
- alors que l'orientation de l'enzyme est un phénomène affectant le transfert électronique dans bon nombre de cas et nécessite souvent des modifications complexes de surface d'électrode, elle n'a pas d'importance dans l'hydrogel. En effet et à l'instar de la médiation en solution, le médiateur est présent tout autour de l'enzyme et disponible pour lui capter ses électrons ;
- par rapport à un système complètement figé, la relative mobilité des espèces fixées dans l'hydrogel flexible doit augmenter les chocs entre ces espèces et donc la vitesse de transferts électroniques ;
- l'hydrogel étant majoritairement composé d'eau, la diffusion des substrats et produits de réactions y est excellente ;
- si l'hydrogel est convenablement réticulé et immobilisé sur l'électrode, le rejet d'enzyme et de médiateur est évité. Cela prévient une contamination du milieu environnant ainsi qu'une baisse de stabilité due à la perte d'espèces électroactives ;

Bien sûr, certains de ces arguments peuvent être à double tranchant. Par exemple, une bonne perméabilité, si elle est vraie pour les substrats, l'est aussi pour les espèces interférentes. Dans ce contexte, il faut noter que le médiateur rédox ne devrait pas réagir avec des espèces autres que l'enzyme immobilisée. Par exemple, Kang *et al.* ont observé une oxydation de l'urate directement sur un complexe d'osmium utilisé comme médiateur ($E^{\circ} = 0,31 \text{ V}$) [96]. Une polymérisation des urates oxydés suivie d'une précipitation avec le polymère rédox entraînait un déclin significatif du courant délivré par l'électrode. L'ajout d'une membrane en Nafion permet de restreindre cet effet, mais limite aussi la diffusion des substrats.

Les nombreux bénéfices qu'apporte l'utilisation de l'hydrogel rédox ont toutefois permis l'obtention d'électrodes modifiées délivrant de fortes densités de courant, de bonnes stabilités et des temps de réponse rapides [58, 61, 115, 116].

4.3. Constituants de l'hydrogel rédox

Chacun des constituants de l'hydrogel a une importance majeure dans la mesure où tous vont influencer sur sa structure globale (perméabilité, gonflement sous hydratation, flexibilité etc.) ainsi que sur les interactions entre les espèces rédox mises en jeu. Les enzymes, qui font partie intégrante de l'hydrogel dans le cas des applications nous intéressant, ont été présentées au § 1.2.

4.3.1. La chaîne polymère

La chaîne polymère constitue l'ossature de l'hydrogel. C'est sur elle qu'est greffé le médiateur rédox. Elle doit être, par définition, hydrophile. Les polymères introduits sont principalement le polyvinylimidazole (PVI), le polyvinylpyridine (PVP) et parfois des copolymères comme le PAA (polyacrylamide)-PVI [58].

4.3.2. Le médiateur : un complexe d'osmium

Plusieurs familles de médiateurs ont pu être greffées sur la chaîne polymérique. Par exemple, des médiateurs organiques ont pu être utilisés, comme les quinones. Cependant, les hydrogels rédox ainsi formés présentent des coefficients de diffusion apparents des électrons faibles et la réactivité des quinones avec de nombreuses espèces abaisse la stabilité [58]. Les complexes organométalliques permettent d'obtenir de bonnes performances. Parmi eux, les complexes à base d'osmium se sont démarqués et ont été largement employés par plusieurs équipes pour des applications de biocapteurs ou de biopiles [5, 61, 62, 86, 117-120].

Les complexes d'osmium ont généralement un nombre de coordination égal à 6. Les ligands des complexes utilisés sont souvent à base de pyridines ou d'imidazoles. La modification de ces ligands avec des fonctions chimiques (chloro, amino, méthoxy, etc.) ou des groupes méthyle décale le E° du complexe. Ceci permet d'obtenir une grande variété de complexes d'osmium dans une large gamme de potentiels (de $-0,43$ V à $+0,8$ V [100, 101]).

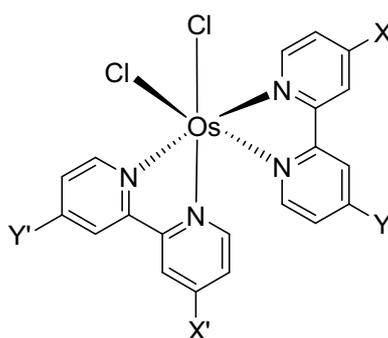


Figure 5. Exemple d'un complexe d'osmium avec deux ligands chloro et deux ligands bipyridine sur lesquels il est possible de greffer des groupements en position X ou Y. Le choix de ces groupements influence la valeur du E° du complexe.

En outre, le fait de fixer le complexe sur une chaîne polymère peut aussi décaler son E° , non seulement selon le type de chaîne (PVI, PVP, etc.) [121], mais aussi selon la manière dont le complexe est greffé. De fait, si le complexe est lié par une ou par deux liaisons à la chaîne polymère, l'effet sur le E° sera différent. Par contre, s'il est attaché *via* un espaceur (cf. § 4.3.4.b), son E° sera sensiblement égal à celui du complexe redox isolé.

Le Tableau 2 présente quelques complexes d'osmium qui ont pu être proposés pour des applications en hydrogels redox. Il est intéressant de constater la forte variabilité du E° par le biais de modifications chimiques somme toute mineures. En outre, certains complexes présentent une ou deux charges positives selon leur état d'oxydation, d'autres deux ou trois. Le caractère polycationique des polymères redox à base d'osmium permet de bonnes interactions électrostatiques avec des enzymes globalement polyanioniques dans des conditions pseudo-physiologiques, comme la GOx [58, 93].

E° (V) vs. Ag/AgCl	Chaîne	Complexe rédox	Référence
+ 0,55	PVI	[Os(4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine)(2,2',6',2''-terpyridine)] ^{2+/3+}	[122]
+ 0,36	PAA-PVI	[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine) ₂ Cl] ^{+/2+}	[94]
+ 0,10	PAA-PVI	[Os(4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine) ₂ Cl] ^{+/2+}	[122]
- 0,07	PVP	[Os(4,4'-diméthoxy-2,2'-bipyridine) ₂ Cl] ^{+/2+}	[123]
- 0,16	PVI	[Os(4,4'-diamino-2,2'-bipyridine) ₂ Cl] ^{+/2+}	[124]
- 0,19	PVP	[Os(N,N'-dialkylated-2,2'-biimidazole) ₃] ^{2+/3+}	[94]

Tableau 2. Diversité des potentiels standards apparents de complexes d'osmium greffés sur des chaînes polymères.

Si les complexes d'osmium sont privilégiés pour la préparation d'hydrogels rédox, c'est qu'ils présentent toutes les caractéristiques requises pour une bonne médiation des électrons depuis les enzymes [45] que nous rappelons ici :

- ils sont stables sous leurs formes réduites et oxydées ;
- leurs transferts d'électrons avec les enzymes ou la surface de l'électrode sont rapides, minimisant les surtensions requises ;
- ils montrent de bonnes qualités d'auto-échanges électroniques et permettent donc une diffusion des électrons dans l'hydrogel efficace ;
- leur E° est généralement insensible au pH ;
- la large gamme de E° disponible permet de choisir un complexe d'osmium de E° idoine pour interagir avec une enzyme donnée dans une application précise (biocapteur ou biopile) [100].

On pourrait toutefois leur opposer un prix élevé et une certaine toxicité, en particulier pour des applications *in vivo*. Les partisans des complexes d'osmium mettent alors en avant la faible quantité de complexes utilisée et le fait que le composé à base d'osmium considéré comme le plus toxique (tétroxyde d'osmium) peut être injecté dans des proportions largement supérieures pour certains traitements médicaux [45], notamment pour soigner l'arthrose [125]. Dans tous les cas, il convient d'éviter toute éventuelle dissémination du médiateur par une bonne immobilisation de l'hydrogel sur l'électrode, voire l'utilisation d'une membrane.

4.3.3. L'agent réticulant

Afin de former des hydrogels stables, des liaisons covalentes sont créées entre les chaînes polymériques et les enzymes. Les agents réticulants les plus utilisés sont le glutaraldéhyde et le polyéthylène glycol diglycidyl éther (PEGDGE).

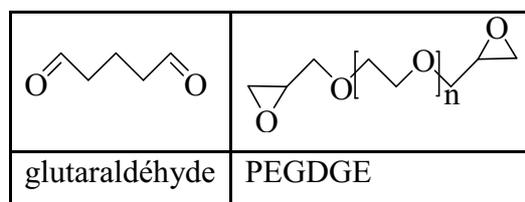


Tableau 3. Formules chimiques des deux agents réticulants les plus utilisés.

La réticulation s'effectue par réaction de leurs groupements carboxyles ou époxy avec les groupes amino à la surface des enzymes et ceux des hétérocycles de la chaîne polymérique (p.ex. pyridine). Selon la longueur de ces agents réticulants et leur concentration, le réseau tridimensionnel que forme l'hydrogel est plus ou moins flexible et sujet à l'hydratation.

L'agent réticulant utilisé tout le long de cette thèse sera le PEGDGE de masse moléculaire environ égale à 400 g.mol^{-1} .

4.3.4. Optimisations du polymère rédox

a) Quaternisation

Il est possible de modifier la chaîne polymère pour améliorer les performances de l'hydrogel. La quaternisation de l'amine de l'hétérocycle permet d'augmenter la densité de charge du polymère redox et donc d'accroître son caractère hydrophile. Une meilleure hydratation induit une meilleure flexibilité de l'hydrogel ce qui peut favoriser les contacts entre les différentes espèces rédox [117].

Cependant, si la quaternisation est trop importante, le nombre de sites disponibles pour la réticulation du polymère est réduit ce qui peut conduire à un mauvais maintien de l'hydrogel sur l'électrode.

b) Ajout d'un espaceur

Ajouter un espaceur moléculaire entre la chaîne polymère et le complexe d'osmium permet de largement augmenter la mobilité de ce dernier qui peut alors se mouvoir autour de son point d'ancrage. De ce fait, une forte augmentation du coefficient de diffusion apparent des électrons a été observée avec un espaceur de 13 atomes [126]. En plus de favoriser la diffusion des électrons, l'espaceur permet au complexe de plus facilement échanger des électrons avec l'enzyme immobilisée car une meilleure mobilité amplifie la quantité de contact intime entre le médiateur et l'enzyme.

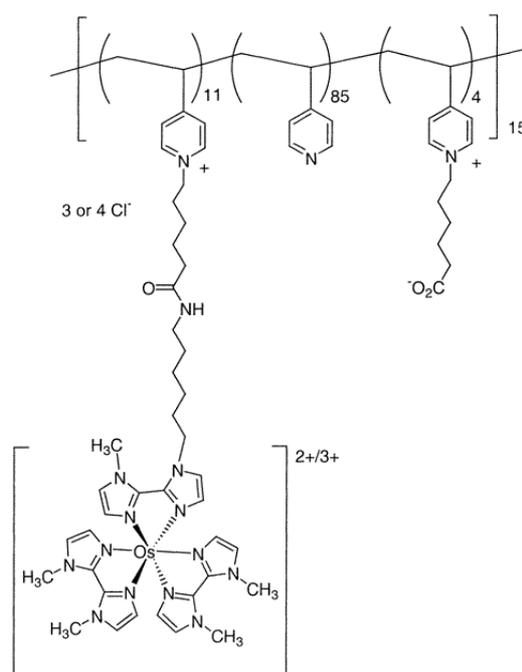


Figure 6. Structure du PVP-[Os(N,N'-dialkylated-2,2'-biimidazole)₃]^{2+/3+}. L'espaceur flexible accroît fortement la mobilité du complexe d'osmium. La quaternisation permet une meilleure hydratation du polymère. Les atomes d'azote des hétérocycles pyridine qui ne sont pas quaternisés sont des sites disponibles pour la réticulation.

Le polymère rédox présenté sur la Figure 6 a été optimisé pour des bioanodes à base de GOx. Sa quaternisation partielle et surtout un espaceur de 13 atomes lui confère d'exceptionnelles propriétés pour capter les électrons de l'enzyme et les transmettre par diffusion jusqu'à l'électrode. Son potentiel rédox d'environ $-0,19\text{ V}$ a été choisi afin d'obtenir des densités de courant de plateau importantes ($> 1\text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$) à des potentiels

d'électrodes minimales (environ $-0,1$ V) [126]. Ce polymère a donc contribué à l'élaboration de biopiles glucose/O₂ de f.e.m. élevées (jusqu'à ~ 1 V [116]) et délivrant d'excellentes densités de puissance maximales [94, 99, 127, 128], jusqu'à $740 \mu\text{W cm}^{-2}$ [86]. En outre, ses performances l'ont révélé comme un bon candidat pour des applications de biocapteurs à glucose, par exemple en terme de limite de détection [129]. Un article de revue précise qu'une électrode modifiée avec ce polymère et la GOx permettrait une efficacité toute particulière pour la mesure de la glycémie *in vivo* dans la mesure où le courant délivré par l'électrode à $-0,1$ V représente *exclusivement l'électroxydation du glucose* [75]. Ce polymère rédox sera largement employé durant cette thèse.

4.4. Conclusion

A ce jour, l'hydrogel rédox est l'un des procédés les plus efficaces pour réaliser des électrodes enzymatiques. Une structure tridimensionnelle majoritairement hydratée associée à une excellente capacité de diffusion des électrons lui confère toute sa spécificité. En particulier, il permet d'obtenir de fortes densités de courant. C'est *a fortiori* le cas pour les bioanodes à glucose et leurs applications.

Cependant, l'hydrogel rédox est un système complexe, à plus forte raison quand des enzymes y sont immobilisées. Son organisation dépend des proportions et des caractéristiques de chacun de ses constituants. La diversité dans le choix de ces derniers induit une immensité de combinaisons envisageables et tout autant de réponses possibles dans des environnements variés. Etant donné le nombre de paramètres à considérer, il semblerait insensé d'établir, à l'heure actuelle, un véritable paradigme de l'hydrogel rédox. Des études de cas spécifiques devraient permettre de mieux appréhender ce système complexe et d'évoluer, pas à pas, vers une compréhension plus globale.

CONCLUSION

Les électrodes enzymatiques représentent des enjeux et un champ d'application considérables. A elles seules, les anodes destinées à oxyder du glucose affichent une diversité impressionnante. Parmi d'autres architectures d'électrodes modifiées, les hydrogels rédox ont révélé de bonnes qualités pour être mis à profit dans des emplois de biocapteurs ou de biopiles. Cependant, plusieurs phénomènes advenant au niveau de ces électrodes restent à mieux appréhender pour optimiser les caractéristiques que requièrent ces applications.

La présente thèse ne cherche en aucun cas à proposer un prototype de capteur ou de biopile glucose/O₂. Aucune limite de détection ou autre densité de puissance ne seront mesurées. Cependant, les études la composant présentent des relations directes avec ces deux applications.

Le premier travail de cette thèse s'intéressera à un moyen susceptible d'accélérer le transfert électronique entre la GOx et les complexes d'osmium d'un hydrogel rédox. L'augmentation conséquente des densités de courant pourrait accroître la sensibilité d'un biocapteur de deuxième génération ou les densités de puissance d'une biopile.

La seconde étude se rapportera à l'interaction de l'oxygène dissous sur les composants de l'anode modifiée, notamment sur les complexes d'osmium. Ces interférences pourraient contribuer à dégrader certaines propriétés d'un biocapteur (sensibilité, linéarité, stabilité) ou d'une biopile (densité de puissance et stabilité, entre autres).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] S. Kerzenmacher, J. Ducreé, R. Zengerle, and F. von Stetten, *Journal of Power Sources* 182:1 (2008).
- [2] R. Wilson and A. P. F. Turner, *Biosensors and Bioelectronics* 7:165 (1992).
- [3] S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal, and L. Ananthanarayan, *Biotechnology Advances* 27:489 (2009).
- [4] M. T. Stankovich, L. M. Schopfer, and V. Massay, *Journal of Biological Chemistry* 253:4971 (1978).
- [5] F. Barrière, P. Kavanagh, and D. Leech, *Electrochimica Acta* 51:5187 (2006).
- [6] K. Kano, *Review of Polarography* 48:29 (2002).
- [7] A. Oubrie, H. J. Rozeboom, and B. W. Dijkstra, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:11787 (1999).
- [8] V. Laurinavicius, B. Kurtinaitiene, V. Liauksminas, A. Ramanavicius, R. Meskys, R. Rudomanskis, T. Skotheim, and L. Boguslavsky, *Analytical Letters* 32:299 (1999).
- [9] E. J. D'Costa, I. J. Higgins, and A. P. F. Turner, *Biosensors* 2:71 (1986).
- [10] V. Laurinavicius, J. Razumiene, B. Kurtinaitiene, I. Lapenaite, I. Bachmatova, L. Marcinkeviciene, R. Meskys, and A. Ramanavicius, *Bioelectrochemistry* 55:29 (2002).
- [11] B. Feldman, « Electrochemical blood glucose test strips for people with diabetes », <<http://electrochem.cwru.edu/encycl/art-g01-glucose.htm>> (octobre 2009).
- [12] K. M. J. Floré and J. R. Delanghe, *Peritoneal Dialysis International* 29:377 (2009).
- [13] D. A. Price, *Clinical Diabetes* 27:164 (2009).
- [14] U.S. Food and Drug Administration, « FDA Public Health Notification: Potentially Fatal Errors with GDH-PQQ Glucose Monitoring Technology », <<http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/PublicHealthNotifications/ucm176992.htm>> (13 août 2009).
- [15] K. Matsushita, H. Toyama, M. Yamada, and O. Adachi, *Applied Microbiology and Biotechnology* 58:13 (2002).
- [16] L. Gorton and E. Dominguez, *Reviews in Molecular Biotechnology* 82:371 (2002).
- [17] F. D. Munteanu, N. Mano, A. Kuhn, and L. Gorton, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 564:167 (2004).

- [18] T. Miyake, M. Oike, S. Yoshino, Y. Yatagawa, K. Haneda, H. Kaji, and M. Nishizawa, *Chemical Physics Letters* **480**:123 (2009).
- [19] S. Tsujimura, S. Kojima, T. Ikeda, and K. Kano, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**:645 (2006).
- [20] S. Tsujimura, S. Kojima, K. Kano, T. Ikeda, M. Sato, H. Sanada, and H. Omura, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **70**:654 (2006).
- [21] H. Yamaoka, Y. Yamashita, S. Ferri, and K. Sode, *Biotechnology Letters* **30**:1967 (2008).
- [22] B. Bode, « The Accuracy and Interferences in Self-monitoring of Blood Glucose », <<http://www.touchbriefings.com/ebooks/A18oyo/usendo2007iss2/resources/49.htm>> (2007).
- [23] Abbott, « Press Release », <http://www.abbott.com/global/url/pressRelease/en_US/60.5:5/Press_Release_0876.htm> (24 juin 2010).
- [24] L. D. Mello and L. T. Kubota, *Food Chemistry* **77**:237 (2002).
- [25] A. Heller and B. Feldman, *Chemical Reviews* **108**:2482 (2008).
- [26] J. Wang, *Chemical Review* **108**:814 (2008).
- [27] J. E. Shaw, R. A. Sicree, and P. Z. Zimmet, *Diabetes Research and Clinical Practice* **87**:4 (2010).
- [28] Organisation mondiale de la santé, « Diabète », <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/index.html#R1>> (Novembre 2009).
- [29] E. A. Andersson, K. Pilgaard, C. Pisinger, M. N. Harder, N. Grarup, K. Faerch, P. Poulsen, D. R. Witte, T. Jorgensen, A. Vaag, T. Hansen, and O. Pedersen, *Diabetologia* **53**:1908 (2010).
- [30] E. Bonifacio and A. G. Ziegler, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **39**:513 (2010).
- [31] E. Oberg, *Integrative Medicine* **6**:18 (2007).
- [32] L. C. Clark Jr and C. Lyons, *Annals of the New York Academy of Sciences* **102**:29 (1962).
- [33] T. J. Ohara, R. Rajagopalan, and A. Heller, *Analytical Chemistry* **66**:2451 (1994).
- [34] L. Coche-Guérente, A. Deronzier, P. Mailley, and J. C. Moutet, *Analytica Chimica Acta* **289**:143 (1994).

- [35] F. Palmisano, A. Guerrieri, M. Quinto, and P. G. Zambonin, *Analytical Chemistry* **67**:1005 (1995).
- [36] S. Cosnier, *Biosensors and Bioelectronics* **14**:443 (1999).
- [37] P. Mailley, S. Cosnier, and L. Coche-Guérente, *Analytical Letters* **33**:1733 (2000).
- [38] P. Mailley, *Talanta* **55**:1005 (2001).
- [39] A. PrévotEAU, Manuscrit de Thèse, Chimie. Université de Bordeaux. Chapitre 3 (consultée le 7 septembre 2010).
- [40] S. Vaddiraju, I. Tomazos, D. J. Burgess, F. C. Jain, and F. Papadimitrakopoulos, *Biosensors and Bioelectronics* **25**:1553 (2010).
- [41] E. H. Yoo and S. Y. Lee, *Sensors* **10**:4558 (2010).
- [42] A. Chaubey and B. D. Malhotra, *Biosensors and Bioelectronics* **17**:441 (2002).
- [43] D. M. Fraser, S. M. Zakeeruddin, and M. Gratzel, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1099**:91 (1992).
- [44] S. A. Jaffari and A. P. F. Turner, *Physiological Measurement* **16**:1 (1995).
- [45] S. C. Barton, J. Gallaway, and P. Atanassov, *Chemical Reviews* **104**:4867 (2004).
- [46] W. Schuhmann, *Reviews in Molecular Biotechnology* **82**:425 (2002).
- [47] K. Kano and T. Ikeda, *Analytical Sciences* **16**:1013 (2000).
- [48] S. M. Zakeeruddin, D. M. Fraser, M. K. Nazeeruddin, and M. Gratzel, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **337**:253 (1992).
- [49] J. Wang, J. W. Mo, S. Li, and J. Porter, *Analytica Chimica Acta* **441**:183 (2001).
- [50] T. Ikeda, T. Shibata, S. Todoriki, and M. Senda, *Analytica Chimica Acta* **230**:75 (1990).
- [51] E. V. Ivanova, V. S. Sergeeva, J. Oni, C. Kurzawa, A. D. Ryabov, and W. Schuhmann, *Bioelectrochemistry* **60**:65 (2003).
- [52] M. Comtat, *Journal de Physique IV* **4**:185 (1994).
- [53] A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. Allen O Hill, W. J. Aston, I. John Higgins, E. V. Plotkin, L. D. L. Scott, and A. P. F. Turner, *Analytical Chemistry* **56**:667 (1984).
- [54] E. Lojou and P. Bianco, *Electroanalysis* **16**:1113 (2004).
- [55] P. Mailley, E. A. Cummings, S. Mailley, S. Cosnier, B. R. Eggins, and E. McAdams, *Bioelectrochemistry* **63**:291 (2004).

- [56] I. Willner, V. Heleg-Shabtai, R. Blonder, E. Katz, G. Tao, A. F. Bückmann, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 118:10321 (1996).
- [57] I. Willner, Y. M. Yan, B. Willner, and R. Tel-Vered, *Fuel Cells* 9:7 (2009).
- [58] A. Heller, *Current Opinion in Chemical Biology* 10:664 (2006).
- [59] N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 574:347 (2005).
- [60] A. Vilkanauskyte, T. Erichsen, L. Marcinkeviciene, V. Laurinavicius, and W. Schuhmann, *Biosensors and Bioelectronics* 17:1025 (2002).
- [61] K. Habermüller, A. Ramanavicius, V. Laurinavicius, and W. Schuhmann, *Electroanalysis* 12:1383 (2000).
- [62] V. Flexer, E. J. Calvo, and P. N. Bartlett, *Journal of Electroanalytical Chemistry* In Press (2010).
- [63] V. Flexer, E. S. Forzani, E. J. Calvo, S. J. Luduena, and L. I. Pietrasanta, *Analytical Chemistry* 78:399 (2006).
- [64] B. A. Gregg and A. Heller, *Analytical Chemistry* 62:258 (1990).
- [65] B. A. Gregg and A. Heller, *Journal of Physical Chemistry* 95:5970 (1991).
- [66] G. Wohlfahrt, S. Witt, J. Hendle, D. Schomburg, H. M. Kalisz, and H. J. Hecht, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 55:969 (1999).
- [67] X. Luo, A. J. Killard, and M. R. Smyth, *Electroanalysis* 18:1131 (2006).
- [68] C. Zhao, Y. Meng, C. Shao, L. Wan, and K. Jiao, *Electroanalysis* 20:520 (2008).
- [69] S. Deng, G. Jian, J. Lei, Z. Hu, and H. Ju, *Biosensors and Bioelectronics* 25:373 (2009).
- [70] P. Wu, Q. Shao, Y. Hu, J. Jin, Y. Yin, H. Zhang, and C. Cai, *Electrochimica Acta* In Press.
- [71] O. Courjean, F. Gao, and N. Mano, *Angewandte Chemie - International Edition* 48:5897 (2009).
- [72] Z. Wang, S. Liu, P. Wu, and C. Cai, *Analytical Chemistry* 81:1638 (2009).
- [73] M. Tominaga, S. Nomura, and I. Taniguchi, *Electrochemistry Communications* 10:888 (2008).
- [74] D. Ivnitski, B. Branch, P. Atanassov, and C. Apblett, *Electrochemistry Communications* 8:1204 (2006).

- [75] A. Heller, *AIChE Journal* 51:1054 (2005).
- [76] D. Sokic-Lazic, R. L. Arechederra, B. L. Treu, and S. D. Minteer, *Electroanalysis* 22:757 (2010).
- [77] P. K. Addo, R. L. Arechederra, and S. D. Minteer, *Electroanalysis* 22:807.
- [78] R. L. Arechederra and S. D. Minteer, *Fuel Cells* 9:63 (2009).
- [79] P. Addo, R. Arechederra, and S. Minteer, *Electroanalysis* 22:807 (2010).
- [80] D. Das and T. N. Veziroglu, *International Journal of Hydrogen Energy* 26:13 (2001).
- [81] B. E. Logan and J. M. Regan, *Trends in Microbiology* 14:512 (2006).
- [82] P. D. Kiely, D. F. Call, M. D. Yates, J. M. Regan, and B. E. Logan, *Applied Microbiology and Biotechnology* 88:371 (2010).
- [83] M. Helder, D. P. B. T. B. Strik, H. V. M. Hamelers, A. J. Kuhn, C. Blok, and C. J. N. Buisman, *Bioresource Technology* 101:3541 (2010).
- [84] C. S. Butler and R. Nerenberg, *Applied Microbiology and Biotechnology* 86:1399 (2010).
- [85] H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, and K. Kano, *Energy & Environmental Science* 2:133 (2009).
- [86] F. Gao, L. Viry, M. Maugey, P. Poulin, and N. Mano, *Nature Communication* 1:1 (2010).
- [87] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, T. Kajino, and K. Kano, *Physical Chemistry Chemical Physics* 9:1793 (2007).
- [88] I. Ivanov, T. Vidakovic-Koch, and K. Sundmacher, *Energies* 3:803 (2010).
- [89] R.-F. Louh and F. Tsai, *ECS Transactions* 3:305 (2006).
- [90] M. Fishback, J. Youn, X. Zhao, P. Wang, H.-G. Park, H. N. Chang, J. Kim, and S. Ha, *Electroanalysis*:2016 (2006).
- [91] W. Gellett, M. Kesmez, J. Schumacher, N. Akers, and S. D. Minteer, *Electroanalysis* 22:727 (2010).
- [92] Sony, « Sony Develops "Bio Battery" Generating Electricity from Sugar », <<http://www.sony.net/SonyInfo/News/Press/200708/07-074E/index.html>> (23 août 2007).
- [93] A. Heller, *Physical Chemistry Chemical Physics* 6:209 (2004).

- [94] N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 125:6588 (2003).
- [95] G. Binyamin and A. Heller, *Journal of the Electrochemical Society* 146:2965 (1999).
- [96] C. Kang, H. Shin, Y. Zhang, and A. Heller, *Bioelectrochemistry* 65:83 (2004).
- [97] N. Mano, V. Soukharev, and A. Heller, *Journal of Physical Chemistry B* 110:11180 (2006).
- [98] N. Mano, J. L. Fernandez, Y. Kim, W. Shin, A. J. Bard, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 125:15290 (2003).
- [99] N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 124:12962 (2002).
- [100] D. A. Guschin, J. Castillo, N. Dimcheva, and W. Schuhmann, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*:1 (2010).
- [101] J. W. Gallaway and S. A. C. Barton, *Journal of the American Chemical Society* 130:8527 (2008).
- [102] T. Tamaki, T. Ito, and T. Yamaguchi, *Fuel Cells* 9:37 (2009).
- [103] D. J. Glykys and S. Banta, *Biotechnology and Bioengineering* 102:1624 (2009).
- [104] V. Flexer and N. Mano, *Analytical Chemistry* 82:1444 (2010).
- [105] P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. o. Boucher, J.-P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathé, P. Porcu, and S. Cosnier, *PLoS ONE* 5:e10476 (2010)
- [106] H. S. White, J. Leddy, and A. J. Bard, *Journal of the American Chemical Society* 104:4811 (1982).
- [107] C. P. Andrieux, J. M. Dumas-Bouchiat, and J. M. Savéant, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 131:1 (1982).
- [108] O. Haas and J. G. Vos, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 113:139 (1980).
- [109] B. A. Gregg and A. Heller, *Journal of Physical Chemistry* 95:5976 (1991).
- [110] H. Dahms, *Journal of Physical Chemistry* 72:362 (1968).
- [111] I. Ruff and V. J. Friedrich, *Journal of Physical Chemistry* 75:3297 (1971).
- [112] I. Ruff, V. J. Friedrich, K. Demeter, and K. Csillag, *Journal of Physical Chemistry* 75:3303 (1971).
- [113] D. N. Blauch and J. M. Savéant, *Journal of the American Chemical Society* 114:3323 (1992).

- [114] D. N. Blauch and J. M. Savéant, *Journal of Physical Chemistry* 97:6444 (1993).
- [115] J. Gallaway, I. Wheeldon, R. Rincon, P. Atanassov, S. Banta, and S. C. Barton, *Biosensors and Bioelectronics* 23:1229 (2008).
- [116] N. Mano, F. Mao, W. Shin, T. Chen, and A. Heller, *Chemical Communications* 9:518 (2003).
- [117] A. Aoki, R. Rajagopalan, and A. Heller, *Journal of Physical Chemistry* 99:5102 (1995).
- [118] J. W. Gallaway and S. A. Calabrese Barton, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 626:149 (2009).
- [119] N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *Chemical Communications* 10:2116 (2004).
- [120] P. P. Joshi, S. A. Merchant, Y. Wang, and D. W. Schmidtke, *Analytical Chemistry* 77:3183 (2005).
- [121] G. Kenausis, C. Taylor, I. Katakis, and A. Heller, *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions* 92:4131 (1996).
- [122] T. Chen, S. C. Barton, G. Binyamin, Z. Gao, Y. Zhang, H.-H. Kim, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 123:8630 (2001).
- [123] N. Mano and A. Heller, *Journal of the Electrochemical Society* 150 (2003).
- [124] H. H. Kim, N. Mano, Y. Zhang, and A. Heller, *Journal of the Electrochemical Society* 150 (2003).
- [125] X. Ayrat, *Haemophilia* 7:20 (2001).
- [126] F. Mao, N. Mano, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 125:4951 (2003).
- [127] F. Gao, O. Courjean, and N. Mano, *Biosensors and Bioelectronics* 25:356 (2009).
- [128] N. Mano, *Chemical Communication* 19:2221 (2008).
- [129] N. Mano and A. Heller, *Analytical Chemistry* 77:729 (2005).

CHAPITRE II

DEGLYCOSYLATION DE LA GLUCOSE OXYDASE

INTRODUCTION

Un inconvénient fréquemment cité dans les recherches sur les biopiles ou biocapteurs enzymatiques est la lenteur du transfert électronique entre le centre rédox de l'enzyme et l'électrode [1-15]. Ce transfert est souvent particulièrement lent, voire impossible, du fait de la distance séparant le centre rédox du collecteur d'électrons [16-21]. En effet, l'électron, pour être collecté, doit traverser la structure protéique de l'enzyme, généralement isolante. Si l'enzyme est glycosylée (glycoprotéine), la distance à franchir peut même être augmentée par la présence d'oligosaccharides [22, 23].

La glucose oxydase (GOx), du fait de ses propriétés catalytiques, a été largement étudiée et est déjà utilisée pour de nombreuses applications [24, 25]. Protéine dimérique, elle possède un centre rédox par monomère : la flavine adénine dinucléotide (FAD). Cette dernière est profondément enfouie dans le volume de l'enzyme, à une distance d'environ 15 Å de la surface protéique pour la GOx extraite d'*Aspergillus niger*. De plus, cette GOx d'environ 160 kDa est glycosylée à hauteur de 16 % à 25 % en masse [26].

De très nombreuses tentatives ont été effectuées pour permettre ou accélérer le transfert électronique depuis les FAD jusqu'à l'électrode, que le transfert soit direct (DET) ou favorisé par un médiateur rédox (MET). Rappelons d'ailleurs que l'utilisation d'un médiateur n'est rien d'autre, à l'origine, qu'un moyen de faciliter le transfert d'électron de l'enzyme à l'électrode [9]. De fait, le transfert direct depuis les FAD de la GOx jusqu'à une électrode semble particulièrement difficile à mettre en œuvre [20].

Modifier la composition et la structure du matériau d'électrode est une des pistes usuelles pour tenter de favoriser le transfert électronique depuis la GOx (DET ou MET). A travers une bibliographie abondante, il est possible de citer l'immobilisation de la GOx sur graphène fonctionnalisé [27], sur nanotubes de carbone [28, 29] ou de polyaniline [30], sur nanoparticules d'or [31], d'oxyde de nickel [32] ou d'oxyde de thulium [33], ou encore sur nanoparticules colloïdales de laponite [34]. Cet inventaire est loin d'être exhaustif, et ne tient pas compte des diverses combinaisons possibles (composites) qu'offre cette quantité de matériaux. Il est à noter que ces nouvelles structures intègrent fréquemment des nanoparticules [12]. Des électrodes poreuses avec des surfaces spécifiques considérables peuvent aussi être utilisées [35, 36]. Précisons que dans ce cas, le transfert électronique

intrinsèque entre l'enzyme et l'électrode n'est pas forcément favorisé, mais l'immobilisation d'une quantité accrue de biocatalyseurs permet d'amplifier les densités de courant par rapport à la surface géométrique de l'électrode, et donc de pallier en partie un transfert électronique lent.

Il est aussi possible de modifier chimiquement la surface du matériau [37]. Ces fonctionnalisations peuvent permettre un greffage covalent de la GOx directement sur l'électrode [38]. La modification chimique peut aussi créer des interactions favorables entre la GOx et la surface (électrostatiques, hydrophiles, etc.). Celles-ci peuvent alors orienter l'enzyme dans une configuration favorisant le transfert d'électron [39]. Le centre rédox est généralement rapproché de l'électrode.

Des modifications peuvent intervenir directement sur l'enzyme. Par exemple en greffant des médiateurs rédox directement sur l'enzyme : différentes techniques ont ainsi été mises en place [13, 40, 41] et sont représentées sur le Schéma 1. De nombreuses techniques mettant en jeu l'ingénierie enzymatique sont à l'étude et ne seront pas développées ici [19].

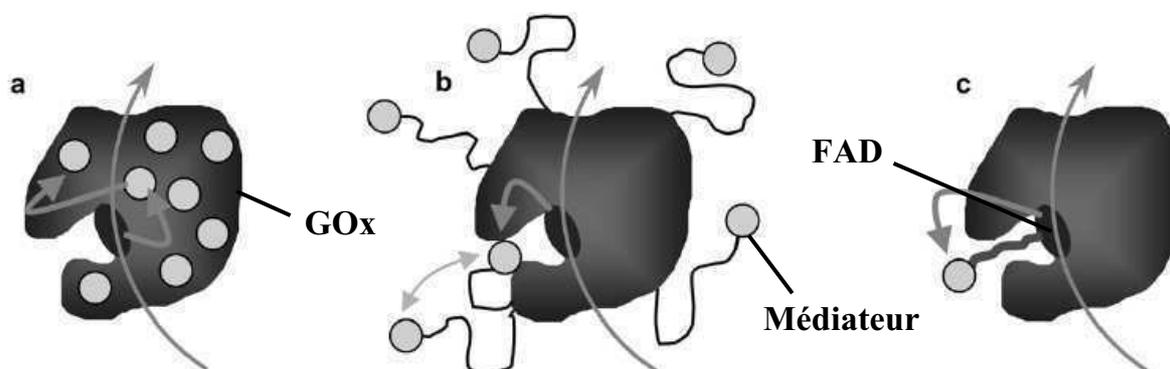


Schéma 1. Modifications d'une enzyme avec des médiateurs liés de manière covalente. (a) Médiateurs greffés directement sur la structure protéique de l'enzyme. (b) Avec des espaceurs autorisant leur mobilité. (c) médiateur directement greffé sur le centre rédox FAD. Tiré de [14]

Par ailleurs, la GOx issue d'*Aspergillus niger* étant glycosylée, une autre alternative peut être de retirer les oligosaccharides entourant sa structure protéique en espérant diminuer la distance du saut d'électron entre le FAD et une électrode (DET) ou un médiateur (MET).

Une étude récente de Courjean *et al.* a montré que la déglycosylation de la GOx améliorerait largement ses propriétés de DET sur une électrode en carbone vitreux [22]. A notre connaissance, l'effet de la déglycosylation de la GOx sur son transfert d'électron à un médiateur rédox n'a été examiné qu'une seule fois [42]. Dans cette étude, Fraser *et al.* ont partiellement déglycosylé la GOx par voie enzymatique (son principe est développé au § 1.1.). Ils estiment à 5 kDa la masse d'oligosaccharides retirée pour la GOx dimérique, soit 30 % du total. En solution, la déglycosylation permettrait d'augmenter de deux ordres de grandeur la constante de vitesse d'échange électronique entre l'enzyme et le médiateur utilisé. La médiation utilisée était assez particulière. Elle était réalisée suite à la formation de micelles mixtes contenant à la fois la glucose oxydase et le médiateur rédox (un surfactant modifié avec du ferrocène). Des électrodes modifiées ont ensuite été préparées par auto-adsorption en plongeant du graphite poreux dans une solution contenant à la fois l'enzyme et le médiateur/surfactant. Quand l'électrode a été modifiée avec la GOx partiellement déglycosylée, elle débite un courant sept fois supérieur à celui d'une électrode à base de GOx commerciale. Les auteurs concluent en suggérant que l'utilisation d'enzymes déglycosylées pourrait améliorer la performance de biocapteurs*.

Nous avons vu que l'intérêt porté aux hydrogels rédox pour des applications de biocapteurs ou de biopiles enzymatiques provient, entre autres, des bons résultats qu'ils permettent en terme de densités de courant. Cependant, ces dernières restent encore relativement faibles et de nombreuses études cherchent à les amplifier. Dans cette optique, la déglycosylation est une piste à ne pas négliger pour favoriser le transfert électronique entre la GOx et le médiateur rédox immobilisés dans l'hydrogel.

La présente étude se propose d'évaluer l'effet de la déglycosylation de la GOx issue d'*Aspergillus niger* sur sa capacité à transférer ses électrons à des complexes d'osmium dans un hydrogel rédox. Son concept est représenté sur le Schéma 2.

* Etant donné le peu d'engouement pour l'énergie électrique produite par voie enzymatique au moment de la publication de cette étude (1991), nous nous permettons une mise à jour : « performance de biocapteurs *et* de biopiles ».

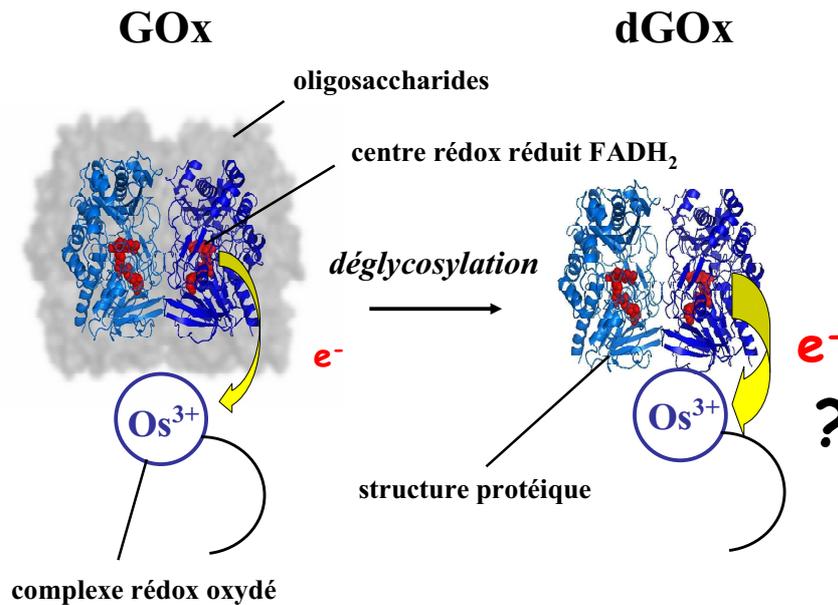


Schéma 2. Concept de l'étude : la déglycosylation de la GOx améliore-t-elle le transfert électronique *intrinsèque* entre l'enzyme et le médiateur redox immobilisés dans un hydrogel ?

En premier lieu, la méthode de déglycosylation puis de purification de l'enzyme obtenue seront présentées. Les caractérisations parallèles de la GOx native et déglycosylée (dGOx) seront effectuées. Viendra ensuite le raisonnement suivi permettant l'obtention d'une méthode rationnelle pour évaluer l'éventuel effet de la déglycosylation sur l'amélioration du transfert électronique entre le centre redox et le complexe d'osmium.

1. DEGLYCOSYLATION DE LA GLUCOSE OXYDASE

1.1. Principe

La déglycosylation est réalisée par un processus enzymatique décrit sur le Schéma 3. Deux enzymes glycosidases sont utilisées pour catalyser la rupture de liaisons osidiques des oligosaccharides entourant la GOx. L' α -mannosidase rompt spécifiquement les liaisons entre deux mannoses, oses majoritaires de la glycosylation de la GOx et intervenant dans la ramification des oligosaccharides [43]. Cette première déglycosylation permet de faciliter l'accès de l'endoglycosidase H qui rompt alors la liaison entre les deux oses initiant la chaîne polysaccharide : les *N*-Acetylglucosamines.

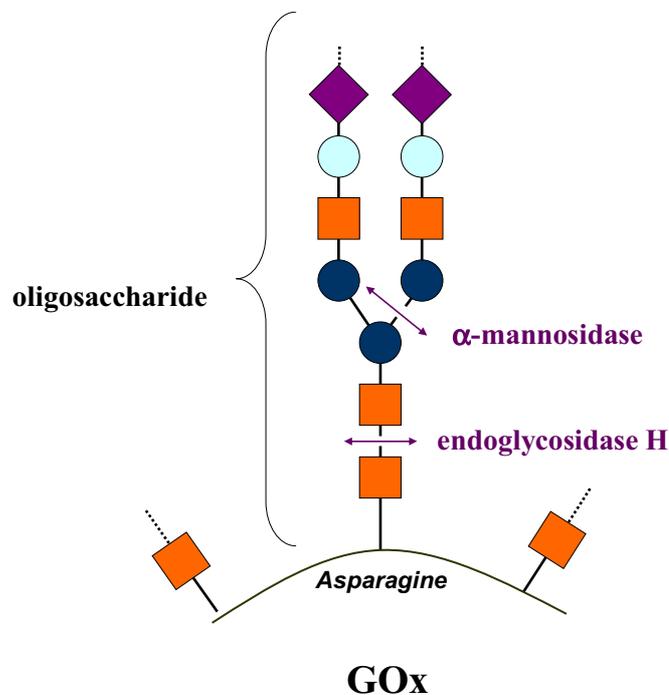


Schéma 3. Processus de déglycosylation par catalyse enzymatique. Les flèches doubles schématisent les ruptures spécifiques de liaisons osidiques par les deux glycosidases. Carrés : *N*-Acetylglucosamines, ronds sombres : mannoses, les autres formes en bout de chaîne symbolisent d'autres oses possibles.

Si le processus est complet, il ne reste donc plus qu'un ose par oligosaccharide initialement présent, lié à la structure protéique par un acide aminé asparagine. Formellement, la GOx ainsi traitée ne peut donc pas être considérée comme totalement déglycosylée.

1.2. Protocole de déglycosylation

La déglycosylation est effectuée à partir de GOx commerciale d'*Aspergillus niger* (Fluka, 208 U.mg⁻¹) préalablement purifiée par nos soins [8] et dont la concentration et l'activité (70 ± 4 U.nmol⁻¹) ont été caractérisées. Le protocole de déglycosylation a été adapté d'une procédure décrite par Kalisz *et. al* [44].

La GOx purifiée est diluée à ~ 8 mg.mL⁻¹ dans une solution de 100 mM de phosphate de sodium à pH 5,1. L' α -mannosidase (Sigma-Aldrich) et l'endoglycosidase H (New England Biolabs) sont ajoutées (respectivement 3,3 U et 16,7 mU par mg de GOx). Après homogénéisation, la préparation est incubée à 37°C à l'abri de la lumière. L'ajout de la même quantité de chaque glycosidase est répété deux fois, à 24 h d'intervalle. Après 72 h, la GOx déglycosylée (dGOx) est purifiée.

1.3. Purification de la glucose oxydase déglycosylée

La solution contenant la dGOx est d'abord centrifugée à 5 000 g pendant 20 min, à 4 °C. Un dépôt solide, probablement formé de résidus d'oligosaccharides et/ou d'agrégats d'enzymes, est visible au fond du tube. Le surnageant est alors filtré à travers une membrane à pores de 0,2 μ m. Par chromatographie sur colonne de *dessalage* PD10, la dGOx est transférée dans un tampon de 100 mM d'acétate de sodium à pH 4,5.

Cette solution est alors introduite dans une colonne échangeuse d'anions (Hi Trap SP FF, 1 mL) pré-équilibrée avec le même tampon. La dGOx est alors éluée à un débit de 1 mL.min⁻¹, avec un gradient linéaire de 0 M à 1 M de NaCl dans 100 mM d'acétate de sodium à pH 4,5. L'éluion est continuellement suivie par les mesures d'absorbance aux longueurs d'onde caractéristiques de la protéine (280 nm) et du centre rédox FAD (452 nm). Les fractions éluées riches en dGOx sont alors rassemblées et concentrées par centrifugation-filtration (*cut off* de 10 kDa). La solution de dGOx est enfin dessalée et conservée dans un tampon de 30 mM phosphate de sodium, pH 5,1, à 4°C.

1.4. Caractérisation de la glucose oxydase déglycosylée

1.4.1. Masse moléculaire et diamètre hydrodynamique

Pour distinguer une perte de masse due à la déglycosylation, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) est effectuée pour des échantillons de GOx et de dGOx. Cette technique permet de discriminer des protéines selon leur masse moléculaire, une protéine plus lourde migrant plus lentement sous l'effet du champ électrique. Des marqueurs de masse moléculaire connue servent de référence. Les enzymes sont préalablement dénaturées par du dodécylsulfate de sodium (SDS). La masse moléculaire ainsi obtenue correspond à un seul monomère, sans son centre rédox FAD ($M_{\text{FAD}} = 0,66 \text{ kDa}$). Le gel obtenu, révélé au bleu de Coomassie, est présenté sur la Figure 1.

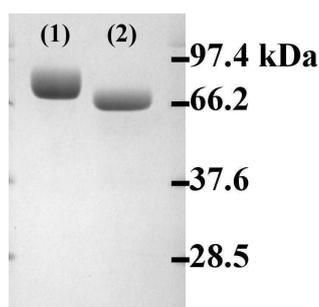


Figure 1. SDS-PAGE d'un échantillon de GOx purifiée (1) et de dGOx purifiée (2), coloré au bleu de Coomassie. Les valeurs à droite représentent l'emplacement des marqueurs de référence et leurs masses moléculaires respectives.

Tandis que la bande correspondant aux monomères de la GOx (1) est centrée autour de 80 kDa, la dGOx présente une bande à environ 66 kDa, confirmant une perte de masse suite au protocole de déglycosylation. Par ailleurs, l'unicité des bandes suggère une bonne pureté des échantillons. Enfin, il est à noter que la bande de la GOx est plus large, probablement du fait d'une distribution plus importante du degré de glycosylation initial.

La spectrométrie de masse (MALDI-TOF) a confirmé la perte de masse et a permis d'affiner les valeurs. La GOx, sous sa forme dimérique, présente une masse moléculaire de $158 \pm 12 \text{ kDa}$ quand celle de la dGOx est de $138 \pm 6 \text{ kDa}$. Il est intéressant de comparer la masse moléculaire moyenne de la dGOx avec la masse moléculaire calculée pour une GOx non glycosylée, soit 128 kDa (correspond à la masse moléculaire de deux séquences d'acides

aminés (63,3 kDa [45]) plus deux FAD [22]). La différence d'une dizaine de kDa pourrait s'expliquer par :

- 1) les *N*-Acetylglucosamines résiduelles liées aux asparagines, entre cinq ou six par monomère [26, 46], soit une contribution de $\sim 2,5$ kDa pour la dGOx dimérique ;
- 2) une déglycosylation seulement partielle de certains oligosaccharides (ce qui serait cohérent avec la distribution de masses moléculaires) ; notamment pour un oligosaccharide liant les deux monomères de la GOx, difficilement accessible pour les glycosidases [46].

Par ailleurs, des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont témoigné d'une diminution du diamètre hydrodynamique de l'enzyme à la suite de la déglycosylation. De 89 ± 4 Å pour la GOx, il décroît à 76 ± 3 Å pour la dGOx. Rappelons cependant que ces valeurs tiennent compte de la couche de solvation autour de la protéine. Elles dépendent donc partiellement de la nature biochimique (acide aminés ou polysaccharides) des éléments exposés à sa surface.

1.4.2. Conservation de l'activité enzymatique

Les concentrations molaires en protéines et FAD sont préalablement déterminées par spectrophotométrie UV-visible. Le rapport $[FAD]/[dGOx]$ est mesuré à $\sim 2,1$. Cette valeur confirme que les centres rédox n'ont pas quitté l'enzyme suite à la déglycosylation.

De la même manière que pour la GOx, l'activité de la dGOx est ensuite évaluée dans une solution de 100 mM de phosphate de sodium de pH 5,1 à 35 °C, par spectrophotométrie UV-visible. Cette mesure met en jeu une seconde oxydoréductase, la peroxydase de raifort (HRP, E.C. 1.11.1.7, Sigma-Aldrich). Son principe est résumé ci-dessous :



La dGOx oxyde le glucose (1), puis réduit l' O_2 en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (2). Ce dernier est alors réduit par l'HRP (3), qui oxyde finalement l'ABTS (4). Les concentrations en glucose (90 mM), O_2 (0,21 mM), HRP ($1,9 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) et ABTS (16 mM) sont en large excès, de

telle sorte que seule la vitesse de réaction entre la dGOx et le glucose détermine la vitesse initiale d'oxydation de l'ABTS. L'évolution initiale de l'absorbance à 420 nm, caractéristique de la forme oxydée de l'ABTS ($\epsilon_{420\text{nm}} = 36\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), est linéaire, et permet de déterminer l'activité molaire de la dGOx dans les conditions considérées.

