



HAL
open science

Biomatériaux d'électrode appliqués à la réalisation et à la caractérisation d'un biocapteur immunologique et de biopiles enzymatiques

Fabien Giroud

► **To cite this version:**

Fabien Giroud. Biomatériaux d'électrode appliqués à la réalisation et à la caractérisation d'un biocapteur immunologique et de biopiles enzymatiques. Autre. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT: 2011GRENI048 . tel-00690367

HAL Id: tel-00690367

<https://theses.hal.science/tel-00690367>

Submitted on 23 Apr 2012

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Matériaux, Mécanique, Génie Civil, Electrochimie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Fabien GIROUD

Thèse dirigée par **Dr. Chantal GONDRAN** et
par **Dr. Karine GORGY**

préparée au sein du **laboratoire Biosystèmes Electrochimiques
et Analytiques du Département de Chimie Moléculaire**
dans l'**École Doctorale I-MEP2**

**Biomatériaux d'électrode appliqués à la
réalisation et à la caractérisation d'un
biocapteur immunologique et de biopiles
enzymatiques.**

Thèse soutenue publiquement le « **27 octobre 2011** »,
devant le jury composé de :

M, Dónal LEECH

Professeur, Irlande (Galway), Président du jury

Mme, Élisabeth LOJOU

Chargée de Recherche CNRS, Marseille, Rapporteur

M, Hubert PERROT

Directeur de Recherche CNRS, Paris, Rapporteur

M, Serge COSNIER

Directeur de Recherche CNRS, Grenoble, Membre

Mme, Chantal GONDRAN

Maître de Conférences, Grenoble, Membre

Mme, Karine GORGY

Maître de Conférences, Grenoble, Membre



A ma maman,

A ma famille, à mon Papi

A mes amis

Remerciements

Après moultes relectures et corrections pour éradiquer les fautes de frappe, de grammaire ou d'orthographe, vient le temps de clore ce manuscrit de thèse. Après avoir cogité une année et demie sur l'enchaînement des idées et la tournure des phrases dans un contexte scientifique, on pourrait croire que cette dernière partie n'est qu'une formalité. Mais finalement, il n'en est rien. Poser sur papier des mots de remerciement peut s'avérer un exercice tout aussi compliqué, couplé à l'angoisse d'oublier une personne ayant joué un rôle important au court de ce doctorat (oui, parce que trois ans, mine de rien, c'est long... et la liste des personnes côtoyées est tout aussi importante).

Je débute donc ces remerciements par ceux adressés au directeur du Département de Chimie Moléculaire de Grenoble, M. Pascal Dumy pour m'avoir accueilli au laboratoire.

Je tiens expressément à remercier le président du jury de thèse, M. Dónal Leech. Non seulement pour avoir accepté de faire partie de ce jury, mais aussi pour avoir lu le manuscrit en version française, pour ses remarques extrêmement riches et intéressantes, je lui en suis reconnaissant.

Je suis particulièrement reconnaissant envers les autres membres « extérieurs » de mon jury. Que ce soit Mme Elisabeth Lojou ou M. Hubert Perrot, mes deux rapporteurs de thèse ont montré un grand intérêt aux travaux que j'ai présentés y compris dans des domaines qui ne sont pas spécifiquement leurs domaines de prédilection. Pour toutes leurs remarques, leurs questions après la présentation orale et la rigueur scientifique pour cette évaluation, je les en remercie une nouvelle fois.

Je tiens ensuite à remercier M. Serge Cosnier. Pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour m'avoir fait confiance tout au long de mon doctorat, pour toutes les discussions scientifiques, ses idées foisonnantes pour faire avancer le projet de recherche qui m'était incombé. Merci aussi pour sa motivation et son soutien au cours de ces trois années.

J'exprime maintenant ma profonde gratitude à mes deux directrices de thèse, Mme Karine Gorgy et Mme Chantal Gondran. Puisque ces deux scientifiques m'ont initié à la vie scientifique lors de mon Master 1, c'est sans doute grâce à elles deux que je me suis orienté dans cette voie et que je suis allé jusqu'à la fin du doctorat.

Karine, merci d'avoir accepté d'encadrer mon M1, d'avoir ensuite de superviser également mon travail lors de cette thèse et d'avoir été si présente jusqu'au bout pour les corrections. Merci pour toutes les attentions que tu as eu au cours de ces trois années à chaque fois que le moral était en baisse.

Chantal, je souhaite te remercier pour toute la confiance et toute la liberté que tu m'as laissée pour mener à bien ces travaux de thèse. Je te suis aussi mille fois redevable pour tout le temps que tu as consacré pour vérifier/valider les manips et pour avoir passé une partie de tes vacances à corriger mon pire chapitre pour presque pas grand-chose (merci à la poste au passage...)

Maintenant, pour les remerciements « généraux » adressés aux personnes rencontrées au quotidien, quoi de plus normal que de citer ceux de ma propre équipe.

Mille mercis à M. Michael Holzinger. Même, si nous n'avons pas collaboré scientifiquement, son aide a été plus que précieuse pour la correction de résumés ou de lettres de motivation réalisés en anglais.

Je voudrais saluer aussi M. Allan Le Goff pour le complexe de Ruthénium qu'il a synthétisé et je m'excuse de n'avoir pas pu tirer des résultats probants avec ce dernier système pour poursuivre ce travail et mettre à profit cette collaboration.

Je remercie à son tour Mme Arielle Le Pellec qui nous dégotte les produits nécessaires ou trouve du matériel plus vite que son ombre.

Finalement, je remercie chaleureusement Mme Sylvie Pocholle et Mme Régine Rozand qui nous rendent la vie bien belle en s'occupant de toute la partie administrative et des commandes.

Je tiens également à remercier les personnes avec qui j'ai eu la possibilité de travailler dans le cadre de collaboration et sans qui tout ce travail n'aurait pu aboutir.

Mes remerciements vont donc au groupe espagnol de Applied Molecular Receptor à Barcelone et dirigée par Mme Maria-Pilar Marco qui m'a fourni l'ensemble du matériel biologique nécessaire pour le développement du biocapteur à antibiotique.

Ensuite, je remercie vivement M. Vincent Vivier, du LISE à Paris pour m'avoir fait parvenir les ultra-microélectrodes à cavité qui m'ont été d'une aide précieuse pour la caractérisation de plusieurs médiateurs rédox couplés à des oxydoréductases.

Enfin, un grand merci aux personnes côtoyées au laboratoire TIMC de Grenoble, en particulier le M. François Boucher (seul maître à bord lors de l'implantation chirurgicale des biopiles), M. Jean-Pierre Alcarraz (le « géo-trouve-tout » avec son imagination débordante et ses solutions rapides pour se sortir de la panade... encore merci à toi pour le temps consacré sur les manip *in vivo*, surtout celles effectuées les week-ends et jour férié. Je garderai en mémoire notre déception de voir les portes closes du bâtiment Jean Roget un samedi matin avant le lever du soleil...) et M. Philippe Cinquin (l'un des principaux instigateurs du projet biopile). Un grand merci pour ses remarques pertinentes et idées originales émises lors des débriefings entre équipe.

Je remercie les permanents du DCM du bâtiment B ainsi que ceux du bâtiment Nanobio.

La « partie » de remerciement dédiée aux personnes *non permanentes* n'est sans doute pas à négliger, puisque même sans interagir directement dans le travail, elles permettent de nous aérer l'esprit en abordant d'autres sujets que ceux du doctorat. Comme ces personnes représentent une part importante d'individus rencontrés ou simplement croisés, il n'est pas impossible d'omettre quelqu'un dans cette liste.

Je débiterais par celles de mon équipe. Je voudrais remercier tous les étudiants de thèse ou les postdocs étrangers avec qui il a été bon de pratiquer un minimum d'anglais. Merci à Shou-Nian, Xu, Yu, Yao (my favorite « Asking Girl »), Magda, Imen (Merci pour la bonne humeur dans le bureau si silencieux en période de rédaction), Meenakshi (Good luck for your thesis), Seda (I wish you the best in Harvard!) Gareth (merci pour avoir essayé de parler anglais/français avec moi, même si à la fin, le français a pris le dessus). Merci à mes deux anciennes collègues de bureau, Jessica (Bon travail à Londres !) et Raoudha (On se recroisera probablement aux alentours de Grenoble !!!) et merci aux post docs et au thésard *biopiles* arrivés « plus » récemment : Abdel (merci encore de m'avoir motivé et incité à envoyer mon CV et ma lettre de motivation aux USA), Kamal, Charles (Merci à vous deux pour les innombrables questions que vous m'avez posé. Je pense que ces discussions m'ont permis de prendre du recul au moment de la rédaction du chapitre sur les piles à glucose, et

merci pour la relecture du chapitre 2) et Bertrand (l'heureux thésard qui débute bien entouré. Bonne continuation pour les trois années restantes ici).

Je remercie les étudiants de I2BM pour les mots échangés, souvent en grande hâte, devant la machine à café. Merci à Cédric et Hugues pour les discussions de couloir ou de bureau complètement non orientées sur le travail.

Un immense merci à Hajra avec qui j'ai partagé de vrais bons moments à Nanobio lors de quelques manips d'impédance ou pour une formation éclair à EndNote. Courage et bon vent pour la suite.

Enfin, mes remerciements vont naturellement à tous les étudiants du bâtiment B avec qui, et cela malgré le déménagement à Nanobio, j'ai passé la majeure partie de mon temps. Merci déjà aux plus anciens d'entre eux : Jean, Aurélien, Xavier, Ludo (permanent que je classe parmi les non-permanents) et Lud' (merci pour tout et surtout pour avoir bravé tant de kilomètres pour assister à la soutenance avec ta petite famille. Bonne route à vous trois), Camille et Adriana.

Pour les moins anciens, on dit souvent que l'on garde le meilleur pour la fin, mais ces formidables compagnons ont tous au moins une raison d'être en fin de liste. Il faut donc tous les considérer comme les derniers ici...

Seb (Ne t'inquiète pas, tu tiens le bon bout !), Thib (Merci pour le champagne et le concert privé !), Marc (Pour toutes les vannes vaseuses que tu as du entendre, les séances de cinéma et les heures de Shannon passées ensemble, merci ma poule !), Juan (ya sabes lo que estoy oliendo...), Diego (Finalement, on aura eu l'occasion de faire notre sortie de ski avant mon départ. Profite bien du reste de la saison et courage pour la suite), Nikita (Thank you for the book that I never read... I tried), Rocco (Thanks for coming to my defence and See you on the flip side!!!), Andrew (It was a real pleasure to meet you and to lend you my one-wheel bike), Flo (Maître incontesté du Frisbee et contestable du laser game), Marcello (Pronto? J'espère que l'on aura de nouveau l'occasion de descendre quelques pistes noires en chantant quelques chants grégoriens. Merci pour ces trois années en ta compagnie), Isabel (Que dire, si ce n'est que je suis infiniment content de t'avoir rencontré... merci à toi pour toute la patience que tu as eu presque chaque jour ici ou ailleurs... hier, aujourd'hui et demain... « PAC ! »), Neus (l'autre catalane, peu loquace de premier abord, je pense encore aux pauses café accoudés au radiateur en période de grand froid ou abrités du soleil estival de Grenoble. Merci aussi à toi pour m'avoir supporté pendant la quasi-totalité de la rédaction...), Jordi (Moltes gràcies Richy per tot ! Ànims i ens veiem molt aviat !), Miquel (Le roi des ravioles et de la douche au champagne ! Bonne continuation à Marseille avec un climat plus clément), Esther (Si, lo sé que soy un gili), Marius (Bonne chance avec tous tes calculs !), Selim (Maître du poker), Vicky (Gracias para todo de lo que compartimos desde en Grenoble hasta en Argentina), Yamile et enfin Constance et Aude (les deux nouveaux trublions qui apportent un peu de sang neuf au groupe et surtout beaucoup d'éclats de rire).

Je remercie également deux personnes extérieures au DCM, Maria (L'intrus du groupe venue du CEA, merci pour ta bonne humeur) et Julie (presque aussi insupportable et têtue que moi, je ne t'ai vraiment pas ménagée durant ces neuf dernières mois. Je souhaite donc te rendre honneur pour avoir su garder la majeure partie du temps ton contrôle et ton enthousiasme en ma présence).

Merci encore à vous tous pour les moments inoubliables (au Shannon ou non...) où tant de phrases cultes ont vu le jour.

Merci à mes colocataires, Thiago et Nina, qui ont supporté mes sautes d'humeur et mon enfermement à mesure que le temps imparti à la rédaction s'amenuisait. Même si je n'ai

pas souvent participé à vos soirées « jeux », vous resterez des colocs que je vais sans doute regretter. Bon courage Thiago pour la fin de la thèse et Nina pour la suite du Master (et la thèse ensuite?)

Merci également à tous mes amis de plus longues dates, ceux connus depuis les bancs de l'école maternelle (So, Emilie et Rémy) et ceux rencontrés sur les bancs du lycée (Cissou, Laury, Clém, Laetitia, Tiph, Céline, Dabad et Quent) et dont certains ont pu faire le déplacement pour assister à la soutenance. Les absents sont bien sûr tous pardonnés puisque vous êtes maintenant tous loin ou dans une nouvelle étape de votre vie familiale (avec les problèmes de logistique que cela comporte).

Un merci spécial à Laury qui m'a souvent recueilli en sortant du labo pour ma sieste alors qu'elle me racontait sa journée de labeur et à Cissou pour les conversations skype qui remonte le moral.

Finalement, mes remerciements les plus importants vont aux membres de ma famille qui m'ont soutenu, supporté et aidé jusqu'à la fin de cette épreuve. Merci à mes couz's, à ma mamie, mon père, mon beau-frère, ma belle-sœur, mon frère. Merci Florence pour t'être arrachée lors de la préparation du pot de thèse, je n'aurais pas pu faire ça sans ton aide. Merci à ceux qui ont mis la main à la pâte pour ce buffet. Merci Maman pour avoir supporté mon caractère depuis maintenant tant d'année et de m'avoir accompagné dans mes études sans trop me poser de question

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I. Étude bibliographique	7
I.1 Les biomatériaux d'électrodes	9
I.1.a Définition générale	9
I.1.b Les applications potentielles	9
I.1.c Les méthodes d'immobilisation	10
I.1.c.1 L'adsorption	11
I.1.c.2 La réticulation	12
I.1.c.3 L'encapsulation	12
I.1.c.4 Les assemblages moléculaires et biomoléculaires par interactions affines	13
I.1.c.5 Le greffage chimique	13
I.2 Les biocapteurs	14
I.2.a Définition générale	16
I.2.b Les anticorps et les antigènes	17
I.2.c Les méthodes de détection applicables pour les immunocapteurs	19
I.2.c.1 Les biocapteurs thermiques	19
I.2.c.2 Les biocapteurs optiques	20
I.2.c.3 Les biocapteurs gravimétriques	22
I.2.c.4 Les biocapteurs électrochimiques	23
I.3 Les biopiles à combustible	29
I.3.a Contexte	29
I.3.b Définition et principe des (bio)piles à combustible	30
I.3.c Les différents types de biopiles	32
I.3.c.1 Les biopiles microbiennes	32
I.3.c.2 Les biopiles à mitochondrie	33
I.3.c.3 Les biopiles enzymatiques	35
I.3.c.4 Les biopiles hybrides	39
I.3.c.5 Les piles biomimétiques	40
I.3.d L'effet du pH dans les biopiles	40
I.3.d.1 Les pompes à proton membranaires	41
I.3.d.2 pH et activité microbienne/enzymatique	42
I.3.d.3 Le gradient de pH comme source de convection	43
I.3.e Les biopiles enzymatiques à glucose/O ₂	43
I.3.e.1 Principe et définition	43
I.3.e.2 Les systèmes enzymatiques	45
I.3.e.3 Transfert électronique : médié contre direct	51

I.3.e.4	Les piles à glucose/O ₂ : vers l'implantation	54
---------	--	----

	Références bibliographiques	57
--	------------------------------------	-----------

Chapitre II. Biocapteur impédancemétrique pour le dosage d'antibiotique – Application à la ciprofloxacine **65**

II.1	Généralités	67
-------------	--------------------	-----------

II.2	Caractérisation du pyrrole-NHS et poly(pyrrole-NHS)	69
-------------	--	-----------

II.2.a	Electrochimie du monomère en solution	69
--------	---------------------------------------	----

II.2.b	Electrodéposition d'un film polypyrrolique par voltampérométrie cyclique	70
--------	--	----

II.2.c	Electrodéposition d'un film polypyrrolique à potentiel contrôlé	71
--------	---	----

II.3	Elaboration de l'assemblage biomoléculaire	73
-------------	---	-----------

II.3.a	Principe de l'assemblage	73
--------	--------------------------	----

II.3.b	Greffage covalent du modèle de l'antibiotique sur le pyrrole-NHS	74
--------	--	----

II.3.c	Couplage anticorps spécifique/modèle antibiotique	77
--------	---	----

II.4	Application de la Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (SIE) pour la détection de la ciprofloxacine	79
-------------	---	-----------

II.4.a	Notion de spectroscopie d'impédance électrochimique	79
--------	---	----

II.4.a.1	Théorie	79
----------	---------	----

II.4.a.2	Représentation dans le plan de Nyquist	81
----------	--	----

II.4.a.3	Les schémas électriques équivalents	82
----------	-------------------------------------	----

II.4.b	Principe de l'immunocapteur	84
--------	-----------------------------	----

II.4.c	Choix du modèle électrique équivalent	85
--------	---------------------------------------	----

II.4.d	Ancrage de l'anticorps spécifique dirigé contre la ciprofloxacine	87
--------	---	----

II.4.e	Détection de la ciprofloxacine par impédancemétrie	89
--------	--	----

II.4.e.1	Détection par impédancemétrie	89
----------	-------------------------------	----

II.4.e.2	Détection par conductimétrie	93
----------	------------------------------	----

II.5	Conclusions du chapitre II	97
-------------	-----------------------------------	-----------

	Références bibliographiques	98
--	------------------------------------	-----------

Chapitre III. Induction enzymatique d'un gradient de pH pour la production d'énergie électrique **101**

III.1	Généralités	103
--------------	--------------------	------------

III.2	Prototype de biopiles à gradient de pH avec utilisation d'électrodes en feutre de carbone	106
III.2.a	Principe	106
III.2.b	Caractérisation des compartiments anodique et cathodique	107
III.2.c	Performances de la biopile	109
III.3	Miniaturisation du prototype avec utilisation d'électrodes en feutre de carbone	111
III.3.a	Principe	111
III.3.b	Performances de la biopile	112
III.4	Prototype de biopiles à gradient de pH avec utilisation d'électrodes de carbone comprimées	117
III.4.a	Principe	117
III.4.b	Caractérisation des compartiments anodique et cathodique	118
III.4.c	Performances de la biopile	121
III.4.c.1	Performances brutes	121
III.4.c.2	Influence de la concentration en substrat sur la puissance de la pile et stabilité	121
III.5	Miniaturisation du prototype avec utilisation d'électrodes de carbone comprimées	123
III.5.a	Principe	123
III.5.b	Performances de la biopile	124
III.6	Conclusions du Chapitre III	125
	Références bibliographiques	127

Chapitre IV. Biopiles enzymatiques à glucose/O₂ avec transfert électronique assuré par des médiateurs rédox 129

IV.1	Généralités	131
IV.2	Biopile à PPO/GOx « bioinspirée » (médiateurs QQH₂/UQ)	132
IV.2.a	Principe	132
IV.2.b	Caractérisation des éléments de la biopile	134
IV.2.b.1	Surface spécifique du carbone graphite	134
IV.2.b.2	Caractérisation de l'électrode UQ-GOx	135
IV.2.b.3	Caractérisation de l'électrode QQH ₂ -PPO	137
IV.2.c	Performances de la biopile : Mesures <i>in vitro</i>	138
IV.2.c.1	Préparation de la biopile	138
IV.2.c.2	Mesures des performances <i>in vitro</i>	138

IV.2.d	Performances de la biopile : Mesures <i>in vivo</i>	143
IV.2.d.1	<i>Préparation de la biopile</i>	143
IV.2.d.2	<i>Expérimentation chez le rat</i>	144
IV.2.d.3	<i>Mesure des performances dans un organisme vivant</i>	144
IV.3	Vers d'autres médiateurs rédox pour la pile GOx/PPO	146
IV.3.a	Médiateurs à PolyPhénol Oxydase	147
IV.3.a.1	<i>Electrochimie de médiateurs rédox</i>	147
IV.3.a.2	<i>Catalyse enzymatique de la réduction de O₂ avec les médiateurs rédox</i>	150
IV.3.b	Médiateurs à GOx	155
IV.3.b.1	<i>Electrochimie de médiateurs rédox</i>	155
IV.3.b.2	<i>Catalyse enzymatique de l'oxydation du glucose avec les médiateurs rédox</i>	157
IV.4	Nouvelle biopile à PPO/GOx (médiateurs TTF/PQ)	162
IV.4.a	Caractérisation de la biocathode	162
IV.4.a.1	<i>Effet de l'oxygénation de la solution</i>	162
IV.4.a.2	<i>Effet de la concentration en médiateur</i>	163
IV.4.a.3	<i>Effet de la concentration en enzyme</i>	164
IV.4.a.4	<i>Effet de la pression lors de la fabrication des électrodes</i>	165
IV.4.a.5	<i>Stabilité temporelle</i>	166
IV.4.a.6	<i>Augmentation de la surface géométrique</i>	167
IV.4.b	Caractérisation de la bioanode	168
IV.4.b.1	<i>Effet de la concentration en médiateur</i>	168
IV.4.b.2	<i>Effet de la concentration en enzyme</i>	169
IV.4.b.3	<i>Effet du pH et stabilité temporelle</i>	169
IV.4.b.4	<i>Augmentation de la surface géométrique / du volume</i>	171
IV.4.c	Performances de la biopile	172
IV.4.c.1	<i>Préparation et performances de la biopile</i>	172
IV.4.c.2	<i>Association de deux biopiles en série et en parallèle</i>	174
IV.4.c.3	<i>Biopile de grandes surfaces</i>	175
IV.5	Conclusions du Chapitre V	176
	Références bibliographiques	178
	Conclusion générale	181
E.	Experimental part	187
E.1	Immunosensor	189
E.1.a	Organic compounds synthesis	189
E.1.a.1	<i>Synthesis of pyrrole-NHS</i>	189
E.1.a.2	<i>Synthesis of the fluoroquinolone model</i>	189

E.1.b	Solvents, reagents and apparatus	189
<i>E.1.b.1</i>	<i>Solvents</i>	189
<i>E.1.b.2</i>	<i>Raising of the polyconal antisérum model</i>	190
<i>E.1.b.3</i>	<i>Other reagents</i>	190
<i>E.1.b.4</i>	<i>Apparatus</i>	190
E.1.c	Electrode modifications	191
E.2	<i>Biofuel cells</i>	192
E.2.a	pH Gradient Biofuel Cell	192
<i>E.2.a.1</i>	<i>Reagents</i>	192
<i>E.2.a.2</i>	<i>Apparatus</i>	192
<i>E.2.a.3</i>	<i>Electrode fabrication</i>	193
<i>E.2.a.4</i>	<i>Biofuel cell assembly</i>	193
<i>E.2.a.5</i>	<i>Miniaturised unit / Carbon felt electrodes</i>	193
<i>E.2.a.6</i>	<i>UV-visible measurements</i>	194
E.2.b	Enzymatic based Glucose/O ₂ Biofuel Cell	194
<i>E.2.b.1</i>	<i>Reagents</i>	194
<i>E.2.b.2</i>	<i>Apparatus</i>	195
<i>E.2.b.3</i>	<i>Electrode fabrication</i>	195
<i>E.2.b.4</i>	<i>Biofuel cell assembly</i>	196
<i>E.2.b.5</i>	<i>Full cell (in vitro)</i>	197
<i>E.2.b.6</i>	<i>Surgery, recovery and measurements</i>	197
	Liste des abréviations	199
	Liste des publications	203

Introduction générale

La bioélectrochimie est un domaine scientifique dont le taux d'implication de la communauté scientifique ne cesse de croître. Le principe général repose sur l'étude, la compréhension et l'exploitation de phénomènes électrochimiques initiés par des molécules biologiques (ADN, anticorps, enzymes, etc.). Deux grandes applications peuvent en être dégagées : la première consiste à exploiter les diverses réactions biologiques pour conduire à la détection et généralement à la quantification de molécules en solution. Dans le cas présent, le terme « bioanalyse par voie électrochimique » image parfaitement les moyens mis en œuvre et les résultats escomptés. Par exemple, grâce à ces technologies, les patients atteints du diabète disposent désormais de capteurs portatifs pour le dosage immédiat du glucose sanguin. La seconde application, plus récente, se focalise sur la production énergétique par le biais d'espèces rédox (microbes, enzymes, mitochondries) pour l'oxydation et la réduction de combustible et de comburant respectivement, mettant en exergue l'activité biocatalytique des espèces en présence. Cet axe de recherche a su s'engouffrer dans la brèche ouverte par l'émergence des consciences environnementalistes sur l'utilisation des ressources d'énergie fossile. Lié aux besoins énergétiques de l'activité humaine, il profite de l'attrait pour les nouvelles énergies dites renouvelables. Il est tout de même bon de préciser que la finalité de ces biodispositifs n'est pas (pour le moins actuellement) de remplacer l'utilisation des centrales thermiques (différence de puissance de 12 ordres de grandeur environ entre une centrale électrique nucléaire et une biopile enzymatique). Ces biopiles se destinent à de toutes autres utilisations en temps que générateurs embarqués pour le monde du petit électronique portatif (commercial ou médical).

Bien que possédant des applications très différentes, ces deux domaines de recherche sont intimement liés et dans ces deux cas de figure, l'immobilisation des molécules biologiques et la géométrie des électrodes apparaissent bien souvent comme les paramètres déterminants pour la réalisation des biocapteurs ou des biopiles. Ainsi, l'effort continu des scientifiques pour la mise au point de nouvelles méthodes d'immobilisation et de matériaux d'électrodes repoussent toujours plus loin performances et miniaturisations de ces dispositifs.

Ce travail de doctorat repose sur le développement et l'étude d'un immunocapteur impédancemétrique et de deux approches différentes pour appréhender la bioconversion d'énergie électrique par la réalisation et la caractérisation de biopiles enzymatiques.

Le premier chapitre de ce manuscrit consacré à la bibliographie se divise en trois sections. La première est consacrée aux biomatériaux d'électrode. La seconde et la troisième, elles, abordent les deux applications de ces biomatériaux étudiées dans cette thèse, que sont les biocapteurs immunologiques et les biopiles enzymatiques.

Le deuxième chapitre est consacré à l'élaboration d'un immunocapteur impédancemétrique pour le dosage de la ciprofloxacine, un antibiotique largement utilisé. Le

principe est de « jouer » sur les différentes affinités qui existent entre les molécules comme les anticorps ou les antigènes pour conduire à la détection souhaitée.

Le troisième chapitre s'oriente lui vers la production d'énergie électrique à partir de l'apparition d'un gradient de pH généré par des enzymes. Ce gradient de pH est converti en différence de potentiel grâce à l'utilisation d'un couple rédox sensible au pH.

Enfin, le quatrième et ultime chapitre approfondit le thème de la production électrique par voie bioélectrochimique. La glucose oxydase (*GOx, Aspergillus Niger*) et la polyphénol oxydase (*PPO, Agaricus Bisporus*) sont mises en coopération pour catalyser l'oxydation du glucose et la réduction du dioxygène.

Chapitre I.

Étude bibliographique

1.1 Les biomatériaux d'électrodes

Dans cette partie, une brève description des biomatériaux d'électrodes ainsi que leurs domaines d'application sont donnés. Ensuite, le thème des méthodes d'immobilisation utilisées pour la réalisation de ces matériaux est abordé.

1.1.a Définition générale

Que ce soit dans le domaine des biocapteurs électrochimiques ou dans celui des biopiles, une espèce biologique (ou plusieurs) est généralement immobilisée à la surface du transducteur par différentes méthodes qui seront décrites en aval dans ce même chapitre. L'ensemble formé par la biomolécule immobilisée et son environnement constitue un biomatériau qui doit permettre à l'espèce biologique de conserver sa stabilité et son activité. Les biomatériaux tirent profit du comportement de l'espèce biologique et des matériaux les constituant. Conçus à partir de biomolécules, de tels objets sont en général utilisables dans un environnement biologique.

Plus particulièrement, une électrode biologique est constituée d'un système biologique (anticorps, enzyme, ADN, etc.), généralement immobilisé sur un matériau solide (électrode) et se désigne comme bioélectrode.

1.1.b Les applications potentielles

Le domaine d'application des biomatériaux est vaste. Par exemple, les matériaux utilisés en chirurgie (prothèses articulaires, ligaments, valves cardiaques, etc.) sont considérés eux aussi comme des biomatériaux.

Dans le domaine de la chimie, les biomatériaux peuvent être utilisés dans la conception et la réalisation de réacteur électrochimique pour la synthèse de produits chimiques divers. En imposant un courant électrique entre deux électrodes, il est possible de produire de nouvelles espèces à partir de matériels biologiques immobilisés dans une enceinte et alimentés par un milieu spécifique. Parmi ces réacteurs, les bioréacteurs électrochimiques utilisent fréquemment des espèces enzymatiques.

Dans le domaine de la chimie analytique, les biomatériaux d'électrodes représentent une veine extrêmement intéressante. Les deux grandes applications de ces matériaux sont la détection et la quantification d'espèce chimique avec les biocapteurs (détection de pesticide, de virus, de bactérie, etc.) et la conversion d'énergie chimique en énergie électrique avec les biopiles (pour l'alimentation électrique de dispositifs légers portatifs). Une description plus précise de chaque application sera donnée dans les parties respectives des biocapteurs ou des biopiles.

I.1.c Les méthodes d'immobilisation

La nécessité d'immobiliser les biomolécules est intuitive. Si cette condition d'immobilisation n'est pas satisfaite, il faudrait alors ajouter en permanence ces espèces par l'intermédiaire du milieu réactionnel pour perpétuer les réactions attendues ce qui entraînerait une augmentation considérable des coûts de fabrication des biocapteurs ou des biopiles. De plus, cette fixation des molécules permet de connaître à chaque instant la quantité d'espèces immobilisées.

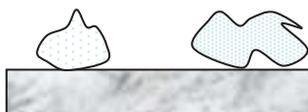
Ainsi, qu'il s'agisse de l'une ou de l'autre des applications énoncées, l'étape cruciale de fabrication/conception réside dans la méthode d'immobilisation du matériel biologique sur l'électrode. L'immobilisation est une technique de confinement dans une structure à 2 ou 3 dimensions ayant pour but la conservation du site de reconnaissance. Dans la plupart des cas, il a été observé une augmentation de la stabilité des anticorps ou des enzymes une fois ces derniers immobilisés¹. Le choix de cette méthode influe directement sur les performances du système. Plusieurs facteurs doivent donc être pris en considération pour optimiser la fixation des récepteurs biologiques en questions (anticorps ou enzymes) :

- L'orientation des biomolécules immobilisées doit être propice à l'interaction avec l'analyte ou le substrat.
- L'immobilisation ne doit pas modifier la structure tridimensionnelle des espèces biologiques (pouvant altérer la réactivité, la cinétique, la sélectivité).
- L'immobilisation doit permettre l'obtention d'un dépôt contrôlé et reproductible des récepteurs biologiques.

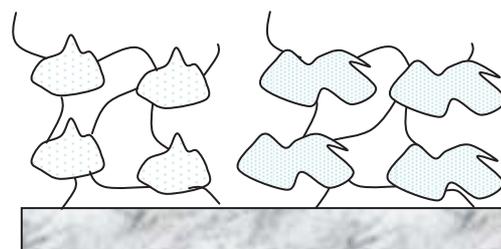
La durée de vie en solution de biomolécules comme les enzymes est courte (entre quelques heures et une semaine). Ce constat indique qu'une méthodologie doit être appliquée pour accroître la durée de vie de ces systèmes pour rendre leurs utilités commerciales envisageables.

Les principales voies envisageables pour l'immobilisation d'espèces biologiques sont représentées dans le **Schéma I-1**. Chacune d'entre elle va faire l'objet d'une brève description.

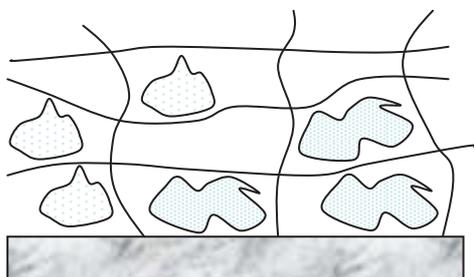
a – Adsorption / Monocouche auto-assemblée



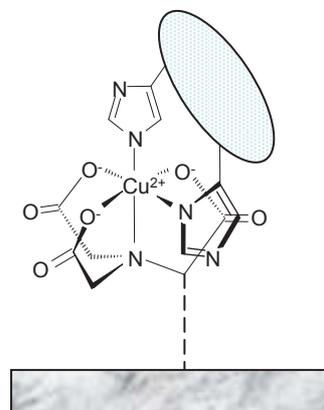
b – Réticulation



c – Encapsulation / Électropolymérisation



d – Assemblage biomoléculaire



e – Greffage chimique

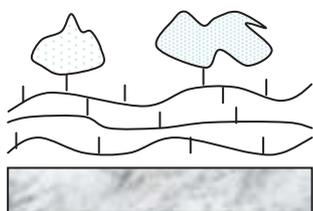


Schéma I-1: Représentation schématique des principales méthodes d'immobilisation d'espèces biologiques à la surface d'électrode

1.1.c.1 L'adsorption

Technique la plus simple de réalisation, l'adsorption consiste à réaliser un dépôt de matériel biologique à la surface de l'électrode (ou du matériau d'électrode) pour un temps défini. Les anticorps ou les enzymes se retrouvent alors « collés » à l'électrode par des interactions de type Van der Waals ou hydrophobes. Malgré une bonne accessibilité des sites actifs de ces molécules et l'élimination des molécules non adsorbées par simple rinçage, cette technique souffre d'un manque de stabilité dans le temps (phénomène de désorption).

Pour autant, plusieurs travaux ont été réalisés à l'aide de cette technique, soit par adsorption directe sur l'électrode soit sur une matrice de polymère²⁻⁴.

Une approche similaire à l'adsorption consiste à réaliser une monocouche auto-assemblée (self assembled monolayer, SAM en anglais) à la surface d'un substrat/d'une surface. Il s'agit d'un dépôt organisé en une couche mono moléculaire avec une orientation définie à partir de molécules amphiphiles. Chaque molécule comporte deux groupements fonctionnels séparés par un bras espaceur (chaîne alkyle (C-C)ⁿ). L'un implique la liaison avec l'électrode (chimisorption d'un groupement thiol sur or par exemple), l'autre possède des groupes fonctionnels susceptibles de réagir avec des biomolécules (acide carboxylique, alcool, amine,

etc.)⁵. Les matériaux réalisés par monocouche auto-assemblée sont bien plus stables que ceux obtenus par simple adsorption.

1.1.c.2 La réticulation

Depuis les années 60, plusieurs études ont permis de mettre à jour une technique de couplage intermoléculaire entre des biomolécules comme des enzymes. En effet, l'utilisation d'agents chimiques bi ou multifonctionnels et d'une protéine, conduit à la formation de liaison entre les fonctions de surface NH₂ de la biomolécule et l'agent de réticulation. Il existe plusieurs agents de couplage, tel que le glutaraldéhyde qui est fréquemment utilisé dans ce type d'immobilisation⁶.



Schéma I-2: Structure de composés utilisés dans le processus de réticulation de biomolécules.

a- Glutaraldéhyde, b- N,N'-méthylènebisacrylamide

Le réseau de réticulation obtenu est un gel insoluble difficilement manipulable et donc mécaniquement peu stable. Pour pallier cet effet, les molécules sont d'abord immobilisées sur le support solide (par adsorption ou par encapsulation dans une matrice de polymère) puis l'agent de réticulation est ajouté. Cependant, bien que cette technique soit attrayante par sa simplicité, le couplage engendre une perte relative de l'activité catalytique des enzymes en affectant la structure 3-D de la protéine et par la même occasion son centre actif. Il faut alors jouer sur le degré de réticulation pour obtenir un bon compromis entre immobilisation et maintien de la réactivité. Dans le cadre des biopiles enzymatiques, le but étant de conserver au mieux la catalyse enzymatique, cette méthode ne semble pas la mieux adaptée.

1.1.c.3 L'encapsulation

Cette technique consiste à générer, dans un espace tridimensionnel, une matrice capable d'emprisonner les biomolécules. Ses avantages sont l'accès à la quantité (constante) de molécules immobilisées à l'intérieur de la matrice et l'immobilisation d'une quantité plus importante d'espèces qu'avec la formation d'une monocouche de récepteurs (obtenue par adsorption ou à l'aide de SAM). Parmi les différentes catégories de matrice, il est possible de citer les matrices à base de chitosan^{7, 8}, de nafion⁹ ou de polymères. Une autre méthode consiste à faire croître sur le transducteur un film de polymère^{10, 11} (électrogénération, par exemple) dans une solution contenant l'espèce à immobiliser. La molécule se retrouve alors piégée dans la nouvelle matrice. De plus, la cage formée par le matériau autour de la protéine offre un environnement adéquat et la dénaturation naturelle observée en solution diminue.

Dans les deux cas, la présence du film génère une barrière diffusionnelle supplémentaire. Dans le cas des capteurs, cela peut entraîner un temps de réponse plus important (diffusion des espèces jusqu'au détecteur) et une sensibilité plus faible, dans celui des biopiles une diminution des courants catalytiques.

1.1.c.4 Les assemblages moléculaires et biomoléculaires par interactions affines

D'autres assemblages consistent à utiliser l'affinité entre différentes molécules, qu'elles soient biologiques ou non. Dans le second cas, l'immobilisation d'une biomolécule ne possédant pas d'affinité particulière, une étape de fonctionnalisation est nécessaire (biotinylation, histidinylolation, etc.). L'étape suivante correspond à la formation d'un « complexe » affin. Plusieurs configurations sont possibles. Parmi les plus connues et les plus utilisées, l'interaction (strept)avidine/biotine qui possède une constante d'association élevée ($K_a \text{ biotine}/(\text{strept})\text{avidine} \sim 1.10^{15}$) permet la fixation de quatre molécules biotine pour une molécule d'avidine. Un autre système digne d'intérêt est l'affinité entre l'adamantane et la β -cyclodextrine (β -CD) qui possède une constante d'association de l'ordre de 10^5 ce qui a permis la fixation de glucose oxydase fonctionnalisée par des β -CD sur une couche de polypyrrole-adamantane¹².

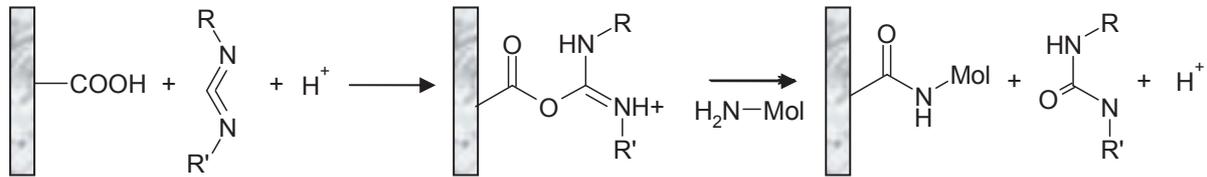
Il existe également la possibilité d'immobiliser des molécules par le biais de complexe métallique. Un polymère (ou une SAM) présentant un groupe nitrilotriacétique peut former un complexe avec des ions tels que le nickel ou le cuivre. Les groupes histidines portés par les biomolécules jouent alors le rôle de ligands conduisant ainsi à la fixation des molécules^{13, 14}. Enfin, une dernière possibilité consiste à réaliser des dépôts successifs couche par couche d'électrolytes possédant des charges opposées. Les biomolécules, étant elles mêmes chargées (ou partiellement), se retrouvent donc emprisonnées dans ces couches¹⁵.

1.1.c.5 Le greffage chimique

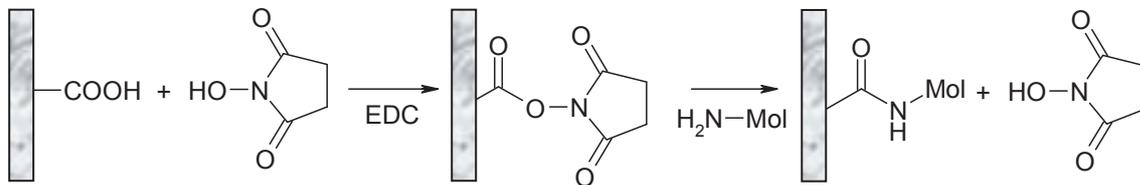
Dans le cas d'un greffage chimique direct avec les biomolécules, la stabilité du système est fortement accrue. Cependant, la formation de liaisons covalents entre les biorécepteurs et le matériau de greffage (surface d'électrode, polymère électrogénéré¹¹) conduit dans la majeure partie des cas étudiés à une diminution de la réactivité des biomolécules (mauvaise orientation des centres actifs, dénaturation en présence des substances chimiques lors de l'étape de greffage). Enfin, cette étape de greffage allonge le temps de fabrication des bioélectrodes.

La première étape de fonctionnalisation par greffage chimique consiste donc à déposer à la surface de l'électrode le support chimique. Le **Schéma I-3** regroupe quelques exemples de réactions utilisées pour l'immobilisation covalente de molécules biologiques sur des surfaces préalablement modifiées par des groupements thiol, diazonium, carboxylique ou *N*-hydroxysuccinimide.

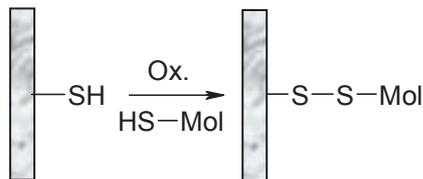
❖ Greffage par couplage avec un carbodiimide (exemple avec EDC)



❖ Greffage par le groupement NHS (N-hydroxysuccinimide), NHP (N-hydroxyphthalimide)



❖ Greffage par un groupe thiol¹⁶



❖ Greffage par un groupe diazonium

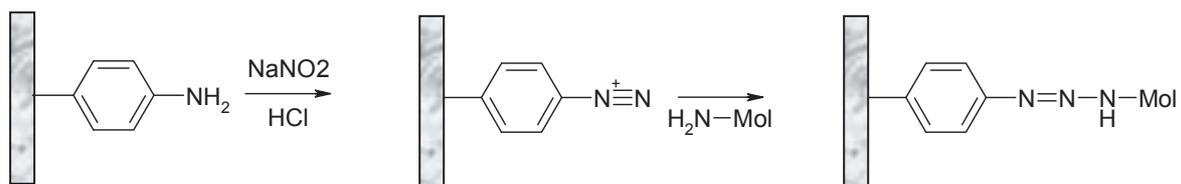


Schéma I-3 : Différents exemples d'immobilisation par greffage chimique

1.2 Les biocapteurs

Depuis les travaux pionniers de Clark et Lyon en 1962 sur le développement d'électrodes enzymatiques pour la détection du glucose¹⁷, la communauté scientifique n'a cessé d'accroître ses efforts dans le domaine de la détection analytique et le développement d'appareil de contrôle. L'évolution quasi exponentielle de la **Figure I-1** ne faisant référence qu'aux seuls immunocapteurs reflète bien cette tendance. Les domaines d'application de ces capteurs se sont étendus bien au-delà de la détection du glucose sanguin chez les personnes

diabétiques : on trouve des biocapteurs dans les sciences de la vie (médecine, biologie, etc.), l'environnement (pollution des sols) ou encore la sécurité et la défense¹⁸. L'avantage principal d'un biocapteur est la rapidité de l'analyse en comparaison avec d'autres méthodes beaucoup plus chronophages telles que la chromatographie en phase liquide (HPLC).

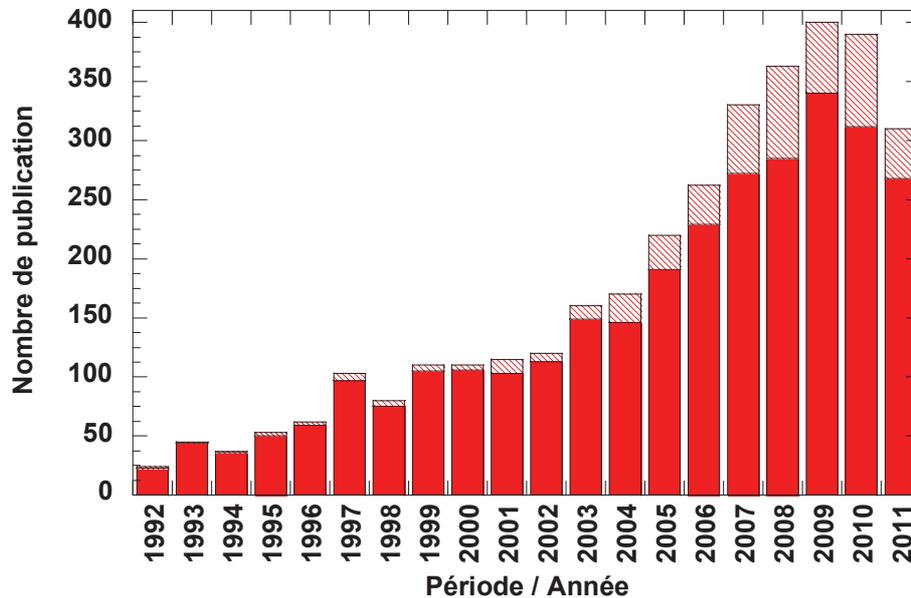


Figure I-1: Évolution du nombre de publication d'articles entre 1992 et 2011. Recherche effectuée avec le mot clé « Immunosensors ». La partie hachurée représente la part concernant la recherche « Impedance and Immunosensors ». Source *Web of Knowledge*, édité en juillet 2011

Les principaux concepts et caractéristiques des biocapteurs à prendre en compte sont :

- La sélectivité : cette caractéristique renseigne sur l'aptitude du capteur à ne répondre qu'à une cible donnée et puisse ainsi faire la distinction parmi d'autres molécules ayant une structure similaire. Ce paramètre est déterminant quand il s'agit de traiter des échantillons complexes (échantillon de lait, de plasma sanguin, d'eau de rivière, etc.). Ces échantillons peuvent contenir des molécules différentes de celles à analyser étant elles même susceptibles d'induire un phénomène de reconnaissance. Ce phénomène d'interférence provoque l'apparition d'une erreur sur la mesure du capteur.
- La limite de détection : cette valeur consiste à fournir la quantité minimale d'analyte cible réellement détectable avec le biocapteur. Celle-ci peut être obtenue en mesurant la réponse du détecteur lors d'ajout d'une concentration croissante en cible. Typiquement, la première dilution fournissant une réponse trois fois plus intense que le bruit du système est considérée comme la limite de détection.
- Le domaine de linéarité : cette information est particulièrement importante lorsqu'il s'agit de quantifier une substance spécifique. Ce domaine est

généralement compris entre les valeurs de la limite de détection et la limite provoquée par la saturation de la sonde par la cible (ajout de fortes concentrations n'engendrant plus de variation du signal).

- La sensibilité : Cette valeur correspond à la variation du signal obtenu par une variation d'une unité de concentration en analyte (exemple : mV.L.mol^{-1} , $\text{mA.L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, etc.). Elle est déterminée à partir de la pente dans le domaine de linéarité du capteur.
- Le temps de réponse : est le temps nécessaire pour atteindre un certain pourcentage de la réponse totale lors de l'ajout de l'analyte ($t_{0,9}$ ou $t_{0,99}$ pour 90 ou 99 % du signal obtenu). Il doit être court pour que le capteur soit attrayant et permette une détection en temps réel.

De plus, pour trouver un marché commercial et rentable, les dispositifs se doivent d'être simples d'utilisation et à un prix de fabrication peu élevé.

Cette section est l'objet de la description du fonctionnement et des différentes catégories des biocapteurs. La discussion se focalise ensuite sur les espèces immunologiques utilisées dans le cas de l'immunodétection. Pour finir, un rappel des différentes techniques de bioanalyse disponibles mettant en jeu les systèmes affins de type antigène/anticorps est présenté.

I.2.a Définition générale

Par définition, les biocapteurs sont des outils d'analyse possédant deux parties assurant chacune des fonctions différentes : la fonction de catalyse ou de reconnaissance qui se situe sur le récepteur biologique (antigène, enzyme, brin d'ADN, etc.) et la fonction transduction du signal (électrode conductrice, thermocouple, fibre optique, etc.) qui met en lien la concentration de la substance à analyser avec une réponse électrique mesurable (**Schéma I-4**).

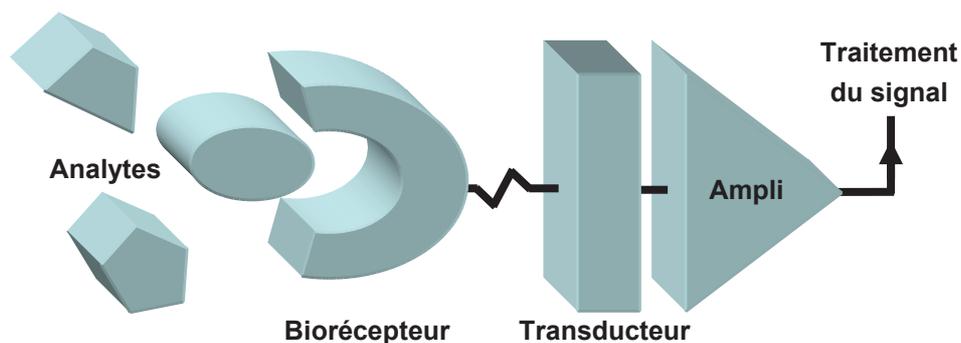


Schéma I-4: Principe de fonctionnement d'un biocapteur

Deux catégories de biocapteurs existent : les biocapteurs métaboliques¹⁹ et les biocapteurs d'affinité²⁰ dont il sera question dans la suite de cette introduction. Le principe général de ces capteurs est donné dans le **Schéma I-5**.

La première classe de capteurs met en jeu des phénomènes de catalyse entre une enzyme (ou une bactérie) et son substrat. Dans ce cas, la détection se fait par transfert de charge électronique lors de phénomène d'oxydoréduction. Par exemple, dans le cas de la mesure de la concentration en glucose, le dioxygène réagit avec la glucose oxydase, elle-même réduite lors de l'oxydation du glucose, formant du peroxyde d'hydrogène. La détection de H₂O₂ se fait alors à + 0,7 V vs. ECS.

La seconde classe correspond aux capteurs à affinités entre les molécules biologiques receptrice/analyte comme l'association entre des saccharides et des protéines, entre un brin d'ADN (Oligonucléotide) et un ADN, ou entre un antigène et un anticorps. La reconnaissance s'effectue entre une molécule greffée sur le transducteur et une molécule présente dans l'échantillon à analyser. Par convention, l'espèce immobilisée est appelée espèce « sonde » tandis que l'analyte est l'espèce « cible ». Ce phénomène de reconnaissance engendre généralement des modifications physico-chimiques pouvant être transformées en signal par différentes méthodes : thermique, optique, gravimétrique ou électrochimique selon le type de transduction utilisée.

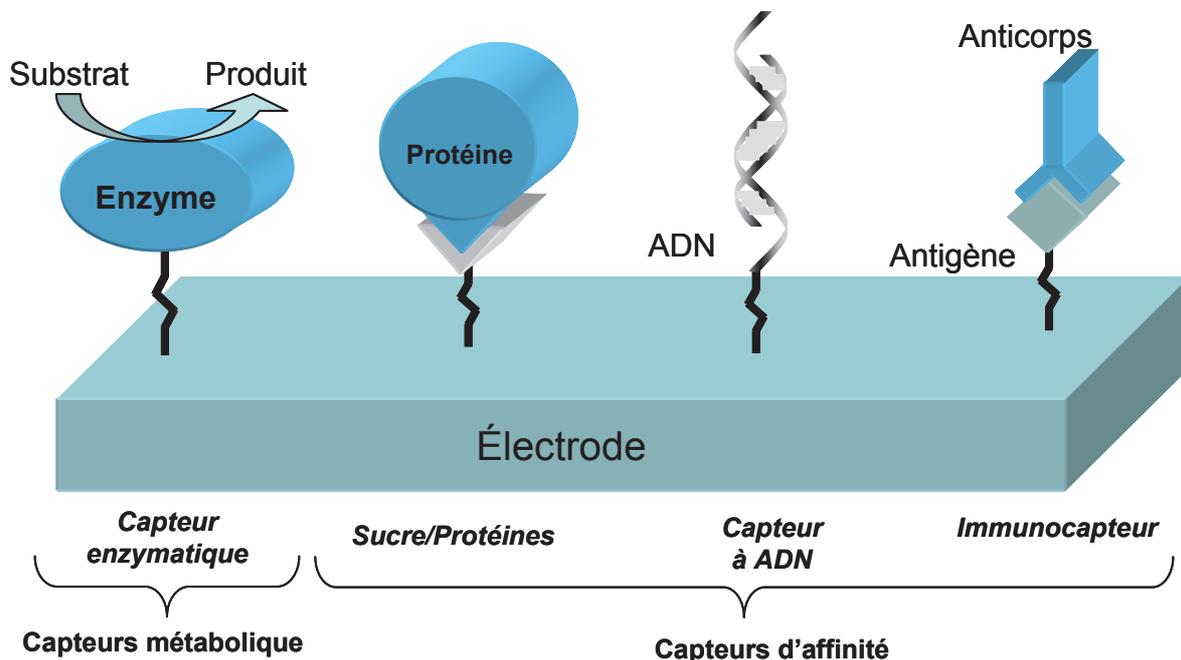


Schéma I-5 : Schéma des deux catégories de biocapteurs : métabolique et à affinité

I.2.b Les anticorps et les antigènes

Les anticorps sont des glycoprotéines (groupement oligosaccharide et chaîne polypeptidique) faisant partie de la famille des immunoglobulines (protéines membranaires participant au phénomène de reconnaissance, de liaison et d'adhésion des cellules). Ils

participent aux phénomènes de reconnaissance se liant avec les antigènes ayant pour effet de déclencher la réponse immunitaire. Ces anticorps sont formés de quatre chaînes peptidiques, deux étant lourdes (corps de l'anticorps), les deux autres légères (**Schéma I-6**).

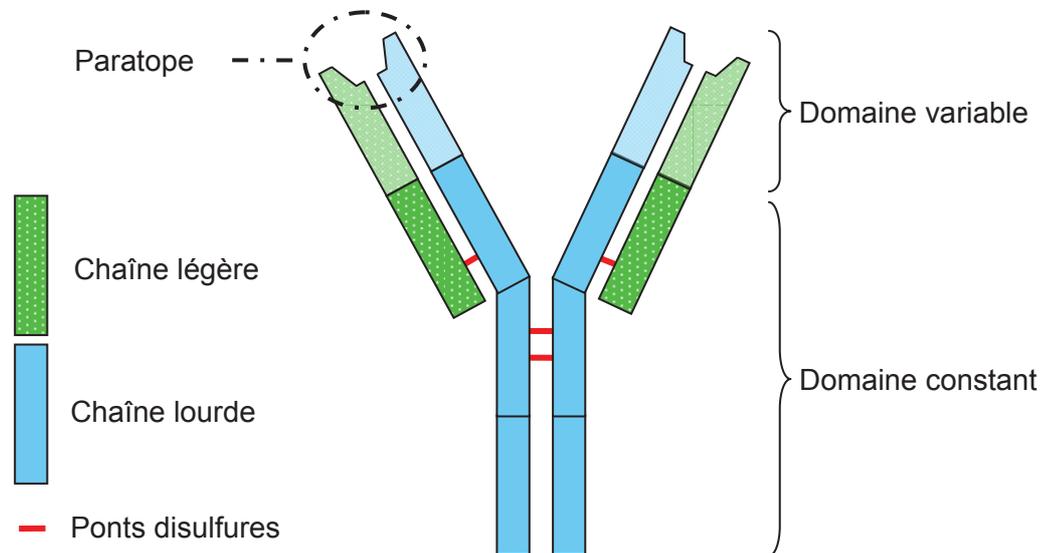


Schéma I-6: Schéma d'un anticorps

De plus, les anticorps se composent de deux domaines distincts. Chacune des quatre chaînes possède un domaine constant ne participant pas à la reconnaissance, et un domaine variable qui lui est engagé dans le processus de détection. Le domaine variable affecte donc la chaîne lourde et la chaîne légère. Le paratope désigne l'association d'un domaine variable lourd et léger d'un même bras et forme le site de reconnaissance dirigé contre un antigène spécifique. Un même anticorps possède deux sites de reconnaissance identiques. Il peut donc immobiliser deux molécules d'antigène.

Les antigènes, eux, sont généralement des macromolécules reconnues par les anticorps. Cette reconnaissance est possible par la présence de sites, appelés épitopes, qui vont être détectés par les anticorps et vont former par affinité le complexe antigène-anticorps (Ag-Ac). Comme le montre le **Schéma I-7**, un antigène comporte plusieurs épitopes. Il est multivalent. Les anticorps n'étant que divalents, plusieurs anticorps de spécificités différentes se fixent sur la molécule étrangère.

En revanche, il est actuellement possible de produire des anticorps contre n'importe quelle molécule, que celle-ci déclenche une réaction immunitaire ou non²¹. Grâce à cela, il est possible d'étendre le nombre d'espèces détectables par réaction immune entre un anticorps et un antigène. Ces « nouveaux » antigènes sont en réalité des fragments d'antigène (aptamères) ou des molécules de faibles poids moléculaire (haptén) qui conservent leurs propriétés de reconnaissance avec les anticorps. De plus, ces composés sont facilement synthétisables et

sont a priori plus stables que les anticorps, ce qui retient l'attention des scientifiques pour les développements de nouveaux immunocapteurs.

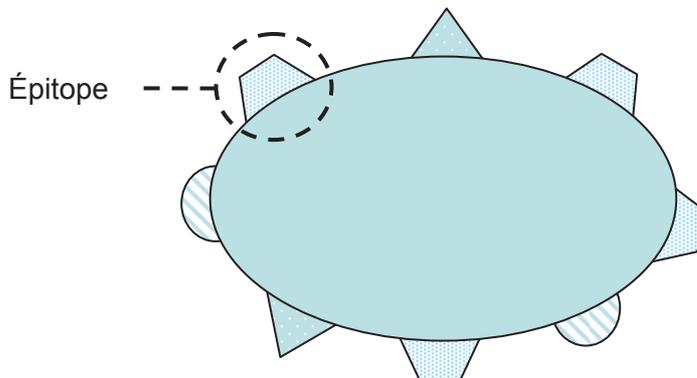


Schéma I-7: Schéma d'un antigène comportant plusieurs types d'épitopes

I.2.c Les méthodes de détection applicables pour les immunocapteurs

Une fois l'immobilisation des molécules biologiques à la surface des transducteurs effectuée, l'étape de détection est, elle aussi, critique puisqu'elle déterminera probablement si l'assemblage moléculaire a été effectif ou non. En chimie analytique, plusieurs méthodes sont utilisables, chacune d'elle ayant des spécificités, des avantages et des inconvénients. Il existe quatre grandes familles de biocapteurs : les biocapteurs thermiques, optiques, gravimétriques et électrochimiques. En ce qui concerne les immunocapteurs, les plus fréquemment utilisés sont les capteurs optiques, gravimétriques et électrochimiques.

I.2.c.1 Les biocapteurs thermiques

Les biocapteurs thermiques mesurent l'énergie produite ou absorbée au cours d'une réaction biochimique. L'avantage de cette méthode réside dans la simplicité de manipulation des molécules biologiques puisqu'il n'est pas nécessaire de les modifier par un groupement fluorophore ou électroactif pour être détectées. Pour autant, la difficulté se situe dans l'élaboration de la cellule du capteur lui-même et par les quantités de volume d'échantillons nécessaires à la détection. Les transducteurs utilisés dans ce genre de capteur sont des thermocouples, des thermorésistances ou des thermopiles (association en série de plusieurs thermocouples). L'excitation mesurée est alors la variation de la température des matériaux convertie en une tension électrique proportionnelle au gradient de température créé par la réaction biologique. En mettant en pratique cette méthodologie, Zhang et al.²² sont parvenus à élaborer un biocapteur thermique pour la détection de l'albumine sérique bovine (*Bovin Serum Albumin*, *BSA* en anglais), mais aussi de Fibronogène Humain (*Human Fibronogen*, *HF* en anglais), de leurs anticorps respectifs ainsi que les produits d'association Ag-Ac.

1.2.c.2 Les biocapteurs optiques

Le principe des biocapteurs optiques repose sur la mesure de lumière absorbée ou émise en réponse à un phénomène biochimique à travers une fibre optique. Les trois méthodologies de détection possibles sont la spectrophotométrie UV-visible, la fluorimétrie et la réflectométrie qui détectent l'absorbance lumineuse, l'intensité lumineuse émise et l'indice de réfraction respectivement.

La fluorimétrie est une technique optique qui nécessite le marquage des molécules par un groupe fluorophore. Par exemple, Barzen et al.²³ ont développé un immunocapteur optique portable multi analytes pour la détection de pesticides (atrazine, pentachlorophénol, etc.) dans les eaux de rivières. Des modèles de pesticides sont immobilisés sur la surface du transducteur par pulvérisation sous forme d'encres. Les anticorps utilisés pour ces études sont marqués par un fluorophore Cy5.5 appartenant à la famille des cyanines. La détection s'effectue indirectement. Une concentration fixe d'anticorps marqués est mise en contact avec un échantillon de concentration croissante en analyte ce qui conduit au blocage progressif des sites de reconnaissances des anticorps. Ces derniers ne sont alors plus complexés par les modèles immobilisés sur la surface de verre. Le pourcentage du signal lumineux récupéré par le détecteur est corrélé à la concentration en anticorps marqués encore libres et donc à la proportion d'analyte (signal intense pour des concentrations en analyte faible et inversement). Des mesures simultanées de concentration ont pu être réalisées. Dans les conditions décrites par les auteurs, les limites de détection sont de $0,07 \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,03 \mu\text{g.L}^{-1}$ et $4,23 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'alachlore, l'atrazine et le pentachlorophénol respectivement.

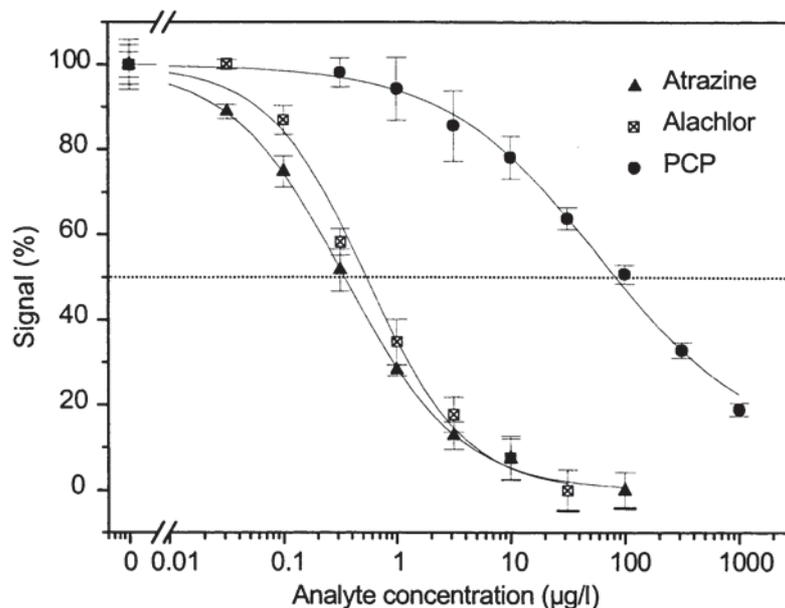


Figure I-2: Calibration simultanée pour l'atrazine, l'alachlore et le pentachlorophénole dans PBS. Diminution de l'intensité lumineuse avec l'augmentation de la concentration en pesticide. Reproduit de [23]

Parmi les modes de détection les plus utilisés, la résonance des plasmons de surface (*Surface Plasmon Resonance, SPR* en anglais) connaît une attention particulière. Elle appartient à la famille des dispositifs de réfractométrie qui utilise l'évanescence des ondes pour la caractérisation de phénomène de surface. Les variations des paramètres optiques tels que l'indice de réfraction de la couche immobilisée sur la surface révèlent les événements de fixation entre une protéine et un récepteur. Chaque événement peut alors être dans un premier temps détecté puis quantifié sans marquage de l'analyte par un fluorophore²⁴. En 1983 le premier immunocapteur basé sur la reconnaissance SPR a été mis au point. Depuis, cette méthode s'est considérablement développée.

En 2007, Gobi et al.²⁵ sont parvenus à détecter l'insuline avec un seuil de détection relativement bas de 1 ng.mL^{-1} avec une gamme de linéarité comprise entre 1 et 300 ng.mL^{-1} . Cet immunocapteur optique consiste à immobiliser dans une première étape une monocouche auto-assemblée à base d'éthylène glycol comportant deux fonctions thiol (pour la fixation sur l'or) et d'une fonction acide carboxylique. Ce groupement acide permet l'immobilisation de l'insuline par la formation de liaison amide entre la SAM et les groupes amines de la molécule. Comme dans le cas précédent, le dosage est indirect. Des mélanges d'insuline (à différentes concentrations) et d'anticorps monoclonaux dirigé contre l'insuline (Ins-mAb) sont injectés sur la surface fonctionnalisée (*OEG-DCA-Ins*). Les auteurs détectent alors la fixation des anticorps encore libre en solution sur la monocouche.

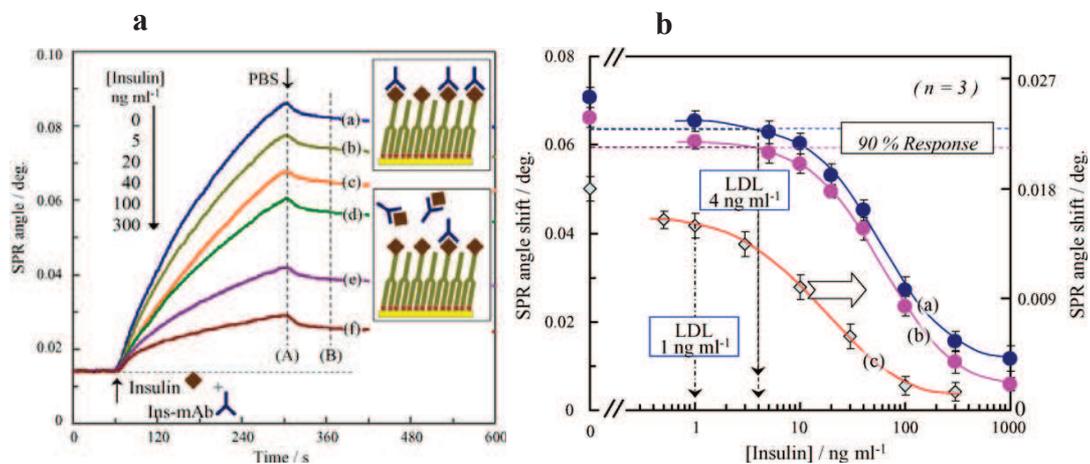


Figure I-3: a- Réponses SPR de la fixation des Ins-mAb en présence de différente concentration d'insuline sur la surface modifiée OEG-DCA-Ins. b- Courbes logarithmiques de la variation de l'angle SPR en fonction de la concentration en insuline. Reproduit de [25]

Une équipe espagnole²⁶ a récemment mis au point un immunocapteur multivoies (incorporation d'un système de microfluidique) capable de détecter les anticorps spécifiques d'antibiotiques tel que l'enrofloxacin dans le lait avec une limite de détection de $0,30 \mu\text{g.L}^{-1}$.

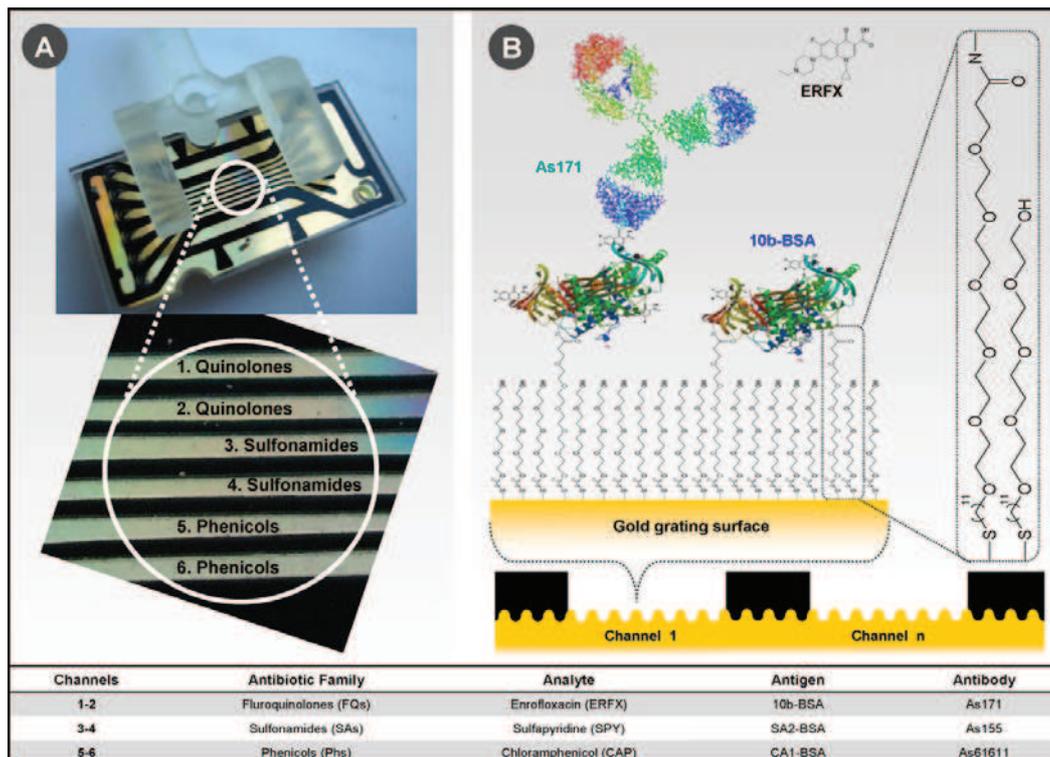


Figure I-4: Photographie de l'immocapteur multivoies utilisant la SPR pour l'analyse simultanée d'anticorps dirigés contre l'enrofloxacin, la sulfapyridine et le chloramphenicol présents dans le lait. Reproduit de [26]

1.2.c.3 Les biocapteurs gravimétriques

La gravimétrie est l'étude de la variation de la masse en lien avec l'adsorption ou la désorption de matériel à la surface d'un cristal. La microbalance à quartz (*Quartz Crystal Microbalance*, *QCM* en anglais) fait partie de ce type de capteur sensible aux changements de masse. Le système consiste en l'immobilisation d'un fin disque de quartz entre deux électrodes. Ce matériel faisant partie de la famille des piézoélectriques, il se déforme sous l'apparition d'un champ électrique entre la paire d'électrode. En 1959, Sauerbrey a montré que la variation de la masse (Δm) d'un film adsorbé sur un quartz était proportionnelle à la variation fréquence de résonance (Δf) du piézoélectrique d'après l'Équation I-1 :

$$\Delta m = -C \frac{\Delta f_n}{n} \quad \text{Équation I-1}$$

Cette fréquence varie donc suivant le type de phénomène d'interaction. Elle augmente lorsque des molécules se fixent sur la surface du quartz et diminue dans le cas d'une perte de masse et permet une détection en temps réel des événements de dés(adsor)ption. Pour que la variation de fréquence soit liée à la variation de masse, le film doit être viscoélastique.

Cette technique est utilisée pour la caractérisation de plusieurs phénomènes biologiques comme l'adhésion et la prolifération de cellules ou de biofilms²⁷ sur une surface, l'hémostase²⁸, la détection de petite molécule^{29, 30} ou différents types d'interaction :

hybridation de l'ADN³¹ (pour la détection d'algue marine³²), protéine-glucide³³ ou anticorps-antigènes³⁴. Une revue scientifique parue en 2010 fait état du nombre impressionnant de champs d'applications pour la détection grâce à cette technique³⁵.

Garcia-Martinez et al.³⁶ ont développé un biocapteur gravimétrique (*QCM*) à ADN très sensible en comparaison avec les valeurs de Δf mesurées dans [32]. Dans les mêmes conditions, la circulation d'une solution en ADN_{cible} à 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ n'engendrait qu'une variation de fréquence de - 77 Hz, alors qu'avec le nouveau dispositif, celle-ci atteint désormais - 1 kHz. Ce nouveau biocapteur gravimétrique possède une limite de détection de 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (**Figure I-5**).

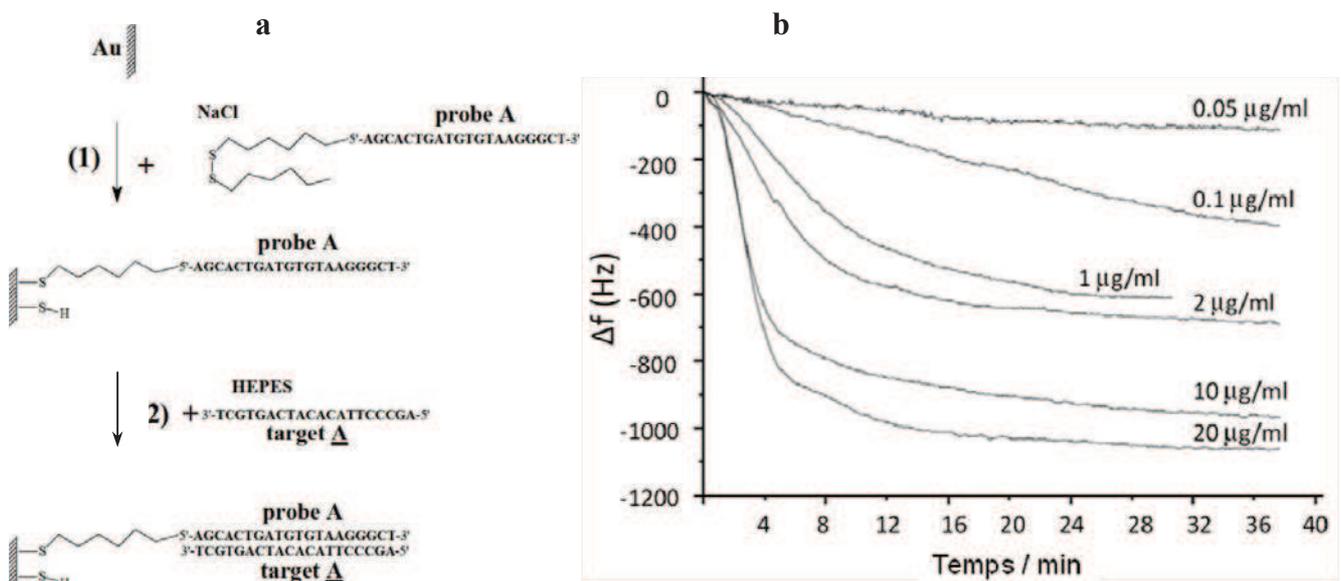


Figure I-5: a- Représentation des étapes de la fabrication du biocapteur : (1) de la monocouche auto-assemblée ($\text{SAM-ADN}_{\text{sonde}}$), (2) de l'hybridation entre l' $\text{ADN}_{\text{sonde}}$ et l' $\text{ADN}_{\text{cible}}$. b- Variation de la fréquence du quartz du biocapteur $\text{SAM-ADN}_{\text{sonde}}$ lors de la circulation à sa surface d'un flux de concentration croissante en $\text{ADN}_{\text{cible}}$. Reproduit de [36]

1.2.c.4 Les biocapteurs électrochimiques

C'est en 1967 que débute l'histoire des capteurs électrochimiques avec les travaux menés par Updike et Hicks³⁷ sur l'immobilisation de l'enzyme glucose oxydase (*GOx*) dans une matrice de polymère.

Dans le cas des capteurs électrochimiques, la reconnaissance (spécifique) des analytes par les macromolécules biologiques immobilisées sur le support solide (le transducteur) induit la transformation du phénomène biologique en signal électrique. Classiquement, les biocapteurs électrochimiques sont basés sur trois différents types de transducteurs, appelés potentiométrique (mesure d'un potentiel), ampérométrique (mesure d'un courant) et impédancemétrique (mesure de la résistance ou de la capacitance du système de reconnaissance).

- Les biocapteurs potentiométriques

Le premier capteur de ce type fut réalisé par Guilbault et Montalvo³⁸ en 1969 pour la détection de l'urée. Il s'agit ici d'une électrode sélective aux ions ammonium, recouverte d'un gel d'uréase. La réaction enzymatique avec l'urée provoquant la formation de l'ammonium, l'électrode sélective est indirectement sensible à la présence de l'urée.

Le bisphénol A (*BPA*) a pu être détecté en immobilisant l'anticorps spécifique à cette molécule sur un film polymère³⁹. La variation du potentiel a été attribuée à la modification de la charge électrique au niveau de l'électrode suivant que l'anticorps immobilisé était complexé ou non par l'analyte *BPA*. D'autres espèces comme l'immunoglobuline humaine G (HIgG)⁴⁰ ou encore l'antigène dirigé contre l'hépatite B (HBsA)^{41, 42} ont été quantifiées avec cette technique.

- Les biocapteurs ampérométriques

Pour de tels dispositifs de mesure, il est nécessaire que le biorécepteur consomme ou produise une espèce électroactive. Les biomolécules sondes utilisées pour la détection/quantification sont des enzymes rédox⁴³ ou des molécules marquées par des protéines électroactives⁴⁴. La détection de l'espèce formée a lieu directement à la surface de l'électrode. Le potentiel, maintenu fixe dans le temps, est choisi de telle sorte à pouvoir mesurer un courant (d'oxydation ou de réduction) proportionnel à la concentration en espèces électroactives introduites dans l'échantillon. Dans les années 1980, les travaux sur ces biodétecteurs ampérométriques notamment pour la détection du glucose⁴⁵ ont largement contribué à l'émergence de nouveaux dispositifs de détection.

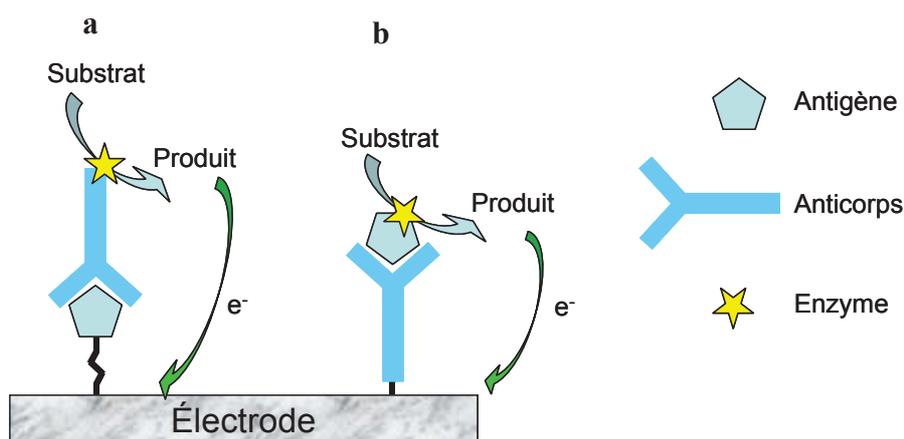


Schéma I-8: Schéma de principe de deux immunocapteurs ampérométriques : a- par marquage enzymatique d'un anticorps, b- par marquage enzymatique d'un antigène

La détection ampérométrique s'est ensuite orientée vers des quantifications variées de substances. Elle permet le dosage d'un nombre important d'autres molécules comme les hormones⁴⁶, les toxines⁴⁷, etc.

Ionescu et al. ont étudié et comparé les performances d'un immunocapteur pour la détection de la toxine du choléra en utilisant trois oxydoréductases, la *HRP*, la polyphénol oxydase (*PPO*), et la glucose oxydase (*GOx*)⁴⁸. Pour cela, deux approches ont été envisagées. La première consistait à utiliser un anticorps secondaire conjugué à la *HRP* capable de reconnaître l'anticorps du choléra. La seconde, à fixer un anticorps secondaire modifié par une biotine puis à immobiliser les enzymes marquées par une biotine grâce au système biotine-avidine-biotine. Les résultats ont montré que le meilleur système était celui mettant en jeu la *HRP* avec une limite de détection de 50 ng.mL^{-1} (2 et 20 fois plus performants que les capteurs utilisant respectivement la *PPO* et la *GOx*)

- Les biocapteurs impédancemétriques

Dans les biocapteurs impédancemétriques, l'électrode est soumise à une perturbation sinusoïdale de faible amplitude à un potentiel (ou un courant) donné. La réponse sinusoïdale mesurée (de faible amplitude également) est alors un courant (ou un potentiel) dans une zone où le système répond linéairement. Le rapport potentiel-courant (sinusoïdaux) donne alors accès à l'impédance Z du capteur. La théorie de cette méthode électrochimique sera développée plus en détail dans le **chapitre II** qui se focalise sur le développement d'un immunocapteur impédancemétrique. Seuls quelques exemples sont donnés dans cette partie bibliographie.

La transduction impédancemétrique est une technique très courue pour l'étude de systèmes affins comme l'hybridation des brins d'ADN ou la reconnaissance anticorps/antigène. Ces phénomènes de reconnaissance biologique ne sont pas accompagnés de transfert d'électron. Deux voies se proposent, alors, à l'expérimentateur désireux d'étudier, de caractériser et finalement de quantifier la présence, sur électrode, de toxine, d'anticorps, de matériel génétique, etc. La première, ne faisant pas intervenir de processus faradique, est obtenue avec l'utilisation d'électrodes dites « bloquantes ». La seconde fait concourir une espèce ou un couple rédox pour l'obtention d'un transfert de charge au niveau de l'électrode. Une telle électrode porte le nom d'électrode « faradique ». Ces deux classes sont décrites succinctement ci-dessous.

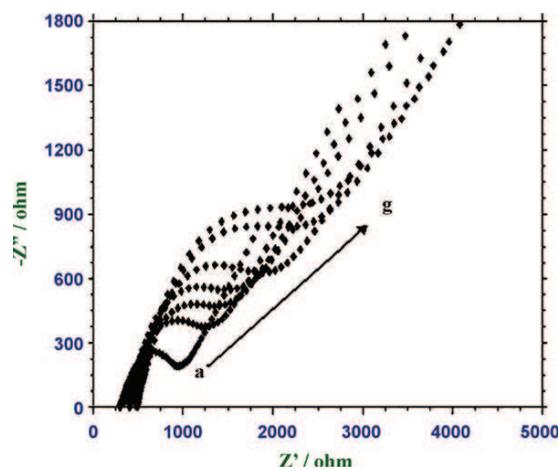
Ces capteurs impédancemétriques sont particulièrement attractifs grâce à leur faible coût, leur relative facilité de fabrication puisqu'ils permettent la détection d'objets biologiques sans marquage préalable (fluorophores, billes magnétiques ou enzyme rédox) des biomolécules⁴⁹⁻⁵¹. Lorsqu'une molécule cible se lie avec la molécule sonde située à la surface du biocapteur, les propriétés électriques et/ou diélectriques de la bioélectrode sont modifiées.

Les espèces biologiques cibles peuvent, alors, être détectées, en mesurant la variation de l'impédance du système.

Lorsqu'il n'y a pas de transfert d'électron (biocapteurs à électrode bloquante), ce sont surtout les propriétés diélectriques du biocapteur qui sont modifiées quand l'analyte se lie à la surface du biocapteur. Dans ces conditions, ce sont les capacités du biocapteur qui sont différentes et qui sont regardées pour doser l'analyte. Les électrodes, en général, ne sont pas classiques ; on utilise des électrodes interdigitées, des semi-conducteurs, des oxydes métalliques⁵²...

Le terme biocapteur capacitif désigne souvent ces biocapteurs basés sur une mesure d'impédance non faradique, mais habituellement la mesure est réalisée à une seule fréquence. Cette méthode de transduction reste peu sensible par rapport à la transduction impédancemétrique faradique.

Dans les biocapteurs à électrode faradique, la mesure s'effectue grâce à l'utilisation d'une sonde électroactive (libre en solution⁵¹, ou immobilisée dans une matrice de polymère⁵³). On trouve de nombreux exemples dans la littérature avec $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$... La sonde redox diffuse à travers le biocapteur pour venir réagir à la surface de l'électrode. Grâce à la spectroscopie d'impédance électrochimique, on détermine la résistance de transfert de charge associée à cette réaction. Après reconnaissance avec la cible, la diffusion de la sonde étant plus difficile, la résistance de transfert de charge (propriétés électriques) de la sonde électrochimique augmente. Par exemple, l'utilisation de membrane nanocomposite (CeO_2 , nanotubes de carbone, liquide ionique) sur carbone vitreux a permis l'immobilisation et la détection de l'hybridation d'ADN^{54, 55}. En présence du couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, les auteurs ont observé une variation importante de la résistance de transfert de charge avec la concentration en ADN cible. La limite de détection obtenue est de $2,3 \cdot 10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$.



Autre exemple, récemment, la détection de myoglobine, bio-marqueur cardiaque, a été démontrée avec une limite de détection très basse ($5,2 \text{ ng.mL}^{-1}$) grâce à un immunocapteur impédancemétrique réalisé par immobilisation covalente de l'anticorps spécifique de l'analyte⁵⁶. La sonde rédox utilisée est ici aussi le couple rédox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

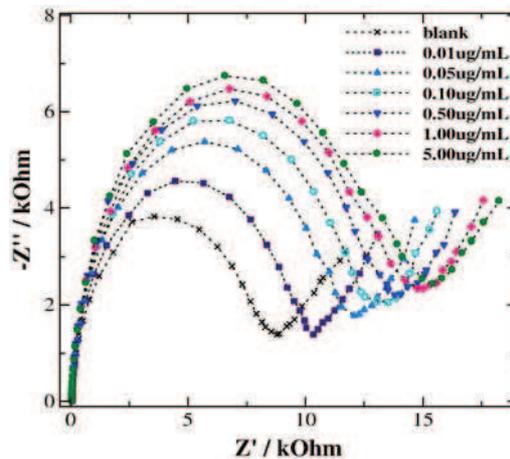


Figure I-7: Spectre d'impédance faradique d'une électrode modifiée par l'anticorps spécifique de la myoglobine après incubations successives dans des solutions de concentration croissante en antigène (myoglobine). Reproduit de [56]

Il est à noter que le marquage des molécules reste possible pour une utilisation de la spectroscopie d'impédance électrochimique. En 2001, Alfonta et al.⁵⁷ ont rapporté un procédé original pour la reconnaissance d'interaction anticorps-antigène pour la toxine du choléra. La réaction catalytique d'un composé (4-chloronaphthol) présent dans l'électrolyte avec l'enzyme *HRP* (présente sur un liposome) conduisait à la formation d'une nouvelle espèce insoluble. Celle-ci formait alors une barrière à la diffusion de la sonde rédox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ menant à une amplification du signal de reconnaissance classique entre l'anticorps et la toxine. Cette amplification se traduit par l'augmentation progressive de la résistance de transfert de charge en fonction du temps. Cet immunocapteur possède une limite de détection de $1.10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$.

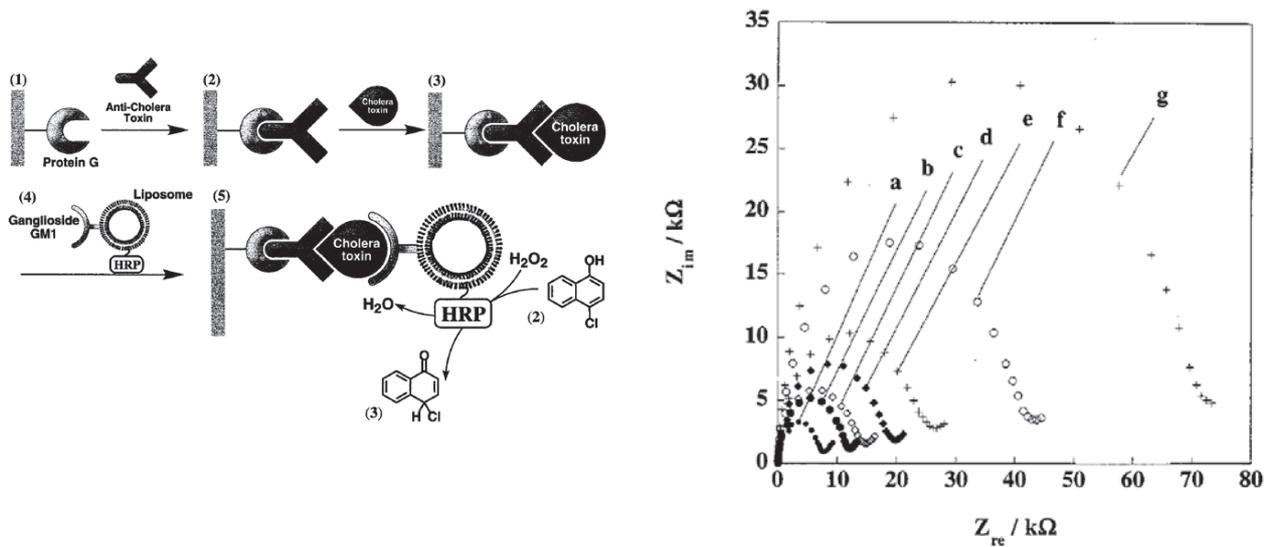


Figure I-8: Principe de l'amplification du signal de l'immunocapteur impédancemétrique pour la détection de la toxine du choléra développé par Alfonta et al. Reproduit de [57]

Une autre famille de capteur, proche des impédancemétriques, consiste à détecter les variations de la conductivité électrique du matériau d'électrode et de son environnement proche. Ces biocapteurs conductimétriques mettent (pour la majorité d'entre eux) en jeu l'utilisation d'enzyme. Lors de la catalyse enzymatique d'un substrat en produit, les variations de concentration en espèces chargées produisent des modifications de la force ionique et donc de la conductivité globale entre les électrodes de mesure⁵⁸. Plusieurs exemples peuvent être choisis, comme la détection de l'urée avec l'apparition des ions NH_4^+ et HCO_3^- en présence d'uréase⁵⁹, ou encore la détection de carbamates sous l'action de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase⁶⁰. Hnaiein et al.⁶¹ ont mis au point un immunocapteur conductimétrique pour la détection de la bactérie *Escherichia coli*. Les auteurs ont immobilisé les anticorps (marqués par de la biotine) dirigés contre la bactérie sur les électrodes grâce à un couplage streptavidine/biotine sur des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées par la streptavidine. Les électrodes sont ensuite mises en contact avec un milieu contenant la bactérie *E. coli*. La complexation des bactéries avec les anticorps immobilisés conduit à une diminution de la conductivité. Cet immunocapteur permet la détection de 500 CFU.L⁻¹ (Colony-Forming Unit, unité de comptage de bactéries vivantes).

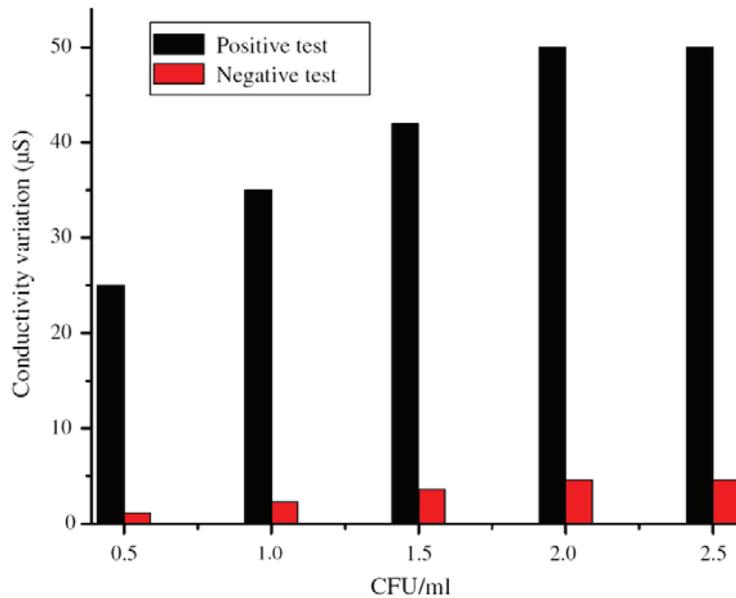


Figure I-9: Variation de la conductivité d'une électrode conductimétrique modifiée par les anticorps dirigés contre *Escherichia coli* (*E. coli*) en présence d'un milieu contenant une population de *E. coli* (histogramme noir) et une population de *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). Reproduit de [61]

1.3 Les biopiles à combustible

Cette partie s'attache à définir le fonctionnement des piles à combustible en général, puis s'oriente progressivement à la production énergétique par voie biologique. Ici, les catégories de biopiles à combustible sont exposées. Par la suite, l'effet du pH dans les systèmes biologiques est décrit. Finalement, l'accent est porté sur le développement et les progrès des biopiles à glucose/O₂ dans la littérature.

1.3.a Contexte

Les questions sur les sources énergétiques dites « fossiles » telles que le pétrole, le gaz ou le charbon occupent une place importante, premièrement parce que ces modes de production d'énergie sont destinés à s'épuiser par la disparition progressive des réserves mondiales, ensuite parce qu'ils sont à l'origine de l'augmentation de la production des gaz à effet de serre (*GES*). Riches en carbone, ces sources libèrent du dioxyde de carbone (CO₂) dans l'atmosphère lors de leur combustion.

Une autre source d'énergie fossile, qui semblait prometteuse, est l'énergie nucléaire. Basée sur la récupération d'énergie émise lors de la fission de matériaux combustibles, elle a l'avantage de ne pas émettre de *GES*. En revanche, la fission conduit à l'apparition de déchets hautement radioactifs et soulève le problème de stockage et/ou de traitement de ces derniers. De plus, les récents événements ont pu montrer les effets désastreux sur l'environnement lorsque l'homme perd le contrôle d'une centrale de production (Tchernobyl 1986, Fukushima 2011).

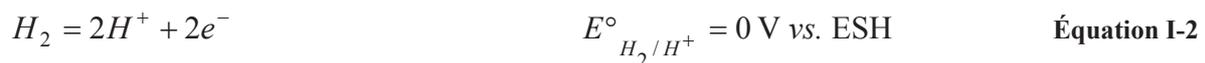
L'une des voies explorées actuellement par le monde scientifique pour diminuer l'emprise des quatre sources citées précédemment concerne le développement de dispositifs électrochimiques tels que les piles à combustibles.

I.3.b Définition et principe des (bio)piles à combustible

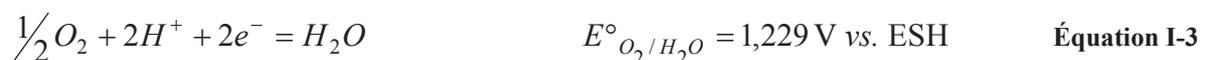
Les piles à combustible (*PAC*) ou plus précisément les biopiles à combustible sont des dispositifs capables de générer de l'énergie électrique par la conversion d'énergie chimique emmagasinée dans les molécules à travers des chemins réactionnels chimiques ou biochimiques⁶². Cette production n'est possible qu'à la seule condition que chacune des électrodes soit alimentée par un combustible d'une part et d'un oxydant d'autre part. Des électrons sont produits au niveau de l'anode lors de l'oxydation du combustible sur le matériau d'électrode. Inversement, la réaction de réduction de l'oxydant à la cathode requiert ces électrons. En reliant les deux électrodes par un circuit extérieur, la circulation des électrons (et donc d'un courant électrique) est alors possible.

La première pile à combustible à hydrogène-oxygène fut revendiquée par Grove en 1839⁶³.

Comme évoqué précédemment, les deux électrodes qui constituent une *PAC* sont les sièges de deux réactions électrochimiques. Aussi longtemps que le combustible et l'oxydant sont apportés jusqu'aux électrodes, la pile est capable de produire de l'énergie électrique. Les *PACs* classiques utilisent le dihydrogène et le dioxygène comme combustible et oxydant respectif. A l'anode, le dihydrogène est oxydé sous forme de proton :



Tandis que le dioxygène est réduit grâce aux protons qui diffuse à partir de l'anode jusqu'à la cathode et forme de l'eau



La réaction globale de la pile est donc



D'après les potentiels d'équilibre des demi-réactions des **équations I-2** et **I-3**, la différence de potentiel attendue pour cette pile est de $E = 1,229 \text{ V}$.

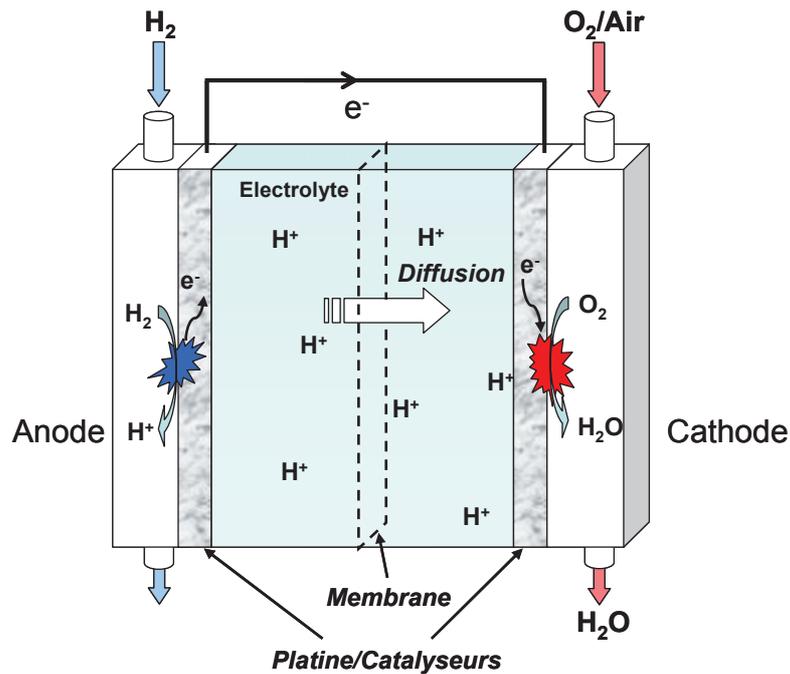


Schéma I-9: Schéma de principe d'une pile à combustible hydrogène/oxygène

Malgré un stade de développement avancé, ces piles souffrent de limitations pour leur commercialisation massive. D'une part, l'utilisation du platine et des catalyseurs augmente considérablement le coût de fabrication de ces générateurs^{64, 65}. D'autre part, les piles subissent un empoisonnement dû à la présence de monoxyde de carbone (CO), de dioxyde de carbone (CO₂) ou de dichlore (Cl₂) au niveau de l'anode^{66, 67} ou un effet de noyade des électrodes⁶⁸ (accumulation d'eau au niveau des électrodes), diminuant aussi les performances des piles dans le temps.

Il aura fallu attendre 1964 avec les travaux de Yahiro, Lee et Kimble⁶⁹ pour que le terme « bio » s'ajoute comme préfixe à pile à combustible. Les auteurs présentent l'étude sur la Glucose Oxydase, et la D-amino acide oxydase pour la création d'un courant. Du fait de la faible stabilité des protéines en solution et du rendement extrêmement faible des dispositifs utilisant la technologie « bio », les piles à combustibles telles que les PEMFC (piles à combustibles à membrane échangeuse de protons) ou les SOFC (pile à oxyde solide) sont restées largement majoritaires*. Toutefois depuis une dizaine d'années, cette catégorie de biopiles jouit d'un nouvel essor (Figure I-10), dû aux développements dans le domaine des biocapteurs (durées de vie accrues des protéines, nouveaux matériaux d'électrodes et techniques d'immobilisation, diversités des espèces biologiques et des substrats).

* recherche effectuée pour chaque type de PAC conventionnelle sur Web of Knowledge pour la période 2010, PEMFC (33 %), SOFC (38 %), DMFC (pile à combustible à méthanol direct) (15 %), AFC (pile à combustible alcaline) (8 %), PAFC (pile à combustible à acide phosphorique) (3 %) et MCFC (pile à combustible à carbonate fondu) (2 %)

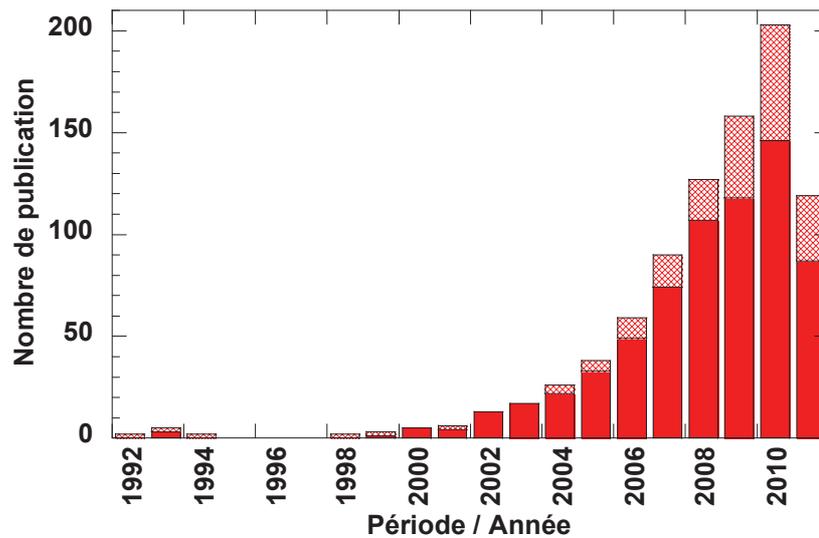


Figure I-10: Évolution du nombre de publication d'articles entre 1992 et 2011. Recherche effectuée avec les mots clés « Biofuel Cells ». La partie hachurée représente la part concernant la recherche « Enzymatic Biofuel Cells ». Source *Web of Knowledge*, édité en juillet 2011

Ces biopiles n'ont pas vocation à remplacer un parc électrique complet. Leurs utilisations se focalisent plus dans l'alimentation de petits appareils électroniques portables (lecteur MP3, téléphone portable, etc.) ou implantable (capteur à glucose, pompe à insuline, etc.)

Le principe des biopiles à combustible est identique à celui des *PAC*. Un combustible est oxydé (hydrogène⁷⁰, alcool^{71, 72}, glucose⁷³, etc.) à l'électrode négative, un oxydant (O_2 ⁷⁴) réduit à la positive. La particularité de ces nouvelles sources d'énergie électrique réside dans l'utilisation d'espèces biologiques pour catalyser les réactions ayant lieu aux électrodes. L'utilisation de métaux nobles n'est alors plus indispensable.

I.3.c Les différents types de biopiles

I.3.c.1 Les biopiles microbiennes

Une pile à combustible microbienne (*PACM*) est caractérisée par l'utilisation de microorganismes (bactéries) comme catalyseurs⁷⁵⁻⁷⁹ pour oxyder la matière organique au niveau de l'anode. A la cathode, l'oxygène est réduit en eau. L'avantage de ces piles est l'utilisation de bioorganismes complets. La présence de nombreuses enzymes rédox que contiennent ces organismes s'accompagne par l'oxydation complète d'une large variété de substrats (glucose⁸⁰, hydrocarbure aromatique⁸¹, etc.). De plus, ces entités sont capables de régénérer elles mêmes leurs enzymes ou cofacteurs nécessaires à l'oxydation de la matière organique. Ainsi, les *PACM* disposent d'une durée de vie remarquable pouvant atteindre plusieurs années⁸². Cependant, ce type de générateur souffre en général d'une faible densité

de puissance provoquée par une limitation du transport de matière à travers la membrane des cellules et d'un faible transfert électronique.

Comme les microorganismes peuvent se développer naturellement, il est primordial de séparer les deux électrodes par une membrane. Si tel n'est pas le cas, les colonies présentes en suspension au niveau de l'anode peuvent se déposer sur la cathode pouvant conduire à une diminution des performances⁸³.

Jusqu'en 2006, la plupart des cathodes utilisées dans les *PACM* étaient en platine et fonctionnaient en condition abiotique (absence de matériel biologique) avec des catalyseurs de type phtalocyanine ou des porphyrines à base de cobalt^{84, 85}. Bergel et al.⁸⁶ ont montré que la croissance d'un biofilm marin sur une électrode en acier inoxydable conduisait à la production de courant électrique lors de l'électrocatalyse de la réduction de l'oxygène. Ils ont ainsi obtenu une pile de 850 mV environ, pouvant délivrer une densité de courant maximale de 1,34 A.m⁻² pour une puissance de 0,32 W.m⁻². Cependant, l'anode était une électrode abiotique et le biofilm n'a pas été caractérisé.

En 2008, l'équipe de Rabaey a décrit l'assemblage d'une biopile microbienne dont la biocathode était en contact direct avec l'air⁸⁷. Le biofilm développé sur la surface de carbone était capable de réduire efficacement l'oxygène (jusqu'à 2,2 A.m⁻²). De plus, après une analyse du biofilm, les auteurs ont pu identifier les communautés bactériennes dominantes, les isoler et sélectionner l'espèce la plus propice à la catalyse de la réduction de O₂.

Une autre approche consiste à utiliser conjointement une bioanode microbienne avec une biocathode enzymatique pour ainsi catalyser la réduction de l'oxygène à l'électrode positive⁸⁸. La *d.d.p.* atteint alors 1,1 V (au lieu de 0,8 V avec une cathode de platine) et la puissance augmente de 4,6 à ~ 46 mW.cm⁻².

1.3.c.2 Les biopiles à mitochondrie

Les systèmes biologiques utilisés dans les électrodes des piles à combustible sont principalement des microbes ou des enzymes. Les biopiles à mitochondries sont donc une nouvelle espèce de *PAC*. Les mitochondries sont des organites/organelles présentes dans les cellules eucaryotes. Leur rôle est essentiel puisqu'elles sont le siège de la synthèse de l'ATP (Adénosine TriPhosphate) grâce à l'apport énergétique lors de la transformation de molécules organiques. Elles présentent de nombreux avantages par rapport aux deux autres classes de biopile. Elles contiennent tout le matériel enzymatique nécessaire pour conduire une oxydation profonde et complète du substrat et n'offrent pas une limitation (de transport de matière ou de transfert électronique) aussi importante que les bactéries. En revanche, elles s'apparentent plus aux enzymes dans le sens où elles ne peuvent pas se reproduire comme des bioorganismes complets, ce qui implique leurs immobilisations dans des matrices pour accroître leurs durées de vie.

A ce jour, seulement une équipe développe de telles biopiles. L'équipe américaine de Minteer s'intéresse à l'oxydation complète de substrat tel que le pyruvate⁸⁹. Les auteurs ont

remarqué que les biopiles classiques utilisant la *GOx* ou la glucose déshydrogénase (*GDH*) ne conduisait qu'à la production de 2 électrons lors de l'oxydation d'une molécule de glucose. Cependant, si le glucose est oxydé entièrement jusqu'au CO_2 , les oxydations successives peuvent générer 24 électrons au travers de deux cycles métaboliques : la glycolyse et le cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs), ce qui pourrait accroître considérablement l'efficacité de la pile. En 2008, ce groupe a montré pour la première fois que l'oxydation complète du pyruvate était réalisable à l'aide de mitochondries⁹⁰. De plus, les travaux de Arechederra et al.⁹¹ ont confirmé que ces organelles pouvaient transférer directement les électrons sur le matériau carbone grâce à la présence de la cytochrome c oxydase (*COx*) au niveau de la membrane de la mitochondrie (Schéma I-10).

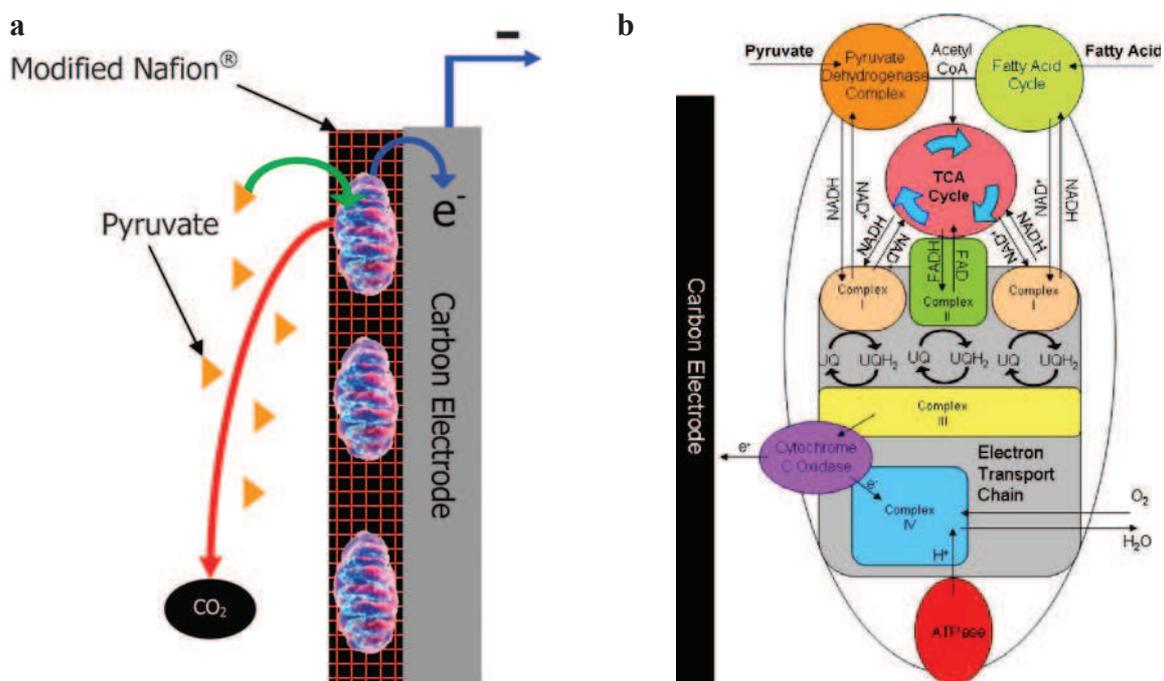


Schéma I-10: a- Schéma de l'oxydation complète du pyruvate en CO_2 en utilisant une mitochondrie comme catalyseur. Reproduit de [92]. b- Schéma descriptif des cycles catalytiques prenant place dans une mitochondrie immobilisée sur une électrode de carbone avec transfert électronique direct par la Cytochrome C Oxydase. Reproduit de [91]

Toujours dans le but d'accroître la gamme de variété des substrats, la même équipe a cherché à tirer parti de la présence du cycle de métabolisme des acides gras, mais également des acides aminés⁹². En utilisant une biocathode au contact de l'air et une bioanode à base de mitochondrie et avec une concentration de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ en cystéine (un acide aminé), la pile délivre une puissance maximale de $10,3 \pm 1,4 \mu\text{W.cm}^{-2}$ pour un courant de $185 \pm 39 \mu\text{A.cm}^{-2}$. De plus, les performances sont supérieures pour tous les acides aminés caractérisés par rapport à une pile réalisée avec du pyruvate dans les mêmes conditions de concentrations.

1.3.c.3 Les biopiles enzymatiques

La troisième catégorie de pile à combustible utilisant des catalyseurs biologiques est la biopile enzymatique (*PACE*). Il s'agit de la catégorie la plus répandue avec les *PACM*. Des enzymes sont immobilisées à la surface des électrodes. Ces générateurs électrochimiques offrent généralement des densités de courant/puissances supérieures à celles obtenues dans le cas de biopiles microbiennes. En utilisant les enzymes en tant que catalyseurs, la limitation par le transport de matière à travers la membrane cellulaire des bactéries n'existe plus. Le substrat peut diffuser alors plus rapidement jusqu'au centre prosthétique de la protéine pour y être oxydé ou réduit. De plus, comme la sélectivité des enzymes envers leur substrat est importante, la conception de biopiles ne nécessite donc pas forcément la présence d'une membrane séparatrice entre bioanode et biocathode contrairement aux autres piles à combustible.

Un inconvénient freinant leurs développements est la limitation des performances par l'oxydation incomplète des combustibles utilisés. La majeure partie des biopiles développées n'utilisent qu'une seule enzyme pour l'oxydation du substrat au niveau de l'anode ne conduisant qu'à un transfert à 2 électrons⁹³. Une grande partie de l'énergie chimique de la molécule de départ n'est alors pas exploitée.

De ce fait, tout comme leurs analogues microbiennes, leurs performances (densité de courant, stabilité opérationnelle et durée de vie du catalyseur) restent nettement inférieures au *PAC* classique et ont retardé leur développement et production. Cependant, comme l'indique la **Figure I-10**, la part d'articles concernant les biopiles enzymatiques ne cesse de croître depuis les années 2000 (avec une tendance exponentielle) fortement liée aux développements parallèles des biocapteurs enzymatiques. Ces biogénérateurs sont destinés à l'alimentation d'appareils électroniques de petites tailles tels que des dispositifs implantables/nomades peu « gourmands » en énergie électrique⁹⁴.

La recherche actuelle sur ce thème potentiellement riche en développement commercial se focalise donc sur l'augmentation des performances des piles, la stabilité des protéines rédox et la miniaturisation des systèmes.

Les enzymes utilisées dans les *PACEs* sont des oxydoréductases (E.C. 1). Elles catalysent l'oxydation ou la réduction d'un substrat en faisant intervenir un transfert électronique. Les enzymes les plus couramment observées dans ces biopiles sont brièvement exposées.

❖ Les enzymes cathodiques

Pour l'ensemble des biopiles en développement, une part très importante se concentre sur l'électroréduction enzymatique de O₂ à la cathode. Les protéines rédox utilisées pour la cathode biologique sont des oxydoréductases possédant des atomes de cuivre (Multi-Copper Oxidase, *MCO* en anglais) comme centres actifs (laccase, bilirubine oxydase)⁹⁵ ou la

cytochrome oxydase⁹⁶ avec un centre hémique actif Cu/Fe. Quelques exemples mettent également en avant la réduction du peroxyde d'hydrogène, en utilisant des peroxydases pour conduire la catalyse enzymatique^{97a-b}.

Le **Tableau I-1** récapitule brièvement les comburants rencontrés à la cathode, les systèmes enzymatiques catalysant leurs réductions et les demi-réactions correspondantes.

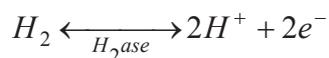
Tableau I-1: Différents couples Oxydant/Enzyme utilisés dans les biocathodes de PACEs

Oxydant	Enzymes	Métal / Cofacteur	Demi-réaction	Référence
O ₂	Laccase (<i>Lc</i> , E.C. 1.10.3.2)	Cu		122
	Bilirubine Oxydase (<i>BOx</i> , E.C. 1.3.3.5)	Cu	$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$	73
	Cytochrome Oxydase (<i>COx</i> , E.C. 1.9.3.1)	Cu, Fe / Hème		96
H ₂ O ₂	microperoxydase-11	Fe / Hème	$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O$	97a
	Horseshoe Peroxydase (<i>HRP</i> , E.C. 1.11.1.7)	Fe / Hème		97b

❖ Les enzymes anodiques

Du côté anodique, les systèmes enzymatiques peuvent varier suivant le substrat utilisé. Par exemple, l'alimentation d'appareil électronique portatif peut être envisagée avec un nombre relativement important de combustibles alors que pour des dispositifs implantables dans des organismes vivants, seul le glucose peut servir de réservoir électronique à l'anode.

Grâce à son faible potentiel d'oxydation, l'hydrogène reste le combustible présentant la plus forte attractivité y compris pour les PACEs. Les enzymes responsables de la catalyse réversible de la conversion des protons en dihydrogène sont les hydrogénases.



Équation I-5

Leur utilisation couplée à des biocathodes enzymatiques conduirait à des *f.e.m.* très proches de celles observées dans les PEMFC. Ces enzymes sont des métalloenzymes (à centre Fe-Fe, Ni-Fe ou Ni-Fe-Se). Le problème de ces enzymes réside dans leur inactivation plus ou moins importante en présence d'oxygène^{98, 99} (désactivation irréversible du site Fe-Fe en présence de O₂⁹⁹). Pour autant, une pile complète a été élaborée en utilisant une hydrogénase issue de la bactérie *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) couplée à la *BOx*. La pile ainsi obtenue affiche un potentiel à l'abandon de 1,17 V¹⁰⁰. Une solution serait d'utiliser une « souche » d'hydrogénase naturellement tolérante à l'oxygène comme celle issue de la bactérie *Aquifex Aeolicus*^{101, 102}.

D'autres carburants peuvent être oxydés comme des alcools (le méthanol, l'éthanol ou dérivé)¹⁰³, glycérol, malate¹⁰⁴, des oligosaccharides tels que le lactose, le cellobiose, le maltose, le tréhalose ou des monosaccharides (glucose¹⁰⁵, mannose, galactose, fructose¹⁰⁶, etc.). Quelques enzymes catalysant ces réactions d'oxydation sont l'alcool déshydrogénase (*ADH*), la *GOx*, la glucose déshydrogénase (*GDH*), la cellobiose déshydrogénase (*CDH*).

Une liste non exhaustive d'enzymes utilisables pour l'oxydation de divers substrats est donnée dans le **Tableau I-2**.

Tableau I-2 : Différents couples Combustible/Enzyme utilisés dans les bioanodes de PACEs

Combustible	Enzymes	Cofacteur	Demi-réaction	Référence
Hydrogène	<i>H₂ase</i> (E.C. 1.12.)	Fe / Fe Fe / Ni	$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$	98, 100
Glucose	<i>GOx</i> (E.C. 1.1.3.4)	FAD	<i>D-glucose</i> → <i>gluconolactone</i>	73
	<i>GDH</i> (E.C. 1.1.1.47)	NAD ⁺		137
	<i>GDH</i> (E.C. 1.1.5.2)	PQQ		143
	<i>CDH</i> (E.C. 1.1.99.18)	FAD / Hème		144
Alcool	<i>ADH</i> (E.C. 1.1.1.1)	NAD ⁺	<i>alcool</i> → <i>aldéhyde</i>	107, 108, 109
Aldéhyde	<i>AIDH</i> (E.C. 1.2.1.3)	NAD ⁺	<i>aldéhyde</i> → <i>acide</i>	107, 108, 109
Acide	<i>FDH</i> (E.C. 1.2.1.43)	NAD ⁺	<i>acide</i> → <i>CO₂</i>	107, 108, 109

Les biopiles à glucose qui représentent une part considérable des réalisations seront développées plus tard dans le paragraphe §I.3.e.

L'inconvénient des biopiles à caractère implantable est de s'assurer de la non-toxicité des produits formés lors des cycles catalytiques ce qui conduit à l'utilisation d'une seule enzyme pour l'oxydation du glucose. Inversement, dès lors que la pile doit alimenter en énergie un dispositif « *in vitro* », le problème précédent ne se pose plus. Il est alors possible de coupler différentes enzymes à l'anode pour l'oxydation plus profonde du substrat. Ce phénomène de cascade enzymatique est inspiré du vivant lors de la glycolyse pour l'oxydation complète du glucose en CO₂ par exemple. Plusieurs équipes ont mis au point des biopiles capables d'oxyder entièrement le substrat à l'anode. Comme le montre le **Schéma I-11**, en utilisant trois enzymes (l'alcool déshydrogénase (*ADH*), l'aldéhyde déshydrogénase (*AldDH*) et le formate déshydrogénase (*FDH*)), et en présence du cofacteur NAD⁺, le méthanol est oxydé successivement en formaldéhyde, en acide formique et en CO₂.

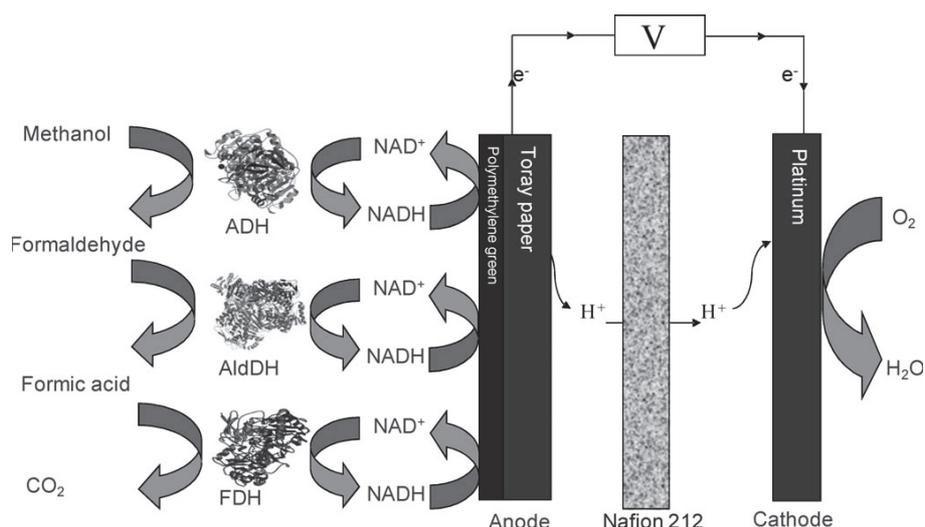


Schéma I-11 : Représentation schématique d'une biopile à méthanol/ O_2 à cascade enzymatique à l'anode. Reproduit de [107]

Avec les progrès d'immobilisation des protéines, Addo et al.¹⁰⁷ ont observé à leur tour une augmentation de la puissance de la biopile en passant d'un système mono à bi et à tri-enzymatiques (puissance de $136 \mu W.cm^{-2}$, $182 \mu W.cm^{-2}$ et $261 \mu W.cm^{-2}$ respectivement) sans utiliser la diaphorase (*DI*) nécessaire à la régénération de NAD^+ vue dans les travaux de Palmore¹⁰⁸. D'autres auteurs ont intégré le même système enzymatique dans un canal microfluidique pour deux configurations différentes¹⁰⁹. Suivant la distribution des trois oxydoréductases immobilisées dans le canal, la puissance électrique de la pile varie. Une distribution successive des enzymes conduit à des performances plus faibles du biogénérateur par rapport à une distribution aléatoire des protéines. En effet, dans le second cas, le substrat doit parcourir « moins de chemin » pour rencontrer l'enzyme suivante nécessaire pour sa nouvelle étape d'oxydation.

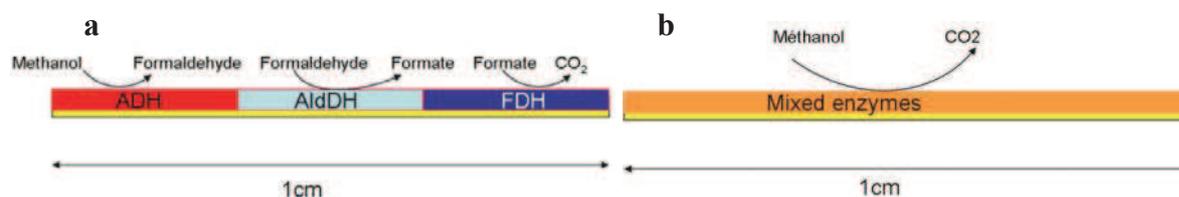


Schéma I-12 : Représentation schématique de la distribution de l'immobilisation des trois enzymes responsables de l'oxydation complète du méthanol. a- distribution successive, b- distribution aléatoire. Reproduit de [109]

L'équipe de Minter est également parvenue à concevoir des biopiles enzymatiques capables d'oxyder complètement le glycérol¹¹⁰, le pyruvate¹¹¹ avec une cascade enzymatique de 5 déshydrogénases et plus récemment le lactate¹¹² (avec une sixième oxydoréductase). Il est à noter que la cascade enzymatique fait aussi intervenir des enzymes ne participant pas

directement à la production électrique mais seulement à des réarrangements intramoléculaires du substrat telles que les transférases et lyases.

1.3.c.4 Les biopiles hybrides

Les biopiles hybrides consistent à associer une demi-pile à catalyseur métallique à une autre demi-pile possédant un catalyseur enzymatique. Cette configuration hybride permet d'accroître la durée de vie de la biopile en limitant le nombre de protéines impliquées dans les réactions. Comparées aux biopiles, un avantage évident de ces biopiles hybrides monoenzymatiques est la possibilité de travailler au pH optimum de l'unique enzyme impliquée.

Certains travaux portent sur la réalisation d'une anode composée de zinc (la réaction d'oxydation du Zn en Zn^{2+} remplaçant par exemple l'oxydation biologique du glucose). La force électromotrice théorique relative à l'oxydation du zinc et à la réduction de l'oxygène conduit à une valeur plus importante que celle rencontrée pour un système tout enzymatique basé sur le glucose et l'oxygène (1,65 V contre 1,22 V). Par exemple, une électrode en carbone déposé sur une matrice de céramique poreuse et modifié par la *BOx* a été associée à une électrode de zinc, conduisant à une biopile hybride de tension maximale de 1,095 V et de densité maximale de puissance de $41,3 \mu W \cdot cm^{-2}$ ¹¹³. Par contre, l'anode devra être remplacée ou rechargée. L'association d'une anode en zinc et d'une biocathode réduisant l'oxygène par la laccase permet également de s'affranchir des problèmes de connexion électrique de la glucose oxydase en présence d'oxygène et de désactivation de cette enzyme en présence de H_2O_2 enzymatiquement généré par la *GOx* non connectée.

Un autre groupe s'est orienté vers la réduction de H_2O_2 à la biocathode grâce à la catalyse enzymatique de peroxydase¹¹⁴. Deux configurations ont été élaborées. La première consiste à introduire le comburant directement en solution. Une couche immobilisée de *HRP* à la surface de l'électrode sert alors de transporteur électronique lors de la réduction. La seconde configuration, plus originale nécessite l'immobilisation d'une seconde couche enzymatique (de *GOx* ou de pyranose oxydase (*POx*)) et d'une solution de glucose pour la production *in situ* de H_2O_2 . Le produit de cette réaction diffuse alors vers la couche de *HRP* et est à son tour réduit (**Schéma I-13**).

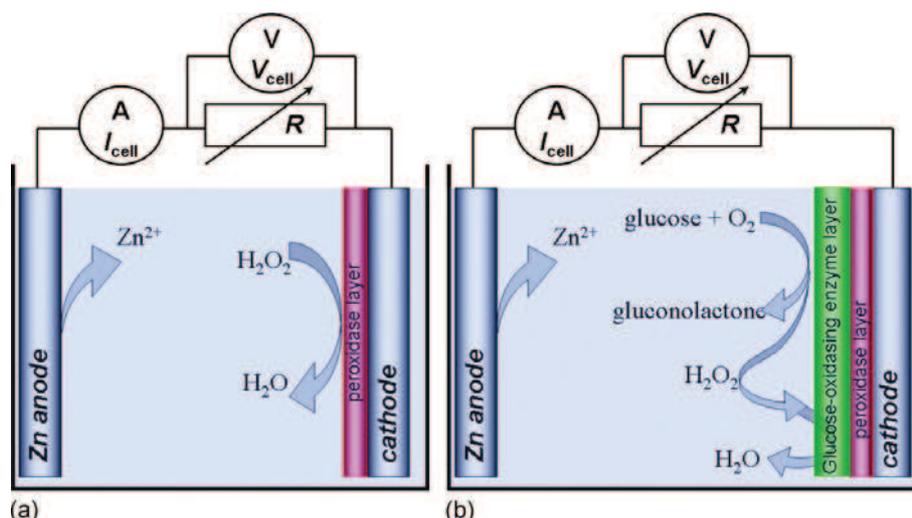


Schéma I-13: Schéma de piles hybrides utilisant l'oxydation du Zinc à l'anode couplée à la l'électroréduction enzymatique de H_2O_2 par la HRP à la cathode. a- alimenté en H_2O_2 (monoenzymatique), b- production in situ de H_2O_2 par la présence de GOx ou de POx et de glucose. Reproduit de [114]

A pH = 6,00, la pile affiche un potentiel à l'abandon de 1,68 V correspondant bien au potentiel de début d'oxydation de Zn ($E = -1,054 V$) et du potentiel thermodynamique de l'hème de la peroxydase ($E = 0,635 V$). La puissance maximale est atteinte à 0,3 V et correspond à une centaine de $\mu W.cm^{-2}$ dans les mêmes conditions de pH.

1.3.c.5 Les piles biomimétiques

Puisque la durée de vie des protéines semble limiter leur utilisation, une nouvelle génération de « bio »pile émerge. Les piles biomimétiques ou bioinspirées correspondent à l'oxydation catalytique du glucose couplée à la réduction de l'oxygène via des macrocycles de métaux de transition comme des phtalocyanines de fer ou des porphyrines de cobalt mimant la structure ou l'activité de sites prosthétiques d'enzyme. Les macrocycles sont de grandes molécules organiques formant un cycle qui sont composées par des unités comportant des hétérocycles (pyrrole, pyridine, etc.). En supprimant la présence des enzymes, l'élément fragile du système, les piles bio-inspirées offrent une forte longévité. Barrera et al.¹¹⁵ ont montré l'utilisation de différents macrocycles à base de cobalt pour l'oxydation catalytique direct du glucose en milieu alcalin.

1.3.d L'effet du pH dans les biopiles

Dans la littérature, il est possible de trouver des travaux de recherche s'intéressant à l'utilisation de gradient de proton pour la création d'une énergie mécanique (flux de convection), ou pour convertir ce gradient en une source d'énergie électrique.

Il s'avère que le pH d'un électrolyte, sans participer à la création d'énergie, peut affecter drastiquement les performances des piles. Les biopiles « classiques » énoncées plus

haut sont généralement extrêmement sensibles aux pH des électrolytes dans lesquels elles sont stockées et se doivent de fonctionner. En effet, l'activité electrocatalytique des protéines oxydoréductrices dépend non seulement de la concentration en substrat mais également du pH. En ce qui concerne les enzymes par exemple, la laccase est connue pour être acidophile (inhibée à pH neutre ou basique) alors que la *GOx* est inhibée à pH très acide (pH optimal de l'ordre de 6).

1.3.d.1 Les pompes à proton membranaires

Dans le vivant, certaines protéines membranaires comme la bactériorhodopsine (*BR*), la cytochrome c oxydase (*COx*) ou encore l'ATP synthase (*ATPase*) sont connues pour fonctionner comme des pompes à protons¹¹⁶. La *BR* possède un chromophore (le rétinale) qui, soumis à un stimulus lumineux, entretient ce mécanisme de pompe de la matrice de la cellule à l'extérieur de celle-ci. Les deux dernières protéines sont responsables du transfert transmembranaires des protons de l'intérieur de la matrice des mitochondries à l'espace intermembranaire (et inversement) pour assurer la production d'ATP nécessaire aux cellules eucaryotes. La *COx*, qui est une oxydoréductase, catalyse la transformation de son substrat par des réactions rédox couplées. L'enzyme reçoit un électron de quatre cytochromes c pour la réduction à 4 électrons de l'oxygène en eau, ce qui crée le gradient de pH de part et d'autre de la membrane. Une équipe de chercheurs a habilement et conjointement utilisé les propriétés de la bactériorhodopsine et de la cytochrome c oxydase pour la fabrication d'un système de production d'énergie basé sur l'apparition d'un gradient de pH. Ce groupe a intégré les deux protéines dans une membrane de vésicules polymères pour partiellement renverser l'activité du *COx* sous l'effet du gradient de pH de l'extérieur à l'intérieur des vésicules. L'excitation lumineuse provoque la translocation des protons H^+ par la *BR* et conduit le *COx* à jouer le rôle de donneur d'électrons aux cytochromes c ($Cytc^{3+}$) présents à l'extérieur des vésicules. Les $Cytc^{2+}$ ainsi formés sont alors oxydés à l'électrode (qui sera donc considérée comme une anode)¹¹⁷. Des cycles lumineux ont pu montrer l'apparition d'un courant électrique.

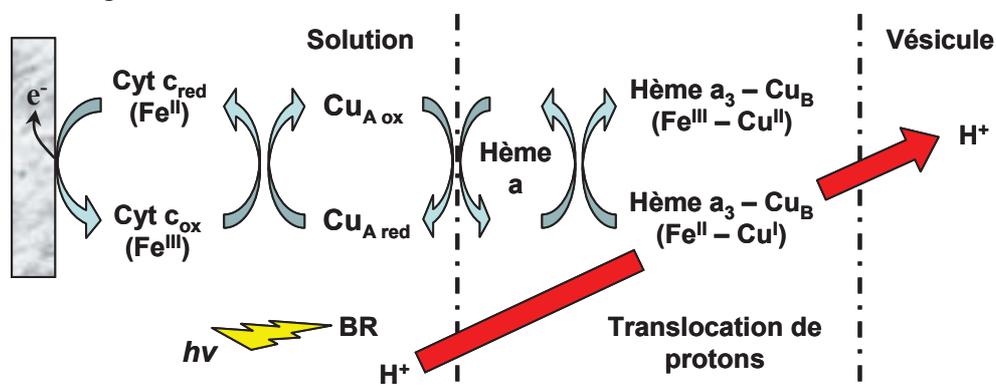


Schéma I-14: Schéma de l'activité renversée du *COx*

1.3.d.2 pH et activité microbienne/enzymatique

Dans le cadre de la production d'énergie, les exemples faisant intervenir un gradient de pH sont plus nombreux. Par exemple, une équipe est parvenue à créer une bioélectrode « renversible » pour une utilisation anodique et cathodique de cette dernière dans des *PACMs* photosensibles¹¹⁸. En effet, un désavantage connu de ces piles est la production de protons lors des processus anodiques et d'espèces basiques à la cathode. L'effet est une diminution du potentiel de la pile et par conséquent de la puissance. Après le développement des biofilms à la surface des électrodes, les auteurs alternent entre des périodes d'illumination et d'obscurité pour une des deux électrodes. En absence de lumière, les microorganismes présents dans le compartiment consomment l'oxygène lors de leurs respirations cellulaires. Le milieu s'appauvrit en oxygène, le courant débité par l'électrode est positif (comportement anodique) et le pH diminue. Puis, lors du processus de photo excitation, la présence d'algues inoculées préalablement dans le compartiment de l'électrode engendre une production *in situ* d'oxygène lors de la photosynthèse. Les microorganismes catalysent alors la réduction de O₂ ainsi formé (comportement cathodique) notamment grâce aux protons produits précédemment lors du fonctionnement anodique pour former de l'eau. En alternant des cycles anodiques et cathodiques, ils régulent le gradient de pH.

D'autre part, d'une façon très originale, en influant sur la concentration en proton, le groupe de Katz a récemment mis au point une biopile sensible aux variations de pH pour entraîner un mode « marche » et « arrêt » du biogénérateur¹¹⁹. Un médiateur à base d'osmium pour la catalyse de la réduction de O₂, immobilisé sur une surface d'ITO, présente des caractéristiques différentes selon le pH du compartiment cathodique. Ainsi à pH ≤ 4,5 le complexe est électroactif et peut donc transférer l'électron de l'électrode à l'enzyme tandis qu'à pH ≥ 5,5, ce même complexe devient totalement électroinactif bloquant alors le processus catalytique de la laccase. Ces chercheurs ont subtilement utilisé des combinaisons de substrat et d'enzyme pour faire varier à l'intérieur même du compartiment cathodique le pH grâce aux produits des réactions enzymatiques. Lors de l'activation de la biopile, quatre enzymes avec leurs quatre substrats spécifiques sont ajoutés dans le compartiment favorisant la production de proton et ainsi la diminution du pH (pH = 4,1 – 4,5). A ce pH, les chaînes du polymère constituées de pyridine sont protonées. Elles deviennent hydrophiles et entraînent le gonflement du polymère permettant ainsi la diffusion de l'oxygène jusqu'aux centres rédox. La désactivation de la pile s'effectue par une injection d'urée qui en présence d'uréase (*Ur*) produit une augmentation du pH (apparition d'ammoniac ; pH = 6). La déprotonation des unités pyridines rend le polymère hydrophobe et ce dernier « se rétracte » sur la surface de l'électrode bloquant alors le transfert électronique.