L'activité molaire de la dGOx a été mesurée à $72 \pm 4\text{ U}\cdot\text{nmol}^{-1}$, valeur particulièrement proche de celle obtenue pour la GOx ($70 \pm 4\text{ U}\cdot\text{nmol}^{-1}$). La déglycosylation n'a donc pas dégradé l'activité enzymatique en solution. Ceci est conforme aux résultats antérieurement publiés. Ceux-ci ont parfois pu évoquer une stabilité amoindrie aux bas ou hauts pH suite à la déglycosylation, mais des structures, des activités et des stabilités similaires dans des conditions pseudo physiologiques [43, 44, 47-49]. Conservée à 4 °C, la dGOx conserve la même activité sur plusieurs semaines.

1.4.3. Charge apparente de surface

Certains acides aminés, qui forment la structure protéique de l'enzyme, présentent un résidu qui contient une fonction amine ou une fonction carboxylique. Selon le pH de la solution, ces fonctions peuvent être neutres ou chargées. Leurs pKa respectifs varient légèrement selon l'acide aminé considéré. Ainsi, autour du pH physiologique (pH $\sim 7,4$), une enzyme en solution présente toujours des charges positives et négatives localisées sur sa structure protéique. Pour un pH donné, les charges positives et négatives s'équilibrent et la charge globale peut être considérée comme nulle. Ce pH, caractéristique de l'enzyme, est son point isoélectrique (pI). Pour un pH inférieur au pI, l'enzyme présente une charge apparente de surface globalement positive. Au contraire, cette dernière est négative pour un pH supérieur au pI.

Les pI de la GOx et de la dGOx sont similaires, et d'environ 4,2 [44]. Ainsi, les deux enzymes présentent une charge globalement négative en milieu pseudo physiologique. Elle permet une bonne interaction électrostatique des enzymes avec les complexes rédox positifs de l'hydrogel [50] et doit donc probablement influencer la structure de ce dernier. Par ailleurs, une étude a montré qu'augmenter la charge positive des complexes rédox permettait d'accroître leur cinétique de transfert électronique avec les centres rédox de la GOx [51]. Les auteurs émettent l'hypothèse d'une meilleure interaction électrostatique entre les complexes plus chargés positivement et une zone localement chargée négativement, située près du site rédox de l'enzyme. Ils rappellent d'ailleurs que des médiateurs de charges négatives sont peu efficaces pour capter les électrons de la GOx .

Tout ceci met en relief l'importance que peut avoir la charge de surface de l'enzyme dans un hydrogel rédox. La GOx et la dGOx ont la même structure protéique et donc, a priori, la même quantité totale de charges pour un pH donné. Cependant, il est possible que la glycosylation puisse affecter la charge apparente de surface de l'enzyme par un effet d'écran [52]. Pour évaluer l'effet de la glycosylation sur la charge apparente de l'enzyme, une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions est réalisée pour la GOx puis pour la dGOx. L'enzyme purifiée (~ 0,5 mg) est diluée dans un tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 8,0. La solution est introduite dans la colonne (HiTrap Q FF, 1mL) préalablement équilibrée avec le même tampon. L'élution est alors effectuée à $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, avec un gradient linéaire de 0 M à 1 M de NaCl. Elle est suivie par la mesure de l'absorbance en sortie de colonne à 280 nm. Les deux chromatogrammes obtenus sont superposés sur la Figure 2.

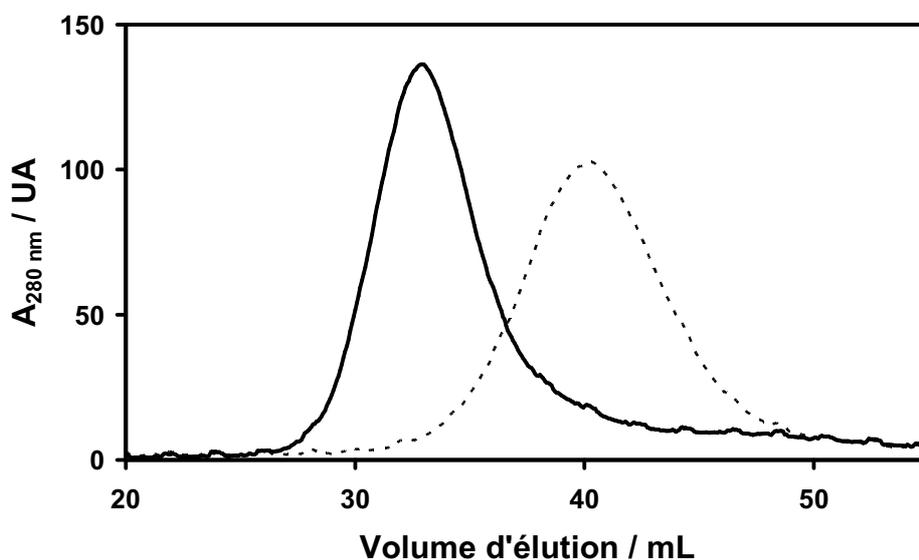


Figure 2. Chromatogrammes superposés de la GOx (ligne continue) et de la dGOx (ligne discontinue), réalisés dans les mêmes conditions à travers une colonne échangeuse d'anions, pH 8, gradient de 0 M à 1 M en NaCl, $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, absorbance mesurée à 280 nm.

Le fait que la dGOx (ligne discontinue) soit éluée pour des concentrations plus élevées en NaCl que la GOx (ligne continue) indique qu'elle présente un plus grand nombre de charges négatives en surface. Ainsi la glycosylation de la GOx induit bien un effet d'écran des charges de surface de la structure protéique.

Il est à noter que cette étude chromatographique ne donne qu'un résultat qualitatif. Pour quantifier les charges de surface des deux enzymes, des analyses de zétamétrie ont été

effectuées. Cependant, la quantité d'enzyme nécessaire à l'obtention de valeurs fiables dépassait la quantité disponible, et le bruit de fond était trop important pour légitimer la moindre mesure.

1.4.4. Tableau résumé

	GOx	dGOx
masse moléculaire	158 ± 12 kDa	138 ± 6 kDa
diamètre hydrodynamique	89 ± 4 Å	76 ± 4 Å
charge apparente de surface (pH 8)	négative -	négative - -
activité en solution (35 °C)	70 ± 4 U.nmol ⁻¹	72 ± 4 U.nmol ⁻¹

Tableau 1. Evolution des caractéristiques de l'enzyme suite à la déglycosylation.

2. REPONSES ELECTROCHIMIQUES DANS L'HYDROGEL REDOX

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Préparation des électrodes modifiées

Des électrodes tournantes (Pine Instrument) à disque de carbone vitreux (GC) de 5 mm de diamètre sont manuellement polies sur un feutre doux enduit de suspension d'alumine de 50 nm (Buehler, MicroPolish II). Elles sont ensuite soniquées pendant 5 min dans de l'eau ultra-pure, puis rincées. Les surfaces en GC sont alors traitées pendant 10 min dans un plasma d'O₂ basse pression afin de les rendre hydrophiles. En parallèle, les mélanges polymère rédox/enzymes sont préparés dans des microtubes. Le polymère rédox utilisé tout le long de cette étude est le poly(4-vinyl-pyridine-[Os(N,N'-diméthyl-2,2'-biimidazole)₃]^{2+/3+} (noté PVP-Os [- 0,17 V]). Dans cette première partie (2.2.), les comparaisons entre électrodes à base de GOx ou de dGOx sont réalisées avec des hydrogels dont la masse surfacique à sec (Γ_{tot}) est constante et fixée à 200 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Les solutions mères d'enzymes ou de polymère rédox sont de même concentration (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) afin de déposer le même volume total de mélange (4,7 μL) quelle que soit la composition massique de l'électrode modifiée. L'agent réticulant PEGDGE est ajouté au dernier moment, à partir d'une solution fraîchement préparée à 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, à raison de 5 %_m de l'hydrogel à sec. Le contenu est rapidement homogénéisé, puis le volume adéquat de mélange est déposé sur la surface en GC de l'électrode préalablement traitée au plasma. Le séchage est alors d'environ 18 h à température ambiante.

Il s'agit d'être particulièrement minutieux dans la préparation des électrodes. De fait, en plus de la composition finale de l'hydrogel, nous avons pu observer que des facteurs tels que, entre autres, le volume, la force ionique, le pH de la solution déposée, la température et l'humidité de la pièce ainsi que le temps de séchage, pouvaient influencer les réponses électrochimiques de l'électrode modifiée. Certaines de ces influences ont été qualitativement étudiées au début de cette thèse pour les électrodes à base de GOx (ou dGOx) immobilisée dans le polymère susmentionné. Elles ne seront pas décrites ici. L'auteur tient cependant à souligner que changer le type d'enzyme (GDH, BOD ou laccase) ou de polymère rédox peut très largement modifier l'impact de ces différents facteurs.

2.1.2. Cellule électrochimique

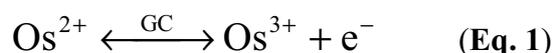
Les mesures électrochimiques sont réalisées avec un potentiostat (CH Instruments, modèles 660 C, 760 C ou 842 B) et une cellule à trois électrodes (50 mL ou 100 mL). La référence est une électrode Ag/AgCl (NaCl 3M) (BAS). Son potentiel varie légèrement avec la température (+ 205 mV vs. ENH à 25°C, + 196 mV vs. ENH à 37°C [53]). La contre électrode est une spirale de platine. La vitesse de rotation de l'électrode de travail est contrôlée. La température est maintenue constante par un système thermostaté. Sauf précision contraire, la cellule est désoxygénée par bullage d'argon pendant au moins 15 min. Le bullage est maintenu pendant la mesure en évitant qu'il puisse interagir sur la convection aux abords de l'électrode de travail.

2.2. Résultats préliminaires et choix d'une méthode comparative

2.2.1. Réponses électrochimiques en absence de glucose

a) Stabilité de l'hydrogel

La voltampérométrie cyclique (CV) en absence de glucose donne de précieuses informations sur la quantité de médiateurs rédox immobilisés, sur leur aptitude à conduire les électrons par auto-échange électronique dans l'hydrogel, ainsi que sur leur cinétique de réaction hétérogène sur l'électrode (Eq. 1).



Pour caractériser et comparer les électrodes modifiées, l'établissement préalable d'une bonne stabilité des réponses électrochimiques est requis. Des CV successifs mesurés à 20 mV.s⁻¹ et en absence de substrat sont donc systématiquement effectués avant toute caractérisation ultérieure. Une légère baisse des courants de pics initiaux est observée (~ 15 ± 5 % après le premier CV). Elle pourrait être due au départ d'une fraction de polymère mal réticulée, mais plus probablement à l'établissement d'un équilibre d'hydratation. A partir du troisième CV, une bonne stabilité est généralement atteinte pour les électrodes à base de PVP-Os [- 0,17 V].

La contrainte de cisaillement induite par une rotation de l'électrode peut décrocher une fraction de l'hydrogel rédox déposé et diminuer la réponse de l'électrode. A une distance donnée du centre du disque en GC, cette contrainte évolue avec la vitesse de rotation de l'électrode à la puissance $3/2$ [54]. La Figure 3 présente plusieurs CV d'une électrode modifiée à base de dGOx (28 %_m), PVP-Os [- 0,17 V] (57 %_m), et PEGDGE (15 %_m), pour un Γ_{tot} de $100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (cette unique composition est étudiée dans les §§ a. et b.). Ils ont été mesurés à $30 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, successivement, pour différentes conditions hydrodynamiques.

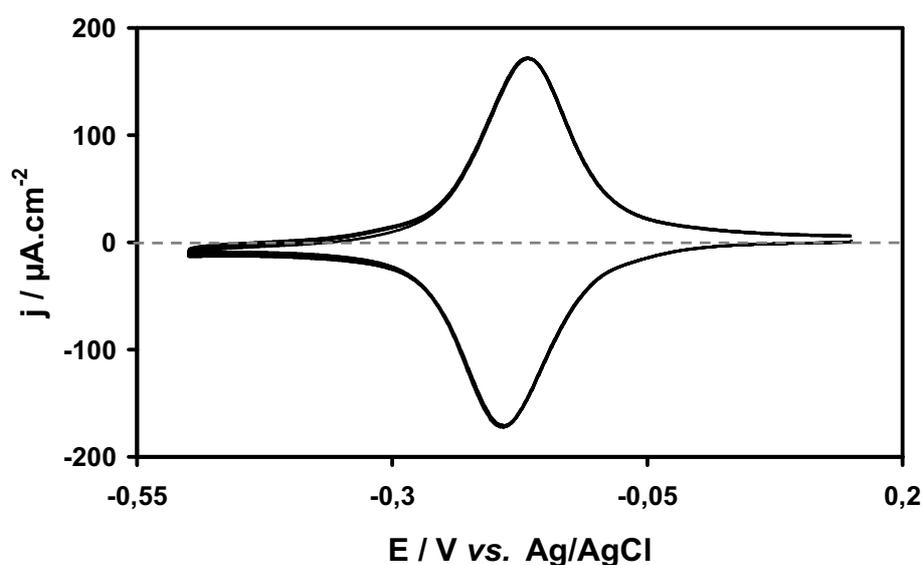


Figure 3. Invariance du CV de l'électrode modifiée avec la vitesse de rotation de l'électrode. Cinq CV superposés, obtenus successivement à 0 rpm, 1000 rpm, 2000 rpm, 3000 rpm et 4000 rpm. (composition : 57 %_m PVP-Os[- 0,17 V], 28 %_m dGOx, 15 %_m PEGDGE, $\Gamma_{\text{tot}} = 100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Tampon phosphate de sodium sous argon, pH 7,2, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $v_b = 30 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Les CV n'évoluent pas pour des vitesses de rotation atteignant 4000 rpm. On peut donc en conclure une bonne stabilité mécanique de l'hydrogel.

b) Caractère diffusionnel du transfert électronique dans l'hydrogel

La Figure 4 présente l'évolution du CV de l'électrode modifiée avec la vitesse de balayage en potentiel (v_b). En premier lieu, il est notable que le rapport entre les valeurs absolues des courants de pics anodiques et cathodiques est proche de 1, et cela quelle que soit v_b . Cela suggère que la réaction électrochimique est soit réversible, soit quasi-réversible [55]. Les potentiels de pics anodiques et cathodiques sont centrés autour du potentiel standard

apparent ($E^{\circ'}$) du complexe rédox immobilisé, soit $-0,175 \pm 0,005$ mV. Par ailleurs, accroître v_b modifie la forme du CV. En particulier, les densités des courants de pics (j_{pic}), ainsi que la différence de potentiels entre les pics anodiques et cathodiques (ΔE_p) augmentent avec v_b .

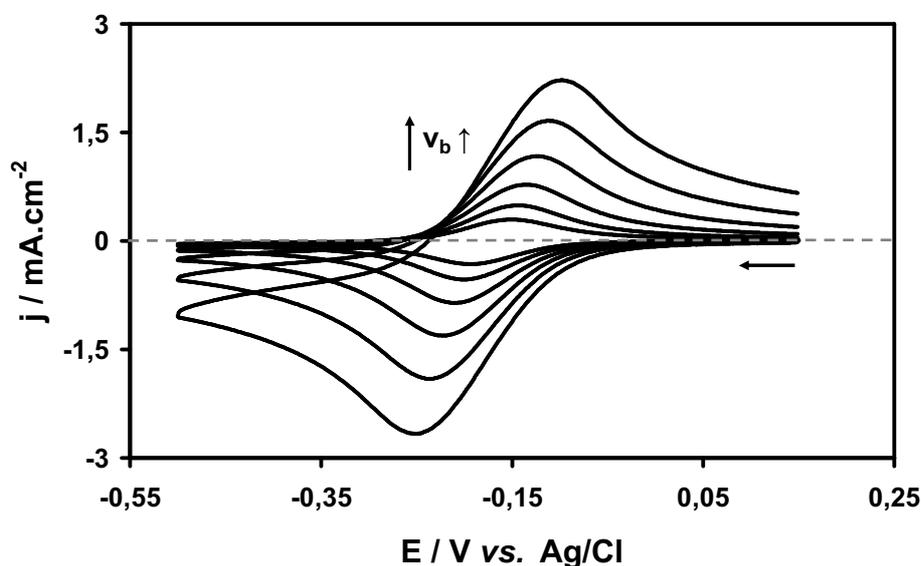


Figure 4. Evolution du CV de l'électrode modifiée avec la vitesse de balayage en potentiel. L'amplitude du CV croît avec v_b : 50 mV.s^{-1} , 100 mV.s^{-1} , 200 mV.s^{-1} , 400 mV.s^{-1} , 800 mV.s^{-1} et 1600 mV.s^{-1} . Tampon phosphate de sodium pH 7,2, 37°C , sous argon.

L'évolution des courants de pics avec v_b donne des informations sur les conditions aux limites du transport par diffusion de l'espèce électroactive à l'origine du signal, ici assimilée aux électrons. A l'échelle de la surface en GC, l'hydrogel rédox peut être considéré ou non comme un espace confiné. Il convient de garder à l'esprit que cette considération ne dépend pas seulement de l'épaisseur et des propriétés *intrinsèques* de l'hydrogel, mais aussi des conditions expérimentales (en particulier v_b).

Dans le cas où la grande majorité des complexes d'osmium de l'hydrogel sont d'abord réduits puis oxydés lors du CV, la diffusion des électrons est dite restreinte et de type *couche mince*. L'évolution des courants de pics est alors linéaire avec v_b . Par ailleurs, ΔE_p tend théoriquement vers 0 avec la baisse de v_b si la réaction électrochimique est réversible [56]. Le comportement est alors similaire à celui d'une espèce électroactive uniquement adsorbée sur l'électrode, où la concentration surfacique adsorbée serait égale à la concentration en complexe d'osmium projetée sur la surface de l'électrode. Dans le cas particulier de

l'électrode de la Figure 4, j_{pic} ne varie pas linéairement avec v_b . La diffusion n'est donc pas de type couche mince dans l'intervalle de v_b considéré.

Au contraire, s'il existe dans l'hydrogel un plan parallèle à l'électrode, suffisamment éloigné, tel que les concentrations locales en complexes réduits et oxydés n'évoluent pas durant le CV, alors la diffusion des électrons est dite semi-infinie. En d'autres mots, l'épaisseur de la couche de diffusion en électrons n'atteint jamais l'épaisseur de l'hydrogel rédox durant l'acquisition du CV. Dans ce cas, l'évolution de j_{pic} est linéaire avec la racine carrée de v_b . Dans le cas où la réaction électrochimique est réversible, elle suit l'équation de Randles-Ševčík [57, 58] :

$$|j_{pic}| = 0,446F[Os]\sqrt{\frac{v_b FD_e}{RT}} \quad (\text{Eq. 2})$$

où pour j en $A.cm^{-2}$, F est la constante de Faraday ($96\,485\text{ C.mol}^{-1}$), $[Os]$ la concentration en osmium dans l'hydrogel (mol.cm^{-3}), v_b la vitesse de balayage ($V.s^{-1}$), D_e le coefficient de diffusion apparent des électrons ($\text{cm}^2.s^{-1}$), R la constante des gaz parfaits ($8,314\text{ J.mol}^{-1}.K^{-1}$) et T la température (K).

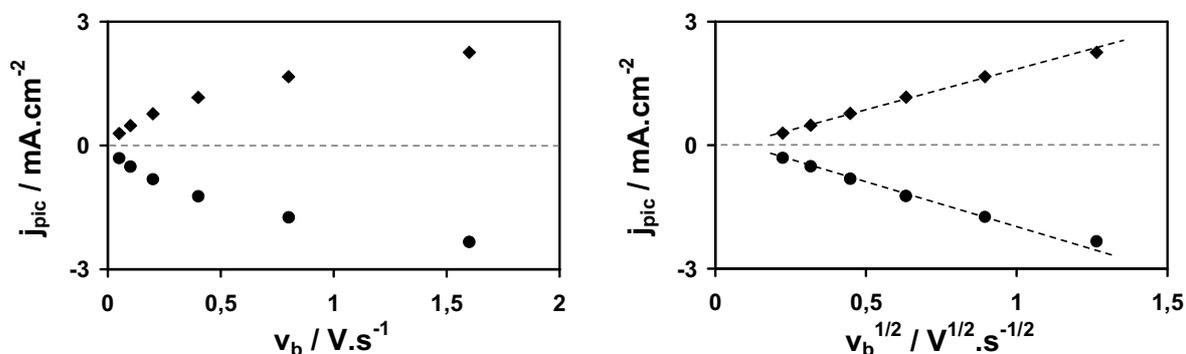


Figure 5. (Gauche) Evolution des densités de courant de pics anodiques et cathodiques avec la vitesse de balayage. (Droite) Avec la racine carrée de la vitesse de balayage. Valeurs de j_{pic} de la Figure 4.

L'évolution des j_{pic} avec $v_b^{1/2}$ est présentée sur la Figure 5 (Droite). Si elle semble bien linéaire, il convient de remarquer que les extrapolations des droites ne coupent pas l'origine. Il est possible que pour les v_b les plus lentes, la diffusion ne soit plus formellement semi-infinie. De fait, 50 mV.s^{-1} semble être une v_b de transition dans le type de diffusion pour cette électrode :

- la quantité de complexes d'osmium successivement réduits puis oxydés, lors du CV à 50 mV.s^{-1} , est d'environ 50 % de la quantité totale en complexes déposés* ;
- pour des v_b inférieures à 20 mV.s^{-1} , les j_{pic} varient linéairement avec v_b . La diffusion devient alors de type couche mince. Cette transition dans le comportement diffusionnel de l'électron dans l'hydrogel rédox a déjà été observée [59]. Elle intervient pour des v_b d'autant plus faibles que l'hydrogel est plus épais [60] ;
- le ΔE_p , à 50 mV.s^{-1} n'est que de 45 mV. Or, dans le cas d'une diffusion semi-infinie où un seul électron est échangé entre l'espèce rédox et l'électrode, le ΔE_p ne peut théoriquement être que supérieur ou égal à 59 mV (à 37°C), et cela quelle que soit la cinétique de transfert électronique hétérogène [55].

Il est d'ailleurs notable que le ΔE_p des CV est croissant avec v_b . En plus de l'introduction de l'effet *couche mince* aux plus faibles v_b , cette évolution pourrait aussi être due à une contribution de chute ohmique dans la cellule [56, 58] ainsi qu'au fait que la réaction électrochimique ne soit pas réversible, mais quasi réversible [55, 61].

Même si la réaction n'est pas tout à fait réversible ni la diffusion semi-infinie, l'équation de Randles-Ševčík (Eq. 2) permet d'obtenir une approximation du produit $[\text{Os}]D_e^{1/2}$. Il est ici de $7,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1/2}$.

Note : il est difficile de discriminer $D_e^{1/2}$ de $[\text{Os}]$. En effet, l'épaisseur de l'hydrogel, menant à $[\text{Os}]$, est difficilement mesurable dans son état hydraté, et les mesures sont peu répétables [58, 62, 63]. De plus, cette épaisseur peut être largement dépendante de la nature et de la proportion de ses différents constituants [58, 62, 64, 65], de son degré de réticulation [63, 66], de l'état d'oxydation de ses complexes [67] et de son environnement (pH, T, force ionique, etc.) [50, 68-71]. Une fois l'hydrogel hydraté, des augmentations de volume d'un facteur 1,1 à ~ 500 par rapport aux volumes à sec ont été reportées [58, 62, 65, 72]. Ajoutons qu'une estimation précise des volumes hydratés, selon leurs compositions, aurait probablement permis une *simplification* (et une confirmation !) des raisonnements à venir. En particulier, l'obtention des valeurs de $[\text{Os}]$, $[\text{GOx}]$ et D_e aurait sans doute permis d'intéressantes comparaisons avec des modèles théoriques développés par Bartlett et Pratt [73] ou Andrieux *et al.* [74], pour ne citer qu'eux.

* Ces mesures sont réalisées par intégrations des pics des CV. La quantité totale d'osmium immobilisée est obtenue à une très faible v_b (1 mV.s^{-1}), où elle est intégralement réduite puis oxydée durant le CV.

Pour vérifier le caractère diffusionnel du transfert d'électron et la légitimité de la valeur obtenue, il est aussi possible de réaliser une chronoampérométrie avec saut de potentiel. Le potentiel initial est fixé afin que l'intégralité des complexes soit réduite (ou oxydée) dans l'hydrogel. Le potentiel final est choisi de telle sorte que l'oxydation (ou la réduction) n'est limitée que par la diffusion des électrons. L'évolution du courant faradique transitoire reflète alors l'appauvrissement interfacial en Os^{2+} (ou Os^{3+}). Si la réaction est réversible et la diffusion semi-infinie, la densité de courant transitoire est décrite par l'équation de Cottrell :

$$|j_{(t)}| = F[\text{Os}] \sqrt{\frac{D_e}{\pi t}} \quad (\text{Eq. 3})$$

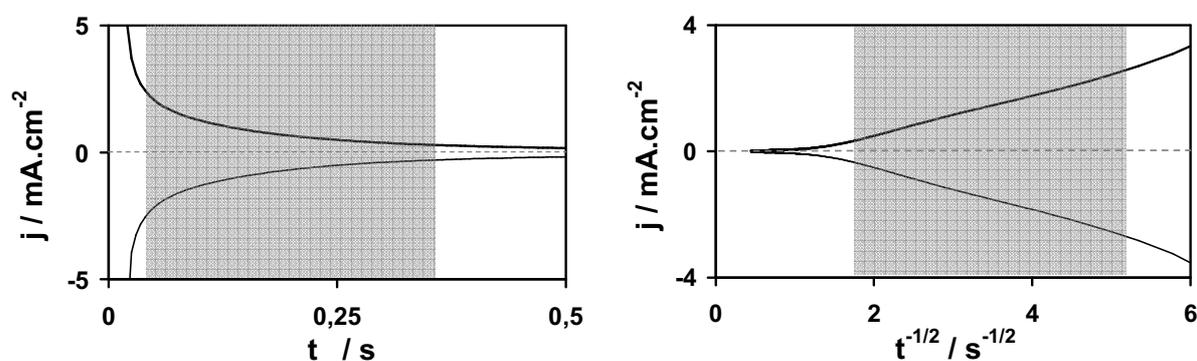


Figure 6. (Gauche) Chronoampérogrammes (superposés) de l'électrode modifiée suite à un saut de potentiel. $E_{\text{initial}} = -0,5 \text{ V}$, $E_{\text{final}} = +0,1 \text{ V}$ (saut inverse pour le courant de réduction). **(Droite)** Variations de $j = f(t^{-1/2})$. La zone grisée représente la zone de mesure de $[\text{Os}]D_e^{1/2}$. Tampon phosphate de sodium pH 7,2, 37 °C, sous argon.

La Figure 6 (Gauche) présente les chronoampérogrammes de l'électrode modifiée pour un saut de potentiel anodique (+ 0,1 V) ou cathodique (- 0,5 V). La figure de droite correspond aux variations de j avec $t^{-1/2}$. Ces dernières affichent une linéarité dans un intervalle de 40 ms à 330 ms (zones grisées). Aux temps plus courts, le courant possède une contribution capacitive non négligeable [75]. Aux temps plus longs, la majorité des complexes sont arrivés à leur état d'équilibre (oxydé ou réduit) et le courant tend rapidement vers zéro. D'ailleurs l'extrapolation des « droites diffusionnelles » ne passe pas par l'origine, ce qui suggère que la diffusion, dans un délai très court, n'est plus formellement semi-infinie. Nous pensons cependant que l'utilisation de l'équation de Cottrell est tolérable pour obtenir

une valeur approximative de $[\text{Os}]\text{De}^{1/2}$. Cette dernière est de $12 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1/2}$, du même ordre de grandeur que la valeur obtenue avec l'équation de Randles-Ševčík ($7,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1/2}$). Cette valeur est comparable avec celles obtenues par Gallaway et Barton, oscillant entre $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1/2}$ et $2,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1/2}$, pour une dizaine d'électrodes modifiées avec différents polymères rédox, 32 %_m de laccase, et 7 %_m de PEGDGE [58, 76].

c) Effet de la proportion d'enzyme

Pour étudier l'effet de la quantité d'enzyme sur la diffusion des électrons dans l'hydrogel, des électrodes modifiées avec une proportion de dGOx croissante ont été préparées, avec des Γ_{tot} constants à $200 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, dont 5 %_m de PEGDGE. La Figure 7 présente la variation des courants de pics anodiques et cathodiques des électrodes selon le pourcentage massique de dGOx dans l'hydrogel. Pour des Γ_{tot} à $200 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ et une v_b de $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, le caractère diffusionnel peut largement être considéré comme (quasi) semi-infini. Les courants de pics diminuent de manière régulière avec la fraction de dGOx dans l'hydrogel. Au contraire, d'autres études ont fait part d'une décroissance très rapide de D_e quand la fraction d'enzyme augmente dans l'hydrogel [77], par exemple, dès 20 %_m [59]*. Une raison avancée est la précipitation, lors du mélange avant dépôt, entre le polymère rédox (polycation) et la GOx (polyanion aux pH considérés) quand cette dernière est introduite en trop forte proportion [78-83]. De fait, et préalablement à la présente étude, une précipitation croissante (observée à l'œil) apparaissait lors des mélanges pour former des hydrogels contenant plus de 35 %_m de GOx. Nous avons alors remarqué qu'une concentration plus forte de la solution mère en GOx associée à une force ionique plus importante amplifiaient la précipitation et donc la baisse des propriétés électrochimiques. Au final, travailler avec des solutions mères de GOx de concentration plus faible ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), et dont la concentration en phosphate de sodium est inférieure à 5 mM (au lieu de 100 mM à l'origine) a permis d'éviter la précipitation apparente pour toutes les compositions étudiées (pour des hydrogels jusqu'à 80 %_m de dGOx).

* Notons cependant que cette dernière référence étudie des hydrogels immobilisant la tyrosinase et non la GOx.

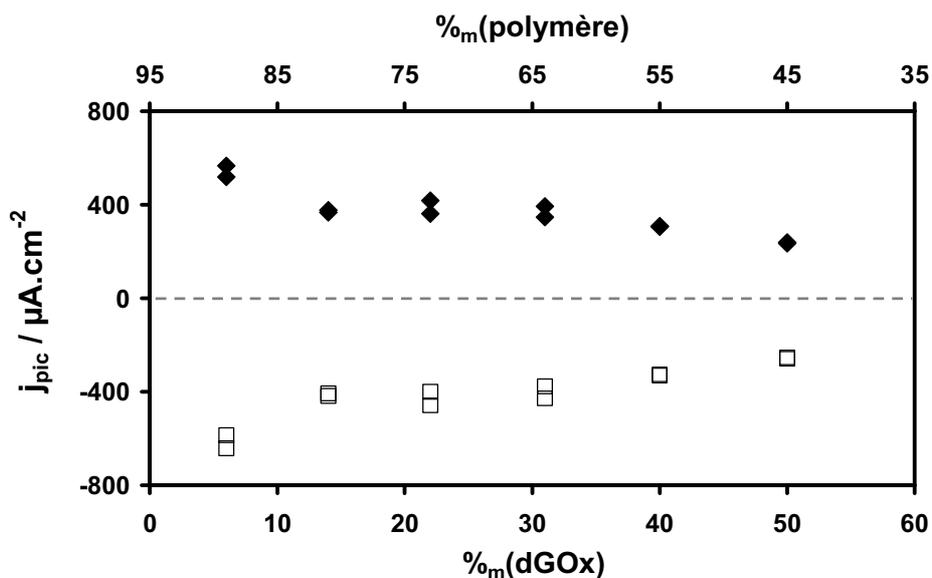


Figure 7. Densités de courants de pics anodiques (losanges pleins) et cathodiques (carrés vides) pour des électrodes modifiées avec différentes fractions massiques de dGOx. $\Gamma_{tot} = 200 \mu g \cdot cm^{-2}$ (dont 5 %_m de PEGDGE). Tampon phosphate de sodium pH 7,2, 37 °C, sous argon, 100 mV.s⁻¹.

Par ailleurs, les ΔE_p des CV étaient quasi invariants avec la proportion d'enzyme (de 65 mV à 73 mV pour les 12 CV, sans tendance particulière)* et les rapports $|j_{pa}/j_{pc}|$ toujours très proches de 1. Ainsi, la présence de l'enzyme ne semble pas contrarier le transfert électronique hétérogène entre les complexes d'osmium et l'électrode. Théoriquement et selon l'équation de Randles-Ševčík (Eq. 2), les densités de courants de pics sont alors uniquement tributaires de [Os] et D_e . Blanch et Savéant ont développé un modèle prédictif de la valeur de D_e d'un hydrogel rédox dans le cas où le déplacement des centres rédox est suffisamment rapide et étendu [84, 85] :

$$D_e = \frac{1}{6} k_{ex} (\delta^2 + 3\lambda^2) [Os] \quad (\text{Eq. 4})$$

Où k_{ex} est la constante de vitesse d'auto échange électronique entre un complexe réduit et un complexe oxydé ($mol^{-1} \cdot cm^3 \cdot s^{-1}$) ; δ la distance caractéristique du saut d'électron (cm), et λ l'amplitude de mouvement du complexe greffé au polymère (cm). Il est notable que cette

* Alors que l'augmentation du ΔE_p a été observée dans le cas d'une précipitation aux forts %_m d'enzyme [79, 81].

diffusion est dépendante de [Os], dans la mesure où la distance moyenne entre deux sites rédox diminue avec [Os], amplifiant la probabilité des sauts d'électrons.

Si l'équation 5 n'est pas toujours vérifiée en pratique [82], Gallaway et Barton ont expérimentalement déterminé une relation quasi linéaire entre D_e et [Os] pour sept hydrogels rédox. Les polymères avaient la même chaîne (PVI) mais se différençaient par la nature et la concentration de leur complexe d'osmium [58]. Ces résultats suggèrent que modifier légèrement la nature du complexe* n'influence que peu les valeurs de k_{ex} , δ , et λ . Dans la présente étude seul le PVP-Os [- 0,17 V] est utilisé. Les valeurs de k_{ex} et δ doivent être intrinsèques à ce dernier et donc constantes quelle que soit la modification de l'électrode. S'il est possible que λ varie légèrement avec le type d'enzyme et la concentration de cette dernière dans l'hydrogel, il est probable que λ évolue aussi avec le degré de réticulation, dans la mesure où la flexibilité de l'hydrogel doit contribuer à la mobilité des complexes. Même en utilisant une quantité constante d'agent réticulant pour chaque électrode modifiée (ici 5 %_m de PEGDGE), il est difficile d'émettre des hypothèses précises sur le degré de réticulation, le nombre de sites disponibles pour cette dernière variant selon le ratio enzyme/polymère dans l'hydrogel. Dans la présente étude, nous supposons que λ varie peu avec la composition de l'hydrogel (pour un %_m en PEGDGE constant), et que D_e est largement dépendant de [Os].

Avec ces hypothèses, on peut déduire des équations 2 (Randles- Ševčík) et 4 (Blanch et Savéant) que les j_{pic} des CV des électrodes modifiées sont majoritairement dépendantes de [Os]. Cela est cohérent avec les résultats de la Figure 7, où la décroissance des j_{pic} avec le %_{m(dGOx)} reflète le fait qu'une proportion d'enzyme plus importante diminue très probablement la concentration volumique en médiateur rédox. Gallaway et Barton avait déjà proposés un effet de « dilution » des complexes suite à l'ajout de laccase dans l'hydrogel [58]. De même, Koide et Yokoyama ont observé un accroissement de $D_e[\text{médiateur}]^{1/2}$ avec la proportion de polymère rédox immobilisé à quantité de GOx constante [60].

2.2.2. Courant catalytique en présence de glucose

a) Courbes de polarisation d'électrodes modifiées à base de GOx ou de dGOx

Des électrodes sont préparées pour évaluer l'efficacité catalytique de la dGOx immobilisée dans l'hydrogel rédox, et la comparer à celle de la GOx native. La composition

* Les sept complexes d'osmium avaient pour ligands soit un terpyridine, soit un chloro, puis un ou deux bipyridines pouvant posséder différentes fonctions.

est de 48 %_m de dGOx (ou GOx), 47 %_m de polymère rédox et 5 %_m d'agent réticulant pour des Γ_{tot} de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. La Figure 8 présente les CV obtenus à faible v_b (5 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) pour les deux électrodes, dans une solution à 50 mM de glucose. Les courants d'oxydation lors des balayages aller et retour sont presque confondus et les réponses transitoires du polymère rédox n'apparaissent plus, en particulier le pic de réduction. Il est donc possible de considérer ces CV comme des courbes de polarisation d'oxydation catalytique du glucose.

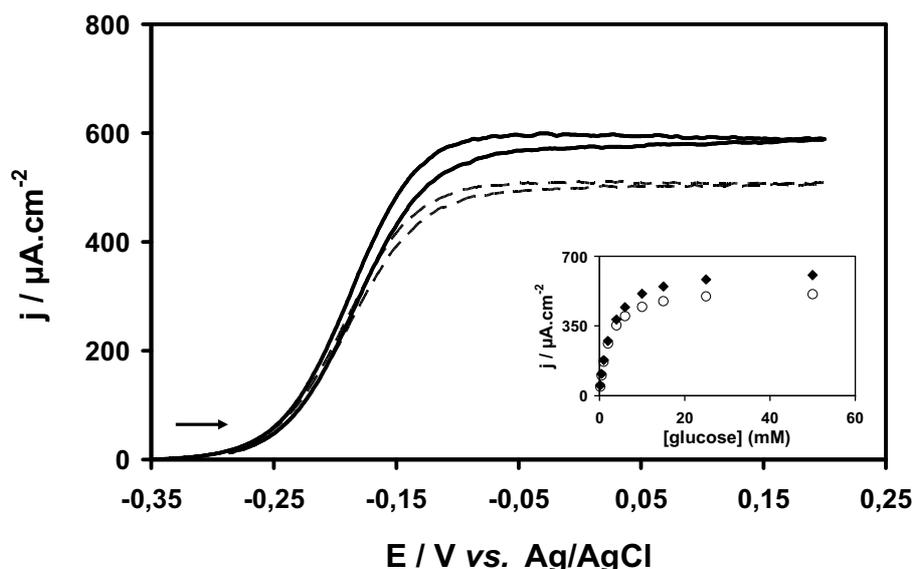


Figure 8. Courbe de polarisation d'une électrode modifiée à base de dGOx (trait continu) ou à base de GOx (trait discontinu). Composition : 47 %_m enzyme, 48 %_m PVP-Os [- 0,17 V], 5 %_m PEGDGE, $\Gamma_{\text{tot}} = 200 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Sous argon, 50 mM de glucose, 37°C, tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,2, 5 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, 1500 rpm. **En insert :** courbes de calibration des deux électrodes correspondantes, obtenues par chronoampérométrie à + 0,1 V dans les mêmes conditions.

L'oxydation catalytique du glucose commence au même potentiel pour les deux électrodes, à $\sim -0,3$ V. Cela pourrait suggérer l'égalité de la constante de Michaëlis par rapport au médiateur rédox pour les deux enzymes [86]. Dans les deux cas, un courant de plateau est atteint pour un potentiel d'électrode de 0 V. Le courant de plateau de l'électrode modifiée à base de dGOx est plus élevé (595 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) que celui de l'électrode modifiée avec la GOx (505 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$). Les facteurs pouvant être à l'origine de ces courants de plateaux, et donc de leur différence, seront discutés dans la partie c) de ce chapitre. Il est aussi notable que les deux potentiels de demi-vague $E_{1/2}$ sont égaux à $-0,185 \pm 0,005$ V, valeur très proche du E° du complexe d'osmium. Enfin, les courbes de calibration du glucose, mesurées par

chronoampérométrie à + 0,1 V (plateau), sont présentées en insert de la Figure 8. Elles sont similaires avec des courants légèrement supérieurs quand la dGOx modifie l'électrode plutôt que la GOx. Les concentrations telles que les courants soient égaux à la moitié de leur valeur à saturation (K'_m), sont analogues et égales à environ 2,5 mM. A partir de 50 mM de glucose, ajouter de ce dernier ou augmenter la vitesse de rotation au-delà de 1500 rpm ne fait plus varier le courant. Le système est à saturation*. Afin de simplifier les comparaisons à venir, les mesures de courants seront toutes réalisées à saturation. Ainsi les courants de plateaux ne pourront être influencés par le transport du glucose jusqu'à et à travers l'hydrogel.

b) Courants de plateaux à saturation selon la composition de l'hydrogel

Modifier la nature ou la pureté [8] de l'enzyme immobilisée peut faire varier la composition massique optimale (relativement au courant de plateau) de l'hydrogel**. En particulier, l'utilisation d'une enzyme de plus faible masse moléculaire et d'activité analogue pourrait permettre de diminuer le pourcentage massique optimal en enzyme, car une plus grande quantité de biocatalyseur est alors immobilisée pour un %m donné [79]. La Figure 9 présente la variation des courants de plateaux à saturation selon la composition massique des hydrogels à base de GOx (ronds vides), ou de dGOx (losanges pleins).

L'évolution du courant avec la composition de l'hydrogel présente un comportement classique plusieurs fois observé dans la littérature, que ce soit avec la GOx [68, 78, 80-82, 87-89] ou d'autres oxydoréductases [79, 80, 87, 90]. Le courant augmente d'abord avec la proportion d'enzyme avant de diminuer. Cette baisse est généralement attribuée à la possible précipitation entre l'enzyme et le polymère lors de la préparation de l'électrode ainsi qu'au déclin des propriétés de diffusion électronique dans l'hydrogel (cf. Figure 7) [79, 81, 82]. Nous pensons qu'un troisième facteur peut aussi être envisagé étant donné qu'une baisse de la concentration en complexe influe non seulement sur la diffusion des électrons (D_e), mais aussi sur le nombre de sites disponibles pour capter les électrons de l'enzyme.

* Toutes les électrodes testées dans ce Chapitre II étaient à saturation à 50 mM de glucose, sous argon. Remarquons toutefois que ce n'est plus forcément le cas quand l'O₂ dissous est présent en solution du fait, entre autre, de la compétition de l'O₂ pour les électrons de la GOx [78].

** Notons que cette composition optimale peut aussi varier avec la masse surfacique déposée, le degré de réticulation, le protocole de préparation des électrodes modifiées, etc. L'objectif de cette remarque est de rappeler que l'évolution des réponses des électrodes modifiées en fonction d'un *seul* paramètre variable est aussi largement dépendante du choix des paramètres *fixés* dans le cadre de l'étude. Il convient donc d'être toujours prudent quant aux conclusions que l'on peut tirer d'une série de résultats. **L'auteur insiste particulièrement sur cette remarque** et seule la crainte d'être redondant le retient de la rappeler à chaque page de ce manuscrit.

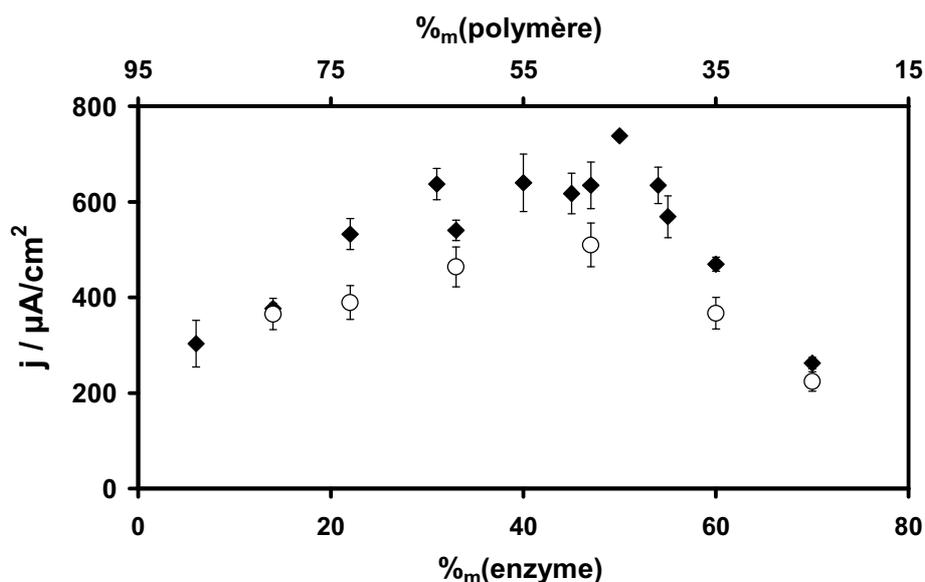


Figure 9. Evolution de la densité de courant de plateau avec la composition massique des hydrogels à base de GOx (ronds vides) et de dGOx (losanges pleins). 5 $\%_m$ de PEGDGE, $\Gamma_{\text{tot}} = 200 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, mesure sous argon, 50 mM de glucose, 37°C, tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 7,2, 1500 rpm, à + 0,1 V.

Il est difficile de distinguer clairement une composition optimale, qu'il est cependant possible de deviner à $45 \pm 10 \%$ d'enzyme dans les deux cas. Par contre, les courants délivrés par les électrodes à base de dGOx sont toujours supérieurs, en moyenne, à ceux obtenus quand la GOx est utilisée. En toute première approximation, cela pourrait suggérer l'amélioration du transfert électronique entre l'enzyme et le médiateur du fait de la déglycosylation. Toutefois et avant toutes conclusions hâtives, il convient d'engager une réflexion sur les différents phénomènes à même d'influencer ces valeurs de courants de plateaux.

c) Facteurs pouvant influencer le courant de plateau à saturation

Rappelons sommairement les différentes étapes intervenant lors de l'électrocatalyse du glucose :

- 1) transport du glucose par diffusion-convection jusqu'à et à travers l'hydrogel ;
- 2) catalyse enzymatique de l'oxydation du glucose par la GOx* ;

* La réaction enzymatique est considérée comme irréversible : une éventuelle interaction du gluconolactone, d'ailleurs rapidement évacué par diffusion convection, sera négligée.

- 3) transfert électronique entre la forme réduite de la GOx et la forme oxydée du complexe d'osmium ;
- 4) transfert de l'électron à travers l'hydrogel jusqu'à la surface de l'électrode par auto-échanges électroniques entre formes oxydées et réduites du complexe d'osmium ;
- 5) transfert électronique hétérogène à la surface de l'électrode.

Lorsqu'un courant stationnaire est établi sous argon, la vitesse de chacune de ces étapes, rapportée au nombre d'électrons mis en jeu, est identique*. Le courant stationnaire est alors limité par la cinétique d'une ou plusieurs d'entre elles (étape(s) cinétiquement déterminante(s)) [73, 91, 92]. L'objectif primaire de cette étude étant de mesurer un éventuel effet de la déglycosylation sur le transfert électronique intervenant entre l'enzyme immobilisée et les complexes d'osmium, il faut s'assurer que la cinétique de cette étape intervient effectivement dans la valeur du courant obtenue. Il est possible de s'affranchir des limitations cinétiques des étapes 1 et 5 en étudiant les courants catalytiques à saturation en glucose (pour l'étape 1) et au plateau de la courbe de polarisation (pour l'étape 5).

En ce qui concerne la catalyse enzymatique, plusieurs faits mettent en évidence que sa cinétique n'intervient pas significativement dans la valeur des courants de plateaux à saturation en glucose $I_{pl/sat}$:

- quel que soit leur composition, le K'_m des électrodes pour le glucose était compris entre 1,2 mM et 5 mM (sous argon). Or le K_m pour le glucose de la GOx extraite d'*Aspergillus niger* a été mesuré entre 11,0 mM et 41,8 mM [93]. Un K'_m d'électrode inférieur au K_m de l'enzyme peut suggérer que le courant à saturation n'est pas limité par la cinétique de l'enzyme par rapport au glucose [91].
- Il est possible de calculer la densité de courant à saturation que pourrait délivrer une électrode modifiée à base de GOx où la catalyse enzymatique du glucose serait le seul phénomène limitant, en assumant une activité enzymatique identique à celle mesurée en solution ($\sim 70 \text{ U.nmol}^{-1}$). Cette valeur serait de 14 mA.cm^{-2} à 5 %_m de GOx, ou 134 mA.cm^{-2} à 47 %_m (pour un dépôt à $200 \text{ }\mu\text{g.cm}^{-2}$). Cependant, le bien fondé de l'argument est limité dans la mesure où l'activité de la GOx peut varier à la suite de son immobilisation [42, 91]. Il met toutefois en relief la différence de deux ordres de grandeur entre les valeurs ainsi calculées et les courants expérimentaux de la Figure 9.

* Le phénomène 1 pouvant être décrit par une densité de flux de glucose, et chaque molécule de glucose correspondant à deux électrons.

- L'O₂ étant le médiateur naturel de la GOx, il réoxyde cette dernière, qui est alors disponible pour réagir avec le glucose. Dans le § 3.4.2.d du chapitre III, une étude sur une électrode à 30 %_m en GOx met en évidence que la vitesse de consommation du glucose à saturation augmente d'environ un ordre de grandeur quand l'O₂ est dissous en solution (p_{O2} = 1 atm). De plus, cette vitesse est elle-même limitée par la diffusion-convection de l'O₂.
- Un courant strictement limité par la cinétique de l'enzyme avec le glucose devrait induire une évolution linéaire de I_{pl/sat} avec la quantité d'enzyme immobilisée, c.-à-d. un courant identique par enzyme, quel que soit la composition de l'hydrogel :

$$I_{enz} = \frac{I_{pl/sat}}{n_{enz}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Où I_{pl/sat} est le courant de plateau à saturation en glucose (μA), et n_{enz} la quantité d'enzyme immobilisée (pmol). La Figure 10 présente l'évolution de I_{enz} avec la composition de l'hydrogel pour les électrodes à base de GOx de la Figure 9.

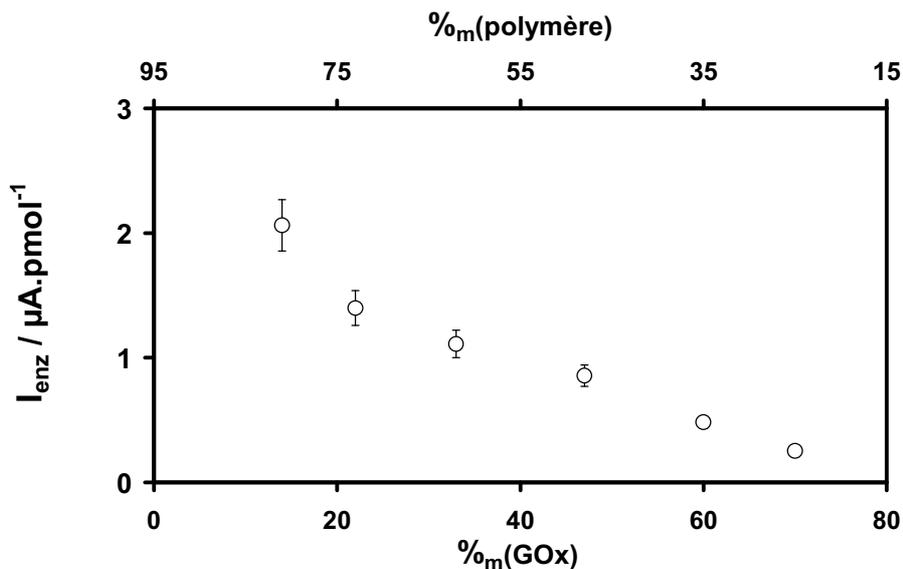


Figure 10. Evolution de I_{enz} avec la composition de l'électrode, à saturation en glucose (50 mM), sous argon. Calculés à partir des courants de la Figure 9.