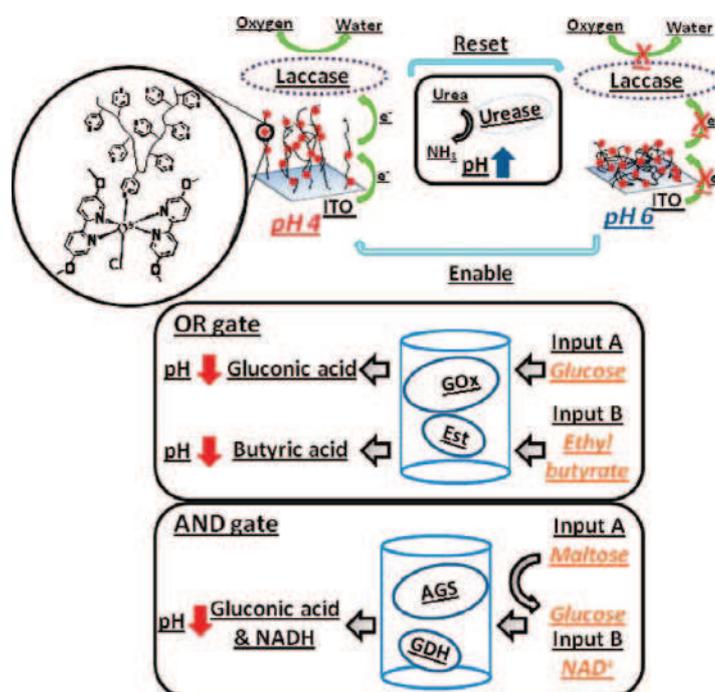


Figure I-11: Représentation de la bioélectrode dont la catalyse est contrôlée par le pH. Reproduit de [119]

1.3.d.3 Le gradient de pH comme source de convection

Pour induire une énergie mécanique, une micropompe catalytique a été réalisée en associant une électrode d'argent en contact avec une électrode d'or¹²⁰. En présence de peroxyde d'hydrogène, l'argent est le siège de la réduction de H₂O₂ en eau, tout en consommant des protons H⁺. Inversement, la surface d'or jouant le rôle d'anode, le peroxyde d'hydrogène s'oxyde en dioxygène en libérant deux protons. L'appauvrissement de la concentration en H⁺ à la cathode en parallèle à une augmentation de celle-ci le long de l'anode crée un gradient de protons induisant le phénomène de convection. Il est à noter que cette convection n'est pas réalisée avec des biomolécules.

1.3.e Les biopiles enzymatiques à glucose/O₂

1.3.e.1 Principe et définition

Dans le paragraphe §1.3.c.3, il a déjà été fait état des utilisations envisageables des biopiles enzymatiques dans des domaines commerciaux ou médicaux. Néanmoins, dans les exemples de biopiles données, la nature du combustible impliquait d'avantage une utilisation *ex vivo* du générateur à cause de leur non biocompatibilité.

L'atout des piles enzymatiques à glucose tient donc à la fois de sa propriété de carburant renouvelable, mais également de sa biodisponibilité et biocompatibilité avec les systèmes vivants. La voie de développement de ce type de pile prend alors un sens particulièrement attractif pour l'alimentation d'appareils médicaux implantés. La pile peut

drainer l'énergie chimique disponible dans le corps de l'hôte sous la forme de glucose (présent dans le sang ou dans le liquide extracellulaire) à une concentration normalement fixe et régulée par le pancréas, le foie et les reins. Cette constance permettrait d'envisager une consommation continue ou ponctuelle du glucose pour la libération des électrons nécessaires au fonctionnement de la pile lors de son oxydation. Parmi les applications possibles et ayant potentiellement un fort impact sur l'autonomie des malades, la régulation de la glycémie chez les patients atteints du diabète apparaît comme la plus prometteuse. L'idée est d'utiliser une pile à glucose pour le fonctionnement couplé d'un capteur à glucose et d'une pompe à insuline implantables. A l'heure actuelle, les pompes injectent l'insuline à intervalles de temps définis que le patient soit en hyperglycémie ou non. Dans le cas de l'appareillage proposé, l'injection d'insuline ne serait effective que si le capteur révèle une concentration en glucose trop élevée.

Une autre application est l'utilisation de la biopile comme source d'énergie pour un sphincter urinaire artificiel proposé aux patients souffrant d'incontinence. Les systèmes proposés à l'heure actuelle sont activés par une pression mécanique. La biopile remplacerait ce dispositif en améliorant considérablement l'efficacité et le confort des patients.

Le **Tableau I-3** regroupe les puissances requises pour alimenter des dispositifs médicaux allant de 10 μ W pour les électrodes de neuromodulation à 1 W pour l'alimentation d'un rein artificiel par exemple.

Tableau I-3 : Présentation des types de dispositifs implantables et des puissances requises pour leur fonctionnement

Puissance Requise	Application envisagée
10 μ W – 100 nW	Électrodes de neuromodulation
100 nW – 10 μ W	Appareils de mesures implantables
10 μ W – 1000 μ W	Délivrance de médicaments
1 mW – 10 mW	Micro-actionneurs (<i>sphincter urinaire artificiel robotisé</i>) Mesure et délivrance de médicaments (<i>pompe à insuline</i>)
10 mW – 1 W	Suppléances de fonctions vitales défaillantes <ul style="list-style-type: none"> - <i>Rein artificiel implantable</i> - <i>Myopathies</i> - <i>Assistance vasculaire</i>

Comme les expérimentations *in vivo* sont particulièrement difficiles à mettre en œuvre lors des premiers développements des piles, la littérature regorge d'exemples de piles à glucose dites implantables, mais caractérisées et utilisées sur la paillasse dans les conditions proches des conditions physiologiques. Ceux-ci montrent que les piles à glucose peuvent

délivrer des puissances non négligeables et qu'elles sont susceptibles de fournir assez de puissance pour le fonctionnement de petits dispositifs portables.

En 2007, la compagnie SONY a proposé un montage de quatre biopiles à glucose/oxygène associées en série fonctionnant dans une solution concentrée de glucose ($0,4 \text{ mol.L}^{-1}$) capable d'alimenter un lecteur MP3 et plus récemment une voiture radiocommandée¹²¹.

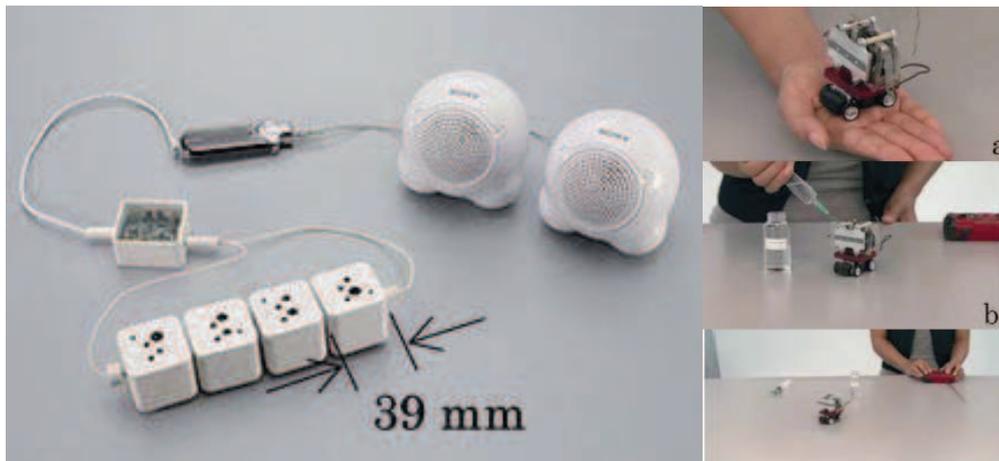


Figure I-12: Biopiles à glucose/oxygène développées par SONY en 2007 pour alimenter un lecteur MP3 et en 2009 pour alimenter une voiture radiocommandée [121]

Dans les deux cas, les électrodes en fibre de carbone sont assemblées avec les mêmes espèces chimiques. La cathode est faite d'un mélange de BOx et de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ de telle sorte à avoir un apport en oxygène efficace. L'anode quant à elle est basée sur l'oxydation du glucose à travers deux cycles enzymatiques (la *GDH* et la *DI*), le médiateur anodique « final » étant la vitamine K_3 (ménadione, 2-méthyl-1,4-naphthalène-1,4-dione). Une pile, seule, affiche une *d.d.p.* de 0,8 V avec une densité de puissance de $1,45 \pm 0,24 \text{ mW.cm}^{-2}$ à 0,3 V.

1.3.e.2 Les systèmes enzymatiques

La pile est constituée de deux électrodes. L'anode transporte le flux d'électrons issus de l'oxydation du glucose par une première oxydoréductase. Ces électrons se retrouvent à la fin du circuit électrique au niveau de la cathode et sont captés par une seconde protéine rédox qui assure la réduction du dioxygène en eau. Ce flux d'électrons, de l'électrode négative à la positive, induit par la même occasion la circulation d'un courant électrique dans le circuit extérieur (**Schéma I-15**). Suivant les matériaux d'électrodes utilisés, la connexion électrique directe entre l'enzyme et l'électrode n'est pas possible. Une nouvelle espèce, appelée médiateur rédox, est alors introduite au niveau de l'électrode pour faciliter ce transfert.

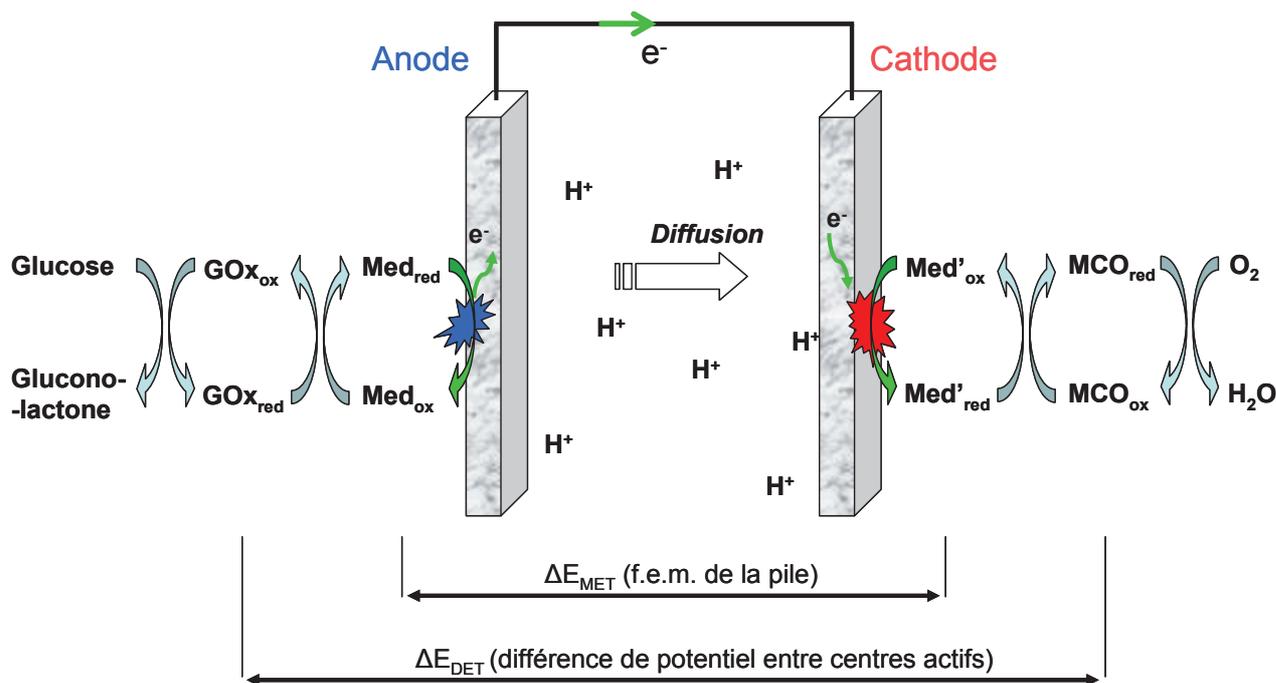


Schéma I-15 : Principe d'une biopile enzymatique à glucose/oxygène utilisant la GOx et une enzyme à base de cuivre (MCO pour Multi Copper Oxidase) comme biocatalyseurs à l'anode et à la cathode respectivement

Puisque dans ce type de pile le comburant est identique aux autres biopiles à combustibles enzymatiques (O_2), les protéines rédox utilisables sont a fortiori identiques. Ainsi, la réduction de l'oxygène s'effectue à l'aide de laccases et de bilirubine oxydase. Néanmoins, le choix du biocatalyseur est ici à relier directement avec l'utilisation désirée de la pile. Comme énoncé dans le paragraphe §I.3.d.2, le pH des électrolytes ayant un impact direct sur l'activité enzymatique, la protéine se doit de conserver celle-ci dans le milieu électrolytique de fonctionnement de la pile.

La Laccase (*Lc*, E.C. 1.10.3.2)

La laccase fongique¹²² (*Lc*) catalyse l'oxydation d'un grand nombre de composés aromatiques avec la réduction concomitante à 4 électrons de l'oxygène en eau. Faisant partie de la famille des MCO (multi copper oxidase), cette enzyme possède quatre atomes de cuivre au degré d'oxydation +II que l'on trouve dans trois sites de la protéine dénommés sites T1, T2 et T3 (**Figure I-13**). Le médiateur le plus répandu est le 2,2-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulphonique) (ABTS). Sous sa forme $ABTS^{\bullet-}/ABTS^{2-}$ ($E^{\circ} \sim +0,430V$ vs. ECS)¹²³, ce médiateur a un potentiel très élevé mais inférieur à celui de l'enzyme ce qui lui confère sa réactivité avec l'atome de cuivre du site T1 de la protéine ($E^{\circ} \sim 0,540 V$ vs. ECS)¹²⁴ Ce site T1 est responsable du transfert électronique à longue distance entre la surface d'électrode et le centre tri nucléaire T2-T3^{95, 125} assurant la réduction de l'oxygène moléculaire. D'autres équipes ont choisi de travailler sur le

développement de polymère ou hydrogel rédox à centre d'osmium en ajustant les ligands pour moduler le potentiel d'oxydoréduction des centres métalliques^{126, 127}.

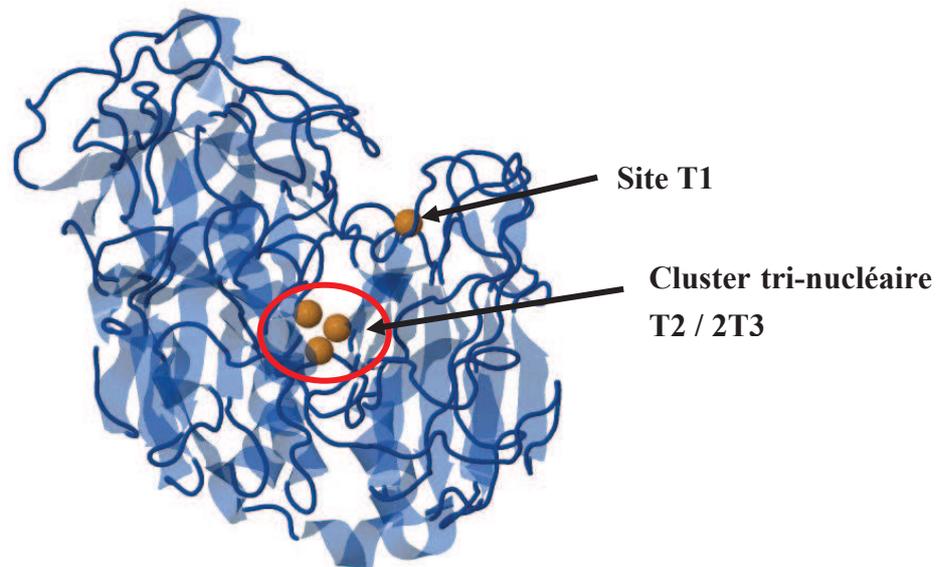


Figure I-13: Structure tridimensionnelle de la Laccase issue du champignon *Trametes Versicolor* composée d'une structure protéique et de ses quatre atomes de cuivre. Le site périphérique T1 isolé (responsable de la réactivité avec l'électrode ou le médiateur) et le cluster tri-nucléaire (responsable de la réduction de l'oxygène) sont représentés par les boules marron. Reproduit de [128]

Cependant, la *Lc* est une protéine acidophile. Son utilisation est donc peu recommandée pour une cathode fonctionnant à pH proche du pH physiologique (pH ~ 7,4). Son inhibition avérée par les ions chlorures la rend aussi peu attractive dans le cadre de biopiles implantables où la concentration en Cl^- atteint $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$.

La Bilirubine Oxydase (E.C. 1.3.3.5)

L'autre enzyme fréquemment utilisée à la cathode de *PACE* est la *BOx*. Elle fait également partie de la famille de *MCO* et possède donc les mêmes centres actifs que la laccase (un site T1, un site T2 et deux T3). En revanche, d'après la littérature, les centres rédox semblent plus bas en potentiel dans le cas de la *BOx* que pour la *Lc*. Pour autant, sa structure similaire rend la médiation électronique de l'électrode au site T1 possible avec le médiateur ABTS¹²⁹ ou avec des complexes d'osmium¹³⁰. Il a été montré que cette protéine est plus tolérante aux ions chlorures que la *Lc* et son pH d'activité maximal est proche de 7, ce qui lui confère un avantage certain dans les applications médicales des biopiles. Toutefois, elle est désactivée par les ions urate¹³¹ (concentration sanguine de $0,42 \text{ mmol.L}^{-1}$).

Côté anodique, comme le combustible est ici le glucose, le nombre de biocatalyseurs est restreint. Les enzymes utilisées dans les bioanodes à glucose sont la glucose oxydase^{130, 132, 133} (**Figure I-14**), la glucose déshydrogénase (*GDH*)¹³⁴⁻¹³⁷, la cellobiose déshydrogénase

(*CDH*)¹³⁸ ou encore la pyranose déshydrogénase (*PDH*)^{139, 140}. Ces enzymes sont présentées, avec une attention sur la *GOx* qui sera l'objet de développement des biopiles enzymatiques dans le **chapitre III**. Il est à noter que les trois premières enzymes mentionnées ont la même réactivité sur le glucose en oxydant la fonction alcool située sur le carbon C₁ de la molécule. La *DPH*, elle, peut entraîner l'oxydation sur les carbones C₁, C₂, et C₃ à hauteur maximale de 4 protons/électrons par molécule de glucose.

La Glucose Oxydase (E.C. 1.1.3.4)

Cette enzyme homodimérique est sans conteste la plus rapportée dans la conception de biopile à glucose/oxygène, notamment avec l'engouement observé pour le développement des biocapteurs métaboliques à glucose. Chacune de ses sous-unités comporte un cofacteur rédox responsable de son activité enzymatique vis-à-vis du D-glucose : la Flavine Adénine Dinucléotide (*FAD*).

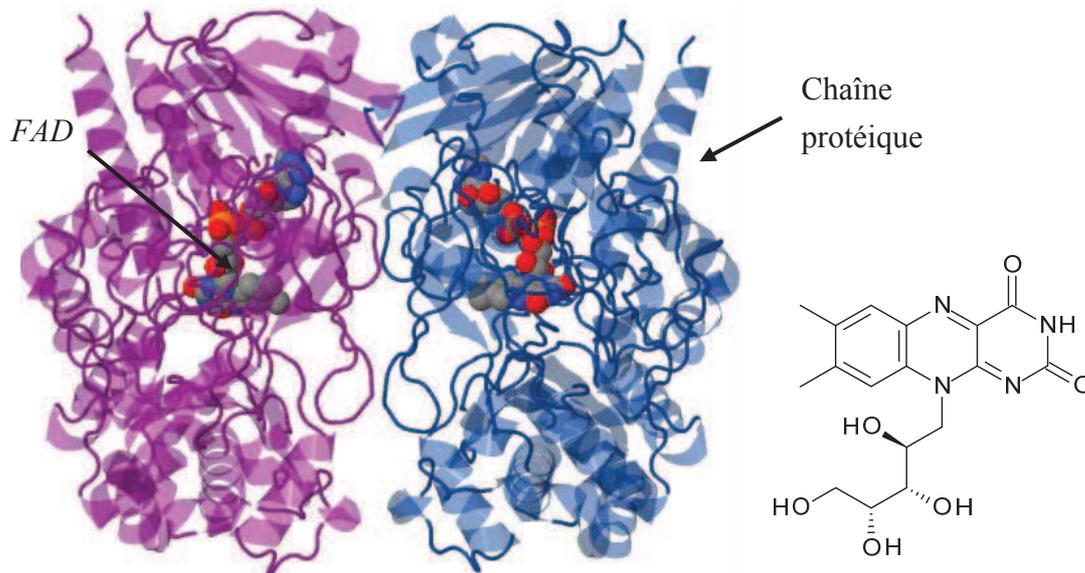
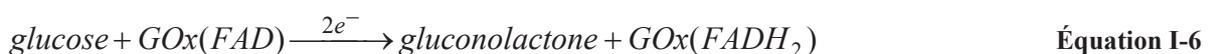


Figure I-14 : Structure tridimensionnelle de la glucose oxydase homodimérique (formée de deux sous unités identiques) composée d'une structure protéique et d'un centre rédox actif (*FAD*) par sous-unité. Structure de la riboflavine participant à l'électroactivité de la protéine. Reproduit de [141]

La *GOx* présente une très forte sélectivité vis-à-vis du glucose. En effet, elle n'oxyde que préférentiellement le β -D-glucose et ne réagit pas sur la forme α -D-glucose, ni sur les autres oses existants.



De plus, celle-ci présente une activité et une stabilité remarquables dans les conditions de température et de pH physiologique (37°C, ~ 7,4). Ces deux caractéristiques font de cette protéine une candidate privilégiée pour le développement de biopiles à glucose implantable.

Toutefois, le dioxygène est un accepteur naturel des centres rédox de l'enzyme (lorsqu'ils sont sous la forme réduite $FADH_2$). Cette réactivité entraîne alors un phénomène de court circuit à l'anode. Une partie des électrons arrachés aux molécules de glucose ne sera pas transférée à l'anode pour la génération du courant et du peroxyde d'hydrogène est produit au cours de cette réaction.



Le centre rédox FAD de la GOx se situe profondément enfoui dans la cage protéinique de l'enzyme¹⁴². Bien que cette localisation confère une bonne stabilité à l'enzyme, elle rend difficile l'exploitation du transfert électronique direct de la FAD à l'électrode.

La Glucose Déshydrogénase (GDH)

Tout comme la GOx , les GDH transforment le glucose en gluconolactone en association avec la réduction d'un cofacteur. En revanche, elles sont inertes face à l'oxygène ce qui les rendent très attractives pour une application biopile.

La nicotinamide adénine dinucléotide- GDH ($NAD-GDH$, *E.C. 1.1.1.47*) catalyse l'oxydation du glucose, grâce au cofacteur NAD^+ (**Schéma I-16-a**). Ce cofacteur, contrairement à la FAD est localisé proche de la surface de la protéine, et n'est que faiblement lié à la structure de celle-ci et peut alors diffuser hors de la structure protéique provoquant une désactivation de l'enzyme (forme apo). Enfin, comme la forme réduite du NAD^+ est difficilement oxydable sur les électrodes, une nouvelle enzyme (communément la diaphorase) est ajoutée au système pour catalyser cette oxydation.

La pyrroloquinoline quinone GDH ($PQQ-GDH$, *E.C. 1.1.5.2*) est une classe de GDH dont le cofacteur est la PQQ représentée dans le **Schéma I-16-b**. La position dans le centre actif de ce dernier favorise considérablement le transfert électronique d'échange avec le glucose¹⁴³.

Ces deux enzymes ont la particularité d'être moins sélectives vis-à-vis du glucose. La $PQQ-GDH$ permet l'oxydation de différents oses comme le galactose, le maltose, le xylose... quant à la $NAD-GDH$, elle est susceptible de réagir dans une moindre mesure avec les deux derniers oses cités. Ces enzymes seront donc préférées à la GOx si le milieu réactionnel met en présence plusieurs substrats.

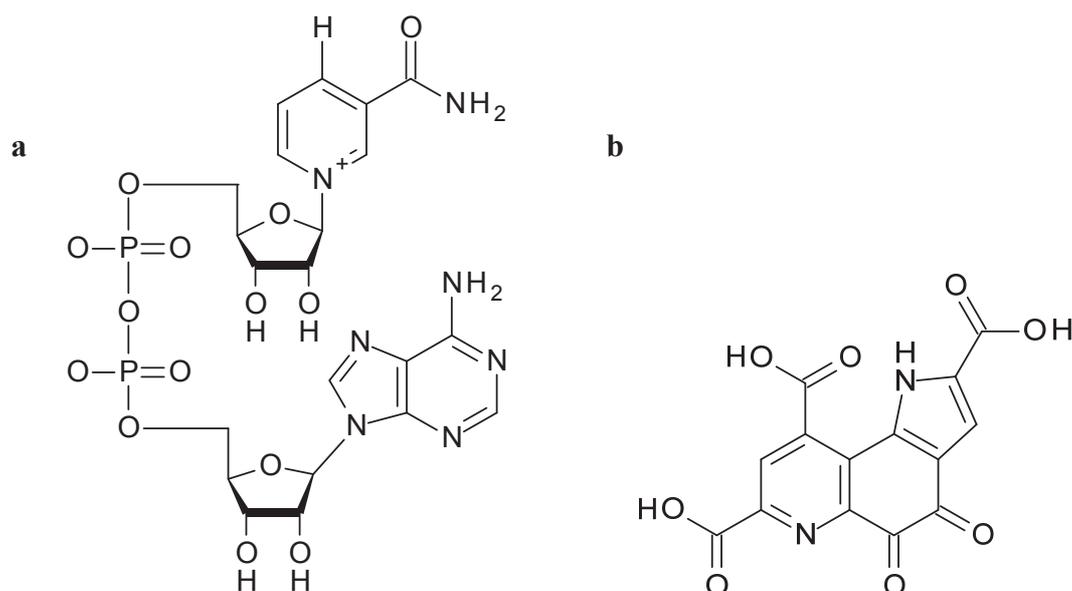


Schéma I-16: Structure de deux cofacteurs trouvés dans les GDH, a- la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) et b- la pyrroquinoline quinone (PQQ)

La Cellobiose Déshydrogénase (CDH, E.C. 1.1.99.18)

Cette oxydoréductase est un monomère composé de deux domaines distincts, le domaine «déshydrogénase» comprenant le cofacteur rédox *FAD* et un domaine contenant un hème (type cytochrome). Elle est capable d'oxyder une large gamme de substrats : cellobiose, cellodextrine, lactose, mais aussi les monosaccharides comme le glucose. Les saccharides sont oxydés au niveau du centre *FAD* qui peut être réoxydé en présence d'un accepteur d'électron ou en transférant les électrons à l'hème (pouvant se réoxyder directement à la surface de l'électrode)¹⁴⁴.

Un récapitulatif des différentes enzymes utilisées dans les biopiles et catalysant l'oxydation du D-glucose est donné dans le tableau suivant :

Tableau I-4: Enzymes d'intérêt pour l'oxydation du glucose dans une bioanode enzymatique

Enzyme	Cofacteur	Carbone affecté	Demi-réaction	Accepteur naturel	Référence
<i>GOx</i>	<i>FAD</i>	C ₁	$glucose \rightarrow glucono-1,5-lactone + 2H^+ + 2e^-$	O ₂	130, 132, 133
<i>PQQ-GDH</i>	<i>PQQ</i>	C ₁		Quinone	143
<i>NAD-GDH</i>	<i>NAD</i>	C ₁		<i>NAD</i>	137
<i>CDH</i>	<i>FAD</i> / Hème	C ₁		Accepteur d'électrons	144

1.3.e.3 Transfert électronique : médié contre direct

Le mode de transfert électronique entre les centres rédox actifs des enzymes et l'électrode est étroitement lié à la structure tridimensionnelle de la protéine, mais aussi au matériau d'électrode utilisé dans la conception des biopiles enzymatiques. Les enzymes sont des protéines de taille relativement importante et le centre actif (accepteur ou donneur d'électrons) est souvent enfoui profondément dans la structure protéique.

- ❖ Dans le cas de la glucose oxydase, les centres *FAD* se trouvent à quelques 15 Å de la surface de la protéine. Dans de telles conditions, le transfert électronique des centres rédox jusqu'à l'électrode est particulièrement difficile.
- ❖ Dans le cas des *MCO*, le site T1, situé proche de la surface de la protéine, capte les électrons au niveau de l'électrode pour le transférer aux sites T2 et T3 responsables de la réduction de O₂. Une mauvaise orientation des enzymes peut conduire à la présence du site T1 aux antipodes de la surface conductrice.

Des travaux sont actuellement en cours dans plusieurs groupes pour améliorer l'orientation des protéines immobilisées à la surface des électrodes et favoriser le transfert direct (immobilisation par couplage entre une amine primaire et un sucre oxydé de la structure de l'enzyme¹⁴⁵) ou immobilisation affine thiol-NTA-Cu-His-Lc¹⁴⁶. Cette recherche de l'orientation spécifique ne se focalise pas uniquement sur les *MCO*. Les *H₂ase* bénéficient aussi de cette attention particulière^{147, 148}.

Pour ces raisons, des médiateurs rédox sont souvent ajoutés aux différents systèmes pour favoriser les échanges électroniques et accomplir les cycles catalytiques complets des oxydoréductases. La détermination et le choix de ces médiateurs sont capitaux pour les performances de la pile. Typiquement, pour qu'une espèce rédox soit considérée comme un médiateur potentiel d'une enzyme, son potentiel standard doit être supérieur à celui de la protéine dans le cas de médiateur anodique, et inversement dans le cas des médiateurs cathodiques (**Schéma I-17**).

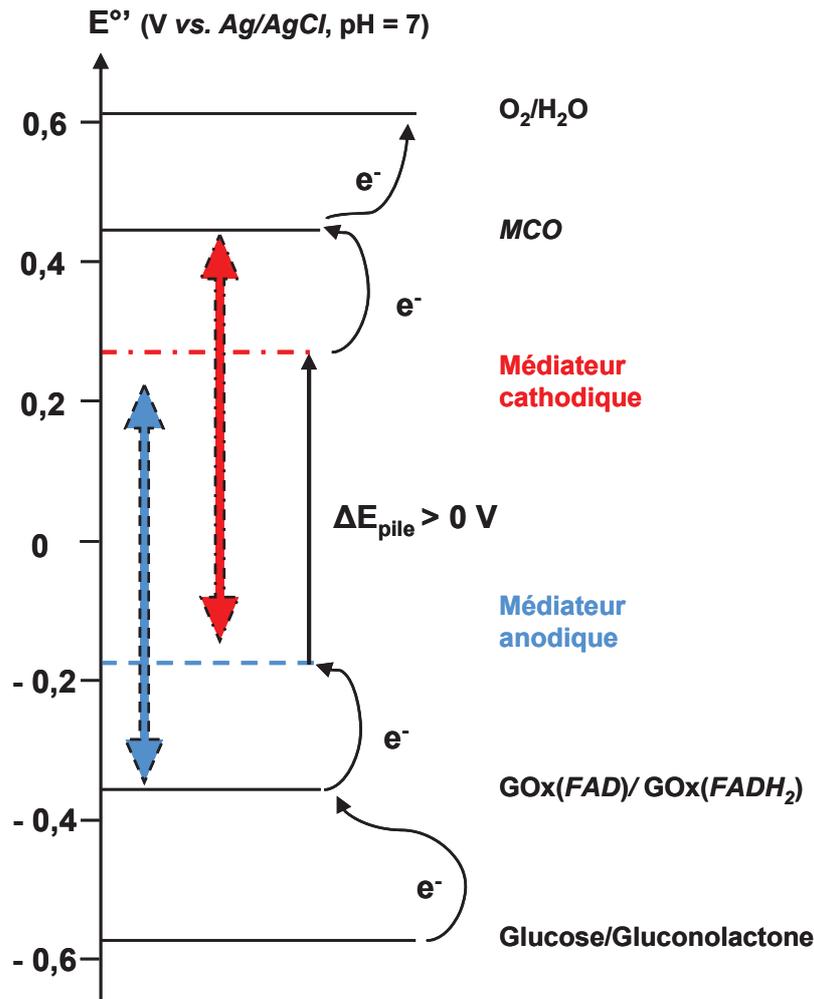


Schéma I-17: Échelles des potentiels standards des différents couples rédox mis en contribution dans une pile à glucose/oxygène. Le potentiel représentant le potentiel de la MCO peut varier suivant le type d'enzyme utilisée ou suivant l'organisme d'où celle-ci est extraite. Les flèches indiquent les gammes de potentiel adéquates pour le choix des médiateurs anodiques et cathodiques (flèches bleue et rouge, respectivement)

Les médiateurs choisis doivent être stables chimiquement, c'est-à-dire qu'ils ne doivent pas se dégrader dans le temps, ni sous l'effet des cycles de transfert d'électrons (repos/décharge). Ils doivent être non toxiques et biocompatibles (pour des applications *in vivo*)¹⁴⁹. Les différences de potentiel entre les protéines redox et les médiateurs doivent être faibles pour conserver une *f.e.m.* la plus importante possible.

Ces relais électroniques peuvent être libres en solution comme dans une grande partie des biopiles associant la microfluidique ou immobilisés à la surface de l'électrode dans des matrices de chitosan ou de polymère pyrrolique par encapsulation^{150, 151}.

Une autre approche pour l'immobilisation d'espèce rédox est de les lier directement au squelette du monomère. Il s'agit à la base d'une technique initiée par le groupe de Heller pour le développement des biocapteurs ampérométriques¹⁵², les exemples les plus fréquents mettent en jeu des complexes à bases d'osmium fixés sur des monomères de type

poly(vinyle-pyridine) (PVP)^{153, 154}, poly(*N*-vinyleimidazole) (PVI)^{126, 155}, copolymère poly(vinylimidazole)/poly(acrylamide) (PVI/PA)¹⁵⁶ par des espaceurs.

A noter qu'ici, les médiateurs rédox font intervenir le même métal que ce soit à l'anode ou à la cathode. Les équipes travaillant sur ce type de médiateur modifient la nature des ligands pour déplacer les potentiels d'oxydation ou de réduction du complexe métallique.

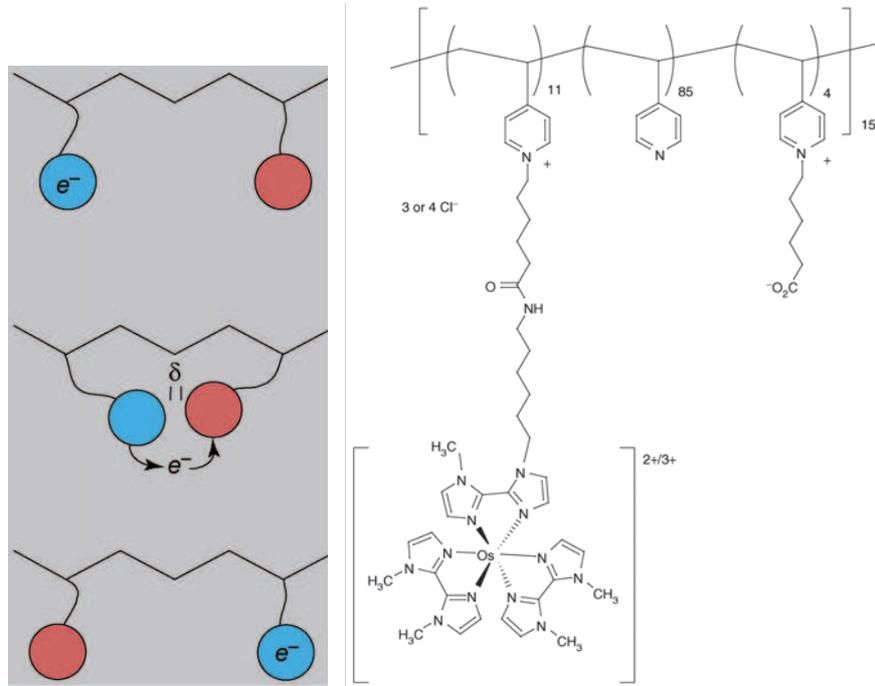


Figure I-15 : a- Représentation d'un hydrogel rédox et de la propagation de la charge négative (saut d'électron) par sauts successifs d'un centre rédox sur le centre voisin. b- Structure d'un hydrogel rédox à base de PVP. Le centre rédox à base d'osmium se situe à l'extrémité d'un espaceur. Reproduits de [154]

Avec une approche similaire, d'autres groupes sont parvenus à immobiliser les médiateurs sur des électrodes préalablement modifiées par un film de polymère avec l'immobilisation de la Vitamine K₃ sur une film de polyallylamine grâce à la réactivité du groupement NHS avec les amines¹⁵⁷ ou le ferrocène avec un copolymère de poly(vinylferrocène)/poly(acrilamide)¹⁵⁸.

Enfin, d'autres groupes fonctionnalisent les électrodes à l'aide de surfaces prétraitées par l'électroréduction d'un sel de diazonium comportant une fonction carboxylique en position para suivie d'une réaction de couplage par carbodiimide entre l'acide et une amine présente sur un ligand du complexe¹⁵⁹.

L'inconvénient d'introduire de nouvelles espèces rédox pour faciliter les transferts électroniques entre enzymes et électrodes est d'abaisser la force électromotrice de la pile (et les performances). Il faut donc évaluer les gains ou les pertes entre *f.e.m.* de la pile et courant (densité de courant) dans le but de trouver un compromis idéal donnant un système avec des performances optimales. De plus, des risques de relargage (désorption) peuvent être attendus.

Une solution est le développement de matériaux ou de techniques d'immobilisation permettant le transfert électronique direct (*DET*) des protéines rédox au collecteur ou inversement. Les travaux récents sur les nanostructures tels que les nanotubes de carbone (mono paroi, ou multi-feuillets), les nanographènes, les nanoparticules d'or, etc... semblent conduire pour de nombreux cas à l'observation du phénomène de *DET* entre l'enzyme et l'électrode. Plusieurs groupes ont alors rapporté des phénomènes de *DET* et d'effet catalytique dans le cas des *MCO* pour les utilisations cathodiques. Pour citer des exemples récents, Gupta et al.¹⁶⁰ ou Rubenwolf et al.¹⁶¹ (travaux sur matériaux carbonés) discutent de l'observation de ce phénomène pour la bilirubine oxydase et de la laccase respectivement sur différents matériaux nanostructurés de carbone et Shleev et al. sur ce même phénomène pour les enzymes à base de cuivre en général¹⁶².

Les enzymes nécessaires à l'oxydation du glucose telles que la *GDH*¹⁶³, la *CDH*¹⁶⁴ ont également été identifiées comme pouvant fournir directement les électrons de leur centre rédox à l'anode toujours grâce à la position du centre rédox dans le cas de la *GDH* (à la périphérie de la protéine) ou de la présence de l'hème pour la *CDH*. La structure tridimensionnelle de la *GOx* et la présence d'une carapace de carbohydrate conduit le centre *FAD* à être isolé au centre de la protéine et empêcher/limiter le phénomène de *DET*. Malgré la division de la communauté scientifique sur ce sujet, il semble que ce transfert soit effectivement possible comme le montrent certains auteurs¹⁶⁵⁻¹⁶⁸.

1.3.e.4 Les piles à glucose/O₂ : vers l'implantation

Depuis la pile développée par SONY alimentant un lecteur MP3 grâce à une solution riche en glucose (0,4 mol.L⁻¹), les progrès réalisés par l'ensemble des équipes travaillant dans ce domaine est considérable. Un groupe a montré la possibilité d'utiliser de telles biopiles en substituant l'électrolyte classique par du simple jus de fruit (raisin, orange) et a constaté une augmentation des performances de leurs piles, dues à une plus forte concentration en glucose dans ces nouveaux milieux^{169, 170}. Les biopiles enzymatiques répondent donc bien à la question de la production d'énergie autonome et portable.

Les assemblages présentés dans la littérature se distinguent désormais par des puissances surfaciques relativement élevées et cela même dans le cas de concentrations faibles en combustible. La majorité des nouvelles piles à glucose se basent sur une utilisation avec une concentration en glucose identique à la concentration physiologique moyenne de 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹.

Tableau I-5: Exemples récents de biopiles enzymatiques à glucose/oxygène

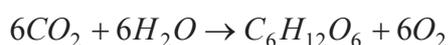
Enzymes Anode/Cathode	Médiateurs Anode/Cathode	f.e.m. / V	Densité puissance maximale	Concentration en combustible	pH	Référence
GOx/Lc	-	0,93	1,0 mW.cm ⁻² à ~ 0,6 V	5 mmol.L ⁻¹	7,0	167
GOx/Lc	FHFP-PQQ/Ru-SDP	~ 0,5 V	310 μW.cm ⁻² à 0,28 V	10 mmol.L ⁻¹	7,4	171
GOx/Lc	TMPD/Os	0,55 V	52 μW.cm ⁻² à 0,21 V	0,1 mol.L ⁻¹	7,4	172
GOx/BOx	Complexe d'Os	~ 0,8 V	740 μW.cm ⁻² à 0,57 V	15 mmol.L ⁻¹	7,2	173
GOx/BOx	Complexe d'Os	0,6 V	9 μW.cm ⁻² à ~ 0,4 V	ND	4,5	174
GDH-DI/BOx	NAD ⁺ -VK ₃ /Fe(CN) ₆ ³⁻	0,8 V	1,45 mW.cm ⁻² à 0,3 V	0,4 mol.L ⁻¹	7,0	121
CDH/Lc	Complexe d'Os	0,73	5 μW.cm ⁻² à 0,5 V	5 mmol.L ⁻¹	4,5	136
CDH/BOx	-	0,62	3 μW.cm ⁻² à 0,37 V	5 mmol.L ⁻¹	7,2	144

*FHFP : ferrocénium hexafluorophosphate, Ru-SDP : Ru-4-(4-hydroxyphényl)sulfonylphénol, TMPD : tétraméthyl-paraphénylènediamine

Le **Tableau I-5** donne des exemples récents de biopiles avec des médiateurs différents. Il est à noter que les puissances les plus importantes sont obtenues avec des complexes d'osmium mais que la concentration en glucose est supérieure à celle de la concentration physiologique.

Les exemples mettant en jeu des biopiles complètes implantées ne sont, en revanche, pas encore légion dans ce domaine. Deux piles ont déjà été implantées dans des végétaux (**Figure I-16**). La première du genre a été implantée dans un grain de raisin¹⁷⁵. Elle est constituée de deux électrodes en fibre de carbone de 7 μm de diamètre et de 2 cm de long. Sur chacune d'elle est immobilisée une enzyme (GOx ou BOx) avec le médiateur correspondant à base d'osmium à l'aide d'hydrogel. Cette pile présente une différence de potentiel de 0,8 V et délivre une puissance de 240 μW.cm⁻² proche de 0,55 V.

Plus récemment, Flexer et al.¹⁷⁴ ont rapporté une biopile enzymatique implantée dans un cactus et basé sur les mêmes systèmes enzymes/médiateurs. Les auteurs ont pu observer la formation de glucose et d'eau lors du processus de photosynthèse induit par des impulsions lumineuses dirigées sur le cactus. En effet, le principe de la photosynthèse est la synthèse de glucose grâce au dioxyde de carbone et à l'eau sous l'effet de la lumière solaire. Le bilan de cette réaction est :



Les courants anodiques pour l'oxydation du glucose et cathodiques pour la réduction de O_2 sont donc différents suivant que le cactus est illuminé par la lampe ou non. L'illumination conduit effectivement à des courants plus intenses (concentrations en combustible/comburant plus élevées).

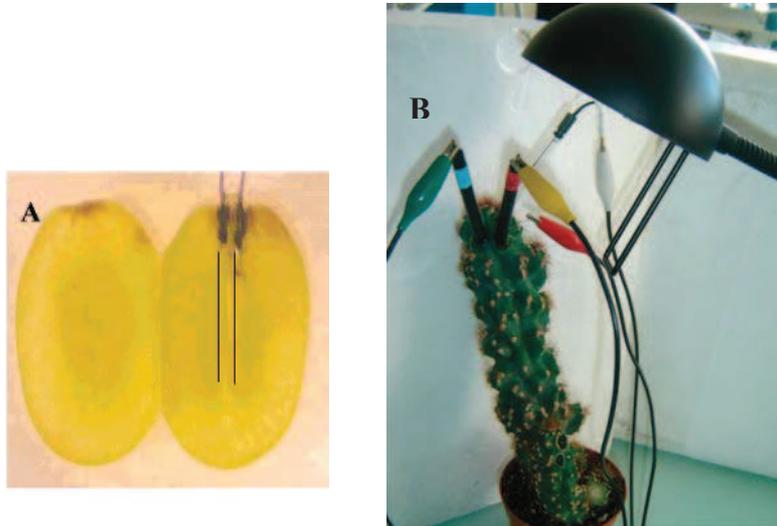


Figure I-16: Photographies de biopiles implantés dans des végétaux. A- Biopile à glucose/oxygène dans un raisin. Reproduit de [175]. B- Biopile à glucose/oxygène implantée dans un cactus. Reproduit de [174]. Pour les deux cas, les enzymes sont la GOx et la BOx immobilisées dans des hydrogels rédox à base d'osmium sur carbone

Références bibliographiques

- (1) Kim, J.; Grate, J. W. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1219-1222.
- (2) Quioco, F. A.; Richards, F. M. *Biochemistry* **1966**, *5*, 4062-4076.
- (3) Ramanathan, K.; Annapoorni, S.; Kumar, A.; Malhotra, B. D. *J. Mater. Sci. Lett.* **1996**, *15*, 124-128.
- (4) Hoa, X. D.; Kirk, A. G.; Tabrizian, M. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 3043-3048.
- (5) Samanta, D.; Sarkar, A. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2567-2592.
- (6) Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. *Biotechniques* **2004**, *37*, 790-802.
- (7) Cooney, M. J.; Lau, C.; Windmeisser, M.; Liaw, B. Y.; Klotzbach, T.; Minteer, S. D. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 667-674.
- (8) Higgins, S. R.; Foerster, D.; Cheung, A.; Lau, C.; Bretschger, O.; Minteer, S. D.; Neals, K.; Atanassov, P.; Cooney, M. J. *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *48*, 458-465.
- (9) Zeng, K.; Tachikawa, H.; Zhu, Z. Y.; Davidson, V. L. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2211-2215.
- (10) Shan, D.; He, Y.; Wang, S.; Xue, H.; Zheng, H. *Anal. Biochem.* **2006**, *356*, 215-221.
- (11) Cosnier, S. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 443-456.
- (12) Haddad, R.; Holzinger, M.; Villalonga, R.; Neumann, A.; Roots, J.; Maaref, A.; Cosnier, S. *Carbon* **2011**, *49*, 2571-2578.
- (13) Haddour, N.; Cosnier, S.; Gondran, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5752-5753.
- (14) Roullier, V.; Clarke, S.; You, C.; Pinaud, F.; Gouzer, G.; Schaible, D.; Marchi-artzner, V.; Piehler, J.; Dahan, M. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1228-1234.
- (15) Ferreyra, N.; Coche-Guerente, L.; Labbe, P. *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, 477-484.
- (16) Karyakin, A. A.; Presnova, G. V.; Rubtsova, M. Y.; Egorov, A. M. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3805-3811.
- (17) Clark, L. C., Jr.; Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29-45.
- (18) Smith, R. G.; D'Souza, N.; Nicklin, S. *Analyst* **2008**, *133*, 571-584.
- (19) Goebel, G.; Dietz, T.; Lisdat, F. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 1581-1585.
- (20) Scarano, S.; Mascini, M.; Turner, A. P. F.; Minunni, M. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 957-966.
- (21) Soledad Belluzo, M.; Elida Ribone, M.; Marina Lagier, C. *Sensors* **2008**, *8*, 1366-1399.
- (22) Zhang, Y. Y.; Tadigadapa, S. In *2005 IEEE Sensors, Vols 1 And 2*, 2005, pp 41-44.
- (23) Barzen, C.; Brecht, A.; Gauglitz, G. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 289-295.
- (24) Strehly, B.; Nikolaus, N.; Stoltenburg, R. *Sensors* **2008**, *8*, 4296-4307.
- (25) Gobi, K. V.; Iwasaka, H.; Miura, N. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1382-1389.
- (26) Fernandez, F.; Hegnerova, K.; Piliarik, M.; Sanchez-Baeza, F.; Homola, J.; Marco, M. P. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 1231-1238.
- (27) Schofield, A. L.; Rudd, T. R.; Martin, D. S.; Fernig, D. G.; Edwards, C. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 407-413.
- (28) Aizawa, H.; Kurosawa, S.; Tozuka, M.; Park, J. W.; Kobayashi, K. *Sens. Actuators, B* **2004**, *101*, 150-154.
- (29) Yang, Z.-P.; Zhang, C.-J. *Sens. Actuators, B* **2009**, *142*, 210-215.
- (30) Kurosawa, S.; Park, J.-W.; Aizawa, H.; Wakida, S.-I.; Tao, H.; Ishihara, K. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 473-481.
- (31) Feng, K.; Li, J.; Jiang, J.-H.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1651-1657.

- (32) Lazerges, M.; Perrot, H.; Antoine, E.; Defontaine, A.; Compere, C. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1355-1358.
- (33) Cunningham, S.; Gerlach, J. Q.; Kane, M.; Joshi, L. *Analyst* **2010**, *135*, 2471-2480.
- (34) March, C.; Manclus, J. J.; Jimenez, Y.; Arnau, A.; Montoya, A. *Talanta* **2009**, *78*, 827-833.
- (35) Becker, B.; Cooper, M. A. *Journal of molecular recognition: JMR* **2010**, *24*, 754-787.
- (36) García-Martínez, G.; Bustabad, E. A.; Perrot, H.; Gabrielli, C.; Bucur, B.; Lazerges, M.; Rose, D.; Rodríguez-Pardo, L.; Fariña, J.; Compère, C.; Vives, A. A. *Sensors* **2011**, *11*, 7656-7664.
- (37) Updike, S. J.; Hicks, G. P. *Nature* **1967**, *214*, 986-988.
- (38) Guilbault, G. G.; Montalvo, J. G., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 2164-2165.
- (39) Piao, M.-H.; Noh, H.-B.; Rahman, M. A.; Won, M.-S.; Shim, Y.-B. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 30-37.
- (40) Campanella, L.; Martini, E.; Tomassetti, M. *Sens. Actuators, B* **2008**, *130*, 520-530.
- (41) Purvis, D.; Leonardova, O.; Farmakovskiy, D.; Cherkasov, V. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 1385-1390.
- (42) Tang, D. P.; Yuan, R.; Chai, Y. Q.; Zhong, X.; Liu, Y.; Dai, J. Y. *Clin. Biochem.* **2006**, *39*, 309-314.
- (43) Ramanavicius, A.; Kausaite, A.; Ramanaviciene, A. *Analyst* **2008**, *133*, 1083-1089.
- (44) Kavanagh, P.; Leech, D. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2710-2716.
- (45) Cass, A. E. G.; Davis, G.; Francis, G. D.; Hill, H. A. O.; Aston, W. J.; Higgins, I. J.; Plotkin, E. V.; Scott, L. D. L.; Turner, A. P. F. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 667-671.
- (46) Pemberton, R. M.; Hart, J. P.; Mottram, T. T. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 715-723.
- (47) Radi, A.-E.; Munoz-Berbel, X.; Cortina-Puig, M.; Marty, J.-L. *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 2180-2184.
- (48) Ionescu, R. E.; Gondran, C.; Cosnier, S.; Gheber, L. A.; Marks, R. S. *Talanta* **2005**, *66*, 15-20.
- (49) Daniels, J. S.; Pourmand, N. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1239-1257.
- (50) Lisdat, F.; Schaefer, D. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1555-1567.
- (51) K'Owino, I. O.; Sadik, O. A. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 2101-2113.
- (52) Berggren, C.; Bjarnason, B.; Johansson, G. *Electroanalysis* **2001**, *13*, 173-180.
- (53) Gondran, C.; Orío, M.; Rigal, D.; Galland, B.; Bouffier, L.; Gulon, T.; Cosnier, S. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 311-314.
- (54) Bonanni, A.; del Valle, M. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *678*, 7-17.
- (55) Zhang, W.; Yang, T.; Zhuang, X.; Guo, Z.; Jiao, K. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2417-2422.
- (56) Rajesh; Sharma, V.; Tanwar, V. K.; Mishra, S. K.; Biradar, A. M. *Thin Solid Films* **2010**, *519*, 1167-1170.
- (57) Alfonta, L.; Willner, I.; Throckmorton, D. J.; Singh, A. K. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5287-5295.
- (58) D'Orazio, P. *Clin. Chim. Acta* **2003**, *334*, 41-69.
- (59) Eckfeldt, J.; Levine, A. S.; Greiner, C.; Kershaw, M. *Clinical Chemistry* **1982**, *28*, 1500-1502.
- (60) Suwansa-Ard, S.; Kanatharana, P.; Asawatreratanakul, P.; Limsakul, C.; Wongkittisuksa, B.; Thavarungkul, P. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 445-454.
- (61) Hnaiein, M.; Hassen, W. M.; Abdelghani, A.; Fournier-Wirth, C.; Coste, J.; Bessueille, F.; Leonard, D.; Jaffrezic-Renault, N. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10*, 1152-1154.
- (62) Bullen, R. A.; Arnot, T. C.; Lakeman, J. B.; Walsh, F. C. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 2015-2045.

- (63) Grove, W. R. *Philosophical Magazine and Journal of Science* **1839**, Ser. 3, 14, 127-130.
- (64) Adzic, R. R.; Zhang, J.; Sasaki, K.; Vukmirovic, M. B.; Shao, M.; Wang, J. X.; Nilekar, A. U.; Mavrikakis, M.; Valerio, J. A.; Uribe, F. *Top. Catal.* **2007**, 46, 249-262.
- (65) Seger, B.; Kamat, P. V. *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 7990-7995.
- (66) Yan, W.-M.; Chu, H.-S.; Lu, M.-X.; Weng, F.-B.; Jung, G.-B.; Lee, C.-Y. *J. Power Sources* **2009**, 188, 141-147.
- (67) Haga, K.; Adachi, S.; Shiratori, Y.; Itoh, K.; Sasaki, K. *Solid State Ionics* **2008**, 179, 1427-1431.
- (68) Le Canut, J. M.; Abouatallah, R. M.; Harrington, D. A. *J. Electrochem. Soc.* **2006**, 153, A857-A864.
- (69) Yahiro, A. T.; Lee, S. M.; Kimble, D. O. *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, 88, 375-383.
- (70) Lojou, E.; Bianco, P. *Electroanalysis* **2006**, 18, 2426-2434.
- (71) Aquino Neto, S.; Forti, J. C.; Zucolotto, V.; Ciancaglini, P.; de Andrade, A. R. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 2922-2926.
- (72) Chakraborty, D.; Barton, S. C. *J. Electrochem. Soc.* **2011**, 158, B440-B447.
- (73) Kim, J.; Parkey, J.; Rhodes, C.; Gonzalez-Martin, A. *J. Solid State Electrochem.* **2009**, 13, 1043-1050.
- (74) Zheng, W.; Zhao, H. Y.; Zhang, J. X.; Zhou, H. M.; Xu, X. X.; Zheng, Y. F.; Wang, Y. B.; Cheng, Y.; Jang, B. Z. *Electrochem. Commun.* **2010**, 12, 869-871.
- (75) Ramasamy, R. P.; Ren, Z.; Mench, M. M.; Regan, J. M. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, 101, 101-108.
- (76) Alfonta, L. *Electroanalysis* **2010**, 22, 822-831.
- (77) Di Lorenzo, M.; Curtis, T. P.; Head, I. M.; Scott, K. *Water Res.* **2009**, 43, 3145-3154.
- (78) Read, S. T.; Dutta, P.; Bond, P. L.; Keller, J.; Rabaey, K. *BMC Microbiology* **2010**, 10.
- (79) Liu, Y.; Harnisch, F.; Fricke, K.; Sietmann, R.; Schroeder, U. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 24, 1006-1011.
- (80) Potter, M. C. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **1912**, 84, 260-276.
- (81) Zhang, T.; Gannon, S. M.; Nevin, K. P.; Franks, A. E.; Lovley, D. R. *Environmental Microbiology* **2010**, 12, 1011-1020.
- (82) Davis, F.; Higson, S. P. J. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 1224-1235.
- (83) Ren, Z.; Ramasamy, R. P.; Cloud-Owen, S. R.; Yan, H.; Mench, M. M.; Regan, J. M. *Bioresour. Technol.* **2011**, 102, 416-421.
- (84) Zhao, F.; Harnisch, F.; Schroeder, U.; Scholz, F.; Bogdanoff, P.; Herrmann, I. *Electrochem. Commun.* **2005**, 7, 1405-1410.
- (85) Cheng, S.; Liu, H.; Logan, B. E. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 364-369.
- (86) Bergel, A.; Feron, D.; Mollica, A. *Electrochem. Commun.* **2005**, 7, 900-904.
- (87) Rabaey, K.; Read, S. T.; Clauwaert, P.; Freguia, S.; Bond, P. L.; Blackall, L. L.; Keller, J. *ISME Journal* **2008**, 2, 519-527.
- (88) Schaetzle, O.; Barriere, F.; Schroeder, U. *Energy & Environmental Science* **2009**, 2, 96-99.
- (89) Sokic-Lazic, D.; Arechederra, R. L.; Treu, B. L.; Minteer, S. D. *Electroanalysis* **2010**, 22, 757-764.
- (90) Arechederra, R.; Minteer, S. D. *Electrochim. Acta* **2008**, 53, 6698-6703.
- (91) Arechederra, R. L.; Boehm, K.; Minteer, S. D. *Electrochim. Acta* **2009**, 54, 7268-7273.
- (92) Bhatnagar, D.; Xu, S.; Fischer, C.; Arechederra, R. L.; Minteer, S. D. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 86-92.

- (93) Cooney, M. J.; Svoboda, V.; Lau, C.; Martin, G.; Minteer, S. D. *Energy & Environmental Science* **2008**, *1*, 320-337.
- (94) Katz, E.; Buckmann, A. F.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10752-10753.
- (95) Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. E. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563-2605.
- (96) Katz, E.; Lioubashevski, O.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3979-3988.
- (97a) Willner, I.; Katz, E.; Patolsky, F.; Buckmann, A. F. *Journal Of The Chemical Society-Perkin Transactions 2* **1998**, *8*, 1817-1822
- (97b) Pizzariello, A.; Stred'ansky, M.; Miertus, S. *Bioelectrochemistry* **2002**, *56*, 99-105
- (98) Vincent, K. A.; Parkin, A.; Lenz, O.; Albracht, S. P. J.; Fontecilla-Camps, J. C.; Cammack, R.; Friedrich, B.; Armstrong, F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18179-18189.
- (99) De lacey, A. L.; Fernandez, V. M.; Rousset, M.; Cammack, R. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4304-4330.
- (100) Tsujimura, S.; Fujita, M.; Tatsumi, H.; Kano, K.; Ikeda, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 1331-1335.
- (101) Luo, X.; Brugna, M.; Tron-Infossi, P.; Giudici-Ortoni, M. T.; Lojou, E. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 1275-1288.
- (102) Pandelia, M.-E.; Fourmond, V.; Tron-Infossi, P.; Lojou, E.; Bertrand, P.; Leger, C.; Giudici-Ortoni, M.-T.; Lubitz, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6991-7004.
- (103) Deng, L.; Shang, L.; Wen, D.; Zhai, J.; Dong, S. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 70-73.
- (104) Rincon, R. A.; Lau, C.; Garcia, K. E.; Atanassov, P. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 2503-2509.
- (105) Bahshi, L.; Frascioni, M.; Tel-Vered, R.; Yehezkeli, O.; Willner, I. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8253-8259.
- (106) Kamitaka, Y.; Tsujimura, S.; Setoyama, N.; Kajino, T.; Kano, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 1793-1801.
- (107) Addo, P. K.; Arechederra, R. L.; Minteer, S. D. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 807-812.
- (108) Palmore, G. T. R.; Bertschy, H.; Bergens, S. H.; Whitesides, G. M. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *443*, 155-161.
- (109) Zebda, A.; Innocent, C.; Renaud, L.; Cretin, M.; Pichot, F.; Ferrigno, R.; Tingry, S. *InTech 2011, Biofuel's Engineering Process Technology; Chapter 24: Enzyme-Based Microfluidic Biofuel Cell to Generate Micropower*, 565-584.
- (110) Arechederra, R. L.; Minteer, S. D. *Fuel Cells* **2009**, *9*, 63-69.
- (111) Sokic-Lazic, D.; Minteer, S. D. *Electrochemical And Solid State Letters* **2009**, *12*, F26-F28.
- (112) Sokic-Lazic, D.; de Andrade, A. R.; Minteer, S. D. *Electrochim. Acta* **2011**, *In press*.
- (113) Nogala, W.; Celebanska, A.; Wittstock, G.; Opallo, M. *Fuel Cells* **2010**, *10*, 1157-1163.
- (114) Gomez, C.; Shipovskov, S.; Ferapontova, E. E. *Journal Of Renewable And Sustainable Energy* **2010**, *2*.
- (115) Barrera, C.; Zhukov, I.; Villagra, E.; Bedioui, F.; Paez, M. A.; Costamagna, J.; Zagal, J. H. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *589*, 212-218.
- (116) Lanyi, J. K.; Pohorille, A. *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 140-144.
- (117) Ho, D.; Chu, B.; Lee, H.; Brooks, E. K.; Kuo, K.; Montemagno, C. D. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 3120-3132.
- (118) Strik, D.; Hamelers, H. V. M.; Buisman, C. J. N. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 532-537.
- (119) Amir, L.; Tam, T. K.; Pita, M.; Meijler, M. M.; Alfonta, L.; Katz, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 826-832.

- (120) Kline, T. R.; Paxton, W. F.; Wang, Y.; Velegol, D.; Mallouk, T. E.; Sen, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17150-17151.
- (121) Sakai, H.; Nakagawa, T.; Tokita, Y.; Hatazawa, T.; Ikeda, T.; Tsujimura, S.; Kano, K. *Energy & Environmental Science* **2009**, *2*, 133-138.
- (122) Hudak, N. S.; Gallaway, J. W.; Barton, S. C. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *629*, 57-62.
- (123) Otsuka, K.; Sugihara, T.; Tsujino, Y.; Osakai, T.; Tamiya, E. *Anal. Biochem.* **2007**, *370*, 98-106.
- (124) Ivnitski, D.; Atanassov, P. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 2307-2313.
- (125) Ivnitski, D. M.; Khripin, C.; Luckarift, H. R.; Johnson, G. R.; Atanassov, P. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 7385-7393.
- (126) Barriere, F.; Ferry, Y.; Rochefort, D.; Leech, D. *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 237-241.
- (127) Jenkins, P. A.; Boland, S.; Kavanagh, P.; Leech, D. *Bioelectrochemistry* **2009**, *76*, 162-168.
- (128) Bertrand, T.; Jolival, C.; Briozzo, P.; Caminade, E.; Joly, N.; Madzak, C.; Mouglin, C. *Biochemistry* **2002**, *41*, 7325-7333.
- (129) Habrioux, A.; Napporn, T.; Servat, K.; Tingry, S.; Kokoh, K. B. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 7701-7705.
- (130) Mano, N.; Mao, F.; Heller, A. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1703-1705.
- (131) Kang, C.; Shin, H.; Zhang, Y. C.; Heller, A. *Bioelectrochemistry* **2004**, *65*, 83-88.
- (132) Katz, E.; Filanovsky, B.; Willner, I. *New J. Chem.* **1999**, *23*, 481-487.
- (133) Liu, Y.; Wang, M. K.; Zhao, F.; Liu, B. F.; Dong, S. J. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4970-4974.
- (134) Ikeda, T.; Kano, K. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins And Proteomics* **2003**, *1647*, 121-126.
- (135) Ivnitski, D.; Atanassov, P.; Apblett, C. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1562-1568.
- (136) Okuda-Shimazaki, J.; Kakehi, N.; Yamazaki, T.; Tomiyama, M.; Sode, K. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 1753-1758.
- (137) Yan, Y.-M.; Yehezkeli, O.; Willner, I. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 10168-10175.
- (138) Coman, V.; Vaz-Dominguez, C.; Ludwig, R.; Harreither, W.; Haltrich, D.; De Lacey, A. L.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; Shleev, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6093-6096.
- (139) Tasca, F.; Gorton, L.; Kujawa, M.; Patel, I.; Harreither, W.; Peterbauer, C. K.; Ludwig, R.; Noell, G. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1710-1716.
- (140) Zafar, M. N.; Tasca, F.; Boland, S.; Kujawa, M.; Patel, I.; Peterbauer, C. K.; Leech, D.; Gorton, L. *Bioelectrochemistry* **2010**, *80*, 38-42.
- (141) Wohlfahrt, G.; Witt, S.; Hendle, J.; Schomburg, D.; Kalisz, H. M.; Hecht, H. J. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **1999**, *55*, 969-977.
- (142) Prevoteau, A.; Courjean, O.; Mano, N. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 213-215.
- (143) Oubrie, A.; Rozeboom, H. J.; Kalk, K. H.; Olsthoorn, A. J. J.; Duine, J. A.; Dijkstra, B. W. *EMBO J.* **1999**, *18*, 5187-5194.
- (144) Coman, V.; Ludwig, R.; Harreither, W.; Haltrich, D.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Shleev, S. *Fuel Cells* **2010**, *10*, 9-16.
- (145) Shleev, S.; Pita, M.; Yarepolov, A. I.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1901-1908.
- (146) Balland, V.; Hureau, C.; Cusano, A. M.; Liu, Y.; Tron, T.; Limoges, B. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7186-7192.
- (147) Lojou, E.; Luo, X.; Brugna, M.; Candoni, N.; Dementin, S.; Giudici-Orticoni, M. T. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1157-1167.
- (148) Gutierrez-Sanchez, C.; Olea, D.; Marques, M.; Fernandez, V. M.; Pereira, I. A. C.; Velez, M.; De Lacey, A. L. *Langmuir* **2011**, *27*, 6449-6457.

- (149) Barton, S. C.; Gallaway, J.; Atanassov, P. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4867-4886.
- (150) Servat, K.; Tingry, S.; Brunel, L.; Querelle, S.; Cretin, M.; Innocent, C.; Jolival, C.; Rolland, M. *J. Appl. Electrochem.* **2007**, *37*, 121-127.
- (151) Brunel, L.; Denele, J.; Servat, K.; Kokoh, K. B.; Jolival, C.; Innocent, C.; Cretin, M.; Rolland, M.; Tingry, S. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 331-336.
- (152) Gregg, B. A.; Heller, A. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 258-263.
- (153) Rajagopalan, R.; Aoki, A.; Heller, A. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3719-3727.
- (154) Heller, A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 664-672.
- (155) Gallaway, J. W.; Barton, S. A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8527-8536.
- (156) Kang, C.; Shin, H.; Heller, A. *Bioelectrochemistry* **2006**, *68*, 22-26.
- (157) Sato, F.; Togo, M.; Islam, M. K.; Matsue, T.; Kosuge, J.; Fukasaku, N.; Kurosawa, S.; Nishizawa, M. *Electrochem. Commun.* **2005**, *7*, 643-647.
- (158) Tamaki, T.; Yamaguchi, T. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45*, 3050-3058.
- (159) Boland, S.; Foster, K.; Leech, D. *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 1986-1991.
- (160) Gupta, G.; Lau, C.; Rajendran, V.; Colon, F.; Branch, B.; Ivnitski, D.; Atanassov, P. *Electrochem. Commun.* **2011**, *13*, 247-249.
- (161) Rubenwolf, S.; Strohmeier, O.; Kloke, A.; Kerzenmacher, S.; Zengerle, R.; von Stetten, F. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 841-845.
- (162) Shleev, S.; Tkac, J.; Christenson, A.; Ruzgas, T.; Yaropolov, A. I.; Whittaker, J. W.; Gorton, L. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2517-2554.
- (163) Flexer, V.; Durand, F.; Tsujimura, S.; Mano, N. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 5721-5727.
- (164) Tasca, F.; Harreither, W.; Ludwig, R.; Gooding, J. J.; Gorton, L. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3042-3049.
- (165) Guiseppi-Elie, A.; Lei, C. H.; Baughman, R. H. *Nanotechnology* **2002**, *13*, 559-564.
- (166) Ivnitski, D.; Branch, B.; Atanassov, P.; Apblett, C. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 1204-1210.
- (167) Zebda, A.; Gondran, C.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cinquin, P.; Cosnier, S. *Nature communications* **2011**, *2*, 370.
- (168) Vaze, A.; Hussain, N.; Tang, C.; Leech, D.; Rusling, J. *Electrochem. Commun.* **2009**, *11*, 2004-2007.
- (169) Liu, Y.; Dong, S. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 1423-1427.
- (170) Liu, Y.; Dong, S. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 593-597.
- (171) Ammam, M.; Fransaer, J. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1474-1480.
- (172) Kavanagh, P.; Boland, S.; Jenkins, P.; Leech, D. *Fuel Cells* **2009**, *9*, 79-84.
- (173) Gao, F.; Viry, L.; Maugey, M.; Poulin, P.; Mano, N. *Nature Communications* **2010**, *1*.
- (174) Flexer, V.; Mano, N. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1444-1449.
- (175) Mano, N.; Mao, F.; Heller, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6588-6594.

Chapitre II.

Biocapteur impédancemétrique pour le dosage d'antibiotique – Application à la ciprofloxacine

II.1 Généralités

Découvertes dans les années 60, les quinolones¹ sont des agents antibactériens issus de la synthèse possédant un large spectre d'activité. Ces antibiotiques sont actifs contre les bactéries à Gram négatifs ou positifs (aérobies ou non)^{2,3}. Leur structure chimique globale est représentée sur le **Schéma II-1**. Elles sont composées de deux hétérocycles. Le premier cycle est substitué par un groupement carboxylique en position 3 et par un groupement carbonyle en position 4. Ces sites sont responsables d'une complexation entre l'ADN et les topoisomérases (ADN gyrase et topoisomérase IV) ce qui empêche la duplication du matériel chromosomique des bactéries^{4,5}.

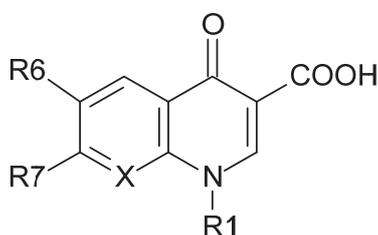


Schéma II-1: Structure générale des quinolones

C'est à partir de 1970 que la substitution sur le cycle secondaire en position 6 par un atome de fluor est décrite. Cela a pour effet de conférer aux quinolones un pouvoir pénétrant supérieur¹. La substitution en position 7 par un groupement pipérazine favorise un accroissement de l'activité antibactérienne¹. L'introduction du groupement cyclopropyl en position 1 du pharmacophore permet d'augmenter l'activité et la distribution volumique de l'antibiotique. Cette nouvelle famille d'antibiotiques se désigne par l'appellation « fluoroquinolone » dont la ciprofloxacine fait partie (**Schéma II-2**). Cet antibiotique apparaît comme l'un des antibiotiques les plus utilisés. Il est prescrit pour lutter contre des maladies telles que les infections urinaires, intestinales, articulaires, broncho-pulmonaires et parfois dans les cas où d'autres traitements se sont révélés inefficaces⁶.

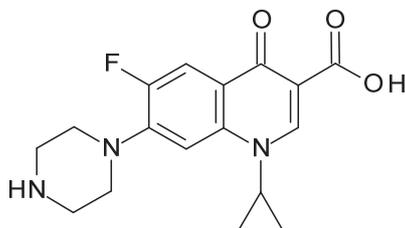


Schéma II-2: Structure de la ciprofloxacine

L'utilisation croissante de fluoroquinolones ces dernières années semble faire émerger un problème de santé publique important. Effectivement, l'apparition de souches de bactéries

résistantes à ce type d'antibiotique est particulièrement préoccupante⁷. L'origine de ce phénomène pourrait résider dans l'ingestion quotidienne en faible dose de ces substances présentes dans la nourriture et l'eau contaminées⁸. La présence de ces antibiotiques dans la nourriture s'explique par leur utilisation dans l'alimentation animale en tant que complément alimentaire ou pour pallier la prolifération rapide de germes liée à une production intensive⁹. Les autorités sanitaires (US Food & Drug Administration, l'Union Européenne, etc...) ont alors fixé une concentration résiduelle limite comprise entre 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ et 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de nourriture (suivant le type d'aliment)¹⁰. Ainsi, le contrôle des taux de fluoroquinolones dans l'alimentation et dans les eaux (rivières, nappes phréatiques, eaux usées) se révèle indispensable à cause des conséquences que pourrait engendrer l'augmentation des résistances bactériennes sur la santé et l'environnement¹¹⁻¹³.

Plusieurs méthodes analytiques ont été développées afin de détecter et quantifier les fluoroquinolones à différentes concentrations allant des techniques optiques¹⁴⁻¹⁸, chromatographiques¹⁹⁻²⁵, électrophorétiques²⁶ à des techniques électrochimiques²⁷⁻³³. La méthode sans doute la plus utilisée est la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) dont l'intérêt est de pouvoir détecter simultanément plusieurs fluoroquinolones dans le même échantillon à des temps de rétention qui leur sont propres. Les seuils de détection atteignables sont de l'ordre de 0,01 à 0,2 ng.mL^{-1} mais cette technique requiert un matériel onéreux, des méthodes d'extractions longues, etc.

L'objet de ce chapitre est de décrire l'élaboration et la caractérisation d'un capteur capable de détecter par voie électrochimique la ciprofloxacine en solution. Ce thème était inscrit dans le programme ELISHA (Electro-Immunointerfaces and Surfaces Nanobiotechnology : A Heterodoxical Approach). Il visait à développer des biocapteurs électrochimiques simples, fiables et basés sur l'affinité existante entre un anticorps et un antigène en s'affranchissant ainsi du marquage biologique généralement nécessaire, par exemple pour les méthodes de détection optique (fluorescence, chimie-luminescence). Pour cela, il est nécessaire de fonctionnaliser la surface lors d'une première étape permettant par la suite l'ancrage de la molécule biologique (antigène).

Le capteur imaginé est composé d'une couche de polymère permettant le greffage d'un modèle de l'antibiotique (**Schéma II-3**) en créant une liaison covalente entre le polymère et la fonction amine du modèle.

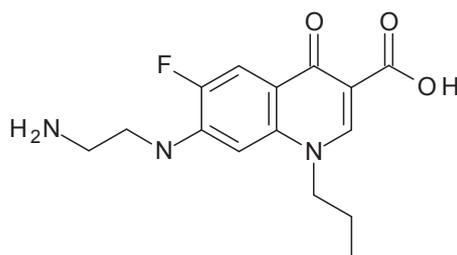


Schéma II-3: Structure du modèle de l'antibiotique ciprofloxacine

Ce modèle de l'antibiotique permet l'immobilisation de l'anticorps de la ciprofloxacine à la surface de l'électrode modifiée par affinité chimique mettant en jeu des interactions de type anticorps/antigènes. Puisque l'affinité entre l'antibiotique et l'anticorps est supérieure à celle existante avec le modèle, l'anticorps est déplacé en solution lorsque la concentration en antibiotique augmente dans le milieu réactionnel.

Ce chapitre est divisé en trois sections différentes qui reflètent les étapes d'élaboration et de caractérisation de l'assemblage. La première partie se focalise sur l'électrogénération de la matrice de polymère qui est la base de l'immobilisation des molécules biologiques. La seconde partie est l'occasion d'identifier le succès des différentes étapes de greffage des matériaux (modèle d'antigène et anticorps). Enfin, la dernière s'intéresse à la partie détection électrochimique de la ciprofloxacine grâce à l'immunocapteur réalisé.

II.2 Caractérisation du pyrrole-NHS et poly(pyrrole-NHS)

Le monomère pyrrole-undécanoyl-N-hydroxysuccinimide est d'abord caractérisé en solution par voltampérométrie cyclique. Après la détermination de la fenêtre d'électroactivité du monomère, la caractérisation de la formation du polymère correspondant, le poly(pyrrole-NHS), est menée par balayages successifs de potentiels et par électrolyse à potentiel contrôlé. Les films de polymères obtenus sont finalement caractérisés par voltampérométrie cyclique. Tous les potentiels conduits en milieu organique et en milieu aqueux sont obtenus par rapport aux références $\text{Ag}^+ 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1} / \text{Ag}$ et $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$, KCl (calomel saturé) respectivement.

II.2.a Electrochimie du monomère en solution

L'étude préliminaire du 11-pyrrole-1-acide undécanoyl-N-hydroxysuccinimide (pyrrole-NHS, **Schéma II-4**), synthétisé selon le protocole de Ionescu et al.³⁴, utilisé dans le cadre de ce capteur, est faite dans une solution électrolytique d'acétonitrile (CH_3CN) contenant du tétrabutylammonium perchlorate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (TBAP).

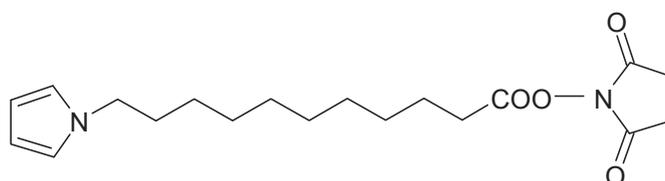


Schéma II-4: Structure du monomère pyrrole-undécanoyl-N-hydroxysuccinimide

La courbe de voltampérométrie cyclique d'une électrode de carbone vitreux immergée dans une telle solution permet de mettre en évidence le comportement électrochimique du groupe pyrrole (**Figure II-1**).

L'électroactivité du monomère, en particulier le groupement N-alkylpyrrole est vérifiée par la présence d'un pic anodique irréversible situé à 0,85 V vs. Ag⁺/Ag correspondant à l'oxydation irréversible du motif pyrrole. Le potentiel de pic est en accord avec les potentiels d'oxydation trouvés dans la littérature³⁵ lors de l'étape d'initiation de la polymérisation de monomères pyrroliques N substitués (de 0,9 V à 1,2 V vs. Ag⁺/Ag).

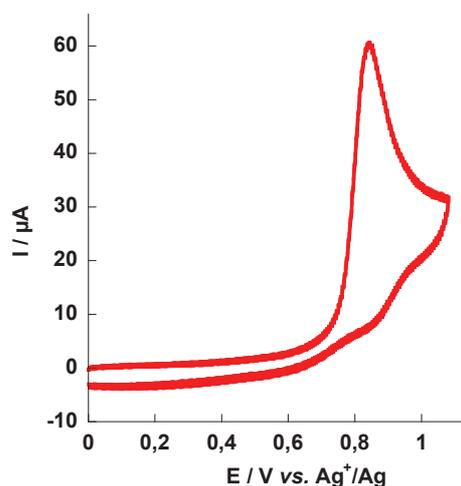


Figure II-1: Voltampérogramme cyclique d'une solution de pyrrole-NHS (2.10⁻³ mol.L⁻¹) dans CH₃CN + 0,1 mol.L⁻¹ TBAP sur une électrode de carbone vitreux (Ø = 3 mm), v_b = 100 mV.s⁻¹

II.2.b Electrodeposition d'un film polypyrrolique par voltampérométrie cyclique

La méthode la plus visuelle pour observer la croissance d'un film de polypyrrole est la voltampérométrie cyclique. Les balayages successifs entre 0,00 et 0,85 V d'une électrode de carbone vitreux plongée dans une solution contenant le monomère de pyrrole-NHS font apparaître un signal rédox réversible (**Figure II-2-a**). Au premier cycle, on retrouve un voltampérogramme identique à celui de la **Figure II-1**. Dès le second cycle, on voit apparaître un signal réversible centré sur 0,22 V qui correspond au signal électroactif du poly(pyrrole-N-alkyl). Les intensités des courants d'oxydation et de réduction croissent avec l'augmentation du nombre de cycles, traduisant l'accumulation d'espèces électroactives et l'augmentation de l'épaisseur du film poly(pyrrolique) sur la surface de l'électrode. Le pic irréversible à 0,85 V diminue en intensité corroborant l'apparition du film et par la même occasion la plus grande difficulté à observer le monomère en solution. Après transfert dans une solution exempte de monomère (**Figure II-2-b**), le signal électrochimique du polypyrrole est conservé. Ceci montre la présence du film solide à la surface de l'électrode. Pour conserver les propriétés de conduction électrique du polymère, le potentiel d'électropolymérisation a été choisi de telle sorte que le film formé ne soit pas suroxydé (entre 0,80 V et 0,85 V vs. Ag⁺/Ag). La suroxydation d'un film polypyrrolique conduit en effet à l'interruption de la conjugaison des chaînes de polymère au profit de l'apparition de groupement carbonyle ou alcool³⁶.

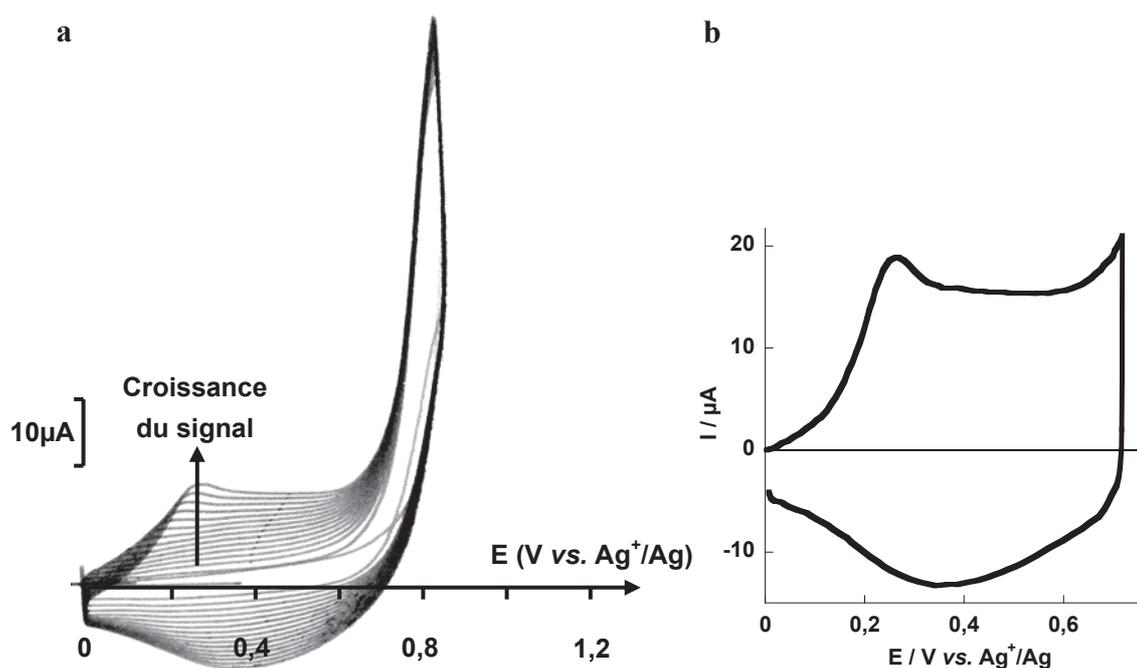


Figure II-2: a- Voltampérométrie cyclique du pyrrole-NHS ($2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ TBAP sur électrode de carbone vitreux ($\varnothing = 3 \text{ mm}$), $\nu_b = 100 \text{ mV.s}^{-1}$, $n_{\text{cycle}} = 15$. b- Voltampérogramme d'une électrode de carbone vitreux ($\varnothing = 3 \text{ mm}$) modifiée par le poly(pyrrole-NHS) obtenue par voltampérométrie cyclique après 15 cycles et transférée dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ TBAP exempt de monomère, $\nu_b = 100 \text{ mV.s}^{-1}$

II.2.c Electrodeposition d'un film polypyrrolique à potentiel contrôlé

Dans le but d'obtenir des films de polymères dont l'épaisseur est modulable et reproductible entre plusieurs électrodes, les dépôts sont réalisés par chronoampérométrie. Cette méthode permet de contrôler la charge électrique nécessaire à la propagation de la polymérisation.

Le transfert d'une électrode modifiée par chronoampérométrie à potentiel contrôlé dans une solution exempte de monomère indique que le film polymère ainsi électrogénéré présente les mêmes signaux rédox qu'un film déposé par la méthode de cyclage en potentiel. Un signal réversible centré sur 0,24 V est obtenu avec une allure proche de la courbe de transfert d'un polymère obtenu par cycles successifs (**Figure II-3**) mais avec des intensités plus faibles. Les faibles signaux sont indicateurs d'une couche fine de polymère qui est nécessaire pour garder une bonne perméabilité du film d'ancrage.

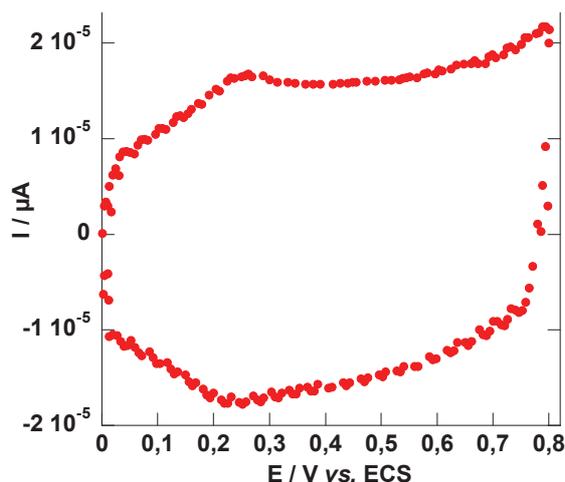


Figure II-3: Voltampéromogramme d'une électrode de carbone vitreux ($\varnothing = 3 \text{ mm}$) modifiée par le poly(pyrrole-NHS) par chronoampérométrie à $+0,85 \text{ V}$ et transférée dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ TBAP}$ exempt de monomère, $v_b = 100 \text{ m V.s}^{-1}$, $Q_{\text{polymérisation}} = 0,180 \text{ mC}$

La chronoampérométrie permet de contrôler l'efficacité de l'électropolymérisation lors de la formation du poly(pyr-NHS) en comparant la charge utilisée lors de l'électropolymérisation et la charge du polymère redox obtenu. Le rendement d'électropolymérisation η se définit par le rapport entre la quantité d'espèces électroactives effectivement immobilisées sur la surface $\Gamma_{\text{réel}}$ (correspondant à l'intégration de la charge sous le signal redox du polypyrrole) et la quantité d'espèces immobilisées théoriquement pour un rendement d'électropolymérisation total (correspondant à l'intégration de la charge utilisée lors de l'électropolymérisation $Q_{\text{polymérisation}}$) :

$$\eta = \frac{\Gamma_{\text{réel}}}{\Gamma_{\text{théorique}}} \times 100$$

avec $\Gamma_{\text{réel}}$, la concentration surfacique réelle de l'électrode est calculé à partir de l'équation :

$$\Gamma_{\text{réel}} (\text{mol.cm}^{-2}) = \frac{Q_{\text{int}}}{n \times F \times S} \quad \text{Équation II-1}$$

où Q_{int} : quantité d'électricité (C) intégrée sous le signal du pyr-NHS

n : nombre d'électrons échangés par le système (0,33)

F : constante de Faraday (C.mol^{-1})

S : surface de l'électrode (cm^2)

et $\Gamma_{\text{théorique}}$, la concentration surfacique théorique en utilisant la quantité d'électricité

$Q_{\text{polymérisation}}$ utilisée lors de la polymérisation :

$$\Gamma_{théorique} (mol.cm^{-2}) = \frac{Q_{polymérisation}}{n' \times F \times S} \quad \text{Équation II-2}$$

où $Q_{polymérisation}$: charge utilisée pour la polymérisation

n' : nombre d'électrons nécessaires à la polymérisation (2,33)

Le rendement moyen du dépôt de polymère par voie électrochimique est de l'ordre de $\eta = 65 \%$ (**Tableau II-1**). Cette valeur moyenne indique que la polymérisation est efficace et que le film n'est que très peu suroxydé et donc qu'il reste un bon conducteur électronique.

Tableau II-1: Electropolymérisation du pyrrole-NHS ($2 \cdot 10^{-3} mol.L^{-1}$) dans $CH_3CN + 0,1 mol.L^{-1}$ TBAP sur électrodes de carbone vitreux ($\varnothing = 3mm$) à potentiel contrôlé ($E = 0,85 V$)

$Q_{polymérisation}$ (mC)	Q_{int} (mC)	$\Gamma_{réel}$ (mol.cm ⁻²)	$\Gamma_{théorique}$ (mol.cm ⁻²)	η (%)
0,183	0,0167	$7,42 \cdot 10^{-9}$	$1,15 \cdot 10^{-8}$	64,4
0,183	0,016	$7,11 \cdot 10^{-9}$	$1,15 \cdot 10^{-8}$	61,8
0,183	0,018	$7,99 \cdot 10^{-9}$	$1,15 \cdot 10^{-8}$	69,6

II.3 Elaboration de l'assemblage biomoléculaire

II.3.a Principe de l'assemblage

Le biocapteur à ciprofloxacine (**Schéma II-2**) décrit dans ce chapitre est basé sur l'immobilisation de l'anticorps de la ciprofloxacine de façon réversible sur un film de polymère. Un modèle de l'antigène (**Schéma II-3**) est greffé sur le film de poly(pyrrole-NHS) présenté dans la partie précédente à la surface des électrodes. L'immobilisation du modèle est rendue possible par le couplage de la fonction amine présente sur le modèle avec l'ester activé du polymère électrogénéré³⁷.

L'anticorps dirigé contre la ciprofloxacine est ensuite immobilisé à la surface de l'assemblage. Le couplage d'un antibiotique et d'un anticorps ne fait intervenir que des liaisons non-covalentes (liaisons hydrogènes, électrostatiques, hydrophobes ou forces de Van der Waals). L'originalité du capteur repose sur le déplacement en solution de l'anticorps lors de l'ajout de l'antibiotique dans le milieu réactionnel. En effet, l'affinité entre l'anticorps et la ciprofloxacine (*CF*) étant plus importante qu'avec le modèle de l'antibiotique *CFM*, les propriétés physico-chimiques de l'assemblage biomoléculaire évoluent avec l'augmentation de la concentration en analyte. Elles seront suivies par mesure de spectroscopie d'impédance électrochimique. Avant de parvenir à la détection directe par la modification de l'impédance du système, les étapes d'immobilisation successives ont été caractérisées de manière à mettre en évidence la fixation de chacune des espèces.

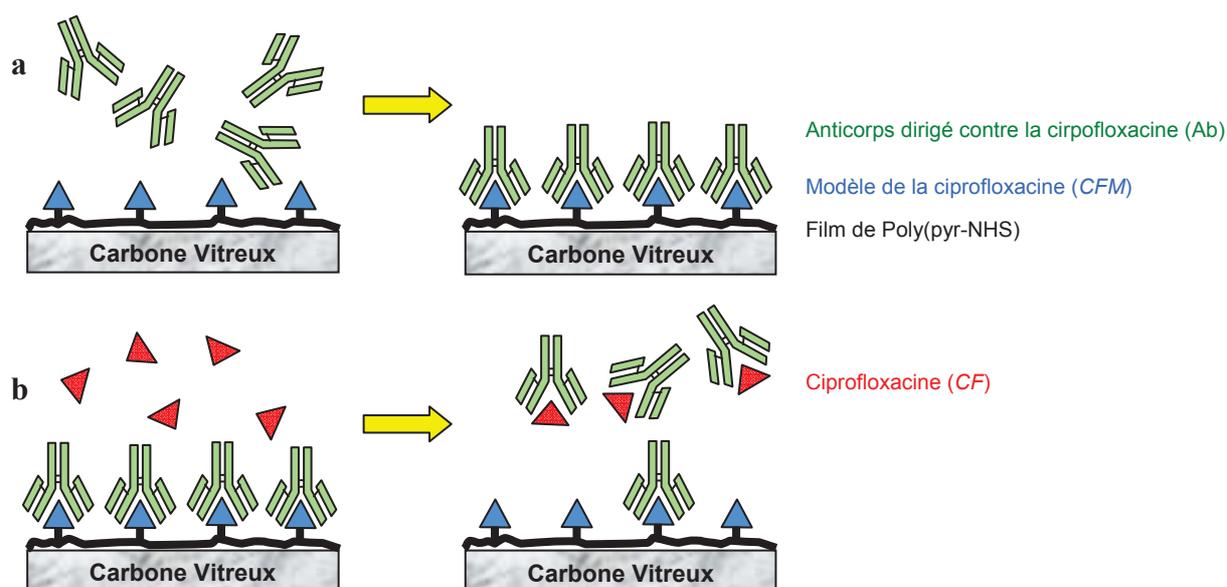


Schéma II-5: Représentation schématique de l'assemblage moléculaire et du principe de détection du biocapteur. a- L'électrode modifiée par le modèle de l'antibiotique CFM est immergée dans une solution contenant l'anticorps. b- L'affinité chimique plus élevée entre l'anticorps et l'analyte est responsable du déplacement en solution de l'anticorps

II.3.b Greffage covalent du modèle de l'antibiotique sur le pyrrole-NHS

Une fois la polymérisation effectuée et confirmée par la présence du signal rédox du polymère, l'étape du greffage du modèle CFM est conduite. Ce greffage est réalisé par la réactivité existante entre la fonction ester (présente en bout de chaîne du polymère et le groupe labile NHS) et la fonction amine (présente sur le groupement en position 7 du pharmacophore) (**Schéma II-6**).

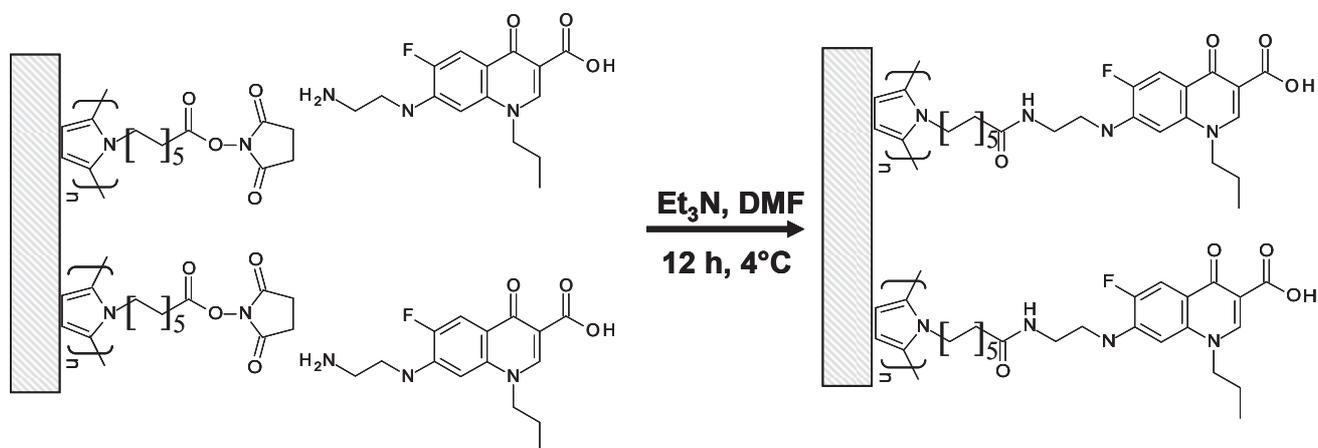


Schéma II-6: Réaction de couplage moléculaire entre le poly(pyrrole-NHS) et le modèle CFM

Pour montrer que le greffage du modèle de l'antibiotique a bien eu lieu, des mesures de perméabilité sont effectuées avant et après incubation du modèle sur le film polymère. La perméabilité, notée P_m , d'un film polymère déposé sur la surface d'une électrode indique sa capacité à laisser diffuser des espèces, que ce soit de la solution vers l'électrode ou bien l'inverse. Dans le cas présent, avec l'utilisation de l'électrochimie, il est possible de déterminer la valeur de ce paramètre en ajoutant une sonde rédox dans la solution. En fonction de cette sonde, le suivi de la variation des courants limites (d'oxydation ou de réduction) obtenus en voltampérométrie stationnaire pour différentes vitesses de rotation de l'électrode donne accès à P_m en utilisant l'équation de Koutecky-Levich.

$$\frac{1}{I_{\text{lim}}} = \frac{1}{0,62nFSD_s^{2/3}\nu^{-1/6}C_0} \times \frac{1}{\Omega^{1/2}} + \frac{\delta}{nFSD_mKC_0} \quad \text{Équation II-3}$$

où n est le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday (C.mol^{-1}), S la surface de l'électrode (cm^2), ν la viscosité cinématique de la solution ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$), Ω la vitesse de rotation de l'électrode (rad.s^{-1}), δ l'épaisseur du film polymère (cm), C_0 la concentration de la sonde rédox (mol.cm^{-3}), D_s , D_m , les coefficients de diffusion de la sonde rédox en solution et dans la membrane respectivement ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$) et K le coefficient de partage de la sonde rédox entre le film et la solution.

Le premier terme de cette égalité fait référence au caractère diffusionnel de la sonde en solution donné par le coefficient D_s , tandis que le second renseigne sur la diffusion de cette même sonde à l'intérieur du film polymère recouvrant la surface S de l'électrode. La perméabilité du film correspond alors à :

$$P_m = \frac{KD_m}{\delta} \quad \text{Équation II-4}$$

Cette mesure de perméabilité permet de vérifier très simplement si un processus d'immobilisation a été effectif par la variation de sa valeur (diminution de P_m pour une immobilisation, augmentation de P_m pour un relargage en solution). Ici, les mesures de perméabilité ont été réalisées suite aux deux étapes consécutives d'électropolymérisation et de modification par le modèle antibiotique. D'après l'Équation II-3, le tracé de $1/I_{\text{lim}}$ en fonction de $\Omega^{-1/2}$ donne accès à la valeur du coefficient de perméabilité P_m de la couche par simple lecture directe de l'ordonnée à l'origine de la droite obtenue.

Dans le cas présent, la sonde électrochimique utilisée est le $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ ($2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans le tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$). Cette sonde est choisie car sa réduction se situe dans une fenêtre de potentiel où le polymère est électroinactif. Dans ces conditions, seul le changement de perméabilité est mesuré. L'apparition de courants négatifs entre 0 et

-0,65 V traduit la réduction de $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$. Une augmentation des courants limites de réduction est mise en évidence lors de l'augmentation de la vitesse de rotation de l'électrode (entre 250 et 2500 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$) pour une vitesse de balayage de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. La **Figure II-4** représente l'inverse du courant limite de réduction du Ru^{III} en fonction de l'inverse de la vitesse de rotation de l'électrode. Elle fait donc état d'une diminution de la valeur de la perméabilité de $7,7\cdot 10^{-3}$ à $5,9\cdot 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ entre une électrode modifiée et une électrode incubée dans une solution de *CFM*. La perte de perméabilité engendrée par l'incubation est une preuve indirecte du greffage covalent du modèle de l'antibiotique sur l'électrode modifiée par le poly(pyrrole-NHS). De plus, la même étape d'incubation a été réalisée en remplaçant *CFM* par le vrai antibiotique *CF*. Cette expérimentation n'a pas conduit à une variation de la perméabilité du film ce qui confirme le couplage covalent du groupement amine présent sur le modèle de la fluoroquinolone avec l'ester activé déposé à la surface de l'électrode.

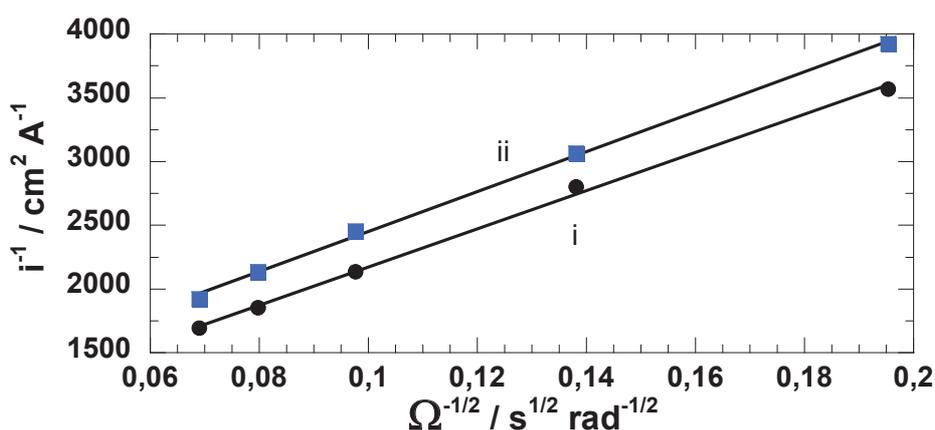


Figure II-4: Courbes de Koutecky-Levich obtenues à partir des courbes de courant-tension en régime stationnaire lors de la réduction de $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ ($2\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dans du tampon phosphate ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{pH} = 7,5$) entre 0 et -0,65 V vs. ECS, $v_b = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. i- électrode tournante de carbone vitreux ($\varnothing = 5 \text{ mm}$) modifiée par un film de ppyr-NHS, $Q_{\text{polymérisation}} = 2,5 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$; ii- électrode modifiée puis incubée dans une solution du modèle de l'antibiotique ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} + 2 \text{ eq. TEA}$ dans le DMF)

Ces mesures de perméabilité sont régulièrement utilisées dans l'équipe pour caractériser les polymères électrogénérés. Le film de poly(pyrrole-NHS) utilisé dans ce capteur ne présente pas la meilleure perméabilité pouvant être attendue pour un film de poly(pyrrole-N-alkyl substitué). Le **Tableau II-2** regroupe quelques valeurs de perméabilité avec d'autres films obtenus dans des conditions similaires.

Tableau II-2: Valeurs de perméabilité obtenues en solution aqueuse pour différents poly(pyrrole-N-alkyl substitués) électrogénérés à la surface d'électrode. NC : Non Communiqué

Polymère étudié	P_m (cm.s ⁻¹)	Q (mC.cm ⁻²)	Sonde rédox	Référence
Poly(pyrrole-NHS)	$7,7.10^{-3}$	2,5	[Ru ^{III} (NH ₃) ₆] ³⁺ (2.10^{-3} mol.L ⁻¹)	Ce travail
Poly(pyrrole-NTA)	10^{-1}	2,5	Hydroquinone (10^{-3} mol.L ⁻¹)	38
Poly(pyrrole-Alkyl-ammonium)	$4,2.10^{-2}$	NC	Hydroquinone (2.10^{-3} mol.L ⁻¹)	39
PMMA(Ppyr-PpyrBz)	$7,9.10^{-4}$	NC	Fe ^{III/II} (CN) ₆ (2.10^{-3} mol.L ⁻¹)	40

II.3.c Couplage anticorps spécifique/modèle antibiotique

L'étape suivante de fabrication de l'assemblage moléculaire consiste à immobiliser l'anticorps spécifique dirigé contre la ciprofloxacine. Les électrodes modifiées par le poly(pyrrole-NHS) et par le modèle *CFM* subissent une incubation de 15 μ L d'anticorps spécifique (dilution 1 :100) dans le tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ et le Tween 20 (0,05 %) (limitant la fixation non spécifique de matériel biologique) pendant 30 minutes et à 4°C.

La validation de cette étape de greffage est menée par chronoampérométrie en utilisant un anticorps secondaire marqué par une peroxydase. Après la modification des électrodes par le modèle *CFM* et l'anticorps primaire, une nouvelle incubation est nécessaire pour fixer l'anticorps secondaire (1 mg.mL⁻¹ dans le tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ pendant 30 minutes à 4°C). Ce nouvel anticorps ayant été exprimé chez le lapin (IgG, comme l'anticorps spécifique), une immunoréaction permet son immobilisation conduisant à un assemblage fonctionnalisé par l'enzyme *HRP*. L'enzyme utilisée dans le cas présent catalyse l'oxydation de l'hydroquinone (*QH*₂) en quinone (*Q*) en présence de H₂O₂ (Schéma II-7).

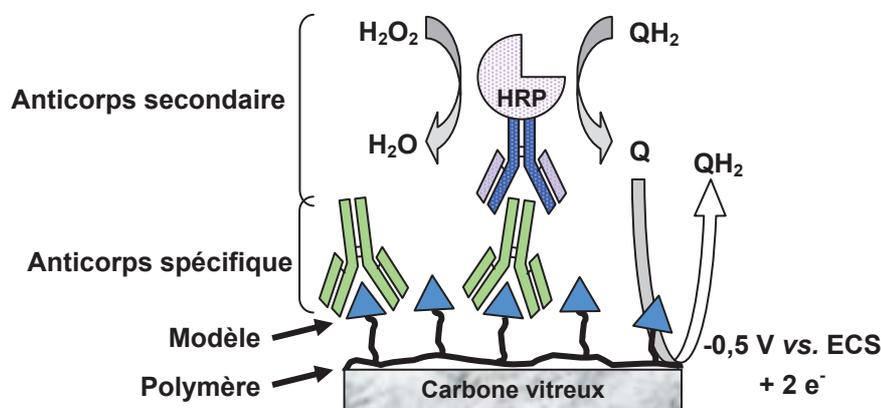
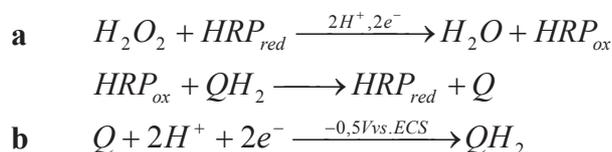


Schéma II-7: Schéma de principe de la détection du greffage affiné entre le modèle *CFM* et l'anticorps spécifique par la méthode dite de « sandwich » avec la fixation d'un anticorps secondaire fonctionnalisé par la *HRP*

Une électrode modifiée immergée dans une solution d'hydroquinone et soumise à un potentiel de $-0,5 \text{ V vs. ECS}$ détecte le produit de la réaction enzymatique décrite dans l'Équation II-5-a, c'est-à-dire la réduction de la quinone en *o*-quinone.



Équation II-5 : a- réaction enzymatique de la HRP vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène et de QH_2 permettant la production de Q . b- réaction de réduction de Q sur une électrode de carbone à $E = -0,5 \text{ V vs. ECS}$

Comme le montre la **Figure II-5-i**, l'ajout d'un excès de H_2O_2 en solution conduit à une forte réponse catalytique avec des courants cathodiques de $-13,0 \pm 0,2 \mu\text{A}$, ceci confirme la présence de la HRP à la surface de la couche de polymère et donc l'immobilisation de l'anticorps dirigé contre la ciprofloxacine par immunoréaction avec le modèle CFM.

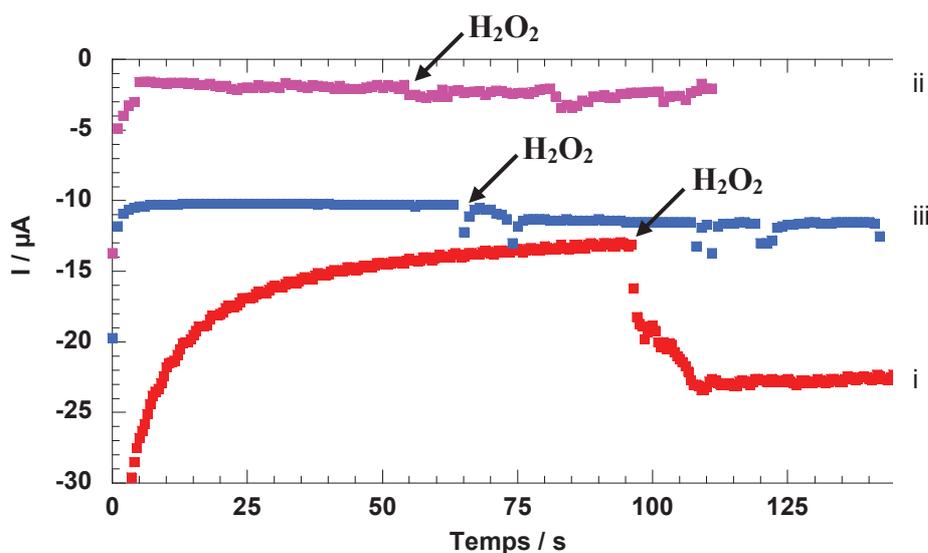


Figure II-5: Réponse ampérométrique d'une électrode modifiée par l'assemblage poly(pyrrole-NHS)/CFM dans le tampon phosphate + hydroquinone ($2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) et soumis à un potentiel de $-0,5 \text{ V vs. ECS}$ après ajout de $30 \mu\text{L}$ de H_2O_2 en excès (8 mol.L^{-1}). Electrode modifiée préalablement incubée dans : i- Anticorps spécifique + anticorps conjugué HRP, ii- Anticorps conjugué HRP seul, iii- Anticorps non spécifique (Anti-BSA) + anticorps conjugué HRP

Plusieurs contrôles ont été effectués pour démontrer clairement la spécificité du système élaboré. Ceux-ci ont consisté à mesurer les courants catalytiques obtenus pour des électrodes modifiées en omettant l'étape de greffage de l'anticorps primaire ou en le substituant par un anticorps non spécifique (anti-BSA). Dans le premier cas, l'électrode modifiée par le film pyrrolique puis par le modèle de l'antigène ne présente qu'un faible

courant catalytique en réduction (-0,9 μA) lors de l'ajout de H_2O_2 malgré l'incubation de l'électrode avec l'anticorps conjugué avec la *HRP* (**Figure II-5-ii**). Le second contrôle où l'anticorps de la ciprofloxacine est remplacé par l'anti-BSA conduit quant à lui à un courant catalytique de -1,0 μA comme indiqué dans la **Figure II-5-ii**. D'une part, ces résultats montrent que l'adsorption non spécifique de l'anticorps secondaire est négligeable par rapport à une fixation par immunoréaction. D'autre part, ils confirment la spécificité du système biologique vis-à-vis de l'anticorps ciblé. Enfin, ils indiquent que le greffage chimique du modèle de la ciprofloxacine sur le film de polypyrrole n'affecte pas sa reconnaissance moléculaire par l'anticiprofloxacine.

II.4 Application de la Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (SIE) pour la détection de la ciprofloxacine

La spectroscopie d'impédance électrochimique a été choisie comme méthode de détection de la ciprofloxacine. Cette technique permet de suivre l'évolution des phénomènes physico-chimiques prenant place à l'électrode grâce à l'étude des modifications électrochimiques du support. Outre le fait qu'il s'agisse d'une méthode non destructive, elle offre la possibilité de réaliser la détection en l'absence de marquage supplémentaire de l'analyte cible. Le polymère pyrrolique conducteur joue alors le rôle de transducteur, ce qui permet d'observer directement chaque nouvel événement à sa surface.

Chacune des étapes de modification de la surface du transducteur pour l'élaboration du biocapteur est caractérisée grâce à cette technique. Avant d'aborder l'étude de l'immunocapteur, un rappel sur la théorie de la SIE est présenté.

II.4.a Notion de spectroscopie d'impédance électrochimique

II.4.a.1 Théorie

La SIE est une méthode basée sur la capacité d'un circuit à résister au flux d'électrons le traversant tout comme l'est la loi d'Ohm. Cette dernière est définie par la résistance de ce circuit comme le rapport entre le potentiel E et le courant I :

$$R = \frac{E}{I} \qquad \text{Équation II-6}$$

L'impédance électrochimique va plus loin dans la caractérisation du système dans le sens où elle ne se limite pas uniquement au phénomène résistif. Elle tient compte également des phénomènes capacitif et/ou inductif.

La spectroscopie d'impédance électrochimique est l'étude de la réponse d'un système électrochimique soumis à une perturbation volontaire. Généralement, la perturbation consiste

en une tension alternative (sinusoïdale) ΔE de faible amplitude imposée autour d'un point de fonctionnement E_c et à différentes fréquences. La réponse enregistrée correspond alors à un courant alternatif ΔI autour d'une valeur I_c . Il s'agit du mode potentiostatique. Cependant, il est tout à fait possible d'effectuer une mesure en mode galvanostatique en imposant une perturbation en courant et en mesurant une réponse en tension. Dans les deux cas de figure, comme ces deux grandeurs dépendent du temps, il est possible de les écrire pour une fréquence f , une pulsation $\omega = 2\pi f$ et un déphasage φ de la manière suivante :

$$E(t) = E_c + \Delta E(t) = E \sin(\omega t)$$

$$I(t) = I_c + \Delta I(t) = I \sin(\omega t + \varphi)$$

Comme il est difficile de résoudre de telles équations dans le domaine temporel, une simplification consiste à se placer dans le domaine des fréquences en utilisant les transformées de Fourier. En appliquant ces transformées à ces deux équations, l'impédance électrochimique $Z(\omega)$ devient un nombre complexe qui se définit alors comme le rapport entre $E(\omega)$ et $I(\omega)$ et s'écrit :

$$Z(\omega) = \frac{E}{I} e^{-j\varphi(\omega)} = |Z(\omega)| e^{j\varphi} \quad \text{ou} \quad Z(\omega) = \text{Re}[Z(\omega)] + j \text{Im}[Z(\omega)] \quad \text{Équation II-7}$$

avec $j = \sqrt{-1}$, $|Z(\omega)|$ le module de l'impédance, φ le déphasage du signal en sortie, $\text{Re}[Z(\omega)]$ et $\text{Im}[Z(\omega)]$ la partie réelle et imaginaire respectives de $Z(\omega)$.

Le choix du potentiel (ou du courant) et de la perturbation doivent être clairement indiqués et respectés lors des expérimentations. En effet, le système caractérisé doit être linéaire. Or, en électrochimie, de tels systèmes n'existent pas. Il faut alors adapter les paramètres de mesure aux systèmes pour se placer dans des conditions linéaires. Dans le cas de mesures d'impédance en mode potentiostatique, il faut veiller à ce que l'amplitude de la perturbation sinusoïdale en tension ΔE autour de la valeur E_c soit suffisamment faible pour que la fonction $I = f(E)$ représentant la réponse soit également linéaire (**Figure II-6**). Alors la réponse ΔI mesurée devra correspondre à la variation linéaire du courant stationnaire autour de la valeur I_c . La figure suivante représente la courbe $I = f(E)$ dans le cas d'un système rédox rapide sur lequel est imposé un signal alternatif ΔE autour de E_c . La perturbation ΔE doit rester faible pour rester dans un domaine linéaire de la courbe $I = f(E)$.

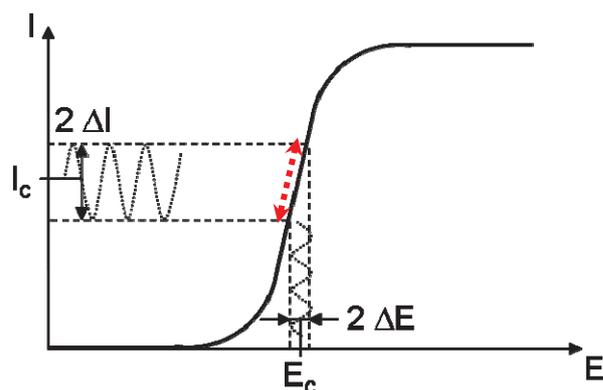


Figure II-6: Courbe de courant-tension stationnaire d'un système rédox « rapide » (ligne noire). Réponse sinusoïdale en courant à une perturbation sinusoïdale en potentiel sur une partie linéaire de la courbe courant – tension (flèche pointillée)

II.4.a.2 Représentation dans le plan de Nyquist

De nombreuses représentations de résultats sont possibles pour les utilisateurs de cette méthode. Celle préférée par les électrochimistes (spécialement dans les cas où un transfert électronique a lieu à l'électrode) est la représentation de Nyquist des électrochimistes (**Figure II-7**). Comme l'indique l'écriture cartésienne de l'**Équation II-7**, l'impédance possède une composante réelle et une composante imaginaire.

Le diagramme de l'impédance dans la représentation de Nyquist des électrochimistes consiste à représenter l'opposé de la partie imaginaire $-\text{Im}[Z(\omega)]$ de $Z(\omega)$ en fonction de la partie réelle $\text{Re}[Z(\omega)]$. Chaque point du diagramme correspond aux valeurs des composantes réelle ou imaginaire de l'impédance à une certaine fréquence. Ils correspondent également à l'extrémité du vecteur de l'impédance donné par l'**Équation II-7** en coordonnée polaire ayant pour longueur le module $|Z(\omega)|$ et pour angle φ .

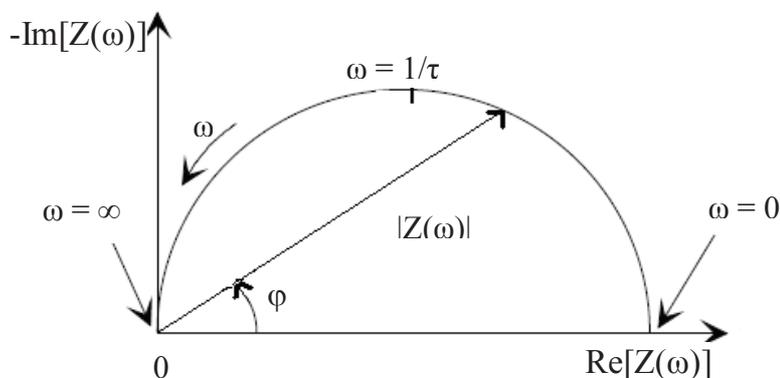


Figure II-7: Représentation des valeurs d'impédance dans le plan de Nyquist des électrochimistes

II.4.a.3 Les schémas électriques équivalents

L'exploitation des données fournies par les mesures de spectroscopie d'impédance est généralement obtenue en modélisant le système étudié par un circuit électrique équivalent. Avant d'entreprendre cette modélisation, il faut tout de même prendre un temps de réflexion pour établir un modèle fiable qui a un sens physique. En effet, le choix des composants électriques ainsi que leur ordre d'apparition est déterminant dans la compréhension des phénomènes physiques ayant lieu à l'électrode de travail. L'ensemble des processus physico-chimiques se déroulant à différentes interfaces (électrode/solution, électrode/film ou film/solution, etc...), il faut alors traduire chacun de ces phénomènes en termes de composants électrique et diélectrique puis les associer ensuite judicieusement en série ou en parallèle. Des étapes simultanées seront donc représentées par une association de processus en parallèle tandis que les étapes successives le seront par des processus branchés en série.

Dans le cas général d'une électrode (plane) mise en contact avec un électrolyte et en présence d'une sonde rédox, le circuit électrique équivalent émis par Randles est le plus fréquemment utilisé (**Schéma II-8**).

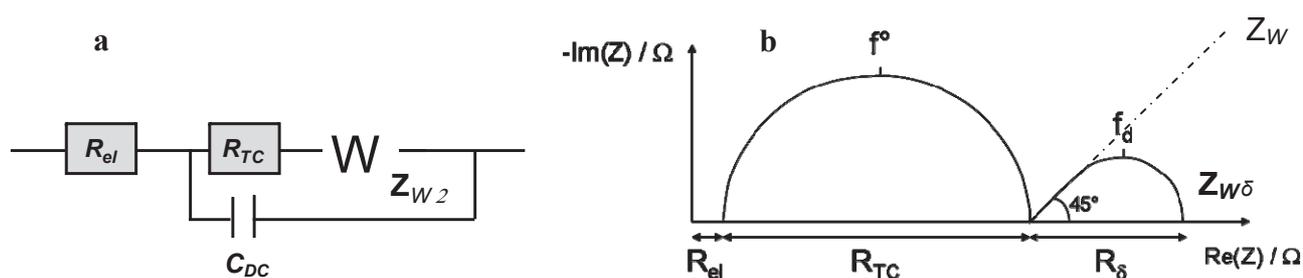


Schéma II-8: a- Circuit électrique équivalent de Randles caractérisant une électrode en contact avec une solution. b- Représentation schématique de l'impédance de Randles dans le plan de Nyquist des électrochimistes. R_{el} : résistance de l'électrolyte, R_{TC} : résistance de transfert de charge électronique, C_{DC} : capacitance de double couche, Wz : impédance de Warburg semi-infinie, Wz_{δ} : impédance de Warburg limitée

Le premier paramètre à considérer résulte de la mise en contact de l'électrode avec la solution électrolytique. Il correspond à la résistance de l'électrolyte appelée R_{el} . Cette valeur dépend essentiellement du type d'électrolyte, de la force ionique, de la température et de la surface géométrique de l'électrode. A haute fréquence, elle vaut:

$$Z_{R_{el}}(\omega) = R_{el}$$

Ensuite, la capacitance de double couche, C_{DC} , représente la charge globale stockée à l'interface électrode/solution. Elle se forme par la charge naturelle du matériau d'électrode qui induit une accumulation des ions (anions ou cations) à la surface de l'électrode créant ainsi un condensateur. Son impédance est donnée par :

$$Z_{C_{DC}}(\omega) = 1/j\omega C$$

La résistance de transfert de charge électronique, R_{TC} , correspond au flux de courant produit par des réactions électrochimiques à l'interface de l'électrode lorsque le transfert d'électron a lieu entre une espèce électroactive et l'électrode.

$$Z_{R_{TC}}(\omega) = R_{TC}$$

En dernier lieu, l'impédance de Warburg Z_W traduit l'impédance du courant dû aux phénomènes de diffusion de l'espèce électroactive vers la surface conductrice. Bien qu'il existe trois types de Warburg, l'attention sera portée sur deux d'entre eux, selon que la diffusion opère dans une couche semi-infinie (diffusion naturelle) ou dans une couche finie. Le premier représente une diffusion semi-infinie (ou diffusion naturelle en l'absence de convection). Le second, lui, est valable dans le cas où la couche de diffusion δ est connue et fixe (cas des électrodes à disque tournant, des microélectrodes ou des membranes perméables). Ce comportement se traduit alors par la présence d'une pente à 45° dans le diagramme de Nyquist des électrochimistes. Cette pente est constante pour le premier cas. En revanche, pour la diffusion limitée, une résistance peut être attribuée pour les faibles valeurs de fréquences. On la note Z_{W_δ} . Deux équations permettent de relier plusieurs paramètres importants pour un Warburg limité (**Schéma II-8-b**). La première indique le lien entre le temps de relaxation τ_δ à l'épaisseur de la couche de diffusion δ :

$$\tau_\delta = \frac{\delta^2}{D_k} \quad \text{Équation II-8}$$

La seconde établit la relation entre la fréquence au sommet de la boucle de diffusion f° et τ_δ :

$$f^\circ = \frac{2,54}{2\pi\tau_\delta} \quad \text{Équation II-9}$$

La SIE sépare les courants faradiques des courants capacitifs. Ainsi, dans le circuit de Randles, les résistances de transfert de charge et de Warburg ($R_{TC} + Z_{W_\delta}$) en série sont associées en parallèle avec la capacitance de double couche C_{DC} puisque le courant total traversant la surface active est la somme des contributions issues des processus faradique (I_F)

et capacitif (I_C). Finalement, R_{el} est associée en série au précédent circuit car l'ensemble des courants doivent passer par la résistance électrolytique⁴¹.

Dans le cas d'électrodes modifiées par un matériau peu perméable, il peut s'avérer nécessaire de rajouter des contributions électriques et diélectriques supplémentaires pour tenir compte soit du matériau soit de l'interface matériau/solution.

II.4.b Principe de l'immunocapteur

La spectroscopie d'impédance électrochimique a été choisie pour réaliser la détection de la ciprofloxacine en solution. Les capteurs impédancemétriques traditionnels sont capables de déceler la fixation d'une molécule/couche supplémentaire à la surface de l'électrode. Cette molécule peut être soit un anticorps comme dans le cas présent, soit un brin d'acide désoxyribonucléique (ADN)⁴² soit une enzyme. Un tel comportement se traduit par une augmentation de la valeur de l'impédance mesurée qui peut se comparer à une augmentation de la résistivité de l'assemblage immobilisé. Contrairement aux capteurs décrits dans la littérature, ce capteur repose sur l'idée de la dissociation du complexe modèle antigène/anticorps spécifique ($CFM/Ac_{spé}$) lors de l'augmentation de la concentration en antibiotique en solution. Cette technique électrochimique permettant d'obtenir des informations sur les étapes élémentaires qui forment le système électrochimique global, il est alors possible de suivre la décomplexation progressive de $Ac_{spé}$ pour chaque incubation. De ce fait, théoriquement, le système devant présenter la plus forte valeur d'impédance sera une électrode modifiée par le polypyrrole et ayant subi le greffage chimique du modèle de l'antigène suivi de l'immobilisation de l'anticorps primaire. L'ajout progressif d'analyte dans le milieu réactionnel devrait alors s'accompagner d'une diminution progressive de l'impédance du système.

Les mesures d'impédance sont réalisées en présence d'une sonde électrochimique, ici le couple $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}/[Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$ (10^{-3} mol.L⁻¹), ce qui permet d'observer le phénomène de transfert de charge électronique de l'espèce rédox mais également sa diffusion à travers le film polymère. Les contraintes supplémentaires liées à la diffusion de la sonde rédox qui évolue avec la présence de ciprofloxacine en solution sont donc mises en évidence ici.

Le couple $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}/[Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$ est largement utilisé dans la littérature^{43, 44}. Il a l'avantage d'être cinétiquement rapide. Par ailleurs, la présence des deux espèces du couple permet de réaliser les mesures d'impédance à l'équilibre.

II.4.c Choix du modèle électrique équivalent

Le diagramme de Nyquist obtenu dans une solution de 10^{-3} mol.L⁻¹ de ferri/ferrocyanure de potassium d'une électrode de carbone vitreux modifiée par du polypyrrole-NHS et le modèle de l'antibiotique (CFM) est donné dans la **Figure II-8**.

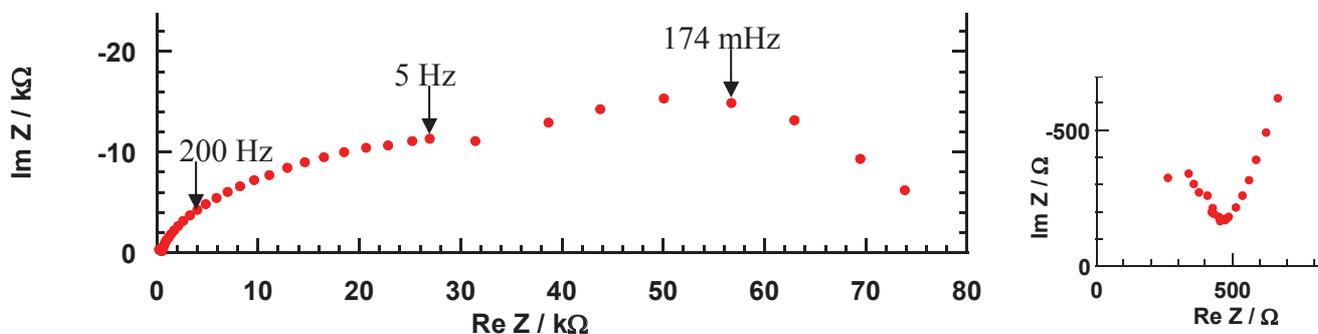


Figure II-8: Diagramme de Nyquist obtenu pour une électrode de carbone vitreux ($\varnothing = 3$ mm) modifiée par un film de poly(pyrrole-NHS) et incubée dans une solution de modèle antibiotique (CFM) (1.10^{-2} mg.mL⁻¹). Sonde rédox : $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}/[Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$ 1.10^{-3} mol.L⁻¹ dans le tampon phosphate 1.10^{-2} mol.L⁻¹, pH = 7,5. Vitesse de rotation : $\Omega = 500$ tr.min⁻¹, fréquences : 500 kHz à 0,01 Hz, $E_c = 0,2$ V vs. ECS, $\Delta E = 5$ mV rms, $T =$ Température ambiante

Ce diagramme est complexe. A première vue, il fait apparaître deux boucles fortement décentrées. Cependant en traitant les différentes données d'impédance obtenues aux différentes étapes de la construction de l'immunocapteur, il apparaît distinctement que la partie du spectre (à haute fréquence) est composée de deux contributions distinctes.

Deux hypothèses ont pu être raisonnablement formulées d'après le paragraphe §II.4.a.3 :

- présence d'une boucle liée au transfert de charge dû à la présence de la sonde rédox.
- présence d'une boucle liée à la diffusion de cette même sonde due à la présence du polymère peu perméable (cf. §II.3.a) qui entraîne une faible diffusion de la sonde à travers le film, même à l'équilibre.

Enfin, puisque le film polymère à la surface de l'électrode est peu perméable, la troisième hypothèse est une contribution électrique et diélectrique liée aux propriétés ioniques du film ou de son interface avec la solution (résistance de la membrane, des pores, capacité de l'interface film/solution).

Le circuit électrique équivalent choisi de manière à traduire les différents phénomènes électrochimiques en éléments électriques est donné sur le **Schéma II-9**.

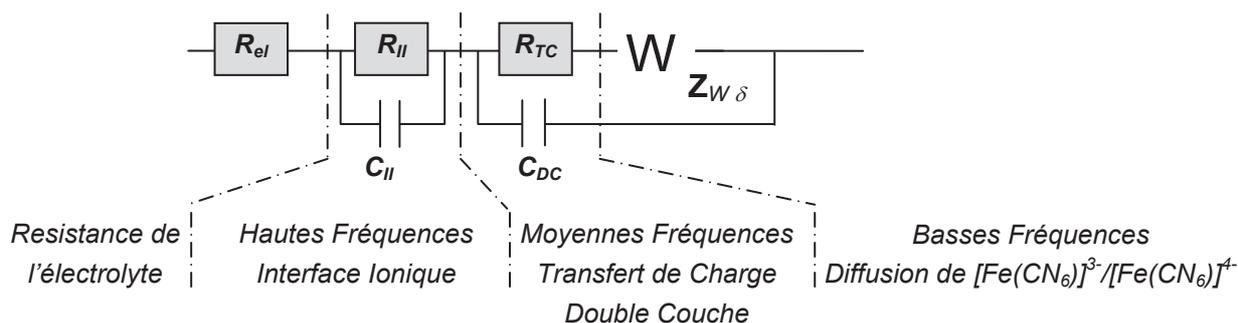


Schéma II-9: Circuit électrique équivalent choisi pour les systèmes étudiés : électrode de carbone vitreux modifiée par le film de poly(pyrrole-NHS)-CFM ; poly(pyrrole-NHS)-CFM-Ac en présence du couple rédox $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}/[Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$ ($1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$)

Ce circuit équivalent est composé de quatre phénomènes distincts correspondant à quatre domaines de fréquences sur le spectre expérimental. Le premier concerne le domaine à très haute fréquence [500 kHz, 50 kHz] où apparaît la résistance due à la chute ohmique de la solution électrolytique R_{el} . Dans la gamme des hautes fréquences, entre 50 kHz et 80 Hz, le demi-cercle est attribué au transfert ionique à l'interface film/solution qui est donc assimilé à une résistance R_{II} (résistance ionique de l'interface) en parallèle avec un condensateur C_{II} (capacitance au niveau de l'interface film/solution). Les fréquences moyennes, entre 80 Hz et 5 Hz ont, quant à elles, été attribuées aux processus liés aux transferts de charge au niveau de l'électrode. Ce phénomène est modélisé par une résistance R_{TC} (transfert de charge) et un condensateur C_{DC} (capacitance de double couche) en parallèle. Le dernier phénomène, dont la fréquence caractéristique est de 174 mHz correspond au phénomène de diffusion de la sonde rédox intervenant dans le film immobilisé à la surface de l'électrode. Le circuit électrique élémentaire utilisé dans le cas d'une diffusion δ limitée est un Warburg avec couche de diffusion finie noté $Z_{W\delta}$. Il peut être intéressant de constater que ce modèle comporte le circuit équivalent de Randles en complexifiant celui-ci par les phénomènes liés à l'interface film polymère solution.

Sur la **Figure II-9**, la ligne en pointillés représente l'ajustement obtenu avec les paramètres du circuit électrique équivalent choisi. Il est important de noter le très bon accord entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées (●). Les interfaces n'étant pas parfaitement planes, les capacitances ont été remplacées par des éléments à phase constante (CPE) lors de l'ajustement afin de rendre compte de l'inhomogénéité des surfaces et des interfaces.

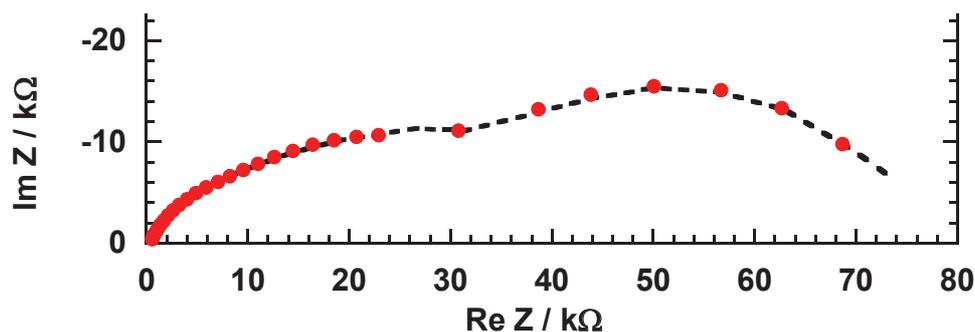


Figure II-9: Diagramme de Nyquist précédent (●) (Figure II-8), valeurs issues de la modélisation à l'aide du modèle électrique équivalent présenté dans le Schéma II-9 (traits pointillés)

II.4.d Ancrage de l'anticorps spécifique dirigé contre la ciprofloxacine

L'enregistrement d'un spectre d'impédance électrochimique d'une électrode ayant subi une incubation dans une solution contenant l'anticorps primaire est donné sur la Figure II –10-ii. La modification importante de l'allure générale du spectre d'impédance indique que l'immersion d'une électrode modifiée dans une solution contenant l'anticorps spécifique ($Ac_{spé}$) mène à une évolution de l'état de surface du biocapteur.