I_{enz} décroît rapidement avec la proportion d'enzyme immobilisée, confirmant que la cinétique enzymatique envers le glucose n'est pas limitante pour la valeur de I_{pl/sat}.

Ainsi, les phénomènes qui peuvent gouverner la valeur de I_{pl/sat} sont soit le transfert électronique entre l'enzyme et le médiateur, soit une contribution à la fois du transfert

électronique et de la diffusion des électrons dans l'hydrogel (Andrieux *et al.* parleraient d'une *compensation mutuelle* [74])^{*}. Il serait hasardeux d'affirmer dès maintenant lequel des deux contribue majoritairement à la diminution de I_{enz} avec la proportion d'enzyme dans l'hydrogel. De fait :

- nous avons vu qu'accroître la proportion d'enzyme diminuait les propriétés de diffusion des électrons dans l'hydrogel par un effet de « dilution » des complexes (cf. § 2.2.1c).
- cette diminution de [Os] avec la proportion d'enzyme implique nécessairement une baisse de la vitesse maximale d'échange électronique^{**} entre une GOx et son proche environnement, moins riche en complexes susceptibles d'accepter ses électrons. Cet effet pourrait aussi largement contribuer la baisse des courant selon le %_m d'enzyme observée dans la Figure 9.

d) Comparaison selon la quantité molaire d'enzyme immobilisée

Antérieurement, des caractérisations d'électrodes modifiées à base d'hydrogel rédox mettant en jeu des enzymes de masses moléculaires différentes ont pu être effectuées [79, 86, 88, 96]. Les comparaisons étaient faites relativement à des proportions massiques d'enzymes et de polymères, pour des dépôts surfaciques à sec généralement constants. Dans le cadre de la présente étude, nous cherchons à confronter l'efficacité de deux enzymes à transférer leurs électrons à un réseau de médiateurs. Réflexion faite, il semble donc plus judicieux de comparer la réponse d'électrodes modifiées avec la GOx ou la dGOx pour une quantité molaire d'enzyme constante. Par exemple, la Figure 11 reprend les résultats de la Figure 9 (étude *massique*) en comparant cette fois les électrodes selon la quantité molaire d'enzyme immobilisée.

* Par analogie, les deux cas en question se rapprocheraient respectivement du cas I (*thin film mediator limited kinetics*) et II (*thick film mediator limited kinetics*) prédits par la théorie de Bartlett et Pratt [73, 91].

L'auteur du présent manuscrit profite de cette note pour inciter toute personne concernée par l'hydrogel rédox (il pense à un éventuel futur thésard en quête de livres de chevet et qui consulterait fortuitement ces lignes) à parcourir les travaux susmentionnés ainsi que ceux d'autres autorités [74, 94, 95]. Ils permettent notamment de mieux cerner la substance de la (bio)catalyse dans les hydrogels rédox.

** Celle-ci est dépendante de la concentration et de la mobilité des complexes dans un hydrogel donné. Il convient de bien la distinguer de la cinétique *intrinsèque* d'échange électronique, uniquement caractéristique de la nature de l'enzyme et du médiateur rédox une fois *immobilisés*. Rappelons que l'objectif primaire de la présente étude est d'évaluer une éventuelle amplification de cette cinétique *intrinsèque* grâce à la déglycosylation.

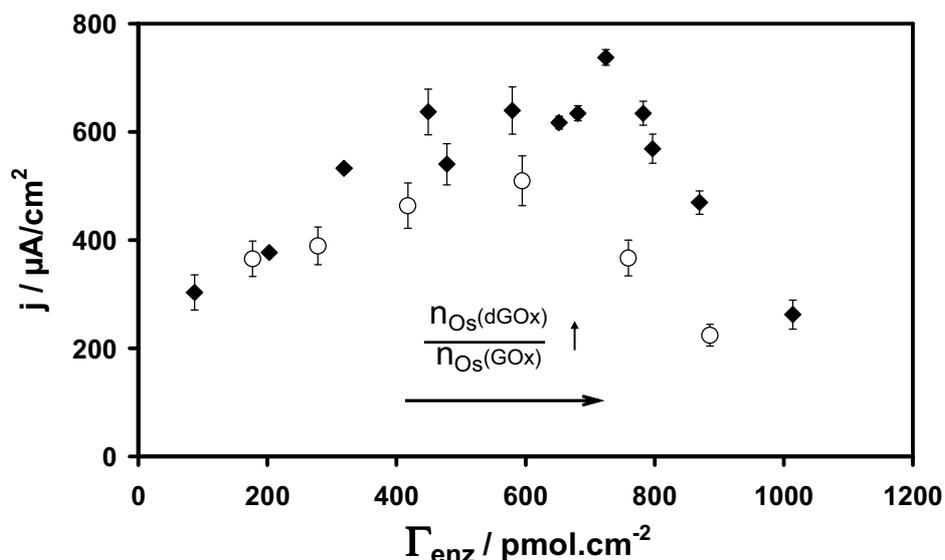


Figure 11. Evolution de la densité de courant de plateau avec la quantité molaire de GOx (ronds vides) ou de dGOx (losanges pleins) immobilisée. Valeurs de courant reprises de la Figure 9. Avec Γ_{tot} constant ($200 \mu\text{g.cm}^{-2}$), la quantité de médiateur immobilisée est alors plus importante à une abscisse donnée si la dGOx est utilisée plutôt que la GOx. Cette différence s'accroît selon l'axe des abscisses.

A première vue, une tendance plus nette semble se profiler : la différence relative entre les courants obtenus avec la dGOx par rapport à la GOx augmente avec la quantité d'enzyme immobilisée. Cependant, cette comparaison entre des Γ_{tot} constants ne peut pas être considérée comme satisfaisante. En effet, pour une abscisse donnée, la quantité de médiateur immobilisée est alors plus importante pour une électrode à base de dGOx en raison de sa moindre masse moléculaire. Cette différence s'accroît selon l'axe des abscisses. Par exemple, une électrode à 100 pmol.cm^{-2} d'enzyme contiendrait 1,15 % de complexes d'osmium supplémentaires si la dGOx est immobilisée plutôt que la GOx, mais 62,5 % à $1000 \text{ pmol.cm}^{-2}$. Il est tout à fait envisageable que cette différence dans la quantité d'osmium soit à l'origine de l'écart croissant des courants avec Γ_{enz} entre les électrodes à base de dGOx ou de GOx. En effet d'avantage de complexes rédox, à la fois *collecteur* et *transporteur* des électrons, doit accroître la propension d'une enzyme à transmettre ses électrons ainsi que l'aptitude de ces derniers à diffuser dans l'hydrogel [60]. Rien ne prouve donc que la différence des courants est consécutive à la déglycosylation.

A posteriori, il apparaît qu'une comparaison d'électrodes avec les mêmes compositions molaires de chaque constituant est de rigueur, même si cela impose une différence dans les Γ_{enz} du fait de la différence de masse moléculaire entre la GOx et la dGOx.

2.3. Nouvelle stratégie

2.3.1. Modifications dans la préparation des électrodes

a) Augmentation de la réticulation

Dans certaines conditions, augmenter la proportion d'agent réticulant diminue l'aptitude du PVP-Os [- 0,17 V] à diffuser les électrons, dans la mesure où cela peut diminuer la mobilité des complexes rédox [72]. A la suite des études du § 2.2., nous avons réalisé que pour des quantités de GOx (ou dGOx) et de PVP-Os [- 0,17 V] fixées, les j_{pic} des CV ainsi que les courants catalytiques d'oxydation du glucose augmentaient avec le degré de réticulation jusqu'à ~ 20 %_m de PEGDGE, avant de diminuer aux %_m plus élevés. Nous attribuons cet effet à un moindre gonflement de l'hydrogel sous hydratation pour de plus fortes réticulations, induisant de plus grandes concentrations en complexes rédox, et donc de plus grands j_{pic} (selon les équations 2 et 4). Au-delà de 20 %_m de PEGDGE, la contribution négative de la réticulation sur la mobilité du complexe λ l'emporterait sur la contribution positive de l'augmentation de la concentration.

Par ailleurs, augmenter la réticulation permet d'accroître la stabilité du courant, tout particulièrement aux faibles proportions d'enzyme, où à 5 %_m de PEGDGE, des stabilités limitées pouvaient entraîner des difficultés de répétabilité et donc des comparaisons moins fiables.

Ainsi, la nouvelle comparaison est effectuée avec des hydrogels plus fortement réticulés, avec 46 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de PEGDGE au lieu de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ précédemment. Notons que si les densités de courants catalytiques sont alors plus élevées, le système est toujours à saturation sous 50 mM de glucose en solution.

b) Préparation des électrodes

Des électrodes à base de GOx ou de dGOx avec une même composition molaire de chaque constituant vont être comparées.

Les électrodes modifiées à base de GOx native sont préparées de la même manière que précédemment (cf. § 2.1.) exception faite d'une plus forte proportion d'agent réticulant. Les solutions mères en PVP-Os [- 0,17 V] ou en GOx sont toujours à 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. La solution

mère de PEGDGE passe à 5 mg.mL^{-1} et le volume total de mélange déposé à $5,4 \text{ }\mu\text{L}$. La valeur de Γ_{tot} reste constante à $230 \text{ }\mu\text{g.cm}^{-2}$ pour toutes les compositions d'hydrogel.

Quand la dGOx est immobilisée, une solution mère à $8,73 \text{ mg.mL}^{-1}$ d'enzyme est utilisée, correspondant à une concentration molaire identique à celle de la GOx à 10 mg.mL^{-1} (soit $63,3 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$). Le volume de mélange déposé reste donc identique pour toutes les électrodes ($5,4 \text{ }\mu\text{L}$). Etant donnée la différence de masse moléculaire entre les deux enzymes, la valeur de Γ_{tot} n'est plus égale à la valeur de *référence* de $230 \text{ }\mu\text{g.cm}^{-2}$. Elle est décroissante avec la proportion d'enzyme et évolue de $230 \text{ }\mu\text{g.cm}^{-2}$ à $212 \text{ }\mu\text{g.cm}^{-2}$.

Note : par souci de lisibilité, la composition d'une électrode modifiée sera désormais caractérisée par la quantité molaire d'enzyme immobilisée Γ_{enz} (en pmol.cm^{-2}). Il convient de garder à l'esprit que la quantité de polymère déposée diminue avec Γ_{enz} , de la même manière qu'elle diminuait avec le $\%_m$ d'enzyme dans le § 2.2.

2.3.2. Comparaison des courants catalytiques

La Figure 12 compare des courbes de polarisation à saturation de glucose d'électrode à base de GOx (traits discontinus) et de dGOx (traits continus) pour deux valeurs de Γ_{enz} particulièrement éloignées.

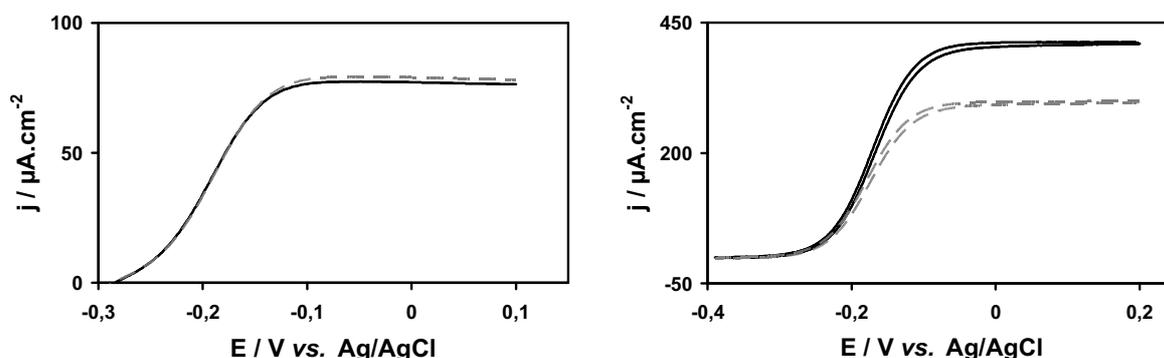


Figure 13. Courbes de polarisation à saturation de glucose (50 mM) pour des électrodes modifiées avec la GOx (trait gris discontinu) ou avec la dGOx (trait noir continu). (**Gauche**) $\Gamma_{\text{enz}} = 17,5 \text{ pmol.cm}^{-2}$, mesuré à $2,5 \text{ mV.s}^{-1}$. (**Droite**) $\Gamma_{\text{enz}} = 876 \text{ pmol.cm}^{-2}$. Sous argon, 37°C , tampon phosphate de sodium 100 mM pH $7,2$, 10 mV.s^{-1} , 1500 rpm .

A gauche, la concentration d'enzyme est particulièrement faible avec $\Gamma_{enz} = 17,5$ pmol.cm⁻² (correspond à 1,2 %_m de GOx). Les courants de plateau sont quasi égaux à environ 80 μA.cm⁻²*. A droite, la proportion d'enzyme est très élevée, avec un Γ_{enz} de 896 pmol.cm⁻² (c.-à-d. 60 %_m pour la GOx). Le courant de plateau délivré par l'électrode à base de dGOx est alors supérieur de 37 % à celui obtenu avec la GOx (respectivement 410 μA.cm⁻² et 300 μA.cm⁻²). La différence en courant semble donc liée à Γ_{enz} . Pour confirmer cet effet, des électrodes modifiées avec des proportions d'enzymes comprises entre les deux *extrêmes* de la Figure 13 sont préparées et leur courants de plateaux reportés sur la Figure 14.

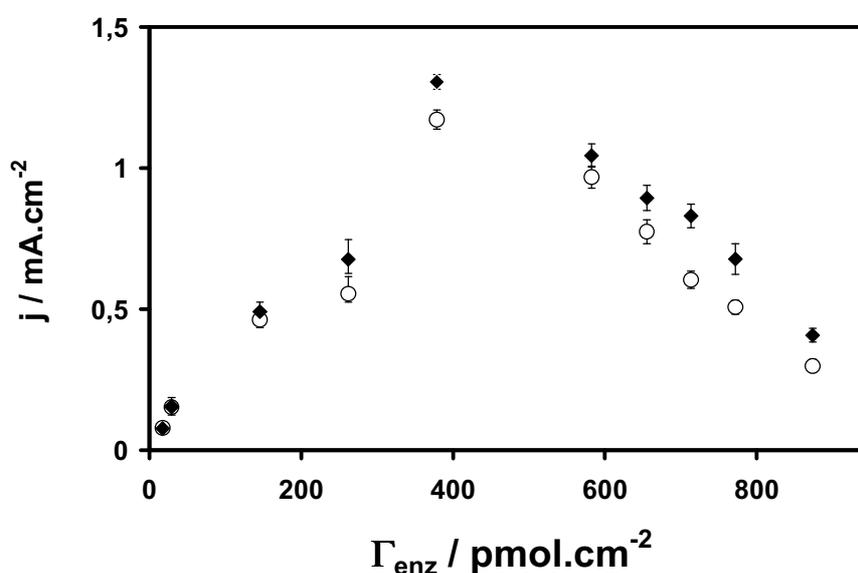


Figure 14. Evolution de la densité de courant de plateau avec la composition molaire des hydrogels à base de GOx (ronds vides) et de dGOx (losanges pleins). Mesure sous argon, 50 mM de glucose, 37°C, tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 7,2, 1500 rpm, à + 0,1 V.

Quelle que soit l'enzyme, les courants de plateau augmentent avec Γ_{enz} jusqu'à 380 pmol.cm⁻² avant de diminuer. La densité de courant maximale est alors de $1,31 \pm 0,02$ mA.cm⁻² avec la dGOx (deux électrodes), contre $1,17 \pm 0,03$ mA.cm⁻² avec la GOx, soit 12 % supérieure. Afin de mieux visualiser la différence relative des courants entre les électrodes à base de GOx ou de dGOx, la Figure 15 présente l'évolution des rapports $j_{pl}(dGOx) / j_{pl}(GOx)$ selon leur composition molaire. Une tendance est clairement visible,

* A ces très faibles Γ_{enz} , les courants de plateaux peuvent facilement varier de 20 % d'une électrode à l'autre. Les deux courbes ici présentées ont été choisies afin de bien refléter la moyenne obtenue avec six électrodes pour chaque enzyme.

avec une augmentation selon Γ_{enz} . Ainsi, la proportion d'enzyme immobilisée est bien à l'origine de la différence des courants catalytiques quand la dGOx remplace la GOx dans l'hydrogel.

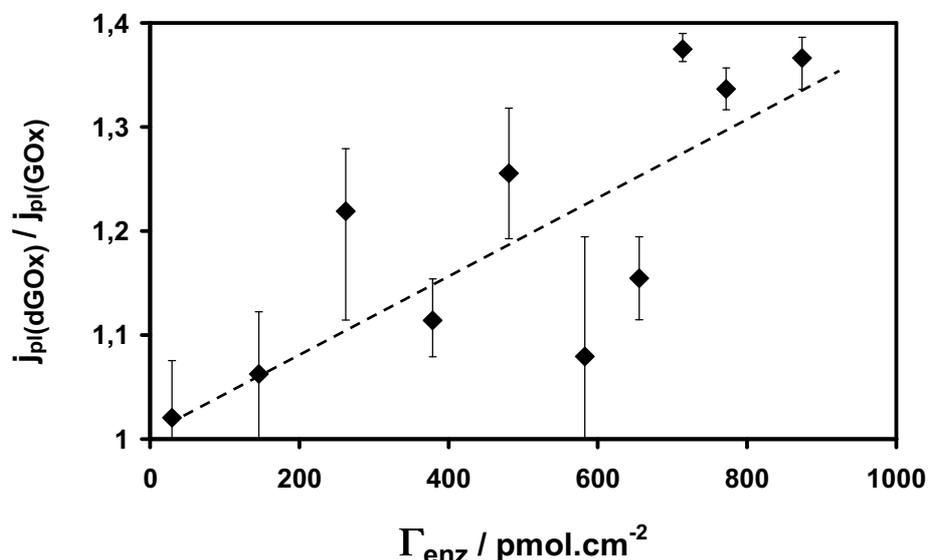


Figure 15. Rapports des courants de plateaux à saturation $j_{pi}(dGOx)/j_{pi}(GOx)$, selon la composition molaire de l'hydrogel. Mesure sous argon, 50 mM de glucose, 37°C, tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 7,2, 1500 rpm, à + 0,1 V. Rq : la droite discontinue met en relief l'évolution croissante et non une hypothétique linéarité.

Aux plus faibles valeurs de Γ_{enz} , les enzymes sont très *diluées* dans l'hydrogel et les courants de plateaux sont quasi identiques. Ainsi, la déglycosylation n'a pas sensiblement amélioré le transfert électronique *intrinsèque* entre la GOx et le complexe d'osmium du PVP-Os [- 0,17 V] immobilisés, auquel cas les courants délivrés avec la dGOx devraient être notablement plus élevés. Par contre il est tout à fait envisageable qu'une plus grande proportion d'enzyme induise une plus forte influence de la nature de cette dernière sur la structure de l'hydrogel, ce qui pourrait expliquer l'évolution observée sur la Figure 15.

2.3.3. Comparaison des voltampérogrammes cycliques en absence de glucose

Nous avons précédemment vu qu'une proportion plus élevée d'enzyme diminuait l'amplitude des CV mesurés en absence de glucose, sans doute par un effet de *dilution* des complexes d'osmium (cf. § 2.2.1.c). La nature de l'enzyme doit probablement avoir une influence sur cet effet. La Figure 16 compare les CV des électrodes modifiées avec la GOx ou

la dGOx pour des proportions d'enzyme très faibles ($\Gamma_{enz} = 17,5 \text{ pmol.cm}^{-2}$) ou très importantes ($\Gamma_{enz} = 876 \text{ pmol.cm}^{-2}$).*

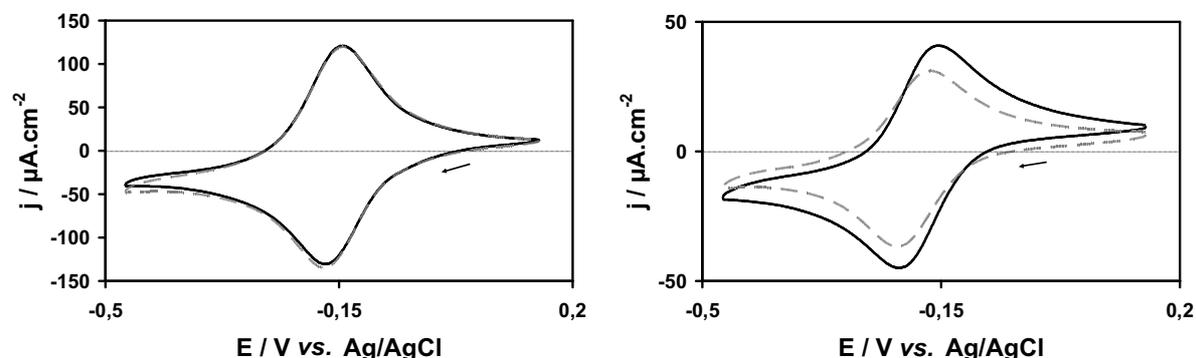


Figure 16. CV mesurés en absence de glucose pour des électrodes à base de GOx (traits gris discontinus) ou a base de dGOx (traits noirs continus). (**Gauche**) Enzyme très diluée : $\Gamma_{enz} = 17,5 \text{ pmol.cm}^{-2}$. (**Droite**) Enzyme très concentrée : $\Gamma_{enz} = 876 \text{ pmol.cm}^{-2}$. Sous argon 37°C , tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,2, 20 mV.s^{-1} , 1500 rpm.

Quand l'enzyme peut être considérée comme très diluée dans l'hydrogel (CV de Gauche), les réponses en courants sont presque identiques. Comme la réponse du CV en absence de glucose est a priori uniquement dépendante de la concentration en complexe d'osmium [Os] et de leur mobilité autour de leur point d'ancrage λ^{**} (cf. § 2.2.1.c), cela semble cohérent avec l'hypothèse d'une influence minimale de l'enzyme (ou de leur différence) sur la structure de l'hydrogel. Au contraire, le contraste est manifeste pour des hydrogels particulièrement concentrés en enzyme (CV de Droite). Alors que la densité de courant de pic cathodique est de $-33,4 \text{ } \mu\text{A.cm}^{-2}$ avec la GOx immobilisée, elle atteint $-45,6 \text{ } \mu\text{A.cm}^{-2}$ avec la dGOx, soit une amplitude de pic de 37 % supérieure (l'augmentation des pics anodiques est de 36 %). La structure de l'hydrogel semble alors être différemment influencée selon la nature de l'enzyme.

* Les CV sont en fait ceux des électrodes dont les courbes de polarisation étaient présentées à la Figure 13. Ils correspondent au troisième CV successif obtenu lors de la première hydratation, une fois qu'une bonne stabilité de la réponse est atteinte.

** La quantité de complexe déposée peut également jouer un rôle dans la mesure où la diffusion des électrons ne peut pas être considérée comme formellement semi-infinie (cf. § 2.2.1.b). Rappelons cependant que chaque comparaison est maintenant effectuée pour des compositions molaires identiques.

Le rapport des courants de pics cathodiques $j_{pa}(dGOx) / j_{pa}(GOx)$ est mesuré pour plusieurs compositions molaires d'hydrogels. Ils sont reportés sur la Figure 17.

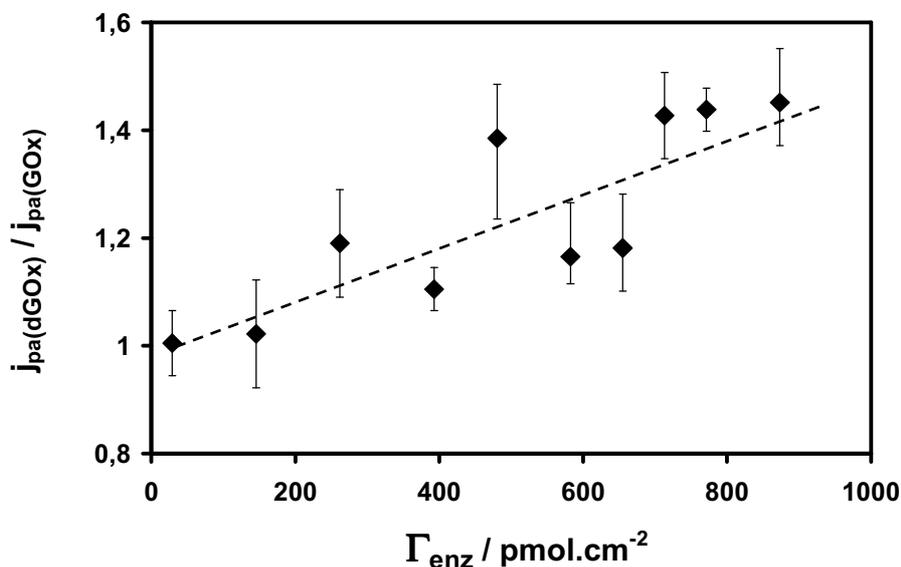


Figure 17. Rapports des courants de pics anodiques des CV mesurés en absence de glucose $j_{pa}(dGOx)/j_{pa}(GOx)$, selon la composition molaire de l'hydrogel. Sous argon, 37°C, tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 7,2. Rq : la droite discontinue met en relief l'évolution croissante et non une hypothétique linéarité.

La tendance observée est identique à celle obtenue pour les courants catalytiques : croissante avec Γ_{enz} , avec des rapports proches de 1 aux faibles concentrations d'enzyme. Cette forte corrélation entre l'évolution de l'écart des courants de pics et celle des courants catalytiques sous-entend une cause identique, forcément imputable à une différence entre la GOx et la dGOx. Or la cinétique de transfert électronique entre l'enzyme et le complexe d'osmium n'a pas d'influence sur les CV mesurés en absence de glucose et a fortiori sur les valeurs de j_{pic} .

2.3.4. Une hypothèse rationnelle : l'effet de la déglycosylation sur le volume de l'hydrogel

Pour une composition molaire d'hydrogel donnée (Γ_{enz}), il est probable que la mobilité du complexe (λ) varie peu selon que la GOx ou la dGOx est immobilisée. La valeur de j_{pic} doit être alors majoritairement dépendante de [Os]. Ainsi la différence des j_{pic} doit être due à une concentration d'osmium plus élevée pour l'électrode à base de dGOx, qui serait alors

nécessairement imputable à un volume d'hydrogel plus faible. Cette différence dans les volumes d'hydrogel pourrait avoir deux origines :

- la différence de volume entre la GOx native et sa forme déglycosylée. En se référant aux diamètres hydrodynamiques mesurés par DLS, le volume hydrodynamique de la GOx est supérieur d'environ 60 % à celui de la dGOx. Naturellement, cette comparaison est à prendre avec prudence, le gonflement de l'hydrogel sous hydratation étant majoritairement dû au polymère hydrophile.*
- La différence de charge apparente entre les deux enzymes. En effet, l'équilibre entre les interactions électrostatiques répulsives et attractives dans l'hydrogel doit influencer son volume [69]. Or, la dGOx présente une plus grande quantité de charges négatives à sa surface que la GOx (cf. § 1.4.3.). Elle doit donc induire de plus fortes interactions attractives avec le polymère rédox globalement positivement chargé, ce qui pourrait participer à l'obtention d'un hydrogel plus fin (c.-à-d. concentré).

L'action de ces deux possibles causes dans la différence des volumes est forcément croissante avec la proportion d'enzyme immobilisée. Ceci est rationnel avec l'évolution de la différence des courants de pics avec Γ_{enz} , selon que la GOx ou la dGOx modifie l'hydrogel (cf. Figure 17).

Enfin, la différence des volumes d'hydrogel peut expliquer de deux manières la progression graduelle du courant catalytique quand la dGOx remplace la GOx :

- une plus forte concentration en complexe accroît la fréquence des chocs entre les enzymes et les complexes, et donc la vitesse globale du transfert électronique entre le biocatalyseur et son médiateur rédox.
- Une plus forte concentration en complexe rédox favorise aussi la diffusion des électrons (par [Os] et par D_e). Si cette diffusion constitue aussi un facteur limitant (cf. § 2.2.2.c), alors un volume plus faible doit également augmenter le courant catalytique par le biais de cet effet.

* D'autant que le diamètre hydrodynamique comprend l'épaisseur de la couche de solvation de l'enzyme. Il est aussi mesuré pour une enzyme diluée en solution, et non immobilisée.

CONCLUSION

La présente étude se proposait d'étudier l'effet de la déglycosylation de la GOx sur son transfert électronique médié dans l'hydrogel rédox.

La GOx a été largement déglycosylée par voie enzymatique. La déglycosylation diminue logiquement la masse et le volume hydrodynamique de l'enzyme. Retirer une large fraction des oligosaccharides a aussi atténué un *effet d'écran* que ces derniers exercent sur la charge apparente que l'enzyme expose à son environnement direct. Ainsi, la dGOx présente une charge apparente de surface plus négative que celle de la GOx native. Par ailleurs, la déglycosylation ne modifie pas l'activité de l'enzyme en solution.

Des électrodes modifiées avec la GOx ou la dGOx dans des proportions molaires identiques ont été étudiées électrochimiquement. Si les électrodes à base de dGOx délivrent généralement des densités de courant catalytique supérieures à celles obtenues avec leurs homologues glycosylées, la différence est subordonnée à la quantité d'enzyme immobilisée dans l'hydrogel (Γ_{enz}). Plus l'enzyme y est concentrée, plus l'effet de la déglycosylation sur le courant est significatif. En particulier, les hydrogels où les enzymes sont particulièrement diluées ne présentent pas de tendance qui pourrait suggérer une conséquence manifeste de la déglycosylation.

Le même effet de Γ_{enz} est observé sur l'amplitude des CV en absence de glucose : plus la proportion d'enzyme immobilisée dans l'hydrogel est importante, plus l'effet positif de la déglycosylation sur les courants de pic se fait ressentir. Or cette réponse n'est pas dépendante du transfert électronique entre l'enzyme et le complexe d'osmium.

En définitive, la croissance graduelle du courant catalytique avec Γ_{enz} quand la GOx est déglycosylée est attribuée à un effet sur la structure de l'hydrogel plutôt qu'à une amélioration du transfert électronique *intrinsèque* entre l'enzyme et son médiateur. Les résultats obtenus penchent en faveur d'une diminution du volume de l'hydrogel quand la GOx est déglycosylée. Ceci pourrait être attribuable à une enzyme alors plus petite et plus négativement chargée, ce qui induit de meilleures interactions électrostatiques avec le polymère rédox. Enfin la plus grande concentration en GOx et en complexe doit accroître la *vitesse globale* des deux étapes gouvernant majoritairement la valeur du courant catalytique, à

savoir le transfert électronique entre la GOx et le complexe puis la diffusion des électrons dans l'hydrogel.

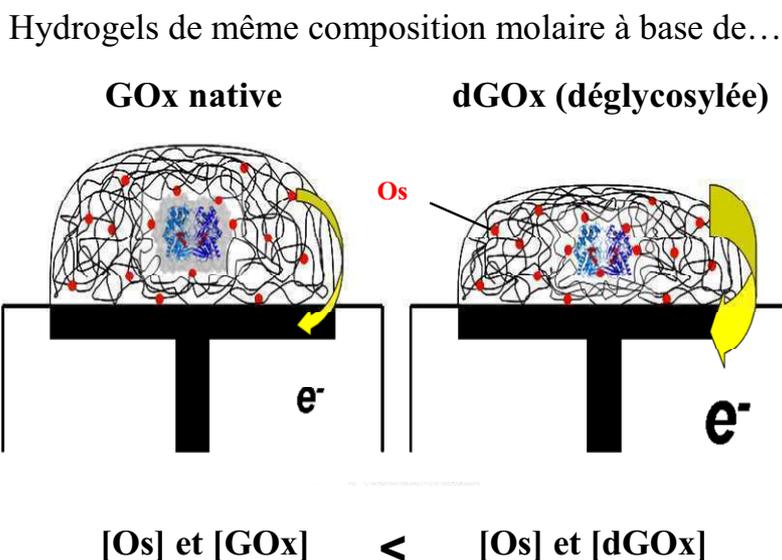


Schéma 4. Conclusion de l'étude : la déglycosylation n'a pas modifié sensiblement la cinétique de transfert électronique *intrinsèque* entre la GOx et le médiateur rédox. Néanmoins, elle permet très probablement une diminution du volume de l'hydrogel et accroît donc [Os]. Ceci augmente la fréquence des chocs Os–GOx (vitesse de transfert électronique globale) et Os–Os (diffusion des électrons), amplifiant ainsi le courant.

Le Schéma 4 résume cette conclusion. Il est intéressant de l'opposer au Schéma 2 présenté en introduction de ce chapitre et proposant une hypothèse en amont de l'étude. Tandis que ce dernier envisageait un effet « ponctuel » de la déglycosylation (mettant en jeu *une* enzyme et *un* médiateur), le présent schéma met en relief une action « globale » sur la structure de l'hydrogel rédox.

Avant de mettre un terme à ce chapitre, il faut noter que l'effet de la déglycosylation observé dans cette étude semble lui-même caractéristique des deux principaux constituants de l'hydrogel, à savoir la GOx issue d'*Aspergillus niger* et le polymère rédox utilisé. En effet, une étude similaire réalisée avec une autre GOx, issue de *Penicillium amagasakiense*, déglycosylée elle aussi et immobilisée dans un polymère rédox autre que celui employé dans ce travail, présentait un comportement différent [97]. Comme souvent dans les études mettant en jeu l'hydrogel rédox, il convient donc de ne pas généraliser trop rapidement un effet

observé à d'autres systèmes. Par contre, il s'avèrerait intéressant d'invertir chaque constituant des deux couples enzyme/polymère employés afin de mieux appréhender l'effet de cette déglycosylation.

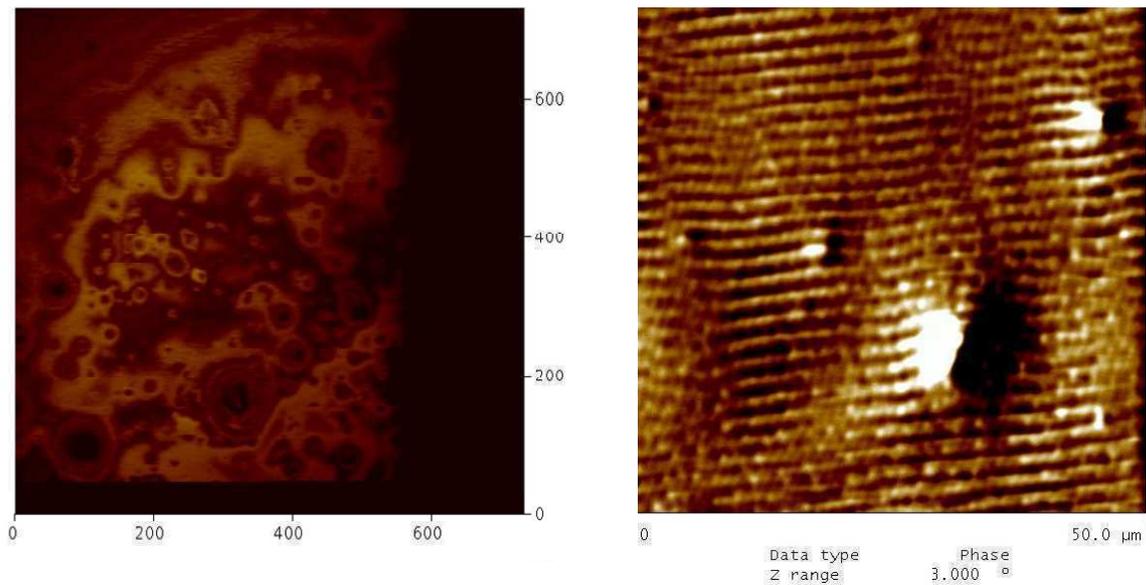
ANNEXE

Mesure AFM

Dans la littérature, plusieurs moyens ont été mis en œuvre pour estimer l'épaisseur d'hydrogel rédox, avec ou sans enzyme immobilisée. On peut citer la profilométrie [58, 62], l'AFM [67], la microscopie électronique à balayage environnemental (ESEM) [65] ou même la microscopie optique si l'hydrogel est particulièrement hydraté [62]. La dernière référence est intéressante car elle prouve comment de légères différences dans un polymère rédox peuvent largement modifier les propriétés d'un hydrogel et *a fortiori* son degré d'hydratation. L'ellipsométrie a aussi été utilisée pour des mesures d'épaisseur hydrogels réalisés en *couches par couches* de polymère rédox et de GOx [98].

L'hétérogénéité de l'épaisseur de l'hydrogel, que ce dernier soit hydraté ou non, ne semble pas permettre d'estimations suffisamment précises, aux exceptions notables des dépôts réalisés en *couches par couches* [98] ou par *spin coating* [67]. Cette dernière référence présente de loin les épaisseurs les plus homogènes.

Au cours de cette thèse, quelques mesures AFM ont été effectuées pour tenter d'évaluer l'épaisseur des hydrogels rédox hydratés selon que la GOx ou la dGOx modifiait l'électrode. Les images ci-dessous présentent la structure d'un hydrogel à base de GOx déposé sur une électrode de carbone vitreux. L'hydrogel est non hydraté. Le cliché de gauche a été réalisé via un microscope optique. On peut y constater que le dépôt présente une forte hétérogénéité. Le cliché de droite est une image AFM. Elle a été obtenue sur une surface choisie expressément pour sa relative homogénéité. Même ainsi, les défauts sont encore importants et de l'ordre de grandeur de l'épaisseur de l'hydrogel (quelques μm). Les sillons visibles pourraient être dus au séchage après le dépôt du mélange sur l'électrode.



Clichés optique (gauche) et AFM (droite) d'un hydrogel rédox déposé sur une électrode carbone vitreux (50 %_m polymère rédox, 30 %_m GOx, 20 %_m PEGDGE ; $\Gamma_{\text{tot}} = 230 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Etat non hydraté. Echelles en μm .

L'hydrogel a été hydraté 15 min à température ambiante dans la solution tampon utilisée tout le long de cette étude (tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 7,2). Une fois l'excès d'eau retiré, l'hydrogel hydraté a été observé par AFM. Une forte hydratation et la persistance de défauts étaient décelables. Cependant, l'hydrogel se comprimait rapidement par déshydratation naturelle. Entre cette évolution et les importantes hétérogénéités locales des dépôts, cette étude n'a pas permis d'obtenir une véritable estimation de l'épaisseur des hydrogels hydratée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] D. J. Caruana and S. Howorka, *Molecular Biosystems* In Press.
- [2] E. Katz, A. Riklin, V. Heleg-Shabtai, I. Willner, and A. F. Bückmann, *Analytica Chimica Acta* 385:45 (1999).
- [3] F. A. Armstrong, H. A. O. Hill, B. Nigel Oliver, and N. J. Walton, *Journal of the American Chemical Society* 106:921 (1984).
- [4] F. A. Armstrong, H. Allen, O. Hill, and N. J. Walton, *Quarterly reviews of biophysics* 18:261 (1985).
- [5] F. A. Armstrong, H. A. O. Hill, and N. J. Walton, *Accounts of Chemical Research* 21:407 (1988).
- [6] A. Heller and B. Feldman, *Chemical Reviews* 108:2482 (2008).
- [7] S. C. Barton, J. Gallaway, and P. Atanassov, *Chemical Reviews* 104:4867 (2004).
- [8] F. Gao, O. Courjean, and N. Mano, *Biosensors and Bioelectronics* 25:356 (2009).
- [9] I. Willner, Y. M. Yan, B. Willner, and R. Tel-Vered, *Fuel Cells* 9:7 (2009).
- [10] Y. Yan, L. Su, and L. Mao, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7:1625 (2007).
- [11] Y. Yan, W. Zheng, L. Su, and L. Mao, *Advanced Materials* 18:2639 (2006).
- [12] I. Willner, R. Baron, and B. Willner, *Biosensors and Bioelectronics* 22:1841 (2007).
- [13] W. Schuhmann, T. J. Ohara, H. L. Schmidt, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 113:1394 (1991).
- [14] W. Schuhmann, *Reviews in Molecular Biotechnology* 82:425 (2002).
- [15] M. Campàs, B. Prieto-Simón, and J. L. Marty, *Seminars in Cell and Developmental Biology* 20:3 (2009).
- [16] M. Alvarez-Icaza, H. M. Kalisz, H. J. Hecht, K. D. Aumann, D. Schomburg, and R. D. Schmid, *Biosensors and Bioelectronics* 10:735 (1995).
- [17] E. Katz, V. Heleg-Shabtai, B. Willner, I. Willner, and A. F. Bückmann, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 42:95 (1997).
- [18] V. Leskovac, S. Trivic, G. Wohlfahrt, J. Kandrak, and D. Pericin, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37:731 (2005).
- [19] T. S. Wong and U. Schwaneberg, *Current Opinion in Biotechnology* 14:590 (2003).

- [20] J. Wang, *Chemical Review* 108:814 (2008).
- [21] M. Comtat, *Journal de Physique IV* 4:185 (1994).
- [22] O. Courjean, F. Gao, and N. Mano, *Angewandte Chemie - International Edition* 48:5897 (2009).
- [23] S. Demin and E. A. H. Hall, *Bioelectrochemistry* 76:19 (2009).
- [24] S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal, and L. Ananthanarayan, *Biotechnology Advances* 27:489 (2009).
- [25] R. Wilson and A. P. F. Turner, *Biosensors and Bioelectronics* 7:165 (1992).
- [26] G. Wohlfahrt, S. Witt, J. Hendle, D. Schomburg, H. M. Kalisz, and H. J. Hecht, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 55:969 (1999).
- [27] C. Shan, H. Yang, J. Song, D. Han, A. Ivaska, and L. Niu, *Analytical Chemistry* 81:2378 (2009).
- [28] S. Deng, G. Jian, J. Lei, Z. Hu, and H. Ju, *Biosensors and Bioelectronics* 25:373 (2009).
- [29] Y. Liu, M. Wang, F. Zhao, Z. Xu, and S. Dong, *Biosensors and Bioelectronics* 21:984 (2005).
- [30] Z. Wang, S. Liu, P. Wu, and C. Cai, *Analytical Chemistry* 81:1638 (2009).
- [31] S. Thibault, H. Aubriet, C. Arnoult, and D. Ruch, *Microchimica Acta* 163:211 (2008).
- [32] A. Salimi, E. Sharifi, A. Noorbakhsh, and S. Soltanian, *Biosensors and Bioelectronics* 22:3146 (2007).
- [33] Y. Li, Y. Gao, Y. Zhou, Y. Liu, and J. Liu, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 642:1.
- [34] D. Shan, J. Zhang, H. G. Xue, S. N. Ding, and S. Cosnier, *Biosensors and Bioelectronics* 25:1427.
- [35] R. Szamocki, A. Velichko, F. Mücklich, S. Reculosa, S. Ravaine, S. Neugebauer, W. Schuhmann, R. Hempelmann, and A. Kuhn, *Electrochemistry Communications* 9:2121 (2007).
- [36] R. Szamocki, S. Reculosa, S. Ravaine, P. N. Bartlett, A. Kuhn, and R. Hempelmann, *Angewandte Chemie - International Edition* 45:1317 (2006).
- [37] I. Willner and E. Katz, *Angewandte Chemie - International Edition* 39:1181 (2000).

- [38] G. Urban, G. Jobst, F. Kohl, A. Jachimowicz, F. Olcaytug, O. Tilado, P. Goiser, G. Nauer, F. Pittner, T. Schalkhammer, and E. Mann-Buxbaum, *Biosensors and Bioelectronics* 6:555 (1991).
- [39] E. Lojou, X. Luo, M. Brugna, N. Candoni, S. Dementin, and M. T. Giudici-Ortoni, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13:1157 (2008).
- [40] Y. Degani and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 110:2615 (1988).
- [41] I. Willner, V. Heleg-Shabtai, R. Blonder, E. Katz, G. Tao, A. F. Bückmann, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 118:10321 (1996).
- [42] D. M. Fraser, S. M. Zakeeruddin, and M. Gratzel, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1099:91 (1992).
- [43] S. Nakamura and S. Hayashi, *FEBS Letters* 41:327 (1974).
- [44] H. M. Kalisz, H. J. Hecht, D. Schomburg, and R. D. Schmid, *Journal of Molecular Biology* 213:207 (1990).
- [45] RCSB Protein Data Bank, « Biology and Chemistry Report », <<http://www.pdb.org/pdb/explore/biologyAndChemistry.do?structureId=1CF3>> (30 août 2010).
- [46] H. J. Hecht, H. M. Kalisz, J. Hendle, R. D. Schmid, and D. Schomburg, *Journal of Molecular Biology* 229:153 (1993).
- [47] S. Nakamura, S. Hayashi, and K. Koga, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 445:294 (1976).
- [48] H. M. Kalisz, H. J. Hecht, D. Schomburg, and R. D. Schmid, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1080:138 (1991).
- [49] M. S. Akhtar and V. Bhakuni, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 413:221 (2003).
- [50] A. Heller, *Current Opinion in Chemical Biology* 10:664 (2006).
- [51] D. M. Fraser, S. M. Zakeeruddin, and M. Gratzel, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 359:125 (1993).
- [52] R. J. Sola and K. Griebenow, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98:1223 (2009).
- [53] Research Solutions & Resources, « The Ag/AgCl Reference Electrode », <<http://www.consultsr.com/resources/ref/agcl.htm>> (10 mai 2009).
- [54] G. Binyamin and A. Heller, *Journal of the Electrochemical Society* 146:2965 (1999).
- [55] F. Bedioui, *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation* P2 (1999).

- [56] F. Bedioui, *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation* P3 (1999).
- [57] H. Z. Bu, S. R. Mikkelsen, and A. M. English, *Analytical Chemistry* 67:4071 (1995).
- [58] J. W. Gallaway and S. A. C. Barton, *Journal of the American Chemical Society* 130:8527 (2008).
- [59] F. Daigle and D. Leech, *Analytical Chemistry* 69:4108 (1997).
- [60] S. Koide and K. Yokoyama, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 468:193 (1999).
- [61] H. Z. Bu, A. M. English, and S. R. Mikkelsen, *Journal of Physical Chemistry B* 101:9593 (1997).
- [62] S. A. Merchant, M. T. Meredith, T. O. Tran, D. B. Brunski, M. B. Johnson, D. T. Glatzhofer, and D. W. Schmidtke, *Journal of Physical Chemistry C* 114:11627.
- [63] B. A. Gregg and A. Heller, *Journal of Physical Chemistry* 95:5970 (1991).
- [64] A. PrévotEAU, O. Courjean, and N. Mano, *Electrochemistry Communications* 12:213 (2010).
- [65] A. Aoki, R. Rajagopalan, and A. Heller, *Journal of physical chemistry* 99:5102 (1995).
- [66] G. Manecke and H. G. Vogt, *Pure and Applied Chemistry* 50:665 (1978).
- [67] G. Ybarra, C. Moina, F. V. Molina, M. I. Florit, and D. Posadas, *Electrochimica Acta* 50:1505 (2005).
- [68] T. J. Ohara, R. Rajagopalan, and A. Heller, *Analytical Chemistry* 65:3512 (1993).
- [69] F. Battaglini, E. J. Calvo, C. Danilowicz, and A. Wolosiuk, *Analytical Chemistry* 71:1062 (1999).
- [70] Y. Degani and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 111:2357 (1989).
- [71] A. Aoki and A. Heller, *Journal of Physical Chemistry* 97:11014 (1993).
- [72] F. Mao, N. Mano, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 125:4951 (2003).
- [73] P. N. Bartlett and K. F. E. Pratt, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 397:61 (1995).
- [74] C. P. Andrieux, J. M. Dumas-Bouchiat, and J. M. Savéant, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 131:1 (1982).
- [75] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical methods : fundamentals and applications / Allen J. Bard, Larry R. Faulkner, Wiley, New York :, 1980.*

- [76] J. W. Gallaway and S. A. Calabrese Barton, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 626:149 (2009).
- [77] M. Elmgren, S. E. Lindquist, and M. Sharp, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 362:227 (1993).
- [78] B. A. Gregg and A. Heller, *Journal of Physical Chemistry* 95:5976 (1991).
- [79] N. Mano, H. H. Kim, and A. Heller, *Journal of Physical Chemistry B* 106:8842 (2002).
- [80] T. J. Ohara, R. Rajagopalan, and A. Heller, *Analytical Chemistry* 66:2451 (1994).
- [81] N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 574:347 (2005).
- [82] N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *Chemical Communications* 10:2116 (2004).
- [83] N. Mano, *Chemical Communication* 19:2221 (2008).
- [84] D. N. Blauch and J. M. Savéant, *Journal of the American Chemical Society* 114:3323 (1992).
- [85] D. N. Blauch and J. M. Savéant, *Journal of Physical Chemistry* 97:6444 (1993).
- [86] J. Gallaway, I. Wheeldon, R. Rincon, P. Atanassov, S. Banta, and S. C. Barton, *Biosensors and Bioelectronics* 23:1229 (2008).
- [87] G. Kenausis, C. Taylor, I. Katakis, and A. Heller, *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions* 92:4131 (1996).
- [88] N. Mano, E. Y. Joung, J. Tarver, Y. L. Loo, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 129:7006 (2007).
- [89] C. Taylor, G. Kenausis, I. Katakis, and A. Heller, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 396:511 (1995).
- [90] G. Kenausis, C. Taylor, R. Rajagopalan, and A. Heller, *Journal of Molecular Recognition* 9:626 (1996).
- [91] P. N. Bartlett, *Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*, Ed. Wiley, 2008.
- [92] T. Tamaki, T. Ito, and T. Yamaguchi, *Fuel Cells* 9:37 (2009).
- [93] G. Güven, R. Prodanovic, and U. Schwaneberg, *Electroanalysis* 22:765 (2010)
- [94] J. M. Savéant, *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry*, Wiley, 2006.

- [95] J. M. Savéant, *Chemical Reviews* 108:2348 (2008).
- [96] S. C. Barton, M. Pickard, R. Vazquez-Duhalt, and A. Heller, *Biosensors and Bioelectronics* 17:1071 (2002).
- [97] O. Courjean, V. Flexer, A. PrévotEAU, E. Suraniti, and N. Mano, *ChemPhysChem* 11:2795 (2010).
- [98] V. Flexer, E. S. Forzani, E. J. Calvo, S. J. Luduena, and L. I. Pietrasanta, *Analytical Chemistry* 78:399 (2006).

CHAPITRE III

REDUCTION DE L'OXYGENE SUR LES COMPLEXES D'OSMIUM

INTRODUCTION

Les biocapteurs ampérométriques à glucose se doivent, entre autre, d'être sélectifs envers leur substrat. C'est-à-dire qu'idéalement, l'amplitude du courant mesuré ne doit dépendre que du glucose indépendamment des autres espèces endogènes présentes dans le sang, telles que l'urate, l'ascorbate ou encore l'oxygène dissous (O_2).

Comme nous l'avons discuté dans le premier chapitre de cette thèse, les biocapteurs de première génération, utilisant l' O_2 comme accepteur d'électron pour la GOx, sont particulièrement tributaires de la pression partielle d' O_2 du milieu considéré [1, 2]. Afin de pallier cette dépendance, de nombreuses recherches ont été menées sur ce type de biocapteurs, et des solutions telles que l'utilisation de film polymère pour optimiser la diffusion du glucose et de l' O_2 [3, 4], la modification de la géométrie du capteur [5] ou encore l'emploi de matériaux permettant une source interne d' O_2 [6] ont été proposées. Une alternative élégante a été l'usage d'accepteurs d'électron artificiels, plus communément appelés médiateurs [1]. Les biocapteurs mettant à profit cette nouvelle stratégie sont dits de deuxième génération. Ils ont permis une réduction considérable des interférences électrochimiques [7].

Cependant, les variations en concentration d' O_2 dissous demeurent une source d'erreurs relativement fréquentes dans les mesures de glucose, parmi d'autres interférences [8-16]. Les variations de pressions partielles d' O_2 dans le sang dépendent de l'emplacement des prélèvements (veineux, artériels ou capillaires), de l'altitude où a été réalisée la mesure, de l'âge et de l'hématocrite du patient ainsi que de sa récente activité physique. Pour un patient sans complication particulière, ces variations selon ces différentes conditions vont généralement de 40 mm Hg (dans les capillaires) à 110 mm Hg (artères) [17, 18]. Cependant, des patients atteints de certaines pathologies ou en état de soins intensifs peuvent présenter des pressions partielles d' O_2 dans le sang particulièrement faibles (cas de bronchite chronique ou d'emphysème pulmonaire [8]) ou élevées (en cas d'oxygénothérapie, de réanimation, d'opérations chirurgicales [14]). Uniquement dans les artères, des pressions partielles d' O_2 extrêmes ont pu être relevées, de 40 mm Hg [19] à 400 mm Hg [14].

Pour les biocapteurs de deuxième génération utilisant la GOx, ou plus généralement les anodes modifiées connectant électriquement cette enzyme avec un médiateur rédox, le phénomène mis en cause dans l'interférence de l' O_2 est presque exclusivement la réactivité de la GOx avec l' O_2 [1, 2, 6, 20-32]. En effet, la GOx présente une forte affinité pour l' O_2 ($K_m = 0,2$ mM en solution ; un K'_m de 0,28 mM a été reporté pour l'enzyme immobilisé [33]) et le réduit rapidement (constante de vitesse de $1,5 \cdot 10^6$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$ [23]). Ainsi l' O_2 peut entrer en

compétition avec le médiateur rédox pour capter les électrons de la GOx réduite (Eq. 2) et par là même diminuer la réponse en courant de la bioanode par rapport à un milieu anaérobie :



Deux revues récentes sur les capteurs à glucose n'évoquent que la possibilité de cette compétition dans l'interférence de l'O₂ sur les mesures de biocapteurs à glucose de deuxième génération [1, 34]. Par ailleurs les auteurs recommandent pour ces systèmes des potentiels de fonctionnement d'électrode relativement faibles afin d'éviter l'oxydation de l'urate et du paracétamol, et de fortement limiter celle de l'ascorbate. Ainsi, un des auteurs préconise une gamme de potentiel d'électrode comprise entre - 0,1 V à + 0,2 V** [34]. Afin d'assurer une force motrice suffisante pour l'oxydation interfaciale du médiateur rédox, le E°' de ce dernier doit être inférieur d'au moins 0,1 V au potentiel de fonctionnement. Ainsi l'auteur conseille l'emploi de médiateurs de E°' compris entre - 0,2 V et + 0,1 V [34, 35]. Il insiste par ailleurs sur les valeurs particulièrement élevées des constantes cinétiques d'échange électronique entre la GOx et certains complexes d'osmium. Pour ces raisons, des recherches ont été menées afin de diminuer le potentiel de polymères rédox à base d'osmium en modifiant la configuration des ligands autour du centre métallique [22, 35]. En parallèle, l'abaissement du potentiel du polymère devait aussi permettre des tensions de biopiles plus élevées [36, 37]. En 2005, Mano *et al.* ont étudié une anode composée de GOx et de polymère à base d'Osmium de E°' égal à -0,19 V pour des applications en biocapteur à glucose ou biopile [22]. Dans une revue, l'hydrogel en question est présenté comme idoine pour réaliser un biocapteur *in vivo* du fait entre autre de sa linéarité, de sa forte sensibilité, et de sa sélectivité *exclusive* pour le glucose [38]. En 2006, Timur *et al.* ont proposé un biocapteur à glucose utilisant la pyranose oxydase et un polymère à base d'osmium à - 0,18 V [39].

D'un autre côté, Zakeeruddin *et al.* ont avancé que pour des complexes de E°' inférieur à + 0,05 V, la forme réduite du médiateur pouvait réagir avec l'O₂ dissous, et donc compromettre la performance d'un biocapteur [40]. De fait, Kenausis *et al.* ont détecté une réduction catalytique de l'oxygène sur une électrode modifiée avec de la GOx et un polymère

* n = 2 ou 1 selon que le médiateur échange 1 ou 2 électrons, respectivement. Le médiateur est considéré comme n'échangeant pas de proton(s) lors de son oxydoréduction, d'où la présence des 2 protons en produit de réaction.

** Rappel : tous les potentiels sont relatifs à l'électrode de référence Ag/AgCl.

à base d'osmium de E° égal à $-0,02$ V [41]. Malgré un effet de l' O_2 plus prononcé lors de la mesure du glucose à $+0,25$ V, ils considèrent que ce dernier est uniquement dû à la compétition de l' O_2 pour les électrons de la GOx, probablement pour la raison que le potentiel de mesure est supérieur aux potentiels de réduction de l' O_2 en absence de glucose ($\leq +0,09$ V). Récemment, Salimi *et al.* ont observé ce phénomène de réduction de l' O_2 sur un complexe d'osmium de E° égal à $-0,07$ V [42]. Ils exploitent cette réaction pour proposer un biocapteur à glucose à base de GOx où la mesure de la réduction de l' O_2 s'amenuise avec l'ajout de glucose. L'inconvénient majeur de ce type de capteur est qu'il nécessite, en amont de toute mesure, une connaissance précise de la concentration en O_2 dissous dans le milieu considéré, car c'est d'elle dont dépend le courant en absence de glucose ainsi que son évolution suite à l'addition de ce dernier (sensibilité). Enfin, Abe *et al.* ont étudié la réduction de l' O_2 sur un complexe d'osmium de E° égal à $-0,1$ V, immobilisé dans une membrane en Nafion [43].

L'engouement relatif à l'utilisation des complexes d'osmium pour la médiation des électrons de la GOx est important [32, 34, 36, 44-46] et les possibles applications dans des milieux aérobies sont majoritaires (biocapteurs ou biopiles glucose- O_2). Il semble donc essentiel de vérifier l'éventualité d'une réaction entre l' O_2 et les complexes d'osmium susceptibles d'être affectés à ces systèmes ainsi que les conséquences que cela pourrait engendrer.

La présente étude se propose de mettre en évidence la réduction de l' O_2 sur le polymère rédox à base d'osmium PVP-Os [$-0,17$ V], précédemment utilisé dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Cette réduction sera qualitativement étudiée et les produits de réaction déterminés. Plusieurs autres polymères rédox à base d'osmium, de E° différents, seront aussi testés dans cette optique. Les effets de cette réactivité entre les complexes d'osmium et l' O_2 sur les réponses en courant des bioanodes à glucose seront ensuite évalués. Les formes atypiques des courbes de calibration du glucose obtenues sous O_2 seront finalement interprétées.

Les compromis conduisant au choix du potentiel standard d'un médiateur rédox pour un biocapteur ou une anode de biopile seront rapidement rediscutés aux vues des résultats établis.

1. REDUCTION DE L'OXYGENE SUR UN POLYMERE REDOX

1.1. Réponse électrochimique du polymère sous argon et oxygène

Afin de détecter une éventuelle réaction entre le médiateur rédox et l' O_2 dissous, nous étudions la réponse électrochimique d'une électrode en carbone vitreux (GC) modifiée uniquement avec le polymère rédox PVP-Os [$-0,17$ V] réticulé. S'agissant du polymère le plus réducteur en notre possession, il est probablement le plus susceptible de réduire l' O_2 dissous présent en solution. La composition de l'hydrogel est de 90 %_m de polymère, 10 %_m de PEGDGE, pour une masse surfacique à sec totale Γ_{tot} de $63,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

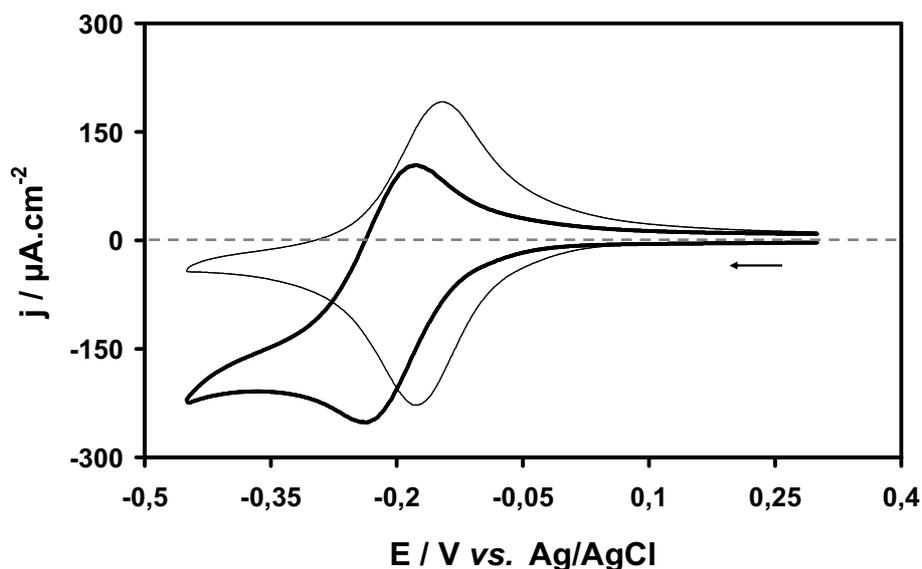


Figure 1. CV d'une électrode modifiée avec le polymère PVP-Os [$-0,17$ V] sous argon (trait fin) et saturation d' O_2 (trait épais). Γ_{tot} $63,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, 90 %_m polymère rédox, 10 %_m PEGDGE. Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 37 °C, 500 rpm, 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Les voltampérométries cycliques (CV) de l'électrode modifiée mesurés à $50 \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ sont présentés sur la Figure 1. Sous argon (trait fin), la réponse du polymère est classique, avec des pics quasi symétriques centrés autour du potentiel standard apparent de $-0,17$ V. Sous O_2 (trait épais), le voltampérométrie est modifiée, indiquant une probable interaction entre le polymère et l' O_2 . Les pics ne sont plus symétriques. Le courant de pic de réduction est plus important. La baisse de la valeur absolue du courant après le pic de réduction est

moins marquée. Or celle-ci dépend de la vitesse de déplétion de l'espèce électroactive consommée à la surface de l'électrode, ici le complexe oxydé Os^{3+} . De plus, l'amplitude du pic d'oxydation semble atténuée, tout particulièrement sa composante positive. Ces deux faits semblent indiquer une régénération des Os^{3+} (c.-à-d. une consommation des Os^{2+} produits à l'électrode) au sein de l'hydrogel. Cela implique une oxydation des Os^{2+} dans l'hydrogel au cours de la voltampérométrie sous O_2 , ce qui requiert parallèlement la réduction d'une espèce, ici l' O_2 . Cependant, la composante transitoire (c.-à-d. les pics) du polymère rédox reste importante par rapport au signal dû à la réduction de l'oxygène.

La Figure 2 présente les CV de l'électrode modifiée à différentes vitesses de balayage en potentiel (v_b). Diminuer cette dernière de 50 mV.s^{-1} à 1 mV.s^{-1} réduit les courants de pics tout en conservant globalement constant le courant de réduction de l' O_2 . A 10 mV.s^{-1} (trait fin), un léger courant positif demeure lors du balayage retour, indiquant qu'une fraction des Os^{2+} générés sur l'électrode n'a pas été réoxydée par l' O_2 . A 1 mV.s^{-1} (trait épais), aucun courant faradique positif n'est mesuré et les courants d'aller et de retour sont proches. On peut alors considérer le CV comme une courbe de polarisation de réduction de l' O_2 sur l'électrode modifiée. La validité de cette hypothèse d'état stationnaire du courant a été confirmée par chronoampérométries à potentiel constant dans la gamme des potentiels considérée.

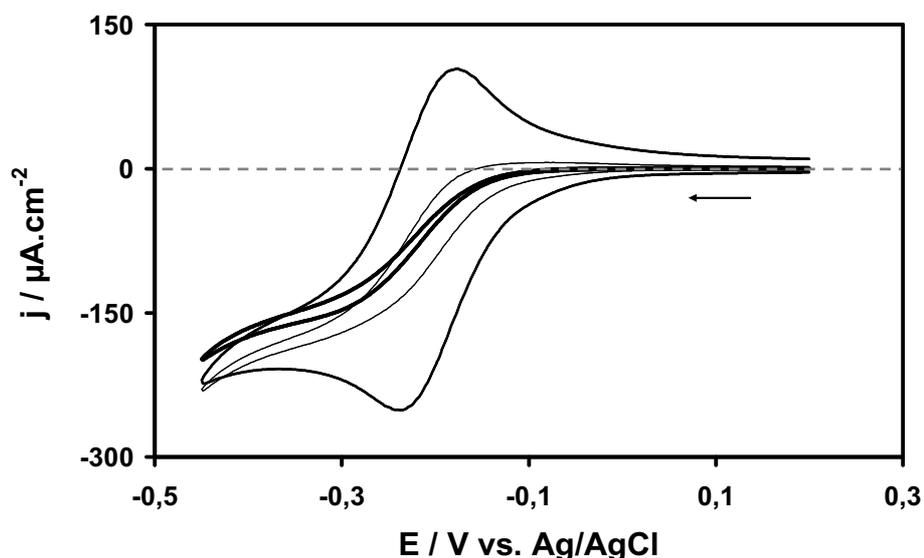


Figure 2. CV d'une électrode modifiée avec le polymère PVP-Os [$-0,17 \text{ V}$] sous saturation d' O_2 à 50 mV.s^{-1} (trait moyen), 10 mV.s^{-1} (trait fin), 1 mV.s^{-1} (trait épais). Tampon phosphate de sodium 100 mM , $\text{pH } 7,2$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm .

Ce polymère a déjà été utilisé avec la GOx dans des électrodes modifiées proposées pour des applications de biocapteurs ou de biopiles glucose-O₂. Ses qualités ont d'ailleurs été mises en avant dans plusieurs articles de revues récents [32, 34-36, 38, 44, 47, 48]. Si une interférence avec l'O₂ dissous a été observée, elle a toujours uniquement été attribuée à la réactivité de la GOx avec l'O₂, son médiateur naturel [22, 25, 27, 31, 49, 50]. Du fait de l'excellent transfert d'électrons entre ce polymère et la GOx, il a même été suggéré que son utilisation diminue l'interférence de l'O₂ puisque les électrons de la GOx, plus rapidement captés par le médiateur artificiel, sont moins sujets à la compétition de l'O₂ [22, 25, 32, 49, 50]. Cependant, l'éventualité d'une interférence de l'O₂ due à sa réduction sur les complexes Os²⁺ n'a pas été envisagée. Il s'agit donc d'étudier plus précisément ce phénomène avant d'en mesurer les éventuels effets défavorables pour des biocapteurs ou des biopiles.

1.2. Distinctions entre réduction de l'oxygène sur le médiateur et sur la surface de l'électrode

Un des avantages offerts par l'utilisation d'un hydrogel rédox est qu'il permet l'immobilisation d'enzymes dans une matrice conductrice tout en autorisant une excellente diffusion du substrat nécessaire à la biocatalyse [44]. Cependant, les autres espèces dissoutes peuvent aussi diffuser librement dans l'hydrogel si leur taille et leur charge le leur permettent. C'est le cas de l'O₂ [51, 52] qui peut donc atteindre la surface de l'électrode en traversant l'hydrogel. Les CV présentés précédemment ayant été réalisés à des potentiels relativement bas, il ne faut pas exclure la possibilité d'une électroréduction de l'O₂ dissous directement sur la surface en GC de l'électrode modifiée.

La Figure 3 (A) présente les CV d'une électrode en GC non modifiée, à 1 mV.s⁻¹, sous saturation d'argon ou d'O₂. Sous argon (trait noir), seul un léger courant capacitif est enregistré. Sous 1 atm d'O₂ (trait gris), l'O₂ est réduit sur la surface en GC pour des potentiels inférieurs à -0,2 V.

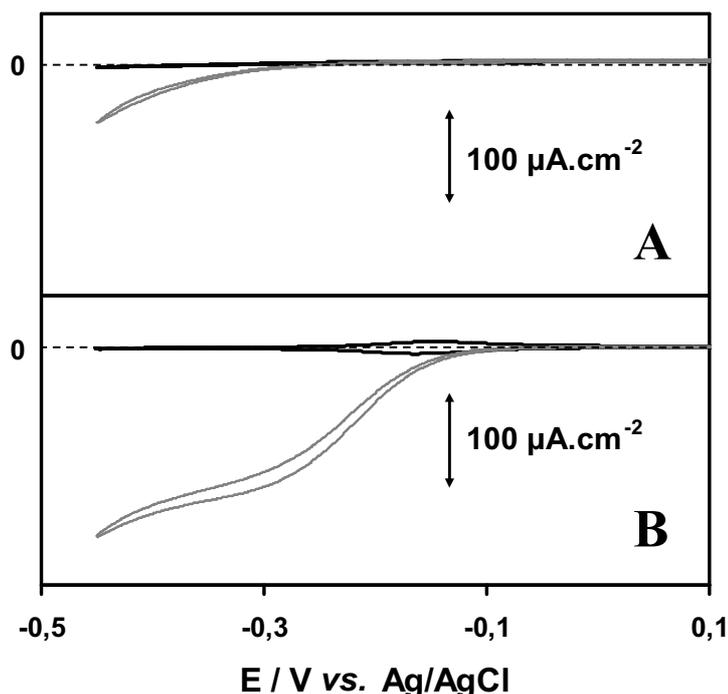


Figure 3. CV d'une électrode non modifiée (A) ou modifiée avec le polymère PVP-Os [$-0,17$ V] (B), sous saturation d'argon (trait noir) ou d' O_2 (trait gris). Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 37 °C, 500 rpm, 1 $mV \cdot s^{-1}$.

Des CV de l'électrode modifiée avec le polymère PVP-Os [$-0,17$ V] réticulé ont été réalisées dans les mêmes conditions (Figure 3 (B)). Sous argon et à 1 $mV \cdot s^{-1}$ (trait noir), les pics sont symétriques avec une faible différence de potentiel pic à pic ($15 \text{ mV} \pm 2$). La forme du CV est caractéristique de la réponse électrochimique d'un film fin contenant une espèce électroactive dont la réaction hétérogène est (quasi) réversible [53]. Etant donné que les complexes sont tout d'abord intégralement réduits puis oxydés lors du CV, l'intégration des pics permet d'obtenir la quantité de charges mises en jeu ($240 \pm 30 \mu C \cdot cm^{-2}$) et donc la quantité de complexes d'osmium effectivement connectés dans l'hydrogel ($2,5 \pm 0,3 \text{ nmol} \cdot cm^{-2}$).

Sous O_2 (trait gris), la réduction de l' O_2 commence légèrement à $\sim -0,05$ V, c'est-à-dire dès que des Os^{2+} sont disponibles (suite à leur génération sur l'électrode) pour réduire l' O_2 dissous. Le courant de réduction augmente jusqu'à un pseudo plateau compris entre $-0,3$ V et $-0,4$ V. Enfin, il augmente à nouveau plus rapidement pour les potentiels les plus négatifs. Cette nouvelle augmentation après une quasi-stagnation implique l'apparition d'un nouveau mécanisme de réduction de l' O_2 . La forme, l'amplitude et la dépendance au potentiel de cette dernière augmentation du courant sont très proches de celles observées sur l'électrode

de GC non modifiée. Cela suggère fortement que l'O₂ dissous qui n'a pas été réduit par les complexes au sein de l'hydrogel commence à être directement réduit sur la surface en GC de l'électrode modifiée.

Le courant délivré à $-0,3$ V par l'électrode modifiée est d'environ $-150 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ tandis qu'il n'est que de $-7 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ sur l'électrode non modifiée, témoignant de la prédominance de la réduction de l'O₂ sur les complexes d'osmium par rapport à une réduction directe de l'O₂ sur le GC. La Figure 4 illustre bien ce fait. Elle compare l'évolution des courants des électrodes modifiée ou non à $-0,3$ V, sous barbotage d'argon ou d'O₂ dans la cellule. Initialement, sous saturation d'argon, les deux électrodes présentent un courant quasi nul. Quand le barbotage d'O₂ est initié (aire grisée), la réponse en courant est immédiate et croît jusqu'à une valeur stationnaire, atteinte au bout d'une dizaine de minutes, lorsque la solution est saturée en O₂ dissous. De même, la désoxygénation de la solution peut être suivie en continu sous barbotage d'argon jusqu'à l'obtention d'un courant nul (seconde aire blanche). Le courant stationnaire sous O₂ est environ 15 fois supérieur pour l'électrode modifiée (trait noir discontinu) par rapport à l'électrode non modifiée (trait continu).

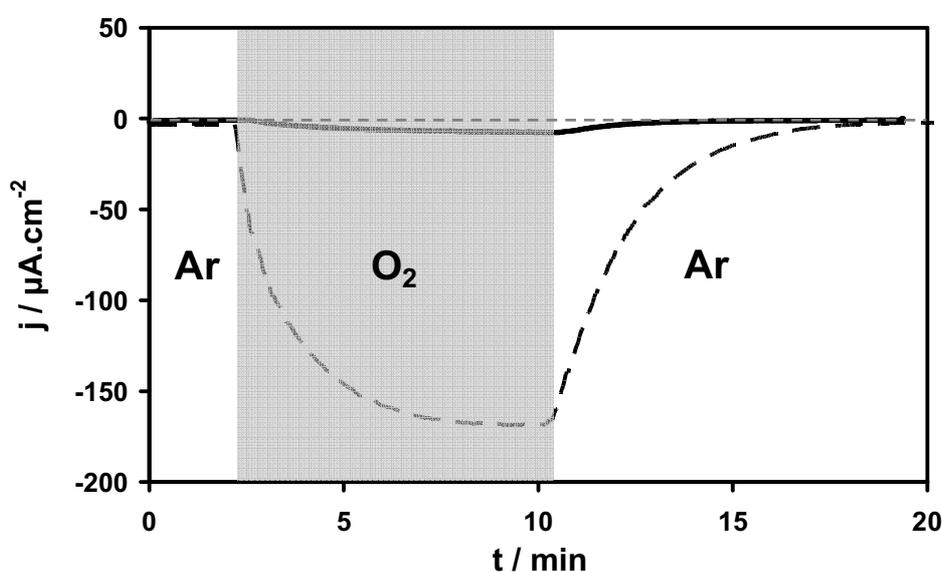


Figure 4. Chronoampérogrammes mesurés à $-0,3$ V, sous barbotages successifs d'argon (aire blanche) ou d'O₂ (aire grisée), d'une électrode en GC non modifiée (trait noir continu) et d'une électrode modifiée avec le polymère PVP-Os [$-0,17$ V] (trait noir discontinu). Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 37 °C, 500 rpm.

En conclusion, si la réduction directe de l'O₂ est possible sur le GC, la surtension d'électrode qu'elle nécessite est plus importante que sur l'électrode modifiée. Le courant ainsi

généralisé peut être considéré comme presque négligeable par rapport à celui induit par la catalyse des complexes d'osmium pour des potentiels supérieurs à $-0,3$ V.

1.3. Soustraction de la composante de réduction de l'oxygène sur le carbone vitreux, facteur limitant la densité de courant

1.3.1. Regard préliminaire sur le transfert de matière

Afin d'obtenir une courbe de polarisation caractéristique de la seule réduction de l'O₂ sur les complexes d'osmium, il convient de s'affranchir de la composante du courant de réduction directe de l'O₂ sur la surface en GC de l'électrode modifiée. Il est alors tentant de soustraire en tout point la valeur du courant traversant l'électrode non modifiée de celle mesurée avec l'électrode modifiée. Cependant, cela n'a de sens que si le courant de réduction directe de l'O₂ sur le GC de l'électrode modifiée est similaire au courant de réduction de l'O₂ sur le GC non modifié dans la gamme de potentiels considérée. Visuellement, cela semble être le cas. Plus rigoureusement, cela impliquerait alors que :

1°) Le transport de l'O₂ dans l'hydrogel est similaire à celui observé dans le tampon, hypothèse déjà admise dans la littérature [51, 52] et qui sera confirmée expérimentalement par la suite (cf. § 1.4.5., en faisant l'analogie entre l'O₂ et l'H₂O₂).

2°) Les paramètres cinétiques de la réduction de l'O₂ sur le GC ainsi que la surface effectivement disponible pour cette réduction ne sont pas ou peu modifiés par la présence de l'hydrogel. La Figure 5 compare les CV mesurés sous O₂ d'une électrode non modifiée (trait gris) et d'une électrode modifiée avec un polymère rédox ne réagissant pas avec l'O₂* (trait noir). Aux potentiels inférieurs à $-0,2$ V, les courants de réduction de l'O₂ sur le GC sont similaires pour les deux électrodes. Cela confirme non seulement l'équivalence en surface disponible pour la réduction de l'O₂, mais aussi que les paramètres cinétiques la régissant n'évoluent pas du fait de la modification.

* La réactivité de l'O₂ selon le type de polymère rédox mis en jeu est abordée ultérieurement (§ 2.).

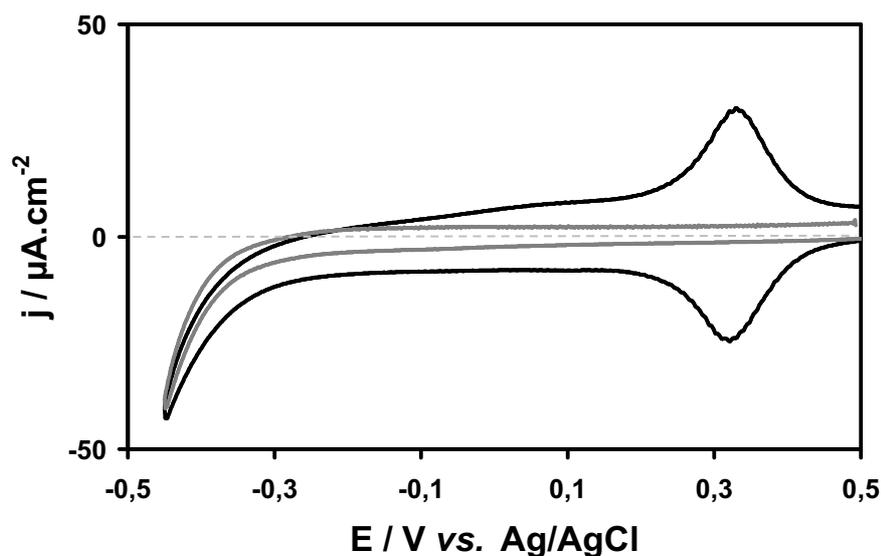


Figure 5. CV sous O_2 d'une électrode non modifiée et d'une électrode modifiée avec le polymère PAA-PVI-Os [+ 0,36 V] (non réactif à l' O_2). Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 37 °C, 500 rpm, 50 $mV.s^{-1}$.

3°) Pendant toute la durée de l'expérience, on peut considérer que les profils de concentrations stationnaires en O_2 aux abords de la surface en GC sont similaires pour une électrode modifiée ou non. Cela implique que la consommation d' O_2 due à sa réduction sur les Os^{2+} est faible en comparaison au flux interfacial d' O_2 maximal que pourrait supporter les conditions expérimentales dans le cas d'une consommation totale de l' O_2 atteignant l'électrode. Autrement dit, que la densité de courant due à la réduction de l' O_2 sur les Os^{2+} est faible relativement à la densité de courant limite de diffusion-convection prédit par la théorie de Levich pour une électrode plane non modifiée :

$$j_{\lim(O_2)} = -0,62nF[O_2]D^{2/3}\nu^{-1/6}\Omega^{1/2} \quad (\text{Eq. 3})$$

où, pour j en $A.cm^{-2}$, n est le nombre d'électrons échangés par molécule réduite, F la constante de Faraday ($96\,485\text{ C.mol}^{-1}$), $[O_2]$ la concentration en O_2 dissous au sein de la solution ($mol.cm^{-3}$), D le coefficient de diffusion de l' O_2 dans la solution ($cm^2.s^{-1}$), ν la viscosité cinématique de la solution ($cm^2.s^{-1}$), et Ω la vitesse de rotation de l'électrode tournante ($rad.s^{-1}$).

La valeur de n prête à discussion selon le processus de réduction de l' O_2 (cf. § 1.4.). Cependant, même en prenant la valeur minimale usuellement admise ($n = 2$ pour la réduction

en H_2O_2), la valeur de la densité de courant limite de diffusion-convection d' O_2 dans les conditions considérées (37°C , 1 atm O_2 , 500 rpm) est de $2,0 \text{ mA.cm}^{-2}$. Cette valeur est plus de dix fois supérieure à celle de la densité de courant traversant l'électrode modifiée, mesurée à $\sim 150 \mu\text{A.cm}^{-2}$ à $-0,3 \text{ V}$ (début du pseudo plateau attribué à la réduction sur les Os^{2+}). Ainsi, la densité de courant de réduction de l' O_2 sur les Os^{2+} n'est pas limitée (au sens strict du terme) par le transport en O_2 . Ceci était déjà prévisible du fait de la possibilité de la réduction additionnelle de l' O_2 sur le GC [54]. En outre, la différence d'un ordre de grandeur avec la densité de courant limite de diffusion-convection permet de conjecturer la similarité des profils de concentration en O_2 aux abords de la surface en GC que l'électrode soit modifiée ou non. En effet, ces profils sont probablement quasi plats et de concentration quasi égale à la concentration en O_2 du tampon dans la gamme de potentiels considérée. Dans ce cas, une variation des conditions de transport de l' O_2 ne devrait pas ou peu modifier la réponse en courant.

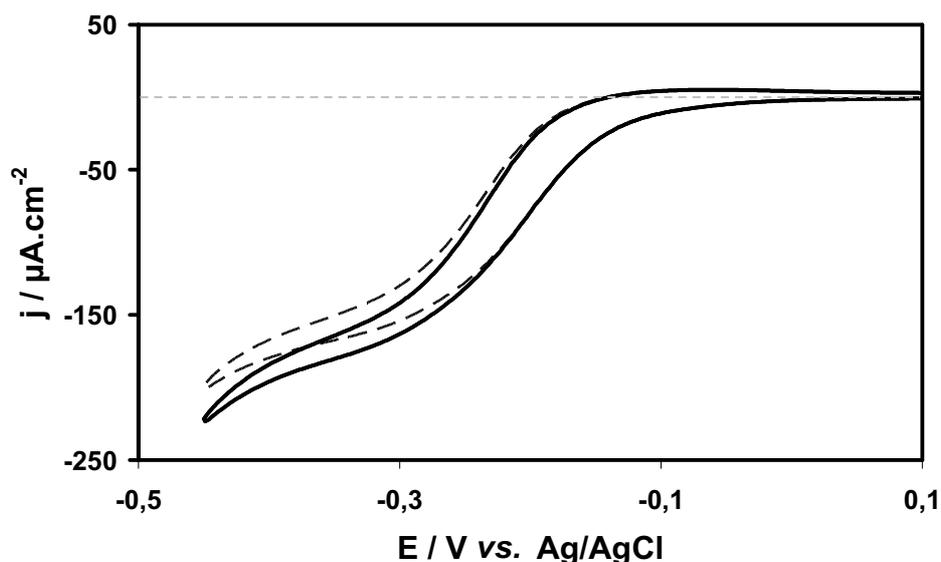


Figure 6. CV sous saturation d' O_2 d'une électrode modifiée avec le polymère PVP-Os [$-0,17 \text{ V}$] à 100 rpm (trait discontinu) et 1000 rpm (trait continu). Tampon phosphate de sodium 100 mM , $\text{pH } 7,2$, 37°C , 10 mV.s^{-1} .

La Figure 6 présente deux CV d'une électrode modifiée, sous saturation d' O_2 , pour des rotations de 100 rpm (trait discontinu) et 1000 rpm (trait continu). La variation du courant de plateau est faible, même pour le courant maximal (+ 11% à $+0,45 \text{ V}$). Or, selon la théorie de Levich et dans le cas d'une limitation par transfert de matière, l'accroissement d'un facteur dix de la vitesse de rotation entraînerait une augmentation de la densité de courant de 216% .

Ce résultat confirme la faible influence de l'amplitude du transfert de matière sur les courants mesurés, dans la mesure où un minimum de convection est toutefois assuré.

Ces différents résultats nous permettent donc de soustraire la courbe de polarisation sous O_2 de l'électrode non modifiée de celle de l'électrode modifiée, ceci afin d'obtenir une courbe de polarisation caractéristique de la seule réduction de l' O_2 sur les complexes d'osmium.

1.3.2. Analyse de la réduction de l'oxygène sur les complexes d'osmium

La Figure 7 présente la courbe de polarisation caractéristique de la seule réduction de l' O_2 sur les complexes d'osmium (soustraction de la courbe de l'électrode modifiée par la courbe de l'électrode non modifiée de la Figure 3). La forme sigmoïdale de la courbe est typique d'une courbe de polarisation de réduction d'une seule espèce électroactive sur la surface de l'électrode, ici les complexes Os^{3+} . La particularité du système est que les Os^{3+} ne sont pas transportés par diffusion-convection depuis le cœur de la solution, mais régénérés dans le volume de l'hydrogel *via* la réaction rédox avec l' O_2 (dont la concentration est maintenue à l'état stationnaire par la convection forcée). La légère baisse en valeur absolue du courant pour les potentiels les plus bas suggère que les trois hypothèses présentées dans le paragraphe précédant ne sont pas formellement vérifiées et que la présence de l'hydrogel diminue légèrement l'amplitude de la réduction de l' O_2 sur le GC. Cependant, cet écart est minime et ne semble pas remettre en cause le bien-fondé de la soustraction effectuée.

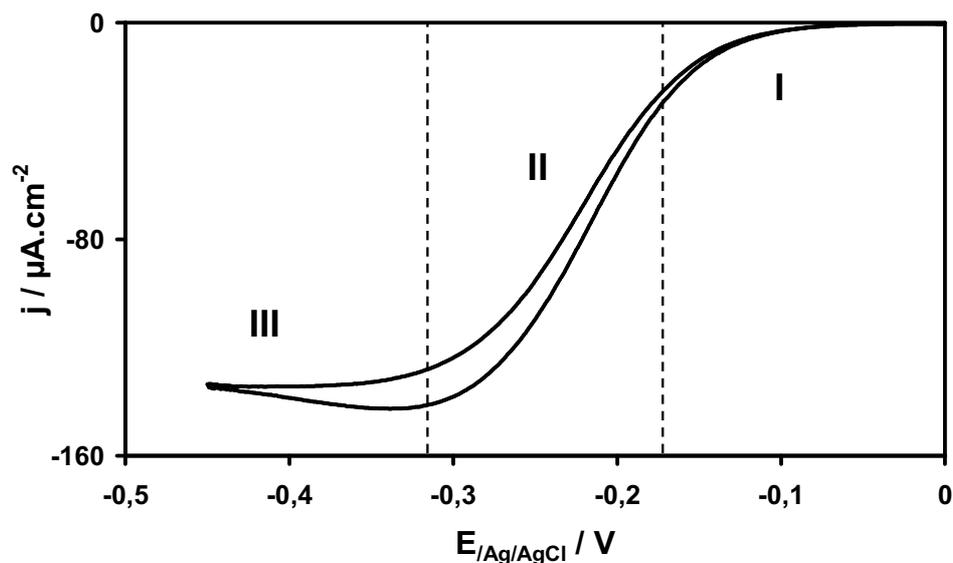


Figure 7. Courbe de polarisation caractéristique de la réduction de l' O_2 sur les complexes d'osmium du polymère PVP-Os $[-0,17 \text{ V}]$ (soustraction de la courbe de polarisation de l'électrode modifiée par celle de l'électrode non modifiée, présentées sur la Figure 3). Les trois domaines sont reportés depuis la représentation de Tafel correspondante (Figure 8).

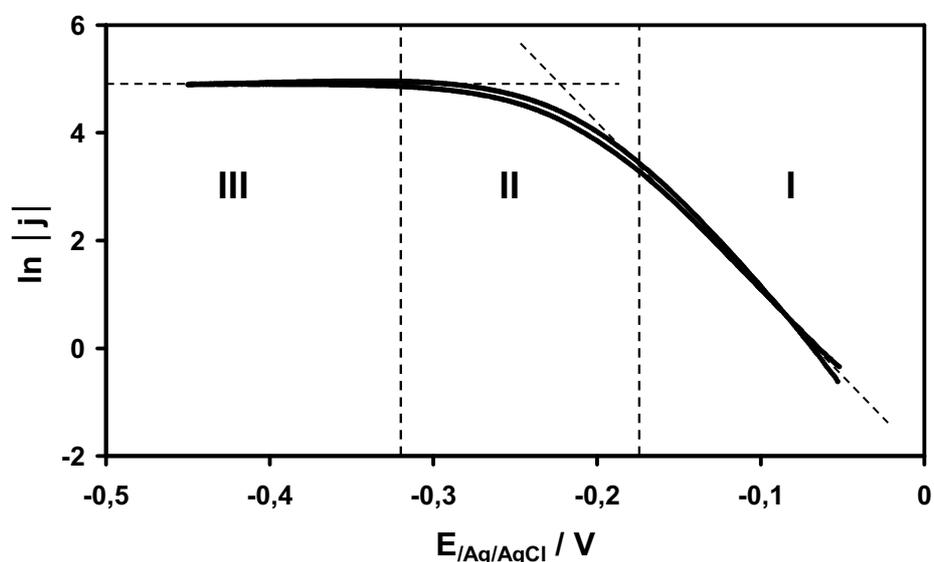
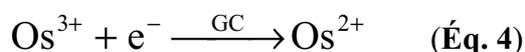


Figure 8. Représentation de Tafel de la courbe de la Figure 7. Domaine I : courant fortement dépendant de la vitesse de transfert électronique hétérogène. Domaine III : courant majoritairement limité par la cinétique de la réduction de l' O_2 sur les sites Os^{2+} . Domaine II : courant simultanément gouverné par les deux phénomènes.

Avant discussion, rappelons sommairement les différentes étapes intervenant dans la génération du courant de réduction stationnaire, soit *chronologiquement* :

- 1) transfert de l'O₂ par diffusion-convection jusqu'à l'hydrogel, puis dans son volume ;
- 2) réaction rédox entre l'O₂ et les Os²⁺ au sein de l'hydrogel ;
- 3) transferts électroniques successifs à travers l'hydrogel jusqu'à la surface de l'électrode par auto-échange entre formes oxydées et réduites du complexe d'osmium (transfert de charge analogue à une diffusion, selon de modèle de Dahms-Ruff [55-59]) ;
- 4) transfert électronique hétérogène : réduction de la forme oxydée du complexe d'osmium sur la surface en GC :



Nous avons prouvé que, sous saturation d'O₂, le transfert de matière n'avait que peu d'influence sur les valeurs de courant si tant est qu'un minimum de convection était assuré (cf. § 1.3.1.). Nous allons maintenant discuter quelles étapes limitent majoritairement* la vitesse globale (i.e. courant) de réduction de l'O₂ sur l'électrode modifiée, particulièrement au courant de plateau.

La Figure 8 est la représentation de Tafel de la courbe de polarisation de la Figure 7. Si le système étudié est différent, la forme de la courbe est similaire à celle obtenue pour une seule espèce électroactive en solution lorsque seule la forme oxydée de l'espèce est initialement présente [60]. Nous pouvons distinguer trois domaines :

- **Domaine I** : entre - 0,05 V et - 0,175 V. Une droite est observée, indiquant une augmentation exponentielle du courant avec la diminution du potentiel de l'électrode. De ce fait, le courant semble a priori uniquement limité par la vitesse de transfert électronique hétérogène (Eq. 4). La valeur absolue de la pseudo-pente** de Tafel $|p_T|$ ainsi obtenue est

* Il est difficile de parler ici d'étape cinétiquement déterminante et donc de limitation *stricto sensu*. En effet, le caractère volumique de la réaction rédox puis de la diffusion électronique induit des gradients de l'environnement rédox ([Os²⁺]/[Os³⁺]) dans l'hydrogel qui peuvent localement modifier les cinétiques de chaque processus. Les processus sont aussi rarement indépendants. Par exemple, améliorer les propriétés de *conduction électronique* de l'hydrogel permettant une consommation plus rapide des Os³⁺ pourrait induire une concentration moyenne d'Os²⁺ plus importante dans l'hydrogel, et donc plus de sites pour la réaction rédox avec l'O₂. Nous nous intéresserons donc au(x) processus influençant *majoritairement* le courant de réduction de l'O₂.

** Une représentation de Tafel est classiquement réalisée pour des espèces électroactives en solution, à forte convection forcée, permettant de minimiser une limitation du courant par le transport de matière. Pour un

de 75 mV.dec^{-1} . Pour huit différents polymères rédox à base d'osmium, Gallaway et Barton ont déterminé des pentes de Tafel comprises entre 37 et 95 mV.dec^{-1} par *fitting* de voltampérogrammes cycliques mesurés à 40°C [61], ce qui semblerait légitimer la valeur obtenue dans notre cas. Nous pensons cependant que ces neuf valeurs de pentes peuvent prêter à discussion. En effet, pour une réaction faisant intervenir un seul électron, l'expression formelle d'une pente de Tafel est :

$$|p_T| = \frac{RT \ln 10}{\alpha F} \quad (\text{en V.dec}^{-1}) \quad (\text{Eq. 5})$$

Les neuf valeurs précitées impliqueraient, à 40°C , des facteurs de symétrie de transfert électronique α compris entre $0,65$ et $1,68$. Or, par définition : $0 \leq \alpha \leq 1$. De plus, les auteurs émettent l'hypothèse de valeurs de pentes anodiques et cathodiques identiques en valeur absolue, autrement dit $\alpha = 0,5$ et, théoriquement, $|p_T| = 123 \text{ mV.dec}^{-1}$. Dans notre cas particulier, nous pensons que la valeur de la pente mesurée est *sous-estimée* dans la mesure où la cinétique de transfert électronique hétérogène est trop rapide (valeur de k° trop élevée, alors que l'observation d'une véritable droite de Tafel nécessite un transfert lent [62]). De ce fait, le courant faradique est probablement trop éloigné du courant de transfert électronique* et ne permet pas l'obtention d'une véritable droite de Tafel [60].

En conclusion, si le courant observé dans le domaine I est bien sûr dépendant de la vitesse de transfert électronique hétérogène (*i.e.* valeur du potentiel), il ne faut pas exclure l'effet des propriétés diffusionnelles de l'électron à travers l'hydrogel ainsi que la cinétique de régénération des Os^{3+} par réaction avec l' O_2 . Par contre, l'invariabilité des deux courbes de polarisation de la Figure 6 dans le domaine I confirme bien que les paramètres de transport de l' O_2 n'interviennent pas dans la valeur du courant, pour $\Omega \geq 100 \text{ rpm}$.

hydrogel rédox, il est difficile de prévoir des profils de concentration en espèces électroactives hors équilibre (courant non nul). Dans le cas présent, la droite obtenue est dans une gamme de potentiels supérieure ou égale au potentiel standard apparent du complexe rédox, pour un courant négatif, impliquant que la majorité des complexes est sous état oxydé au sein de l'hydrogel. Cependant, nous pensons qu'il serait hasardeux de conclure catégoriquement sur le caractère formel de la valeur déterminée. C'est pourquoi le terme « *pseudo pente* de Tafel » est a priori utilisé.

* Courant théorique que l'on mesurerait si la réaction électrochimique n'entraînait pas de variation des concentrations des espèces électroactives à l'interface de l'électrode (dans notre cas : 100 % de complexes oxydés), ce qui, hors équilibre, est impossible par définition (on peut cependant s'en rapprocher expérimentalement pour des faibles surtensions d'électrode, des cinétiques de transfert électronique lentes et des cinétiques de transfert de matière rapides) [60].

- **Domaine III** : potentiels inférieurs à $-0,32$ V. La valeur du courant atteint un plateau. Le potentiel de l'électrode, et donc la vitesse maximale de transfert électronique, ne modifient plus la vitesse globale de réduction. Le flux de diffusion des trous d'électrons est donc maximal et leur concentration interfaciale (c.-à-d. $[\text{Os}^{3+}]$) tend vers zéro. On pourrait donc parler, formellement, de *courant limite de diffusion*. Cependant, un courant limite de diffusion dépend non seulement des propriétés de transport de l'espèce électroactive (ici le coefficient de diffusion apparent des électrons D_e), mais aussi du profil de concentration de l'espèce électroactive à proximité de l'électrode. Dans le cas étudié, le profil de concentration stationnaire en trous d'électron (i.e. $[\text{Os}^{3+}]$) dans l'hydrogel est forcément dépendant de leur vitesse de production, et donc de la cinétique de la réaction rédox entre l' O_2 et les sites Os^{2+} . Entre l'aptitude du polymère rédox à conduire les électrons (D_e) et la cinétique de la réaction rédox, il s'agit de déterminer quel processus limite majoritairement la valeur du courant.

Précédemment, des hydrogels formés du polymère PVP-Os $[-0,17$ V] réticulé comprenant de la dGOx ou de la laccase ont permis d'obtenir des densités de courant catalytique largement plus importantes (respectivement $+1,3$ mA.cm⁻² [31] et $-2,4$ mA.cm⁻²). Etant donné que la présence d'enzyme diminue les propriétés de conduction électronique du polymère [63], cela laisse supposer que ce ne sont pas ces propriétés qui sont majoritairement limitantes mais plutôt la cinétique de production (respectivement consommation) des électrons.

Pour vérifier cette hypothèse dans le cas de la réduction de l' O_2 sur les complexes d'osmium, nous allons mesurer les densités de courant de plateau pour des électrodes modifiées sur lesquelles différentes quantités de polymère rédox PVP-Os $[-0,17$ V] réticulés à 10 % massique ont été déposées (Γ_{tot} de 5 à 200 $\mu\text{g.cm}^{-2}$). Préalablement, les quantités de complexes d'osmium effectivement connectés ont été déterminées par intégration des pics cathodiques de CV mesurés à faibles vitesses de balayage (≤ 5 mV.s⁻¹). La Figure 9 présente les densités de courant correspondantes mesurées à $-0,3$ V.

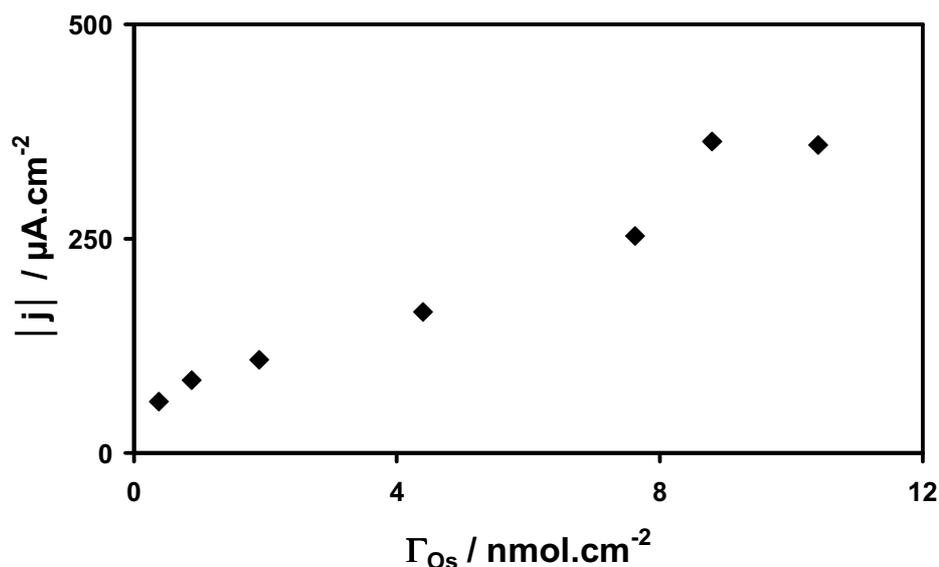


Figure 9. Evolution de la densité de courant de plateau de réduction de l' O_2 avec la quantité d'osmium déposée sur l'électrode. Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 37 °C, 500 rpm, saturation en O_2 , mesurée à $-0,3$ V.

Le courant de plateau évolue quasi linéairement avec la quantité d'osmium effectivement connectée. En admettant que l'aptitude du polymère à conduire les électrons (D_e) ainsi que la qualité du dépôt ne varient pas significativement avec la quantité de polymère déposé, on peut considérer que seule la quantité de sites Os^{2+} disponibles pour la réaction rédox varie. On peut donc en conclure que c'est la cinétique de la réaction rédox entre l' O_2 et les sites Os^{2+} qui limite majoritairement le courant de plateau. Notons, par analogie, que des modèles théoriques sur les réactions dans les polymères rédox concluent qu'une limitation par la cinétique de la réaction rédox doit induire une évolution linéaire du courant avec l'épaisseur du polymère [64, 65].

Un corollaire de notre conclusion est que la grande majorité des sites osmium est dans un état réduit Os^{2+} dans tout le volume de l'hydrogel, disponible pour la réduction de l' O_2 [66].

- **Domaine II** : entre $-0,32$ V et $-0,175$ V. La valeur du courant est ici simultanément gouvernée par les phénomènes décrits pour les domaines I et III.

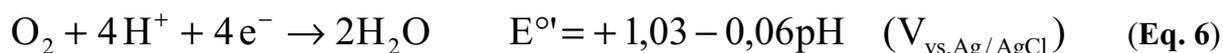
1.4. Espèces produites par la réduction de l'oxygène sur le polymère rédox

1.4.1. Généralités

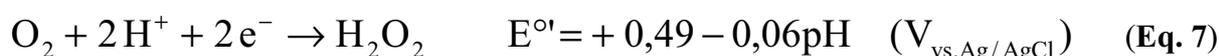
La réduction de l'O₂, quand elle est thermodynamiquement possible, est un processus dont la cinétique s'avère souvent être lente, réclamant des surtensions plus ou moins importantes selon les conditions et le matériau d'électrode. La liaison O=O de la molécule d'O₂ est une liaison forte (enthalpie de formation de - 498,7 kJ.mol⁻¹) [67]. La réduction en une étape de l'O₂ en deux molécules d'eau est particulièrement difficile car elle implique la rupture de cette liaison ainsi que l'apport simultané de quatre électrons. Selon les matériaux d'électrode (ou les médiateurs en solution) et les solvants employés, plusieurs autres mécanismes de réduction de l'O₂ ont été proposés. Ils peuvent mettre en jeu, entre autres, l'anion superoxyde O₂⁻, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, des étapes intermédiaires d'électrosorption (dans le cas d'une réduction hétérogène) et, bien sûr, des transferts de protons [68, 69]. Les recherches ont été conséquentes pour tenter de décrire formellement les réductions catalytiques de l'O₂, qu'elles soient *hétérogènes* (impliquant le matériau d'électrode dans le processus) ou *moléculaires* (employant des molécules dispersées en solution ou immobilisées sur l'électrode). Cependant, la complexité et la diversité des mécanismes pouvant intervenir limitent les consensus, et de nombreuses questions restent en suspens [66]. Les mécanismes réactionnels ne seront pas introduits dans le cadre de ce chapitre de thèse, dont la finalité est d'évaluer l'effet de la réduction de l'O₂ sur la réponse en courant de biocapteur à glucose.