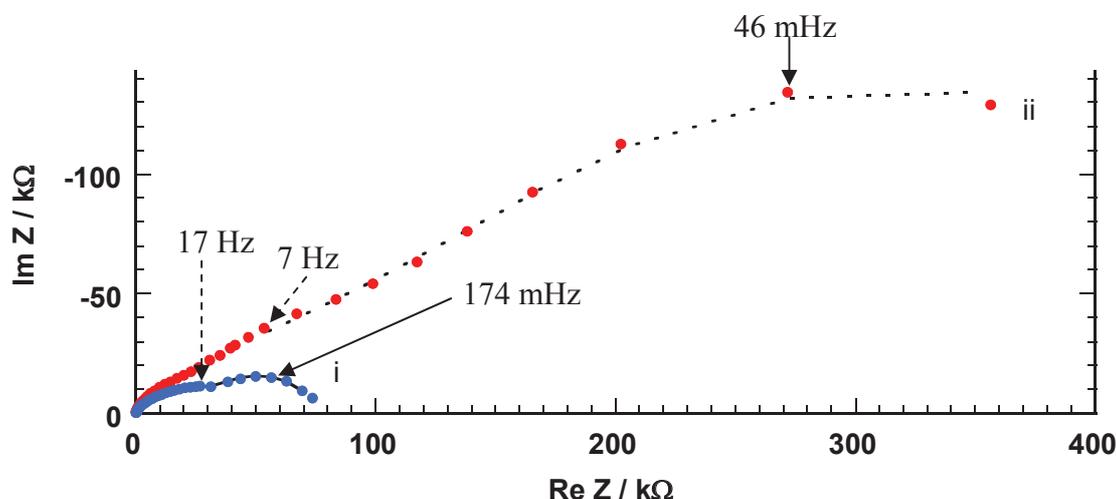


Figure II-10: Diagrammes de Nyquist réalisés avec une électrode de carbone vitreux ($\varnothing = 3 \text{ mm}$) modifiée par i- un film de poly(pyrrole-NHS)-CFM et ii- ensuite incubée dans une solution de tampon phosphate ($1.10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$) contenant l'anticorps anticiprofloxacine ($15 \mu\text{L}$ – dilution 1/100 dans le tampon phosphate. Conditions expérimentales identiques). Données expérimentales (points), données de simulation (courbes pointillées).

Sonde rédox : $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans le tampon phosphate $1.10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$.
Vitesse de rotation : $\Omega = 500 \text{ tr.min}^{-1}$, fréquences : 50 kHz à $0,01 \text{ Hz}$, $E_c = 0,2 \text{ V vs. ECS}$, $\Delta E = 5 \text{ mV rms}$,
 $T = \text{Température ambiante}$

Le Tableau II-3 donne les paramètres obtenus par ajustement entre les données de la Figure II-10 et le circuit équivalent (Schéma II-9).

Comme attendu, la valeur de la résistance de l'électrolyte n'est pas modifiée par l'incubation de l'électrode dans la solution d'anticorps ($R_{el} = 7,7 \pm 0,5 \Omega$). La première contribution attribuée à l'interface ionique (film/solution) est fortement influencée par la présence de l'anticorps. La résistance est multipliée par deux alors que la capacitance est divisée de moitié environ. Les deux autres paramètres qui sont l'angle de décentrage, α_1 , du demi-cercle (qui représente la mesure de l'inhomogénéité de l'interface) et la fréquence de relaxation f_1° du phénomène, diminuent légèrement après incubation dans la solution d'anticorps. Puisque la résistance et la capacitance évoluent inversement, l'effet de la présence de l'anticorps est surtout un effet géométrique. L'encombrement stérique provoqué par l'anticorps diminue la surface de l'interface ce qui augmente la résistance et diminue la capacitance. Cette interface, lieu de la complexation de l'anticorps, devient plus difficile à franchir par les ions après incubation de l'anticorps. C'est une preuve indirecte de la formation d'une couche d'anticorps sur l'électrode modifiée.

La seconde contribution à moyenne fréquence est attribuée au transfert de charge à l'interface polymère/électrode et à la capacitance de double couche. Ici, la résistance est multipliée par un facteur supérieur à trois alors que la capacitance est divisée par 1,4. L'angle de décentrage augmente légèrement alors que la fréquence diminue d'un facteur 2,5. La résistance de transfert est fortement influencée par l'encombrement stérique dû à la présence de l'anticorps. La quantité de ferri/ferrocyanure arrivant à l'électrode pour être réduit et oxydé est beaucoup plus faible. Parallèlement, la capacité de double couche située en solution (à l'extérieur du film) est légèrement diminuée. Ceci pourrait venir d'une augmentation de sa longueur due à la présence de l'anticorps dans la double couche provoquant une légère modification de la distribution des charges.

La dernière contribution basse fréquence a été attribuée à la diffusion dans une couche δ de la sonde rédox. La résistance de diffusion a été multipliée par plus de huit tandis que la constante de temps du phénomène a été multipliée par presque cinq. Puisque R_δ est proportionnel à l'épaisseur de la couche de diffusion :

$$R_\delta \propto \delta / D_k,$$

et que τ est proportionnel au carré de l'épaisseur de la couche de diffusion :

$$\tau = \delta^2 / D_k,$$

il est possible de supposer que δ a fortement augmenté après incubation de l'anticorps ($\delta < 1 \text{ cm}$). L'angle de Warburg est inférieur à 45° ce qui montre une hétérogénéité de la diffusion.

Tableau II-3: valeurs issues de la simulation par le circuit équivalent choisi des résultats expérimentaux donnés dans la **Figure II-10**. Logiciel de simulation : Z-view

	Poly(pyrrole-NHS)-CFM	Poly(pyrrole-NHS)-CFM-Ac_{spé}
$R_{el} / \Omega.cm^2$	7,6	8,0
$R_{II} / \Omega.cm^2$	433 ± 12	1030 ± 30
$C_{II} / \mu F.cm^{-2}$	1,51	0,82
$\alpha_1 / ^\circ$	19,7	15,8
F_1° / Hz	244	189
$R_{TC} / \Omega.cm^2$	1495 ± 45	4930 ± 150
$C_{DC} / \mu F.cm^{-2}$	5,96	4,42
$\alpha_2 / ^\circ$	23,4	25,1
F_2° / Hz	17,9	7,3
$R_\delta / \Omega.cm^2$	3560 ± 110	29420 ± 880
τ_δ / s	2,65	12,9
$\alpha_D / ^\circ$	31,1	36,5

Les changements importants observés pour chaque phénomène physique peuvent trouver leurs origines dans la taille des biomolécules immobilisées. En effet, la taille de l'anticorps spécifique est de l'ordre de 150 kDa alors que celle du modèle *CFM* seulement 300 Da. L'encombrement stérique est donc beaucoup plus important lorsque l'anticorps est greffé sur le biocapteur, ce qui explique les variations au niveau des paramètres de transfert ionique, de transfert de charge et de diffusion de l'espèce rédox.

II.4.e Détection de la ciprofloxacine par impédancemétrie

II.4.e.1 Détection par impédancemétrie

La dernière étape du capteur consiste donc à réaliser le dosage de l'antibiotique cible, la ciprofloxacine. Pour s'assurer de la faisabilité du système, une incubation dans une solution de $1 \mu g.mL^{-1}$ est menée. Cette injection devrait s'accompagner d'une diminution globale de l'impédance électrochimique du biocapteur, en accord avec le déplacement en solution de l'Ac_{spé}. La **Figure II-11** représente l'évolution des spectres d'impédance après rinçage dans le tampon phosphate suite à cette nouvelle incubation.

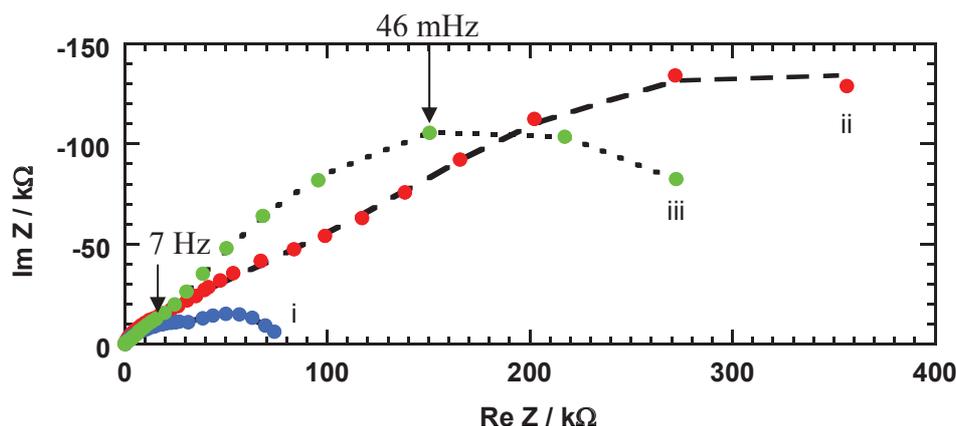


Figure II-11 : Diagrammes de Nyquist réalisés avec une électrode de carbone vitreux ($\varnothing = 3 \text{ mm}$) modifiée par i- un film de poly(pyrrole-NHS)-CFM, ii- un film de poly(pyrrole-NHS)-CFM- $\text{Ac}_{\text{spé}}$ et iii- un film de poly(pyrrole-NHS)-CFM suite à une incubation de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ciprofloxacine. Conditions expérimentales identiques). Données expérimentales (points), données de simulation (courbes). Sonde rédox : $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans le tampon phosphate $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$. Vitesse de rotation : $\Omega = 500 \text{ tr.min}^{-1}$, fréquences : 50 kHz à 0,01 Hz, $E_c = 0,2 \text{ V vs. ECS}$, $\Delta E = 5 \text{ mV rms}$, $T = \text{Température ambiante}$

Là encore, trois boucles distinctes sont observables. En revanche, la courbe **iii** fait état d'une chute relativement importante de l'impédance du système. Il est alors raisonnable de penser que le système répond de la manière attendue, à savoir un décrochage d'une partie de la couche d' $\text{Ac}_{\text{spé}}$ fixée sur le modèle d'antibiotique *CFM* par la présence de *CF*.

En dernier lieu, et après la caractérisation complète du système élaboré, la détection de concentrations croissantes en ciprofloxacine est réalisée. Pour cela, les électrodes modifiées par le système poly(pyrrole-NHS)-CFM- $\text{Ac}_{\text{spé}}$ subissent des incubations successives dans des solutions de concentrations croissantes en *CF* comprises entre $10^{-12} \text{ g.mL}^{-1}$ (3 pmol.L^{-1}) et $10^{-6} \text{ g.mL}^{-1}$. En observant les diagrammes de Nyquist donnés dans la **Figure II-12**, il apparaît qu'une incubation de *CF* sur l'immunocapteur induit une diminution notable des boucles de R_{II} et R_{TC} . Ces résultats semblent en accord avec une perte d'anticorps en solution ce qui se traduit par une diminution de l'encombrement stérique à l'interface film polymère-solution provoquant un déplacement des ions et de la sonde rédox à travers le film plus aisé. Ces variations d'impédances sont observables pour une concentration de ciprofloxacine allant de $1.10^{-12} \text{ g.mL}^{-1}$ à $1.10^{-6} \text{ g.mL}^{-1}$.

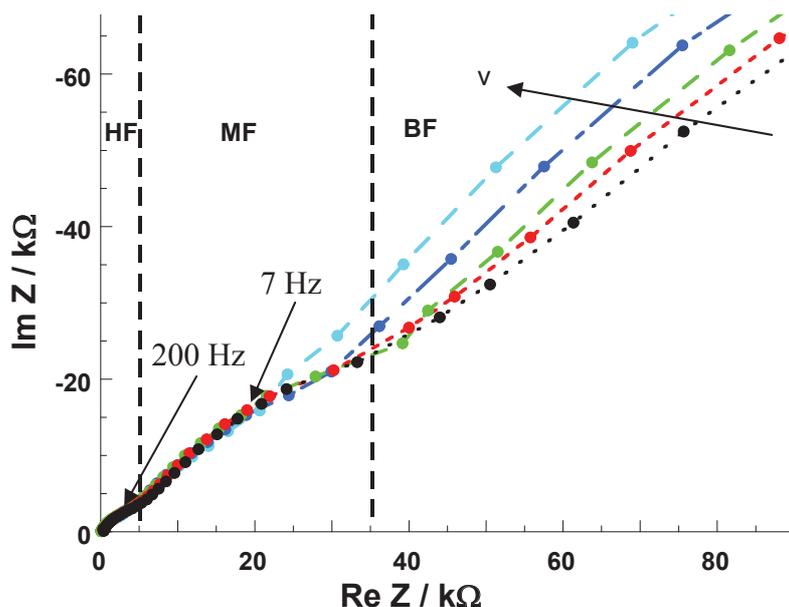


Figure II-12 : Diagrammes de Nyquist d'une électrode modifiée avec l'anticorps spécifique après une immersion dans une solution de ciprofloxacine. i- 1 pg.mL⁻¹ ; ii-10 pg.mL⁻¹ ; iii- 100 pg.mL⁻¹ ; iv- 100 ng.mL⁻¹ et v-1 μg.mL⁻¹. Sonde rédox : [Fe^{III}(CN)₆]³⁻/[Fe^{II}(CN)₆]⁴⁻ 1.10⁻³ mol.L⁻¹ dans le tampon phosphate 1.10⁻² mol.L⁻¹, pH = 7,5. Vitesse de rotation : Ω = 500 tr.min⁻¹, fréquences : 50 kHz à 0,01 Hz, E_c = 0,2 V vs. ECS, ΔE = 5 mV rms, T = Température ambiante. Données expérimentales (●), valeurs issues de la modélisation à l'aide du modèle électrique équivalent utilisé (traits pointillés)

Dans le **Tableau II-4** sont répertoriées les valeurs obtenues par ajustement des spectres d'impédance pour les différentes concentrations de ciprofloxacine mise en présence d'un biocapteur. En présence de ciprofloxacine, les résistances de l'interface ionique et de transfert de charge diminuent régulièrement avec l'augmentation de la concentration.

Les autres paramètres sont peu exploitables. Les deux capacités sont de l'ordre du microfarad ce qui confirme qu'il s'agit de capacités interfaciales. La résistance de diffusion est plus faible que celle sans ciprofloxacine mais n'a pas tendance à diminuer comme il était possible de l'envisager.

Tableau II-4: valeurs issues de l'ajustement par le circuit équivalent choisi des résultats expérimentaux pour les systèmes électrode modifiée et électrode modifiée-Anticorps avec et sans incubation de ciprofloxacine (incubation de 30 min) à différentes concentrations (**Figure II-12**). P : film de polypyrrole

État de modification	[CF] / pg.mL ⁻¹	R _{el} / Ω.cm ²	R _{II} / Ω.cm ²	C _{II} / μF.cm ⁻²	α ₁ / °	F ₁ ° / Hz	R _{TC} / Ω.cm ²	C _{DC} / μF.cm ⁻²	α ₂ / °	F ₂ ° / Hz	R ₈ / Ω.cm ²	τ ₈ / s	α _D / °
P-CFM	0	7,6	433 ± 12	1,51	19,7	244	1495 ± 45	5,96	23,4	17,9	3560 ± 110	2,65	31,1
P-CFM-Ac_{spe}	0	8,0	1030 ± 30	0,82	15,8	189	4930 ± 150	4,42	25,1	7,3	29420 ± 880	12,9	36,5
P-CFM-Ac_{spe}	1	8,5	318 ± 10	0,99	22,3	504	3330 ± 100	12,2	22,8	3,9	16640 ± 500	6,1	43,1
P-CFM-Ac_{spe}	10	8,4	310 ± 10	1,21	22,6	424	2830 ± 85	12,3	21,2	4,6	16480 ± 490	6,9	42,7
P-CFM-Ac_{spe}	100	6,0	275 ± 9	1,20	21,6	483	2690 ± 80	12,2	21,6	4,9	16560 ± 500	7,2	44,0
P-CFM-Ac_{spe}	10 ⁵	7,4	240 ± 8	1,28	22,2	518	1643 ± 50	10,7	19,4	9,0	17400 ± 530	7,4	43,5
P-CFM-Ac_{spe}	10 ⁶	8,0	162 ± 5	1,53	20,4	643	1532 ± 50	12,9	25,7	8,0	18126 ± 550	6,5	43,9

La **Figure II-13** montre les variations de la somme entre la résistance R_{II} et la résistance R_{TC} (ΔR_{II+TC}) en fonction de la concentration en ciprofloxacine. Plus explicitement, $\Delta R_{II+TC} = (R_{II} + R_{TC})_{Acspé} - (R_{II} + R_{TC})_{Acspé+CF}$. Ce graphique présente une évolution linéaire de ΔR_{II+TC} en fonction du logarithme de la concentration en antibiotique utilisée, $\log([CF])$. Cette linéarité a pu être mise en évidence pour des concentrations comprises entre 10^{-12} et 10^{-6} g.mL⁻¹ avec une pente de 342,9 $\Omega.cm^2$ /unité log de concentration en CF ($R^2 = 0.997$). D'après la droite, le seuil de détection pour les mesures impédancemétriques est de 10^{-12} g.mL⁻¹.

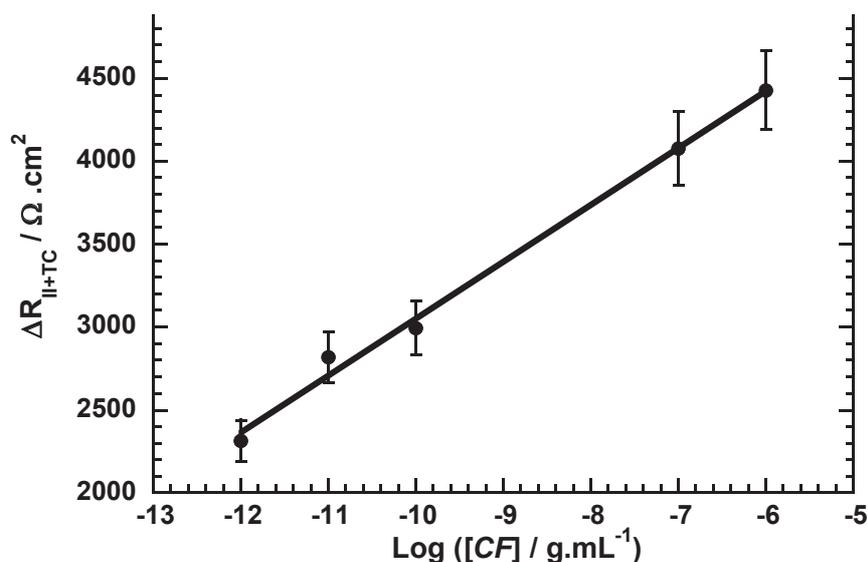


Figure II-13: Courbe d'étalonnage pour le capteur à ciprofloxacine élaboré indiquant la variation des résistances de l'interface ionique et de transferts de charge ΔR_{II+TC} en fonction du logarithme de la concentration en ciprofloxacine. Les points sont obtenus à partir du Tableau II-4

II.4.e.2 Détection par conductimétrie

La spectroscopie d'impédance électrochimique reste une technique lourde pour les temps d'acquisition nécessaires sur les larges gammes de fréquences balayées et pour l'obtention de valeurs significatives par l'ajustement à l'aide du circuit électrique équivalent. Dans le but de rendre plus attractive l'utilisation de cet immunocapteur pour la détection de la ciprofloxacine, l'étalonnage par conductimétrie a été entrepris. Il consiste à réaliser les séries de mesures à une fréquence donnée en appliquant une perturbation sous la forme d'une tension électrique alternative (tout comme les mesures d'impédances classiques). Chaque point composant un diagramme de Nyquist représentant la partie réelle et la partie imaginaire de $Z(\omega)$, il est possible de connaître le module de l'impédance $|Z(\omega)|$ pour une fréquence quelconque. Comme le montre la **Figure II-14**, la variation la plus importante visible sur les diagrammes d'impédance entre les électrodes de types poly(pyrrole-NHS)-CFM,

poly(pyrrole-NHS)-CFM-Ac_{spé} et poly(pyrrole-NHS)-CFM-Ac_{spé} incubées dans une solution de CF a été décelée à 1 Hz.

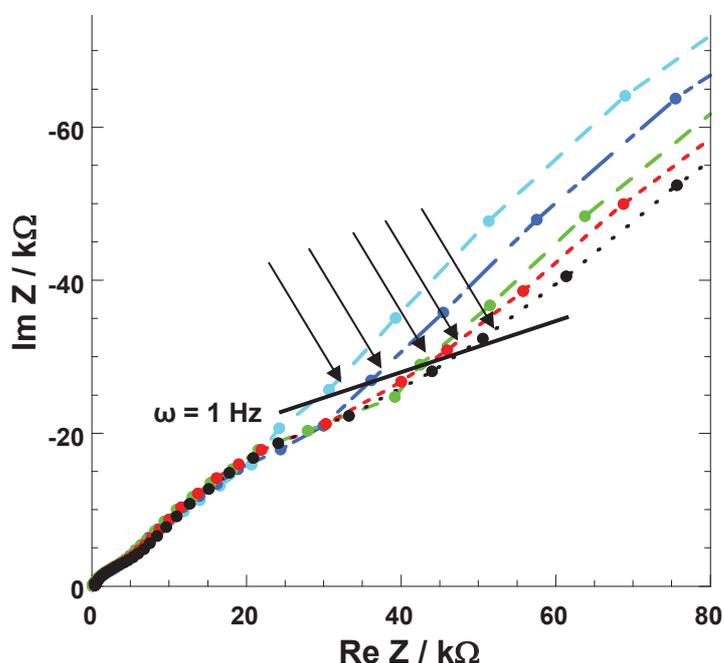


Figure II-14: La droite indique la fréquence utilisée pour les mesures conductimétriques ($\omega = 1$ Hz) en reprenant les mesures impédancemétriques de la **Figure II-12**

Il est intéressant de noter que cette fréquence se situe à la fin de la boucle en moyenne fréquence. A cette fréquence, le module de l'impédance est proche de la somme des résistances R_{II} et R_{TC} . Cette méthode a permis de mettre en évidence une relation linéaire pour la gamme de concentration de 1.10^{-12} à 1.10^{-6} g.mL⁻¹ de pente $215 \pm 11 \Omega.cm^{-2}/unité \log$ ($R^2 = 0,9882$). La pente obtenue par conductimétrie (**Figure II-15-i**) est plus faible que celle obtenue par impédancemétrie (**Figure II-13**). Ceci est logique puisque la contribution de la résistance de l'électrolyte et de la résistance de diffusion existent entièrement ou en partie dans la mesure conductimétrique alors qu'elles sont inexistantes après calculs des résistances pures après ajustements. La mesure conductimétrique a, même avec une sensibilité plus faible, de nombreux avantages comme la rapidité et la simplicité de réalisation.

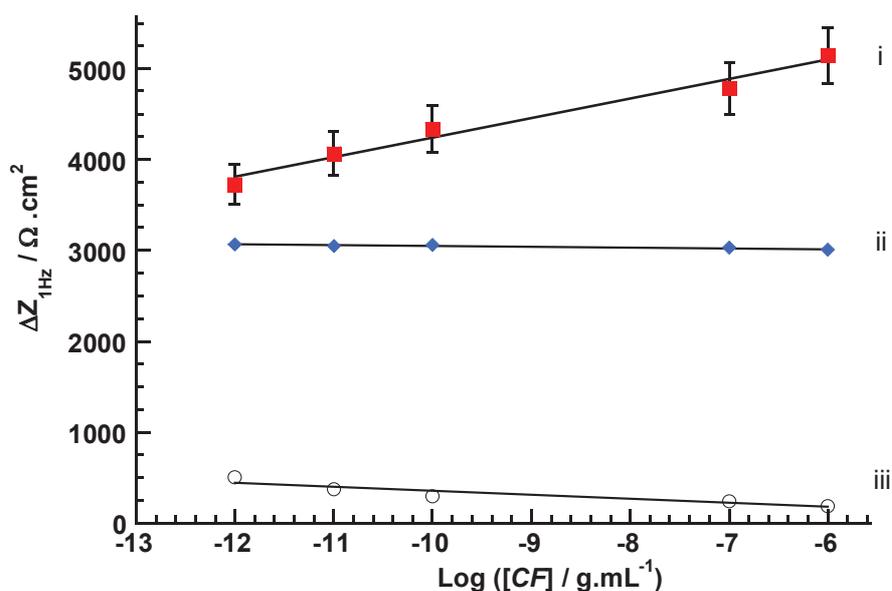


Figure II-15: Courbes d'étalonnage pour le capteur à ciprofloxacine élaboré traduisant la variation du module de l'impédance $\Delta Z_{1 \text{ Hz}}$ à $\omega = 1 \text{ Hz}$ en fonction de la concentration en : i- ciprofloxacine, ii- enrofloxacine. iii- même mesures que la courbe i pour une électrode dont l'immobilisation de l' $Ac_{spé}$ n'a pas été effectuée

Deux types de contrôle ont été réalisés dans le cadre de l'élaboration de cette méthode de détection. Dans le premier cas, la spécificité du biocapteur a été étudiée. Pour cela, l'analyte initialement utilisé (CF) a été remplacé par de l'enrofloxacine (EF) qui est un autre antibiotique appartenant à la famille des fluoroquinolones (**Schéma II-10**).

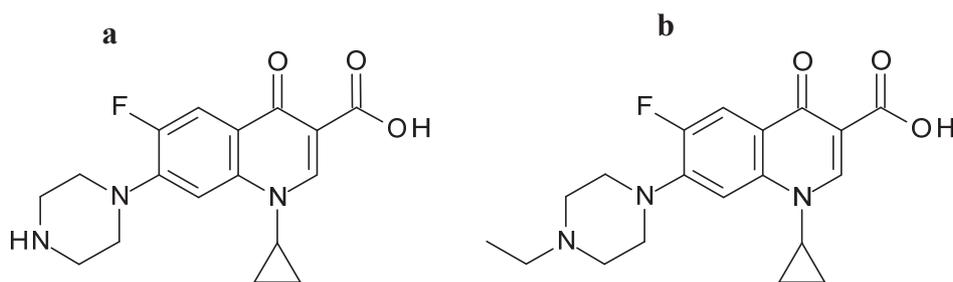


Schéma II-10 : Structure des deux antibiotiques utilisés. a- la ciprofloxacine (CF) et b- l'enrofloxacine (EF)

La première incubation de l'électrode, à une concentration de $1.10^{-12} \text{ g.mL}^{-1}$, indique une variation relativement importante de la valeur de $\Delta Z_{1 \text{ Hz}}$ ($3000 \text{ } \Omega.\text{cm}^2$) (**Figure II-15-ii**). Cet évènement traduit un décrochage partiel de la couche d'anticorps spécifique. Cependant, les incubations successives du capteur pour des solutions plus concentrées en enrofloxacine ne montrent aucune variation du module de l'impédance à cette même fréquence (pente = $-8,522 \text{ } \Omega.\text{cm}^2/\text{unité log}$). De cette façon, l'immunocapteur peut être qualifié de

spécifique. La première réponse pourrait être attribuée à la forte similarité des structures entre *CF* et *EF*. Le groupement éthyle suffirait tout de même pour faire la différenciation aux plus fortes concentrations.

Finalement, le dernier contrôle a consisté à omettre l'étape d'immobilisation de l'anticorps spécifique sur le modèle de l'antigène. De telles électrodes soumises à des incubations successives de solution de *CF* devraient donc avoir non seulement des spectres d'impédances invariants avec le nombre d'incubations (puisque la décomplexation n'est pas possible) mais devraient avoir également une valeur de ΔR_{II+TC} extrêmement faible. La **Figure II-15-c** fait apparaître une variation quasi-nulle du module de *Z* quelque soit la concentration de ciprofloxacine utilisée pour l'incubation du capteur. La variation de l'impédance ne s'observe alors que dans la configuration où l'anticorps est présent sur la surface du film modifié.

Le **Tableau II-5** rassemble quelques exemples d'immunocapteurs impédancemétriques développés pour la détection de la ciprofloxacine (ou de structure similaire comme l'enrofloxacin). Le biocapteur élaboré au cours de ce travail de thèse est donc plus performant puisque testé dans des conditions similaires (tampon et pH), sa limite de détection est de 10^{-12} g.mL⁻¹ (différence d'un ordre de grandeur avec les moins performants). En revanche, il faut noter la limite de détection extrêmement basse du capteur ayant détecté la ciprofloxacine dans un échantillon de lait⁴⁵.

Tableau II-5: Tableau récapitulatif des capteurs impédancemétriques pour la détection de la ciprofloxacine ou de l'enrofloxacin issus de la littérature (de 2007 à 2010)

Antibiotique	Solvant	Sonde	Limite de détection	Référence
Ciprofloxacine	Tampon phosphate (pH=7,4)	Fe ^{III} / Fe ^{II} (10 mM)	10^{-9} g.mL ⁻¹	46
Ciprofloxacine	Tampon phosphate (pH=7)	Sans sonde / E = -1,4 V	$10 \cdot 10^{-12}$ g.mL ⁻¹	47
Ciprofloxacine	Lait (pH=7,4)	Fe ^{III} / Fe ^{II} (10 mM)	$100 \cdot 10^{-12}$ g.mL ⁻¹	45
Enrofloxacin	Tampon phosphate (pH=7,4)	Fe ^{III} / Fe ^{II} (2,5 mM)	10^{-9} g.mL ⁻¹	48
Ciprofloxacine	Tampon phosphate (pH=7,5)	Fe ^{III} / Fe ^{II} (1 mM)	10^{-12} g.mL ⁻¹	Ce travail

II.5 Conclusions du chapitre II

Ce chapitre relate l'élaboration d'un immunocapteur basé sur l'utilisation d'un film polypyrrolique pour l'immobilisation de molécules présentant une fonction amine.

Dans la première partie de ce chapitre, l'électropolymérisation du monomère pyrrole-NHS a permis le greffage (covalent) entre l'ester activé du monomère et la fonction NH_2 d'un fragment d'hapten d'une fluoroquinolone. Cet antibiotique étant efficace contre un nombre important d'agents pathogènes grâce à ses propriétés bactéricides, le développement d'un immunocapteur impédancemétrique pour les contrôles environnementaux et sanitaires a été conduit. L'interaction affine existant entre un antigène et son anticorps spécifique a été mise à contribution pour l'immobilisation de la glycoprotéine à la surface de l'assemblage moléculaire. La réalisation d'un capteur à affinité pour détecter l'antibiotique, appelé ciprofloxacine, a pu être entreprise. En utilisant les propriétés conductrices et la perméabilité du film polymère ou de l'ensemble de la couche déposée, une nouvelle méthode de détection impédancemétrique a été utilisée. Cette dernière s'est basée sur la décroissance du signal d'impédance électrochimique en présence de ferri/ferrocyanure pour un film polymère-modèle antigène-anticorps suite au déplacement en solution de ce dernier grâce à l'interaction anticorps-antigène. Le suivi de la décroissance du signal de l'impédance électrochimique en fonction de la concentration en analyte a permis de tracer une courbe d'étalonnage avec un seuil de détection de $1.10^{-12} \text{ g.mL}^{-1}$ et d'obtenir une réponse pour une gamme comprise entre 1.10^{-12} et $1.10^{-6} \text{ g.mL}^{-1}$.

De plus, l'immunocapteur développé a indiqué une bonne spécificité vis-à-vis d'une molécule dont la structure est très proche de la ciprofloxacine. Une variation de la conductance est visible lors de l'incubation du capteur avec une concentration de $1.10^{-12} \text{ g.mL}^{-1}$ en enrofloxacin. Les incubations suivantes n'ont cependant pas entraîné de nouvelles modifications.

Références bibliographiques

- (1) Van Bambeke, F.; Michot, J. M.; Van Eldere, J.; Tulkens, P. M. *Clin. Microbiol. Infec.* **2005**, *11*, 256-280.
- (2) Pestova, E.; Millichap, J. J.; Noskin, G. A.; Peterson, L. R. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *45*, 583-590.
- (3) Abadia, A. R.; Aramayona, J. J.; Munoz, M. J.; Pla Delfina, J. M.; Bregante, M. A. *Zentralbl. Veterinarmed. A* **1995**, *42*, 505-511.
- (4) Palu, G.; Valisena, S.; Ciarrocchi, G.; Gatto, B.; Palumbo, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 9671-9675.
- (5) Khodursky, A. B.; Zechiedrich, E. L.; Cozzarelli, N. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 11801-11805.
- (6) Brown, S. A. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1996**, *19*, 1-14.
- (7) Gendrel, D.; Chalumeau, M.; Moulin, F.; Raymond, J. *Lancet Infectious Diseases* **2003**, *3*, 537-546.
- (8) Lillenberg, M.; Litvin, S. V.; Nei, L.; Roasto, M.; Sepp, K. *Agronomy Research* **2010**, *8*, 807-814.
- (9) Cabello, F. C. *Environ. Microbiol.* **2006**, *8*, 1137-1144.
- (10) European Commission Council Regulation N° 37/2010 *Off. J. Eur. Union* **2010**, *L15*, 30.
- (11) Watkinson, A. J.; Murby, E. J.; Costanzo, S. D. *Water Res.* **2007**, *41*, 4164-4176.
- (12) Kemper, N. *Ecological Indicators* **2008**, *8*, 1-13.
- (13) Watkinson, A. J.; Murby, E. J.; Kolpin, D. W.; Costanzo, S. D. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 2711-2723.
- (14) Pascual-Reguera, M. I.; Parras, G. P.; Diaz, A. M. *Microchem. J.* **2004**, *77*, 79-84.
- (15) Mostafa, S.; El-Sadek, M.; Alla, E. A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 133-142.
- (16) Nagaralli, B. S.; Seetharamappa, J.; Melwanki, M. B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *29*, 859-864.
- (17) Cao, L. M.; Lin, H.; Mirsky, V. M. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *589*, 1-5.
- (18) Huet, A. C.; Charlier, C.; Singh, G.; Godefroy, S. B.; Leivo, J.; Vehniäinen, M.; Nielen, M. W. F.; Weigel, S.; Delahaut, P. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *623*, 195-203.
- (19) Idowu, O. R.; Peggins, J. O. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *35*, 143-153.
- (20) Maya, M. T.; Goncalves, N. J.; Silva, N. B.; Morais, J. A. *J. Chromatogr. B.* **2001**, *755*, 305-309.
- (21) Kmetec, V.; Kozjek, F.; Veber, M. *Int. J. Pharm.* **1999**, *176*, 225-230.
- (22) Neckel, U.; Joukhadar, C.; Frossard, M.; Jager, W.; Muller, M.; Mayer, B. X. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *463*, 199-206.
- (23) Vilchez, J. L.; Araujo, L.; Prieto, A.; Navalon, A. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *516*, 135-140.
- (24) Samanidou, V. F.; Demetriou, C. E.; Papadoyannis, I. N. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 623-629.
- (25) Yorke, J. C.; Froc, P. *J. Chromatogr. A* **2000**, *882*, 63-77.
- (26) Fierens, C.; Hillaert, S.; Van den Bossche, W. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *22*, 763-772.
- (27) Navalon, A.; Blanc, R.; Reyes, L.; Navas, N.; Vilchez, J. L. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *454*, 83-91.
- (28) Torriero, A. A. J.; Ruiz-Diaz, J. J. J.; Salinas, E.; Marchevsky, E. J.; Sanz, M. I.; Raba, J. *Talanta* **2006**, *69*, 691-699.

- (29) Torriero, A. A. J.; Salinas, E.; Raba, J.; Silber, J. J. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 109-115.
- (30) Haddour, N.; Chauvin, J.; Gondran, C.; Cosnier, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9693-9698.
- (31) Cosnier, S. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1701-1715.
- (32) Ionescu, R. E.; Cosnier, S.; Herzog, G.; Gorgy, K.; Leshem, B.; Herrmann, S.; Marks, R. S. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 403-408.
- (33) Cosnier, S. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 1260-1279.
- (34) Ionescu, R. E.; Herrmann, S.; Cosnier, S.; Marks, R. S. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 1741-1748.
- (35) Pinachoa, D. G.; Gorgy, K.; Cosnier, S.; Marco, M. P.; Sanchez-Baeza, F. J. *Irbm* **2008**, *29*, 181-186.
- (36) Fernandez, I.; Trueba, M.; Nunez, C. A.; Rieumont, J. *Surf. Coat. Technol.* **2005**, *191*, 134-139.
- (37) Cosnier, S.; Ionescu, R. E.; Herrmann, S.; Bouffier, L.; Demeunynck, M.; Marks, R. S. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7054-7057.
- (38) Baur, J.; Gondran, C.; Holzinger, M.; Defrancq, E.; Perrot, H.; Cosnier, S. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1066-1072.
- (39) Ionescu, R. E.; Cosnier, S.; Herrmann, S.; Marks, R. S. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8662-8668.
- (40) Abu-Rabeah, K.; Atias, D.; Herrmann, S.; Frenkel, J.; Tavor, D.; Cosnier, S.; Marks, R. S. *Langmuir* **2009**, *25*, 10384-10389.
- (41) Barsoukov, E.; Macdonald, J. R. *Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications* **2005**, Éd. Wiley and Sons.
- (42) Piro, B.; Haccoun, J.; Pham, M. C.; Tran, L. D.; Rubin, A.; Perrot, H.; Gabrielli, C. J. *Electroanal. Chem.* **2005**, *577*, 155-165.
- (43) Keighley, S. D.; Li, P.; Estrela, P.; Mighorato, P. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1291-1297.
- (44) Radi, A.-E.; Munoz-Berbel, X.; Lates, V.; Marty, J.-L. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1888-1892.
- (45) Tsekenis, G.; Garifallou, G. Z.; Davis, F.; Millner, P. A.; Pinacho, D. G.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M. P.; Gibson, T. D.; Higson, S. P. J. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9233-9239.
- (46) Garifallou, G. Z.; Tsekenis, G.; Davis, F.; Higson, S. P. J.; Millner, P. A.; Pinacho, D. G.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M. P.; Gibson, T. D. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 1412-1422.
- (47) Ionescu, R. E.; Jaffrezic-Renault, N.; Bouffier, L.; Gondran, C.; Cosnier, S.; Pinacho, D. G.; Marco, M. P.; Sanchez-Baeza, F. J.; Healy, T.; Martelet, C. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 549-555.
- (48) Wu, C.-C.; Lin, C.-H.; Wang, W.-S. *Talanta* **2009**, *79*, 62-67.

Chapitre III.

Induction enzymatique d'un gradient de pH pour la production d'énergie électrique

III.1 Généralités

La pile enzymatique développée dans ce chapitre se distingue des biopiles connues dans la littérature puisqu'elle n'utilise pas directement l'effet électrocatalytique des protéines rédox. Son principe repose sur l'apparition d'un gradient de pH à l'intérieur du système pour la création d'une différence de potentiel. L'espèce électroactive ne joue alors pas le rôle de médiateur rédox entre les enzymes et le circuit, mais uniquement de «réservoir électronique» pour le fonctionnement de la pile. Celle-ci doit alors être sensible aux variations de pH pour transcrire ces modifications en terme de potentiel électrochimique. Pour générer ce gradient de pH nécessaire pour l'établissement d'une différence de potentiel entre les deux électrodes, la *GOx* et l'uréase ont été utilisées.



D'après leurs réactions catalytiques, des protons sont produits lors de l'oxydation du glucose tandis que de l'ammoniac se forme par la dégradation de l'urée. Ainsi, en prenant les deux compartiments séparément, le pH de la solution contenant la *GOx* diminue et celui contenant l'uréase augmente. La présence d'un couple électroactif sensible au pH permet alors d'exploiter ce gradient de concentration pour le convertir en différence de potentiel. La sonde rédox sensible au pH utilisée pour la réalisation du projet est la quinhydrone (mélange équimolaire d'hydroquinone et de p-benzoquinone).

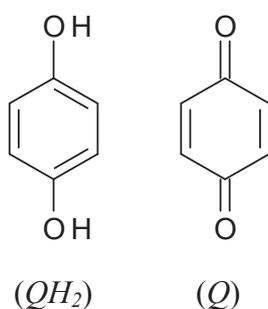


Schéma III-1 : Structure de l'hydroquinone (QH_2) et de la quinone (Q)

D'après le diagramme de tension pH du couple quinone/hydroquinone (**Figure III-1**), une électrode contenant ce couple et immergée dans une solution acide aura un potentiel supérieur à celui d'une électrode contenant la même espèce plongée dans une solution alcaline.

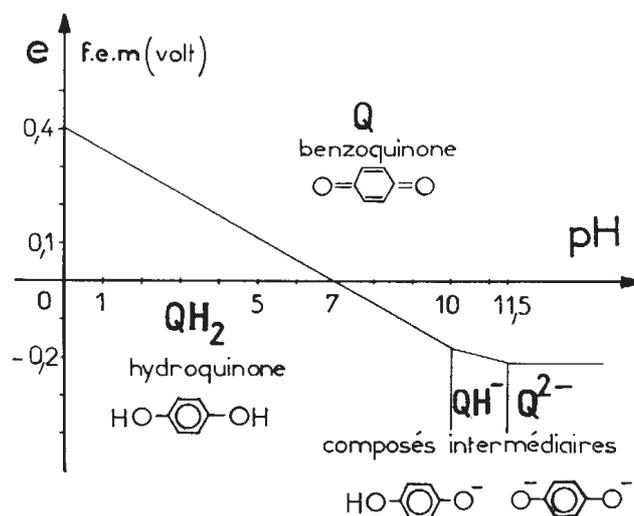


Figure III-1 : Évolution théorique du potentiel mesuré pour deux électrodes de quinhydrone équimolaire en fonction de la différence de pH entre celles-ci. L'électrode de travail est immergée dans un électrolyte à pH variable, tandis que l'électrode de référence est à pH constant (pH=7)¹

D'après la mesure de la différence de potentiel (*d.d.p.*) d'une pile (ou force électromotrice, *f.e.m.*) donnée par :

$$\Delta E = E_c - E_a \geq 0, \quad \text{Équation III-3}$$

et puisque d'après l'équation de Nernst :

$$\Delta E = E_c^\circ - E_a^\circ - \frac{R.T.\ln 10}{F}(pH_c - pH_a) + \frac{R.T.\ln 10}{F} \log \left(\frac{[O_c][R_a]}{[R_c][O_a]} \right) \quad \text{Équation III-4}$$

- avec
- E° : le potentiel standard du couple rédox.
 - R : la constante des gaz parfaits
 - T : la température en Kelvin
 - F : le nombre de Faraday
 - $[X]$: la concentration de l'espèce X
 - c, a : la cathode ou l'anode
 - O, R : la forme oxydée ou réduite de l'espèce X respectivement,

alors, en choisissant de travailler avec un mélange équimolaire de quinhydrone à l'électrode positive et négative, l'équation précédente peut se simplifier. En effet, $E^{\circ}_c = E^{\circ}_a$ (même couple rédox) et $\left(\frac{[O_c][R_a]}{[R_c][O_a]}\right) = 1$ (mélange équimolaire). La variation de potentiel devient :

$$\Delta E = -\frac{R.T.\ln 10}{F}(pH_c - pH_a) \approx 0,059 \times |\Delta pH| \quad \text{Équation III-5}$$

L'électrode possédant le potentiel le plus élevé joue le rôle de cathode, l'autre, celui d'anode. Les électrodes en présence de GOx et d'uréase seront alors la cathode et l'anode respectivement.

Ainsi, les réactions ayant lieu à la cathode et à l'anode respectivement sont :

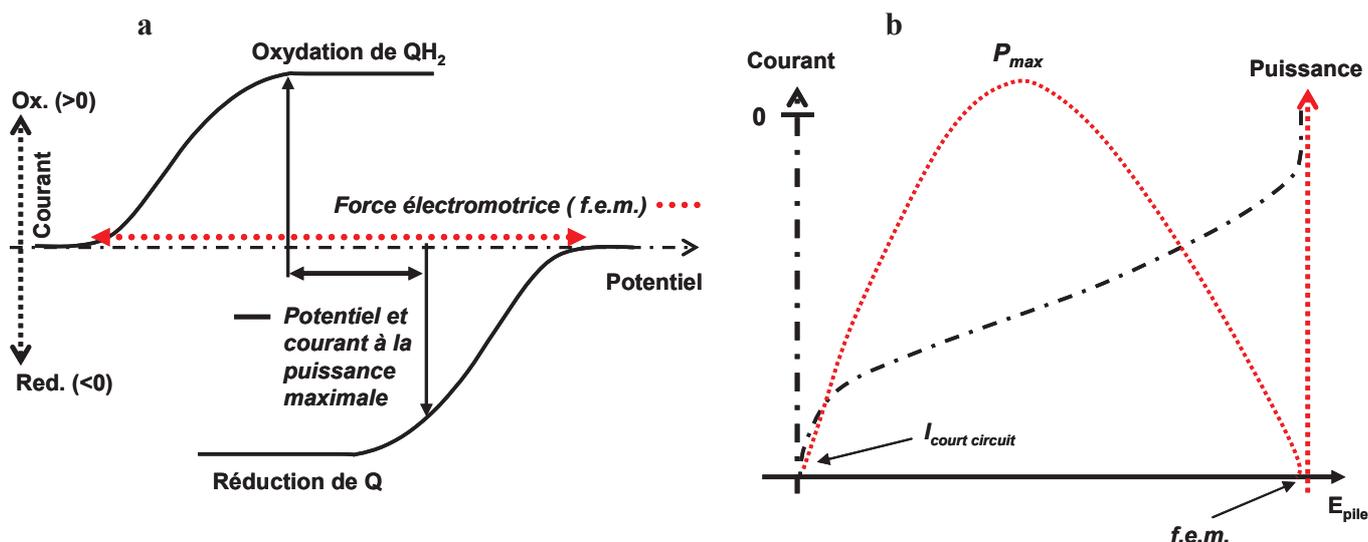
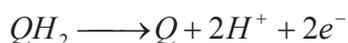
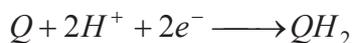


Schéma III-2 : Schéma des différentes courbes obtenues pour la caractérisation d'une pile : a- courbes de polarisation de chaque demi-pile, b- courbes de polarisation et de puissance de la pile complète

La pile est caractérisée en modifiant plusieurs paramètres. Ainsi, deux matériaux d'électrodes sont utilisés. L'influence de la quantité d'enzyme, de la concentration en substrat, de la géométrie de la pile et les effets d'un milieu tamponné sont également étudiés. Pour cela, trois mesures principales sont effectuées. La première consiste à mesurer les courbes de courant-tension de chacune des demi-piles (Schéma III-2-a). L'association des deux courbes de polarisations permet d'accéder aux premières caractéristiques de la pile telles que la différence de potentiel à l'abandon (OCV) et les courants maximums pouvant être obtenus à chacune des électrodes (pour définir quelle électrode limite les performances de la pile). Une fois la pile complète assemblée, la puissance de la pile est mesurée grâce à une

courbe de polarisation. En faisant varier le potentiel de la pile de la valeur de l'OCV à 0 V (potentiel de court-circuit de la pile, courant max), il est possible de déterminer la puissance maximale de la pile ainsi que le potentiel où celle-ci est la plus performante. Communément, les courbes de polarisation et de puissance de la pile sont présentées sur le même graphe pour passer rapidement d'une puissance à un courant (ou un potentiel) ou inversement (**Schéma III-2-b**). Finalement, la pile est utilisée comme générateur électrique. Pour cela, des mesures en chronopotentiométrie à différents courants imposés ont permis d'obtenir les courbes de décharges de la pile en fonction du temps.

Ces biopiles sont développées dans le but d'alimenter électriquement de petits appareils réclamant peu de puissance et pouvant être utilisés après implantation dans un hôte vivant. Pour valider le fonctionnement de la pile répondant au critère de la dernière application, la caractérisation des piles a été conduite dans des conditions proches des conditions physiologiques ($\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et urée $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$).

III.2 Prototype de biopiles à gradient de pH avec utilisation d'électrodes en feutre de carbone

III.2.a Principe

Dans un premier temps, la pile est assemblée dans un prototype. Celui-ci consiste en l'association de deux blocs séparés par un mur d'agar-agar (hydrogel saturé en KCl ou NaCl, épaisseur = 5 mm) faisant office de jonction électrolytique entre les compartiments anodique et cathodique du système (**Schéma III-3**). Dans cette partie, les électrodes de travail sont constituées de feutre de carbone de dimension $0,9 \times 0,9 \times 0,9 \text{ cm}^3$ ($S_{\text{totale}} = 4,86 \text{ cm}^2$, $V_{\text{total}} = 0,729 \text{ cm}^3$). Elles sont insérées dans des membranes de dialyses ayant un seuil de coupure de 100 g.mol^{-1} (ou 100 Da). Ceci permet de confiner la sonde rédox Q/QH_2 à proximité du feutre. De plus, Q étant médiateur pour la GOx^2 , il faut éviter le contact direct entre la sonde rédox et l'enzyme. Sans sac de dialyse, Q serait alors réduit en QH_2 provoquant la disparition de l'espèce nécessaire à la cathode. De plus, l'activité enzymatique de l'uréase peut être inhibée par les quinones³. La membrane est également nécessaire du côté anodique pour empêcher cette désactivation.

Les réactions enzymatiques permettant de créer cette différence de potentiel sont données par les **Équations III-1** et **III-2**. Cependant, une nouvelle enzyme est introduite en complément de la GOx . En effet, cette dernière enzyme utilise le dioxygène pour se régénérer et produit du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 selon l'équation :



Pour éviter l'accumulation de H_2O_2 , la catalase a été ajoutée dans la solution contenant la GOx . La catalase catalyse la dismutation de H_2O_2 en O_2 et en eau. En effet, H_2O_2 étant un produit de la réaction enzymatique de la GOx , une concentration trop élevée de cette espèce entraîne une désactivation de la protéine.

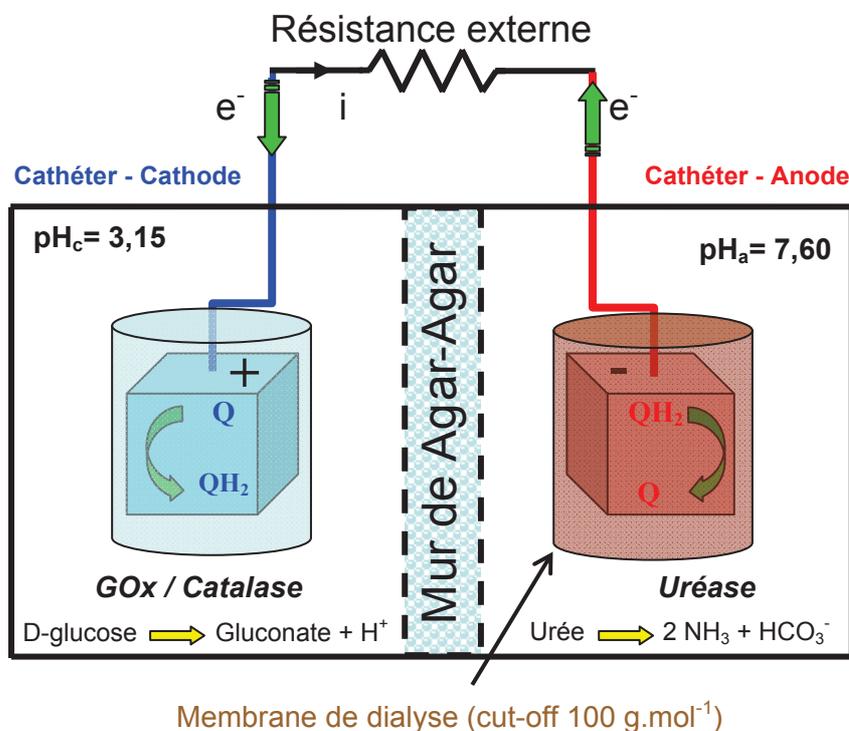


Schéma III-3: Schéma de principe du fonctionnement du prototype d'une biopile à gradient de pH basée sur des électrodes en feutre de carbone et immergée dans une solution électrolytique de $NaCl$ $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,0.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et urée $3,5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Les membranes de dialyse de 100 Da contiennent le couple Q/QH_2 $3,2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

Comme la diffusion des protons à travers la paroi d'hydrogel est suffisamment longue, une différence de pH entre les deux compartiments peut s'établir. L'épaisseur du mur d'agar est de 0,5 cm. Si l'on considère que le coefficient de diffusion du proton est de $9,3.10^{-5} \text{ cm}^2.s^{-1}$ (celui dans l'eau) et d'après la relation $T = l^2/D$, alors il faut environ 2600 secondes pour que le proton traverse la couche d'agar.

III.2.b Caractérisation des compartiments anodique et cathodique

Le temps de charge d'une pile à gradient de pH est entrepris en mesurant la vitesse d'établissement du potentiel pour chacune des électrodes étudiées séparément. Comme le montre la **Figure III-2**, la cathode met 3 heures pour atteindre son potentiel maximal de 225 mV vs. ECS (correspondant à une valeur expérimentale de pH de 3,15). L'anode quant à elle nécessite une attente de 12 heures pour voir son potentiel se stabiliser à 20 mV vs. ECS à

un pH de 7,6. Une fois les valeurs maximales de pH et de potentiel atteintes grâce aux réactions enzymatiques, une première étape de validation du système est réalisée en mesurant le potentiel de chaque électrode en absence d'enzyme mais en fixant le pH par ajout d'acide ou de base. Deux nouvelles électrodes de mêmes dimensions et en présence d'une concentration égale en quinhydrone sont immergées dans des solutions dont le pH est contrôlé à 3,15 pour la cathode et à 7,60 pour l'anode. Comme les pH correspondent aux pH maximaux anodique et cathodique dès l'immersion des électrodes, la « charge » est visiblement plus rapide. La cathode et l'anode mettent alors seulement 30 minutes et 1 heure respectivement pour atteindre 90% de leurs potentiels maximaux. Il faut également noter que les potentiels sont très proches des potentiels obtenus pour les deux premières électrodes en utilisant les enzymes pour créer la variation de pH (E_{\max} induit ± 5 mV). Ceci confirme que les potentiels dépendent effectivement du pH.

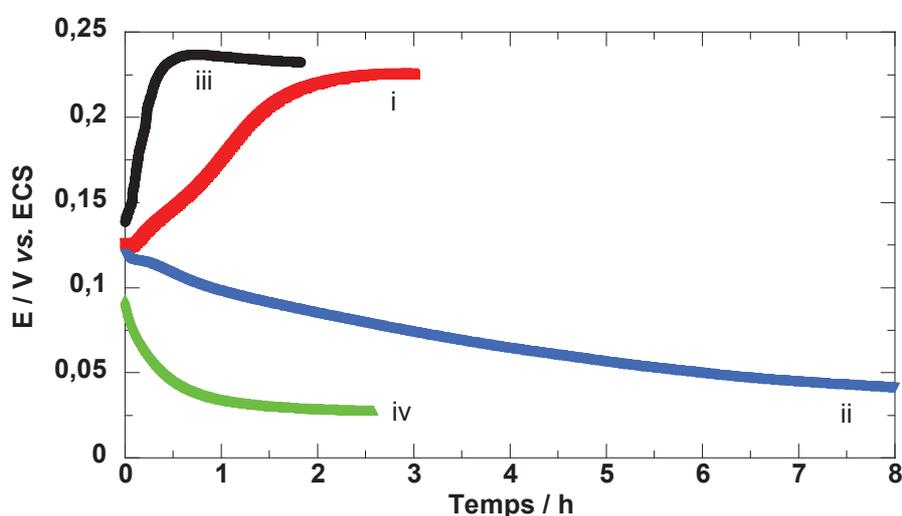


Figure III-2: Mesure du potentiel à l'abandon d'électrodes de feutre de carbone placées dans des membranes de dialyse de 100 Da contenant une solution de Q/QH_2 $3,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et immergées dans une solution de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et urée $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ en présence de: i- GOx/Catalase (22,8/4 mg), ii- Uréase (57,3 mg) ou à pH constant contrôlé par ajout de HCl ou NaOH: iii- pH = 3,15 ; iv- pH = 7,60

Après avoir atteint un état stationnaire pour toutes les électrodes, la mesure de l'évolution du courant est réalisée en imposant une surtension (anodique ou cathodique suivant le cas) en cyclant linéairement du potentiel à l'abandon (+ 0,225 V) à 0,0 V pour la cathode et de 0,020 V à 0,250 V pour l'anode.

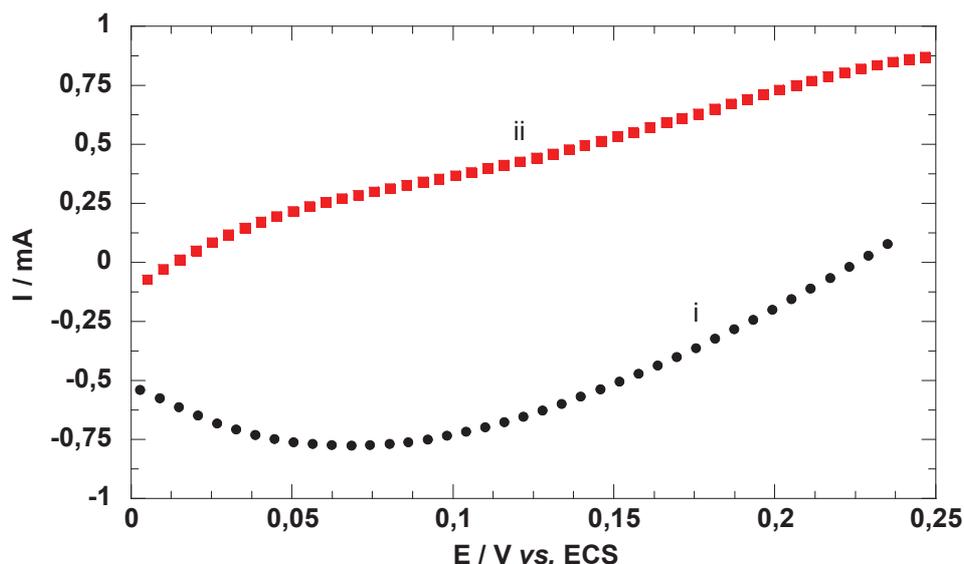


Figure III-3: Courbes courant-tension anodique et cathodique d'électrodes de feutre de carbone placées dans des membranes de dialyse de 100 Da contenant Q/QH_2 $3,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et immergées dans une solution électrolytique de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et urée $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ avec pH induits enzymatiquement : i- pH 3,15 (GOx/Catalase, 22,8/4 mg) ; ii- pH 7,62 (Uréase, 57,3 mg), $v_b = 5 \text{ mV.s}^{-1}$

Ces courbes permettent d'obtenir la valeur de la *f.e.m.* du système comme indiqué dans le **Schéma III-2-a**. Au niveau de l'anode, le courant d'oxydation augmente progressivement avec le potentiel. Inversement, le courant obtenu pour la réduction de la cathode atteint un maximum à + 0,06 V vs. ECS (-0,75 mA). Le produit formé au cours de la réduction (la quinone) est faiblement soluble. Une tendance plus hydrophobe de la surface (ou du volume) de l'électrode jouerait un rôle de passivation partielle, expliquant ainsi l'obtention d'un maximum de courant.

III.2.c Performances de la biopile

La première biopile complète réalisée en réunissant les deux compartiments autour d'un mur d'agar-agar de 5 mm d'épaisseur dans les conditions présentées dans le paragraphe précédent offre une *f.e.m.* de 0,133 V après un temps de charge d'une durée de 12 heures (temps et potentiel comparables pour une durée identique d'immersion dans la **Figure III-2**). Les pH des compartiments sont de 3,90 et de 6,60 du côté anodique et cathodique respectivement. D'après l'**Équation III-5**, le potentiel théorique attendu est de $E = (6,60 - 3,90) \times 0,059 = 0,159 \text{ V}$. Le système est donc relativement efficace car 84% de la différence de potentiel est obtenue.

Les performances de cette biopile à glucose/urée sont ensuite étudiées en mesurant sa puissance totale ainsi que sa capacité à être utilisée comme un générateur électrique. La **Figure III-4** représente le courant (●) et la puissance (■) produits, en fonction du potentiel

imposé entre les bornes positive et négative. Pour des concentrations physiologiques en glucose et en urée, à savoir $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ respectivement, le système délivre une puissance maximale de $4,97 \mu\text{W}$ à 73 mV et le courant maximal lorsque la pile entre en court-circuit est de $120 \mu\text{A}$.

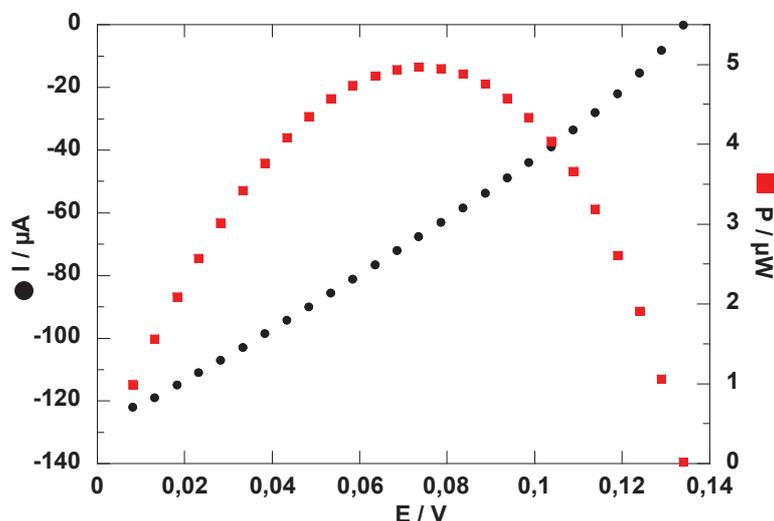


Figure III-4: Courbe de polarisation linéaire en tension (●) et courbe de puissance correspondante (■) d'une pile avec des électrodes en feutre de carbone placées dans des membranes de dialyse de 100 Da contenant Q/QH_2 $3,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et immergées dans une solution électrolytique de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et urée $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Les membranes contiennent de la GOx/Catalase (22,3 / 3,8 mg) côté cathodique (pH = 3,9) et de l'uréase (58,0 mg) côté anodique (pH = 6,6). Les compartiments sont séparés par un mur d'agar-agar, $v_b = 2 \text{ mV.s}^{-1}$

Finalement, des séries de décharges à courant constant sont entreprises. Pour de très faibles courants (100, 250 et 500 nA, résultats non montrés), aucune variation de la valeur du potentiel n'est enregistrée ce qui correspond aux phénomènes attendus grâce à l'utilisation de la courbe de polarisation comme courbe prédictive. Soumise à un courant de $1 \mu\text{A}$, le potentiel commence à chuter pour atteindre $0,123 \text{ V}$ après une période de 1000 secondes (**Figure III-5-i**). Des courants plus importants (5 et $10 \mu\text{A}$) engendrent une variation de potentiel plus marquée (**Figure III-5-ii** et **iii**). Pour une même durée d'utilisation (1000 secondes, la pile affiche un potentiel de 90 mV et de 24 mV (67% et 18% de la *f.e.m.* initiale). Cependant, la valeur initiale de la *f.e.m.* n'est plus jamais atteinte même avec un temps de charge libre relativement long.

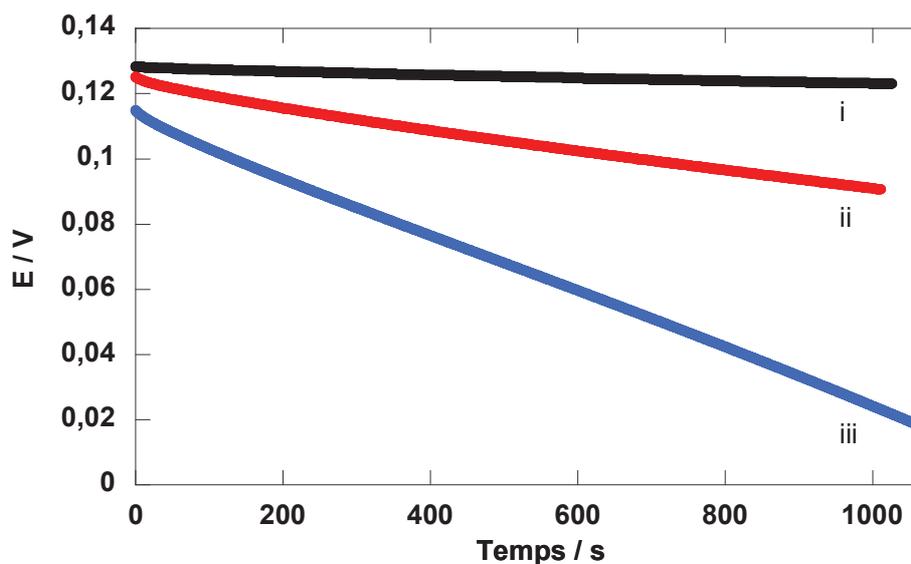


Figure III-5: Courbes de décharge de la pile décrite dans la **Figure III-4** soumise à la circulation de différents courants dans le circuit : i- 1 μA , ii- 5 μA , iii- 10 μA

III.3 Miniaturisation du prototype avec utilisation d'électrodes en feutre de carbone

III.3.a Principe

La faisabilité du système a pu être mise en évidence dans la partie précédente. Cependant, la taille conséquente du prototype utilisé rend impossible son utilisation en tant que biogénérateur implantable. La poursuite du projet a donc consisté en une démarche de miniaturisation du système. Effectivement, une biopile enzymatique dont les substrats/combustibles sont des espèces présentes dans l'organisme peut être envisagée pour une utilisation médicale (avec implantation dans le corps de l'hôte).

Concrètement, les compartiments séparés par une paroi solide du prototype sont abandonnés au profit de deux nouvelles membranes de dialyse. Des sacs confinant les enzymes du côté anodique et cathodique et possédant des seuils de coupures beaucoup plus élevés (6-8 kDa) sont désormais utilisés (**Schéma III-4**). Dans un premier temps, cette nouvelle version de la pile est caractérisée dans des conditions identiques à la version prototype, c'est-à-dire immergée dans une solution de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et urée $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Ensuite, l'effet d'une solution tamponnée à pH physiologique (pH = 7,2) sur l'utilisation de la pile est étudié.

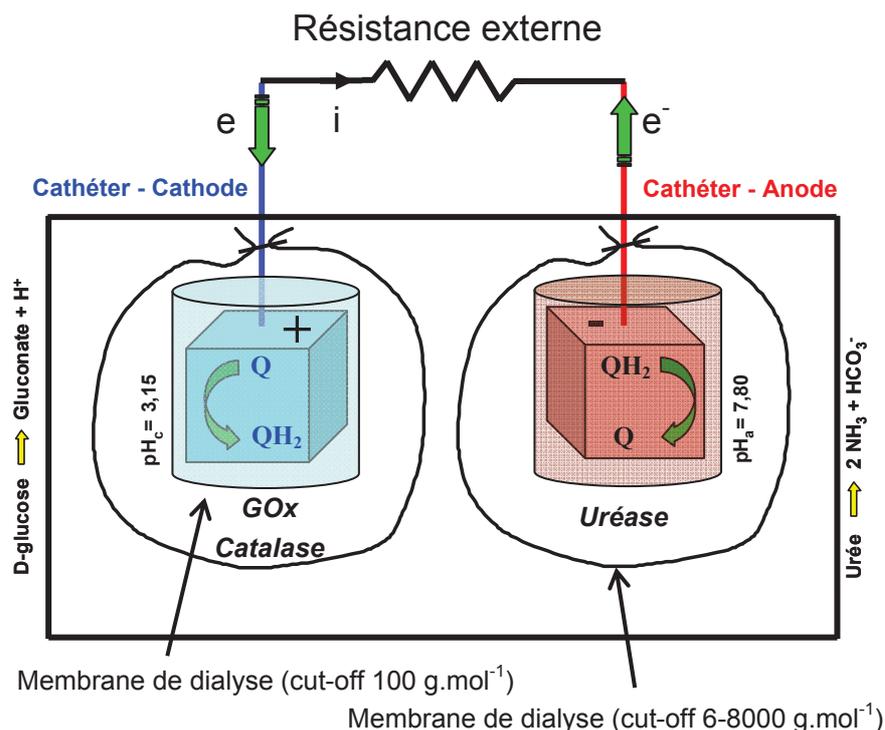


Schéma III-4: Schéma de principe de la miniaturisation du prototype de biopile à gradient de pH basée sur des électrodes en feutre de carbone immergée dans une solution électrolytique de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et urée $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Les membranes de dialyse de 100 Da contiennent le couple Q/QH_2 $3,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ tandis que les membranes de 6-8 kDa contiennent les systèmes enzymatiques

III.3.b Performances de la biopile

La mesure des performances dans cette configuration a donc été entreprise pour plusieurs piles identiques. Les *f.e.m.* sont visiblement plus faibles que pour les piles présentées auparavant. Pour la première pile, une *f.e.m.* de + 55 mV est atteinte (63 mV pour la seconde) (**Figure III-6**). De ce fait, les courbes de puissance indiquent une diminution d'un facteur cinq de la puissance maximale de la pile ($P_{m \text{ moyen}} = 1,00 \pm 0,03 \mu\text{W}$ à $27 \pm 2 \text{ mV}$). La perte importante de force électromotrice (entraînant par la même occasion une perte en puissance) s'explique par la nouvelle géométrie de la pile. Les membranes de dialyses étant extrêmement proches, le gradient de pH n'a pas le temps de s'établir à une valeur suffisamment élevée entre l'anode et la cathode puisque les deux compartiments se mélangent aisément. Dans cette configuration, aucune mesure de pH n'a pu être réalisée et donc n'a pu appuyer cette conclusion.