En général, on propose deux voies simplifiées de réduction de l'O₂, qui peuvent d'ailleurs entrer en compétition [66] :

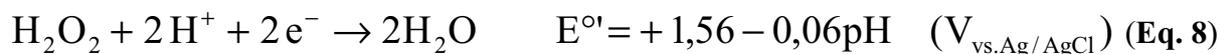
Réduction directe à quatre électrons :



Réduction à deux électrons :



Le H_2O_2 ainsi créé est par la suite susceptible de se réduire par un processus à deux électrons (on peut alors parler de mécanisme à « $2 + 2 \text{ électrons}$ » [66]) :



Dans le cas de la réduction de l' O_2 sur les complexes d'osmium utilisés dans cette étude, il est difficile d'envisager une réduction directe à quatre électrons étant donné que chaque complexe ne peut donner, a priori, qu'un seul électron. Un mécanisme à plusieurs étapes est donc très probable. Le caractériser est difficile et hors du cadre de cette thèse. Cependant, une technique simple permet de déterminer les produits de réduction de l' O_2 sur l'électrode modifiée. Elle tire parti de l'électrode tournante à disque et anneau.

1.4.2. Principe de l'électrode tournante à disque et anneau

Cette électrode est constituée d'un disque interne et d'un anneau externe, tout deux conducteurs et de nature variée, séparés par un anneau isolant (voir Schéma 1).

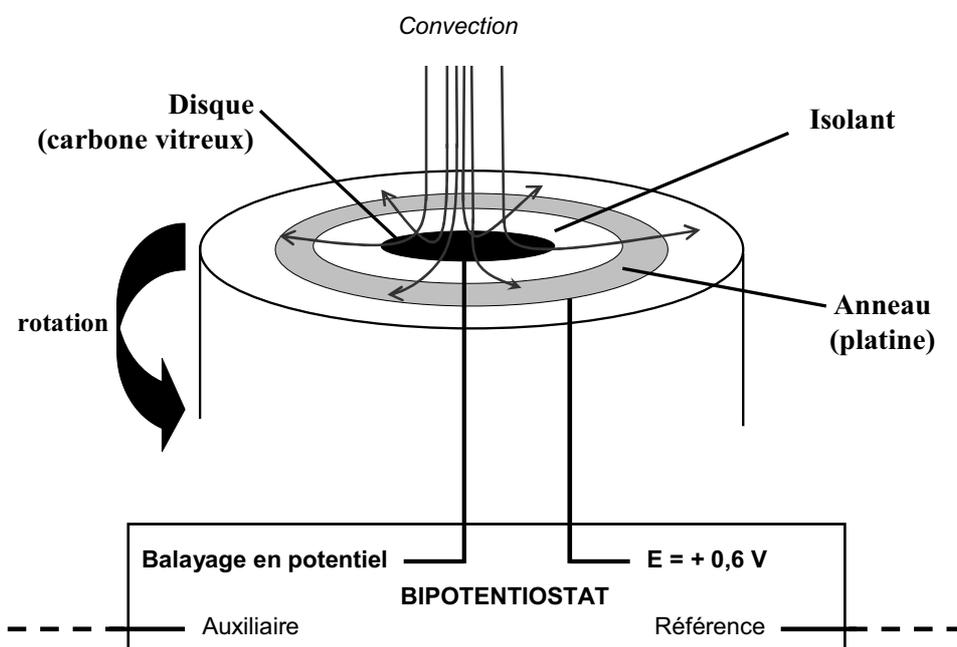


Schéma 1. Electrode tournante à disque et anneau (les matériaux d'électrodes ainsi que le protocole de détection correspondent au cas particulier de notre étude).

Les deux parties conductrices sont indépendamment reliées à un bipotentiostat. Elles constituent en fait deux électrodes de travail. Lors de son utilisation, la cellule électrochimique comporte alors quatre électrodes au total (référence + auxiliaire).

A l'instar d'une électrode à disque tournante standard, une rotation contrôlée de l'électrode permet d'atteindre un régime hydrodynamique stationnaire et de maîtriser le renouvellement des espèces électroactives sur la surface de l'électrode. Ce renouvellement s'effectue le long de la direction normale à la surface et le fluide est ensuite rejeté vers l'extérieur *via* des directions radiales. Ainsi, si la réaction électrochimique $A \pm n e^- \rightarrow B$ se produit sur le disque, l'espèce B est entraînée vers l'anneau et peut être étudiée électrochimiquement.

Si le potentiel de l'anneau est tel que la réaction de détection de l'espèce B est quantitative (courant contrôlé par le transfert de matière), on peut définir un rendement de capture N correspondant à la fraction d'espèce B produite sur le disque atteignant effectivement l'anneau par diffusion-convection. Dans le cas de la réaction inverse $B \rightarrow A \pm n e^-$ sur l'anneau, le rendement de capture est simplement la valeur absolue du rapport du courant mesuré sur l'anneau par celui mesuré sur le disque :

$$N = \left| \frac{i_{anneau}}{i_{disque}} \right| \quad (\text{Eq. 9})$$

Ce rendement ne dépend que des caractéristiques géométriques de l'électrode (rayon du disque, rayons interne et externe de l'anneau) ; il est donc unique pour un modèle donné. Afin de se placer dans des conditions identiques à celles de notre étude, deux électrodes à disque en GC et anneaux en platine seront utilisées.

1.4.3. Test préliminaire

Pour un type d'électrode disque-anneau, le constructeur donne un rendement de capture théorique. Un défaut de fabrication ou un vieillissement prématuré peuvent modifier cette valeur. Les rendements de capture des deux électrodes (AFMT28 et AFE7R9, Pine Instrument) sont donc vérifiés expérimentalement.

Pour ce faire, on réalise une étude dans une solution tampon désoxygénée à 0,1 M de phosphate de sodium pH 7,2 et 0,5 mM de ferricyanure de potassium. Sous convection contrôlée, on effectue un balayage négatif en potentiel du disque (5 mV.s^{-1}) tandis que le

potentiel de l'anneau est maintenu fixe à + 0,5 V, ce qui permet une oxydation complète du ferrocyanure atteignant sa surface. Dès qu'un courant de réduction du ferricyanure traverse le disque (+ 0,3 V), un courant d'oxydation du ferrocyanure ainsi généré traverse l'anneau (Figure 10). Le rapport des courants pris à différents potentiels permet d'obtenir la valeur du rendement de capture (Tableau 1).

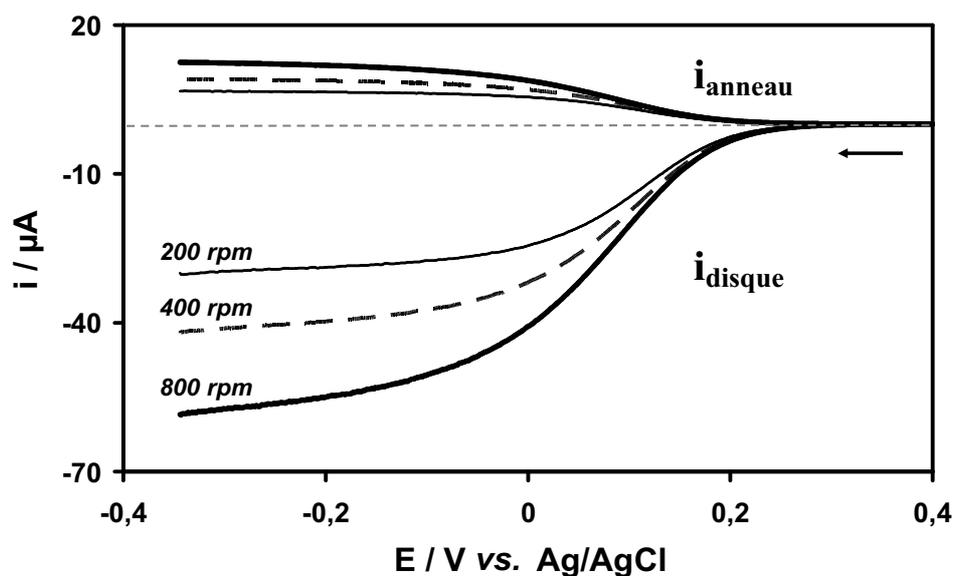


Figure 10. Mesures réalisées avec une électrode disque-anneau dans une solution à 0,5 mM de ferricyanure de potassium, pour différentes vitesses de rotation. Vitesse de balayage en potentiel du disque en GC à 5 mV.s^{-1} . Détection correspondante du ferrocyanure sur l'anneau en platine à + 0,5 V. Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

	- 0,15 V	- 0,20 V	- 0,25 V	\bar{N}
200 rpm	22,7%	22,8%	22,7%	22,7%
400 rpm	22,2%	22,2%	22,2%	22,2%
800 rpm	21,6%	21,6%	21,6%	21,6%

Tableau 1. Rendements de capture de l'électrode à disque-anneau AFMT28, obtenus pour différents potentiels de disque et différentes convections forcées, exprimé en %, d'après la Figure 10.

Il est intéressant de constater que la valeur du rendement de capture semble diminuer légèrement avec la rotation de l'électrode. Alors que le processus de diffusion de l'espèce n'évolue pas (intrinsèque à l'espèce, à la solution et à la température), le temps caractéristique d'expulsion du fluide hors de la surface de l'électrode diminue avec l'amplitude de la convection forcée. On peut donc imaginer qu'accroître la vitesse de rotation augmentera légèrement la fraction d'espèce électroactive évacuée radialement par convection sans avoir eu le temps nécessaire à leur diffusion normale jusqu'à l'anneau.

Cependant cette variation due à la rotation est faible. La moyenne des neuf rendements de capture mesurés (22,2 %) est très proche de la valeur théorique donnée par le constructeur (21,8 %).

Pour la seconde électrode disque-anneau (modèle AFE7R9) à 500 rpm, le rendement de capture est mesuré à $37,2 \pm 0,4$ % pour une valeur théorique de 37 %. La très bonne corrélation entre les prédictions théoriques et les valeurs expérimentales permettent d'étudier les produits de la réduction de l'oxygène sur le polymère rédox.

1.4.4. Etude avec disque modifié

De la même manière, un balayage en potentiel est effectué sur le disque en GC modifié ou non avec le polymère rédox, sous saturation d'O₂. Parallèlement, le potentiel de l'anneau en platine est fixé à + 0,6 V. Ce potentiel est suffisamment élevé pour oxyder quantitativement le H₂O₂ éventuellement produit sur le disque atteignant la surface de l'anneau. Il est par contre trop faible pour oxyder l'eau, second produit possible de la réduction de l'O₂ et, soit dit en passant, solvant de notre électrolyte.

Sur le disque non modifié (traits discontinus, Figure 11), un courant de réduction de l'O₂ est mesuré pour des potentiels inférieurs à - 0,2 V. Symétriquement, un courant d'oxydation est mesuré sur l'anneau en platine, démontrant une production de H₂O₂ sur le GC. Dans toute la gamme de potentiels comprise entre - 0,2 V et - 0,37 V, le rendement de capture est de 35 ± 2 %. Cette valeur, très proche des 37 % théoriques, confirme que l'O₂ est très majoritairement réduit en H₂O₂ sur le GC dans les conditions considérées, ceci sans réduction additionnelle du H₂O₂ ainsi généré.

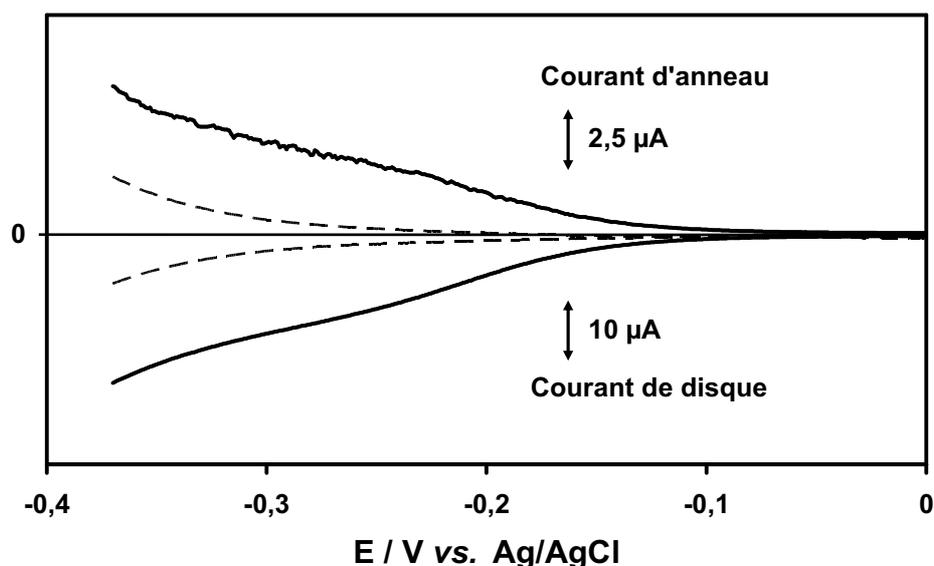


Figure 11. Mesures réalisées sous saturation d' O_2 avec l'électrode disque-anneau pour le disque non modifié (traits discontinus) et modifié (traits continus). Vitesse de balayage en potentiel du disque à $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Détection correspondante du H_2O_2 sur l'anneau à $+0,6 \text{ V}$. Tampon phosphate de sodium 100 mM , $\text{pH } 7,2$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm .

Quand le disque est modifié avec le polymère PVP-Os [$-0,17 \text{ V}$] réticulé (traits continus, Figure 11), un courant de réduction de l'oxygène est mesuré sur le disque pour des potentiels inférieurs à $-0,1 \text{ V}$. Comme prévu, le courant de réduction s'accroît plus rapidement que sur le carbone vitreux. Du fait de la diffusion de l' O_2 à travers l'hydrogel puis de sa réduction directe sur le GC, l'augmentation du courant de réduction pour les potentiels inférieurs à $-0,3 \text{ V}$ semble calquée sur celle mesurée avec l'électrode non modifiée. Sur l'anneau en platine, un courant d'oxydation du H_2O_2 est parallèlement mesuré dès que la réduction de l' O_2 débute sur le disque modifié à $-0,1 \text{ V}$. Ceci implique donc que l' O_2 se réduit en H_2O_2 sur les complexes d'osmium. Enfin, le rendement de capture est ici de $27 \pm 2 \%$ dans toute la gamme de potentiels compris entre $-0,2 \text{ V}$ et $-0,37 \text{ V}$. Cette valeur est inférieure à la valeur théorique de 37% , ce qui permet d'émettre plusieurs hypothèses :

1) Rappelons que le processus de génération du H_2O_2 est différent sur l'électrode modifiée de celui observé sur l'électrode non modifiée. Pour la première, la production d' H_2O_2 s'effectue majoritairement dans le volume de l'hydrogel. Pour la seconde, cette production est uniquement réalisée sur la surface plane de l'électrode en GC. On pourrait donc émettre l'hypothèse qu'une modification des propriétés hydrodynamiques due à la présence de l'hydrogel induise une baisse de la fraction d' H_2O_2 atteignant l'anneau. Cependant, on peut

aussi envisager un transport du H_2O_2 à travers l'hydrogel quasi identique à celui intervenant en solution, comme il l'a été précédemment fait pour l' O_2 [51, 52]. Cette hypothèse est discutée dans le paragraphe suivant (§ 1.4.5.) ;

2) une fraction de l' H_2O_2 produit pourrait être consommée dans l'hydrogel avant d'atteindre l'anneau et donc baisser la valeur du rendement de capture. Cette consommation pourrait avoir deux origines :

(i) la dismutation du H_2O_2 , qui pourrait être catalysée par des composés de l'hydrogel (discuté au § 1.4.5.)



(ii) la réduction du H_2O_2 en eau sur l'électrode modifiée (Eq. 8), induisant non seulement une baisse du courant mesuré à l'anneau, mais aussi une augmentation du courant de réduction mesuré sur le disque. Cette possibilité est étudiée dans le § 1.4.6. ;

3) si les hypothèses précédentes étaient infirmées, il serait alors temps d'envisager qu'une fraction de l' O_2 est réduite par un procédé direct à quatre électrons (Eq. 6). Cependant, cette hypothèse semble difficilement concevable du fait, entre autre, de la très faible probabilité de rencontre simultanée entre la molécule d' O_2 et quatre complexes d'osmium réduits.

1.4.5. Transport de matière dans l'hydrogel et absence de dismutation

Afin d'étudier le transport du H_2O_2 à travers l'hydrogel, son oxydation est comparée sur une électrode tournante de platine non modifiée ou modifiée avec le polymère rédox, dans un tampon désoxygéné. Le platine est utilisé pour ses propriétés catalytiques. Il permet une oxydation quantitative du H_2O_2 à un potentiel raisonnable où la densité de courant ne dépend que des phénomènes de transport du H_2O_2 (courant limite de diffusion-convection). Fixé à +0,6 V, le potentiel de l'électrode permet aussi d'entièrement oxyder les complexes d'osmium de l'électrode modifiée préalablement aux ajouts de H_2O_2 dans la solution. Ainsi, aucun complexe réduit n'est à même de réduire le H_2O_2 traversant l'hydrogel. Seul un effet sur le transport de matière est alors susceptible d'être détecté.

Notons que le dépôt de l'hydrogel est moins homogène sur l'électrode de platine par rapport à un dépôt sur GC traité au plasma. Une fraction de la surface n'est pas recouverte par l'hydrogel. Un effet est toutefois attendu si l'hydrogel ralentit le transport du H_2O_2 .

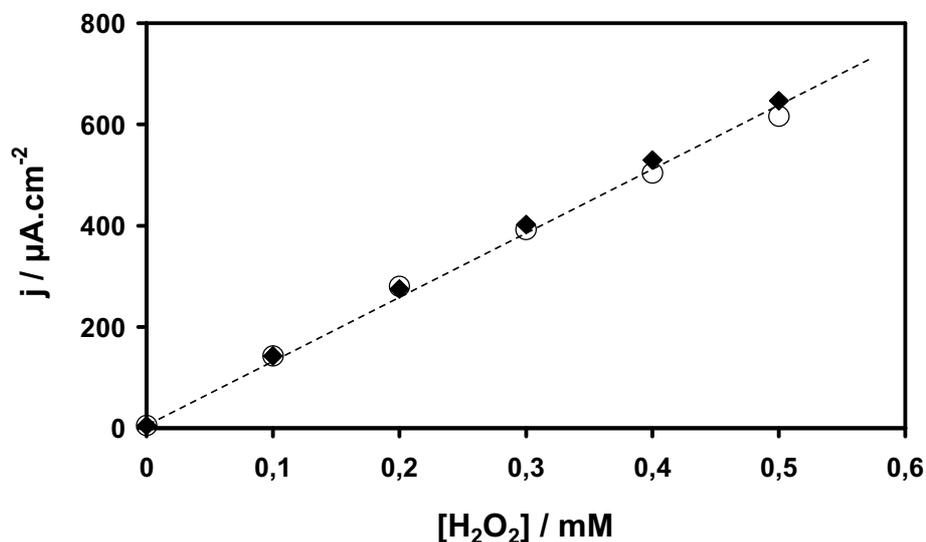


Figure 12. Courbes de calibration du H_2O_2 par une électrode de platine non modifiée (cercles vides) et modifiée avec le polymère PVP-Os [- 0,17 V] (losanges pleins). Tampon phosphate de sodium 100 mM sous argon, pH 7,2, 37 °C, 500 rpm, + 0,6 V.

La Figure 12 présente la réponse en courant à + 0,6 V des deux électrodes selon la concentration en H_2O_2 , sous barbotage d'argon. Les valeurs obtenues pour l'électrode modifiée (losanges noires) sont quasiment identiques à celles de l'électrode de platine (cercles). Ainsi l'hydrogel ne semble pas entraver le transport du H_2O_2 jusqu'à l'électrode dans les conditions considérées (masse surfacique à sec de $63,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ dont 10 % massique d'agent réticulant PEGDGE)*.

De plus, cette invariabilité des courants de diffusion-convection suggère que les composés de l'hydrogel ne catalysent pas sensiblement la dismutation du H_2O_2 lors de son transport vers l'électrode, auquel cas les courants mesurés avec l'électrode modifiée seraient plus faibles que ceux de l'électrode non modifiée.

* Ce résultat a précédemment été mis à profit pour émettre l'hypothèse d'un transport de l' O_2 non modifié par la présence de l'hydrogel (§ 1.3.1.). L'analogie avec le H_2O_2 semblant légitime, dans la mesure où les deux molécules sont électriquement neutres et où la molécule d' O_2 est plus petite que celle de H_2O_2 .

1.4.6. Réduction du peroxyde d'hydrogène sur l'électrode modifiée

Récemment, Salimi *et al.* ont observé une réduction du H_2O_2 sur une électrode modifiée avec des nanotubes de carbone sur lesquels a été adsorbé un complexe rédox d'osmium ($E^{\circ'} = -0,07 \text{ V}$). Ils ont mis en évidence le rôle du complexe dans cette réduction [42]. En 2004, Abe *et al.* ont détecté la réduction du H_2O_2 sur un complexe d'osmium de $E^{\circ'}$ égal à $-0,1 \text{ V}$. Ils ont souligné que la cinétique de réduction du H_2O_2 était plus lente que celle de l' O_2 [43].

Pour vérifier l'éventualité de la réduction du H_2O_2 sur le polymère rédox, les CV des électrodes, modifiée ou non, ont été réalisés en présence ou absence de H_2O_2 , dans un tampon désoxygéné (Figure 13).

Seul un courant capacitif est mesuré pour l'électrode en GC non modifiée (trait fin discontinu). En présence de 2 mM de H_2O_2 , ce dernier se réduit très légèrement sur l'électrode pour des potentiels inférieurs à $-0,35 \text{ V}$ (trait fin continu).

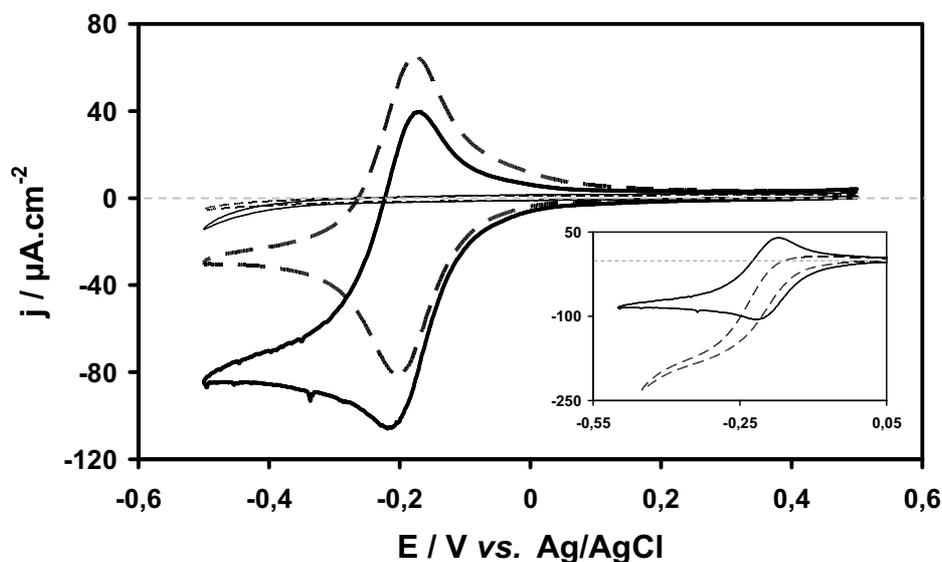


Figure 13. CV d'une électrode de GC non modifiée (traits fins) et modifiée avec le polymère PVP-Os [$-0,17 \text{ V}$] (trait épais) en absence (traits discontinus) et présence (traits continus) de 2 mM de H_2O_2 . Tampon phosphate de sodium 100 mM sous argon, $\text{pH } 7,2$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. **En insert :** comparaison du voltampérométrie de l'électrode modifiée dans 2 mM de H_2O_2 (trait continu) et $1,07 \text{ mM}$ d' O_2 (trait discontinu).

Pour l'électrode modifiée, la présence de 2 mM de H₂O₂ (trait épais continu) modifie la forme du CV. Pour les mêmes raisons que précédemment explicitées (cf. § 1.1.), cela implique que le H₂O₂ se réduit sur les Os²⁺ dans le volume de l'hydrogel. Il est intéressant de constater que malgré une vitesse de balayage relativement faible (10 mV.s⁻¹) et une concentration en H₂O₂ relativement importante, la forme du voltampérogramme reste particulièrement tributaire de la composante transitoire (c.-à-d. les pics) du polymère rédox plutôt que de la composante stationnaire (c.-à-d. la sigmoïde) de la réduction d'H₂O₂. Ce fait reflète une cinétique de réduction du H₂O₂ sur les Os²⁺ relativement lente. La comparaison des CV mesurés à 10 mV.s⁻¹ dans 2 mM de H₂O₂ (trait continu) ou 1,07 mM d'O₂ dissous (trait discontinu) est présentée en insert. La différence illustre une cinétique plus rapide pour la réduction de l'O₂ que pour celle du H₂O₂. Cela confirme les mesures expérimentales de Abe *et al.* [43]. Il est intéressant de rappeler que la réduction du H₂O₂ en eau est pourtant plus favorable thermodynamiquement que celle de l'O₂ en H₂O₂. Selon Savéant, le fait que la cinétique de la première soit plus lente reflète probablement la difficulté de rompre la liaison O–O du H₂O₂ [66].

1.4.7. Fraction de peroxyde d'hydrogène réduit

Considérant que la seule cause de l'obtention d'un rendement de capture inférieur à la valeur théorique maximale est la réduction du H₂O₂ dans l'hydrogel, il est possible d'évaluer la fraction x d'H₂O₂ réduit dans l'hydrogel avant d'atteindre l'anneau. Par souci de simplification, toutes les valeurs de courant sont considérées en valeur absolue. De plus, chaque réaction mettant en jeu le même nombre d'électrons ($n = 2$), on peut directement faire l'analogie entre courant et quantité de matière consommée ou produite.

Le courant total mesuré sur le disque (I_{disque}) est la somme du courant de réduction de l'O₂ (I_{O_2}) et du H₂O₂ ($I_{H_2O_2}$) consécutivement produit :

$$I_{disque} = I_{O_2} + I_{H_2O_2} \quad (\text{Eq. 11})$$

Le courant de réduction du H₂O₂ sur le disque est une fraction x du courant de réduction de l'O₂ (x est la fraction de H₂O₂ – produit par réduction de O₂ – qui se réduit sur le disque) :

$$I_{H_2O_2} = x \cdot I_{O_2} \quad \text{avec} \quad 0 \leq x \leq 1 \quad \text{(Eq. 12)}$$

En supposant l'absence de modification des propriétés hydrodynamiques dans l'hydrogel (cf. § 1.3.5.), la quantité de H_2O_2 qui s'oxyde sur le disque est par définition le produit du rendement de capture théorique N par la quantité de H_2O_2 qui quitte le disque. Cette quantité est la différence entre la quantité de H_2O_2 produite (via I_{O_2}) et celle consommée (via $I_{H_2O_2}$) :

$$I_{anneau} = N(I_{O_2} - I_{H_2O_2}) \quad \text{(Eq. 13)}$$

Ainsi, en divisant l'Equation 13 par l'Equation 11, puis en substituant $I_{H_2O_2}$ par son expression de l'Equation 12, on obtient :

$$\frac{I_{anneau}}{I_{disque}} = N \frac{1-x}{1+x} \quad \text{(Eq. 14)}$$

On peut remarquer les valeurs remarquables :

- $x = 1 \Leftrightarrow I_{anneau} = 0$ (tout le H_2O_2 produit dans l'hydrogel y est consommé)
- $x = 0 \Leftrightarrow \frac{I_{anneau}}{I_{disque}} = N$ (pas de réaction du H_2O_2 dans l'hydrogel, on retrouve la définition originelle du coefficient de capture)

Expérimentalement nous avons mesuré $\frac{I_{anneau}}{I_{disque}} = 0,27 \pm 0,02$, ce qui donne une fraction x

de 16 ± 4 % de H_2O_2 réduit dans l'hydrogel. Il va de soi que cette valeur est particulièrement dépendante des conditions de mesures considérées. En effet chaque paramètre (rotation, T, pH, force ionique, p_{O_2} , etc.) peut modifier la structure de l'hydrogel, les propriétés hydrodynamiques en dehors et dans l'hydrogel, comme les cinétiques des différentes réactions électrochimiques mises en jeu.

Remarquons enfin que le nombre global d'électrons captés par molécule d' O_2 se réduisant dans l'hydrogel est de :

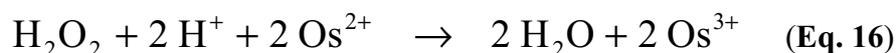
$$n_{\text{electron}} = 2 + 2x \quad \text{soit dans le cas précité :} \quad n_{\text{electron}} \approx 2,3$$

1.4.8. Conclusion

L'O₂ dissous se réduit sur les Os²⁺ en produisant du H₂O₂. Le bilan de la réaction peut être traduit par :



Une fraction du H₂O₂ ainsi produit peut lui même être réduit par les Os²⁺ :



Cette fraction sera particulièrement dépendante de la vitesse de transport du H₂O₂ hors de l'hydrogel redox. Une fraction plus importante devrait entraîner une interaction accrue de l'O₂ dissous sur une mesure ampérométrique en glucose (augmentant le nombre d'électrons globalement captés par O₂ réduit). La cinétique de réduction du H₂O₂ sur les complexes est toutefois moins rapide que celle de l'O₂.

Enfin cette étude permet de conjecturer deux possibles inconvénients supplémentaires d'une réactivité du polymère redox avec l'O₂, que ce soit dans le cas d'un biocapteur ou d'une anode de biopile à base de GOx. En effet, la compétition de l'O₂ pour les électrons de la GOx génère du H₂O₂. Il est alors possible que :

1) le H₂O₂ produit par la GOx se réduise sur les complexes d'osmium, diminuant le courant catalytique et par conséquent la puissance d'une biopile ou la sensibilité d'un biocapteur ;

2) si les complexes d'osmium génèrent plus de H₂O₂ qu'ils n'en consomment, alors la concentration locale en H₂O₂ va être accrue. Le H₂O₂ peut alors dégrader la stabilité de l'enzyme [26, 70, 71], voire du polymère redox [72], et donc la durée de vie du dispositif.

Notons que si une enzyme ne générant pas de H₂O₂ est utilisée à la place de la GOx (par exemple la GDH), seule la seconde hypothèse est encore envisageable.

2. INFLUENCE DU POTENTIEL STANDARD DU COMPLEXE D'OSMIUM

Nous avons précédemment prouvé que la cinétique de la réaction rédox entre l'O₂ et les complexes d'osmium était le facteur gouvernant majoritairement la densité de courant de plateau de réduction de l'O₂ sur une électrode modifiée avec le polymère PVP-Os [- 0,17 V]. Généralement, la faisabilité ainsi que la force motrice d'une réaction rédox dépendent de la différence de potentiels entre les deux couples mis en jeu. Il est donc vraisemblable que le potentiel standard du complexe d'osmium greffé puisse avoir une influence majeure sur l'occurrence et la densité de courant de plateau de la réduction de l'O₂.

2.1. Electrode modifiée simultanément avec deux polymères de potentiels standards largement différents

Il apparaît dans la littérature que les polymères rédox à base d'osmium, synthétisés pour d'éventuelles applications biopile ou biocapteur utilisant la GOx, présentent des potentiels standard apparents de plus en plus faibles au fil des recherches*. De + 0,35 V en 1990 [26], la valeur de E°' atteint - 0,19 V en 2003 [50, 73], avec une évolution globalement décroissante de E°' dans le temps [24, 41, 74-79]. A chaque fois qu'un effet de l'O₂ sur le courant d'oxydation du glucose a été détecté, il a été attribué à sa réactivité avec la GOx :



sans prendre en compte une éventuelle réactivité avec le médiateur rédox malgré l'utilisation de médiateurs de plus en plus réducteurs :



Pour mettre en exergue l'effet du E°' du polymère rédox sur sa réactivité avec l'O₂, une électrode a été modifiée par un mélange réticulé de deux polymères rédox dont les E°'

* De fait, nous avons vu que l'objectif d'un E°' de médiateur plus faible est soit une tension plus importante pour une biopile, soit, dans le cas d'un biocapteur à glucose, une meilleure sélectivité en limitant l'oxydation d'espèces interférentes.

sont proches des deux *extrêmes* précités : le PVP-Os [$-0,17$ V]^{*} et le PAA-PVI-Os [$+0,36$ V]. La Figure 14 présente les voltampérogrammes cycliques à faible vitesse de balayage ($5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) de l'électrode modifiée sous saturation d'argon, d'air et d' O_2 .

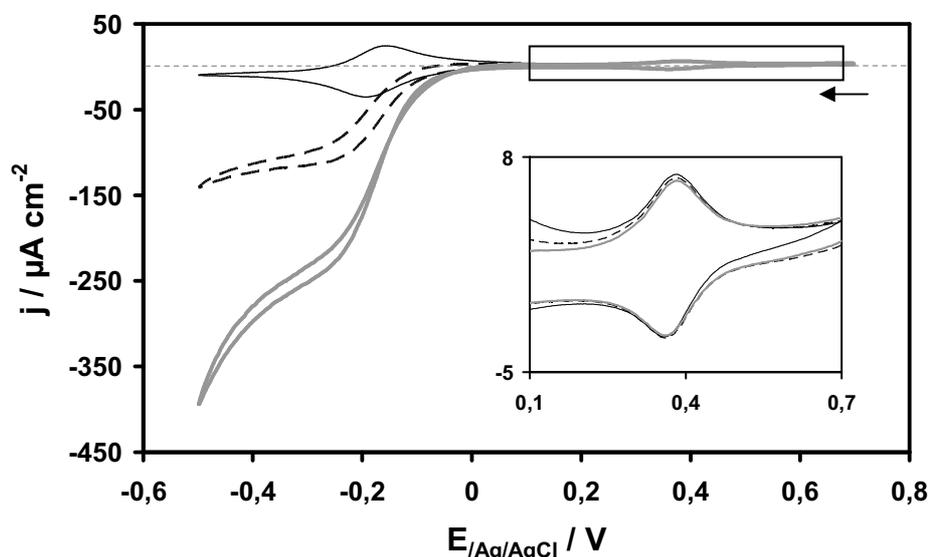


Figure 14. CV d'une électrode modifiée par un mélange de polymères PVP-Os [$-0,17$ V] et PAA-PVI-Os [$+0,36$ V] réticulés. Sous argon (trait fin), air (trait discontinu) et O_2 (trait gris épais). Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 37°C , 500 rpm, $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. **En insert :** zoom sur les pics caractéristiques du PAA-PVI-Os [$+0,36$ V].

Malgré une masse identique de chaque polymère dans la constitution initiale de l'hydrogel (réticulé à 10 %_m de PEGDGE, $\Gamma_{\text{tot}} = 200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), la réponse sous argon du polymère le plus oxydant (voir zoom) est environ dix fois inférieure à celle du PVP-Os [$-0,17$ V]. Cela peut refléter d'une part une fraction massique en complexe d'osmium plus faible pour ce polymère, d'autre part une réticulation moins efficace et donc la *fuite* d'une partie de ce polymère lors de la première plongée de l'électrode (parfois observée pour ce polymère). Cependant, une fois que la réponse sous argon est bien stabilisée (après ~ 3 CV), la différence d'un ordre de grandeur n'est pas gênante pour l'interprétation des résultats.

* Il s'avère que le PVP-Os [$-0,17$ V] est en fait le même polymère que celui précité de E° égal à $-0,19$ V des références [22, 38, 50, 73]. Outre les incertitudes de mesures, il est avéré que le E° d'un polymère rédox peut légèrement varier selon son degré de réticulation [80], la force ionique et le pH de la solution [44], la nature des ions en solution [22], ainsi que la présence ou non d'enzyme. La valeur de $-0,17$ V avancée ici est celle obtenue avec nos propres conditions expérimentales.

Sous argon, la vitesse de balayage est assez lente pour permettre une oxydation ou réduction totale d'un complexe avant d'atteindre un potentiel permettant la réaction du second. Ainsi, la forme oxydée du complexe Os [+ 0,36 V] n'est jamais en présence de la forme réduite du complexe Os [-0,17 V], et aucun échange électronique ne peut avoir lieu entre les deux complexes respectifs.

Sous air puis O₂, les réponses caractérisant l'Os [+ 0,36 V] restent invariantes par rapport au milieu anaérobie, prouvant sa non réactivité avec l'O₂. Au contraire, les courbes de polarisation de réduction de l'O₂ sont bien présentes pour l'Os [- 0,17 V]. Pour ce dernier, passer d'une saturation d'air à une saturation d'O₂ augmente fortement la densité de courant de plateau, comme le laissait présumer une limitation du courant majoritairement due à la cinétique de réaction entre l'O₂ et le complexe d'osmium (cf. § 1.3.2.).

Il est intéressant de constater que le potentiel standard apparent (pH 7,2) du couple rédox de l'O₂ mis en jeu dans la réaction est $E^{\circ}_{O_2/H_2O_2} = + 0,06$ V. Ainsi, la réactivité (ou non) de l'O₂ avec un complexe d'osmium dont le E° du couple est largement inférieur (ou supérieur) reflète bien les prédictions thermodynamiques de la réaction en question.

Si cette étude met en évidence l'effet du E° du complexe d'osmium sur l'occurrence d'une réactivité avec l'O₂, nous allons maintenant tenter d'évaluer son effet sur la cinétique de la réaction rédox.

2.2. Cinétique de la réaction en fonction du potentiel standard du complexe

2.2.1. Evolution exponentielle de la cinétique de réaction avec la baisse de E°

Afin d'évaluer l'effet du potentiel standard du complexe d'osmium sur la cinétique de réduction de l'O₂, nous allons tester différents polymères à base d'osmium dans toute la gamme de E° précédemment utilisée pour des anodes de biopiles glucose-O₂ et/ou biocapteurs de deuxième génération, c'est-à-dire compris entre - 0,17 V et + 0,36 V. Ces polymères rédox sont recensés dans l'Annexe 1.

Nous avons vu que pour le polymère PVP-Os [- 0,17 V], la valeur du courant de plateau de réduction de l'O₂ était globalement limitée par la cinétique rédox entre l'O₂ et le complexe d'osmium, induisant, entre autre, une quasi linéarité du courant de plateau avec la quantité d'osmium effectivement connecté. Le même comportement est probable pour les autres polymères rédox dans la mesure où, présentant des caractères diffusionnels

probablement similaires, leur $E^{\circ'}$ supérieurs devrait accentuer la limitation par la cinétique rédox. Notons également que la nature de la chaîne des polymères (PVP, PVI, ou PAA-PVI) n'a pas été prise en compte a priori.

Pour chaque polymère rédox, des électrodes modifiées ont été préparées pour des Γ_{tot} de $63,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ dont $10 \%_{\text{m}}$ d'agent réticulant. La concentration en osmium pouvant varier d'un polymère à un autre, les quantités d'osmium effectivement connectées (n_{Os}) sont préalablement mesurées par voltampérométries cycliques à $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ et intégrations des pics, avec :

$$Q_{\text{Os}} = \int i \cdot dt = n_{\text{Os}} \cdot F \quad (\text{Eq. 18})$$

Des voltampérométries sous saturation d' O_2 sont ensuite réalisées ($1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$). Quand la réduction de l' O_2 est détectée, le pseudo plateau en courant est généralement atteint pour un potentiel d'électrode inférieur de $130 \pm 30 \text{ mV}$ au $E^{\circ'}$ du polymère considéré. Selon le polymère, une mesure plus précise peut être effectuée :

- quand la réduction directe de l' O_2 sur le GC ne peut être négligée (potentiels de plateaux les plus négatifs et/ou courant de plateau faible), le courant correspondant, obtenu avec une électrode non modifiée, est soustrait (cf. § 1.3.2.) ;

- pour les polymères de $E^{\circ'}$ critiques ($0 \text{ V} \leq E^{\circ'} \leq 0,1 \text{ V}$), la réduction de l' O_2 est incertaine ou faible avec, le cas échéant, un plateau mal défini et une valeur de courant obtenue par voltampérométrie peu fiable. Une chronoampérométrie avec barbotage successif d'argon puis d' O_2 est alors réalisée (cf. Figure 4) à un potentiel inférieur d'environ 200 mV au $E^{\circ'}$ du polymère (plateau théoriquement atteint). L'éventuel courant de réduction directe de l' O_2 sur le GC, mesuré au potentiel considéré, est alors soustrait.

L'état stationnaire du courant de plateau de réduction de l' O_2 sur les complexes d'osmium (I_{pl}) impose l'égalité entre la vitesse de production des électrons par transfert de l'électrode à l'hydrogel ($|I_{\text{pl}}/F|$) et la vitesse de consommation des électrons dans l'hydrogel par la réaction rédox entre l' O_2 et les complexes (dn_{e}/dt) :

$$\left| I_{\text{pl}} \right| = F \cdot \frac{dn_{\text{e}}}{dt} \quad (\text{Eq. 19})$$

En divisant la valeur absolue du courant de plateau (Eq. 19) par la charge disponible par les sites osmium Q_{Os} (Eq. 18), on obtient donc une valeur κ , correspondant au nombre moyen d'électrons échangés par seconde et par complexe d'osmium avec l' O_2 au sein de l'hydrogel.

$$\kappa = \frac{|I_{pl}|}{Q_{Os}} = \frac{1}{n_{Os}} \frac{dn_{e^-}}{dt} \quad (\text{Eq. 20})$$

En considérant que la cinétique de la réaction rédox entre l' O_2 et les complexes d'osmium est bien le facteur limitant majoritairement le courant de plateau, la valeur κ est représentative de l'ampleur de cette cinétique.

La Figure 15 présente les valeurs de κ obtenues expérimentalement pour les différents polymères rédox testés sous saturation d' O_2 . La forte dispersion de la valeur de κ pour le polymère PVI-Os [+ 0,005 V] est due à une certaine instabilité de la réponse du polymère, induisant une baisse de la répétabilité et une certaine dépendance temporelle, ainsi qu'à des valeurs de Q_{Os} et I_{pl} particulièrement faibles, diminuant la précision des mesures.

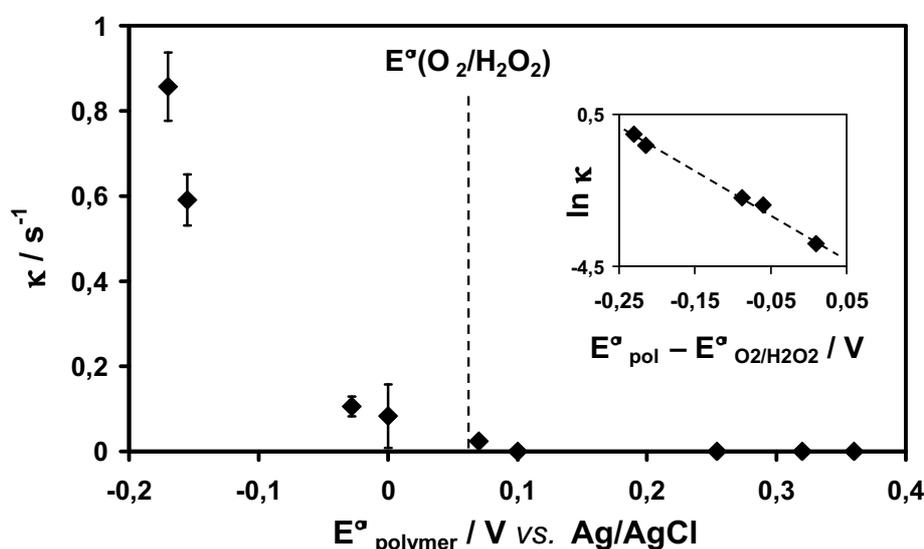


Figure 15. Nombre moyen d'électrons échangés par seconde et par complexe d'osmium avec l' O_2 au sein de l'hydrogel, en fonction du potentiel standard apparent du polymère rédox. Sous saturation d' O_2 , tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 37°C, 500 rpm. Les pointillés verticaux indiquent le potentiel standard apparent du couple O_2/H_2O . **En insert :** $\ln \kappa$ en fonction de $(E^\circ_{\text{pol}} - E^\circ_{O_2/H_2O_2})$ pour les cinq polymères réagissant avec O_2 .

Pour les quatre polymères de $E^{\circ'} \geq 0,1$ V, aucune réduction de l' O_2 n'a été détectée et la valeur de κ correspondante est donc nulle. Un courant de réduction de l' O_2 est détecté pour les cinq polymères de $E^{\circ'} \leq 0,07$ V. La valeur de κ augmente quasi exponentiellement quand le $E^{\circ'}$ du polymère décroît (voir l'insert).

La cinétique (ici caractérisée par κ) et la thermodynamique (dépendante de $E^{\circ'}$ du polymère) d'une réaction sont des considérations qu'il s'agit d'associer avec précaution. Cependant, la dépendance entre les deux notions est ici probante. Cette forte corrélation permet même de suggérer que les mécanismes réactionnels mis en jeu dans la réaction sont semblables d'un complexe à l'autre, indépendamment de la chimie de coordination du complexe (pour les complexes testés et dans la gamme de $E^{\circ'}$ considérés).

Par analogie, il est intéressant de noter que des évolutions quasi-exponentielles de constantes cinétiques avec le potentiel standard du catalyseur rédox (c.-à-d. avec la force motrice de la réaction) ont précédemment pu être remarquées [66]. En particulier, Stanbury *et al.* ont observé cette évolution pour la réduction de l' O_2 en H_2O_2 sur toute une série de complexes de ruthénium modifiés avec différents ligands (amine, eau, chlorure, isonicotinamide, vinylpyridine, phénantroline et éthylènediamine) [81]. Ils déduisent de leurs résultats, conformes à la théorie de Marcus, que la réaction rédox est limitée par le transfert d'un premier électron depuis un complexe de ruthénium réduit jusqu'à l' O_2 . Par ailleurs, ils proposent une loi de vitesse d'ordre partielle 1 par rapport à chaque réactif (O_2 et complexe de ruthénium). Il est fort possible qu'il en soit de même dans le cas de la réduction de l' O_2 traitée ici, d'autant que la chimie de coordination des complexes d'osmium est proche de celle des complexes de ruthénium [82].*

En conclusion, cette évolution du courant de réduction de l' O_2 par site osmium en fonction du $E^{\circ'}$ du polymère rédox confirme, *a posteriori*, l'influence prédominante de la cinétique rédox entre l' O_2 et les sites osmium sur ce courant. Aucun effet les concernant n'ayant été observé, on peut aussi conjecturer une faible dépendance de la chaîne polymère, tout du moins pour l'éventail de polymères testés.

* En outre, la forte corrélation exponentielle penche plutôt en faveur d'une réaction du premier ordre par rapport aux complexes. En effet avec un ordre différent, la vitesse de réaction serait dépendante non seulement de la quantité de complexes immobilisés, mais aussi de leur concentration. Or cette dernière est très probablement différente d'un polymère hydraté à un autre. Restons toutefois prudents vu le faible nombre de points et les incertitudes concernant les deux polymères de plus haut $E^{\circ'}$ (0 V et 0,07 V).

2.2.2. Le cas limite du PVP-Os [+ 0,07 V]

Le PVP-Os [+ 0,07 V] est le polymère de plus haut E° sur lequel une réduction de l' O_2 a été mesurée. De plus, son E°_{pol} est très proche de celui du couple O_2/H_2O_2 . Il convient donc de lui accorder une attention particulière.

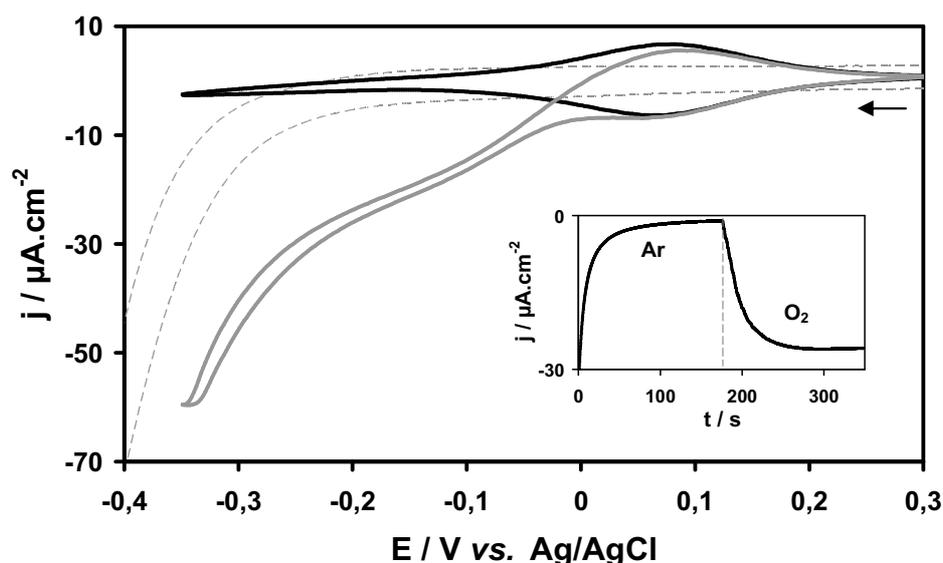


Figure 16. Voltampérommes cycliques d'une électrode modifiée avec le PVP-Os [+ 0,07 V] sous argon (trait noir) et O_2 (trait gris). Trait fin discontinu : électrode non modifiée sous O_2 . Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 37°C, 500 rpm, $1\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. **En insert :** chronoampéromme de l'électrode modifiée à $-0,2$ V, barbotage d'argon puis d' O_2 .

La Figure 16 présente les CV de l'électrode modifiée sous argon (trait noir) et O_2 (gris), à $1\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Le polymère réagit bien avec l' O_2 avec une densité de courant stationnaire de $-26\ \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ à $-0,2$ V (voir insert), contre $-4 \pm 2\ \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour l'électrode non modifiée. Cependant, la forme du CV sous O_2 est tout à fait atypique en comparaison avec celle du CV présenté sur la Figure 3 (B). En effet, même à cette faible vitesse de balayage, et avant d'atteindre le pseudo plateau entre $-0,1$ V et $-0,2$ V, la réponse transitoire due au polymère (pics) reste visible, tout particulièrement pour les potentiels supérieurs au E° du polymère où les CV obtenus sous argon ou O_2 sont confondus. L'hypothèse proposée ici est que pour des potentiels d'électrode supérieurs à $E^{\circ}_{pol} = +0,07$ V l'hydrogel rédox ne présente pas un caractère suffisamment réducteur pour réagir avec l' O_2 , dont le E° du couple formé avec le H_2O_2 est $+0,06$ V dans les conditions considérées. Le potentiel de l'hydrogel rédox, quand il

est à l'équilibre ($I=0$), peut être relié à la proportion de complexes réduits et oxydés par l'équation de Nernst [21, 83]^{*} :

$$E_{Pol} = E^{\circ}_{Pol} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Os^{3+}]}{[Os^{2+}]} \quad (\text{Eq. 21})$$

S'il n'est pas question d'équilibre dans le cas présent^{**}, cette équation permet d'illustrer l'hypothèse proposée, dans la mesure où le courant peut être considéré comme le phénomène qui tend à établir l'équilibre entre l'hydrogel et l'électrode (c.-à-d. l'égalité entre le potentiel d'électrode E et E_{pol} dans tout l'hydrogel).