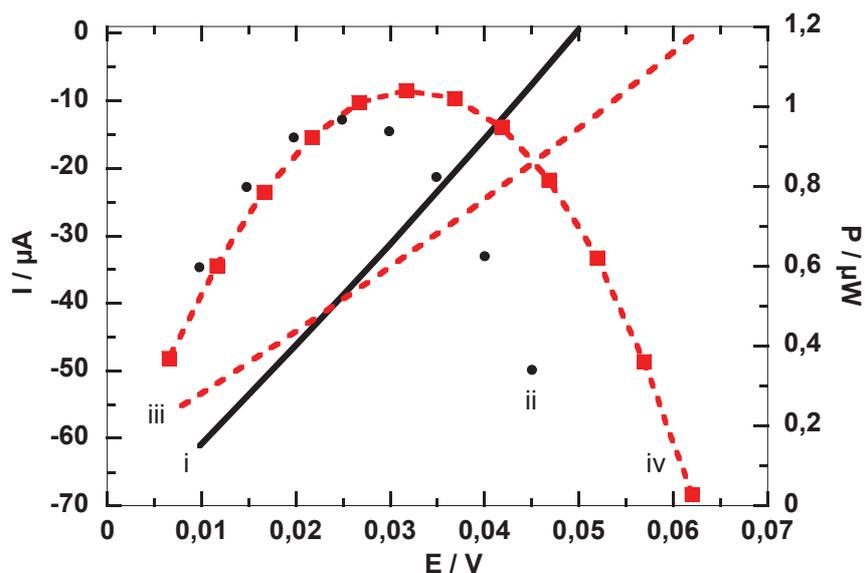


Figure III-6: Courbes de polarisation et de puissance de deux piles miniaturisées immergées dans une solution électrolytique de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,0.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et urée $3,5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans les conditions du Schéma III-4 avec GOx/Catalase (22,6 / 3,8 mg) et Uréase (57,1 mg), i,ii- pile 1, iii,iv- pile 2, $v_b = 2 \text{ mV.s}^{-1}$

Pour autant, les courbes de chronopotentiométrie, données dans la Figure III-7, montrent que de telles piles supporteraient mieux des décharges à courant constant que celles en utilisant un prototype. A titre d'exemple, la pente courbe **iii** qui représente la vitesse de perte de potentiel dans le cas précédent pour un courant de $10 \mu A$ est de $-5,2 \text{ mV.min}^{-1}$. Celle des piles miniaturisées vaut, elle, $-1,3 \text{ mV.min}^{-1}$.

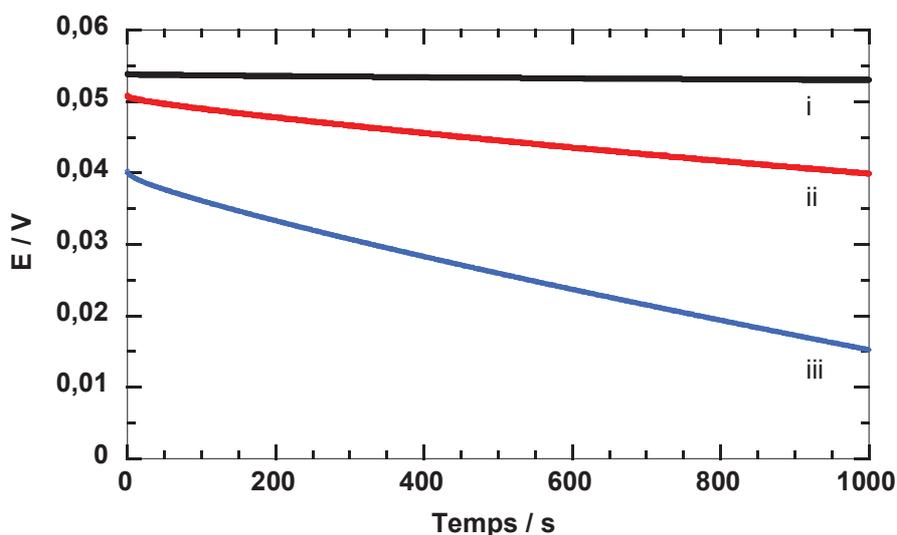


Figure III-7: Courbes de décharge de la pile 1 décrite dans la Figure III-6 soumise à la circulation de différents courants dans le circuit : i- $1 \mu A$, ii- $5 \mu A$, iii- $10 \mu A$

Un problème important dans cette nouvelle configuration semble donc être la difficulté d'induire une différence de pH suffisante au sein des sacs contenant le couple rédox.

Pour essayer de résoudre ce problème (qui est le fondement même du fonctionnement de la pile à gradient de pH), la quantité de biocatalyseurs initialement utilisée est doublée. Dans ces conditions, de nouvelles piles sont assemblées. Il a ainsi été montré (**Figure III-8**) que la *f.e.m.* et la puissance maximale sont nettement plus importantes (même ordre de grandeur que le potentiel en mode prototype, à savoir 120 ± 10 mV). Les puissances restent inférieures à celles développées dans la première partie mais sont le double des premières piles miniaturisées ($P_m = 2,5 \pm 0,5 \mu\text{W}$ à 66 mV).

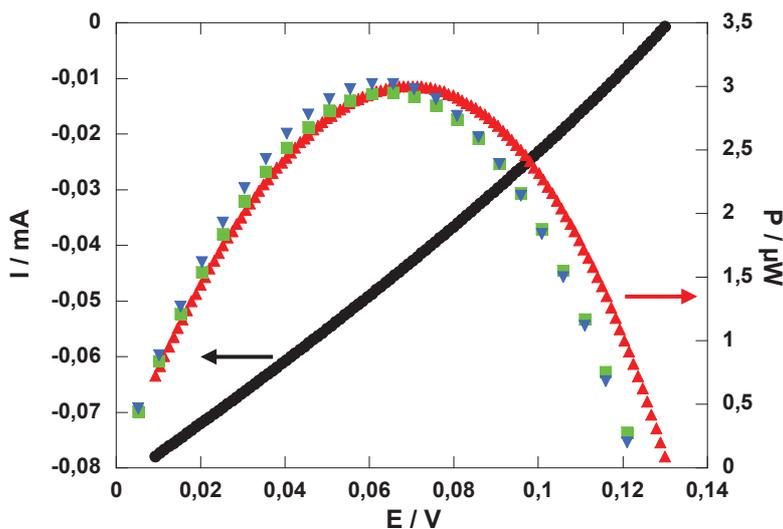


Figure III-8: Courbe de polarisation linéaire en tension d'une pile miniaturisée immergée dans une solution électrolytique de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et urée $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ à $v_b = 2 \text{ mV.s}^{-1}$ permettant de construire la courbe de puissance correspondante (\blacktriangle). Courbes de puissance obtenues pour la pile à gradient de pH miniaturisée pour différentes valeurs de vitesse de balayage. (\blacktriangle) 2 mV.s^{-1} , (\blacksquare) 5 mV.s^{-1} , (\blacktriangledown) 10 mV.s^{-1} . A l'anode GOx/Catalase (44,7 / 7,5 mg), à la cathode Uréase (115 mg)

Des tests complémentaires ont été menés sur ces systèmes pour valider définitivement la méthode de mesure de la puissance des biogénérateurs. Plusieurs valeurs de vitesse de balayage en potentiel lors de la polarisation des électrodes ont été appliquées. Il apparaît que des vitesses comprises entre 2 et 10 mV.s^{-1} n'ont aucune influence sur les courants mesurés entre les deux électrodes. La valeur de la puissance maximale reste par conséquent inchangée. Les conditions de stationnarité nécessaires à la mesure de la puissance sont donc respectées.

Les courbes de décharge présentées dans la **Figure III-9** donnent le fonctionnement de la pile lorsque les quantités d'enzymes à l'intérieur des membranes de dialyse sont doublées. Bien que les forces électromotrices développées par les générateurs soient nettement supérieures aux piles précédentes, les vitesses moyennes de décharge des piles ne changent pas drastiquement (**ii** : $0,85 \pm 0,35 \text{ mV.min}^{-1}$ et **iii** : $1,75 \pm 0,65 \text{ mV.min}^{-1}$ à 5 et $10 \mu\text{A}$ respectivement) et sont même légèrement supérieures, ce qui montre que le système n'est pas limité par la concentration d'enzymes et qu'il ne repose pas non plus sur l'effet électrocatalytique direct des enzymes en présence.

Ces mesures chronopotentiométriques sont aussi mises à profit pour la détermination des puissances de la même façon que le groupe de Kano⁴. Grâce à cela et pour des temps suffisamment longs, la contribution du courant capacitif tend vers zéro. La diminution du potentiel n'est alors due qu'au seul courant faradique.

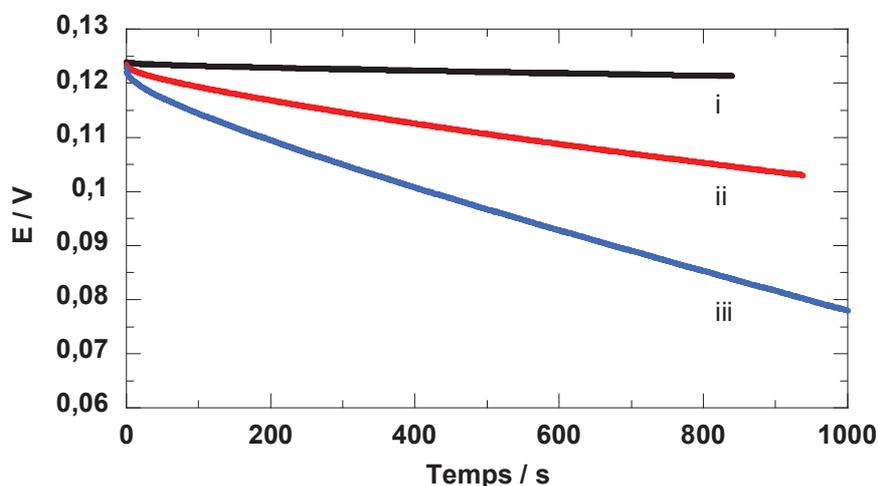


Figure III-9: Courbes de décharge de la pile à gradient de pH décrite dans la **Figure III-8** soumise au passage d'un courant. i- 1 μA , ii- 5 μA , iii- 10 μA

Pour des courants de 1, 5 et 10 μA et pour une durée de polarisation comprise entre 60 et 120 secondes, les puissances associées respectivement à ces courants sont en accord avec celles données dans la **Figure III-8** (0,12 ; 0,59 et 1,13 μW). Pour des temps supérieurs (240, 480 et 900 s), les puissances commencent à diverger linéairement par rapport à la courbe de polarisation initiale (**Figure III-10-a**). La pente de perte de puissance au cours du temps est forte pour un courant de 10 μA alors qu'elle est faible pour un courant de 1 μA . La **Figure III-10-b** représente l'évolution de la puissance en fonction de la différence de potentiel à courant imposé de 1, 5 et 10 μA . Cette méthode de représentation est une autre manière de montrer le même résultat.

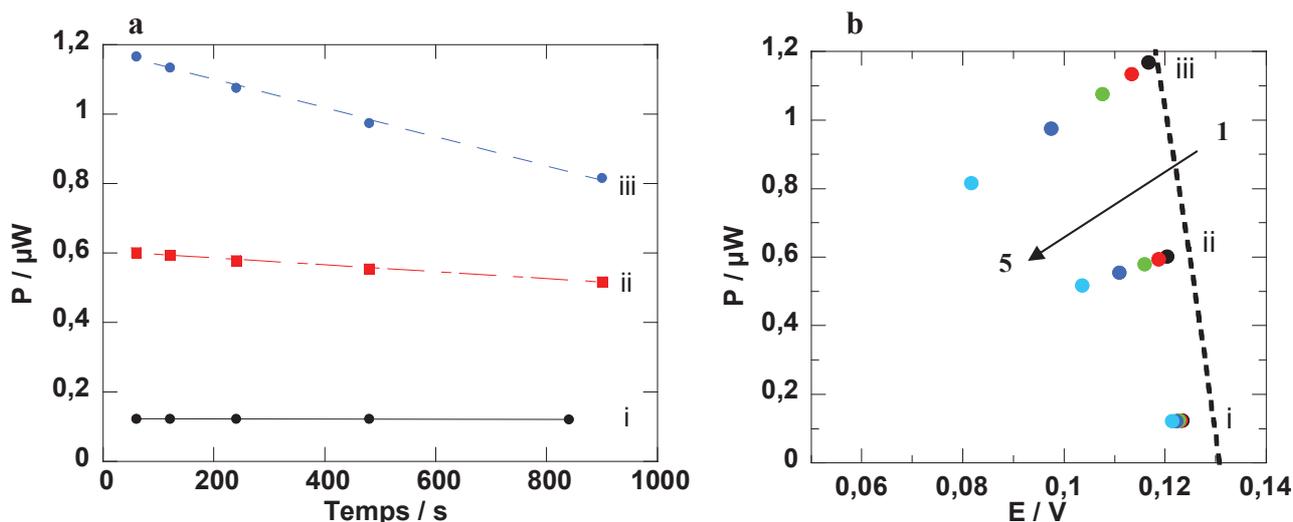


Figure III-10: a- Variation de la puissance de la pile décrite dans la **Figure III-8** en fonction du temps de polarisation pour différents courants imposés : i- 1 μA , ii- 5 μA et iii- 10 μA . b- Évolution de la puissance de la pile en fonction du courant imposé et de la durée de la polarisation entre les électrodes : i- 1 μA , ii- 5 μA et iii- 10 μA . De 1 à 5 : 60 s, 120 s, 240 s, 480 s et 900 s. En pointillé, la courbe de puissance de la **Figure III-8** pour $v_b = 2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

La dernière étape porte sur l'étude des performances d'une pile immergée dans une solution tamponnée à pH et concentration physiologique (pH = 7,2). Une biopile est donc mise en place dans une solution de tampon phosphate à $25 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ contenant NaCl $0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et urée $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. La concentration d'enzymes est maintenue à sa valeur initiale pour pouvoir confronter les résultats obtenus avec le plus grand nombre de piles assemblées lors des expérimentations. Il apparaît une réelle difficulté d'établir le gradient de pH nécessaire à la mesure d'une différence de potentiel intéressante. Le ΔE le plus élevé entre la cathode et l'anode atteint une valeur de $\Delta E_{\text{max}} = +26 \text{ mV}$. De plus les ions phosphates, notamment l'espèce H_2PO_4^- , sont responsables d'une inhibition de l'activité enzymatique de l'uréase pour une gamme de pH comprise entre 5,80 et 7,49⁵. Dans de telles conditions, la puissance générée est seulement de $0,08 \mu\text{W}$ à $E = +8 \text{ mV}$ (*f.e.m.* = 14 ou 26 mV). Des tentatives de décharge sont tout de même enregistrées, mais les faibles valeurs de potentiel et de puissance ne permettent pas le passage d'un courant pour des durées supérieures à 200 s et 40 s pour des courants de 5 et 10 μA respectivement.

A la vue des résultats apportés en milieu tamponné, l'idée d'utiliser une pile à gradient de pH comme un générateur autonome implantable chez l'homme n'apparaît pas comme réalisable.

III.4 Prototype de biopiles à gradient de pH avec utilisation d'électrodes de carbone compressées

III.4.a Principe

Cette partie s'intéresse à une nouvelle méthode de fabrication d'électrodes. Il s'agit de substituer les feutres de carbone (même si leur porosité présente de nombreux avantages) par des électrodes plus robustes mécaniquement. Le principe est d'immobiliser l'espèce rédox à l'intérieur d'un matériau conducteur par compression mécanique à l'aide d'une presse hydraulique (**Schéma III-5**). Le matériau choisi est à base de paillettes de carbone graphite. L'espèce rédox est identique aux parties précédentes. Dans un premier temps, la sonde est mélangée puis broyée dans un mortier en présence du carbone, d'eau et de glycérol (pour incorporer au mieux l'espèce électroactive sur la surface conductrice). Le glycérol est ajouté au mélange pour augmenter la solidité des pastilles. Le mélange obtenu est placé dans un cylindre de diamètre $\varnothing = 13$ mm et soumis à une pression de 10 tonnes. Les électrodes obtenues sont des cylindres ($\varnothing = 13$ mm, $h = 1$ mm) de surface géométrique $S_{\text{géométrique}} = 1,33 \text{ cm}^2$ et de volume $V_{\text{électrode}} = 0,133 \text{ cm}^3$.

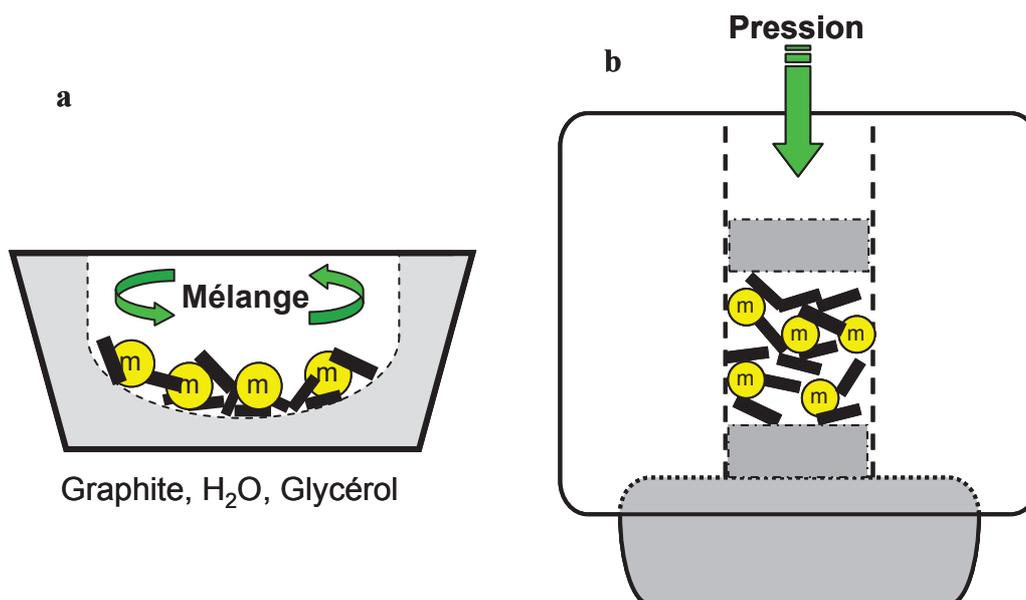


Schéma III-5: Schéma de fabrication des électrodes sous formes de disques compressés. a- mélange intime de carbone graphite et de quinhidrone (Q/QH_2), d'eau et de glycérol et broyé dans un mortier en céramique, b- vue de la compression du mélange précédent introduit dans un cylindre

Le disque obtenu est ensuite connecté à un fil de platine à l'aide d'une pâte conductrice à base de carbone. Le fil de platine est, quant à lui, inséré dans un cathéter pour éviter qu'il ne soit en contact avec la solution électrolytique (risque d'oxydation ou de réduction d'espèces indésirables sur le platine, création de potentiels mixtes). L'ensemble de la surface de la pâte conductrice et la jonction cathéter/électrode est recouverte d'un film de

silicone pour avoir une surface identique entre chaque expérimentation et isoler définitivement le fil de platine de la solution (Schéma III-6).

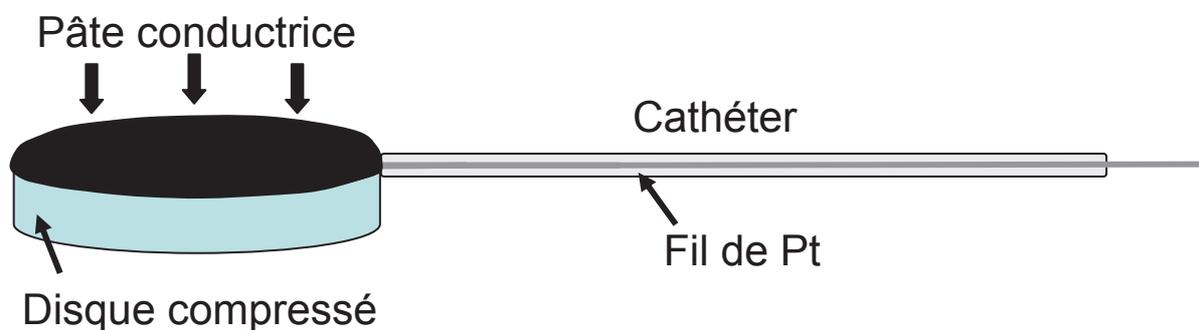


Schéma III-6: Schéma de l'assemblage entre le disque obtenu par compression et un fil de platine

Le principe général de la pile (Schéma III-7) reste identique à celui du prototype. Le schéma devient donc :

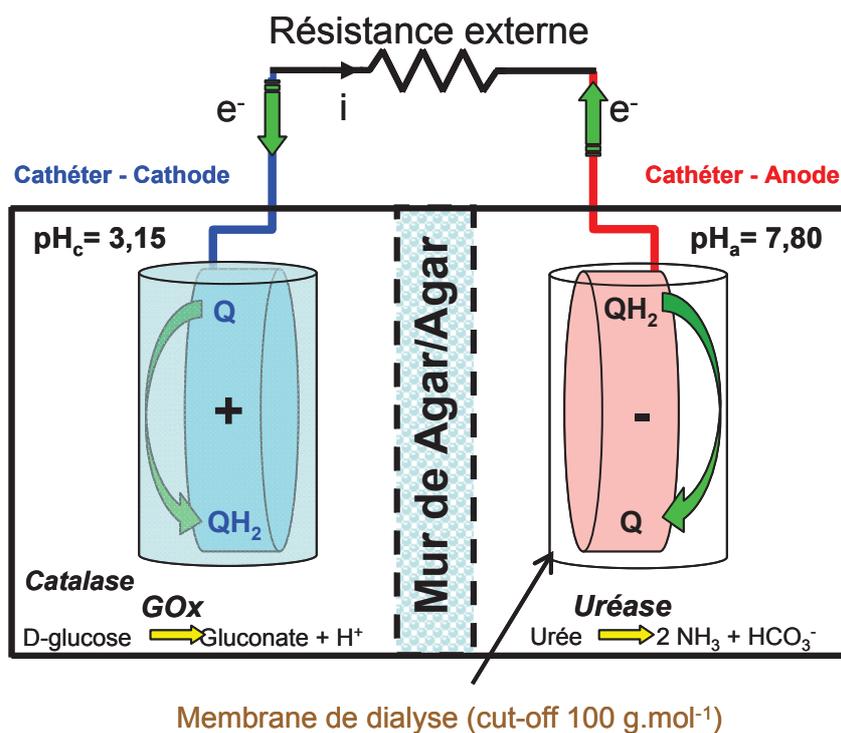


Schéma III-7: Schéma de principe du fonctionnement du prototype d'une biopile à gradient de pH basée sur des électrodes de carbone compressées contenant la sonde redox Q/QH_2 (77,6 mg) et immergées dans une solution électrolytique de $NaCl$ $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et urée $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ contenant $GOx/Catalase$ (22,8 / 3,8 mg) côté anodique et $Uréase$ (57,6 mg) côté cathodique

III.4.b Caractérisation des compartiments anodique et cathodique

Ces nouvelles électrodes compressées ont été caractérisées de façon identique au paragraphe §III.2.b. La première étape a donc consisté à réaliser les mesures d'établissement

des potentiels anodique et cathodique en présence d'enzyme. Le temps nécessaire pour parvenir au potentiel de + 0,230 V pour le pôle positif est légèrement plus long pour les cylindres compactés que pour une électrode de feutre de carbone (4 heures contre 2,5). Comme attendu, le pH de l'anolyte est de 3,15. Cependant, dans le cas d'électrodes compressées (à pH contrôlé ou à pH induit enzymatiquement), il n'y a pas de différence de durée de stabilisation du pH entre les essais ($t \approx 4$ h). Inversement, l'électrode négative requiert une période de stabilisation nettement plus importante que son homologue en feutre de carbone. Ce constat renseigne sur la difficulté rencontrée par la solution pour pénétrer dans l'électrode (après 8 heures d'immersion, les électrodes négatives ne parviennent toujours pas au potentiel d'une bioanode en feutre de carbone). En effet, le procédé de fixation du platine sur le disque demande deux étapes de séchage consécutives. Les pastilles sont donc déshydratées lors de leur immersion. Il faut donc un certain temps de réhydratation au système pour fonctionner « normalement ».

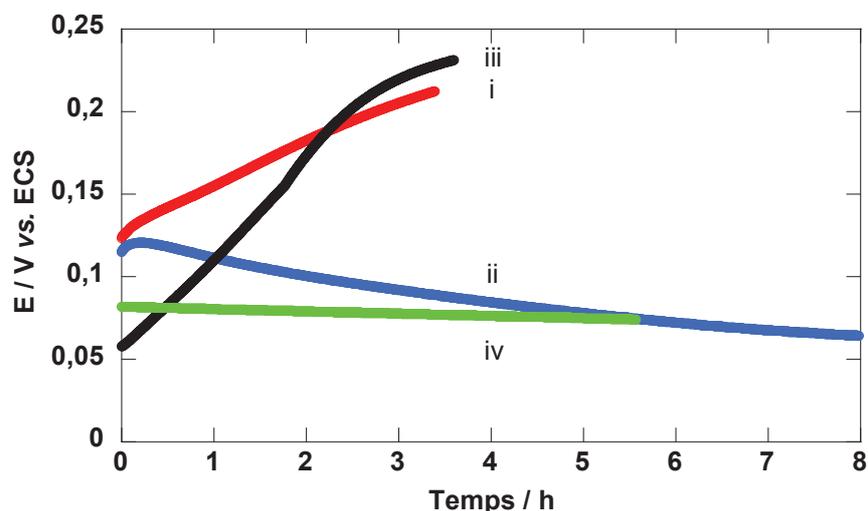


Figure III-11: Mesure du potentiel à l'abandon de disques de carbone compressé contenant Q/QH_2 (77,6 mg), placés dans des membranes de dialyse de 100 Da et immergées dans une solution de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et urée $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ en présence de: i- GOx/Catalase (22,8 / 3,8 mg), ii- Uréase (57,5 mg) ou à pH constant contrôlé manuellement: iii- pH = 3,15 ; iv- pH = 7,60

Après avoir attendu la stabilisation du pH dans le compartiment cathodique à 3,15, la courbe de voltampérométrie linéaire en tension (**Figure III-12-i**) montre que la réduction de Q commence à un potentiel de +0,223 V vs. ECS. Dans l'autre compartiment, la formation des NH_3 , favorise l'augmentation du pH jusqu'à atteindre 7,34 et l'oxydation de l'hydroquinone débute alors à + 0,060 V vs. ECS (**Figure III-12-ii**). En prenant séparément les pH de chaque compartiment ($\Delta\text{pH} = 4,19$), la différence de potentiel théorique attendue entre les deux électrodes devraient être de 247 mV. Les potentiels à l'abandon de la cathode et de l'anode, eux, donne une *f.e.m.* de 210 mV ce qui est en accord avec la valeur espérée. Les courants mesurés sur les nouvelles électrodes sont de manière générale trois fois moins intenses.

A 120 mV, $I_{a \text{ cylindre}} = 0,152 \text{ mA}$ et $I_{c \text{ cylindre}} = -0,218 \text{ mA}$ contre $I_{a \text{ feutre}} = 0,428 \text{ mA}$ et $I_{c \text{ feutre}} = -0,652 \text{ mA}$. Enfin, la présence de semi-plateaux dans le cas de l'oxydation et de la réduction indique que les réactions sont contrôlées par les phénomènes de transport de matière (diffusion des protons H^+).

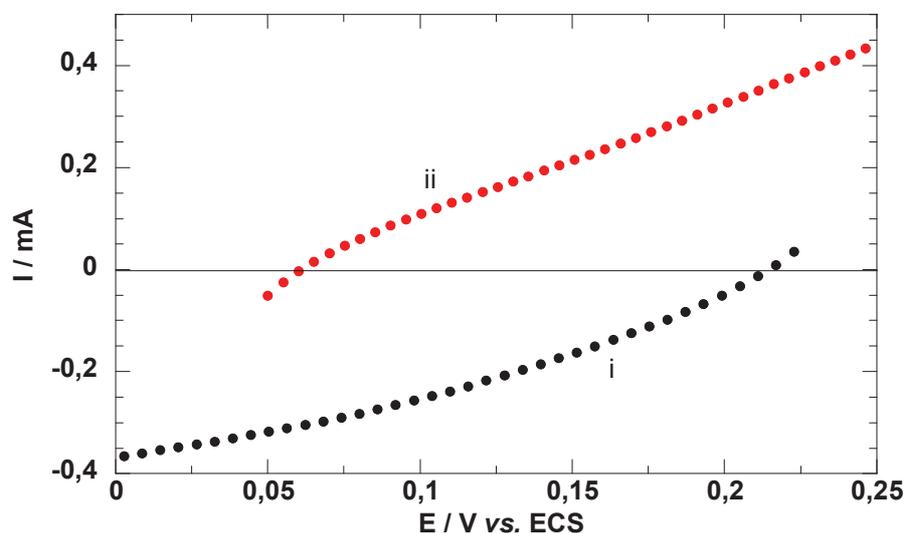


Figure III-12: Courbe de polarisation anodique et cathodique d'électrodes compactées et immergées dans une solution électrolytique de $NaCl \ 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, $glucose \ 5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et $urée \ 3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ avec pH induits enzymatiquement : i- pH 3,15 (GOx/Catalase : 22,8 / 3,8 mg) ; ii- pH 7,34 (Uréase : 57,5 mg), $v_b = 5 \text{ mV.s}^{-1}$

De premier abord, le nouveau protocole de fabrication des électrodes ne semble pas apporter de réelle amélioration de performance puisque les courants sont moindres à chacun des pôles. Néanmoins, il sera fait état plus tard dans ce chapitre d'une augmentation de la durée de vie de la pile avec des fonctionnements sur plusieurs jours. Aucune pile possédant des électrodes feutrées n'a pu fonctionner plus d'une journée du fait de la faible rigidité de ce matériau. Cette augmentation de stabilité du montage est à rapporter à l'emprisonnement mécanique du couple Q/QH_2 et ainsi qu'au relargage réduit à l'extérieur des sacs de dialyse de 100 Da (entraînant la désactivation de l'uréase à l'anode). Pour quantifier le relargage de la quinhydrone en solution, des mesures de spectroscopie UV-visible ont été réalisées. Les valeurs des longueurs d'onde d'absorption de chacune des deux espèces sont en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature^{6,7} à savoir $\lambda_Q = 245 \text{ nm}$ et $\lambda_{QH_2} = 290 \text{ nm}$ et $\lambda_{Q/QH_2} = 420 \text{ nm}$. Les études préliminaires sur des solutions à concentration connue en quinhydrone ont fourni les valeurs des coefficients d'extinction molaire. En utilisant $\epsilon_{290} = 2875 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, la concentration en QH_2 atteint $2,39 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ dans 75 mL de solution, soit 2 mg d'hydroquinone libérés en l'espace de 3 heures d'immersion (surtout QH_2 se trouvant à la surface). En 3 heures, la pastille perd donc 4% de QH_2 . La bonne stabilité de l'incorporation de l'espèce rédox dans la pastille peut être attribuée aux interactions $\pi-\pi$ existantes entre le graphite et les complexes de quinhydrone.

III.4.c Performances de la biopile

III.4.c.1 Performances brutes

La première biopile assemblée dans cette configuration est testée dans les conditions normales d'utilisation (concentration physiologique en substrat, quantités d'enzyme données dans la **Figure III-12**). Une telle pile possède une *f.e.m.* de +0,072 V pour une différence de pH de $\Delta\text{pH} = 2,94$ (**Figure III-13-i**). La différence de potentiel entre les électrodes est nettement plus faible que dans le cas des feutres. La biopile est également caractérisée par sa puissance et par sa capacité à générer un courant continu. La puissance étant de l'ordre de 1 μW (5 fois moins élevée que pour le prototype avec des électrodes en feutre de carbone), les temps de décharge de la pile sont extrêmement rapides (pente de $-5,25 \text{ mV}\cdot\text{min}^{-1}$ pour un courant de 10 μA). Ces décharges plus rapides sont en accord avec la diminution des courants rencontrés pour les courbes de polarisation.

III.4.c.2 Influence de la concentration en substrat sur la puissance de la pile et stabilité

Ensuite, l'effet de la concentration en substrat à l'intérieur du prototype est évalué. La concentration en urée est doublée dans la solution électrolytique ($7,0\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Dans ce cas, l'appréciation d'un ΔpH de 3,00 est obtenu ($\Delta E_{\text{théo}} = 177 \text{ mV}$). Malgré un potentiel bien plus faible que celui attendu, l'augmentation du potentiel et de la puissance maximale sont visibles (110 mV et 2,5 μW) (**Figure III-13-ii**). Le ΔpH varie très peu en comparaison avec celui de la pile précédente (+ 0,06 unité) mais l'augmentation de la quantité d'urée permet tout de même d'augmenter la *d.d.p.* de 50 % (+ 38 mV). Sur la **Figure III-13-iii**, il apparaît qu'en doublant à la fois la concentration en glucose et en urée (respectivement de $1,0\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et $7,0\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), une hausse des performances sur la puissance est enregistrée atteignant alors 5,03 μW à 65 mV. En revanche, la force électromotrice comme le pH de la pile sont faiblement affectés par cette augmentation en concentration (112 mV pour $\Delta\text{pH} = 3,07$). Finalement, pour une solution électrolytique extrêmement concentrée en substrat ($0,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **Figure III-13-iv**) la pile présente les performances les plus avantageuses. Le potentiel est multiplié par deux, passant à 208 mV ($\Delta\text{pH} = 3,55$; $E_{\text{théorique}} = 209 \text{ mV}$) et la puissance est multipliée par 6 (30 μW à 133 mV). En augmentant les concentrations en substrat, la thermodynamique des réactions et la cinétique réactionnelle sont améliorées :

- ❖ Thermodynamiquement : la *f.e.m.* expérimentale atteint la *f.e.m.* théorique
- ❖ Cinétiquement : les courants comme les puissances sont plus élevés

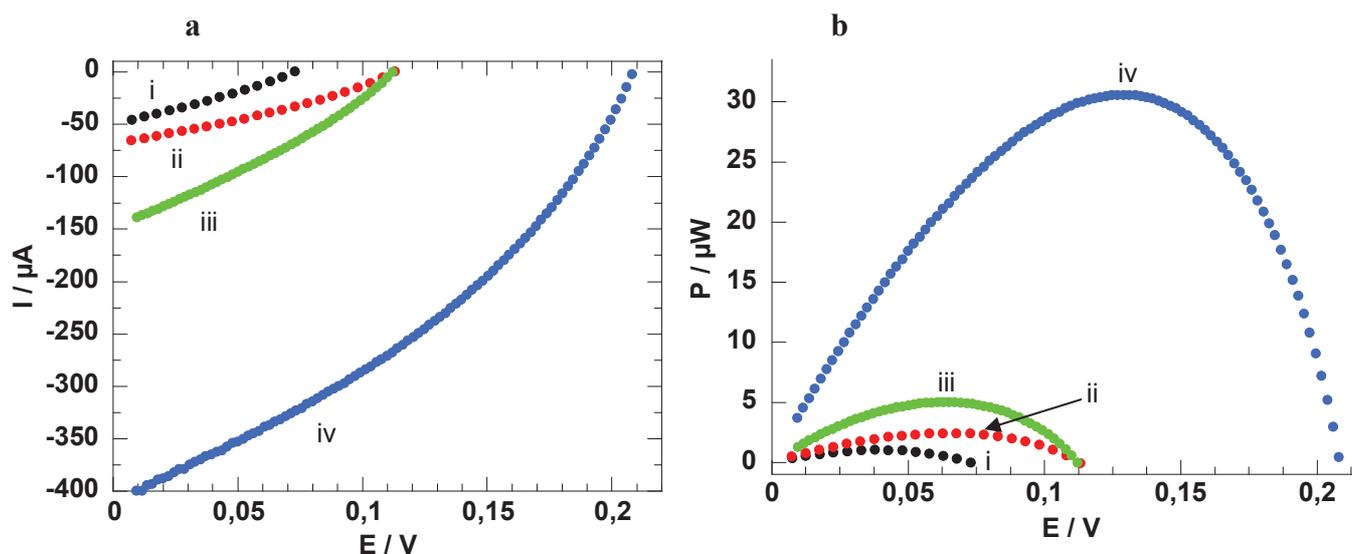


Figure III-13: a- Courbes de polarisation et b- Courbes de puissance d'une pile à gradient de pH immergée dans une solution électrolytique de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ contenant : i- glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, urée $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, ii- glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, urée $7,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, iii- glucose $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, urée $7,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, iv- glucose $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$, urée $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$; et contenant GOx/Catalase (22,8 / 3,8 mg) côté anodique et Uréase (57,6 mg) côté cathodique, $v_b = 5 \text{ mV.s}^{-1}$

La stabilité opérationnelle de la biopile est mesurée lors d'une décharge à courant constant ($10 \mu\text{A}$) pour plusieurs heures en présence de $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ d'urée et de glucose (**Figure III-14-i et ii**). Une faible diminution du potentiel de la pile a été enregistrée au cours de la première heure (pente de 16 mV.h^{-1}) entraînant une chute de la puissance de la pile de 8 % après cette période. Une pseudo-stabilisation du potentiel est obtenue après une utilisation continue de 15 h (pente 2 mV.h^{-1}). La *d.d.p.* de la pile après 23 heures atteint 107 mV. Cette expérience confirme la capacité d'une pile basée sur un gradient de pH à fournir une puissance continue en délivrant $10 \mu\text{A}$ sur une journée, l'énergie et la charge ainsi produites par la pile étant de 0,133 J et de 0,828 C, respectivement. Il est à préciser que cette même pile a subi une nouvelle décharge à courant constant de $20 \mu\text{A}$ les 18 heures suivantes (**Figure III-14-iii**).

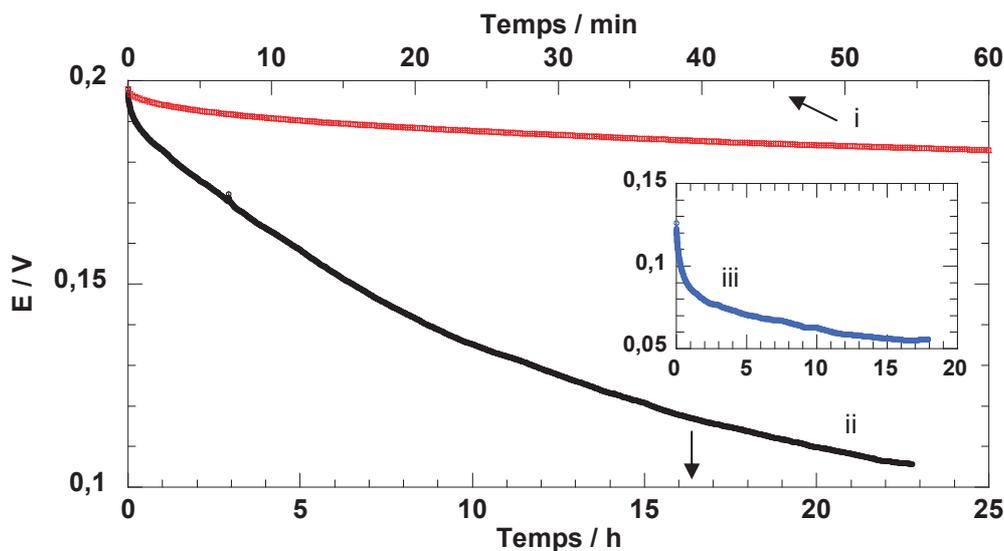


Figure III-14: Courbes de décharge à courant constant ($10 \mu\text{A}$) de la pile à gradient de pH immergée dans une solution de $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$, urée $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$: i- 1^{ère} heure, ii- 23 heures de fonctionnement .iii- poursuite de la décharge à $20 \mu\text{A}$. Quantités d'enzymes identiques à celles décrites dans la Figure III-13

III.5 Miniaturisation du prototype avec utilisation d'électrodes de carbone compressées

III.5.a Principe

Pour l'utilisation simplifiée au maximum d'une source d'énergie électrique transportable et robuste, la miniaturisation de la pile avec des électrodes compactées a été réalisée. Le montage est identique au **Schéma III-4** en intégrant les électrodes réalisées dans le paragraphe précédent à la place des électrodes de feutre de carbone (cf **Schéma III-8**).

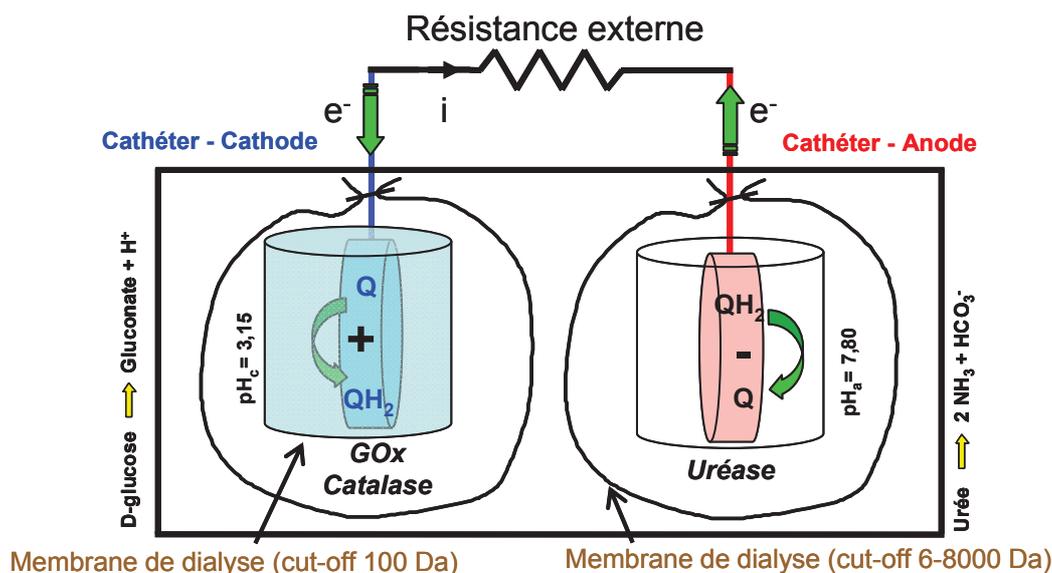


Schéma III-8 : Schéma de principe de la miniaturisation de la biopile à gradient de pH basée sur des électrodes de carbone compressées contenant la sonde redox Q/QH_2 (77,6 mg) et immergées dans une solution électrolytique de $NaCl$ $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et urée $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et contenant $GOx/Catalase$ ($22,8 / 3,8 \text{ mg}$) côté anodique et $Uréase$ ($57,6 \text{ mg}$) côté cathodique

III.5.b Performances de la biopile

La **Figure III-15** montre la puissance en fonction du potentiel de la pile pour une pile à gradient de pH miniaturisée pour différentes concentrations en glucose et en urée. Comme vu précédemment avec le prototype, le potentiel en circuit ouvert et la puissance de la pile augmentent avec la concentration en D-glucose et en urée. Le potentiel augmente à $0,157 \text{ V}$ alors que la puissance atteint $7,6 \mu\text{W}$ à 93 mV pour le potentiel à l'abandon et la puissance maximale, respectivement (erreur relative pour trois biopiles identiques : 6 %). La stabilité temporelle de cette biopile a également été effectuée. Une décharge de 10 heures est faite en appliquant $10 \mu\text{A}$ jusqu'à obtenir un potentiel de $0,0 \text{ V}$ (perte de 100 mV en 5 heures) ; l'énergie et la charge produites par la pile étant $0,022 \text{ J}$ et $0,36 \text{ C}$, respectivement. De plus, la pile affiche une puissance identique après 24 heures d'immersion constante dans la cellule. Cependant, le temps de décharge est moindre (décharge complète en seulement 4 heures à $10 \mu\text{A}$). Ces valeurs sont nettement inférieures à celles obtenues en présence du mur d'agar-agar séparant les deux électrodes qui facilitent énormément l'établissement de la différence de pH au sein de la pile. Néanmoins, ces résultats démontrent la possibilité de développer une pile à gradient de pH basée sur le confinement d'enzymes à l'intérieur d'une membrane de dialyse.

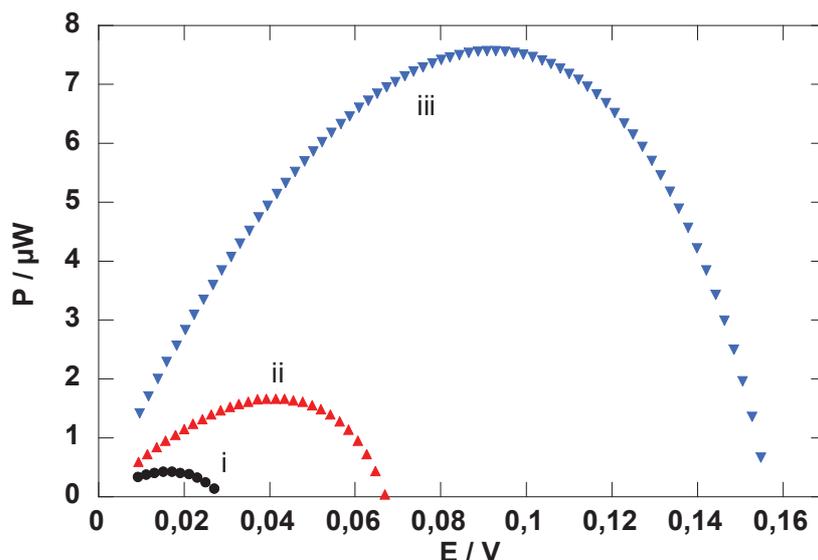


Figure III-15: Courbes de puissance d'une pile à gradient de pH immergée dans une solution électrolytique de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ contenant : i- glucose $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, urée $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, ii- glucose $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, urée $7,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, iii- glucose $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$, urée $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$, quantités d'enzymes identiques à celles décrites dans le Schéma III-8, $v_b = 2 \text{ mV.s}^{-1}$

III.6 Conclusions du Chapitre III

Les activités catalytiques de la glucose oxydase et de l'uréase lors de l'oxydation du D-glucose et d'hydrolyse de l'urée ont été mises à profit pour le développement d'un nouveau concept de biopile. Les produits issus des réactions de catalyse enzymatique du glucose et de l'urée ont ainsi permis de concevoir une pile dont le potentiel n'est basé que sur la différence de pH s'établissant entre l'anode et la cathode. Ce potentiel est établi grâce à une espèce électroactive sensible aux variations de concentrations de protons, la quinhydrone.

D'après l'équation de Nernst appliquée aux deux électrodes contenant le même couple rédox, la différence de potentiel initiale entre les deux électrodes dépend uniquement de la différence de pH entre l'anode et la cathode (avec le pH de la cathode inférieur à celui de l'anode). La production d'acide gluconique et d'ammoniac entraîne respectivement une diminution et une augmentation du pH ce qui détermine la polarité des deux électrodes.

Il a pu être démontré au cours de ce chapitre que de telles piles peuvent effectivement produire une source continue de courant pour des périodes plus ou moins importantes suivant les conditions expérimentales. Deux aspects principaux ont pu être mis en évidence dans cette partie. La première est la distinction entre deux méthodes d'assemblage des piles. La présence de la membrane d'agar-agar limitant la diffusion des protons favorise considérablement l'obtention de puissances plus élevées ($30 \mu\text{W}$ contre $7,6 \mu\text{W}$) et le fonctionnement en générateur est accru (décharge sur une période de 23 h par rapport à 1,5 h). De plus, il est apparu que le système miniaturisé n'était pas exploitable pour des objectifs d'implantation in vivo à cause de l'effet tampon du liquide extracellulaire trop important pour voir apparaître le

gradient de pH nécessaire au fonctionnement de la pile. La seconde distinction est le type de matériau utilisé pour le transfert électronique des réactions électrochimiques ayant lieu à l'anode et à la cathode. Bien que les courants soient plus faibles lors de l'utilisation d'électrodes compressées, la résistance mécanique et donc la stabilité du système a pu être améliorée de manière significative et des mesures sur une période de plusieurs jours a été possible.

Références bibliographiques

- (1) Muller, E. *Bulletin de l'Union des Physiciens* **1988**, 704, 585.
- (2) Kuwahara, T.; Ohta, H.; Kondo, M.; Shimomura, M. *Bioelectrochemistry* **2008**, 74, 66-72.
- (3) Zaborska, W.; Krajewska, B.; Kot, M.; Karcz, W. *Bioorg. Chem.* **2007**, 35, 233-242.
- (4) Sakai, H.; Nakagawa, T.; Tokita, Y.; Hatazawa, T.; Ikeda, T.; Tsujimura, S.; Kano, K. *Energy & Environmental Science* **2009**, 2, 133-138.
- (5) Krajewska, B.; Zaborska, W. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, 6, 75-81.
- (6) Urban, P. L.; Goodall, D. M.; Bergstrom, E. T.; Bruce, N. C. *Anal. Biochem.* **2006**, 359, 35-39.
- (7) Meddeb-Limem, S.; Malezieux, B.; Herson, P.; Besbes-Hentati, S.; Said, H.; Blais, J. C.; Bouvet, M. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, 18, 1176-1182.

Chapitre IV.

Biopiles enzymatiques à glucose/O₂ avec transfert électronique assuré par des médiateurs rédox

IV.1 Généralités

Les biopiles enzymatiques développées au laboratoire dans le cadre de ce projet de recherche se sont portées sur l'utilisation de la glucose oxydase à l'électrode négative pour l'oxydation du glucose tandis qu'à la positive, une nouvelle enzyme a été immobilisée : la tyrosinase, ou PolyPhénol Oxydase (*PPO*, E.C. 1.14.18.1). C'est une enzyme contenant deux sites T3 à base de cuivre avec transfert électronique couplé entre ces deux atomes¹.

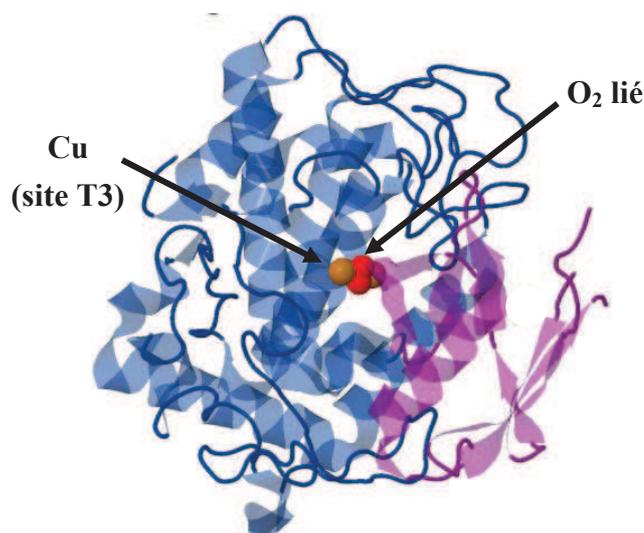


Figure IV-1: Structure tridimensionnelle de la Tyrosinase issue du champignon composée d'une structure protéique et de ses deux atomes de cuivre. Le site di-nucléaire de cuivre (responsable de la réduction du dioxygène) est représenté par les boules marron. Le dioxygène lié est représenté par les boules rouges. Reproduit de [2]

Bien que les sites T3 de la *PPO* soient similaires aux sites T3 trouvés dans les métalloenzymes à base de cuivre comme la laccase, la réactivité des sites de la tyrosinase est complètement différente³. Dans le cas de la *PPO*, la réduction de l'oxygène moléculaire est réalisée lors de deux réactions consécutives. La première met en jeu l'*o*-hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (ou catéchols) au cours de l'activité crésolase suivi de l'oxydation des catéchols en *o*-quinones⁴ (activité catécholase).

Cette enzyme a été préférée à la laccase ou à la bilirubine oxydase. La première enzyme est connue pour sa propriété acidophile, c'est-à-dire pour des valeurs de pH plus faibles que le pH physiologique (valeurs proches de 5) et pour son inhibition par les ions chlorure^{5,6}. La *BOx*, bien qu'étant stable à des pH neutres y compris en présence de Cl⁻⁷, est inhibée par les ions urate⁸. La *PPO*, quant à elle, peut fonctionner à pH proche du pH physiologique^{9,10}, en milieu chloré¹¹ et ne semble pas être sensible au sérum physiologique¹².

IV.2 Biopile à PPO/GOx « bioinspirée » (médiateurs QQH₂/UQ)

Les quinones sont connues pour être des transporteurs électroniques à l'intérieur des cellules. Dans le cycle de respiration cellulaire de la mitochondrie par exemple, l'ubiquinone joue un rôle primordial pour la production d'ATP (Adénosine TriPhosphate) en transférant des électrons entre deux enzymes, la NADH déshydrogénase et la cytochrome C réductase¹³. Le choix des médiateurs rédox utilisés à chacune des électrodes pour catalyser l'oxydation du glucose et la réduction de l'oxygène s'est donc porté, en premier lieu, sur ce type de molécules. Le médiateur anodique est la coenzyme Q₁₀ (ou ubiquinone, UQ), tandis qu'à la cathode, la quinhydrone (couple équimolaire de benzoquinone Q et d'hydroquinone QH₂, noté QQH₂) est utilisée.

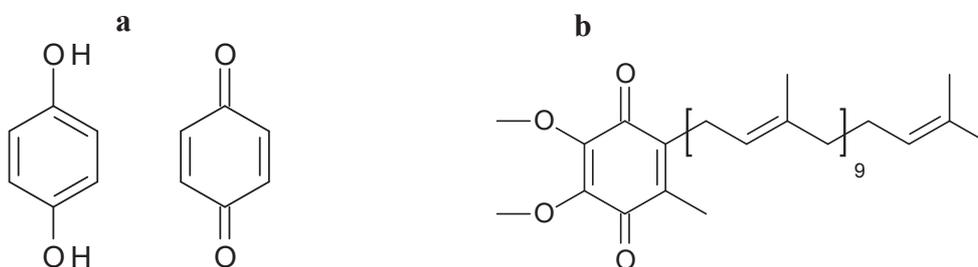
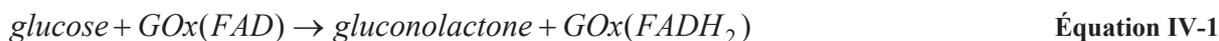


Schéma IV-1: Structure de : a- la quinhydrone et de b- l'ubiquinone

IV.2.a Principe

Contrairement au principe des biopiles développées dans le chapitre précédent, les espèces électroactives sont ici utilisées comme transporteur électronique entre les centres actifs des enzymes et le circuit électrique extérieur. A l'anode, la GOx catalyse l'oxydation du glucose selon la réaction :



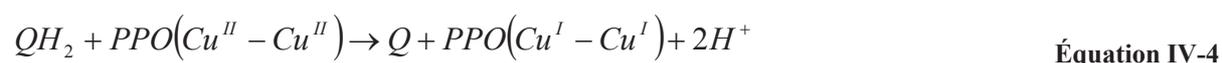
Le centre actif de l'enzyme, alors réduit, s'oxyde sous l'action de UQ, ce qui conduit à la formation de l'espèce UQH₂ nécessaire au fonctionnement de l'anode et régénère par la même occasion la forme oxydée de la protéine (Équation IV-2) :



A la cathode, la PPO catalyse la réduction du dioxygène dissous dans l'eau.



La présence du couple Q/QH_2 permet de catalyser cette réduction puisque celle-ci s'oxyde en présence de la forme oxydée de l'enzyme par la réaction :



En connectant les deux électrodes par une résistance externe, la pile se décharge alors suivant les réactions :

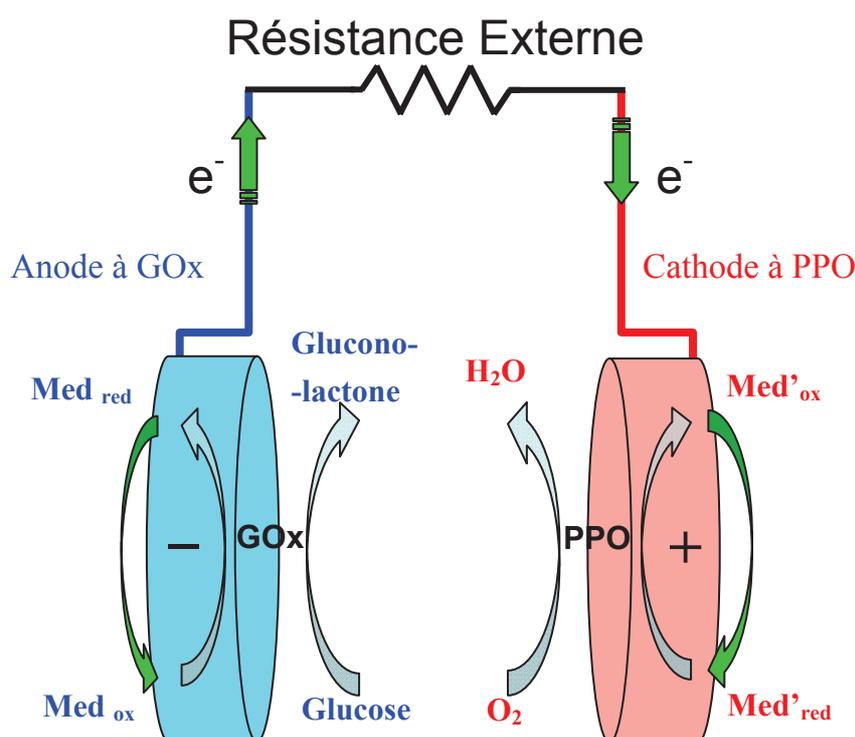


Schéma IV-2: Schéma de principe d'une pile à glucose/O₂ avec utilisation de médiateur rédox pour le transfert électronique entre les centres actifs des enzymes et le circuit électrique extérieur

Le principe de réalisation des électrodes compressées est identique à celui développé dans le **chapitre III**. Il consiste à appliquer une pression mécanique à une solution solide sous forme de pâte contenant du carbone graphite (conducteur électronique), un médiateur rédox et une oxydoréductase préalablement homogénéisée. La différence vient de la présence de

l'enzyme immobilisée elle aussi dans l'électrode et non en solution comme il était le cas dans le chapitre évoqué.

IV.2.b Caractérisation des éléments de la biopile

IV.2.b.1 Surface spécifique du carbone graphite

La première étape de caractérisation des électrodes consiste à déterminer la valeur de la surface spécifique des électrodes compressées. Pour cela, des mesures de voltampérométrie cyclique sur des électrodes compactées contenant uniquement du carbone graphite sont réalisées en présence de l'espèce rédox [Fe^{III}(CN)₆]³⁻ (1.10⁻³, 2,5.10⁻³ mol.L⁻¹) dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹. D'après l'**Équation IV-5**, le courant de pic de réduction d'une espèce électroactive en solution est directement proportionnel à la racine carrée de la vitesse de balayage en potentiel appliquée lors de la polarisation de l'électrode.

$$I_{p,c} = 0,446n^{3/2}FS[O]_{sol} \left(\frac{D_o F}{RT} \right)^{1/2} v_b^{1/2} \quad \text{Équation IV-5}$$

avec : n le nombre d'électrons échangés lors de la réaction (ici, $n = 1$)

F la constante de Faraday

S la surface participant à la réaction (cm²)

$[O]_{sol}$ la concentration en espèce oxydante en solution (mol.cm⁻³)

D_o le coefficient de diffusion de l'espèce oxydante (6,95.10⁻⁶ cm².s⁻¹)

R la constante de gaz parfaits

T la température (298 K)

v_b la vitesse de balayage en potentiel (V.s⁻¹)

La pente de la droite obtenue permet alors d'accéder à la surface de l'électrode en prenant comme valeur de coefficient de diffusion de la sonde rédox $D_o = 6,95.10^{-6}$ cm².s⁻¹ et $n = 1$. Une électrode compressée contenant 100 % de carbone en masse est immergée dans des solutions de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹ avec différentes concentrations en [Fe(CN)₆]³⁻ (typiquement, 1.0.10⁻³, 2,5.10⁻³ et 5,0.10⁻³ mol.L⁻¹). Des mesures de voltampérométrie cyclique sont effectuées à plusieurs vitesses de balayages (10, 25, 50, 100 et 250 mV.s⁻¹) (**Figure IV-2-a**).

La variation de la vitesse de balayage en potentiel de 10 à 250 mV.s⁻¹, montre que la surface moyenne d'une électrode de diamètre $\varnothing = 5$ mm et d'épaisseur $e = 2$ mm est

sensiblement identique à la surface géométrique de celle-ci ($S_{\text{mesurée}} = 0,51 \pm 0,19 \text{ cm}^2$; $S_{\text{géométrique}} = 0,51 \text{ cm}^2$). La diffusion de la sonde rédox à l'intérieur de l'électrode semble donc être lente pour avoir accès au volume de graphite constituant l'électrode.

Des mesures de BET ont été réalisées. Cependant, aucun résultat exploitable n'a pu être obtenu.

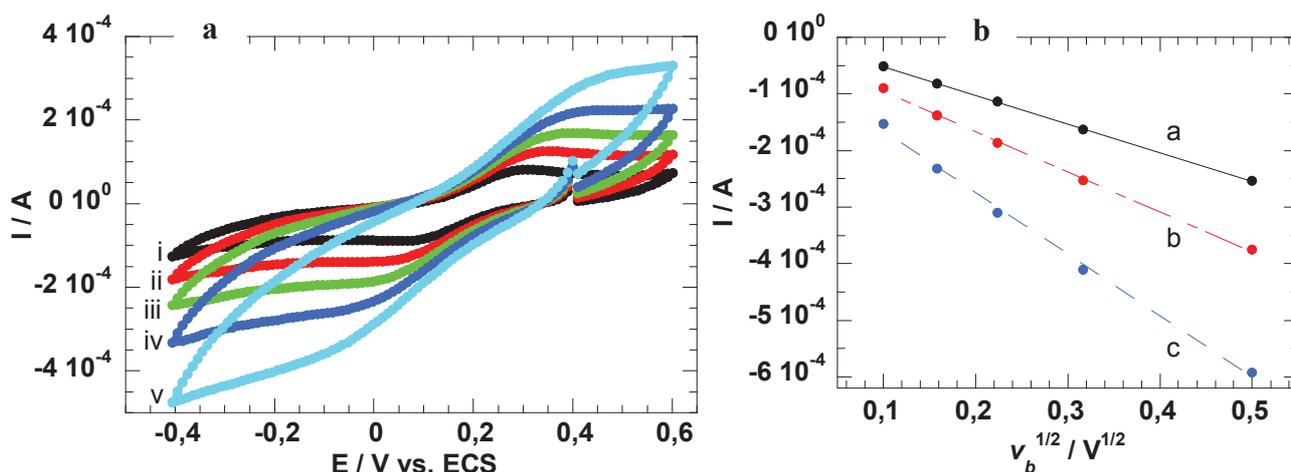


Figure IV-2: a- Courbes de voltampérométrie cyclique d'une électrode compactée ($\varnothing = 5 \text{ mm}$) immergée dans une solution de $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{HEPES } 25.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,2$, T_{ambiante} , air saturé) contenant $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-} 2,5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ pour différentes vitesses de balayage : i- 10 mV.s^{-1} , ii- 25 mV.s^{-1} , iii- 50 mV.s^{-1} , iv- 100 mV.s^{-1} , v- 250 mV.s^{-1} . b- Dépendance du courant de pic cathodique par rapport à $v_b^{1/2}$ de l'électrode précédente pour différentes concentrations de $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$: a- $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, b- $2,5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, c- $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Équation de la régression linéaire de ii- $2,5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$: $y = - 2,426.10^{-5} - 7,089.10^{-4}x$

IV.2.b.2 Caractérisation de l'électrode UQ-GOx

L'ubiquinone est un médiateur peu soluble en milieu aqueux. De ce fait, la caractérisation de son électrochimie et de l'effet catalytique de la GOx sur celui-ci lors de l'oxydation du glucose est difficile. Pour cela, le choix s'est porté sur l'utilisation d'ultramicroélectrodes à cavité (*umec*) en carbone. Les électrodes présentent une cavité à leur extrémité. Celles-ci sont remplies par une solution faite d'un mélange de médiateur insoluble et d'enzyme (rapport massique 1 :1). Une fois dans la cavité, le médiateur est suffisamment proche de la surface active de carbone pour observer son électroactivité. De plus, ses propriétés hydrophobes permettent de confiner l'enzyme (hydrosoluble) à l'intérieur de la cavité pour mesurer l'effet catalytique de la protéine sur l'espèce rédox en présence de substrat. La **Figure IV-3-a** montre les courbes de balayage consécutif d'une *umec* remplie de l'espèce UQ uniquement. Après un balayage initial dans les potentiels positifs (ii), le premier cycle dans la région des potentiels négatifs fait apparaître un pic de réduction ($E_{\text{pc}} \sim -0,55 \text{ V}$). Le second cycle (iii) fait apparaître un signal en oxydation ($E_{\text{pa}} \sim 0,19 \text{ V}$) (suivi du pic de

réduction déjà observé). Ces deux pics sont donc attribués à la réduction de *UQ* et à l'oxydation de *UQH₂* en sa forme oxydée. La **Figure IV-3-b** fait état de l'effet catalytique de la *GOx* sur l'électroactivité de l'espèce rédox. Les courbes **i** et **ii** sont les voltampérogrammes d'une *umec* dont la cavité remplie de *UQ/GOx* en absence et en présence de glucose respectivement. En présence du substrat, l'intensité du pic de réduction de *UQ* diminue au profit de l'augmentation du signal en oxydation. Il s'agit bien d'un phénomène catalytique provoqué par la *GOx*.