Sur le voltampérogramme sous O_2 , étudions le balayage aller (négatif). De + 0,3 V à + 0,07 V, la valeur du potentiel d'électrode ($\geq E^{\circ}_{pol}$) et le courant négatif indiquent que la majorité des sites osmium sont encore sous leur forme oxydée Os^{3+} . L'hydrogel rédox présente alors un caractère faiblement réducteur, ne permettant pas la réduction de l' O_2 (invariabilité avec la courbe sous argon). Pour les potentiels d'électrode $E < E^{\circ}_{pol}$, une plus grande fraction des sites osmium est réduite ($[Os^{2+}] > [Os^{3+}]$, ceci au moins à l'interface de l'électrode), et le caractère plus réducteur de l'hydrogel induit enfin une force motrice suffisante pour réduire l' O_2 .

Dans le même ordre d'idée, sur le balayage retour, le potentiel d'électrode atteint des valeurs (≥ 0 V) où la cinétique de réduction de l' O_2 devient trop lente (puis nulle à un moment) par rapport à l'oxydation des Os^{2+} sur l'électrode, d'où la présence d'un pic d'oxydation.

Ce phénomène particulier pourrait donc être dû à la trop grande proximité des E° des deux couples rédox mis en jeu dans la réaction. Dans ce cas, faire varier le E° d'un des couples indépendamment de celui de l'autre devrait modifier la force motrice de la réaction rédox, et donc l'apparence du CV. Or, ce complexe d'osmium^{***} n'échange pas de proton en transférant son électron et son E° est indépendant de la valeur du pH [48, 84]. Au contraire, le E° du couple O_2/H_2O_2 diminue de 60 mV par unité de pH (Eq. 7).

* Les activités chimiques sont ici assimilées aux concentrations.

** Notons que la loi de Nernst reste applicable hors équilibre si la réaction hétérogène est réversible (nernstienne) [60, 83].

*** $[Os(N,N'$ -diméthyl-1,1'-biimidazole) $_2]^{2+/3+}$, greffé sur une chaîne PVP.

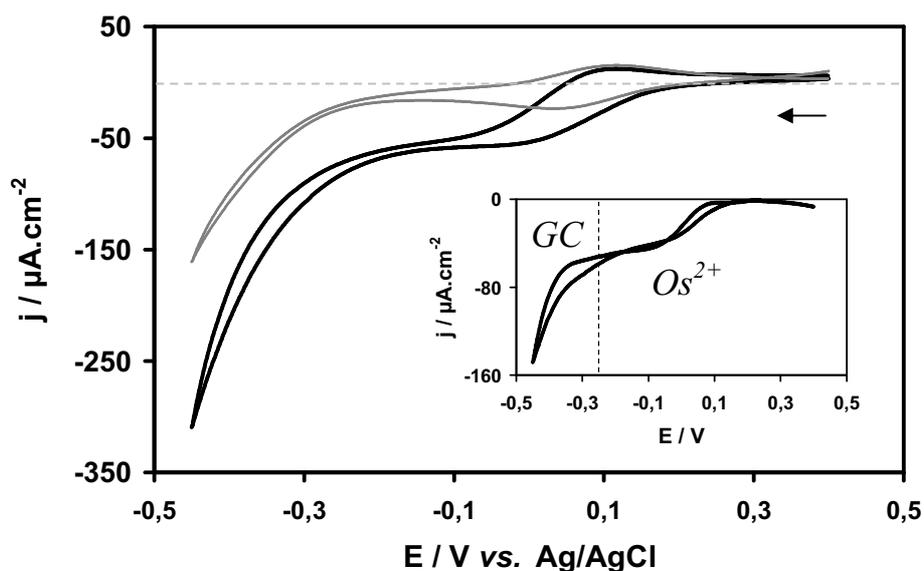


Figure 17. Voltampérogrammes cycliques d'une électrode modifiée avec le PVP-Os [+ 0,07 V] sous O_2 à pH 10 (trait gris) et pH 3 (trait noir). Tampon phosphate de sodium 100 mM avec ajout de soude ou d'acide phosphorique, 37°C, 500 rpm, 5 mV.s⁻¹. **En insert :** soustraction de la courbe mesurée à pH 3 par celle mesurée à pH 10 : effet de l'acidification sur les deux réductions de l' O_2 (sur les Os^{2+} et le GC).

La Figure 17 présente les voltampérogrammes cycliques sous O_2 d'une électrode modifiée avec le PVP-Os [+ 0,07 V] à pH 10 (courbe grise) et pH 3 (noire). A pH 10, plus aucun effet significatif de l' O_2 n'est détecté sur le polymère rédox (pics quasi symétriques et pas de courant de plateau) avant la réduction directe de l' O_2 sur le carbone vitreux ($E < 0,2$ V). Au contraire la réduction de l' O_2 sur les Os^{2+} est bien visible dans le tampon à pH 3, avec un plateau en densité de courant à environ $-60 \mu A.cm^{-2}$. Il est intéressant de constater que lors du balayage aller (négatif) les deux voltampérogrammes divergent significativement à partir de + 0,13 V. Cela suggère que, contrairement à l'observation faite à pH 7,2, une proportion minimale* de complexe d'osmium sous état réduit suffit à réduire distinctement l' O_2 à pH 3.

En insert, la courbe mesurée à pH 10 a été soustraite à la courbe mesurée à pH 3. En considérant que la réduction de l' O_2 sur les sites osmium est nulle ou négligeable à pH 10, nous escomptons avoir soustrait la composante transitoire du courant due au polymère (pics) et celle stationnaire de la réduction de l' O_2 sur le carbone vitreux à pH 10. Il est alors possible

* Si la loi de Nernst est valide pour l'hydrogel rédox à l'équilibre, l'existence d'un courant faradique négatif pour un potentiel d'électrode supérieur de 60 mV au E^0 du polymère implique que la proportion $[Os^{2+}]/[Os^{3+}]$ soit localement inférieure à 1/10 dans toute l'épaisseur de l'hydrogel.

de distinguer plus facilement l'effet du pH sur les deux réductions de l'O₂ respectives (sur les sites osmium puis sur la surface de l'électrode). De fait, à pH 3, la réduction de l'O₂ sur les sites osmium est bien observée à partir de + 0,13 V et elle atteint un plateau à - 0,05 V. La valeur caractéristique d'environ 120 mV entre le potentiel de plateau et le E°' du polymère est alors retrouvée. Pour les potentiels inférieurs à - 0,25 V une augmentation quasi exponentielle de la différence des courants mesurés à pH 3 et pH 10 est ensuite observée. Cette augmentation est attribuée à l'effet du pH sur la réduction directe de l'O₂ sur le carbone vitreux. L'effet de l'évolution du E°' du couple O₂/H₂O₂ (ici de - 0,11 V à + 0,31 V) sur la cinétique électrochimique s'avère donc sensible, logiquement, pour les deux réactions considérées.

Pour les autres polymères rédox, diminuer le pH de la solution augmentait aussi la cinétique de réduction de l'O₂ sur les complexes d'osmium. Cependant, l'évolution du courant avec le pH était moins sensible pour les polymères de plus faibles E°'.

L'intérêt de cette étude est qu'elle suggère que pour des complexes de E°' proche de E°_{O₂/H₂O₂}, la réduction de l'O₂ ne peut s'effectuer que si une proportion importante de complexes sont sous leur état réduit. Dans le cas d'un biocapteur à glucose ou d'une biopile, le potentiel de fonctionnement de l'anode est toujours supérieur au E°' du médiateur (d'environ 0,1 V). Ainsi, à moins que le courant délivré par l'anode ne soit largement gouverné par la diffusion des électrons à travers l'hydrogel, la majorité des complexes sont oxydés [65]. Dans ce cas, il est possible que l'O₂ ne réagisse pas avec les osmiums réduits dont dépend le courant. La possible réduction de l'O₂ sur les complexes (aux faibles potentiels d'électrode) ne serait donc pas préjudiciable pour des applications biopiles ou biocapteurs.

2.2.3. Dépendance en température selon le polymère rédox

La température est probablement un facteur déterminant dans la réaction rédox entre l'O₂ et les complexes d'osmium. Si cette dernière peut être considérée comme thermiquement activée, une évolution de son énergie d'activation en fonction du E°' du complexe mis en jeu serait alors concevable.

Nous avons déjà conclu sur le caractère majoritairement limitant de la cinétique rédox entre l'O₂ et les complexes d'osmium pour les valeurs de courants de plateau. Par conséquent, l'évolution du courant de plateau en fonction de la température devrait refléter celle de la cinétique rédox.

a) Etude préliminaire sur le PVP-Os [-0,17 V]

Avec les hypothèses retenues jusqu'à maintenant, la cinétique intrinsèque de la réaction rédox ne devrait pas dépendre de l'état global de hydrogel mais seulement de la nature du complexe d'osmium. Pour le vérifier trois électrodes à base de PVP-Os[-0,17 V] modifiées différemment sont testées en température : une avec le polymère réticulé seul (10 %_m PEGDGE, $\Gamma_{\text{tot}} = 130 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), les deux autres avec 30 %_m d'enzymes immobilisées, soit la GOx*, soit la GDH (10 %_m PEGDGE, $\Gamma_{\text{tot}} = 100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Ajoutons que les deux électrodes modifiées avec les enzymes avaient préalablement été testées pour d'autres caractérisations. Les valeurs de courants obtenues étaient donc probablement inférieures par rapport à celles d'une électrode nouvellement modifiée, nous admettons que l'évolution du courant avec la température reste, a priori, identique. Les valeurs des courants ont été obtenues par chronoampérométrie à -0,3 V, jusqu'à l'obtention d'un courant quasi stationnaire (~60 s). Entre deux mesures, l'électrode était conservée à part dans le tampon à température ambiante tandis qu'un barbotage soutenu d'O₂ était effectué dans la cellule pendant 10 min afin d'atteindre la concentration saturante d'O₂ à la température étudiée. Les températures étaient mesurées avec une précision de 0,1°C pendant toute la durée de l'expérience.

L'évolution de la densité de courant de réduction de l'O₂ avec la température est présentée sur la Figure 18. Pour les trois électrodes le courant augmente nettement avec la température, ce qui suggère une réaction thermiquement activée. Il serait alors tentant, à l'aide d'un diagramme d'Arrhenius, de calculer une énergie d'activation (E_a) de la réaction limitante entre l'O₂ et le complexe d'osmium. Le bien-fondé d'une telle démarche est discuté dans le paragraphe suivant.

* N.B. : la réactivité de la GOx avec l'O₂ ne peut interagir dans la valeur du courant obtenu ici, ceci dans la mesure où le polymère rédox est bien trop oxydant pour réduire la GOx. En régime stationnaire sous O₂ et en absence de glucose toute la GOx est constamment oxydée dans l'hydrogel.

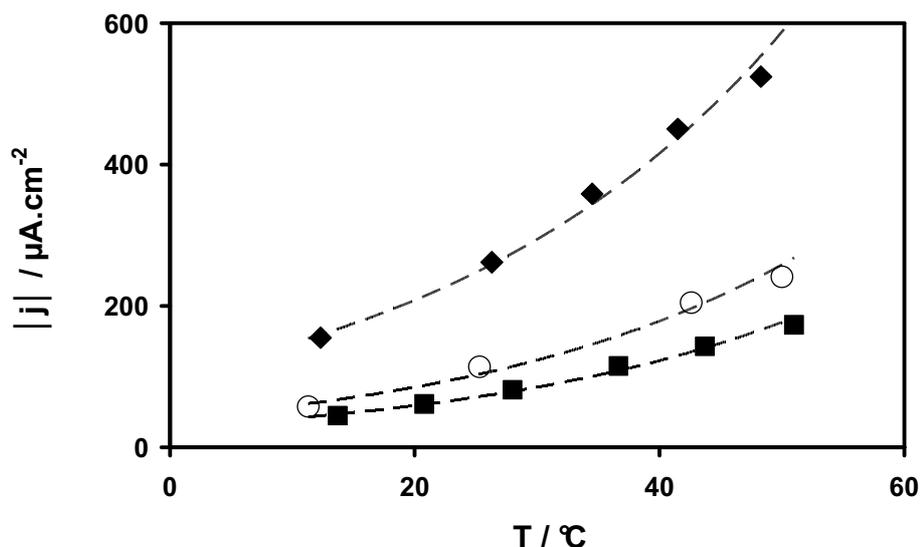


Figure 18. Evolution du courant de réduction de l'O₂ sur le PVP-Os[-0,17 V] avec la température. Polymère réticulé seul (losanges) ; polymère réticulé avec la GOx (ronds) ; polymère réticulé avec la GDH (carrés). Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, saturation d'O₂, 1000 rpm, mesures à -0,3 V.

b) Obtention d'une énergie d'activation apparente

Pour calculer l'énergie d'activation *authentique* d'une réaction chimique les quantités et, à plus forte raison, les concentrations des différentes espèces mises en jeu ne doivent pas ou peu évoluer durant la mesure, donc avec la température. Dans notre cas, les concentrations des deux réactifs diminuent avec la température :

1) la concentration moyenne en Os²⁺ : le courant de réduction des Os³⁺ augmente avec la température, ce qui implique une augmentation de leurs concentrations locales dans l'hydrogel, et donc une diminution des concentrations en Os²⁺. Cependant, nous avons vu que la grande majorité des complexes sont sous leur état réduit Os²⁺ et disponibles pour la réduction de l'O₂ (cf. § 1.3.2.). *In fine*, le triplement du courant entre ~ 10°C et ~ 50°C a probablement une incidence relativement faible sur la concentration moyenne en Os²⁺ ;

2) la concentration moyenne en O₂ : elle est influencée par la température de deux manières :

(i) en régime stationnaire le flux d'O₂ consommé est directement proportionnel à la valeur du courant traversant l'électrode (si on admet que la fraction de H₂O₂ secondairement réduit reste constante). L'augmentation de la température pourrait donc exacerber une déplétion d'O₂ dans l'hydrogel. En plus de sa consommation, le transport de l'O₂ est aussi modifié par la température, étant donné que le coefficient de diffusion de l'O₂, sa concentration à saturation, ainsi que la viscosité cinématique de la solution dépendent de la température. Le courant limite de diffusion-convection prédit par la théorie de Levich à 1000 rpm et pour $n = 2$, croît légèrement dans la gamme de températures considérée : de 2,69 mA.cm⁻² (20°C) à 3,05 mA.cm⁻² (50°C). La déplétion la plus importante serait donc à prévoir pour l'électrode à base de PVP-Os[- 0,17 V] seul, à 50°C, où le courant de réduction de l'O₂ atteint 17% de la valeur prédite par la théorie de Levich.

La consommation d'O₂ et la légère déplétion qui doit en résulter dans l'hydrogel peuvent probablement avoir une influence sur la valeur du courant par rapport à un profil de concentration en O₂ idéalement plat et égal à la concentration de saturation. Cependant, cette influence est probablement marginale par rapport à celle du second effet de la température décrit ci-dessous ;

(ii) il est notoire qu'à pression constante la concentration de saturation d'O₂ dissous diminue avec la température. Cette évolution est présentée sur la Figure 19 (Gauche). La concentration de saturation est environ deux fois plus faible à 50°C qu'à 10°C. Ainsi, les valeurs des courants mesurées aux hautes températures sont plus faibles que celles, idéales, qui seraient obtenues avec une concentration de saturation constante et spécifique à une basse température. Ceci ne peut que biaiser une valeur d'énergie d'activation qui serait calculée avec les données brutes.

Afin d'obtenir des valeurs d'énergie d'activation apparente ($E_{a,app}$) se rapprochant des valeurs réelles, il est possible d'effectuer une correction des courants selon la température à laquelle la mesure a été réalisée. La correction est réalisée par rapport à l'évolution de la concentration de saturation d'O₂ avec la température. En effet, cette évolution est probablement l'effet le plus prononcé de la température sur la concentration de chaque réactif mis en jeu dans la réaction. Les hypothèses retenues pour la correction des courants sont donc les suivantes :

- ↪ la valeur du courant est uniquement gouvernée par la cinétique de la réaction entre les Os^{2+} et l' O_2 , qui est limitante, et thermiquement activée ;
- ↪ la réduction secondaire du H_2O_2 en eau est négligée ;
- ↪ la température, dans la gamme d'étude considérée, ne modifie pas le volume et les propriétés intrinsèques de l'hydrogel ;
- ↪ la concentration en Os^{2+} est constante pour toutes les températures considérées (les concentrations locales en Os^{3+} , dont est tributaire le courant, sont négligées) ;
- ↪ la concentration en O_2 dans toute l'épaisseur de l'hydrogel est constante et égale à la concentration de saturation à la température considérée (pas de déplétion).

Avec ces hypothèses, la valeur du courant traversant une électrode donnée ne dépend plus que de la température de part son influence sur l'activation de la réaction (terme exponentiel) et sur la concentration de saturation $[O_2]_{sat_T}$ (préexponentiel) :

$$|j_T| = K \times f([O_2]_{sat_T}) \times e^{-Ea_{app}/RT} \quad (\text{Eq. 22})$$

Avec j_T la densité de courant de plateau à une température donnée, K une constante intrinsèque à l'électrode modifiée (surface, polymère utilisé, degré de réticulation, masse déposée, etc.), Ea_{app} l'énergie d'activation apparente*, R la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), et $f([O_2])$ la fonction correspondant à l'influence de la concentration en O_2 sur la vitesse de la réaction rédox.

Si le bilan global de la réaction est maintenant connu (Eq. 17), les différents mécanismes élémentaires pouvant intervenir ne le sont pas. Ainsi, il n'est pas possible de prédire l'influence théorique de la concentration en O_2 sur la loi de vitesse. Cependant, en supposant que la réaction admette un ordre partiel n par rapport à l' O_2 , alors la dépendance devient :

$$f([O_2]_T) = [O_2]_T^n \quad (\text{Eq. 23})$$

* Le terme *apparente* fait référence à toutes les hypothèses simplificatrices qui ont permis d'obtenir ce résultat.

Un ordre partiel apparent peut être grossièrement estimé expérimentalement*. La Figure 19 (Droite) présente l'évolution du courant de plateau à 37°C en fonction de la concentration en O₂ (sous argon ([O₂] = 0 mM), air (0,21 mM), ou O₂ (1,07 mM)). Les courants sont normalisés par rapport aux courants respectifs mesurés sous saturation d'O₂. Les valeurs ont été obtenues à partir de six électrodes et trois polymères rédox différents (les trois plus réducteurs de la Figure 15). La courbe discontinue correspond à une évolution du courant avec la concentration d'O₂ à la puissance 0,6.

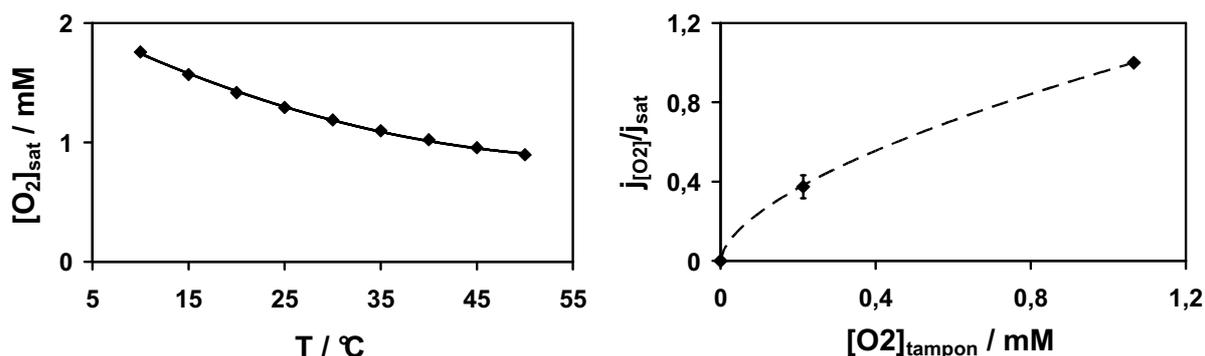


Figure 19. (Gauche) Evolution de la concentration de saturation en O₂ dissous dans l'eau selon la température. **(Droite)** Evolution du courant de plateau de réduction avec la concentration d'O₂ à 37°C. Les courants mesurés sous air (0,21 mM) sont normalisés par rapport à ceux obtenus sous saturation d'O₂ (1,07 mM). Valeur moyenne obtenue avec six électrodes et trois polymères différents. La courbe discontinue représente une loi de puissance d'exposant 0,6.

Il conviendrait de réaliser cette étude avec un plus grand nombre de concentrations en O₂ et à différentes températures afin de légitimer formellement l'hypothèse de la loi de puissance, puis affiner la valeur de son exposant. A défaut, une loi de puissance *expérimentale* d'exposant 0,6 est retenue pour la correction du courant selon la concentration de saturation en O₂. L'évolution du courant avec la température devient :

$$|j_T| = K \times [O_2]_{sat_T}^{0,6} \times e^{-Ea_{app}/RT} \quad (\text{Eq. 24})$$

* Le lecteur attentif aura remarqué que nous avons précédemment évoqué la possibilité d'une loi de puissance d'ordre 1 par rapport à l'O₂ (cf. fin du § 2.2.1.). Après longue réflexion, nous avons décidé de réaliser la correction relativement à nos valeurs expérimentales, malgré leur faible nombre.

Puis :

$$\ln \frac{|j_T|}{[O_2]_{sat_T}^{0,6}} = \ln(K) - \frac{Ea_{app}}{RT} \quad (\text{Eq. 25})$$

Le diagramme d'Arrhenius correspondant à cette équation est tracé, sur la Figure 20, pour les trois électrodes de la Figure 18.

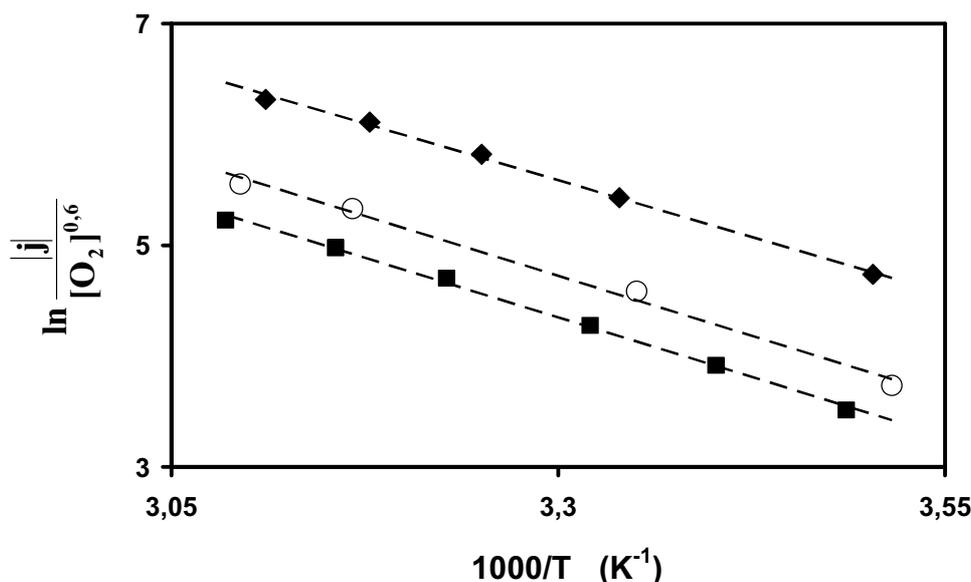


Figure 20. Diagramme d'Arrhenius correspondant aux courants des électrodes à base de PVP-Os[-0,17 V] de la Figure 18.

Des droites d'Arrhenius quasi parallèles sont obtenues pour chaque électrode. Les Ea_{app} calculées sont respectivement de 34,0 kJ.mol⁻¹ (polymère seul), 35,9 kJ.mol⁻¹ (avec la GOx) et 35,7 kJ.mol⁻¹ (avec la GDH). Aux incertitudes de mesure près, on peut considérer que l'énergie d'activation apparente est identique dans les trois cas, ce qui suggère donc bien qu'elle est intrinsèque au polymère rédox utilisé.

c) Effet du E° du complexe d'osmium

La même étude en température a été réalisée pour les trois polymères rédox de plus faible E° . Le diagramme d'Arrhenius correspondant est présenté sur la Figure 21.

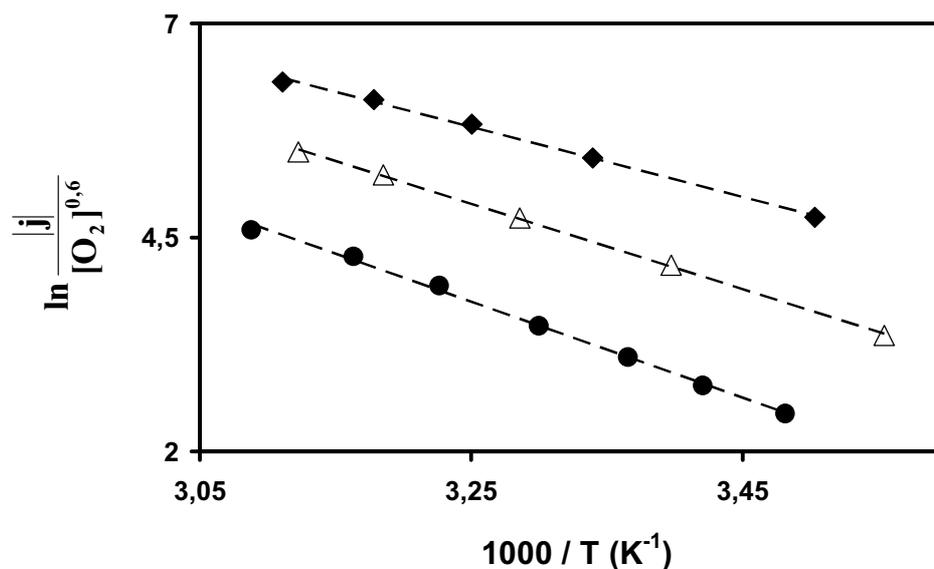


Figure 21. Diagramme d'Arrhenius correspondant aux électrodes modifiées avec le PVP-Os[- 0,17 V] (losanges), le PVI-Os[- 0,155 V] (triangles), et le PVP-Os [- 0,028 V] (ronds). Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, saturation d'O₂, 1000 rpm.

Les pentes d'Arrhenius sont différentes selon le polymère utilisé, ce qui semble corroborer la dépendance de l'énergie d'activation apparente avec la nature du polymère utilisé. Les $E_{a,app}$ respectives sont recensées dans le **Tableau 2**.

Polymère	$E_{a,app}$ (kJ.mol ⁻¹)
PVP-Os[- 0,17 V]	35,2 ± 1
PVI-Os[- 0,155 V]	41,5 ± 0,7
PVP-Os[- 0,028 V]	46,6 ± 1,5

Tableau 2. Valeurs de $E_{a,app}$ selon le polymère rédox modifiant l'électrode. Moyennes et écarts-types sur trois électrodes pour chaque polymère.

Plus que les valeurs en tant que telles, qui ne restent qu'*apparentes*, c'est l'évolution de l' $E_{a,app}$ avec le E° du polymère rédox qui s'avère intéressante. En effet, l' $E_{a,app}$ de la réaction rédox diminue avec le E° . Il est vrai que l'énergie d'activation est une caractéristique cinétique de la réaction rédox, alors que le E° du polymère influe sur sa thermodynamique, et que les deux considérations ne sont pas a priori corrélées. Cependant, nous avons déjà observé que rendre la réaction plus favorable thermodynamiquement, en

diminuant la valeur du E° , accélère sa cinétique (cf. Figure 15). L'évolution croissante de $E_{a_{app}}$ avec le E° du polymère semble donc cohérente.

En conclusion, cette étude en température permet d'affirmer que la réaction rédox dans l'hydrogel est thermiquement activée et de corroborer, encore une fois, que la valeur du courant de réduction est majoritairement limitée par la cinétique rédox entre l' O_2 et les Os^{2+} .

3. EFFET DE L'OXYGENE SUR LA REPONSE DE BIOCAPTEURS A GLUCOSE

3.1. Introduction

La possible réaction du polymère rédox à base d'osmium avec l'O₂ a été prouvée, le produit majoritaire de la réaction caractérisé et l'influence des paramètres d'importance majeure sur cette dernière étudiée. Il s'agit à présent d'évaluer l'impact de cette réactivité sur la réponse en courant d'un biocapteur à glucose de deuxième génération. Des biocapteurs ont donc été préparés soit avec le PVP-Os [- 0,17 V] dont les sites osmium réduisent l'O₂, soit avec le PAA-PVI-Os [+ 0,36 V] qui ne réagit pas avec l'O₂.

Tenter de distinguer la réactivité de l'O₂ sur le polymère de celle sur la GOx s'avère nécessaire. Rappelons en effet que l'O₂, médiateur naturel de la GOx, entre en compétition avec les complexes d'osmium pour collecter les électrons de l'enzyme. Ce phénomène est d'ailleurs le seul généralement mis en avant pour expliquer la baisse des courants délivrés par les systèmes GOx/médiateur en milieu aérobie. Ainsi, pour s'affranchir de cette réactivité du biocatalyseur avec l'O₂ et évaluer l'influence du polymère uniquement, certaines électrodes ont été modifiées avec de la glucose déshydrogénase (GDH^{*}) en lieu et place de la GOx. En effet, la GDH est une oxydoréductase oxydant le glucose mais qui ne réagit pas avec l'O₂. Un de ses inconvénients est sa faible thermostabilité. Pour cette raison, les courbes de calibration ont été obtenues à 25°C (au lieu des 37°C habituels) pour toutes les électrodes modifiées.

En résumé, les quatre combinaisons possibles de biocapteurs formés d'enzymes et de polymères rédox étant susceptibles ou non de réagir avec l'O₂ ont été préparées. Les courbes de calibration sous argon et O₂ ont ensuite été réalisées pour évaluer l'effet de l'O₂ dans chaque cas. La composition massique de chaque électrode était identique et de 60 %_m de polymère rédox, 30 %_m d'enzyme, et 10 %_m de PEGDGE, pour une masse surfacique à sec de 100 µg.cm⁻². Les calibrations ont été effectuées par ajouts de faibles volumes de solution de glucose concentrée (2 M) lors de chronoampérométries à des potentiels permettant l'obtention des courants de plateau pour toute concentration en glucose, soit + 0,1 V pour le PVP-Os [- 0,17 V] et + 0,55 V pour le PAA-PVI-Os [+ 0,36 V].

* L'enzyme en question est notée GDH par souci de lisibilité. Plus formellement, il s'agit d'une GDH soluble dépendante de la PQQ, dont la séquence protéique est issue de la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus* et qui a été exprimée dans *Escherichia coli*.

3.2. Biocapteurs à base de GOx

3.2.1. *Modifié avec le polymère redox non réactif à l'oxygène*

La Figure 22 présente les courbes de calibration sous argon (carrés noirs) et O₂ (cercles vides) du biocapteur à base de GOx et PAA-PVI-Os [+ 0,36 V].

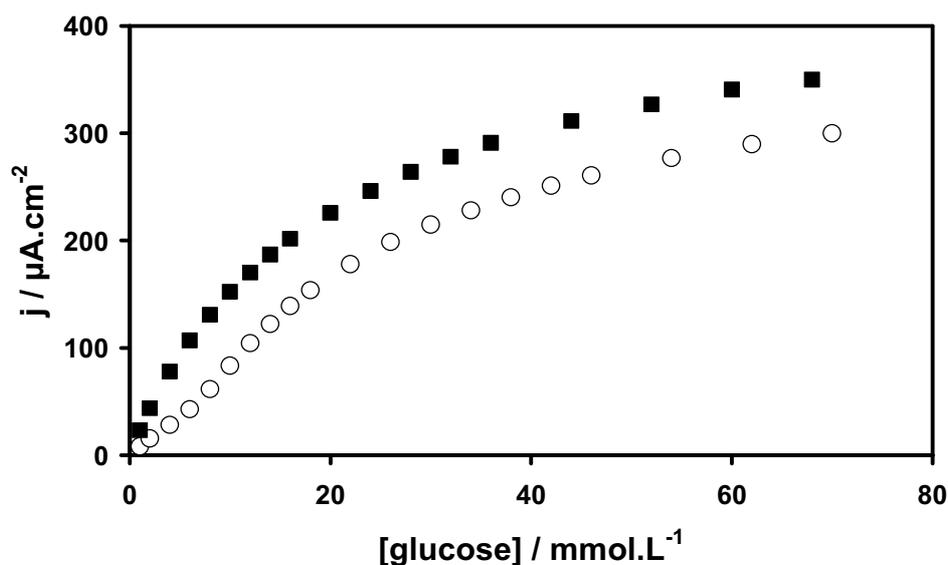


Figure 22. Courbes de calibration du biocapteur à base de GOx et PAA-PVI-Os [+ 0,36 V] sous saturation d'argon (carrés noirs) et d'O₂ (cercles vides). Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 25°C, 500 rpm, mesurées à + 0,55 V.

Les courbes de calibrations affichent les caractéristiques habituelles, avec une réponse en courant quasi linéaire pour les faibles concentrations en glucose (jusqu'à environ 15 mM) et l'obtention d'un pseudo-plateau pour les plus fortes (> 50 mM). Toutefois, une légère rupture de pente de la partie quasi linéaire a été remarquée, sous O₂, vers 5 mM. Le fait le plus marquant est la réponse plus faible du courant sous O₂, attribuée à la compétition entre l'O₂ et les sites osmium pour les électrons de la GOx :



Pour les concentrations supérieures à 5 mM, la différence entre les densités de courants sous argon et O₂ est quasi constante et d'environ 50 μA.cm⁻². La différence relative est plus prononcée aux faibles concentrations. La sensibilité du biocapteur,

mesurée jusqu'à 15 mM, accuse déjà une perte significative de 35 %, passant de $13,4 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ sous argon à $8,7 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ sous O_2 .

L'observation de cet effet de l' O_2 , plus important aux faibles concentrations en glucose, est relativement récurrente dans l'étude de systèmes composés de GOx et de polymères à base d'osmium de E° relativement élevés (par exemple + 0,25 V [24], + 0,085 V [41], et + 0,145 V [77]), ou de polymères à base de ferrocène (+ 0,2 V [85]). Deux exemples tirés de la littérature sont présentés sur la Figure 23.

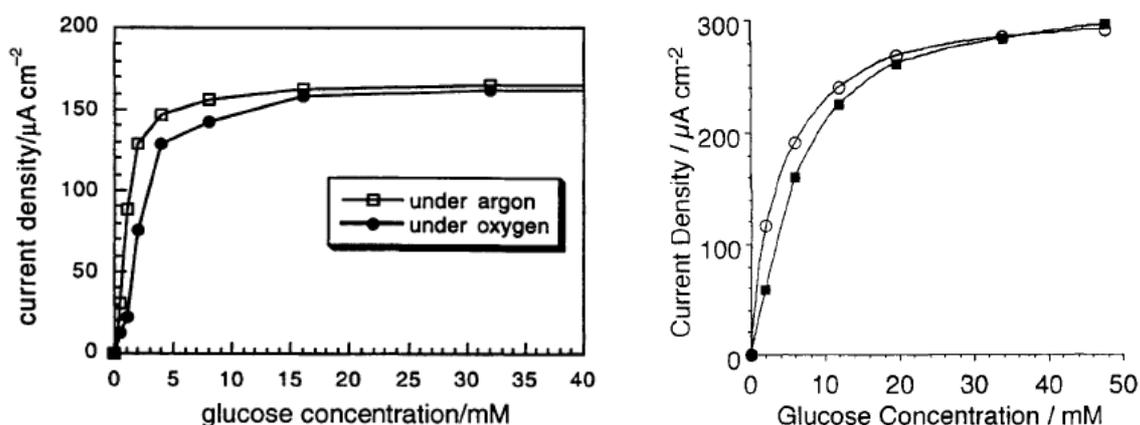


Figure 23. (Gauche) Courbes de calibration sous argon ou O_2 d'une électrode modifiée à base de GOx et de PVP-Os [+ 0,085 V], 1000 rpm, 21,3°C, figure reproduite de [41]. **(Droite)** Courbes de calibration sous argon (ronds vides) ou O_2 (carrés pleins) d'une électrode modifiée à base de GOx et de PVI-Os [+ 0,145 V], 1000 rpm, température ambiante, figure reproduite de [77].

3.2.2. Modifié avec le polymère rédox réactif à l'oxygène

La Figure 24 présente les courbes de calibration obtenues avec l'électrode modifiée à base de GOx et le PVP-Os [- 0,17 V]. La courbe obtenue sous argon est quasi linéaire jusqu'à 2 mM de glucose et atteint un plateau bien défini à 8 mM. Au contraire, la courbe sous O_2 présente une forme sigmoïdale assez atypique. Le courant croît d'abord linéairement mais très faiblement jusqu'à 4 mM. Une augmentation brutale à partir de 5 mM mène ensuite à un pseudo-plateau pour des concentrations supérieures à 15 mM. En considérant les parties quasi linéaires aux basses concentrations (jusqu'à 2 mM et 4 mM pour l'argon et l' O_2 respectivement), la sensibilité subit une perte sévère de 95 %, passant de $60 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ à $3 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ en changeant l'atmosphère saturante. Cet effet de l' O_2 , particulièrement marqué aux faibles concentrations de glucose, ainsi que la forme singulière de la courbe, sont

attribués à l'action cumulée de l'O₂ sur la GOx et sur les sites rédox du polymère, amplifiant la possibilité pour l'O₂ de capter des électrons dans l'hydrogel :



ET



La forte différence induite par la présence d'O₂ moléculaire pourrait s'avérer problématique pour des mesures de glucose dans des milieux où la pression partielle d'O₂ est variable et inconnue. Les courants plus faibles pourraient aussi diminuer les performances d'une biopile glucose/O₂ qu'elle soit implantée *in vivo** ou non.

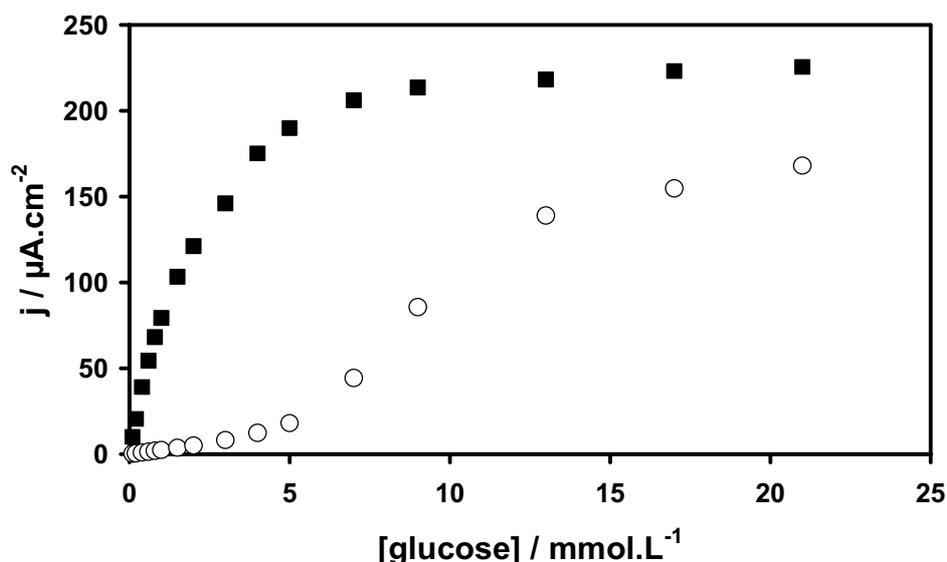


Figure 24. Courbes de calibration du biocapteur à base de GOx et PVP-Os [-0,17 V] sous saturation d'argon (carrés noirs) et d'O₂ (cercles vides). Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 25°C, 500 rpm, mesurées à +0,1 V.

Notons que le profil initial de la courbe a déjà été observé dans la littérature pour des calibrations sous O₂ de systèmes à base de GOx et de médiateur rédox de E^o relativement bas [40]. Par exemple, Wang *et al.* ont calibré des biocapteurs de deuxième génération à base de

* Rappelons toutefois que la concentration d'O₂ moléculaire utilisée dans nos expérimentations est de 1,2 mM (à 25°C), environ un ordre de grandeur au dessus des valeurs typiques *in vivo* (~0,1 mM, à 37°C [36]).

GOx (Figure 25) en présence (courbe a) ou absence d'O₂ (b) avec trois médiateurs différents [6].

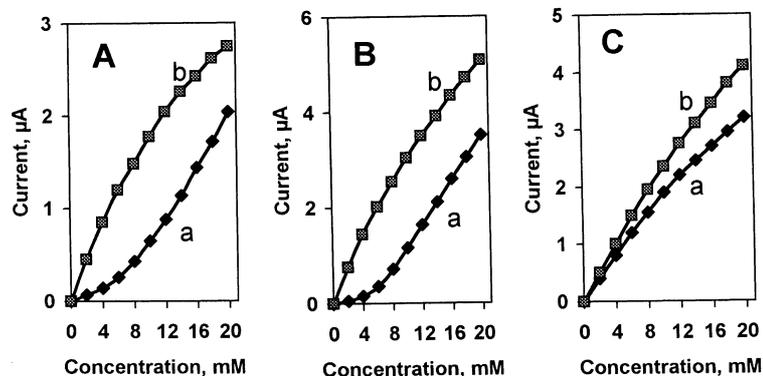


Figure 25. Courbes de calibration de biocapteurs à glucose à base de GOx et de différents médiateurs de E^o croissants : (A) PMS (E^o = - 0,12 V vs. Ag/AgCl), (B) MG (- 0,07 V), et (C) DMF (+ 0,15 V). En présence (a) et en absence (b) d'O₂. Tampon phosphate 50 mM, pH 7,4, température ambiante, 300 rpm. Figure reproduite de [6].

Avec les deux premiers médiateurs (PMS et MG, respectivement sur graphiques A et B) l'effet de l'O₂ est important et la courbe présente un profil plat jusqu'à 5 mM en glucose, avant de croître linéairement aux concentrations supérieures. Avec le troisième médiateur (DMF, graphique C), l'influence de l'O₂ est bien moindre et plus uniforme (20-25 % de baisse de courant dans toute la gamme de concentration en glucose). En assumant que l'O₂ ne peut réagir qu'avec la GOx et ainsi concurrencer le médiateur artificiel, les auteurs déduisent de ces résultats une réaction apparemment plus rapide du DMF avec la GOx par rapport à celles mettant en jeu les deux premiers médiateurs. Ce fait n'est pourtant pas flagrant au regard des résultats en absence d'O₂, où la sensibilité du biocapteur à base de DMF (0,23 mA.M⁻¹) est même inférieure à celle du biocapteur employant le MG (0,3 mA.M⁻¹) alors que la même quantité de GOx est immobilisée. Dans le cas présent, les deux biocapteurs particulièrement sensibles à la présence d'O₂ affichent des E^o faibles (- 0,12 V et - 0,07 V) par rapport au médiateur le moins affecté (+ 0,15 V). S'il est incontestable qu'augmenter l'aptitude du réseau de médiateurs à capter les électrons de la GOx limite la compétition de l'O₂ pour ces

derniers, nous pensons qu'il ne faut pas exclure l'éventualité d'une réaction additionnelle de l'O₂ avec les médiateurs*.

Le lecteur ne manquera pas de constater que cette réflexion induit elle-même une relative mais légitime critique de notre propre comparaison de l'action de l'O₂ sur les biocapteurs mettant en jeu deux polymères différents. En effet, en plus de leur réponse respective à l'O₂, les deux polymères réagissent sans aucun doute différemment avec la GOx. En effet, la différence entre les deux complexes mis en jeu (structure, concentration, E°, présence ou non d'un espaceur l'articulant) doit modifier leur affinité avec la GOx. Or, la réaction de l'O₂ sur la GOx entre en compétition avec celle entre l'osmium et la GOx. Par conséquent, il va de soi que l'affinité entre la GOx et les complexes influence l'effet de l'O₂ sur l'enzyme, et donc la réponse globale de l'électrode.

En conclusion, la forte différence de l'effet de l'O₂ sur la réponse du biocapteur selon le polymère utilisé accrédite l'hypothèse que la réactivité du complexe rédox avec l'O₂ influe sur cet effet. Cependant, il n'est pas possible d'omettre une éventuelle influence de l'état global de l'hydrogel, et tout particulièrement de l'affinité entre la GOx et les différents complexes.

3.3. Biocapteurs à base de GDH

Afin de prouver catégoriquement l'effet substantiel que peut provoquer la réaction entre l'O₂ et le polymère rédox sur la réponse du biocapteur, l'utilisation de la GDH permet de s'affranchir de la réactivité entre l'enzyme et l'O₂. Comme pour les biocapteurs à base de GOx, les deux polymères susceptibles ou non de réagir avec l'O₂ sont utilisés.

3.3.1. Modifié avec le polymère rédox non réactif à l'oxygène

Les courbes de calibration mesurées sous argon et O₂ avec le biocapteur formé de GDH et PAA-PVI-Os [+ 0,36 V] sont représentées sur la Figure 26.

* Par exemple, il a été reporté que le PMS à l'état réduit est oxydé par l'O₂ avec une constante de vitesse de 180 mol⁻¹.L.s⁻¹ (à 21°C, en solution aqueuse, pH 7,4) [86].

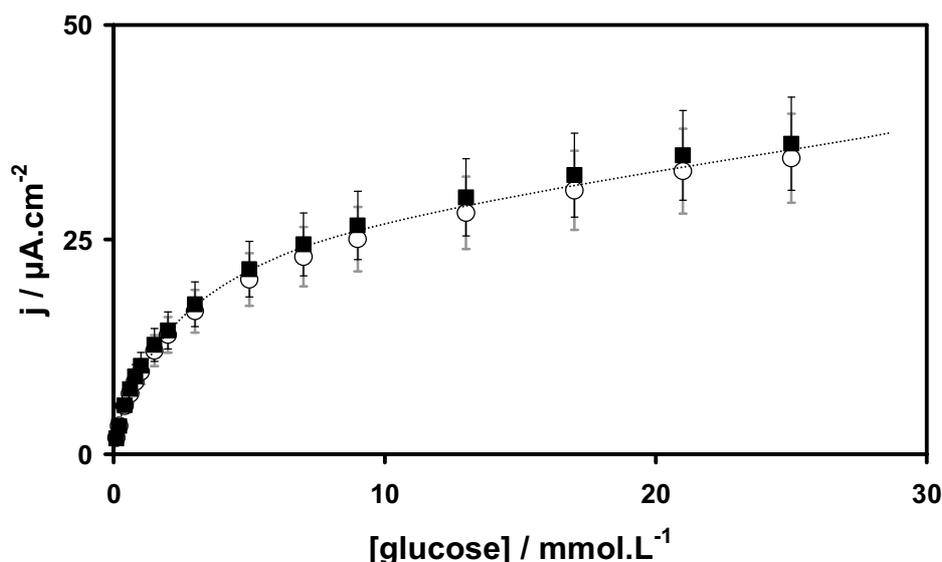


Figure 26. Courbes de calibration du biocapteur à base de GDH et PAA-PVI-Os [+ 0,36 V] sous saturation d'argon (carrés noirs) et d'O₂ (cercles vides). Tampon phosphate de sodium 100 mM, 25°C, pH 7,2, 500 rpm, mesurées à + 0,55 V.

Les deux courbes sont sensiblement identiques et aucun effet de l'O₂ n'est détecté, confirmant l'innocuité de ce dernier sur les deux espèces électroactives présentes dans l'hydrogel.

3.3.2. Modifié avec le polymère rédox réactif à l'oxygène

Au contraire, les courbes de calibration obtenues avec l'électrode à base de GDH et PVP-Os [-0,17 V] (Figure 27) sont bien distinctes selon le gaz saturant la solution. Sous argon (carrés noirs), la courbe est classique et analogue à celle obtenue avec la GOx immobilisée dans ce même polymère (Figure 22). Sous O₂ (cercles vides), la réponse au glucose diminue fortement. La forme de la courbe est particulièrement atypique. Notons que si les valeurs du courant pouvaient présenter une certaine dispersion (voir barre d'erreur), le caractère original de la forme de la courbe a été observé pour les quatre électrodes testées. La courbe présente d'abord une augmentation nette du courant, quoique plus faible que sous argon, jusqu'à 1 mM. Curieusement, une première rupture de pente apparaît entre 1 mM et 3 mM, où le courant n'augmente plus que lentement avec la concentration en glucose. De 3 mM à 9 mM, une nouvelle augmentation du courant intervient, plus franche, jusqu'au pseudo-plateau pour des concentrations supérieures à 9 mM. A priori, l'effet de l'O₂ sur la réponse du biocapteur ne peut que s'expliquer par sa réactivité avec le polymère rédox. Même si les

médiateurs étaient solubilisés et non immobilisés sur l'électrode, il est intéressant de faire le parallèle avec une étude de Tsujimura *et al.* utilisant la FAD-GDH. elle aussi non réactive avec l'O₂ [87]. Ils évoquent un effet de l'O₂ sur les courants d'oxydation du glucose quand ils emploient en tant que médiateur l'hexaamine de ruthénium (III), la thionine, ou différentes sortes de quinones ; et attribuent l'effet à l'oxydation de leur forme réduite par l'O₂. Pour obtenir une calibration en glucose totalement indépendante de l'O₂, ils utilisent alors comme médiateur soluble du ferricyanure.

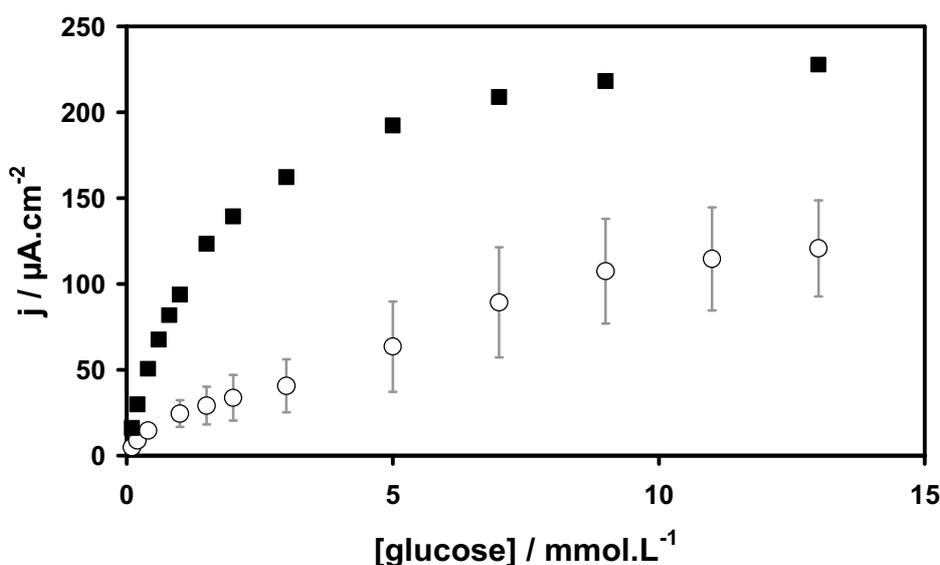


Figure 27. Courbes de calibration du biocapteur à base de GDH et PVP-Os [-0,17 V] sous saturation d'argon (carrés noirs) et d'O₂ (cercles vides). Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 25°C, 500 rpm, mesurées à + 0,1 V.