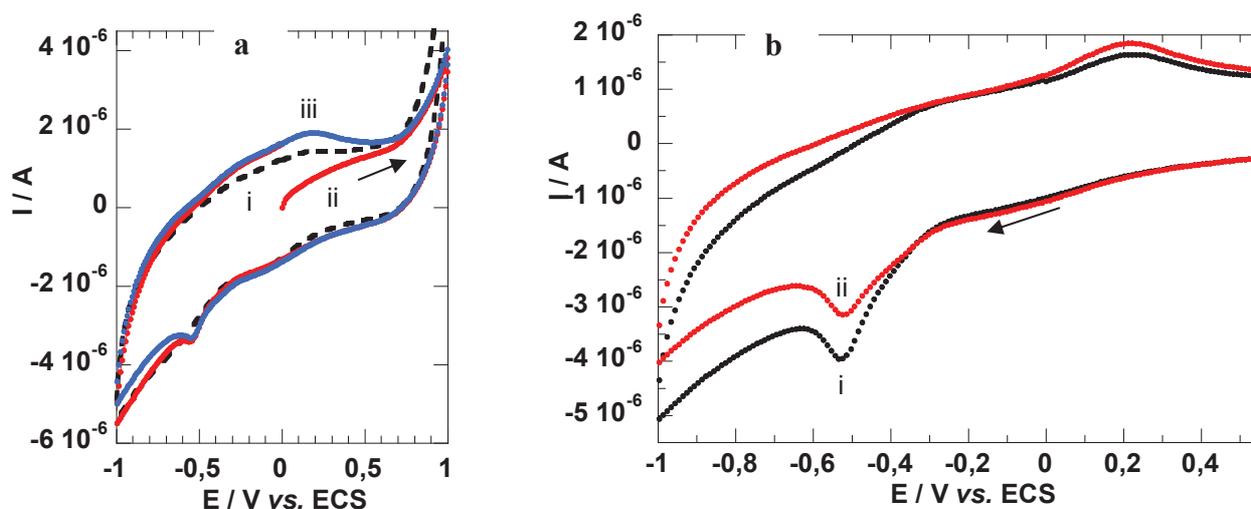


Figure IV-3: a- Voltampérométrie cyclique d'une ultramicroélectrode à cavité en carbone : i- vide, ii- contenant *UQ* (1^{er} scan), iii- contenant *UQ* (2^{ème} scan) immergée dans solution électrolytique NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹ (pH = 7,2, T_{ambiante}, air saturé). b- Voltampérométrie cyclique d'une *umec* contenant *UQ/GOx* (rapport 1 :1 en masse) immergée dans la même solution électrolytique : i- en absence de glucose et ii- en présence de glucose 30.10⁻³ mol.L⁻¹, $v_b = 100 \text{ mV.s}^{-1}$

L'ubiquinone apparaissant donc comme un médiateur de la glucose oxydase, une électrode compressée est réalisée en immobilisant le médiateur ainsi que l'enzyme dans la matrice de carbone. La réactivité de la *GOx* avec l'oxygène dissous entraînant la formation de H₂O₂, la catalase est ajoutée au mélange et contribue au maintien d'une concentration faible en peroxyde. Les performances de cette bioanode sont mesurées grâce à des mesures de voltampérométrie linéaire en tension (courbe de polarisation).

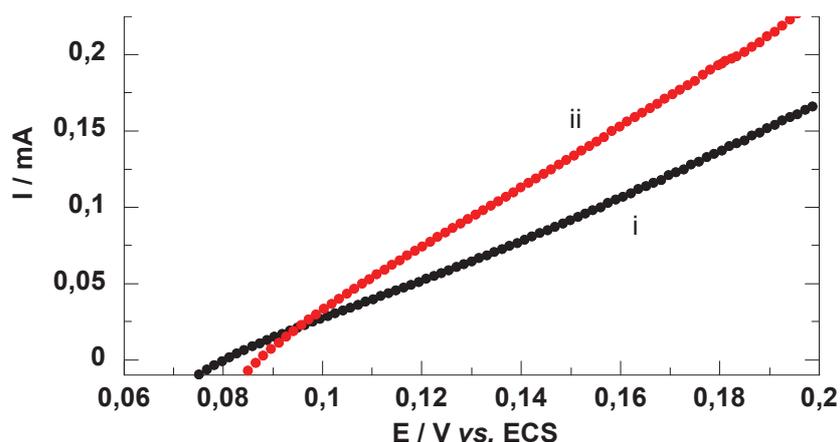


Figure IV-4: Courbes de polarisation anodique de deux électrodes compressées ($\varnothing = 13$ mm) contenant un rapport massique de carbone graphite/ubiquinone GC/UQ de 66 :33 et de : i- rapport GOx-Catalase/UQ de 13-6 %, ii- rapport GOx-Catalase/UQ de 26-13 %, immergées dans une solution électrolytique de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹, glucose 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹ (pH = 7,2, T_{ambiant}, air saturé), $v_b = 5$ mV.s⁻¹

Ces mesures sont effectuées pour une concentration fixe en UQ vis-à-vis du carbone graphite nécessaire à la réalisation de la bioélectrode soit 33 % en masse de médiateur. L'influence de la quantité d'enzymes confinées est ensuite vérifiée. Les courbes de polarisation réalisées en présence de glucose 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹ indique une dépendance entre charge enzymatique et courant catalytique. En effet, bien que le potentiel d'abandon (open circuit potential, OCP en anglais) des deux électrodes soit similaire ($E_{OCP} = 80 \pm 4$ mV vs. ECS), les courants d'oxydation mesurés à l'anode contenant deux fois plus d'enzymes sont plus importants. L'oxydation de UQ débute à la valeur de l'OCP de l'électrode en considération et croit quasi linéairement sur l'ensemble de la gamme de potentiel étudiée (**Figure IV-4**). Le gain en courant atteint 25 % lorsque la quantité d'enzymes est doublée.

IV.2.b.3 Caractérisation de l'électrode QQH₂-PPO

Dans le cas de l'étude du médiateur cathodique, la caractérisation n'a pas été conduite avec les *umec* car le médiateur est trop soluble pour être efficacement immobilisé dans la cavité. De ce fait, l'unique caractérisation de la cathode consiste à réaliser la courbe de polarisation d'une électrode compressée contenant 50 % de médiateur rédox pour 50 % en carbone graphite. Le potentiel à l'abandon de la biocathode est de +0,146 V vs. ECS. La courbe de polarisation cathodique (**Figure IV-5**) fait elle aussi apparaître une augmentation quasi linéaire du courant de réduction de Q en QH₂.

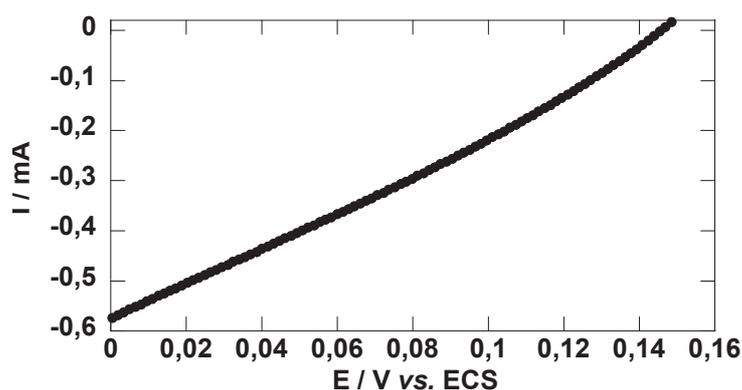


Figure IV-5 : Courbes de polarisation cathodique d'une électrode compressée contenant ($\varnothing = 13\text{mm}$) contenant un rapport massique carbone graphite (GC)/QQH₂ de 50 :50 et de PPO/QQH₂ de 3 % immergée dans une solution électrolytique de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹ (pH = 7,2, T_{ambiante}, air saturé), $v_b = 5 \text{ mV.s}^{-1}$

IV.2.c Performances de la biopile : Mesures *in vitro*

IV.2.c.1 Préparation de la biopile

Une fois la caractérisation de chacune des électrodes effectuée, l'étape de mesure des performances de la biopile quinhydrone/ubiquinone a pu être entreprise dans les conditions normales d'utilisation, à savoir, NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹, glucose 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹ (tampon mimant le liquide extracellulaire, pH = 7,2), à température ambiante (T = 25 ± 2 °C) et sous air saturé.

Comme il a été indiqué dans le paragraphe précédent, le médiateur rédox cathodique est en partie soluble. La biocathode est donc enveloppée dans une membrane d'acétate de cellulose de porosité de 100 Da limitant la diffusion de la quinhydrone. Le médiateur anodique étant lui insoluble, une membrane de dialyse de porosité plus élevée (6-8000 Da) sert à recevoir la biocathode enveloppée et la bioanode. Les deux substrats, l'oxygène et le glucose, peuvent néanmoins diffuser à travers les membranes jusqu'à leurs électrodes respectives.

IV.2.c.2 Mesures des performances *in vitro*

Les premières courbes de polarisation des deux bioélectrodes séparées (**Figure IV-6**) montrent que la pile possède une *f.e.m.* initiale de +65 mV. L'allure générale des courbes laisse entrevoir une limitation à la bioanode. En effet, le courant maximal obtenu à cette électrode à +0,145 V vs. ECS (potentiel à l'abandon de la biocathode) n'est que de +90 μA tandis que le courant de la biocathode (mesuré lui au potentiel à courant nul de l'anode) est de -295 μA . Cette forte limitation a été attribuée à la forte hydrophobicité du médiateur UQ utilisé à l'anode pour l'oxydation du glucose par la présence de la longue chaîne alkyle. Le

transfert électronique entre le groupement prosthétique *FAD* de la *GOx* et le médiateur semble ralenti.

Par un traitement graphique de ces données, la courbe de puissance théorique de la pile est obtenue (**Figure IV-6-b i**). La forme parabolique typique d'une courbe de puissance indique alors une puissance maximale de 1,18 μW à +34 mV. La comparaison de cette courbe avec la celle obtenue expérimentalement lors du premier jour d'immersion (**Figure IV-6-b ii**) donne des résultats similaires, ce qui indique que le traitement initial des valeurs données par les courbes de polarisation peut aider à estimer les performances d'une pile.

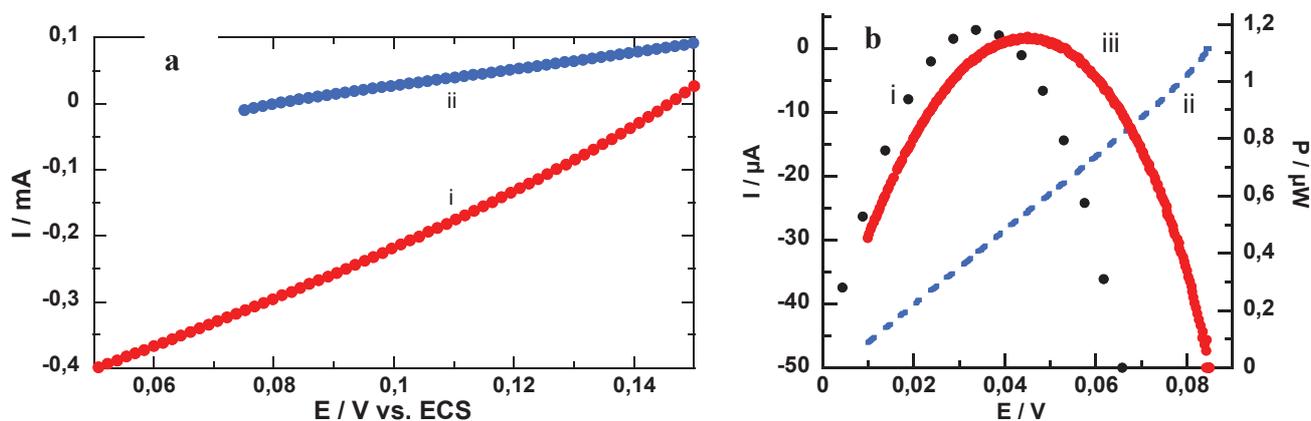


Figure IV-6: a- Courbes de polarisation i- cathodique et ii- anodique de chacune des électrodes constituant la biopile à glucose oxygène *QQH₂/UQ* ($\varnothing = 13\text{mm}$), i- 50 :50 *GC/QQH₂* ; *PPO/QQH₂* 3 %, ii- 66 :33 *GC/UQ* ; *GOx-Catalase/UQ* 13-6 %, immergées dans une solution électrolytique de *NaCl* 0,15 mol.L⁻¹, *HEPES* 25.10⁻³ mol.L⁻¹ et glucose 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹ (pH = 7,2, *T_{ambiantes}*, air saturé), $v_b = 5\text{ mV.s}^{-1}$. b- i- Courbe de puissance théorique construite à partir des courbes de polarisation, ii- courbe de polarisation de la pile après 24 heures d'immersion et iii- courbe de puissance issue de la courbe de polarisation précédente

La puissance de cette pile ainsi que sa capacité à fonctionner comme un générateur de courant sont suivies quotidiennement. La solution tampon de stockage de la pile est changée après 24 heures d'immersion pour assurer une concentration en glucose à une valeur proche de 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹ et maintenir une concentration faible en acide gluconique pour éviter l'inhibition de la *GOx*. Après une première journée immergée dans la solution mimant le Fluide Extra-Cellulaire (*FEC*), la *d.d.p.* est de +80 mV, ce qui est en accord avec le potentiel mesuré par les courbes de polarisation. Après 120 heures d'immersion continues (**Figure IV-7-a, J5**), la pile délivre une puissance de 2,1 μW à +80 mV ($P_{\text{max}} = 1,58\ \mu\text{W.cm}^{-2}$) et une différence potentiel à l'abandon de +0,205 V, avant de connaître une phase de diminution de potentiel et de puissance visibles à **J12**. A partir du 15^{ème} jour de fonctionnement (**Figure IV-7-b**), la *f.e.m.* et la puissance de la pile augmentent puis se stabilisent à une valeur proche de +0,250 V et 1,75 μW (**Figure IV-7-c**). Le potentiel correspondant à la puissance maximale quant à lui n'a pas varié sur l'ensemble des mesures.

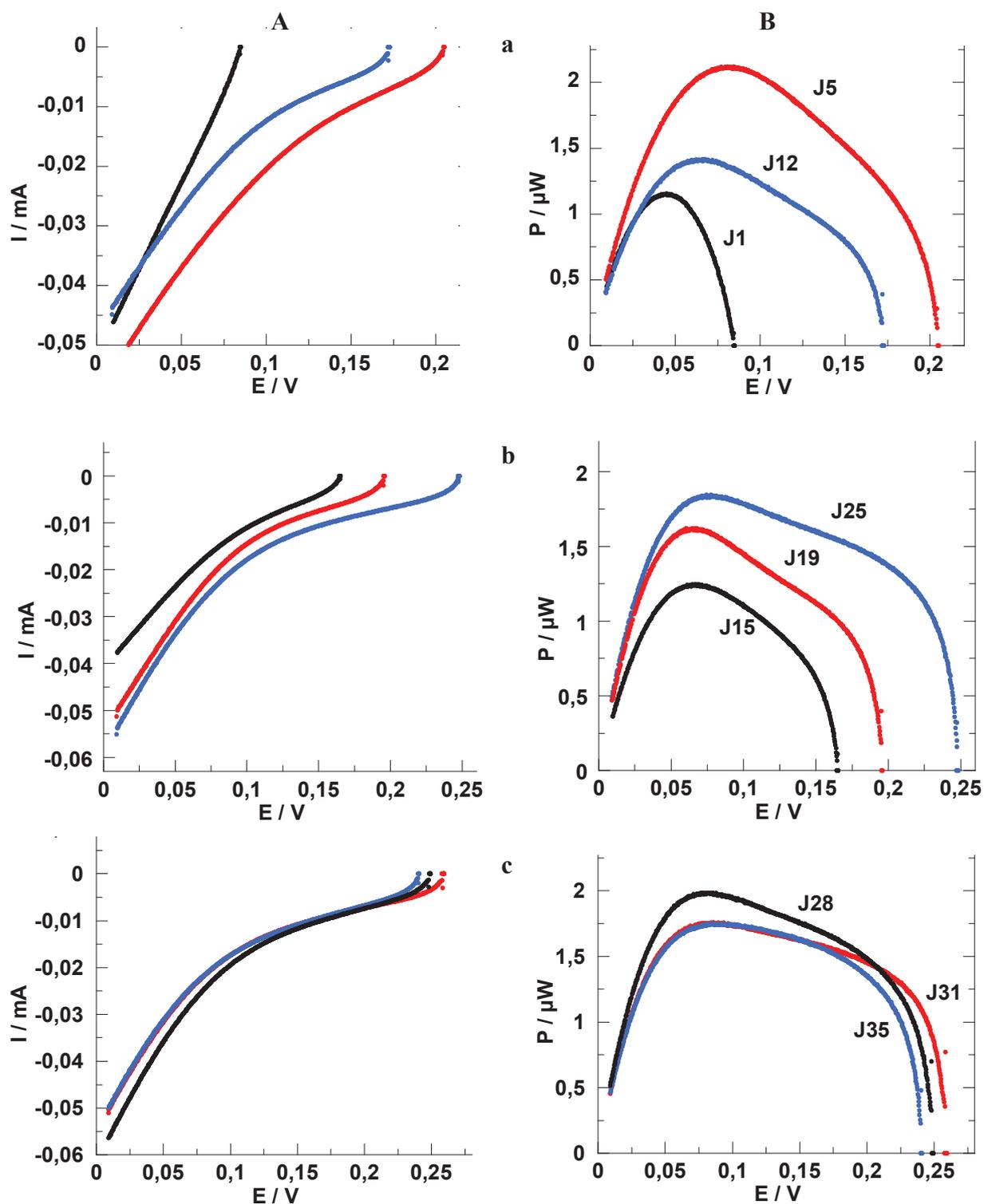


Figure IV-7: Courbes de polarisation (A) et de puissance (B) d'une biopile à glucose oxygène QQH_2/UQ ($\varnothing = 13\text{mm}$) immergée dans une solution de $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{HEPES } 25 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et glucose $5,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,2$, T_{ambiante} , air saturé), pour le jour d'immersion J_n , $v_b = 5 \text{ mV.s}^{-1}$. La solution est renouvelée quotidiennement et la mesure de la puissance est réalisée après 12 heures d'immersion dans celle-ci. Composition des électrodes identiques à celles décrites dans la **Figure IV-6**. a- entre 1 et 12 jours, b- entre 15 et 25 jours et c- entre 28 et 35 jours

La biopile réalisée a fonctionné en continu sur une période totale de 40 jours. La **Figure IV-8** rappelle l'ensemble des valeurs de *f.e.m.* et de puissance maximale mesurées au cours de cette période. Il semble qu'un temps de stabilisation du système soit nécessaire pour que la biopile fonctionne de manière optimale. Lors des quinze premiers jours (phase 1), une fluctuation aléatoire de l'*OCV* et de P_{\max} est observée. Cela peut être attribué à un processus de réhydratation des électrodes qui subissent un assèchement conséquent lors la fabrication et de l'assemblage complet de la pile. Ensuite, au temps **J15**, les performances augmentent progressivement et se stabilisent au jour **J25** (phase 2). La dernière phase qui s'étend de **J25** à **J40** renseigne sur la stabilité de la pile (phase 3). Le potentiel ne varie plus ($E_{f.e.m.} = 0,246 \pm 0,008$ V) et la puissance également ($1,79 \pm 0,20$ μ W).

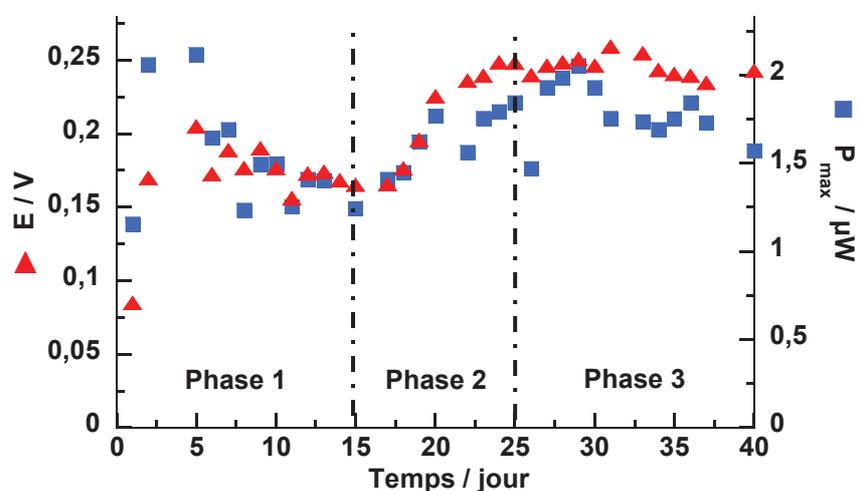


Figure IV-8: Courbes de stabilité du potentiel à l'abandon (▲) et de la puissance maximale (■) d'une biopile à glucose/O₂ QQH₂/UQ ($\varnothing = 13$ mm) immergée dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹, glucose 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹ (pH = 7, 2, T_{ambiante} air saturé). Composition des électrodes identiques à celles décrites dans la **Figure IV-6**

Parallèlement aux mesures de puissance de la pile, sa capacité à fonctionner comme un générateur électrochimique est réalisée en imposant la circulation d'un courant de 5 μ A pendant 10 minutes. Ce temps correspond à une période d'ouverture et de fermeture d'un sphincter urinaire robotisé. Le courant nécessaire pour actionner un tel dispositif est nettement supérieur puisque d'après les premières estimations, il fonctionnerait pour une puissance moyenne de 200 μ W¹⁴. Cependant, les informations obtenues lors des étapes de cycle « charge/décharge » sont essentielles pour entrevoir l'utilisation future d'une biopile pour l'alimentation électrique d'objets médicaux de ce genre.

Les courbes de décharges obtenues (**Figure IV-9**) montrent les performances de la pile suivant les trois phases décrites précédemment. Le premier jour d'utilisation (**J1**), malgré une

faible variation du potentiel de la pile (pente : $-1,3 \text{ mV}\cdot\text{min}^{-1}$), la valeur initiale de la *f.e.m.* rend la pile globalement peu performante.

Par la suite, les performances de la pile deviennent plus intéressantes. En effet l'augmentation de la différence de potentiel entre la cathode et l'anode est significative (*f.e.m.* $\sim 0,170 \text{ V}$) et la pente due à la chute de potentiel ne varie que légèrement entre 4 et 10 minutes (D1, D2 : $-2,2 \text{ mV}\cdot\text{min}^{-1}$, D18 : $-2,6 \text{ mV}\cdot\text{min}^{-1}$ et D39 : $-3,8 \text{ mV}\cdot\text{min}^{-1}$).

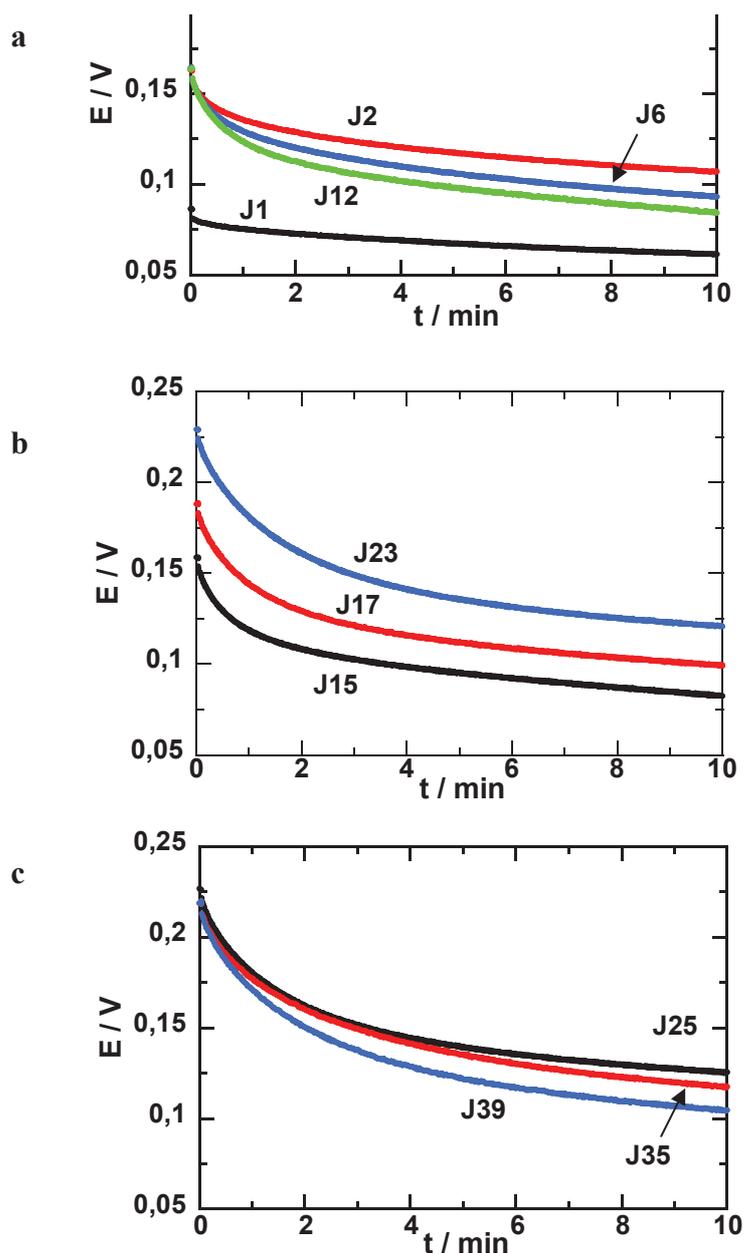


Figure IV-9: Courbes de décharge à courant constant de $5 \mu\text{A}$ de la biopile à glucose/O₂ QQH₂/UQ ($\varnothing = 13\text{mm}$) immergée dans une solution de NaCl $0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, HEPES $25\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, glucose $5,5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,2$, T_{ambiante} , air saturé), pour le jour d'immersion J_n . a- phase 1, b- phase 2, c- phase 3. Composition des électrodes identiques à celles décrites dans la **Figure IV-6**

IV.2.d Performances de la biopile : Mesures *in vivo*

La stabilité de la pile atteignant une durée acceptable, les mesures de fonctionnement de la pile dans un organisme vivant sont envisagées.

IV.2.d.1 Préparation de la biopile

Pour la conception des biopiles implantées dans des organismes vivants, les conditions de préparation (d'assemblage) ont été adaptées. L'ensemble du matériel utilisé a été au préalable désinfecté par autoclave à 120 °C pendant 20 minutes à 1 bar. Des solutions électrolytiques de Ringer nécessaires à l'immersion des électrodes ont été utilisées en ajoutant la quantité adéquate de glucose pour obtenir une concentration de $5,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. L'assemblage des électrodes est réalisé sous une hotte à flux laminaire pour garantir une stérilité optimale avant l'implantation dans le corps de l'animal. Tout comme dans le protocole *in vitro*, la cathode est insérée dans un sac de dialyse de seuil de coupure de 100 Da puis l'ensemble formé par la cathode enveloppée et l'anode est introduit dans une membrane de 6-8 kDa. Pour augmenter la biocompatibilité de la biopile, une troisième membrane ensache dans l'assemblage. Il s'agit d'une membrane de PolyTetraFluoroEthylène (PFTE, Dacron®, **Figure IV-10**) qui est une membrane couramment utilisée lors d'intervention chirurgicale sur le système vasculaire¹⁵ puis cousue à l'aide de fil de suture non résorbable. Une fois assemblée, la pile est immergée et stockée à 4 °C au maximum 12 heures avant l'implantation.



Figure IV-10: Pile insérée dans une membrane de Dacron®, immergée dans une solution de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, HEPES $25 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et glucose $5,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ à pH = 7,2

IV.2.d.2 Expérimentation chez le rat

Le choix de l'animal s'est orienté vers le rat (Wistar, $m_{\text{moyenne}} = 450 \text{ g}$) pour plusieurs raisons. Premièrement, l'organisme de cet animal est très proche de celui de l'être humain tout comme son pH physiologique ($\text{pH}_{\text{rat}} = 7,2$; $\text{pH}_{\text{humain}} = 7,4$). De plus, le système

immunitaire du rat est très « performant » dans la lutte contre les infections. Ce choix a impliqué un effort important de miniaturisation des objets implantés ce qui a rendu l'assemblage plus délicat. L'implantation de la pile a été réalisée sous anesthésie générale (par injection intra péritonéale de Kétamine/Xylamine ou sous flux constant d'isoflurane). Une fois la paroi abdominale ouverte, la pile est insérée dans la partie gauche de l'abdomen. Les cathéters sont tunnelisés par voie sous cutanée de l'incision à la nuque de l'animal (**Figure IV-11**). Une dose sous cutanée d'antalgique (Rimadyl 5 mg.kg⁻¹) est enfin administrée après l'intervention pour limiter les douleurs dues à l'opération.

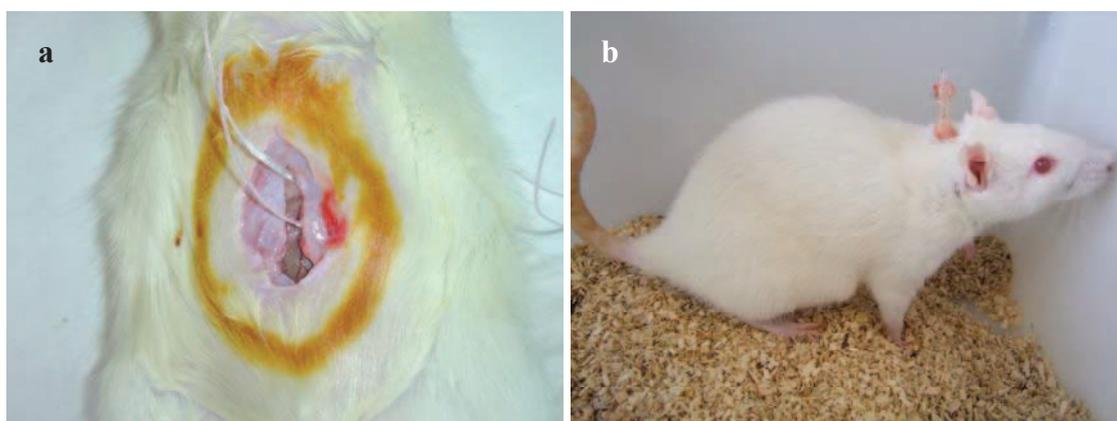


Figure IV-11: a- Intervention chirurgicale sur le rat : laparotomie médiane pour l'insertion de la biopile dans l'espace abdominal de l'animal. Tunnelisation sous cutanée des cathéters contenant les fils de connexion de l'abdomen à la nuque. b- Rat libre de mouvement dans sa cage après l'implantation d'une biopile

IV.2.d.3 Mesure des performances dans un organisme vivant

Les temps de mesure lors des expérimentations chez le rat sont minimisés afin de limiter le stress de l'animal. La mesure de la *d.d.p.* de la pile est établie pour une 1 minute et les mesures de puissance et de décharge faites successivement sont limitées à des mesures journalières. Le temps de connexion de l'animal ne dépasse pas 15 minutes par journée (**Figure IV-12**). La durée ainsi que la valeur du courant de décharge sont calculées sur les valeurs *in vitro* pour les mêmes raisons.

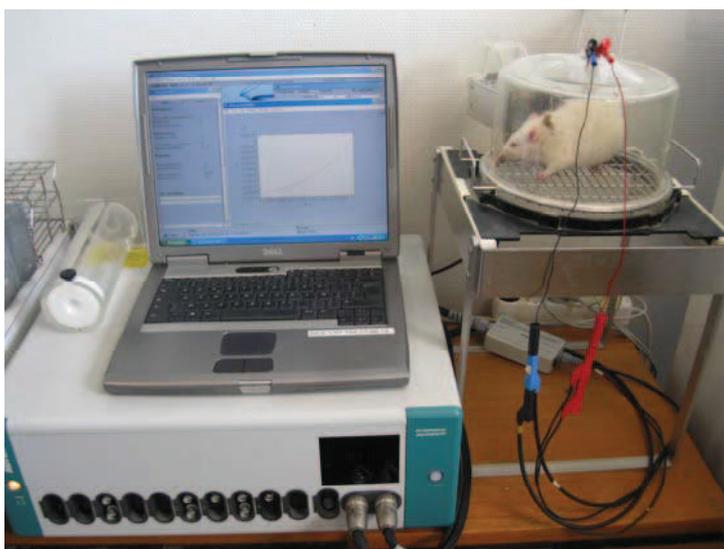


Figure IV-12: Vue de l'appareillage utilisé lors de la mesure de la puissance de la biopile implantée chez le rat

Les mesures des performances et de l'utilisation de la biopile implantée ont duré 11 jours. Au cours de cette période, aussi bien les courbes de puissance que les courbes de décharge montrent des résultats similaires aux expérimentations *in vitro*. Dès le premier jour d'implantation, la pile possède un potentiel à l'abandon de +120 mV et une puissance maximale de $P_{\max} = 1,63 \mu\text{W}$ à 60 mV (**Figure IV-13-a**). Comme observé dans le cas *in vitro* pour les phases 1 et 2, la force électromotrice de la pile et la puissance maximale fluctuent aléatoirement jusqu'au 6^{ème} jour d'implantation pour ensuite croître linéairement avec le temps (**Figure IV-13-c**). Le temps de stabilisation semble plus court et pourrait s'expliquer grâce à l'agitation de la biopile dans le rat (meilleure diffusion du glucose) et par la température corporelle du rat ($T^\circ = 35^\circ\text{C}$) supérieure à celle du laboratoire. De plus, les décharges montrent, elles aussi, que le système peut réellement fournir un courant stable sur une période de 10 minutes (pentes de perte de potentiel, i, ii : $-0,6 \text{ mV}\cdot\text{min}^{-1}$; iii, iv : $-2,5 \pm 0,1 \text{ mV}\cdot\text{min}^{-1}$) en appliquant un courant continu de $5 \mu\text{A}$. Les meilleures performances de cette pile sont obtenues lors du dernier jour de mesure, avec un OCV de +193 mV et une puissance maximale de $1,74 \mu\text{W}$ à +110 mV ($P_{\max} = 1,31 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$).

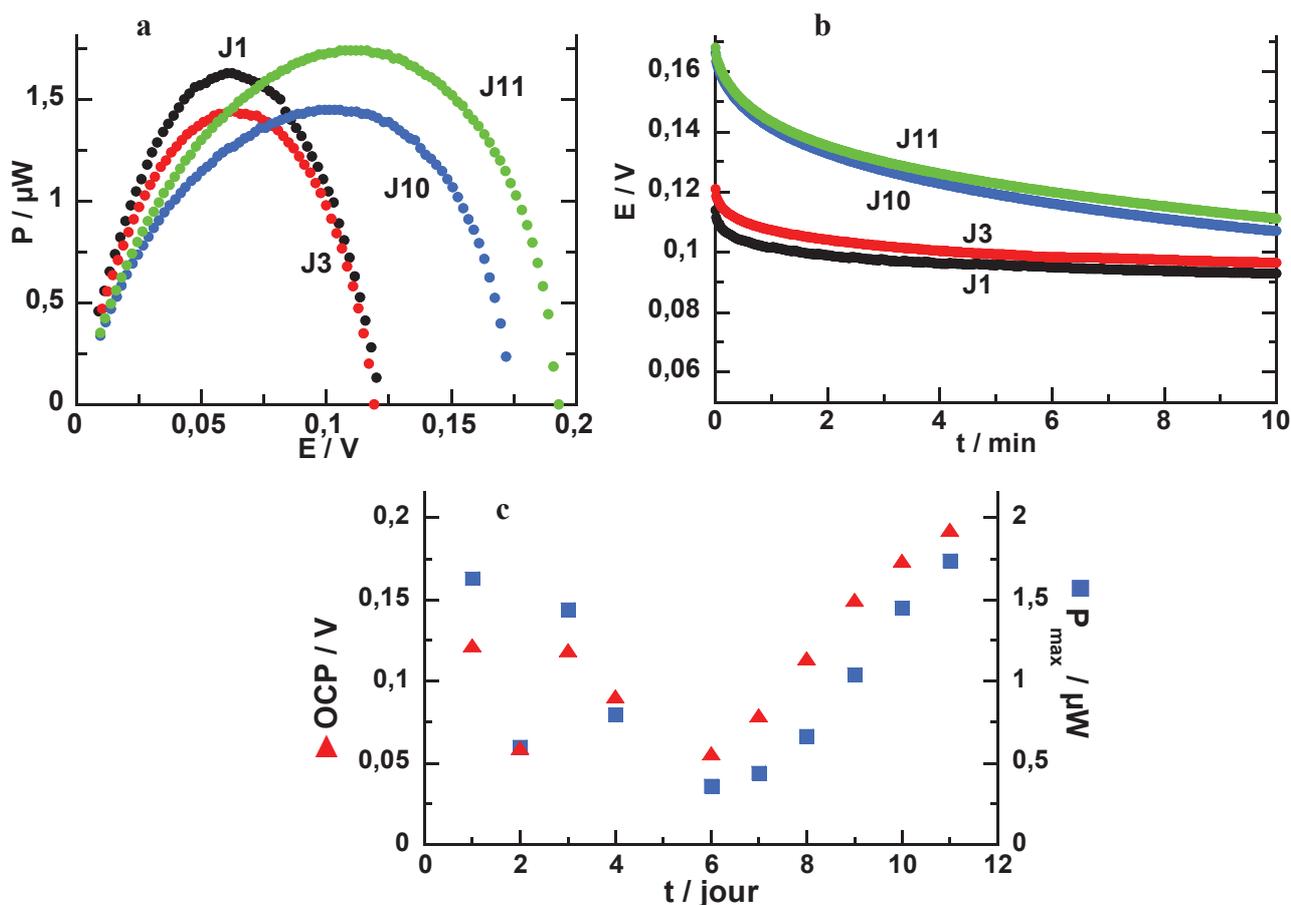


Figure IV-13: a- Courbes de puissance d'une pile à glucose oxygène QQH_2/UQ ($\varnothing = 13 \text{ mm}$) implantée dans le rat (Ricky 3) et b- décharge à courant constant de 5 μA de la biopile pour le jour d'implantation J_n . Composition des électrodes identique à celles décrites dans la **Figure IV-6** ; $v_b = 1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. c- Courbes de stabilité du potentiel à l'abandon (\blacktriangle) et de la puissance maximale (\blacksquare) de la biopile

Les mesures n'ont pas pu être réalisées à compter du jour **J12** à cause d'un sectionnement des fils par le rat au niveau de la nuque ce qui a conduit à euthanasier l'animal. Il est à noter que pendant la période d'expérimentation, le rat a perdu 50 g (23 % de sa masse initiale) tout en continuant à s'alimenter. L'autopsie de l'animal n'a pas fait état d'infection au niveau de l'implant. De plus, un réseau vasculaire semblerait s'être formé sur la membrane de Dacron® ce qui conduirait à une alimentation en glucose assurée à proximité de la pile.

IV.3 Vers d'autres médiateurs rédox pour la pile GOx/PPO

Les paragraphes précédents ont mis en évidence la faisabilité d'implantation et de fonctionnement d'une biopile dans un organisme vivant. Cependant, deux problèmes majeurs sont apparus lors de la caractérisation de la pile à QQH_2/UQ . Le premier concerne l'utilisation et le relargage de l'espèce rédox à la cathode. En effet, la quinhydrone est trop soluble et

l'immobilisation par simple compression mécanique n'est pas suffisante pour éviter sa diffusion hors de l'électrode. A forte concentration, cette espèce peut s'avérer toxique et létale (1,4-benzoquinone : DL₅₀ rat = 130 mg.kg⁻¹). La **Figure IV-14** expose le relargage de Q/QH₂ hors de l'électrode suivi par spectroscopie UV-visible à $\lambda = 290$ nm. En mesurant l'absorbance de la solution quotidiennement, le calcul de la perte journalière de Q/QH₂ est évalué. Au bout de 20 jours d'immersion continue, seulement 10 % de Q/QH₂ reste immobilisé dans l'électrode.

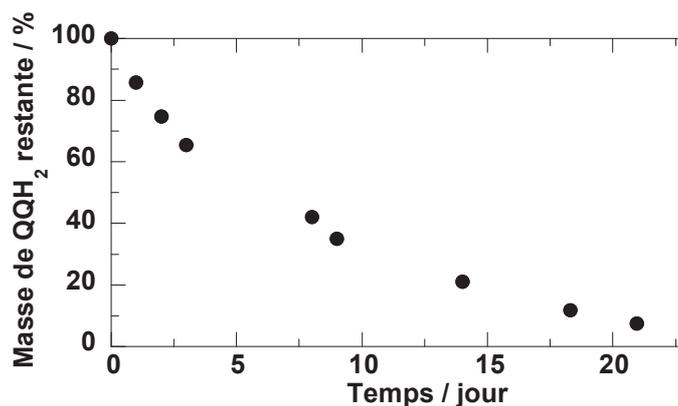


Figure IV-14: Courbe représentant la quantité de Q/QH₂ restante à l'intérieur de l'électrode compressée. Mesures effectuées par suivi de l'absorbance UV-visible à $\lambda = 290$ nm d'une solution tampon contenant la pile

Le second problème est la forte limitation des courants anodiques avec l'utilisation de l'ubiquinone comme médiateurs rédox pour la catalyse de l'oxydation du glucose. Dès lors, l'utilisation de ces deux médiateurs a dû être repensée.

IV.3.a Médiateurs à PolyPhénol Oxydase

D'après la littérature, il apparaît difficile de trouver une valeur précise du potentiel du centre actif de la PPO. Les valeurs sont situées autour de 0,360 V vs. ECS^{16, 17}. De ce fait, l'étude de nouveaux systèmes rédox s'est portée également sur quelques médiateurs connus de la laccase et de la bilirubine oxydase.

IV.3.a.1 Electrochimie de médiateurs rédox

Pour sélectionner les nouveaux médiateurs utilisables à la cathode, le comportement électrochimique de chacun d'eux, est caractérisé.

Dans un premier temps, les essais sur l'utilisation de nouveau médiateur à PPO se sont portés sur des espèces solubles. Ces espèces sont toutes des médiateurs connus de la PPO. Une première étude de l'électrochimie en solution de ces composés permet de déterminer s'ils sont

des candidats intéressants pour la réduction catalytique du dioxygène. La **Figure IV-15** représente les courbes de voltampérométrie cyclique de solution de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de trois espèces rédox, le catéchol (*C*), le 4-méthylcatéchol (*MC*) et la dopamine (*Do*) respectivement, dans le tampon HEPES $25 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ sur électrode de carbone vitreux. Comme attendu, lors du premier balayage dans la gamme des potentiels négatifs, les composés sont électroinactifs tandis que dans la zone des potentiels positifs un pic d'oxydation est observé à $E_{p,a} = 370 \text{ mV}$, $E_{p,a} = 273 \text{ mV}$ et $E_{p,a} = 382 \text{ mV}$ pour chacune des espèces précédemment citées. Au balayage retour, le pic de réduction de la forme oxydée est détectée à $E_{p,c} = -23 \text{ mV}$, $E_{p,c} = -55 \text{ mV}$ pour *C* et *MC* respectivement. Dans le cas de *Do*, deux signaux sont visibles dans le domaine cathodique et semblent correspondre à un phénomène déjà décrit par Liu et al.¹⁸ dans le cas de la 3,4-dihydroxy-L-phénylalanine.

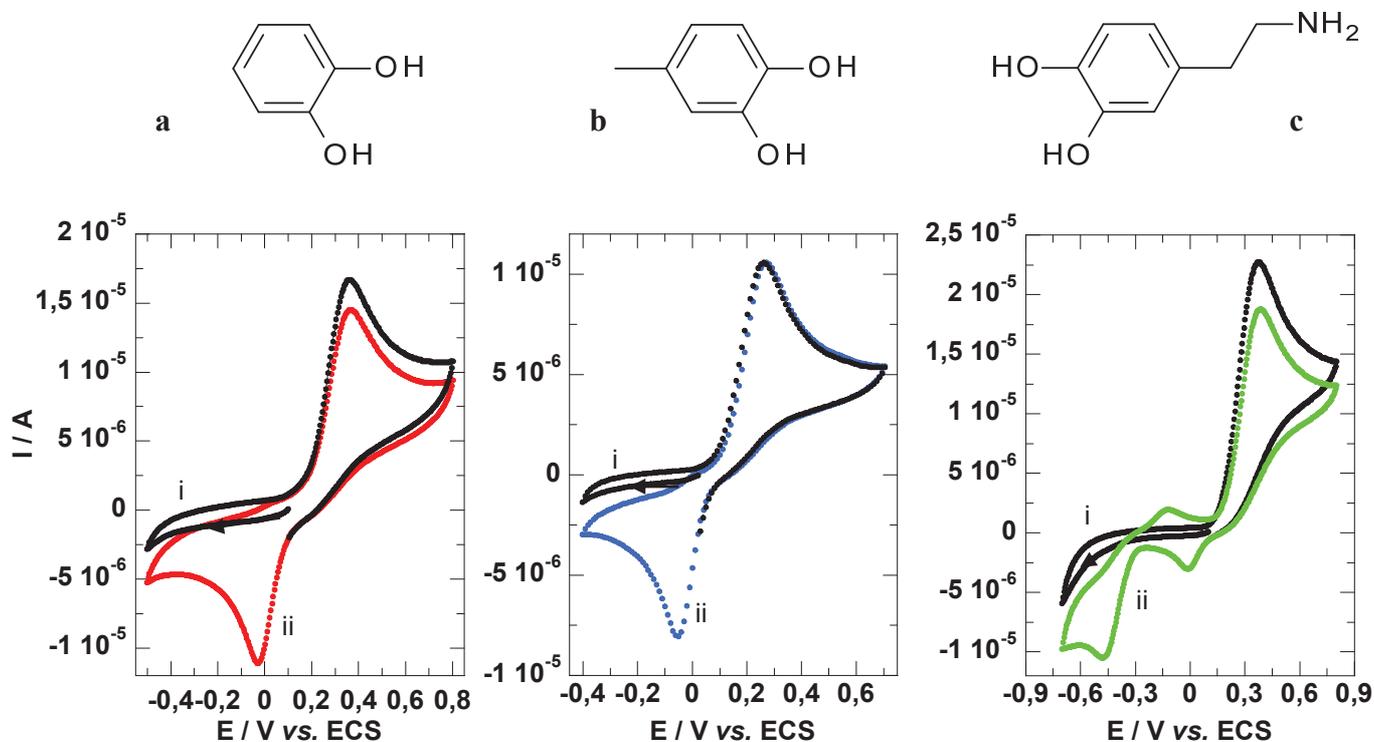


Figure IV-15: Structure (haut) et courbes de voltampérométrie cyclique (bas) d'une solution de : a- catéchol $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, b- 4-méthylcatéchol $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, c- Dopamine $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, HEPES $25 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7, 2$, T_{ambiante} , air saturé) sur électrode de carbone vitreux ($\text{Ø} = 3 \text{ mm}$), i- scan 1, ii- scan 2, $v_b = 100 \text{ mV.s}^{-1}$. La flèche indique le sens de balayage

D'autres médiateurs rédox faiblement solubles sont également caractérisés par voie électrochimique, tels que la syringaldazine (*SGZ*) et le ferrocène (*Fc*). Ces deux espèces électroactives sont connues pour fonctionner avec la *Lc* ou la *BOx*. Elles sont étudiées à l'aide d'*umec*. Les potentiels de demi-vague $E_{1/2}$ de chacune des espèces sont relativement proches

($E_{1/2\ SGZ} = +0,193\text{ V}$, $E_{1/2\ Fc} = +0,249\text{ V}$) (**Figure IV-16**) et semblent potentiellement attractifs pour assurer le transfert électronique de l'électrode à la PPO¹⁹.

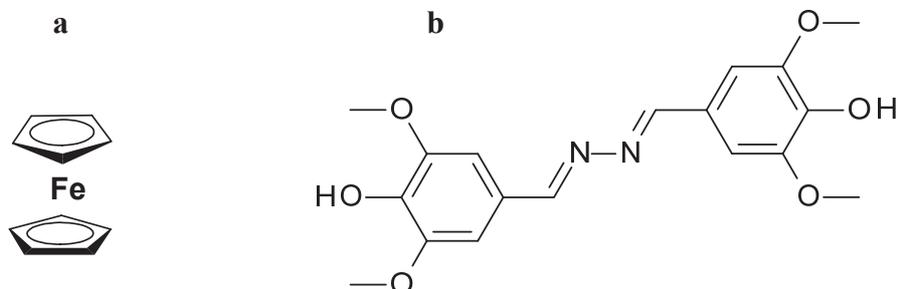


Schéma IV-3: Structure : a- du ferrocène et b- de la syringaldazine

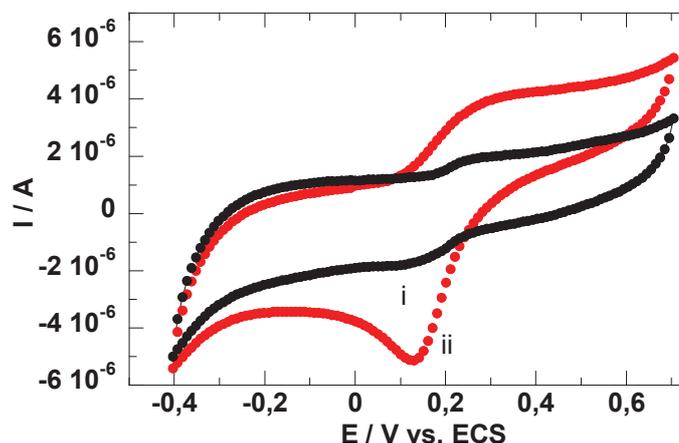


Figure IV-16: Courbes de voltampérométrie cyclique d'électrodes immergées dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹, (pH = 7, 2, T_{ambiante}, air saturé) d'une micro-électrode à cavité de carbone graphite et remplie de i- Syringaldazine, ii- Ferrocène, $v_b = 100\text{ mV.s}^{-1}$

Le dernier médiateur évalué, le tétrathiafulvalène (TTF), est normalement connu pour son utilisation couplée avec le centre FAD de la GOx²⁰ pour catalyser l'oxydation du glucose. Il pourrait également servir de donneur d'électrons à la PPO puisque son potentiel de demi-vagues est de +0,132 V vs. ECS, comme le montre le voltampérogramme (**Figure IV-17**). Il a déjà été démontré que cette espèce rédox catalyse « naturellement » la réduction du dioxygène^{21,22}.

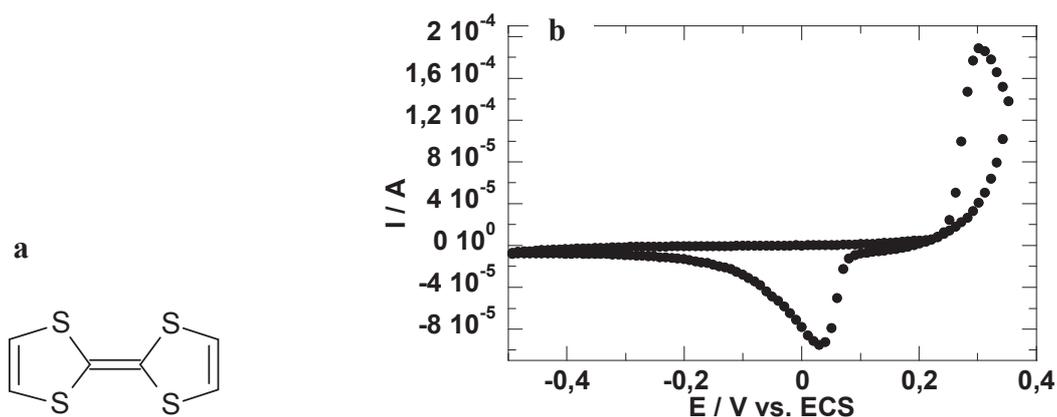


Figure IV-17: a- Structure du tétrathiafulvalène et b- courbe de voltampérométrie cyclique d'une umec de carbone graphite immergée dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹ et remplie de TTF, (pH = 7,2, T_{ambiante}, air saturé), v_b = 100 mV.s⁻¹

IV.3.a.2 Catalyse enzymatique de la réduction de O₂ avec les médiateurs rédox

Après la caractérisation électrochimique des nouvelles espèces, l'étude de l'effet catalytique de la PPO couplée à ces espèces rédox pour la réduction du dioxygène est réalisée.

Les dérivés du catéchol (C, 4-MC et Do) ont effectivement mis en évidence un effet catalytique lors de la présence de la PPO. La **Figure IV-18-a** représente cet effet catalytique dans le cas de l'utilisation du 4-méthylcatéchol. Le premier balayage en réduction indique que le médiateur est bien sous sa forme réduite (absence de pic de réduction comme déjà montré dans la **Figure IV-15**). Réalisé sous air saturé, le voltampérogramme **iii**, débuté lui dans le sens de l'oxydation après un ajout de 0,2 mg de PPO, fait clairement apparaître une diminution du pic d'oxydation du catéchol au profit d'un courant de réduction de l'*o*-quinone correspondante plus intense (I_{cat} = 4 μA) indiquant la consommation du catéchol par l'enzyme. Ce médiateur rédox est cependant instable dans le temps comme le montre la **Figure IV-18-b** : après avoir atteint un courant de pic I_{p,c} = -12 μA sous l'effet de la PPO, le courant de réduction décroît en fonction du temps et atteint -3,5 μA seulement 35 minutes après l'injection du biocatalyseur.

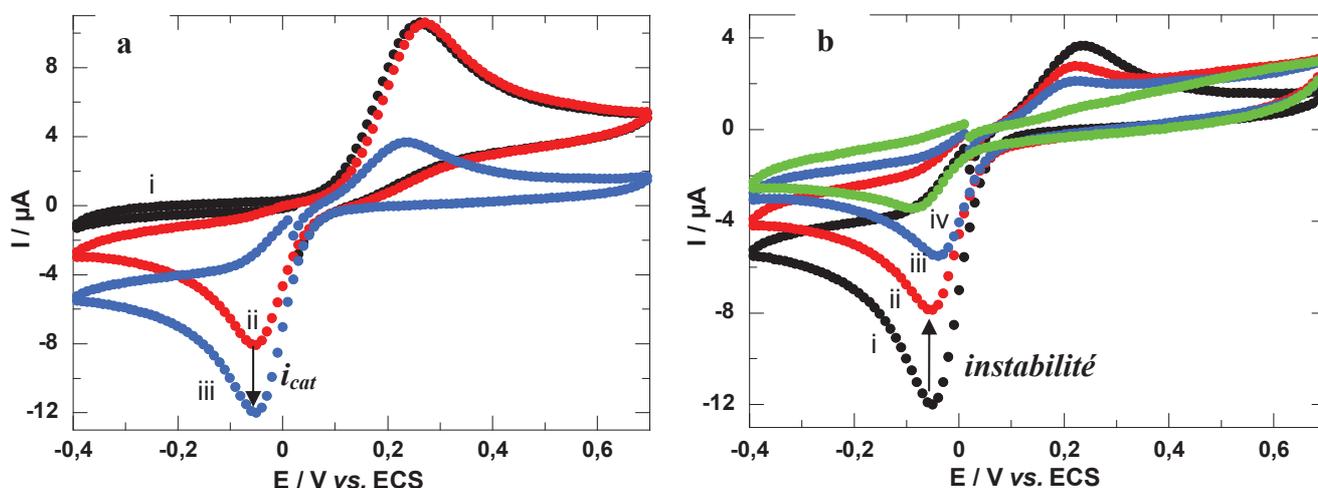


Figure IV-18: a- Courbes de voltampérométrie cyclique sur une électrode de carbone vitreux ($\varnothing = 3\text{mm}$) immergée dans une solution de NaCl $0,15\text{ mol.L}^{-1}$, HEPES $25.10^{-3}\text{ mol.L}^{-1}$, 4-méthylcatechol $1.10^{-3}\text{ mol.L}^{-1}$. i- départ en réduction, absence de PPO, ii- départ en oxydation, absence de PPO, iii- départ en oxydation, après ajout de $0,2\text{ mg}$ de PPO. b- Évolution du signal électrochimique du 4-méthylcatechol en présence de PPO en fonction du temps. i- après ajout de PPO, $t = 0\text{ min}$, ii- $t = 10\text{ min}$, iii- $t = 20\text{ min}$, iv- $t = 35\text{ min}$ ($\text{pH} = 7, 2$, T_{ambiante} , air saturé)

Cette réaction enzymatique est suivie par spectroscopie UV-visible entre 800 et 250 nm. La solution de 4-MC $3,45.10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$ dans une solution tampon NaCl $0,15\text{ mol.L}^{-1}$, HEPES $25.10^{-3}\text{ mol.L}^{-1}$ présente une bande d'absorbance à $\lambda = 280\text{ nm}$, caractéristique du 4-méthylcatéchol. Après une saturation en oxygène, l'injection d'une solution de $0,2\text{ mg}$ de PPO conduit à l'apparition d'une nouvelle bande située à $\lambda = 400\text{ nm}$ caractéristique de l'*o*-quinone atteignant une valeur maximale à $t = 240\text{ s}$. Ensuite, le spectre d'absorption évolue et fait apparaître deux points isobestiques à $\lambda = 370\text{ nm}$ et $\lambda = 446\text{ nm}$ traduisant la formation d'un nouveau produit, le *p*-quinométhane, issu de la dégradation de l'*o*-quinone²³.

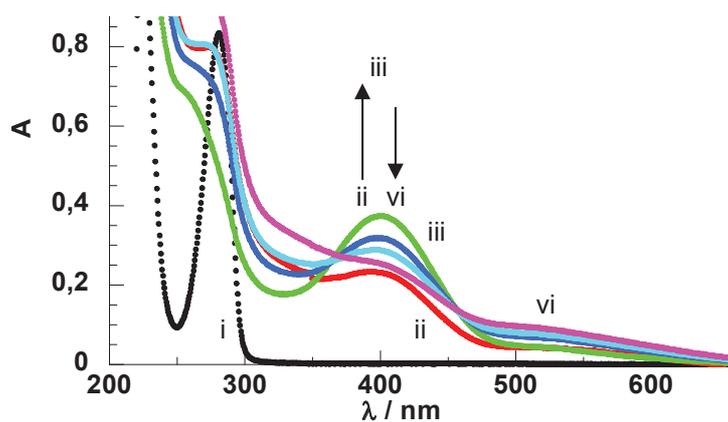


Figure IV-19: Spectre d'absorption UV-visible d'une solution de $3,45 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de 4-MC dans une solution tampon de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, HEPES $25 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$: i- sous air, en absence de PPO, ii à vi- sous O₂ saturé, en présence de 0,2 mg de PPO (ii- $t_0 = 0$, iii- 240 s, iv- 480 s, v- 720 s, vi- 1200 s)

Des résultats similaires sont rencontrés dans le cas du catéchol et de la dopamine. Dans les deux cas, le pic d'oxydation de l'espèce solubilisée diminue au profit de l'augmentation du pic de réduction dénotant ainsi l'effet catalytique de la polyphénol oxydase. Enfin, des mesures de voltampérométrie cyclique sont réalisées dans le temps. Un phénomène de dégradation de l'espèce oxydée est là encore observé comme pour le 4-MC.

L'effet catalytique de la PPO sur le ferrocène ou sur la syringaldazine pour la réduction de l'oxygène n'a pas pu être mis en évidence par l'utilisation de l'umec. Les mesures sont alors effectuées en confectionnant des électrodes compressées de $\varnothing = 5 \text{ mm}$. La réalisation de ces électrodes de faible diamètre est identique ; la proportion des constituants est conservée ; seule la masse totale change. La pression appliquée lors de la compression est modifiée et fixée à 1 tonne.

La **Figure IV-20** présente les courbes de polarisation de ces deux espèces rédox. Comme prévu, la courbe **ii** représentant la polarisation d'une biocathode à PPO en absence de médiateur indique qu'il n'y a pas de transfert électronique direct entre la protéine et le matériau d'électrode. Un signal de réduction est observé sur les courbes **iii** attribué à la réduction d'une fraction de médiateur présent initialement sous forme oxydée, les valeurs de potentiels des pics étant en accord avec ceux déterminés lors de la caractérisation électrochimique des espèces rédox. Lorsque la PPO est immobilisée dans l'électrode compressée en présence d'une espèce rédox, les signaux évoluent. Seule la polarisation cathodique en présence de ferrocène conduit à l'augmentation du courant de réduction. Le signal de SGZ, lui, diminuant en présence de PPO ne démontre pas d'effet catalytique. Ce résultat surprenant n'est, à l'heure actuelle, pas expliqué.

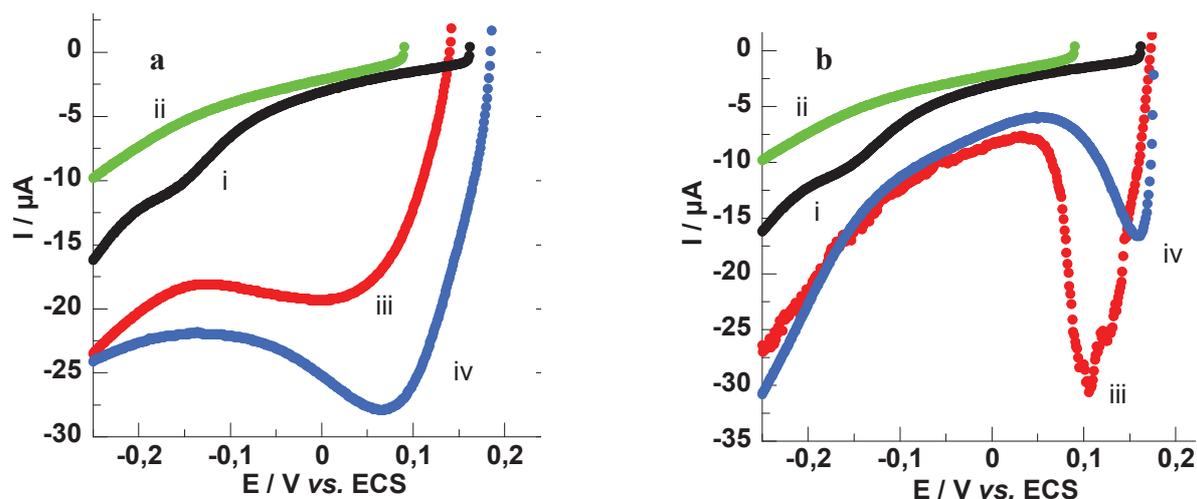


Figure IV-20: Courbes de polarisation cathodique d'électrodes compressées ($\varnothing = 5 \text{ mm}$) pour l'étude de : a- Ferrocène, b- SGZ avec les proportions : i- 100% de carbone graphite (GC), ii- 100% GC + PPO, iii- GC/Médiateur (rapport massique 66 :33), iv- GC/Médiateur (rapport massique 66 :33) + rapport massique PPO/Médiateur(15 %), $v_b = 1 \text{ mV.s}^{-1}$

Finalement, le *TTF* est étudié pour une possible utilisation à la cathode lors de la catalyse de la réduction de O₂ avec la *PPO*. Des mesures de voltampérométrie cyclique d'une *umec* remplie d'un mélange *TTF/PPO* (**Figure IV-21-a**) sont réalisées entre +0,35 V et -0,5 V vs. ECS en milieu saturé en azote puis saturé en oxygène. En saturant le milieu en O₂, le signal détecté à $E_{p,a} = +300 \text{ mV}$ caractéristique de l'oxydation du *TTF* en *TTF*⁺ diminue du fait de sa consommation par l'enzyme alors que le pic de réduction relatif au *TTF*⁺ mesuré à $E = 50 \pm 3 \text{ mV}$ augmente en intensité dû à la production d'espèce oxydante lors de l'activité enzymatique de la *PPO* traduisant ainsi un effet catalytique. Le même type d'expérience est réalisé avec des électrodes compressées mécaniquement. La **Figure IV-21-b** traduit la médiation du *TTF* en présence de tyrosinase et d'oxygène dissous. La courbe **iii** représente la réponse d'un balayage en potentiel pour une électrode modifiée par le médiateur. Dans ce cas, aucun signal de réduction n'est observable confirmant que le médiateur se trouve sous sa forme réduite. En revanche, lorsque les deux espèces sont immobilisées dans une même électrode, un fort courant cathodique apparaît dès $+0,130 \pm 0,007 \text{ V}$ qui correspond à la réduction de l'espèce *TTF*⁺ en *TTF* (**iv**).

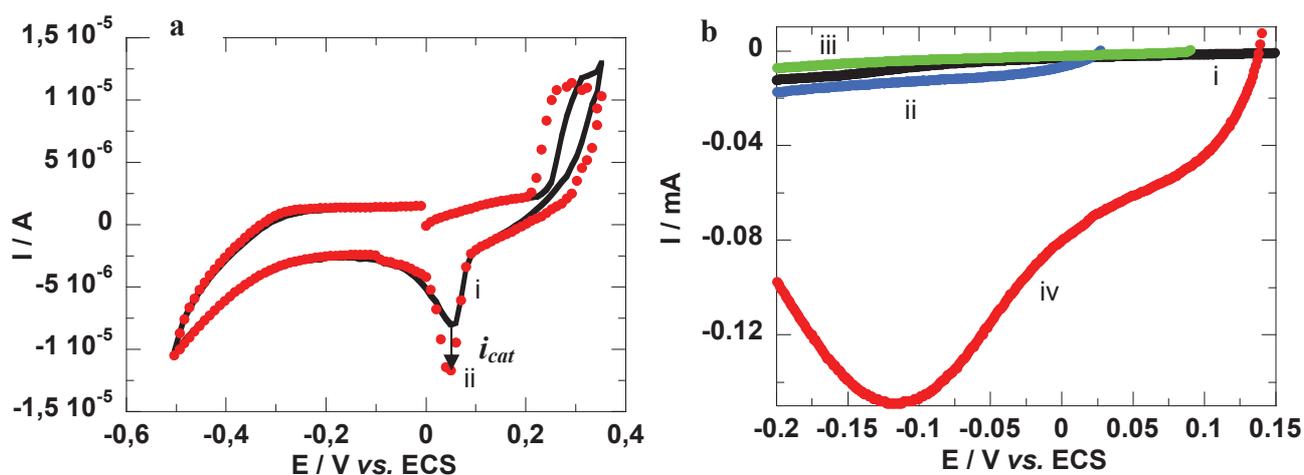


Figure IV-21: a- Courbes de voltampérométrie cyclique d'une micro-électrode à cavité de carbone graphite « remplie » d'un mélange TTF/PPO (1 :1 en masse) immergée dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹ (pH = 7,2, T_{ambiante}) : i- saturée en N₂, ii- saturée en O₂, v_b = 100 mV.s⁻¹. b- Courbes de polarisation cathodique sous air d'électrodes compressées (Ø = 5 mm) contenant : i- 100% de carbone graphite (GC), ii- GC/TTF (rapport massique 90 :10), iii- 100% GC + PPO (m identique à iv), iv- GC/TTF (rapport massique 90 :10) et rapport massique PPO/TTF 37 %, v_b = 1 mV.s⁻¹

Le **Tableau IV-1** récapitule les résultats obtenus précédemment sur l'utilisation éventuelle des espèces électroactives caractérisées pour la catalyse de la réduction du dioxygène.

Tableau IV-1: Tableau récapitulatif des composés susceptibles d'assurer le transfert électronique entre la polyphénol oxydase et l'électrode lors de la réduction de l'oxygène. Italique : médiateurs solubles, **Gras** : médiateurs faiblement solubles.

	E _{1/2} (V vs. ECS)	Catalyse	Stabilité	Intérêt
<i>Catéchol</i>	0,135	Oui	Non	Limité
<i>4-méthylcatéchol</i>	0,090	Oui	Non	Limité
<i>Dopamine</i>	0,080	Oui	Non	Limité
Syringaldazine	0,193 (0,192 ²⁴)	Non	Oui	Non
Ferrocène	0,249	Oui	Oui	Non
TTF	0,132	Oui	Oui	Oui

Les trois dérivés du catéchol ont les potentiels de demi-vague les moins attractifs. Ceux-ci sont relativement faibles et devraient conduire à une diminution de la *f.e.m.* de la pile. De plus, ils sont solubles et instables en solution. Ils sont donc éliminés.

La syringaldazine n'a pas montré d'effet catalytique avec la PPO malgré un potentiel élevé proche de 200 mV et pour cette raison est également éliminée.

Le ferrocène possède un potentiel relativement élevé (~ 0,250 V) et semble médier le transfert électronique entre l'électrode et l'enzyme pour la réduction de O₂. Cependant, la présence initiale d'un signal de réduction en absence de *PPO* étant surprenante, ce médiateur est à son tour écarté de son utilisation pour une biocathode.

Finalement, le *TTF* avec son potentiel de demi-vague de 0,132 V apparaît comme le meilleur candidat pour une utilisation couplée avec la protéine rédox. De plus, son caractère insoluble rend son incorporation plus facile dans la méthodologie d'immobilisation par compression mécanique.