Finalement, pour éviter toute confusion entre l'effet de l'O₂ observé et d'éventuelles complications de répétabilité ou de stabilité des électrodes, une mesure en temps réel est aussi réalisée pour les deux biocapteurs à base de GDH. Elle consiste en une chronoampérométrie au potentiel de plateau respectif avec barbotages successifs d'argon ou d'O₂ dans une solution faiblement concentrée en glucose (0,1 mM) et initialement désoxygénée. Pour le biocapteur à base de GDH et PAA-PVI-Os[+ 0,36 V] (Figure 28, gauche), modifier le gaz barbotant en solution ne change pas la réponse du biocapteur. On peut cependant constater une dérive temporelle de la réponse de - 0,9 % par minute, due à l'instabilité du système. Au contraire, le biocapteur à base de GDH et PVP-Os [-0,17 V] est très réactif à la présence d'O₂ (Figure 28, droite), avec une perte de 68 % du courant quand la solution est saturée en O₂. La réversibilité

de l'effet de l'O₂ est prouvée par le retour au courant initial quand la solution est à nouveau désoxygénée.

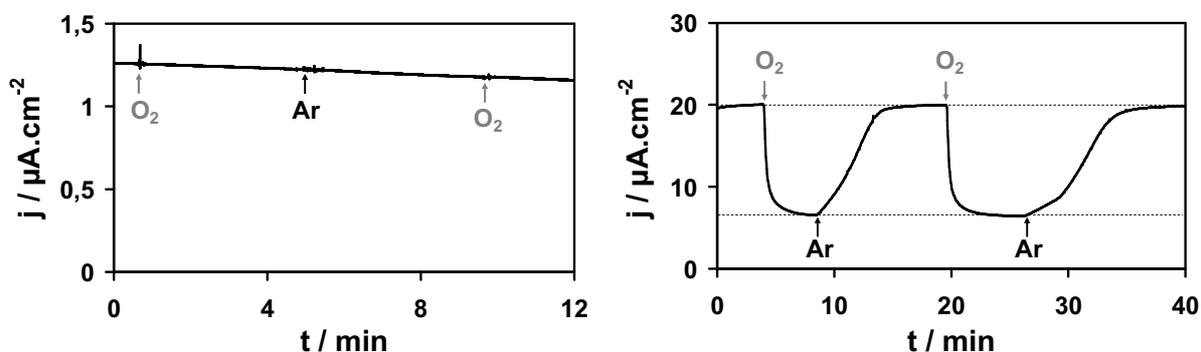


Figure 28. Chronoampérogrammes des biocapteurs à base de GDH avec barbotages successifs d'argon et d'O₂. GDH réticulée dans le PAA-PVI-Os[+ 0,36 V] (**gauche**) ou dans le PVP-Os[-0,17 V] (**droite**). Tampon phosphate de sodium 100 mM, 0,1 mM glucose, pH 7,2, 25°C, 500 rpm, potentiel respectivement à + 0,55 V et + 0,1 V.

L'influence significative de la réactivité du médiateur rédox avec l'O₂ sur la réponse en courant d'un biocapteur est maintenant formellement démontrée. Nous allons maintenant étudier quels phénomènes peuvent induire ces formes originales de courbes de calibration sous O₂.

3.4. Examen de la forme des courbes sous oxygène par étude hydrodynamique

3.4.1. Introduction

Que ce soit avec la GOx ou la GDH immobilisée avec le PVP-Os [- 0,17 V], la courbe de calibration mesurée sous O₂ présente une forme plutôt atypique, avec des effets de l'O₂ plus importants pour les faibles concentrations en glucose (les deux courbes sous O₂ sont reproduites, pour comparaison, sur la Figure 29).

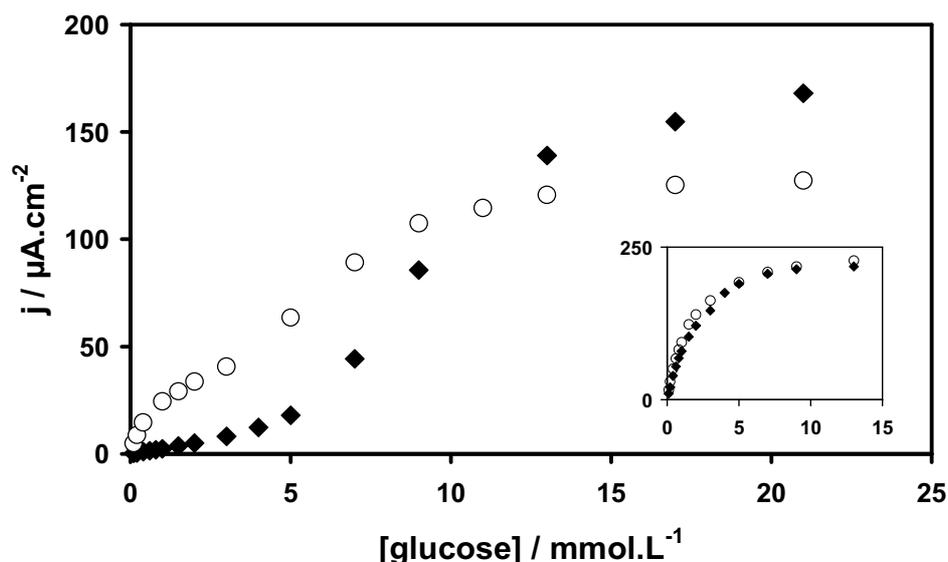


Figure 29. Courbes de calibration sous O_2 des électrodes à base de PVP-Os $[-0,17 V]$ et de GOx (losanges pleins) ou de GDH (ronds vides). En insert : similarité des deux courbes correspondantes obtenues sous argon. Reproduites des Figures 24 et 27.

L'interprétation de cet effet prédominant aux basses concentrations a déjà été proposée pour des électrodes à base de GOx. Même si les auteurs ne considéraient que la compétition de l' O_2 avec le médiateur pour les électrons de l'enzyme, l'explication fournie reste légitime dans le cas de notre électrode modifiée avec la GOx. Mano *et al.* ont émis l'hypothèse que l'effet de l' O_2 est moindre aux hautes concentrations en glucose du fait d'une déplétion de l' O_2 dans l'hydrogel [22]. Ainsi, aux faibles concentrations en glucose, la concentration en O_2 est importante dans tout l'hydrogel et la compétition pour les électrons de la GOx maximale. De plus l' O_2 ré-oxyde la GOx qui est alors à nouveau disponible pour oxyder le glucose. Ainsi, malgré un courant mesuré très faible, la consommation globale de glucose est probablement plus importante sous O_2 qu'en milieu anaérobie, pour une concentration en glucose égale dans la solution. Au final, l'effet de l' O_2 aux basses concentrations en glucose est double avec, d'une part, la capture des électrons de la GOx dans tout le volume de l'hydrogel et, d'autre part, une déplétion significative du glucose dans ce même volume, limitant la catalyse de l'enzyme dans les couches internes de l'hydrogel. Au contraire, pour les concentrations élevées en glucose, la majorité de l' O_2 atteignant l'hydrogel est consommée dans les couches externes, tandis que la plus grande fraction du glucose atteint les couches internes et peut être oxydée par la GOx sans que cette dernière soit sujette à la compétition de l' O_2 . Martins *et al.* ont modélisé ce phénomène pour la GOx immobilisée dans une matrice polymère inerte et des

médiateurs en solutions [23, 28]. Leurs simulations confirment bien l'aspect écrasé de la courbe de calibration aux basses concentrations en glucose.

Cependant, cette hypothèse n'est plus vraiment fondée pour la courbe de calibration du biocapteur à base de GDH et de PVP-Os [- 0,17 V]. En effet, nous avons précédemment étudié la réduction de l'O₂ sur une électrode modifiée par le PVP-Os [- 0,17 V] seul (c.f. § 1.3.1.). Alors même que le courant de réduction maximal était atteint (pour $E \leq -0,3$ V), nous avons conclu sur l'absence de déplétion significative de l'O₂ dans l'hydrogel. Ainsi, même en supposant que l'enzyme puisse modifier drastiquement la structure de l'hydrogel, il semble peu probable que la déplétion de l'O₂ soit à l'origine de la forme atypique de la courbe de calibration sous O₂.

Une autre originalité réside dans le fait que, pour les biocapteurs à base PVP-Os [- 0,17 V], l'effet de l'O₂ à saturation de glucose semble plus important quand la GDH est utilisée plutôt que la GOx. Or, les réponses sous argon étant très proches dans les deux cas (c.f. insert de la Figure 29) et l'effet de l'O₂ étant double (compétition + polymère) pour le biocapteur à base de GOx, on pourrait, a priori, présumer l'inverse.

Afin de tenter de répondre aux différentes interrogations soulevées, une étude de l'évolution des courants des différentes électrodes en fonction de la vitesse de rotation est réalisée pour toute une série de concentrations en glucose, sous argon ou O₂. En effet un accroissement du courant en fonction de l'amplitude de la convection forcée impliquerait une déplétion du glucose dans l'hydrogel majoritaire par rapport à une éventuelle déplétion d'O₂*. Au contraire, si le courant diminue avec la vitesse de rotation de l'électrode, c'est alors l'O₂ qui est plus vite renouvelée par convection, et est donc plus sujet à déplétion dans l'hydrogel.

3.4.2. Etude hydrodynamique de l'électrode à base de GOx et PVP-Os [- 0,17 V]

a) Sous argon

Sous O₂, l'évolution des courants avec la convection est simultanément dépendante des déplétions de l'O₂ et du glucose. Discriminer les deux contributions s'avérerait complexe. Cependant, et pour une même concentration en glucose dans la solution, la déplétion du glucose est très probablement plus marquée sous O₂ que sous argon. En effet l'O₂ oxyde la

* Notons que la réciproque n'est pas forcément vraie ; en particulier aux fortes concentrations en glucose où une déplétion partielle du glucose n'induirait pas forcément de concentrations locales dans l'hydrogel inférieures à la concentration de saturation. Dans ce cas, aucun effet positif sur le courant de l'amplitude de convection ne peut être détecté.

GOx parallèlement aux Os^{3+} et la concentration en Os^{3+} est elle-même accrue par la réaction entre les Os^{2+} et l' O_2 . Par conséquent, la concentration stationnaire en GOx oxydée, susceptible de consommer le glucose, est donc plus importante sous O_2 que sous argon. Evaluer la déplétion du glucose sous argon permet donc de conjecturer que cette dernière sera au moins aussi importante sous O_2 .

La Figure 30 présente l'évolution avec la convection forcée du courant de plateau à +0,1 V de l'électrode à base de GOx et PVP-Os [-0,17 V], sous argon, pour différentes concentrations en glucose. L'évolution des courants, pour chaque concentration, est exprimée relativement à la valeur du courant obtenue à 50 rpm (rotation minimale pour obtenir des courants stationnaires bien définis).

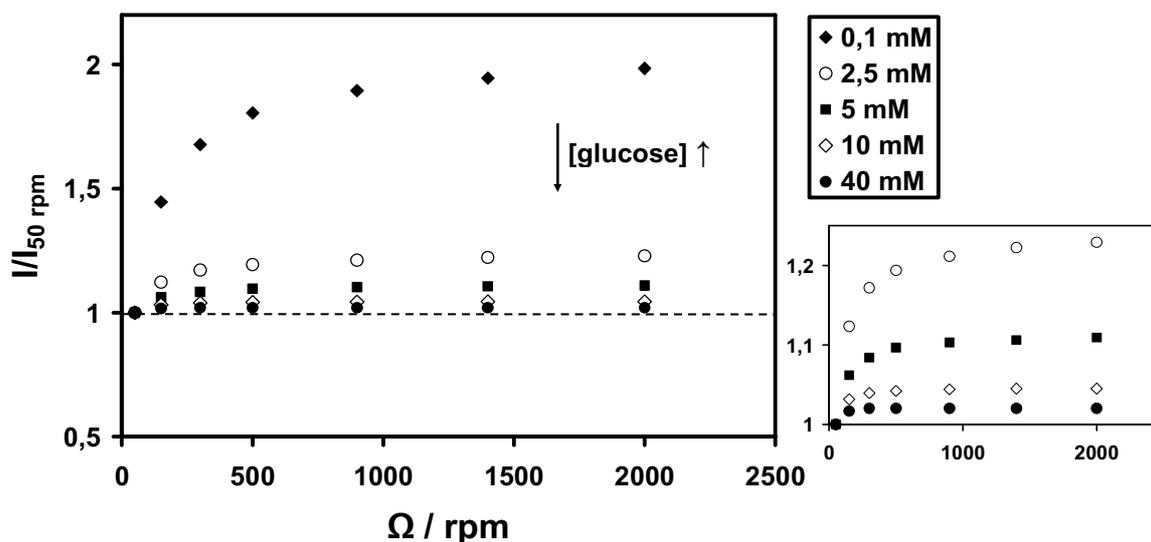


Figure 30. Evolution du courant de plateau sous argon avec la convection forcée de l'électrode à base de GOx et PVP-Os [-0,17 V], pour différentes concentrations en glucose. Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 25°C, par chronoampérométrie à +0,1 V. Les valeurs sont exprimées relativement au courant de plateau respectif pour chaque concentration à 50 rpm (convection minimale). **En insert** : zoom sur les plus faibles évolutions.

Comme on pouvait s'y attendre, le courant augmente avec la vitesse de rotation de l'électrode quelle que soit la concentration en glucose. L'évolution est aussi de moins en moins marquée quand la concentration en glucose augmente de 0,1 mM (losanges pleins) à 40 mM (ronds pleins), indiquant la logique diminution de la déplétion du glucose dans l'hydrogel

quand la concentration de ce dernier augmente en solution. L'évolution du courant au delà de 500 rpm nous intéresse également, car c'est à cette vitesse de rotation qu'étaient mesurées les courbes de calibrations précédemment présentées. Cette évolution est encore significative à 0,1 mM et 2,5 mM (voir zoom en insert), très faible à 5 mM, quasi-nulle à 10 mM, et nulle à 40 mM. Elle est représentative de la déplétion en glucose dans l'hydrogel pour chaque concentration considérée de la courbe de calibration correspondante (Figure 24 sous argon).

b) Sous oxygène

Les résultats de la même expérience réalisée sous O_2 sont présentés sur la Figure 31. L'évolution à 0,1 mM de glucose n'est pas représentée dans la mesure où aucun courant ne traversait l'électrode, et ce quelle que soit la vitesse de rotation. Autrement dit, et à cette concentration, tous les électrons générés par l'oxydation du glucose sont captés par l' O_2 , d'abord directement sur la GOx, puis sur les Os^{2+} si l'électron a pu atteindre le médiateur artificiel.

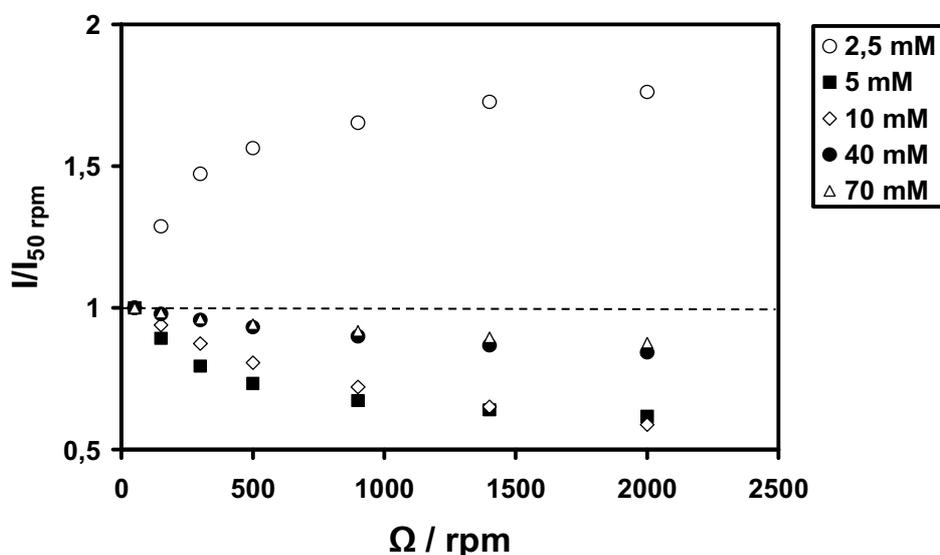


Figure 31. Evolution du courant de plateau sous O_2 avec la convection forcée de l'électrode à base de GOx et PVP-Os [$- 0,17$ V], pour différentes concentrations en glucose. Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, $25^\circ C$, par chronoampérométrie à $+ 0,1$ V. Les valeurs sont exprimées relativement au courant de plateau respectif pour chaque concentration à 50 rpm (convection minimale).

A 2,5 mM de glucose, le courant augmente fortement avec la vitesse de rotation de l'électrode. De 50 rpm à 2000 rpm, le gain est de 76 % sous O₂ alors qu'il n'était que de 23 % sous argon. Cela indique bien que la déplétion du glucose est forcément plus importante sous O₂ que sous argon. Par ailleurs cela implique aussi que, sous O₂ et 2,5 mM de glucose, la baisse du courant due à la déplétion du glucose est plus importante que le gain dû à la déplétion de l'O₂ (auquel cas la croissance du courant avec la convection serait plus lente sous O₂ que sous argon). Ces résultats suggèrent donc une déplétion du glucose relativement forte, tandis que l'O₂ conserve une concentration élevée dans tout l'hydrogel, maximisant son effet. Ceci est cohérent avec la forme très aplatie de la courbe de calibration sous O₂, où la réponse en courant est quasi-nulle entre 0 mM et 4 mM.

Quand la concentration en glucose atteint 5 mM, un nouveau comportement est observé. L'évolution du courant avec la convection est négative, avec une perte de 40 % quand la rotation évolue de 50 rpm à 2000 rpm. Cela implique un effet plus important de la déplétion de l'O₂ dans l'hydrogel que de celle du glucose. Ce fait est lui aussi cohérent avec l'hypothèse selon laquelle la forme de la courbe de calibration est régie par la déplétion de l'O₂ dans l'hydrogel. En effet, c'est à 5 mM qu'interviennent la rupture de pente et la forte croissance du courant avec la concentration en glucose, attribuées à la consommation d'une majorité de l'O₂ dans les couches externes de l'hydrogel.

A 10 mM en glucose, l'effet est assez semblable, hormis que l'évolution paraît plus marquée aux fortes convections qu'à 5 mM, où la diminution en courant semble atteindre un plateau. Une hypothèse permettrait d'expliquer cet effet. La forme de la courbe de calibration mesurée à 500 rpm suggère que 5 mM en glucose est une concentration limite entre une concentration significative en O₂ dans l'hydrogel (pour les concentrations en glucose $\sim \leq 4$ mM) et une déplétion importante de l'O₂ ($\sim \geq 5$ mM). Les fortes convections permettraient donc un renouvellement important de l'O₂ dans les couches internes de l'hydrogel et des concentrations locales en O₂ qui n'évolueraient plus que peu avec les plus fortes rotations. D'autre part, augmenter la convection, à 5 mM, doit aussi diminuer la déplétion du glucose et donc induire un effet positif sur le courant qui pourrait en partie compenser l'effet négatif dû à l'apport d'O₂. Au contraire, à 10 mM, l'effet de l'O₂ est moins important pour les faibles convections car la déplétion de l'O₂ est beaucoup plus marquée et persiste quand la vitesse de rotation augmente. Par ailleurs, l'effet positif de la convection sur la limitation de déplétion du glucose est bien moindre qu'à 5 mM ; et il est toujours possible d'amplifier l'effet de l'O₂ en augmentant la convection, même aux grandes vitesses de

rotation. D'où, finalement, une baisse du courant aux fortes convections pour 10 mM en glucose, alors qu'il se stabilise pour 5 mM.

Enfin, pour les concentrations à saturation (40 mM et 70 mM), l'augmentation de la vitesse de rotation n'induit qu'une faible baisse du courant. La consommation de l'O₂ dans les couches les plus externes de l'hydrogel doit être maximale. Même en augmentant la convection, la déplétion en O₂ doit rester marquée, et une fraction importante de l'hydrogel présente des concentrations en O₂ minimales, permettant une oxydation plus efficace du glucose.

c) Profils de concentration

Un résumé des différents profils de concentration des espèces dissoutes majoritairement consommées dans l'hydrogel est proposé dans le Tableau 3.

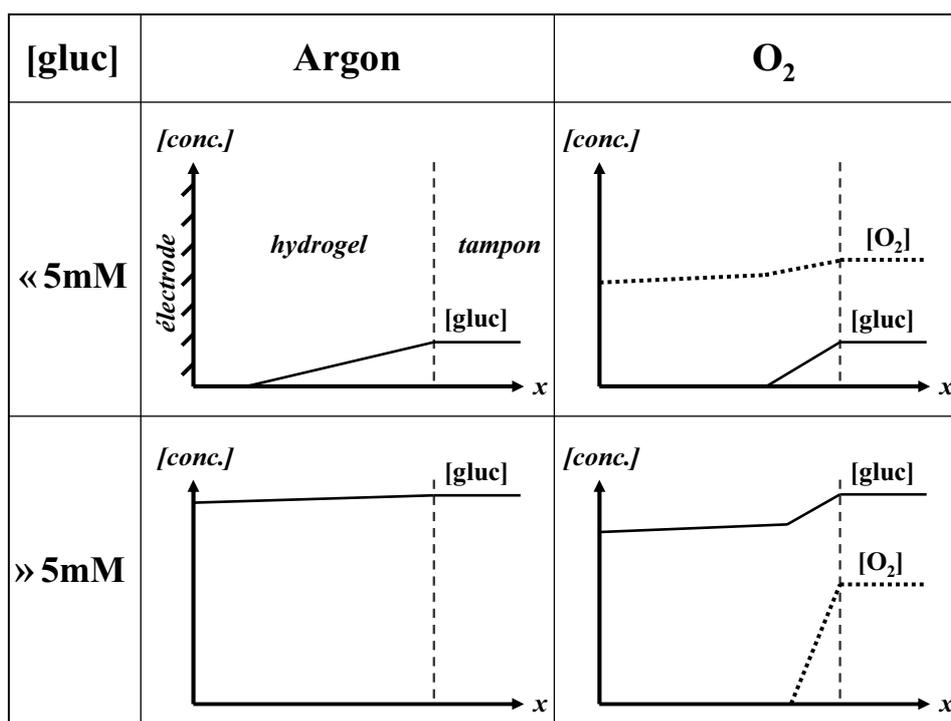


Tableau 3. Profils de concentration schématisés des espèces consommées dans l'hydrogel à base de GOx et PVP-Os[- 0,17 V], selon la distance normale à l'électrode x , pour de faibles ou fortes concentrations en glucose, sous argon ou O₂.

Les profils sont linéarisés, particulièrement simplifiés, et ne prétendent pas traduire la réalité complexe et les interactions entre les phénomènes de convection, diffusion,

consommation, *etc.*, des différentes espèces à travers l'hydrogel. En particulier, les coefficients de partition des deux substrats à l'interface hydrogel-tampon sont considérés comme égaux à 1, et les éventuelles couches de diffusion à l'extérieur de l'hydrogel ne figurent pas sur les profils. Ils ne sont donc présentés ici que pour illustrer schématiquement le propos développé précédemment.

d) Consommation de glucose multipliée en présence d'oxygène

La déplétion de l'O₂ dans l'hydrogel étant prouvée, il est intéressant de comparer le nombre approximatif d'électrons que l'O₂ capte par unité de temps avec le nombre d'électrons atteignant l'électrode. Si on considère que tout l'O₂ qui pénètre dans l'hydrogel est consommé pour les fortes concentrations de glucose, la densité de courant correspondant à la densité de flux d'O₂ approche $-1,9 \text{ mA.cm}^{-2}$ *. En comparaison, la densité de courant traversant l'électrode sous O₂ à saturation en glucose est de $+0,17 \text{ mA.cm}^{-2}$ (cf. Figure 24). Ainsi, la majorité des électrons issus de la réaction entre la GOx et le glucose est collectée par l'O₂ plutôt que par l'électrode. Il est possible d'estimer la vitesse de consommation surfacique en glucose par la GOx :

$$\frac{1}{S} \frac{dn_{gluc}}{dt} = \frac{1}{nF} (|j| + |j_{lim(O_2)}|) \quad \text{(Eq. 26)}$$

où S est la surface géométrique de l'électrode, dn_{gluc}/dt la vitesse de consommation en glucose, n le nombre d'électrons fournis par molécule de glucose (n = 2), F la constante de Faraday, j la densité de courant traversant l'électrode et $j_{lim(O_2)}$ la densité de courant limite de diffusion convection de l'O₂. La consommation en glucose est alors évaluée à $11 \text{ nmol.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$. Sous argon, où tous les électrons issus du glucose atteignent l'électrode, la densité de courant à saturation ($0,23 \text{ mA.cm}^{-2}$) correspond à une consommation de glucose de seulement $1,2 \text{ nmol.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, soit neuf fois moins que sous O₂. Ceci met en relief quatre points importants :

- 1) la forte compétition de l'O₂ pour les électrons de la GOx, cette dernière réagissant plus facilement avec son médiateur naturel qu'avec les Os³⁺ ;

* Prédit par la théorie de Levich, dont le bien-fondé de l'utilisation quant au transport de l'O₂ dans l'hydrogel a été discuté en § 1.3.1. Pour $\Omega = 500 \text{ rpm}$, $T = 25^\circ\text{C}$, et $n = 2$.

- 2) à saturation et sous argon, les propriétés catalytiques de la GOx envers le glucose (*turnover* k_{cat}) ne sont pas limitantes pour la valeur du courant de plateau. En effet l'enzyme oxyde en moyenne neuf fois plus vite le glucose sous O_2 que sous argon et cette vitesse est elle-même limitée par l'apport d' O_2 . C'est donc très probablement la cinétique de transfert entre la GOx et les Os^{3+} qui est le phénomène limitant majoritairement le courant* ;
- 3) la réaction majoritaire entre la GOx et l' O_2 a pour produit le H_2O_2 . En plus d'altérer la stabilité de la GOx [26, 72], ce dernier peut lui aussi capter des électrons de l'hydrogel par le truchement de sa réduction sur les Os^{2+} (c.f. § 1.4.6.) et diminuer d'autant la réponse en courant du biocapteur ;
- 4) aux basses concentrations en glucose, la déplétion de ce dernier dans l'hydrogel doit être significativement accrue sous saturation d' O_2 par rapport à une solution désoxygénée. On peut en effet considérer que le glucose est majoritairement consommé par l' O_2 .

e) Conclusion

En conclusion, cette étude hydrodynamique corrobore bien l'hypothèse selon laquelle la forme de la courbe sous O_2 est majoritairement due à une déplétion de l' O_2 dans l'hydrogel. Aux faibles concentrations en glucose (environ ≤ 4 mM), la concentration en O_2 reste significative dans tout le volume de l'hydrogel. La compétition de l' O_2 pour les électrons de la GOx, ainsi que sa réduction sur les Os^{3+} , sont donc maximales. Par ailleurs, la déplétion du glucose est largement accrue sous O_2 . Les réponses correspondantes en courant sont alors particulièrement faibles. Au contraire, quand la concentration en glucose augmente en solution (> 5 mM), la déplétion du glucose tend logiquement à diminuer, tandis qu'apparaît une déplétion significative de l' O_2 . La réponse en courant du biocapteur augmente alors rapidement avec la concentration en glucose, jusqu'à l'établissement d'un pseudo plateau de saturation.

* Se référer au § 2.2.2.c du chapitre 2 de ce manuscrit pour une plus ample discussion à ce propos.

3.4.3. *Etude hydrodynamique de l'électrode à base de GDH et PVP-Os [- 0,17 V]*a) Sous argon

La même étude a été réalisée pour l'électrode à base de GDH et PVP-Os [- 0,17 V]. Les résultats obtenus sous argon sont présentés sur la Figure 32. Ils sont similaires à ceux obtenus avec la GOx, c'est à dire qu'une évolution croissante du courant avec la convection forcée est observée, évolution de moins en moins marquée quand la concentration en glucose augmente.

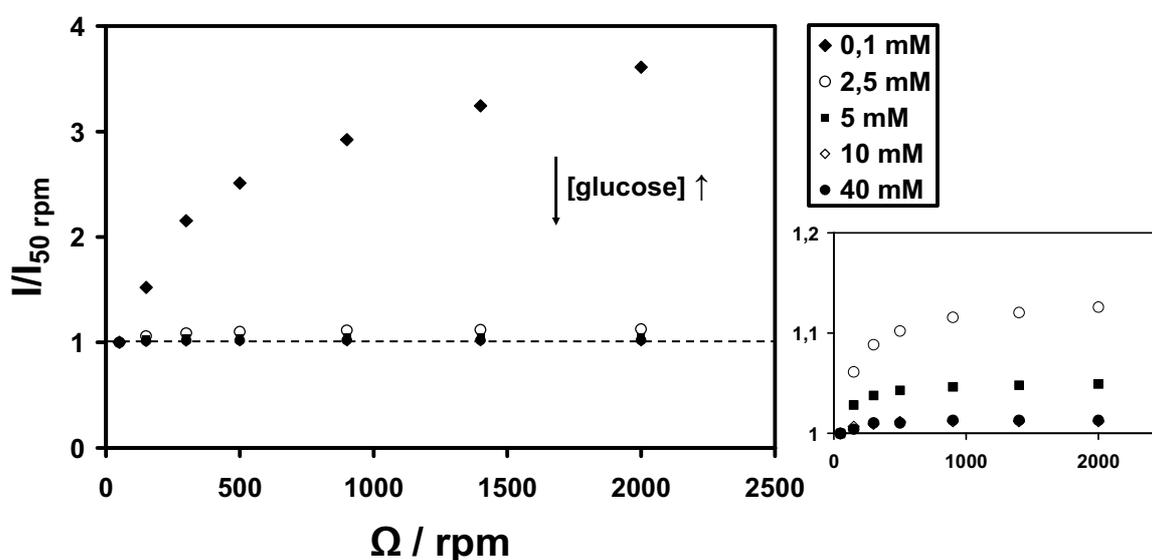


Figure 32. Evolution du courant de plateau sous argon avec la convection forcée de l'électrode à base de GDH et PVP-Os [- 0,17 V], pour différentes concentrations en glucose. Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 25°C, par chronoampérométrie à + 0,1 V. Les valeurs sont exprimées relativement au courant de plateau respectif pour chaque concentration à 50 rpm (convection minimale). **En insert** : zoom sur les plus faibles évolutions.

Du fait de l'évolution des courants après 500 rpm, on peut conjecturer, relativement à la courbe de calibration sous argon obtenue à cette convection (Figure 27), une déplétion du glucose forte à 0,1 mM, modeste à 2,5 mM, et faible à 5 mM. Le courant n'évolue plus au-delà de 500 rpm pour les concentrations supérieures à 10 mM, c'est-à-dire à saturation en glucose.

b) Sous oxygène

Quand l'étude hydrodynamique est réalisée sous O_2 (Figure 33), l'évolution du courant avec la convection est proche de celle mesurée sous argon.

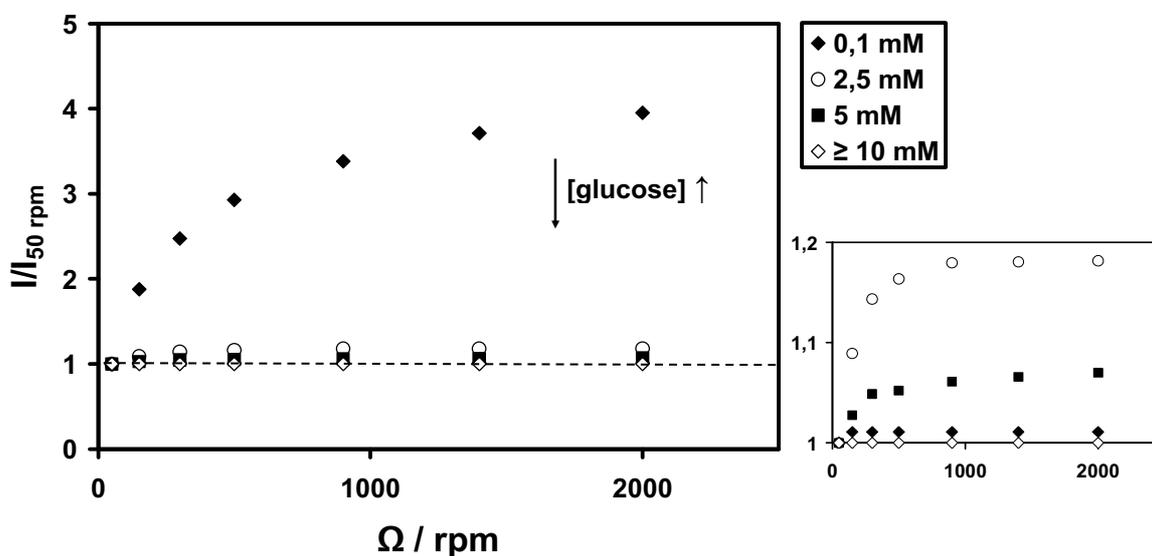


Figure 33. Evolution du courant de plateau sous O_2 avec la convection forcée de l'électrode à base de GDH et PVP-Os $[-0,17\text{ V}]$, pour différentes concentrations en glucose. Tampon phosphate de sodium 100 mM , $\text{pH } 7,2$, 25°C , par chronoampérométrie à $+0,1\text{ V}$. Les valeurs sont exprimées relativement au courant de plateau respectif pour chaque concentration à 50 rpm (convection minimale). **En insert** : zoom sur les plus faibles évolutions.

En particulier, aucune décroissance du courant avec la convection n'a été détectée, même à saturation en glucose (pour des concentrations de 10 mM à 70 mM , l'évolution est nulle de 50 rpm à 2000 rpm). Or, nous savons que la réduction de l' O_2 sur les Os^{2+} est dépendante de la concentration en O_2 , et cela que des enzymes soient présentes (Figure 28, droite) ou non (Figure 14) dans l'hydrogel. Ainsi, la déplétion en O_2 est insignifiante dans l'hydrogel même à saturation en glucose, et donc, a fortiori, aux faibles concentrations. Ce fait est en adéquation avec l'étude du § 1.3.1., qui concluait sur la faible déplétion de l' O_2 dans le cas du polymère seul, alors que la consommation d' O_2 était nécessairement plus importante dans cette circonstance. En effet les potentiels d'électrode étaient largement négatifs, maximisant la concentration en Os^{2+} dans l'hydrogel, et la cinétique de la réaction rédox était aussi intrinsèquement plus rapide, car la température était plus élevée.

c) Discussion et profils de concentration

Une conclusion préliminaire de cette étude est que pour toute concentration en glucose, le profil de concentration de l'O₂ dans l'hydrogel est quasi-plat et égal à la concentration de saturation en O₂ dans le tampon (1,3 mM). Ainsi, la forme originale de la courbe de calibration ne peut être attribuée à une déplétion d'O₂.

Une 2^{ème} hypothèse pourrait être une déplétion accrue du glucose dans l'hydrogel sous O₂ par rapport au milieu anaérobie. L'effet serait évidemment plus marqué aux faibles concentrations en glucose et pourrait donc justifier la forme de la courbe. Cependant, plusieurs faits semblent contredire cette hypothèse :

1) une consommation supplémentaire de glucose par le biais de l'O₂ est nécessairement corrélée à une consommation d'O₂. Or, nous venons de constater l'absence de déplétion significative en O₂, et cela même à saturation en glucose * ;

2) la concentration limite où la déplétion en glucose devient négligeable, à 500 rpm, semble similaire sous argon ou sous O₂. Elle est comprise entre 5 mM (effet très faible de la convection au-delà de 500 rpm) et 10 mM (plus aucun effet). Une consommation en glucose significativement plus importante sous O₂ devrait accroître l'effet de la convection à ces concentrations ;

3) sur la Figure 27, la saturation en glucose semble atteinte à ~ 10 mM que ce soit sous argon ou O₂. Une consommation supplémentaire et significative de glucose sous O₂ devrait induire un décalage de la concentration de saturation (ce qui est d'ailleurs le cas quand la GOx est utilisée, comme l'illustre la Figure 24).

Ainsi, et selon toute vraisemblance, le profil de concentration en glucose dans l'hydrogel ne varie pas ou peu avec la présence d'O₂, et cela quelle que soit la concentration de glucose en solution. La forme originale de la courbe de calibration ne peut donc être attribuée à une déplétion accrue du glucose sous O₂.

Les profils de concentrations schématisés sont représentés dans le Tableau 4, pour les quatre combinaisons argon/O₂ avec des concentrations en glucose faible/élevée. Il illustre le

* Notons que l'on pourrait imaginer une déplétion accrue du glucose sans effet manifeste sur le profil de concentration en O₂ si la diffusion du glucose était largement entravée par l'hydrogel (contrairement à celle de l'O₂). Toutefois, les deux arguments 2) et 3) sont indépendants de l'effet de l'hydrogel sur le transport du glucose.

fait que le profil d'une espèce particulière est quasi-indépendant des concentrations locales de l'autre espèce.

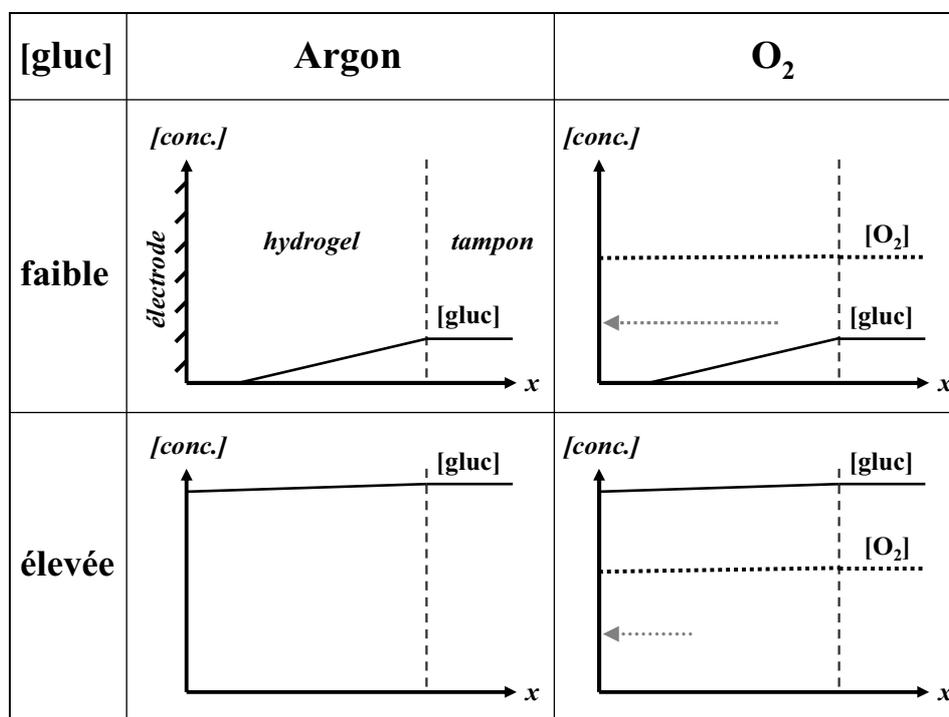


Tableau 4. Profils de concentrations schématisés des espèces consommées dans l'hydrogel à base de GDH et PVP-Os[- 0,17 V], selon la distance normale à l'électrode x , pour de faibles ou fortes concentrations en glucose, sous argon ou O₂. Les flèches grises schématisent les parcours moyens des électrons depuis leur site de *génération* (GDH) jusqu'à l'électrode.

Au final, ni une déplétion d'O₂, ni une exacerbation de la déplétion en glucose en présence d'O₂ ne peuvent justifier la forme de la courbe sous O₂.

Une autre hypothèse pourrait être l'effet de la déplétion du glucose sur le parcours moyen que doivent effectuer les électrons pour rejoindre l'électrode à travers l'hydrogel. En effet, aux faibles concentrations en glucose, la déplétion de ce dernier est fortement marquée dans l'hydrogel. La majorité de la réaction entre la GDH et le glucose est donc réalisée dans les couches externes de l'hydrogel, plus concentrées en glucose. Les électrons ainsi *générés* ont alors une distance importante à parcourir à travers l'hydrogel pour rejoindre l'électrode. La distance moyenne de parcours des électrons est schématisée par les flèches grises en pointillés sur les profils de concentrations du Tableau 4. Le temps moyen que nécessite ce

parcours est forcément croissant avec la distance. En conclusion, la probabilité pour l'électron de se faire capter par l'O₂, qui est présent dans tout l'hydrogel, doit être considérable.

Au contraire, quand le glucose est encore fortement concentré jusqu'à la surface de l'électrode, les électrons sont produits dans toute l'épaisseur de l'hydrogel. Dans le cas où la saturation en glucose est atteinte en tout point de ce dernier, il est même probable que la vitesse locale de production des électrons soit plus importante en s'approchant de la surface de l'électrode. En effet, les concentrations locales en Os²⁺ diminuent en s'approchant de la surface, où elles tendent vers zéro (courant de plateau [28, 54, 88]). Par conséquent, les plus fortes concentrations en Os³⁺, susceptibles d'oxyder la GOx, se situent au plus proche de l'électrode. On peut en déduire que la distance moyenne à parcourir, pour les électrons, est alors inférieure à la moitié de l'épaisseur de l'hydrogel. Une distance plus courte nécessitant un temps plus faible, la probabilité pour l'électron d'être capté par l'O₂ diminue donc avec la concentration en glucose.

Cette hypothèse pourrait donc expliquer le fait que l'O₂ ait un effet plus marqué aux faibles concentrations en glucose dans le cas de l'électrode à base de GDH et de PVP-Os [-0,17 V] (cf. Figure 27).

L'épaisseur de l'hydrogel étant un des facteurs déterminant la déplétion du glucose et la distance à parcourir pour l'électron, une étude de la forme des courbes selon Γ_{tot} pourrait permettre de corroborer cette théorie.

3.5. Effet de l'épaisseur de l'hydrogel sur la forme des courbes sous oxygène

3.5.1. Introduction

L'évolution de l'épaisseur d'un hydrogel redox hydraté avec la masse surfacique déposée (Γ_{tot}) est souvent considérée comme linéaire [24, 77, 78, 80, 88] ou quasi linéaire [63]. Notons que ceci est probablement vérifiable pour une composition d'hydrogel donnée, dans un environnement fixé. En effet, le degré de réticulation [80, 89], la proportion et la nature de l'enzyme immobilisée [31], le type de polymère [61, 90], l'état d'oxydation des complexes [91] et les paramètres physiques du tampon (T, pH, force ionique [24, 44, 63, 80, 92]) peuvent modifier le degré d'hydratation de l'hydrogel, et donc son épaisseur. Le dépôt de

l'hydrogel peut aussi présenter des hétérogénéités [61], par exemple de forts effets de bord [90]*.

Sans nous engager quant à une éventuelle relation de proportionnalité entre l'épaisseur de l'hydrogel hydraté et Γ_{tot} , nous admettons une relation croissante et quasi-linéaire entre les deux variables. Nous supposons aussi que la quantité de matière déposée ne modifie pas significativement la structure de l'hydrogel, et donc les propriétés de diffusion des électrons et des substrats dans son volume.

Toutes les électrodes testées présentent la même composition (60 % massique de PVP-Os [-0,17 V], 30 % d'enzyme, 10 % de PEGDGE) et sont testées sous O_2 dans les mêmes conditions. Seul Γ_{enz} évolue.

3.5.2. *Electrodes à base de GOx et PVP-Os [-0,17 V]*

La Figure 34 (Gauche) présente les courbes de calibration sous O_2 des électrodes à base de GOx et de PVP-Os[- 0,17 V] pour différentes épaisseurs d'hydrogel (Γ_{tot} de $40 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (losanges noirs), $100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (ronds vides) et $500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (carrés vides).

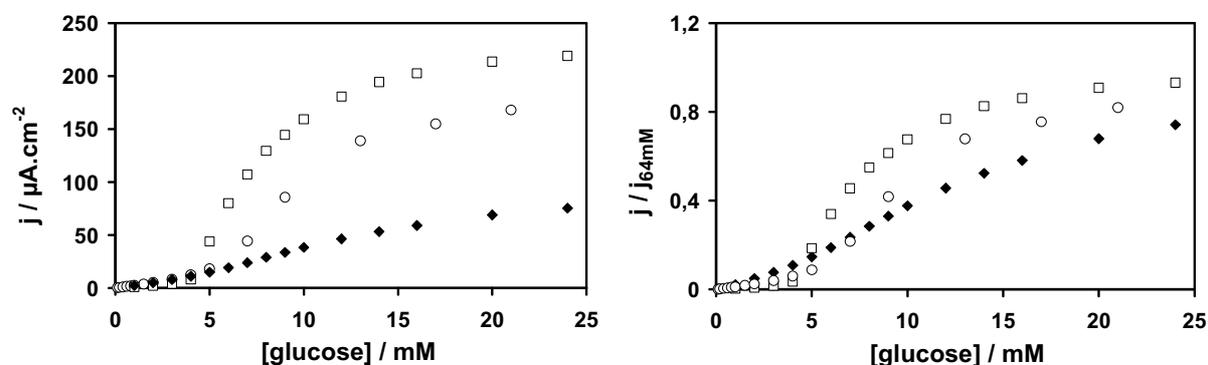


Figure 34. (Gauche) Courbes de calibration sous O_2 des électrodes à base de GOx et de PVP-Os[- 0,17 V] pour des Γ_{tot} de $40 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (losanges), $100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (ronds) et $500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (carrés). Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 25°C , 500 rpm, mesurées à + 0,1 V. (Droite) Normalisées par rapport aux courants respectifs à saturation (64 mM).

* Dans ces conditions, il serait plus formel d'évoquer une évolution de l'épaisseur *moyenne* de l'hydrogel avec Γ_{tot} . Pour une lecture plus fluide de l'étude à venir, seul le terme *épaisseur* sera utilisé.

L'évolution du courant jusqu'à 4 mM est quasi identique pour les trois épaisseurs. Elle correspond à des hydrogels où les concentrations locales en O_2 sont encore considérables dans tout le volume de l'hydrogel, avec de fortes déplétions de glucose dès les couches externes. A partir de 5 mM en glucose, la transition apparaît pour les trois épaisseurs. La déplétion en O_2 est alors importante et une fraction non négligeable du glucose peut rejoindre les couches internes de l'hydrogel pour s'y faire oxyder sans effet majeur de l' O_2 . La transition semble bien plus prononcée quand l'hydrogel est plus épais. Ceci est vérifié quand les courbes sont normalisées par rapport à leur courant de saturation respectif, mesuré à 64 mM en glucose (Figure 34, Droite). L'hypothèse prédominante est que lorsque la déplétion en O_2 est significative, le volume d'hydrogel pauvre en O_2 va augmenter avec l'épaisseur de l'hydrogel. En effet, l'épaisseur de la couche de déplétion en O_2 est probablement similaire quelque soit l'épaisseur de l'hydrogel, étant donnée que la concentration en GOx peut-être considérée comme constante pour chaque hydrogel. Ainsi, l'épaisseur de la couche de déplétion en O_2 avoisine sans doute celle de l'hydrogel le plus fin. Au contraire, elle est relativement mince par rapport à l'hydrogel le plus épais, où dès 5 mM de glucose, une fraction du glucose est oxydée dans un volume quasi dépourvu d' O_2 .

Pour confirmer cette hypothèse, une étude hydrodynamique est menée sous O_2 et saturation de glucose (64 mM), pour l'hydrogel le plus fin ($40 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) et le plus épais ($500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Les résultats sont présentés sur la Figure 35.

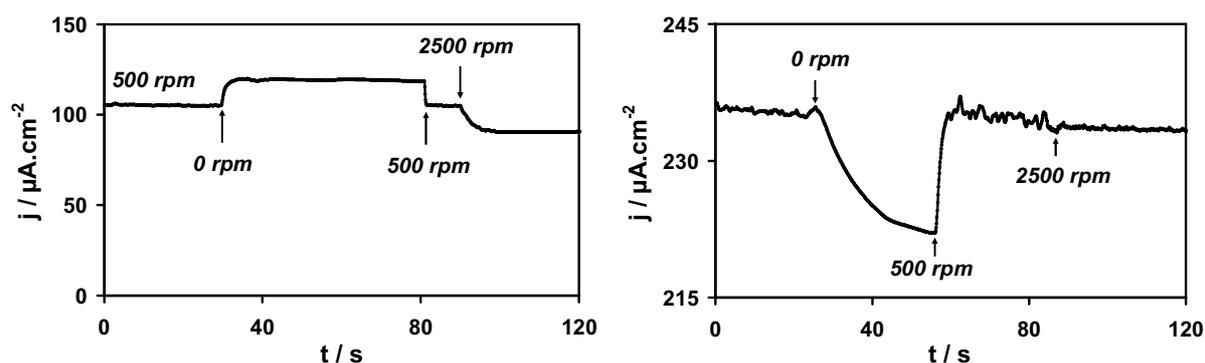


Figure 35. Evolution du courant avec la vitesse de rotation, sous O_2 et saturation de glucose (64 mM). (**Gauche**) hydrogel fin ($40 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). (**Droite**) hydrogel épais ($500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). GOx et PVP-Os[- 0,17 V]. Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 25°C , + 0,1 V. Les flèches indiquent les modifications de la convection forcée. N.B. : les échelles en courant sont différentes.

Pour l'hydrogel fin (Gauche), couper la convection forcée induit aussitôt une augmentation du courant d'environ 15 % ($t = 30$ s). En effet, l'oxygène est rapidement consommé et son renouvellement ne se fait plus que par diffusion, tandis que le glucose est toujours en large excès. Au contraire, quand la vitesse de rotation passe de 500 rpm à 2500 rpm ($t = 105$ s), les concentrations locales en O_2 augmentent, ce qui diminue le courant de 14 %. Cette dépendance significative à la concentration d' O_2 confirme qu'une partie des électrons collectés par l'électrode est *générée* dans (ou près de) la couche de déplétion de l' O_2 . L'épaisseur de cette dernière est donc comparable à celle de l'hydrogel fin.

L'évolution du courant est différente pour un hydrogel épais (Droite). Quand l'électrode est immobilisée ($t = 25$ s), le courant décroît immédiatement et sans discontinuer. Ceci est typique d'une diminution des concentrations locales en glucose, dont le transport n'est plus assuré que par la diffusion. Aucun effet positif de la baisse des concentrations locales en O_2 n'est observé. En outre, augmenter la vitesse de rotation de 500 rpm à 2500 rpm, c'est-à-dire agrandir la couche de déplétion d' O_2 dans l'hydrogel, ne modifie pas le courant ($t = 90$ s). Ceci prouve que, dans le cas de l'hydrogel épais, la couche de déplétion en O_2 est cantonnée aux couches externes de l'hydrogel, et que la majorité des électrons collectés par l'électrode est générée dans les couches internes et pauvres en O_2 .

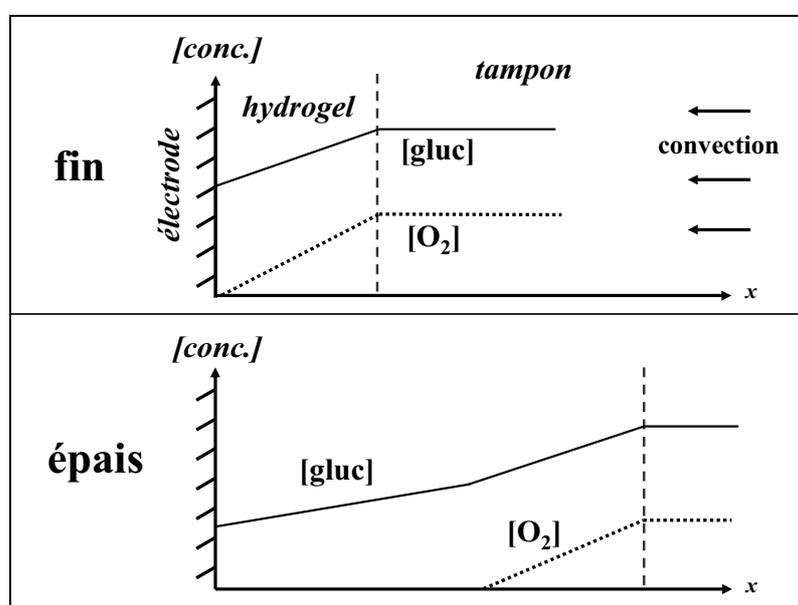


Tableau 5. Profils de concentrations schématisés des espèces consommées dans des hydrogels à base de GOx et PVP-Os[- 0,17 V], pour un hydrogel fin et un hydrogel épais. Tracés pour une concentration en glucose supérieure à 5 mM et inférieure à la saturation.

Afin d'illustrer le propos, des profils de concentration schématisés et linéarisés sont présentés dans le Tableau 5. Ils sont tracés pour un hydrogel fin ou épais, sous une concentration en glucose supérieure à 5 mM (transition en courant) mais inférieure à la saturation.

D'autre part, la normalisation des courbes par rapport au courant de saturation (Figure 34, Droite) permet de constater que la saturation apparente semble se produire à plus faible concentration de glucose quand l'hydrogel est plus épais. A première vue, cela peut paraître contradictoire, dans la mesure où un hydrogel plus épais comporte davantage d'enzymes et délivre un courant de saturation plus élevé (c.-à-d. consomme plus de glucose)*, sans compter une éventuelle complication de la diffusion du glucose avec l'épaisseur. Cependant, Gregg et Heller ont montré que du fait de la compétition de l'O₂ pour les électrons de la GOx, atteindre la saturation apparente (c.-à-d. le courant maximal) nécessite une concentration de glucose qui croît avec la concentration d'O₂ [78]. Pour l'hydrogel épais, la grande majorité des électrons collectés par l'électrode est *générée* dans les couches internes. Dans ces dernières, la concentration en O₂ est faible et les concentrations locales en glucose nécessaires pour atteindre la saturation sont donc proches de la concentration de saturation observée sous argon. Au contraire, pour un hydrogel fin, les électrons collectés par l'électrode sont *générés* sous des concentrations locales d'O₂ plus élevées, ce qui accroît la concentration de saturation en glucose.

Il est intéressant de constater que l'évolution de la forme des courbes sous O₂ selon l'épaisseur de la matrice immobilisant la GOx avait été prédite par un modèle proposé par Martens et Hall [28]. Les simulations correspondantes sont présentées sur la Figure 36.

* Les données ne sont pas traitées ici, mais l'auteur tient à préciser que pour des électrodes modifiées avec une enzyme et un polymère fixés, la concentration de saturation en glucose sous argon augmentait généralement avec la valeur du courant à saturation.

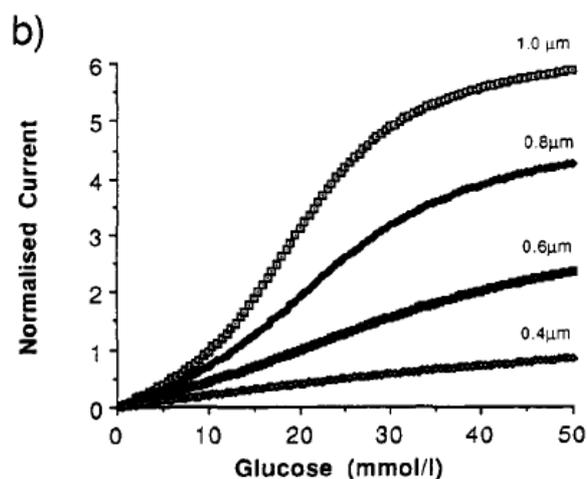


Figure 36. Simulations de courbes de calibration sous O_2 pour des électrodes à base de GOx immobilisée dans une matrice perméable et inerte, selon l'épaisseur de la matrice. La quantité de GOx immobilisée est proportionnelle à l'épaisseur. Le médiateur artificiel est considéré en solution et uniquement sous sa forme oxydée loin de l'électrode. Tiré de [28].

Si les simulations sont semblables à nos mesures expérimentales, une différence reste notable. Avec le modèle, les courants avant la transition (< 8 mM) augmentent avec l'épaisseur de la matrice, tandis qu'ils restent équivalents, voire légèrement inférieurs, dans notre étude (Figure 34, gauche). Nous pensons que ce fait est probablement dû à la réduction de l' O_2 sur les complexes d'osmium, qui n'est pas prise en compte dans le modèle. En effet, pour les faibles concentrations en glucose, la déplétion de ce dernier induit que les électrons sont majoritairement produits dans les couches externes de l'hydrogel. Si l'hydrogel est plus épais, la distance moyenne que doit parcourir l'électron pour rejoindre l'électrode est donc plus grande. La probabilité pour l'électron d'être capté par l' O_2 , dont la concentration reste significative dans l'hydrogel, est alors plus élevée.

Comme nous l'avons vu, seul ce dernier phénomène pourrait expliquer l'effet plus important de l' O_2 aux faibles concentrations de glucose lorsque la GDH est immobilisée à la place de la GOx. Un effet de l'épaisseur de l'hydrogel est donc également attendu.

3.5.3. Electrodes à base de GDH et PVP-Os [-0,17 V]

La Figure 37 (Gauche) présente les courbes de calibration sous O_2 des électrodes à base de GDH et de PVP-Os[- 0,17 V], pour différentes épaisseurs d'hydrogel : $40 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$

(losanges vides), $100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (ronds vides), $250 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (carrés gris) $500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (triangles noirs).

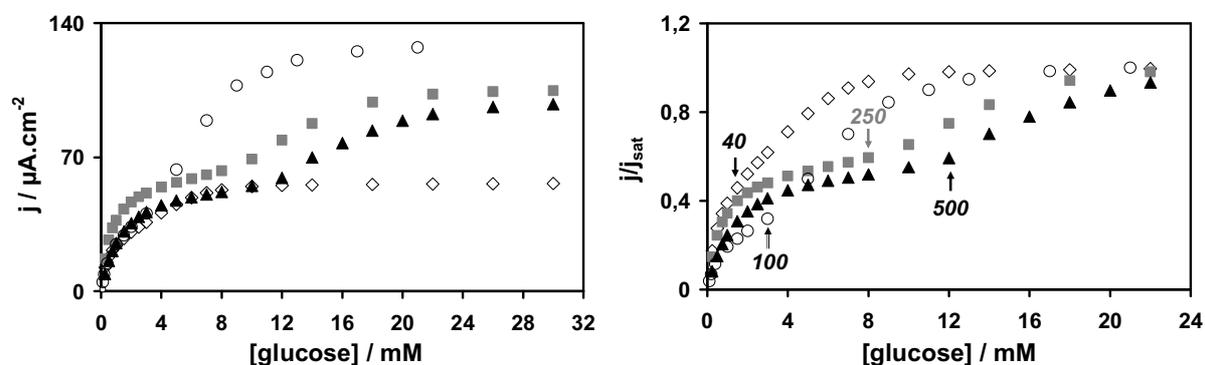


Figure 37. (Gauche) Courbes de calibration sous O_2 des électrodes à base de GDH et de PVP-Os[$-0,17 \text{ V}$], pour différents Γ_{tot} : $40 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (losanges vides), $100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (ronds vides), $250 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (carrés gris) $500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (triangles noirs). Tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, 25°C , 500 rpm, mesurées à $+0,1 \text{ V}$. (Droite) Courbes normalisées par rapport aux courants de saturation respectifs. Les flèches indiquent approximativement les transitions pour chaque Γ_{tot} .

Il est tout d'abord notable que l'évolution des courants de saturation n'est plus monotone avec l'épaisseur de l'hydrogel. En effet, le courant maximal croît quand le dépôt sur l'électrode passe de $40 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ à $100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ avant de diminuer pour les hydrogels les plus épais*. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce fait. D'une part, il est possible que la qualité du dépôt se dégrade avec l'épaisseur de l'hydrogel. De fait, les dépôts les plus fins semblaient en général les plus homogènes. Notons aussi qu'à ce pH, la GDH est globalement positivement chargée ($\text{pI} = 9,5$ [93]) et ne doit pas induire d'interaction électrostatique favorable avec le polymère polycationique. Enfin, augmenter l'épaisseur de l'hydrogel accroît l'importance de la diffusion des électrons dans le contrôle du courant. La diffusion des électrons devient probablement un facteur limitant [54]. Cette fois ci, les concentrations de saturation augmentent avec l'épaisseur de l'hydrogel (courbes normalisées, Droite). Comme les plus grosses épaisseurs ne fournissent pas les courants les plus élevés, cela peut suggérer une diffusion du glucose plus difficile dans les hydrogels les plus épais. Il faudrait donc une

* Notons cependant que si trois électrodes ont été préparées et testées le même jour, la mesure pour l'électrode à $100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ était antérieure de six mois. Le lot de GDH utilisé ainsi que les conditions de séchage de l'électrode (T, humidité) étaient différents. Il s'agit donc de comparer prudemment cette mesure avec les trois autres.

plus grande concentration de glucose dans le tampon pour atteindre la concentration de saturation dans les couches internes de l'hydrogel.

L'intérêt majeur de cette étude reste l'évolution de la forme des courbes de calibration sous O_2 avec l'épaisseur de l'hydrogel. La forme atypique remarquée à la Figure 27 est encore observée. Elle est d'ailleurs exacerbée quand l'épaisseur de l'hydrogel augmente.

Pour les deux hydrogels les plus épais, un plateau intermédiaire en courant, légèrement croissant, est clairement présent. Les courbes sont composées de deux *vagues* successives et nettement séparées. Quand l'épaisseur est intermédiaire ($100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), le pseudo-plateau est moins marqué, car plus court et plus croissant, comme si la seconde *vague* débutait avant la fin de la première. Enfin, pour l'hydrogel le plus fin ($40 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), il est seulement possible de deviner la transition, autour de 2 mM, du fait que l'aspect de la courbe diverge de la forme « classique » à une *vague* nette. Les deux *vagues* sont alors presque superposées.

Nous avons précédemment vu que la déplétion d' O_2 dans l'hydrogel à $100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ était insignifiante et que la présence d' O_2 ne modifiait pas la déplétion de glucose (cf. § 3.4.3.). Ainsi, la forme atypique de la courbe ne pouvait pas s'expliquer par ces deux éventualités. Nous supposons qu'il en est de même pour les plus grosses épaisseurs d'hydrogel, où même une modeste déplétion d' O_2 ne pourrait expliquer l'exacerbation de la forme atypique déjà observée en absence de déplétions notables. Aux faibles concentrations en glucose, une différence majeure induite par l'épaisseur est l'emplacement où se produit majoritairement la réaction entre la GDH et le glucose. Pour un hydrogel épais, la réaction se fait principalement dans ses couches externes, étant donnée que la déplétion en glucose est fortement marquée dans l'hydrogel. Pour les électrons ainsi *générés*, la distance moyenne à parcourir pour rejoindre l'électrode est alors maximale, et la probabilité d'être captés par l' O_2 également. Plus l'hydrogel est épais, plus la concentration en glucose doit donc être élevée pour permettre une réaction importante dans les couches internes, et diminuer ainsi le parcours moyen des électrons. A défaut d'autres hypothèses raisonnables, nous pensons qu'une transition de l'emplacement de réaction majoritaire est à l'origine de la transition dans la forme de la courbe de calibration sous O_2 (seconde *vague*). Cette conjecture est a priori cohérente eu égard à l'évolution croissante de la concentration de transition en glucose avec l'épaisseur (voir les flèches sur la Figure 37).

CONCLUSION, DISCUSSION, PERSPECTIVES

La présente conclusion se propose de récapituler les principaux résultats obtenus dans cette étude avant de discuter succinctement des possibles implications que pourrait avoir la réduction de l'O₂ sur le médiateur rédox dans des applications en biocapteurs ou biopiles. Cette discussion portera en particulier sur la réflexion préalable que pourrait nécessiter le choix d'un médiateur rédox d'un E°' particulier pour une application donnée.

Récapitulatif :

Les hydrogels rédox à base de complexes d'osmium présentent d'excellentes caractéristiques qui font d'eux un des systèmes les plus prometteurs pour réaliser des bioélectrodes enzymatiques [32, 34]. Cependant, et à notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur les possibles interactions entre les complexes d'osmium de l'hydrogel et l'O₂ dissous*.

La présente étude a démontré que l'O₂ réagit avec la forme réduite de certains complexes d'osmium greffés sur des polymères PVP ou PVI. Le produit majoritaire de la réduction de l'O₂ est le peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Ce dernier peut aussi se réduire sur les complexes d'osmium pour former de l'eau mais avec des cinétiques sensiblement plus lentes. Dans un environnement donné, la cinétique rédox entre l'O₂ et les complexes d'osmium testés semble uniquement subordonnée à la valeur du E°' du couple Os_{OX}/Os_{Red}. A pH 7,4, la réduction de l'O₂ a lieu sur des complexes greffés de E°' inférieur ou égal à + 0,07 V vs. Ag/AgCl. Sa cinétique augmente de manière exponentielle quand le E°' du complexe décroît, conformément à la théorie de Marcus.

L'effet de cette réduction sur la réponse en courant de bioanodes à glucose a ensuite été évalué. Avec les électrodes modifiées par le polymère le plus réducteur (E°' = - 0,17 V), l'impact de la réduction de l'O₂ sur les complexes est important, tout particulièrement aux faibles concentrations en glucose (≤ 5 mM). Une fraction des électrons *générés* par l'oxydation du glucose est captée par l'O₂ avant d'atteindre l'électrode. L'effet est même largement majoré si la GOx est immobilisée, car l'enzyme est aussi oxydée par l'O₂. Dans ce dernier cas, l'effet prononcé aux faibles concentrations en glucose est attribué à des

* A l'exception notable et concise de la référence [41] où aucun lien entre la réduction de l'O₂ sur les complexes d'osmium et la baisse du courant d'oxydation du glucose sous O₂ n'est envisagé.

concentrations locales d'O₂ significatives dans tout le volume de l'hydrogel ; aux plus fortes concentrations en glucose, une déplétion marquée de l'O₂ dans les couches externes de l'hydrogel permet d'obtenir un volume réactionnel anaérobie ce qui induit une rapide augmentation du courant. Cette déplétion est très majoritairement due à la réactivité de la GOx avec l'O₂.

Quand une enzyme non réactive à l'O₂ a été immobilisée (GDH), l'effet ne peut être attribué qu'à la réaction rédox entre l'O₂ et les complexes d'osmium. L'O₂ ne subit pas de déplétion significative dans l'hydrogel et la déplétion du glucose ne semble pas évoluer par rapport aux mesures anaérobies. L'impact plus important de l'O₂ aux basses concentrations en glucose est attribué à une *génération* majoritaire des électrons dans les couches externes de l'hydrogel (les plus concentrées en glucose). Le temps de parcours moyen de l'électron jusqu'à l'électrode est donc maximal ainsi que sa probabilité d'être capté par l'O₂ présent dans tout le volume de l'hydrogel. Quand la concentration en glucose augmente au sein de l'hydrogel, le parcours moyen de l'électron diminue et l'effet de l'O₂ sur le courant également.

Discussion :

La réduction de l'O₂ décrite dans cette étude pourrait intervenir dans le compromis conduisant au choix du E°' du complexe d'osmium. Proposer un E°' idoine serait insensé. En effet, le choix d'un E°' dépendra des caractéristiques de l'électrode modifiée (Γ_{tot} , enzyme utilisée, présence de membrane(s), etc.) et surtout de l'application pour laquelle elle est conçue (biocapteur, biopile, *in vivo* ou non). Ainsi il faudrait quantifier dans chaque cas particulier l'impact de la réduction de l'O₂ et le comparer aux bénéfices qu'apporte l'utilisation du médiateur à bas E°'.

Par ailleurs, il convient de garder à l'esprit que la présente étude a été menée dans des fortes concentrations d'O₂*, de surcroît continuellement renouvelées par convection forcée. Elle avait donc une valeur démonstrative et en aucun cas exclusive.

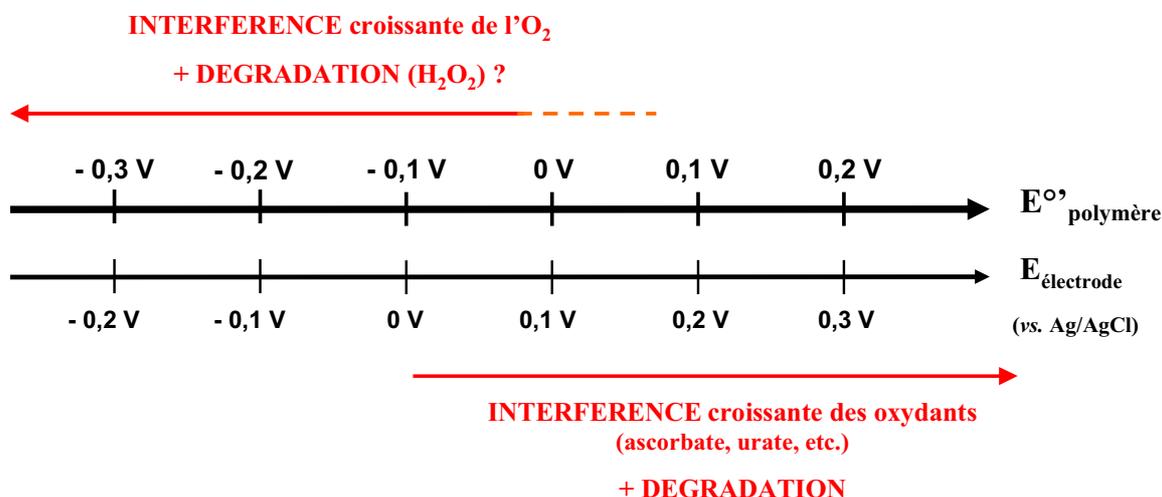
Etant donné la multitude de circonstances envisageables et le peu d'information à disposition, une discussion approfondie serait particulièrement longue, purement spéculative et tout simplement hors du cadre de cette thèse.

* Le plus souvent 1,07 mM (37°C) ou 1,29 mM (25°C), soit environ un ordre de grandeur au dessus des concentrations moyennes dans le sang, par exemple.

Ainsi, nous nous proposons de passer en revue les éventuels préjudices que pourrait causer la réduction de l'O₂ sur les médiateurs rédox dans le contexte des deux applications nous intéressant, mais de manière concise et sans préjuger de l'étendue de leur impacts. Par ailleurs, la discussion va être menée par rapport à des dispositifs qui utiliseraient des enzymes insensibles à l'O₂ (toutes les GDH, cf. § 1.3. du chapitre 1) qui suscitent un intérêt croissant dans les recherches pour applications aérobies. Outre une simplification, ceci permettra de se focaliser uniquement sur l'effet de la réaction de l'O₂ sur le médiateur*, fondement de cette étude.

Biocapteurs pour la mesure de la glycémie :

Le schéma ci-dessous présente les interférences chimiques possibles pour un biocapteur à glucose de seconde génération employant un polymère rédox à base d'osmium, selon le E°' de ce dernier. Le potentiel fixé à l'électrode est généralement plus élevé d'environ 100 mV [34]. Comme les interférences oxydatives sont généralement associées à ce potentiel, l'échelle correspondante est représentée.



Les interférences dues à l'oxydation d'espèces endogènes (par exemple l'urate ou l'ascorbate) ou exogènes (par exemple le paracétamol) débutent aux potentiels d'électrode ≥ 0 V (soit pour des E°' de médiateur $\geq -0,1$ V) [1]. Parmi les interférents cités, celui réagissant le plus significativement aux plus bas potentiels est généralement l'ascorbate [34, 41, 75]. Son

* A supposer que l'hypothétique matériau d'électrode ne présente pas d'affinité particulière pour l'O₂ au potentiel d'électrode considéré !

oxydation débute à 0 V sur le GC (cf. Annexe 2). L'oxydation de certains de ces composés peut aussi détériorer l'électrode [36, 94].

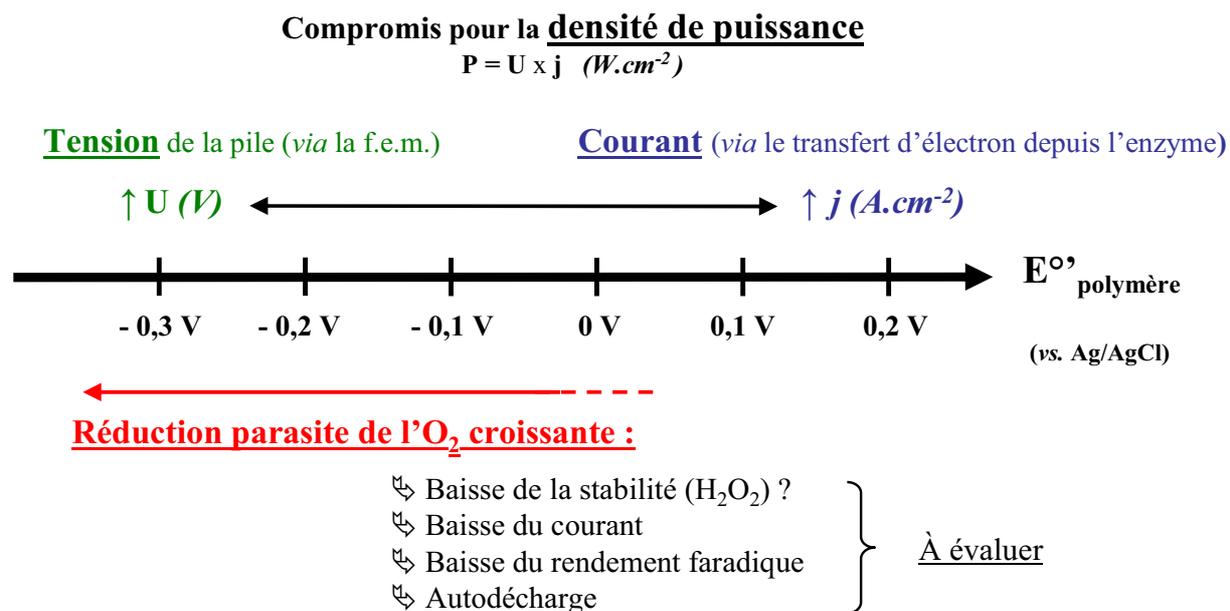
La réduction de l'O₂ pourrait intervenir pour des E° de polymère inférieurs à +0,07 V. Le trait discontinu aux plus hauts potentiels suggère l'incertitude quant à cette réduction pour les polymères correspondants (discussion du § 2.2.2.). Cette réduction :

- peut interférer dans la valeur du courant et donc la précision des mesures ;
- pourrait diminuer la stabilité du capteur par production de H₂O₂. Cette production n'est d'ailleurs pas recommandable pour des applications *in vivo*. L'utilisation couplée de catalase permettrait de diminuer cet effet.

Bien sûr, cette interférence ne se limite pas à la mesure de la glycémie ni au complexe d'osmium. Elle pourrait intervenir pour tout autre capteur de deuxième génération dont le médiateur présente une réactivité avec l'O₂ non négligeable.

Biopiles glucose/O₂

La partie supérieure du schéma suivant nous remémore le compromis usuellement mis en avant dans le choix du E° d'un médiateur rédox pour une anode de biopile [36, 48]. Ce choix détermine la force motrice pour arracher les électrons à l'enzyme (influençant le courant maximal de l'anode) et la f.e.m. de la pile (pour une cathode définie).



Pour une biopile dont les deux électrodes partagent la même solution, il va de soi que la sélectivité de chacune des électrodes par rapport à son réactif respectif est cruciale [32]. La réduction parasite de l'O₂, réactif cathodique, sur le médiateur de l'anode peut induire :

- une baisse du courant d'oxydation et donc de la puissance de la pile ;
- comme pour un biocapteur, une dégradation due à la production d'H₂O₂.

Deux points supplémentaires peuvent être cités. S'ils semblent absurdes pour des applications *in vivo*, ils pourraient être préjudiciables pour des utilisations plus *conventionnelles* (du type de la biopile de Sony [95]) requérant par nature des énergies spécifiques maximales :

- chaque électron capté par l'O₂ à l'anode est un électron provenant de l'oxydation du glucose qui n'alimentera pas le circuit électrique. Cette répercussion sur le rendement faradique devrait être comparée avec le gain sur la tension de fonctionnement qu'induit la baisse du E°. La résultante pourrait diminuer l'énergie spécifique de la pile et donc son autonomie ;

- l'autodécharge consécutive à la réduction de l'O₂ sur le médiateur pourrait être plus pernicieuse. En effet, chaque médiateur oxydé par l'O₂ (1) est à nouveau disponible pour oxyder l'enzyme (2), elle-même libre d'oxyder le glucose (3) :



Le bilan de ces réactions se révèle bien être l'oxydoréduction du glucose et de l'O₂ (4), catalysée par l'action cumulée de l'enzyme *et* du médiateur rédox :



Ainsi, même en circuit ouvert, les réactifs pourraient continuer à être consommés, tout en produisant du H₂O₂. Tout se passerait comme si la GOx était utilisée et non une enzyme insensible à l'O₂. Il s'agirait alors de vérifier que cette autodécharge peut être négligée pour le

type d'utilisation envisagée*. Notons enfin que la présence d'une simple membrane séparant l'anolyte du catholyte, si elle est perméable à l'O₂ (par exemple en cellophane), n'empêcherait pas cet effet.

Avant de mettre un point final à cette étude, l'auteur voudrait insister sur un point : cette étude ne remet pas en cause l'emploi de ces complexes à bas potentiel dans des bioanodes. De fait, ils ont déjà permis d'obtenir d'excellentes performances pour des applications en biocapteurs ou en biopiles. Cependant il convient :

- de garder à l'esprit la possibilité de leur réaction avec l'O₂ ;
- d'évaluer l'impact à court et long terme qu'elle pourrait avoir pour des applications précises dans un milieu aérobie donné ;
- de mettre en balance l'éventuel préjudice subi avec les bénéfices qu'apporte leur utilisation ;
- de chercher, le cas échéant, des solutions pour réduire cet impact.

* Bien sûr, ces deux derniers points sont à relativiser eu égard à la disponibilité et au coût des réactifs utilisés, ainsi qu'à l'innocuité de leur produit de réaction. En outre, le concept même d'énergie spécifique pratique n'a pas encore réellement sa place pour des systèmes dont la stabilité limitée ne permet pas encore, à notre connaissance, l'obtention de courbe de décharge.

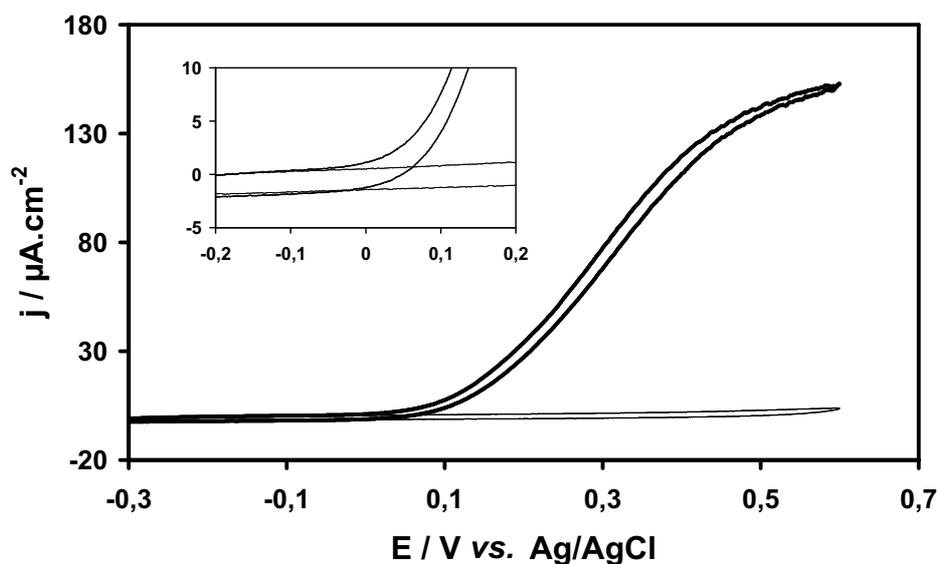
ANNEXES

Annexe 1 : polymères rédox

Polymère rédox	E°' (V)
PVP-[Os(N,N'-diméthyl-2,2'-biimidazole) ₃] ^{2+/3+}	- 0,170
PVI-[Os(4,4'-diamino-2,2'-bipyridine) ₂ Cl] ⁺²⁺	- 0,155
PVP-[Os(N,N'-diméthyl-2,2'-biimidazole) ₂ (4-amino-2,2'-bipyridine)] ^{2+/3+}	- 0,028
PVI-[Os(4,4'-diméthoxy-2,2'-bipyridine) ₂ Cl] ⁺²⁺	+ 0,005
PVP-[Os(N,N'-diméthyl-1,1'-biimidazole) ₂] ^{2+/3+}	+ 0,070
PVP-[Os(N-méthyl-2-(2-pyridyl)imidazole) ₂ (2-(6-méthylpyrid-2-yl)imidazole)] ⁺²⁺	+ 0,254
PAA-PVI-[Os(terpyridine)(N,N'-diméthyl-1,1'-biimidazole)] ^{2+/3+}	+ 0,320
PAA-PVI-[Os(dichloro-bipyridine) ₂ Cl] ⁺²⁺	+ 0,360

Polymères rédox à base d'osmium utilisés dans cette étude.

PVP : polyvinylpyridine ; PVI : polyvinylimidazole ; PAA : polyacrylamide.

Annexes 2 : oxydation de l'ascorbate sur une électrode en carbone vitreux

CV d'une électrode de GC non modifiée en absence (trait fin) ou présence (trait épais) de 0,17 mM d'ascorbate. Tampon phosphate de sodium 100 mM sous argon, pH 7,2, 37 °C, 500 rpm, 20 mV.s⁻¹. **En insert** : zoom sur l'initiation de l'oxydation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J. Wang, *Chemical Review* 108:814 (2008).
- [2] S. Vaddiraju, I. Tomazos, D. J. Burgess, F. C. Jain, and F. Papadimitrakopoulos, *Biosensors and Bioelectronics* 25:1553 (2010).
- [3] G. Reach and G. S. Wilson, *Analytical Chemistry* 64:381A (1992).
- [4] S. Vaddiraju, D. J. Burgess, F. C. Jain, and F. Papadimitrakopoulos, *Biosensors and Bioelectronics* 24:1557 (2009).
- [5] D. A. Gough, J. Y. Lucisano, and P. H. S. Tse, *Analytical Chemistry* 57:2351 (1985).
- [6] J. Wang, J. W. Mo, S. Li, and J. Porter, *Analytica Chimica Acta* 441:183 (2001).
- [7] A. Chaubey and B. D. Malhotra, *Biosensors and Bioelectronics* 17:441 (2002).
- [8] B. Ginsberg, *Journal of diabetes science and technology* 3:903 (2009).
- [9] D. A. Price, *Clinical Diabetes* 27:164 (2009).
- [10] H. Bilen, A. Kilicaslan, G. Akcay, and F. Albayrak, *Journal of Medical Engineering and Technology* 31:152 (2007).
- [11] Z. Tang, R. F. Louie, J. H. Lee, D. M. Lee, E. E. Miller, and G. J. Kost, *Critical Care Medicine* 29:1062 (2001).
- [12] T.-Y. Chun, M. Hirose, T. Sawa, M. Harada, T. Hosokawa, Y. Tanaka, and M. Miyazaki, *Anesthesia & Analgesia* 79:993 (1994).
- [13] J. Hönes, P. Müller, and N. Surridge, *Diabetes Technology and Therapeutics* 10 (2008).
- [14] K. Dungan, J. Chapman, S. S. Braithwaite, and J. Buse, *Diabetes Care* 30:403 (2007).
- [15] K. Beardsall, *Early Human Development* 86:263 (2010).
- [16] H. E. Koschwanetz and W. M. Reichert, *Biomaterials* 28:3687 (2007).
- [17] P. Baele and P. Van der Linden, « Le transport de l'Oxygène par le sang », <<http://www.md.ucl.ac.be/virtanes/oxy.PDF>> (Février 2002).
- [18] L. Baud, « Physiologie respiratoire », <http://www.chusa.jussieu.fr/pedagogie/pcem2/physio/respiration_2.pdf> (Janvier 2003).
- [19] L. Brochard, J. Mancebo, M. Wysocki, F. Lofaso, G. Conti, A. Rauss, G. Simonneau, S. Benito, A. Gasparetto, F. Lemaire, D. Isabey, and A. Harf, *New England Journal of Medicine* 333:817 (1995).

- [20] S. V. Dzyadevich, V. N. Arkhipova, A. P. Soldatkin, A. V. El'Skaya, and A. A. Shul'Ga, *Analytica Chimica Acta* **374**:11 (1998).
- [21] D. J. Glykys and S. Banta, *Biotechnology and Bioengineering* **102**:1624 (2009).
- [22] N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **574**:347 (2005).
- [23] N. Martens, A. Hindle, and E. A. H. Hall, *Biosensors and Bioelectronics* **10**:393 (1995).
- [24] T. J. Ohara, R. Rajagopalan, and A. Heller, *Analytical Chemistry* **65**:3512 (1993).
- [25] N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* **125**:6588 (2003).
- [26] B. A. Gregg and A. Heller, *Analytical Chemistry* **62**:258 (1990).
- [27] F. Gao, O. Courjean, and N. Mano, *Biosensors and Bioelectronics* **25**:356 (2009).
- [28] N. Martens and E. A. H. Hall, *Analytical Chemistry* **66**:2763 (1994).
- [29] B. Feldman, « Electrochemical blood glucose test strips for people with diabetes », <<http://electrochem.cwru.edu/encycl/art-g01-glucose.htm>> (octobre 2009).
- [30] H. G. Wahl, *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology* **23**:387 (2009).
- [31] A. PrévotEAU, O. Courjean, and N. Mano, *Electrochemistry Communications* **12**:213 (2010).
- [32] I. Ivanov, T. Vidakovic-Koch, and K. Sundmacher, *Energies* **3**:803 (2010).
- [33] T. Yasukawa, K. Goto, and F. Mizutani, *Electroanalysis* **22**:927. (2010)
- [34] A. Heller and B. Feldman, *Chemical Reviews* **108**:2482 (2008).
- [35] A. Heller and B. Feldman, *Accounts of Chemical Research* **43**:963 (2010).
- [36] S. C. Barton, J. Gallaway, and P. Atanassov, *Chemical Reviews* **104**:4867 (2004).
- [37] I. Willner, Y. M. Yan, B. Willner, and R. Tel-Vered, *Fuel Cells* **9**:7 (2009).
- [38] A. Heller, *AIChE Journal* **51**:1054 (2005).
- [39] S. Timur, Y. Yigzaw, and L. Gorton, *Sensors and Actuators B: Chemical* **113**:684 (2006).
- [40] S. M. Zakeeruddin, D. M. Fraser, M. K. Nazeeruddin, and M. Gratzel, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **337**:253 (1992).

- [41] G. Kenausis, C. Taylor, I. Katakis, and A. Heller, *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions* 92:4131 (1996).
- [42] A. Salimi, B. Kavosi, R. Hallaj, and A. Babaei, *Electroanalysis* 21:909 (2009).
- [43] T. Abe, K. Shoji, and A. Tajiri, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 208:11 (2004).
- [44] A. Heller, *Current Opinion in Chemical Biology* 10:664 (2006).
- [45] W. Schuhmann, *Reviews in Molecular Biotechnology* 82:425 (2002).
- [46] D. A. Guschin, J. Castillo, N. Dimcheva, and W. Schuhmann, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*:1 (2010).
- [47] A. Heller, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385:469 (2006).
- [48] A. Heller, *Physical Chemistry Chemical Physics* 6:209 (2004).
- [49] N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 124:12962 (2002).
- [50] N. Mano, F. Mao, W. Shin, T. Chen, and A. Heller, *Chemical Communications* 9:518 (2003).
- [51] N. Mano, H. H. Kim, Y. Zhang, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 124:6480 (2002).
- [52] S. C. Barton, H. H. Kim, G. Binyamin, Y. Zhang, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 123:5802 (2001).
- [53] F. Bedioui, *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation* P3 (1999).
- [54] C. P. Andrieux, J. M. Dumas-Bouchiat, and J. M. Savéant, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 131:1 (1982).
- [55] H. Dahms, *Journal of Physical Chemistry* 72:362 (1968).
- [56] I. Ruff and V. J. Friedrich, *Journal of Physical Chemistry* 75:3297 (1971).
- [57] I. Ruff, V. J. Friedrich, K. Demeter, and K. Csillag, *Journal of Physical Chemistry* 75:3303 (1971).
- [58] H. S. White, J. Leddy, and A. J. Bard, *Journal of the American Chemical Society* 104:4811 (1982).
- [59] M. E. G. Lyons, in *Advances in Chemical Physics*, Vol. 94, 1996, p. 297.
- [60] J. P. Diard, B. Le Gorrec, and C. Montella, *Cinétique Electrochimique*, Ed. Hermann, 1996.

- [61] J. W. Gallaway and S. A. C. Barton, *Journal of the American Chemical Society* 130:8527 (2008).
- [62] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical methods : fundamentals and applications* / Allen J. Bard, Larry R. Faulkner, Wiley, New York :, 1980.
- [63] S. Koide and K. Yokoyama, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 468:193 (1999).
- [64] M. E. G. Lyons, P. N. Bartlett, C. H. Lyons, W. Breen, and J. F. Cassidy, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 304:1 (1991).
- [65] J. M. Savéant, *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry*, Wiley, 2006.
- [66] J. M. Savéant, *Chemical Reviews* 108:2348 (2008).
- [67] N. Le Bozec, Thèse, Université de Bretagne occidentale, 2000.
- [68] E. Yeager, *Journal of Molecular Catalysis* 38:5 (1986).
- [69] E. Yeager, *Electrochimica Acta* 29:1527 (1984).
- [70] S. Krishnaswamy and J. R. Kittrell, *Biotechnology and Bioengineering* 20:821 (1978).
- [71] K. Klaus D, S. Ursula, and G. Wilhelm, *Annals of the New York Academy of Sciences* 506:552 (1987).
- [72] G. Binyamin and A. Heller, *Journal of the Electrochemical Society* 146:2965 (1999).
- [73] F. Mao, N. Mano, and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* 125:4951 (2003).
- [74] C. Taylor, G. Kenausis, I. Katakis, and A. Heller, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 396:511 (1995).
- [75] G. Kenausis, C. Taylor, R. Rajagopalan, and A. Heller, *Journal of Molecular Recognition* 9:626 (1996).
- [76] H. H. Kim, N. Mano, Y. Zhang, and A. Heller, *Journal of the Electrochemical Society* 150 (2003).
- [77] T. J. Ohara, R. Rajagopalan, and A. Heller, *Analytical Chemistry* 66:2451 (1994).
- [78] B. A. Gregg and A. Heller, *Journal of Physical Chemistry* 95:5976 (1991).
- [79] N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *Chemical Communications* 10:2116 (2004).
- [80] B. A. Gregg and A. Heller, *Journal of Physical Chemistry* 95:5970 (1991).
- [81] D. M. Stanbury, O. Haas, and H. Taube, *Inorganic Chemistry* 19:518 (1980).

- [82] A. L. Eckermann, D. J. Feld, J. A. Shaw, and T. J. Meade, *Coordination Chemistry Reviews* 254:1769 (2010)
- [83] P. N. Bartlett and K. F. E. Pratt, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 397:61 (1995).
- [84] M. H. V. Huynh and T. J. Meyer, *Chemical Reviews* 107:5004 (2007).
- [85] H. Z. Bu, S. R. Mikkelsen, and A. M. English, *Analytical Chemistry* 67:4071 (1995).
- [86] F. G. Halaka, G. T. Babcock, and J. L. Dye, *Journal of Biological Chemistry* 257:1458 (1982).
- [87] S. Tsujimura, S. Kojima, K. Kano, T. Ikeda, M. Sato, H. Sanada, and H. Omura, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 70:654 (2006).
- [88] V. Flexer, E. J. Calvo, and P. N. Bartlett, *Journal of Electroanalytical Chemistry* In Press (2010).
- [89] G. Manecke and H. G. Vogt, *Pure and Applied Chemistry* 50:665 (1978).
- [90] S. A. Merchant, M. T. Meredith, T. O. Tran, D. B. Brunski, M. B. Johnson, D. T. Glatzhofer, and D. W. Schmidtke, *Journal of Physical Chemistry C* 114:11627 (2010).
- [91] G. Ybarra, C. Moina, F. V. Molina, M. I. Florit, and D. Posadas, *Electrochimica Acta* 50:1505 (2005).
- [92] F. Battaglini, E. J. Calvo, C. Danilowicz, and A. Wolosiuk, *Analytical Chemistry* 71:1062 (1999).
- [93] A. Oubrie, H. J. Rozeboom, and B. W. Dijkstra, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:11787 (1999).
- [94] C. Kang, H. Shin, Y. Zhang, and A. Heller, *Bioelectrochemistry* 65:83 (2004).
- [95] Sony, « Sony Develops "Bio Battery" Generating Electricity from Sugar », <<http://www.sony.net/SonyInfo/News/Press/200708/07-074E/index.html>> (23 août 2007).

CONCLUSION GENERALE

Dans la première partie de ce manuscrit, nous nous sommes appliqués à présenter les tenants et aboutissant des biocapteurs à glucose et des biopiles glucose/oxygène. Ceci a permis d'apprécier l'extrême diversité des constituants disponibles et des stratégies mises en œuvre pour parfaire ces applications. En particulier, nous nous sommes attardés sur les avantages et les inconvénients des hydrogels rédox utilisés dans ce travail pour l'élaboration de nos anodes modifiées.

Dans le deuxième chapitre de cette thèse, nous nous sommes proposés d'étudier l'effet de la déglycosylation de la GOx issue d'*Aspergillus niger* sur son transfert électronique médié dans un hydrogel rédox. L'hypothèse à l'origine de ce travail était que la soustraction d'une large fraction des oligosaccharides entourant l'enzyme permettrait d'accélérer le transfert électronique *intrinsèque* entre la GOx et les complexes d'osmium d'un hydrogel rédox en diminuant la distance de ce saut d'électron.

Un fois le protocole de déglycosylation effectué, nous avons noté que l'enzyme ainsi modifiée présentait logiquement une masse plus faible et un volume hydrodynamique moindre que la GOx glycosylée. Par ailleurs, la charge globalement négative que l'enzyme expose à sa surface a aussi été accrue du fait du retranchement des oligosaccharides.

Des électrodes modifiées avec la GOx ou la dGOx dans des proportions molaires identiques ont ensuite été étudiées électrochimiquement. Les anodes à base de dGOx délivraient des courants globalement supérieurs, ce qui aurait pu suggérer une amélioration du transfert électronique *intrinsèque* avec le complexe d'osmium. Toutefois, il a été mis en évidence que l'accroissement du courant dû à l'utilisation de la dGOx était consécutif à une modification de la structure globale de l'hydrogel, selon toute vraisemblance son volume.

Une tentative de mesure par AFM de l'épaisseur des l'hydrogels hydratés n'a pas abouti, en grande partie du fait de l'hétérogénéité que présentent généralement les dépôts d'hydrogel rédox à réticulation non contrôlée. Trouver une méthode fiable permettant d'obtenir des valeurs précises des volumes d'hydrogels selon leur composition et leur condition d'utilisation permettrait sans nulle doute de favoriser des comparaisons avec des modèles existants et de mieux appréhender les phénomènes complexes intervenant dans ces systèmes.

Dans le troisième chapitre de ce manuscrit, nous avons étudié la réduction de l'oxygène sur des complexes d'osmium souvent utilisés dans des polymères rédox pour des électrodes enzymatiques en vue de l'oxydation du glucose. Cette réduction n'avait été que

rarement observée et son éventuelle interférence sur la réponse d'un biocapteur ou la puissance d'une biopile glucose/O₂ jamais discutée.

A pH 7,4, la réduction de l'O₂ a été observée sur des complexes d'osmium greffés de E° inférieur ou égal à + 0,07 V vs. Ag/AgCl. Il a été déterminé que cette cinétique augmentait de manière exponentielle quand le E° du complexe décroît, conformément à la théorie de Marcus.

L'effet de cette réduction sur la réponse en courant de bioanodes à glucose a ensuite été évalué en immobilisant des enzymes avec le polymère le plus réducteur en notre possession. Pour une électrode à base de GOx, cette interférence présentait très probablement un impact important, particulièrement aux basses concentrations en glucose. Toutefois, il n'a pas été possible de la distinguer formellement de l'effet de l'O₂ sur l'enzyme. Pour des électrodes modifiées à partir de glucose déshydrogénase, enzyme insensible à l'O₂, l'interférence notable de l'O₂ sur les courants délivrés ne pouvait être attribuée qu'à la réduction étudiée.

Par ailleurs, le produit majoritaire de la réduction de l'O₂ sur les complexes d'osmium a été caractérisé comme étant le peroxyde d'hydrogène. Or, ce dernier est réputé pour diminuer la stabilité des enzymes.

La réaction étudiée pourrait diminuer les performances de dispositifs employant des hydrogels rédox dont les complexes d'osmium présentent de bas E°. Pour un biocapteur, sa sensibilité, sa linéarité et sa limite de détection pourraient être altérées. Pour une biopile, la densité de puissance, entre autres, pourrait être réduite. Dans les deux cas, la production de peroxyde d'hydrogène pourrait diminuer la durée de vie du dispositif.

Des études supplémentaires devraient être menées pour évaluer les éventuels impacts de cette réduction et cela pour des applications précises dans des environnements donnés.

En tout état de cause, de nombreuses études sont encore requises pour mieux appréhender le système complexe que constituent les électrodes enzymatiques à base d'hydrogels rédox afin de tirer le maximum de leur potentiel.

La valeur morale de la science n'est pas dans ses résultats, lesquels peuvent faire le jeu du pire immoralisme, mais dans sa méthode, précisément parce qu'elle enseigne l'exercice de la raison au mépris de tout intérêt pratique.

JULIEN BENDA, *La Trahison des Clercs*.

Enzyme electrodes based on redox hydrogels for glucose oxidation: effect of glucose oxidase deglycosylation and evidence for oxygen side reduction on the redox mediator

Abstract: The possibility of converting the catalytic activity of oxidoreductase enzymes into electric current has led to the development of a high diversity of enzyme electrodes. Anodes catalysing glucose oxidation have been amongst the most studied, especially for their application in monitoring blood glucose or glucose/O₂ biofuel cells. Although one of the numerous strategies available, the use of osmium-based hydrogels as redox mediators, has given excellent results, some limitations still remain such as rather low current densities, stability or selectivity

Initially, the study focused on the deglycosylation of glucose oxidase (GOx). When most of the oligosaccharides around this glycoenzyme were removed, the ensuing increase in the electrode catalytic current seemed a priori to support the hypothesis of a decrease in the electron hopping distance between the enzyme redox centres and the redox mediator. However, a systematic study of electrode response for different compositions leads us to conclude that deglycosylation does not improve the intrinsic electron transfer but the whole hydrogel structure. This seems due to the smaller size and higher surface charge of the deglycosylated GOx inducing smaller hydrogel volumes than in the native-based GOx.

The study then proceeded to examine the oxygen side reduction of commonly used osmium-based redox polymers. The interference of O₂ on glucose oxidation current has generally been attributed to O₂ reactivity with GOx. The present study shows that O₂ reduction also occurs on osmium-based polymers if their formal potential E^{o'} is below + 0.07 V vs. Ag/AgCl. The kinetics of this reaction appears to increase exponentially when E^{o'} decreases. As well as reducing the oxidation current and, consequently, lowering anode performances, the generation of hydrogen peroxide could also modify electrode stability. These results suggest that the choice of redox mediator for a given E^{o'} must also take into account the extent of O₂ reduction.

Keywords: bioelectrochemistry, biosensor, biofuel cell, redox polymer, osmium complex.

Résumé : la possibilité de convertir l'activité catalytique d'une oxydoréductase en un courant électrique a permis le développement d'une grande diversité d'électrodes enzymatiques. Les anodes catalysant l'oxydation du glucose font partie des plus étudiées pour leurs applications dans la mesure de la glycémie ou dans des biopiles glucose/O₂. Parmi les nombreuses stratégies disponibles, l'utilisation d'hydrogels à base de complexes d'osmium en guise de médiateurs rédox fournit d'excellents résultats, qui restent cependant limités en terme de densité de courant ou de sélectivité.

Durant cette thèse, la glucose oxydase (GOx) a été déglycosylée. Les électrodes préparées avec la nouvelle enzyme délivraient des courants catalytiques plus élevés, ce qui laissait supposer initialement une diminution de la distance de saut d'électron entre la GOx et le médiateur rédox suite au retrait des oligosaccharides. Une étude avec des électrodes de différentes compositions suggère au contraire que la déglycosylation n'améliore pas le transfert électronique intrinsèque mais la structure globale de l'hydrogel. De fait, une enzyme plus petite et plus négativement chargée doit induire un volume d'hydrogel plus faible pour une même composition molaire.

En second lieu, une réduction parasite de l'oxygène affectant ces anodes, non envisagée jusqu'à aujourd'hui, a été mise en évidence et étudiée. En effet, l'interférence de l'O₂ n'est usuellement attribuée qu'à sa réactivité avec la GOx. La présente étude prouve que l'O₂ se réduit aussi sur les complexes d'osmium si leur potentiel standard E^{o'} est inférieur à + 0,07 V vs. Ag/AgCl. La cinétique de cette réaction croît exponentiellement quand le E^{o'} du complexe diminue. En plus d'abaisser le courant d'oxydation et donc les performances de l'anode, la génération de peroxyde d'hydrogène pourrait aussi altérer sa stabilité. Ces résultats suggèrent que le choix d'un médiateur de E^{o'} donné doit aussi dépendre de l'amplitude de cette réduction.

Mots-clefs : bioélectrochimie, biocapteur, biopile, polymère rédox, complexe d'osmium.