IV.3.b Médiateurs à GOx

D'après les résultats obtenus pour la première biopile à glucose/O₂, il est rapidement apparu qu'une des limitations du système était principalement due aux faibles courants d'oxydation de la forme réduite de l'ubiquinone en présence de *GOx* et de glucose. De nouveaux médiateurs rédox (dérivés de quinone et de naphthoquinone) sont étudiés afin de sélectionner le meilleur candidat au remplacement de l'ubiquinone.

Comme évoqué dans le chapitre bibliographique, le site actif *FAD/FADH₂* de la *GOx* (source *Aspergillus Niger*) a un potentiel rédox situé à -0,33 V vs. ECS.

IV.3.b.1 Electrochimie de médiateurs rédox

Afin d'assurer le transfert d'électrons entre l'enzyme et l'électrode, la caractérisation électrochimique d'une série d'espèces rédox est effectuée en premier lieu pour sélectionner les meilleurs candidats utilisables à une bioanode enzymatique.

Seule une espèce soluble a été caractérisée pour évaluer sa capacité à travailler comme un médiateur rédox de la glucose oxydase. L'électrochimie du méthyl-1,4-benzoquinone (*MBQ*) est donc réalisée dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹ en absence de glucose. La **Figure IV-22** correspond aux voltampérogrammes réalisés entre +0,4 et -0,4 V vs. ECS en présence d'une concentration de 1,0.10⁻³ mol.L⁻¹ en espèce rédox en solution sur une électrode de carbone vitreux de diamètre Ø = 3 mm. Le premier balayage en potentiel positif ne fait apparaître aucun signal rédox, *MBQ* se trouve donc, comme attendu, sous sa forme oxydée. Lors du balayage inverse, un courant cathodique apparaît vers -0,1 V correspondant à la réduction des atomes d'oxygènes pour former *MBQH₂*, le pic de réduction se situe à E_{p,c} = -0,203 V. Le second cycle fait quant à lui apparaître le signal d'oxydation qui correspond à l'oxydation de l'espèce réduite située à la surface de carbone vitreux (E_{p,a} = +0,229 V). Cette espèce rédox est électroactive dans une zone de potentiel favorable à la médiation électronique avec la *GOx*. Pour autant la valeur de la différence de potentiel entre E_{p,a} et E_{p,c} de ΔE_{pic} = 430 mV laisse d'ores et déjà apparaître un système rédox lent.

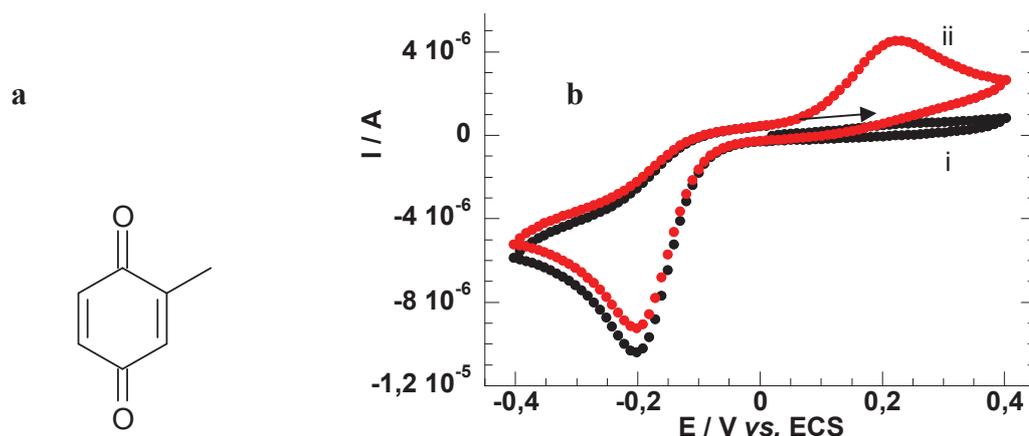


Figure IV-22: a- Structure du méthyl-1,4-benzoquinone et b- courbes de voltampérométrie cyclique d'une solution de MBQ $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, HEPES $25.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 7, 2, T_{ambiante} , air saturé) sur électrode de carbone vitreux ($\varnothing = 3 \text{ mm}$), i- scan 1, ii- scan 2, $v_b = 100 \text{ mV.s}^{-1}$. La flèche indique le sens de balayage.

Les autres espèces rédox étant insolubles, la caractérisation électrochimique est accomplie avec l'utilisation d'*umec*. Il s'agit dans un premier temps de la vitamine K₂ (VK₂), du tétraméthyl-*p*-benzoquinone (ou duroquinone, DQ), de la 1,4-naphtoquinone (1,4-NQ) et de la 9,10-phénanthrènequinone- (PQ).

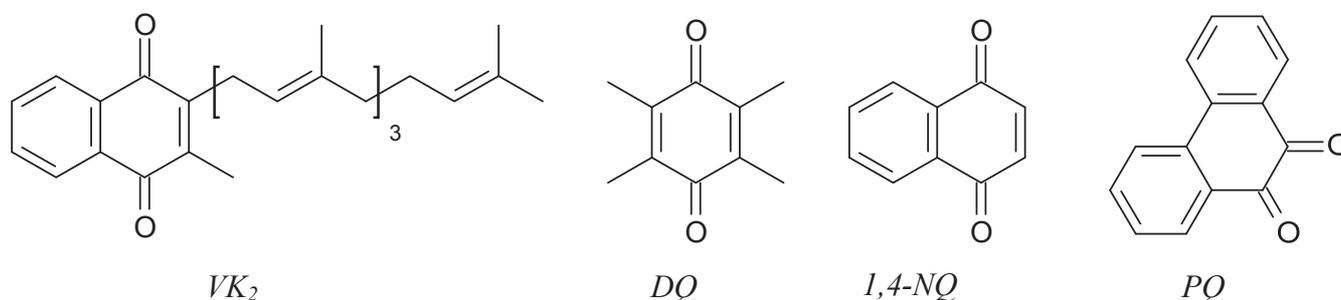


Schéma IV-4: Structure de la vitamine K₂ (VK₂), de la duroquinone (DQ), de la 1,4-naphtoquinone (1,4-NQ) et de la 9,10-phénanthrènequinone (PQ)

La **Figure IV-23** montre les voltampérogrammes au cours du second cycle pour les composés cités auparavant immobilisés dans la microélectrode. (Il est à noter que lors du premier cycle effectué dans le sens des potentiels positifs, aucun signal électrochimique pour les 4 composés cités n'est détecté lors de ce balayage).

La vitamine K₂ (a) ne présente pas de signaux électroactifs bien définis. Un large pic anodique est tout de même visible avec $E_{p,a} = +92 \text{ mV}$. Les signaux rédox de DQ présente une différence de potentiel très élevée ($\Delta E_p = 500 \text{ mV}$) avec une valeur de $E_{1/2}$ de l'ordre de -45 mV (b). La courbe c indique que PQ est caractérisé par un processus électrochimique quasi-réversible à $E_{1/2} = -0,230 \text{ V}$ ($E_{p,c} = -0,290 \text{ V}$, $E_{p,a} = -0,126 \text{ V}$, $\Delta E_{pic} = 164 \text{ mV}$). Enfin,

dans le cas de la *1,4-NQ* (**d**), les différents signaux rédox bien que mal définis ont sensiblement les mêmes valeurs que ceux de la phénanthrènequinone ($E_{p,c} = -0,300$ V, $E_{p,a} = -0,140$ V, $\Delta E_{pic} = 160$ mV, $E_{1/2} \sim -0,215$ V).

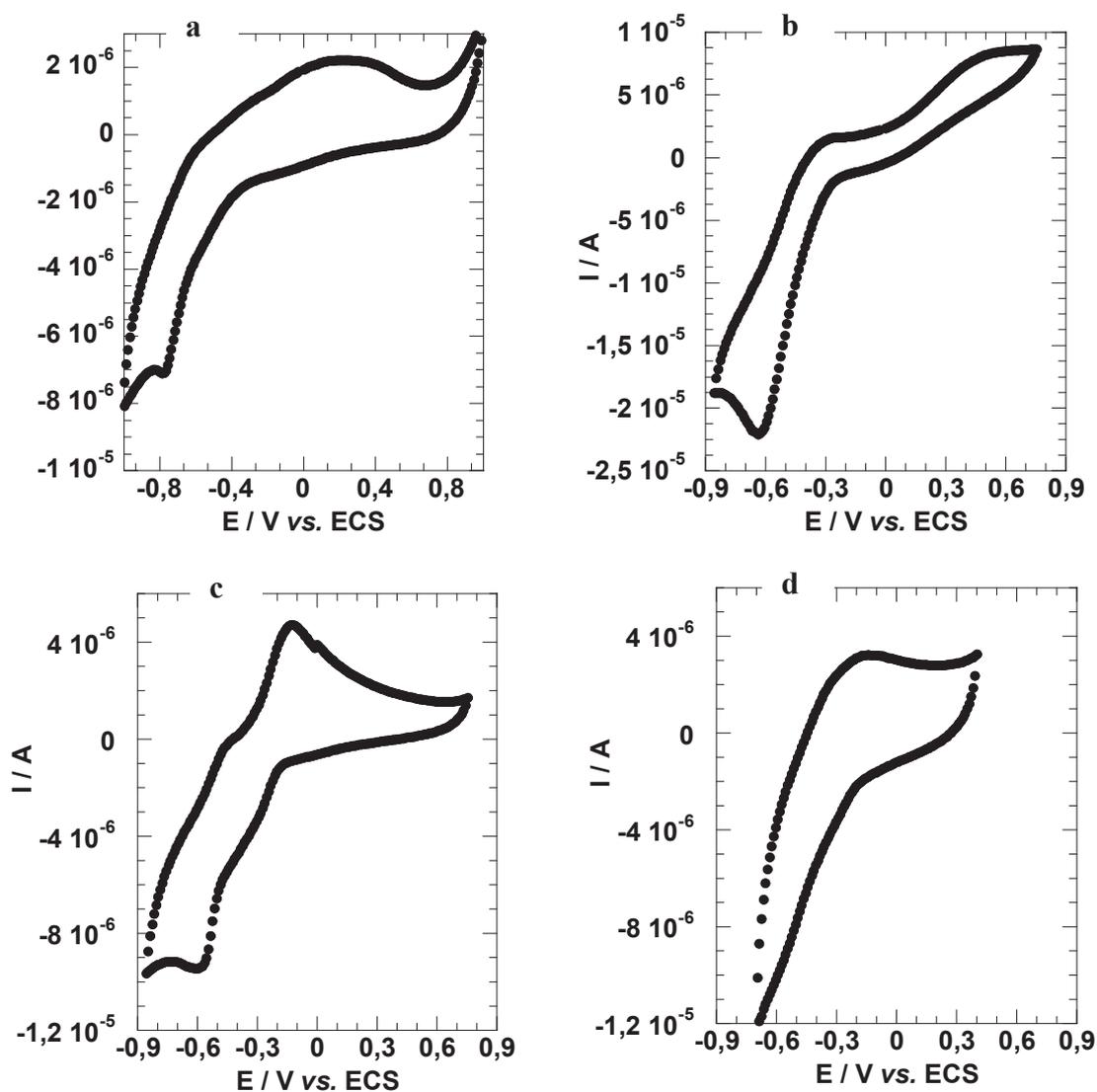


Figure IV-23: Courbes de voltampérométrie cyclique d'une micro-électrode à cavité de carbone graphite immergée dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹ et remplie de a- VK₂, b- DQ, c- PQ, d- 1,4-NQ (pH = 7,2, T_{ambiantes}, air saturé), v_b = 100 mV.s⁻¹

IV.3.b.2 Catalyse enzymatique de l'oxydation du glucose avec les médiateurs rédox

L'effet catalytique de la glucose oxydase lors de l'oxydation du glucose a donc été conduit avec une solution de MBQ 1,0.10⁻³ mol.L⁻¹ en milieu aéré. Dès l'ajout de glucose (5,5.10⁻³ mol.L⁻¹), en présence de 0,2 mg de GOx, l'intensité du pic anodique augmente au détriment du pic cathodique (**Figure IV-24**). Cette injection suffit pour convertir

instantanément la moitié du médiateur oxydé sous sa forme réduite ($I_{p,c}$ sans glucose = $-9,5 \mu\text{A}$, $I_{p,c}$ avec glucose = $-5,0 \mu\text{A}$). Cette diminution du courant de réduction est associée à une augmentation du courant anodique (de $4 \mu\text{A}$ à $5,4 \mu\text{A}$ immédiatement après l'injection). Après une période de 20 minutes, plus aucun signal de réduction n'est observable traduisant la consommation totale de *MBQ* alors que le pic lié au processus d'oxydation atteint sa valeur maximale ($+7,4 \mu\text{A}$) (iii). Outre le potentiel d'oxydation relativement haut pour une utilisation de ce médiateur dans une bioanode et le $\Delta E_{pic} > 500 \text{ mV}$, la stabilité de cette espèce suscite un autre inconvénient puisqu'après trois jours en solution, le signal électrochimique relatif à l'espèce diminue de moitié.

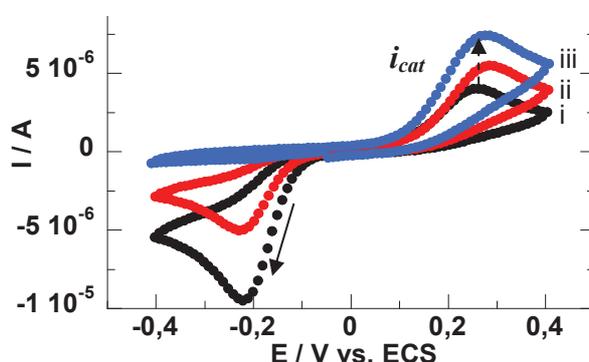


Figure IV-24: Courbe de voltampérométrie cyclique d'une solution de méthylbenzoquinone $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{HEPES } 25.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7, 2$, T_{ambiante} , air saturé) sur électrode de carbone vitreux ($\varnothing = 3 \text{ mm}$), i- scan 1, ii- scan 2, iii- scan 3, $v_b = 100 \text{ mV.s}^{-1}$. La flèche pleine indique le sens de balayage, la flèche en pointillé représente le courant catalytique.

Les courbes suivantes (**Figure IV-25**) présentent les résultats obtenus sur *umec* avec médiateurs insolubles (*VK₂*, *DQ* et *PQ*) immobilisés avec la *GOx* en absence et en présence de glucose respectivement. Pour chacun des trois cas et en présence de glucose $30.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, les courants de réduction mesurés avec l'*umec* diminuent. En ce qui concerne la *DQ*, aucun accroissement de la valeur du courant de pic d'oxydation n'est visible clairement, seul un décalage de $E_{p,a}$ est observé. Inversement, au cours du balayage dans les potentiels positifs, les courants d'oxydation de la *VK₂* et de la *PQ* sont plus importants. Le large signal anodique observé précédemment de la *VK₂* est dédoublé $E_{p,a}^1 = 60 \text{ mV}$ et $E_{p,a}^2 = 318 \text{ mV}$. Le voltampérogramme de *PQ* (c) possède là encore un pic anodique bien défini ($E_{p,a} = -0,164 \text{ V}$, $E_{p,c} = -0,302 \text{ V}$, $\Delta E_{pic} = 138 \text{ mV}$). *PQ* semble le médiateur rédox le plus adapté pour transférer les électrons de la *GOx* à l'électrode lors de l'oxydation du glucose. La *1,4-NQ* n'a pas pu être caractérisée à l'aide de l'*umec*.

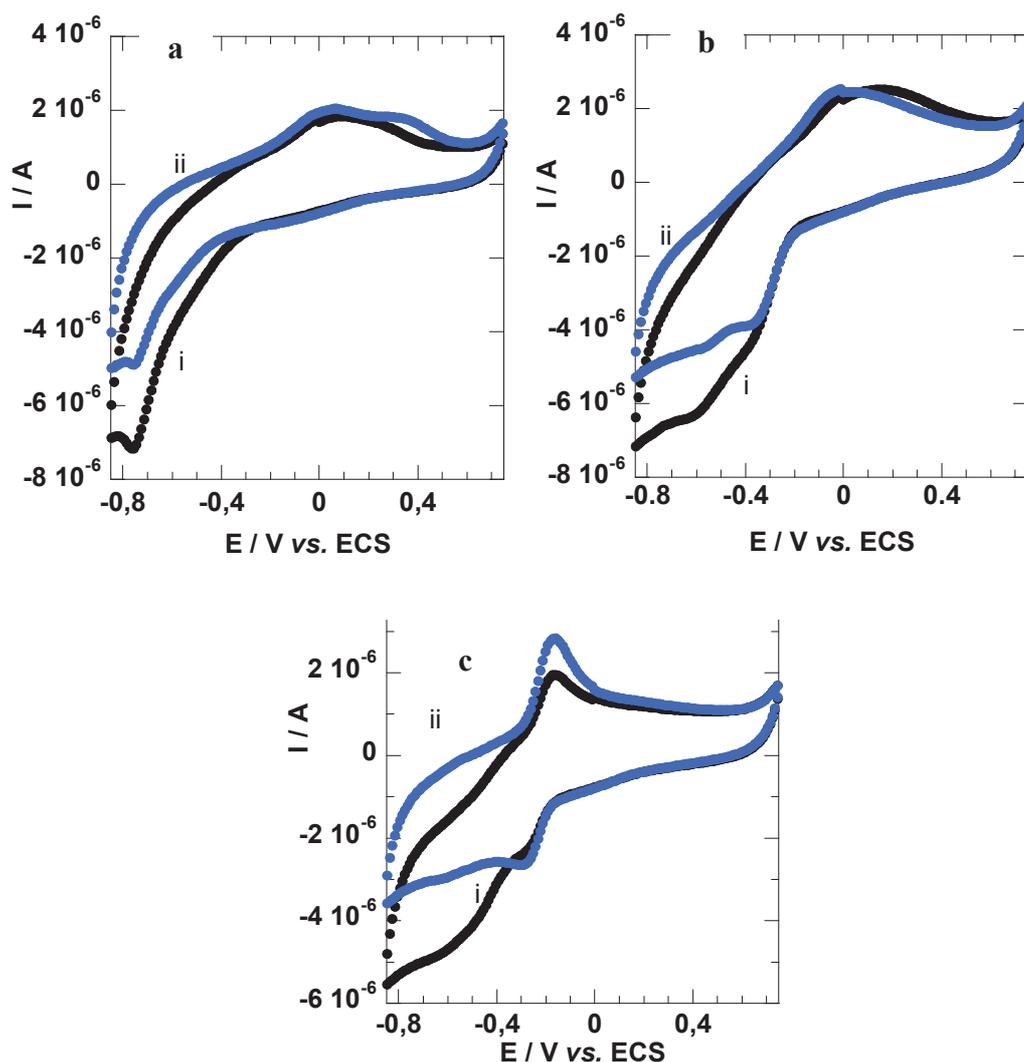


Figure IV-25: Courbes de voltampérométrie cyclique d'une umec de carbone graphite « remplie » d'un mélange médiateur/*GOx* (1 : 1 en masse) immergée dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹ (pH = 7,2, T_{ambiante}). a- VK₂, b- DQ, c- PQ pour i- en absence de glucose, ii- en présence de glucose 30.10⁻³ mol.L⁻¹, $v_b = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

La phénanthrènequinone possédant le signal catalytique le plus important des trois médiateurs présentés plus haut, son comportement électrochimique est évalué dans des électrodes compressées. Chacune des espèces est immobilisée seule dans la matrice de graphite puis les électrodes sont polarisées anodiquement (**Figure IV-26**). Aucun courant d'oxydation n'est mesurable en absence de médiateur et d'enzymes ou lorsqu'un seul des composés est immobilisé (y compris en présence de glucose) (courbes **i**, **ii** et **iii** sont superposées). En revanche, en incorporant la *PQ*, la *GOx* et la catalase dans une même électrode, le potentiel de celle-ci est fortement déplacé vers les potentiels négatifs et se stabilise autour de -0,175 V. Lors d'une polarisation anodique, le courant s'établit instantanément. Dans le cas présent, le courant atteint un maximum (+202 μA à +76 mV).

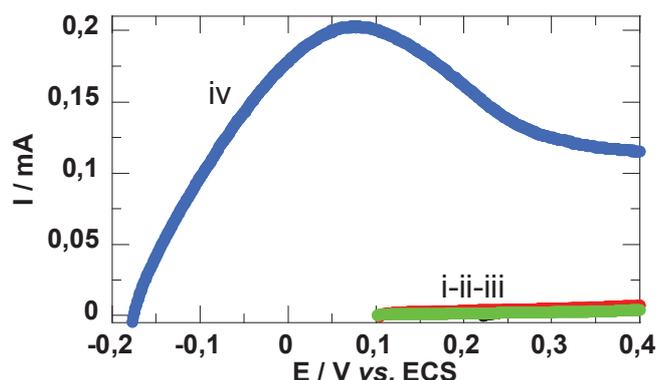


Figure IV-26: Courbes de polarisation anodique d'électrodes compressées ($\varnothing = 5$ mm) contenant : i-100% de carbone graphite (GC), ii- 75 :25 GC/PQ, iii- 100% GC + GOx (m identique à iv), iv- 75 :25 GC/PQ et rapport GOx-Catalase/PQ 51-29 %, immergées dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹, glucose 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹ (pH = 7,2, T_{ambiante}, air saturé), $v_b = 1$ mV.s⁻¹

La catalyse enzymatique de la GOx n'a pas pu être établie pour la 1,4-naphthoquinone avec l'umec à cause d'une détérioration de la microélectrode. A la vue des potentiels rédox obtenus lors de la caractérisation de l'espèce donnée plus haut, une évaluation de la médiation électronique est tout de même réalisée à l'aide d'électrodes compactées (**Figure IV-27-a**). Pour cela, la molécule rédox 1,4-NQ est immobilisée en présence de différentes charges enzymatiques de GOx et de catalase. L'électrode est réalisée avec un mélange initial et fixé de carbone graphite (GC) et de 1,4-NQ de ratio GC/1,4-NQ (75 :25) pour une masse totale de 100 mg. Les charges enzymatiques sont calculées d'après le rapport massique entre l'enzyme et l'espèce rédox (**Figure IV-27-b**). Ces ratios varient de 0-0 % (1,4-NQ seul en présence de carbone graphite) jusqu'à 79-43 % de GOx-Catalase immobilisées. Quelque soit la charge enzymatique imposée, les potentiels d'électrode sont très proches ($E_{OCP} = -152,5 \pm 10$ mV) en présence de glucose et sont plus élevés que celui observé à la bioanode à base de PQ décrite précédemment ($E_{OCP} = -175,5 \pm 5$ mV). En revanche, la réponse anodique varie avec la modification de la proportion d'enzyme. Ainsi, une dépendance linéaire entre courant catalytique et charge enzymatique est vérifiée sur l'ensemble des proportions étudiées. Dans les meilleures conditions testées (glucose 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹, pH = 7,2, T = 25°C), il est possible d'atteindre 460 μ A (901 μ A.cm⁻²) à 0,2 V avec des électrodes de $\varnothing = 5$ mm (**Figure IV-27-iv**).

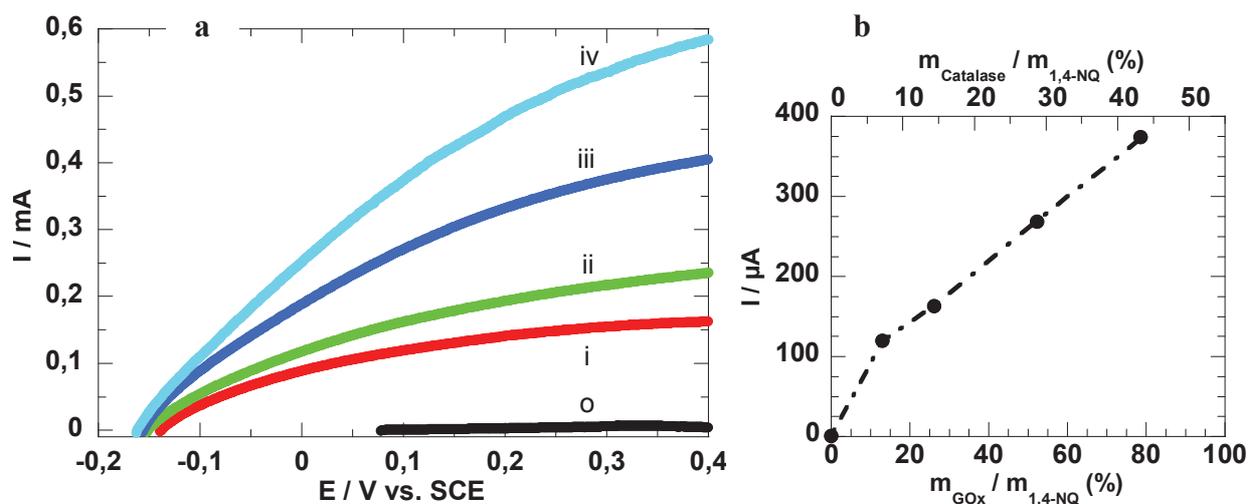


Figure IV-27: a- Courbes de polarisation de bioanodes compressées ($\varnothing = 5$ mm) de type GC/14NQ (ratio massique 75 : 25) et immergées dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹, glucose 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹ pour différents rapports massiques GOx-Catalase/Médiateur : o- 0-0 %, i- 13-7 %, ii- 26-14 %, iii- 52-29 %, iv- 79-43 %, v_b = 1 mV.s⁻¹

Son utilisation pourra être envisagée pour des piles fonctionnant in vitro pour l'alimentation d'appareils électriques. Cela permettra également d'accroître les performances de l'électrode en jouant probablement sur la concentration en substrat, le pH de la solution, la force ionique des solutions tampons et surtout sur l'utilisation d'autres enzymes à la cathode (BOx ou Lc) ce qui devrait augmenter considérablement la force électromotrice de la pile par rapport à une biocathode fonctionnant avec la PPO.

Le **Tableau IV-2** récapitule les résultats obtenus précédemment sur l'utilisation éventuelle des espèces électroactives caractérisées pour la catalyse de l'oxydation du glucose.

Tableau IV-2: Récapitulatif des composés susceptibles d'assurer le transfert électronique entre la GOx et l'électrode lors de l'oxydation du glucose. *Italique* : médiateurs solubles, **Gras** : médiateurs faiblement solubles.

	E _{1/2} (V vs. ECS)	Catalyse	Stabilité	Intérêt
<i>MBQ</i>	0,050	Oui	Non	Non
VK₂	0,080	Oui	Oui	Limité
DQ	- 0,045	Non	-	Non
PQ	- 0,230	Oui	Oui	Oui
1,4-NQ	- 0,215	Oui	Oui	Oui

Le méthylbenzoquinone, médiateur soluble et espèce instable en solution est éliminé des médiateurs potentiels à l'anode.

La duroquinone qui n'a pas permis de trancher sur une éventuelle médiation lors de l'électrooxydation enzymatique du glucose par la *GOx* n'est pas retenue.

La vitamine K₂, bien que présentant un léger comportement de catalyse n'est pas retenue à cause de son potentiel de demi-vague positif.

Finalement, les deux espèces rédox ayant clairement démontré l'effet catalytique de la *GOx* sont la phénanthrènequinone (*PQ*) et la 1,4-naphtoquinone (*1,4-NQ*). La suite des expérimentations se porteront sur l'utilisation de *PQ* qui présente le potentiel le plus négatif.

IV.4 Nouvelle biopile à PPO/GOx (médiateurs TTF/PQ)

Les effets électrocatalytiques de la *PPO* sur la réduction de O₂ et de la *GOx* sur l'oxydation du glucose ont été montrés dans le paragraphe précédent avec la médiation des électrons par le *TTF* et la *PQ* respectivement. Les paramètres influençant les performances des bioélectrodes sont évaluées dans ce paragraphe pour la réalisation d'électrodes optimisées. Dans cette nouvelle partie et pour les premières étapes d'optimisation, les électrodes sont de diamètre Ø = 5 mm contrairement à la première pile à *QQH₂/UQ* développée au début du chapitre.

IV.4.a Caractérisation de la biocathode

IV.4.a.1 Effet de l'oxygénation de la solution

L'effet de la concentration en oxygène en solution est mesuré pour une biocathode réalisée avec un mélange de carbone graphite (*GC*) et de *TTF* de ratio *GC/TTF* (66 :33, masse totale de 100 mg) et la charge enzymatique de *PPO* fixée 15 % de la masse de *TTF*. Après 24 heures d'immersion, une première polarisation cathodique est réalisée sous air ambiant ([O₂ dissous] = 0,2.10⁻³ mol.L⁻¹) (**Figure IV-28**). Le potentiel à l'abandon est de +121 mV et à -70 mV le courant de réduction est maximal. Lorsque cette même électrode est immergée dans une solution dégazée sous argon pendant une heure, son potentiel à l'abandon subit un décalage de ΔE = -63 mV. Le courant global de réduction avant le pic situé à -0,075 V est moins intense, ce qui traduit une conversion de *TTF* en *TTF*⁺ par la *PPO* moins importante en milieu désaéré. La valeur du potentiel de l'électrode est directement reliée à la concentration en dioxygène dissous puisque le potentiel recouvre sa valeur initiale après une nouvelle immersion dans une solution aérée (+0,122 V). L'intensité du pic de réduction diminue due au vieillissement de l'électrode (perte de 8,8 % après 6 jours d'immersion dans une solution de

NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹, pH = 7,2) causée par le relargage de l'espèce ionique oxydée du *TTF*.

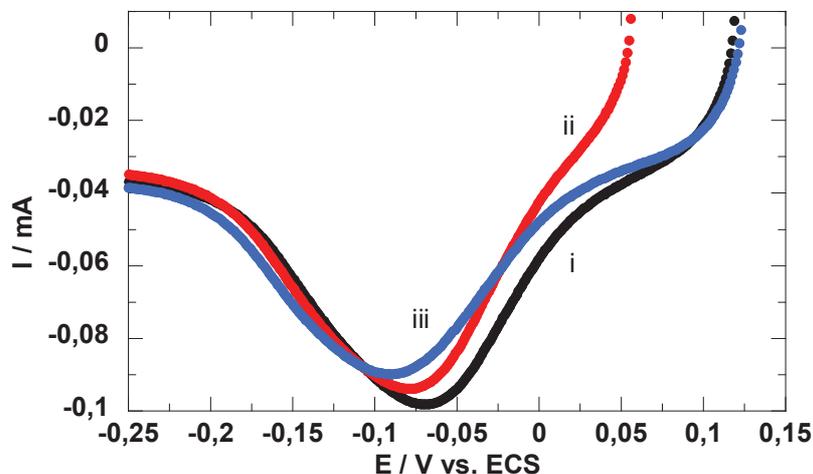


Figure IV-28: Courbes de polarisation d'une biocathode compressée ($\varnothing = 5$ mm) de type GC/*TTF* (ratio massique 66 :33), *PPO/TTF* (15 %) immergée dans une solution électrolytique de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹ : i- en milieu aéré, ii- après dégazage d'une heure par l'argon, iii- après une nouvelle immersion de 6 jours dans une solution aérée, $v_b = 1$ mV.s⁻¹

La concentration sanguine en dioxygène étant quatre fois moins élevée qu'une solution saturée naturellement en O₂, le potentiel de la pile sera probablement affecté en condition *in vivo* ainsi que la puissance de celle-ci. Pour la suite de la caractérisation de la biocathode, les expérimentations sont réalisées uniquement en milieu aéré.

IV.4.a.2 Effet de la concentration en médiateur

Le second paramètre ayant un impact direct sur le potentiel à courant nul ainsi que sur le courant en réduction, est la concentration en médiateur immobilisé dans la matrice de graphite.

L'influence de la proportion en *TTF* par rapport au graphite a été mesurée pour des ratios carbone/*TTF* allant de 33 :66 à 98 :2 (pour une masse totale de 10 mg) et une concentration de *PPO* de 5 mg (**Figure IV-29**). Comme le montrent les courbes, plus la concentration en médiateur est faible, plus le courant de réduction est élevé. Les courants de réduction les plus élevés et donc les meilleures performances pour une biocathode sont obtenues pour 5 % en masse en espèce électroactive. Ces résultats surprenants sont donc à l'origine d'une hypothèse de formation d'une couche trop importante de médiateur à la surface du carbone graphite qui bloquerait « l'accès » à la surface de carbone pour la réduction de *TTF*⁺. En diminuant la concentration de *TTF*, la surface serait alors plus disponible pour

accomplir le processus de catalyse de réduction du cation formé lors de la réduction de O₂ en H₂O. Le paramètre du ratio *GC/TTF* est donc fixé à 95 :5 qui conduit à l'obtention de courant de pic cathodique à un potentiel proche de -0,1 V de -142 μA (-278 μA.cm²).

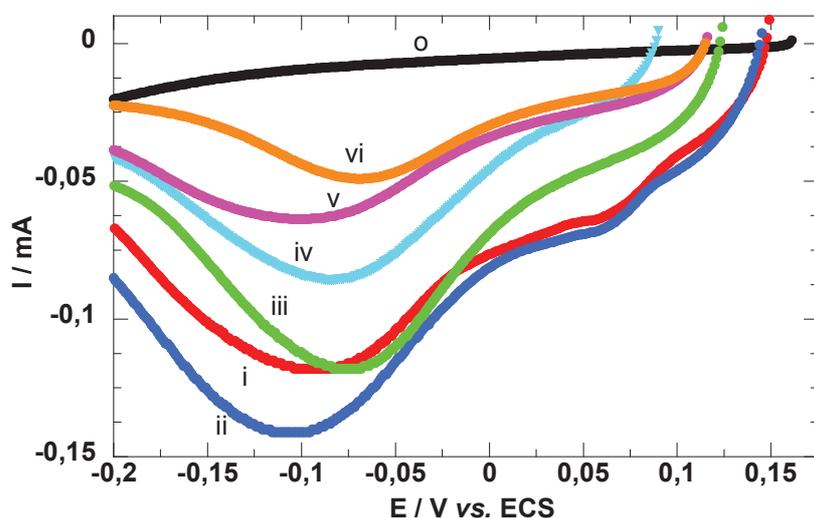


Figure IV-29: Courbes de polarisation de biocathodes compressées ($\varnothing = 5$ mm) de type *GC/TTF* immergées dans des solutions de *NaCl* 0,15 mol.L⁻¹, *HEPES* 25.10⁻³ mol.L⁻¹ en faisant varier la proportion massique de *TTF* suivant le ratio *GC/TTF* : o- 100 :0, i-98 : 2, ii-95 : 5, iii- 90 :10, iv-66 : 33, v- 50 :50, vi- 33 :66 et une masse $m = 5$ mg de *PPO*; $v_b = 1$ mV.s⁻¹

IV.4.a.3 Effet de la concentration en enzyme

L'effet catalytique de la *PPO* sur le *TTF* a été mesuré pour trois concentrations en enzyme (**Figure IV-30-a**). En fixant le ratio entre carbone graphite et le médiateur à *GC/TTF* = 90 :10 (masse totale de 100 mg), la quantité d'enzyme a été augmentée progressivement suivant le rapport massique entre la protéine et le médiateur rédox. L'augmentation de ce rapport enzyme/médiateur influence la réponse catalytique de la biocathode, le potentiel à l'abandon des électrodes restant constant ($E_{OCP} = 125 \pm 4$ mV). Chacune des augmentations se traduit par un courant de pic cathodique plus intense situé au même potentiel ($E_{p,c} = -97 \pm 7$ mV). Bien qu'une dépendance linéaire soit observée dans une gamme de 25 à 95 % (**Figure IV-30-b**), l'augmentation du courant cathodique lui, reste faible. Une augmentation de 10 μA (+8,3 %) est négligeable par rapport à la quantité d'enzyme mise en jeu. Prenant en compte le prix des enzymes pour la réalisation des électrodes, le pourcentage m_{enzyme}/m_{TTF} est donc fixé à 47 %.

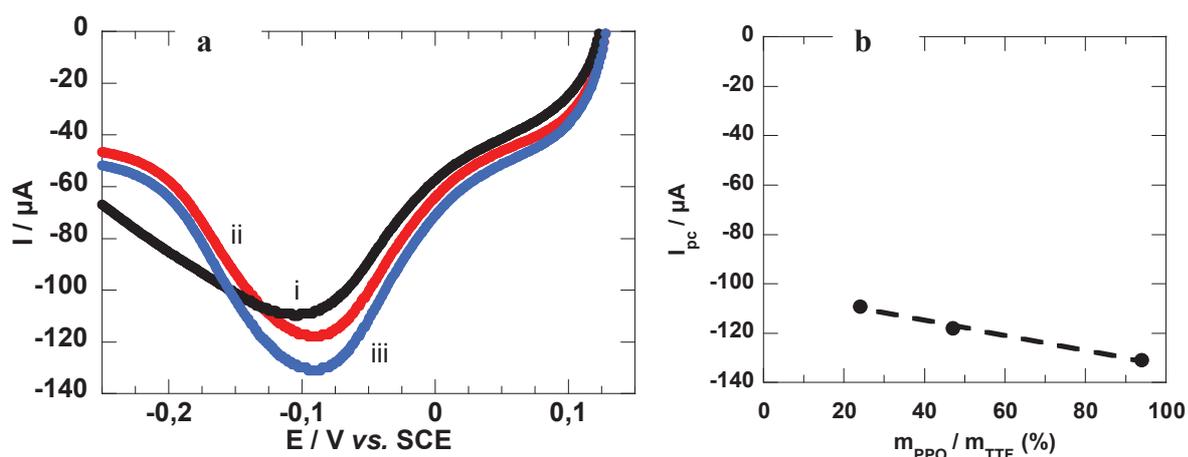


Figure IV-30: a- Courbes de polarisation de biocathodes compressées ($\varnothing = 5$ mm) de type GC/TTF (ratio massique 90 :10) immergées dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹ (pH = 7,2, T_{ambiante}, air saturé) pour différents rapports massiques PPO/TTF : i- 25 %, ii- 47 %, iii- 94 %, $v_b = 1$ mV.s⁻¹. b- Dépendance du courant de pic cathodique mesuré à E = -0,1 V vs. ECS pour des électrodes GC/TTF (ratio massique 90 :10) en fonction du rapport massique PPO/TTF (valeurs issues de la courbe a)

IV.4.a.4 Effet de la pression lors de la fabrication des électrodes

L'effet de la pression appliquée lors de la compression du mélange médiateur, enzyme, graphite est également étudié. Deux valeurs de pression sont choisies. L'utilisation de médiateur rédox peu soluble en solution aqueuse rend les surfaces assez hydrophobes. La pression adoptée initialement est de 1 tonne. Pour accroître la porosité des électrodes, des essais sont réalisés en appliquant une pression moindre (0,5 tonne) pour la conception des électrodes. La courbe de polarisation **i** donnée dans la **Figure IV-31** fait état d'un large pic de réduction centré sur E = +57 mV correspondant au potentiel de réduction de TTF⁺ en TTF (comme décrit dans la **Figure IV-21-a**) visible après 24 heures d'immersion dans l tampon NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹. Ce signal rédox n'est plus observable les jours suivants. De plus, la diminution progressive du courant cathodique situé à -0,1 V vs. ECS renforce l'hypothèse d'une perte constante et rapide de l'espèce rédox (et/ou de la protéine) hors de l'électrode compressée. Avec une pression de 0,5 t, la matrice de l'électrode est trop poreuse et laisse s'échapper l'espèce nécessaire à la réduction de O₂ à l'extérieur de celle-ci. La pression à appliquer pour la fabrication des électrodes est donc choisie et fixée à une valeur de 1 tonne pour des électrodes de 5 mm de diamètre.

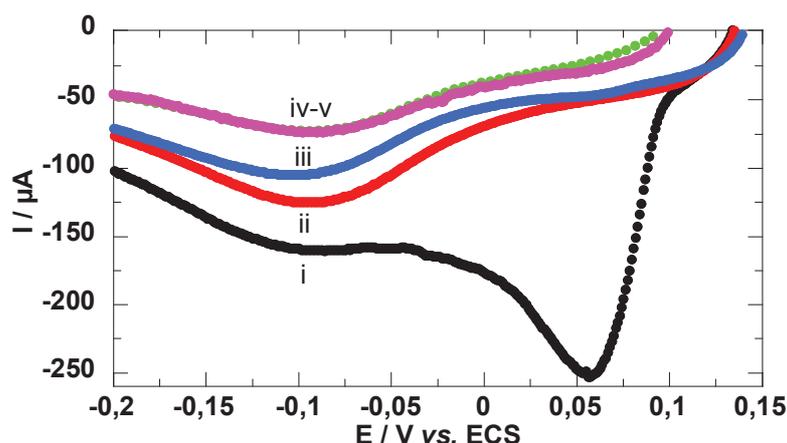


Figure IV-31: Courbes de polarisation d'une biocathode compressée ($\varnothing = 5$ mm) de type GC/TTF (ratio 95 :5) et un rapport de PPO/TTF de 47 % obtenue par une compression de 0,5 tonne puis immergée dans une solution de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, HEPES $25.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, pH = 7,2 et sous air saturé après : i- 24 heures, ii- 48 heures, iii, 6 jours, iv- 14 jours et v- 17 jours, $v_b = 1 \text{ mV.s}^{-1}$

IV.4.a.5 Stabilité temporelle

Une fois les paramètres expérimentaux optimaux déterminés, l'évaluation de la stabilité de la réponse électrochimique des biocathodes est réalisée lors de mesures quotidiennes du potentiel à l'abandon et des tracés des courbes de polarisations cathodiques. Pour rappel, les biocathodes présentées ici sont conçues à partir d'un mélange GC/TTF (ratio massique de 95 :5), d'un rapport massique entre l'enzyme et le médiateur de $PPO/TTF = 47 \%$, soumis à une pression de 1 t et immergées dans une solution tampon NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, HEPES $25.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, sous air saturé. D'après la **Figure IV-32**, la valeur du potentiel est stable dans le temps avec une valeur de $141 \pm 3 \text{ mV}$. Le courant de réduction mesuré à $-0,1 \text{ V vs. ECS}$ révèle une fluctuation relativement importante ($I_{-0,1 \text{ V}} = -135 \pm 40 \mu\text{A}$) sur une période de 25 jours. Au-delà de 25 jours d'immersion, le courant chute brusquement à $-70 \mu\text{A}$ et se stabilise à cette valeur (qui correspond au courant mesuré dans la **Figure IV-31** lorsque le médiateur ou l'enzyme avait diffusé abondamment hors de l'électrode). Les biocathodes ont donc une durée de vie de 25 jours.

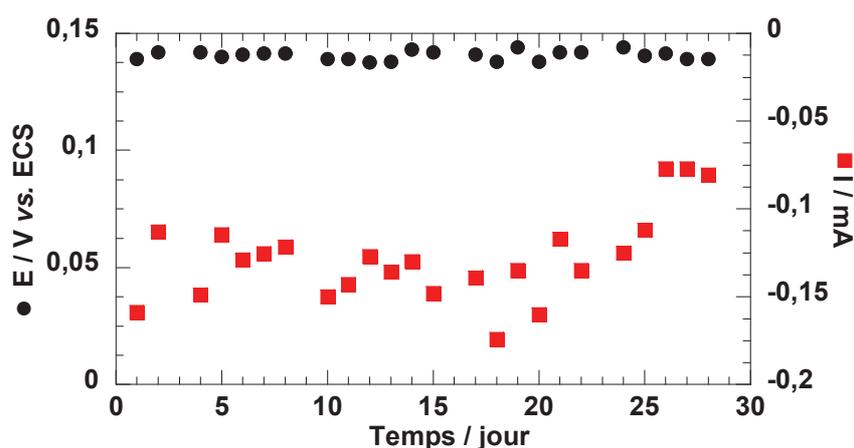


Figure IV-32: Courbe de stabilité du potentiel à l'abandon et du courant de pic à $-0,1$ V d'une biocathode compressée ($\varnothing = 5$ mm) de type GC/TTF (ratio 95 :5) et de charge enzymatique PPO/TTF = 47 %, compactée sous une pression de 1 tonne et immergée dans un tampon NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, HEPES $25 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, pH = 7,2 et sous air saturé

IV.4.a.6 Augmentation de la surface géométrique

L'influence de la dimension du diamètre des cathodes est menée. Conformément à ce qui est attendu, le potentiel à l'abandon d'une biocathode de grand diamètre est identique à celui mesuré précédemment ($\Delta E_{OCP} = \pm 3$ mV). La **Figure IV-33** renseigne sur l'augmentation des courants obtenus lors de la modification de la surface des cathodes. Mesurés à $-0,1$ V, les courants sont de -207 et de $-362 \mu\text{A}$ pour les électrodes de $\varnothing = 5$ et $\varnothing = 13$ mm respectivement représentant un gain d'un facteur 1,75 (inférieur au facteur d'accroissement de la surface de 2,60).

Il est à noter une modification de l'allure des courbes de polarisation qui présentaient auparavant un pic de réduction détecté à $-0,1$ V vs. ECS lorsque celles-ci sont immergées sans membrane de protection (**Figure IV-33-i**) en comparaison avec une électrode identique introduite dans une membrane de dialyse de porosité 100 Da (**Figure IV-33-ii**). Le TTF, de masse molaire $M_{TTF} \sim 204 \text{ g.mol}^{-1}$, et l'enzyme se retrouvent confinés dans la membrane lorsqu'ils sont libérés hors de l'électrode comprimée. Ainsi, la concentration en TTF^+ est nettement plus importante au niveau de l'électrode ce qui augmente les courants cathodiques atteignant $-200 \mu\text{A}$. La présence du semi plateau pourrait alors être due à un effet de concentration des espèces rédox présentes dans la membrane.

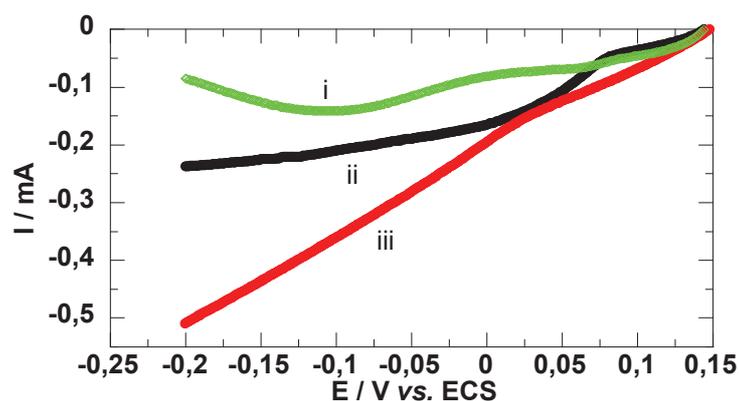


Figure IV-33: Courbes de polarisation de biocathodes comprimées de type GC/TTF (ratio massique 95 :5) et un rapport de PPO/TTF de 47 % immergées dans une solution tampon de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹ (pH = 7,2, T_{ambiante}, air saturé) : i- Ø = 5 mm (m_{GC+TTF} = 100 mg, sans membrane de dialyse), ii- Ø = 5 mm (m_{GC+TTF} = 100 mg, avec membrane), iii- Ø = 13 mm (m_{GC+TTF} = 400 mg, avec membrane), v_b = 1 mV.s⁻¹

IV.4.b Caractérisation de la bioanode

IV.4.b.1 Effet de la concentration en médiateur

L'importance du choix du ratio massique entre le carbone graphite et le médiateur immobilisé à la bioanode se révèle lui aussi essentiel. En effet, les proportions optimales sont très différentes de celles déterminées à la cathode. En comparant les courbes de polarisation anodique de plusieurs systèmes comprenant des ratios massiques entre le carbone et le PQ de allant de 95 :5 (i) à 33 :66 (v) (pour une masse totale de 100 mg) données dans la **Figure IV-34**, il apparaît que les meilleures performances sont obtenues en utilisant un ratio de 75 :25 (iii). Dans ces conditions, la courbe de polarisation atteint un courant de pic maximal de 44,4 µA (87,1 µA.cm²) à E = +66 mV.

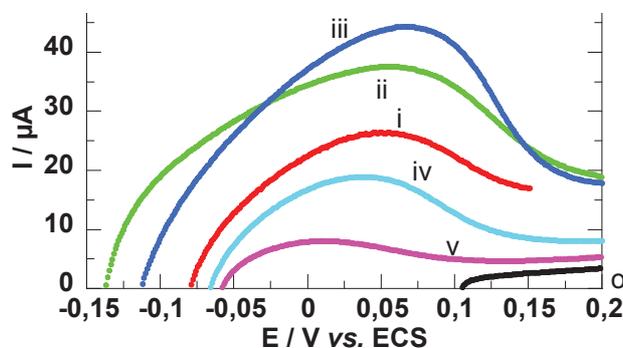


Figure IV-34: Courbes de polarisation de bioanodes comprimées (Ø = 5 mm) de type GC/PQ immergées dans des solutions de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹, glucose 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹ en faisant varier la proportion massique de PQ suivant le ratio GC/PQ : o- 100 :0, i-95 : 5, ii- 90 :10, iii- 75 :25, iv- 50 :50 et v- 33 :66 et des masses de GOx et de catalase de m_{GOx} = 3,3 mg et m_{catalase} = 1,6 mg ; v_b = 1 mV.s⁻¹

IV.4.b.2 Effet de la concentration en enzyme

Une fois la concentration optimale en médiateur obtenue, une phase d'ajustement de la concentration en enzymes a suivi. La quantité initiale est basée sur les conditions utilisées dans le paragraphe §IV.2.c, et adaptée à des électrodes de diamètre $\varnothing = 5$ mm. Accroître la charge enzymatique immobilisée à l'intérieur de la bioanode permet dans un premier temps de favoriser un décalage du potentiel à l'abandon de l'anode dans les potentiels négatifs de l'ordre de $\Delta E = -56 \pm 6$ mV (**Figure IV-35-a**). La valeur du courant catalytique mesuré au potentiel du pic d'oxydation de PQ est proportionnelle à la charge enzymatique immobilisée dans la bioanode pour des ratios massiques de GOx/PQ compris entre 12 et 52 % (correspondant à des ratios Catal/PQ de 7 à 28%) (**Figure IV-35-b**). Les expérimentations suivantes contiendront alors la charge optimale de 52 % et 28 % en masse de GOx et de Catal respectivement.

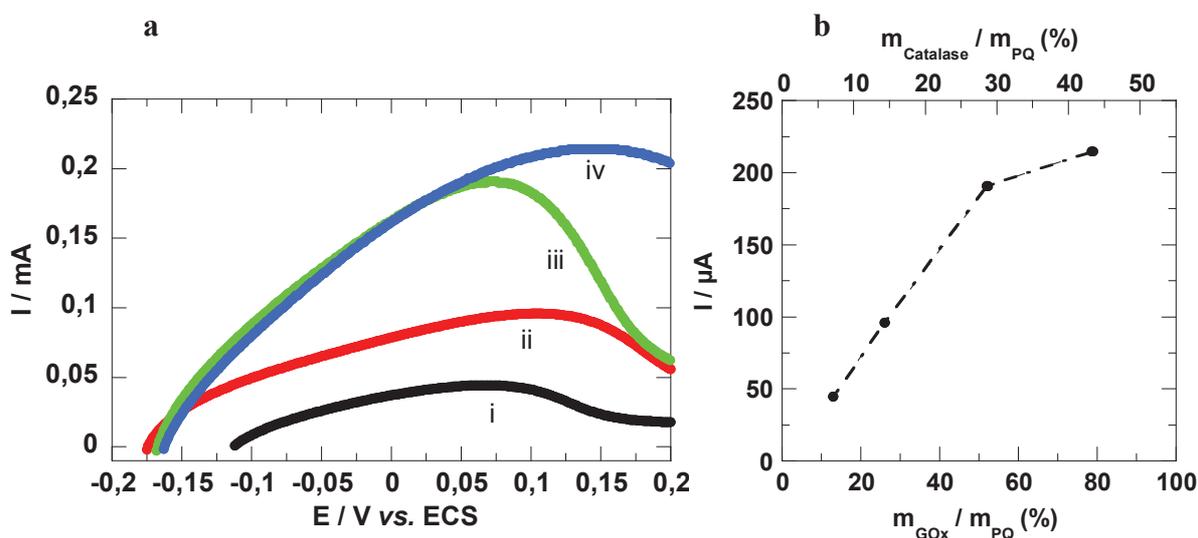


Figure IV-35: a- Courbes de polarisation de bioanodes compressées ($\varnothing = 5$ mm) de type GC/PQ (ratio massique 75 :25) immergées dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹, glucose 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹ (pH = 7,2, T_{ambiante}, air saturé) pour différents rapports massiques GOx-catalase/PQ : i- 13-7 %, ii- 26-14 %, iii- 52-28 % et iv- 79-43 %, $v_b = 1$ mV.s⁻¹. b- Dépendance du courant de pic cathodique mesuré à $E = +0,1$ V vs. ECS pour des électrodes GC/PQ (ratio massique 75 :25) en fonction du rapport massique GOx-catalase/PQ (valeurs issues de la courbe a)

IV.4.b.3 Effet du pH et stabilité temporelle

Les quinones sont connues pour être des espèces sensibles au pH. De plus, l'activité enzymatique des enzymes est aussi fonction de ce paramètre. Les courants catalytiques de bioanode de type GC/PQ (75 :25, GOx/PQ et Catal/PQ 52 et 28 % respectivement) sont évalués dans le cas de solutions électrolytiques ayant différents pH, typiquement 5,0, 6,0, 7,2 et 8,0 unité pH. La solution à pH = 5,0 était une solution tampon NaCl 0,15 mol.L⁻¹, acide

citrique 25.10⁻³ mol.L⁻¹ ajusté par HCl. Les trois autres solutions sont les tampons classiques (HEPES) utilisés tout au long des expérimentations en ajustant le pH désiré par ajout de NaOH. Le comportement électrochimique de chacune des électrodes est fortement modifié selon le pH de la solution d'immersion traduisant donc l'effet du pH sur l'activité enzymatique comme l'indique la **Figure IV-36**. Comme vu précédemment, des bioanodes immergées dans une solution à pH physiologique (pH = 7,2, **iii**) affichent un potentiel à l'abandon faible ($E_{i=0} \sim -175$ mV) et un pic d'oxydation situé dans les potentiels positifs vers +0,1 V.

Au pH le plus acide (pH = 5,0, **i**), le potentiel de l'électrode est relativement élevé pour une anode ($E_{i=0} = -65$ mV) et le courant de pic anodique $I_{p,a} = \pm 110$ μ A (diminution d'un rapport deux par rapport à une électrode immergée dans le tampon pH = 7,2) ce qui indiquerait une activité enzymatique moins importante en milieu acide. A pH = 6,0 (**ii**), le potentiel est décalé de 15 mV dans le sens des potentiels négatifs par rapport à l'électrode précédente et atteint $E_{i=0} = -80$ mV. En revanche, le courant d'oxydation de PQH₂ en PQ est nettement plus important. Dès +0,1 V, celui-ci est plus important que le courant d'oxydation d'une électrode immergée à pH = 7,2, atteignant 320 μ A à +0,2 V. L'utilité de l'augmentation du courant est cependant remise en question dans la fabrication de pile (au moins dans le cas de pile utilisant la PPO et le TTF) à cause de la forte augmentation du potentiel à l'abandon à pH = 6,0. En perdant près de 100 mV et avec des courants plus intenses uniquement pour des potentiels élevés, une pile de type TTF/PQ aurait une *f.e.m.* de 220 mV seulement. Finalement, à pH = 8,0 (**iv**), le potentiel de l'anode se stabilise à $E_{i=0} = -0,214$ V. Le courant maximal est sensiblement le même que l'électrode immergée dans le tampon « physiologique ». L'électrode compressée et développée dans ce chapitre peut donc fonctionner convenablement sur une gamme de pH compris entre pH = 6,0 et pH = 8,0.

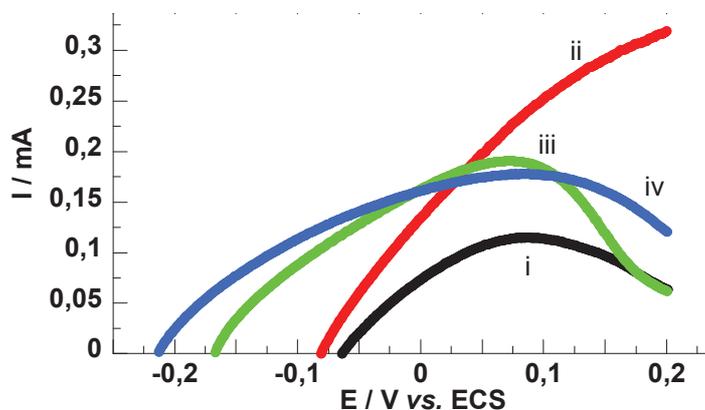


Figure IV-36: Courbes de polarisation de bioanodes compressées ($\varnothing = 5$ mm) de type GC/PQ (ratio 75 :25) et un rapport de GOx-catalase/PQ de 52-28 % obtenues par une compression de 1 tonne puis immergées dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹, glucose 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹ à pH: i- 5,0, ii- 6,0, iii- 7,2 et iv- 8,0, $v_b = 1$ mV.s⁻¹

Le meilleur compromis de valeur de potentiel à l'abandon et de courants anodiques apparaît être pour une bioanode immergée dans une solution à pH physiologique. La stabilité temporelle d'une telle électrode est alors menée dans le tampon décrit précédemment à température ambiante. La solution électrolytique est renouvelée quotidiennement pour assurer une concentration en glucose stable (constante) de $5,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. D'après la **Figure IV-37**, en 5 jours le potentiel de l'électrode s'établit à une valeur proche de -150 mV et les courants d'oxydation à +0,1 V atteignent 150 μA . Le potentiel suit une tendance de stabilisation à $E_{i=0}$ de -175 mV et les courants anodiques demeurent stables $176 \pm 15 \mu\text{A}$ sur une période de 120 jours. La stabilité de la bioanode immergée à pH = 7,2 est très bonne et nettement plus importante que celle mesurée dans le cas de la biocathode. Etant de ce fait limité par la durée de vie de l'électrode positive, les mesures de stabilité ne sont actuellement pas poursuivies.

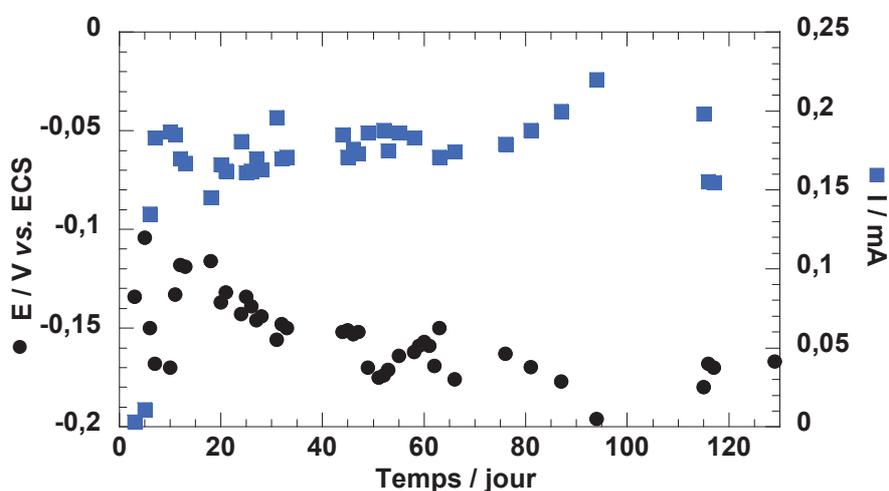


Figure IV-37: Courbe de stabilité du potentiel à l'abandon et du courant de pic à + 0,1 V d'une bioanode compressée ($\varnothing = 5 \text{ mm}$) de type GC/PQ (ratio 75 :25) et de charge enzymatique GOx-catalase/PQ = 52-28 %, compactée sous une pression de 1 tonne et immergée dans un tampon NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, HEPES $25 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, pH = 7,2 et sous air

IV.4.b.4 Augmentation de la surface géométrique / du volume

Comme dans le cas de la biocathode, l'effet de l'augmentation de surface (et du volume) est mesuré. Dans le cas présent, l'augmentation du courant anodique est conséquente lors de l'utilisation d'électrode de grand diamètre puisqu'à +0,1 V, il vaut $I_a = 0,945 \text{ mA}$ et atteint 1,2 mA à +0,25 V. La **Figure IV-38-b** établit la relation de dépendance des courants d'oxydation avec la valeur de la surface géométrique de l'électrode considérée. Les densités de courant mesurées à chacune des électrodes (petit ou grand diamètre) ne sont pas égales. Le courant d'oxydation ne dépend donc pas seulement de la surface géométrique. La **Figure IV-38-c** représente l'évolution des courants obtenus lors de la polarisation des électrodes précédentes en prenant cette fois ci en compte non plus la surface des bioanodes

mais leurs volumes respectifs. Les résultats semblent donc vérifier que l'ensemble du volume des électrodes participent à l'oxydation de PQH₂ et que les distributions du médiateur et des enzymes dans les électrodes compressées sont bien homogènes. Ainsi, les courants « volumiques » atteignent $3,88 \pm 0,35 \text{ mA.cm}^{-3}$ à +0,1 V. Ces résultats sont à comparer avec les mesures de surfaces spécifiques réalisées au paragraphe §IV.2.b.1. Il avait été montré que des électrodes de diamètre $\varnothing = 5 \text{ mm}$ avaient une surface spécifique de $0,51 \text{ cm}^2$ (identique à la surface géométrique). Il semblerait que la présence des enzymes augmente la perméabilité des électrodes et par la même occasion la surface spécifique. D'après les nouveaux résultats présentés ici, il est possible d'affirmer que la surface spécifique réelle est plus importante que la surface géométrique.

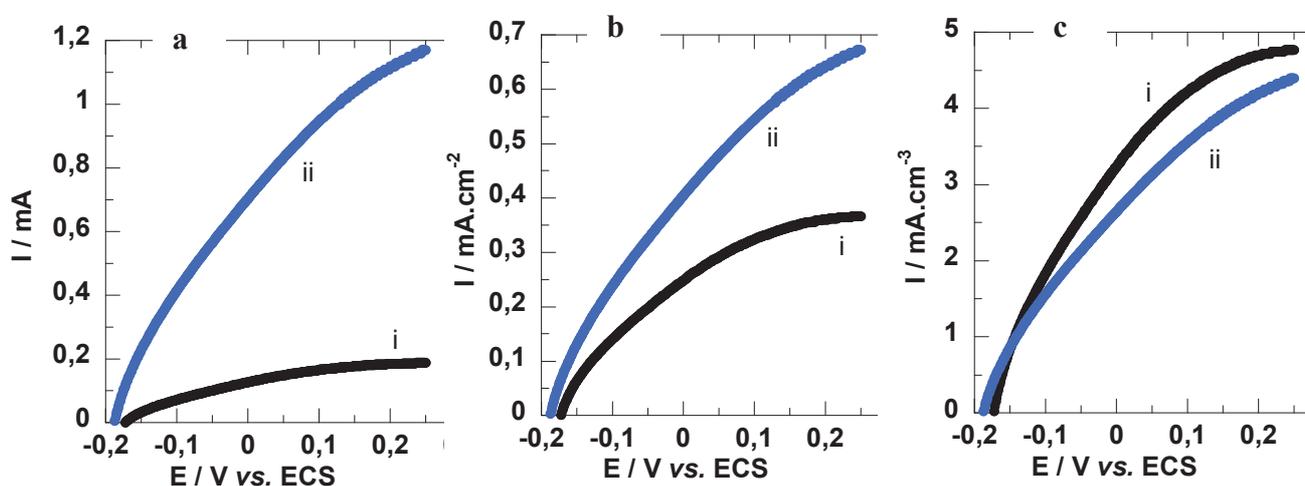


Figure IV-38: a- Courbes de polarisation anodique d'électrodes de type GC/PQ (75 :25 en masse) et de charge enzymatique GOx-Catalase/PQ (52-28 % en masse) immergées dans une solution de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, HEPES $25.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 7,2, T_{ambiante} , air saturé), b- résultats de la courbe a tracés en densité de courant, c résultats de la courbe a tracés en courant « volumique ». Diamètre des électrodes : i- $\varnothing = 5 \text{ mm}$, ii- $\varnothing = 13 \text{ mm}$, $v_b = 1 \text{ mV.s}^{-1}$

IV.4.c Performances de la biopile

IV.4.c.1 Préparation et performances de la biopile

Deux électrodes (une biocathode et une bioanode), conçues d'après les conditions optimales déterminées précédemment, sont immergées dans la même solution électrolytique (NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, HEPES $25.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, pH = 7,2). La cathode utilisée est de type GC/TTF (95 :5) contenant une charge enzymatique PPO/TTF de 47 % tandis que l'anode est de type GC/PQ (75 :25) contenant une charge enzymatique

GOx-Catalase/PQ de 52-28 %. Les électrodes positive et négative sont insérées dans une membrane de dialyse de 100 et 6-8000 Da respectivement.

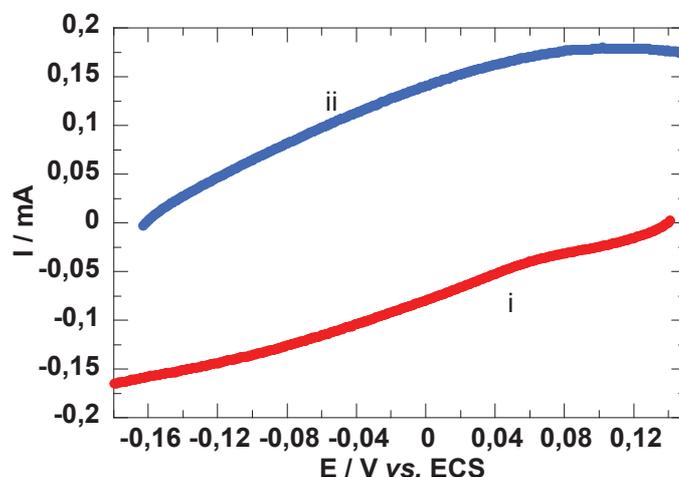


Figure IV-39: Courbes de polarisation d'électrodes immergées dans une même solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹, glucose 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹ (pH = 7,2, T_{ambiante}, air saturé) pour : i- biocathode GC/TTF (95 :5), PPO/TTF : 47 %, ii- bioanode GC/PQ (75 :25), GOx-Catalase/PQ : 52-28 %, v_b = 1 mV.s⁻¹

La **Figure IV-39** donne les courbes de polarisation de la cathode et de l'anode. Dans la gamme de potentiel concernée, celles-ci sont quasi-symétriques. Le potentiel de la pile complète est de 0,3 V. L'exploitation théorique des courbes permet d'obtenir une courbe de puissance (non montrée) dont la valeur maximale est de 8 μW à 0,15 V. Expérimentalement, la mesure de la puissance de la pile (**Figure IV-40**) indique une valeur de 8 μW (40,8 μW.cm⁻²) à 0,2 V.

La prédiction de la puissance de la biopile est ici aussi en accord avec la mesure. Deux méthodes sont utilisées pour le calcul de la puissance de la pile. La première, identique à la méthode utilisée pour la caractérisation de la pile QQH₂/UQ, consiste à effectuer un balayage linéaire en tension à 1 mV.s⁻¹ entre le potentiel à l'abandon (E_{i=0} = 0,315 V) et 40 mV. La seconde consiste à réaliser des mesures de chronopotentiométrie en appliquant différents courants (compris entre 10 et 50 μA). Le potentiel est enregistré après une stabilisation de 120 secondes. La représentation de la courbe de puissance de chacune des deux méthodes montre des résultats identiques. Ces deux méthodes sont donc valables pour mesurer la puissance des piles TTF/PQ.

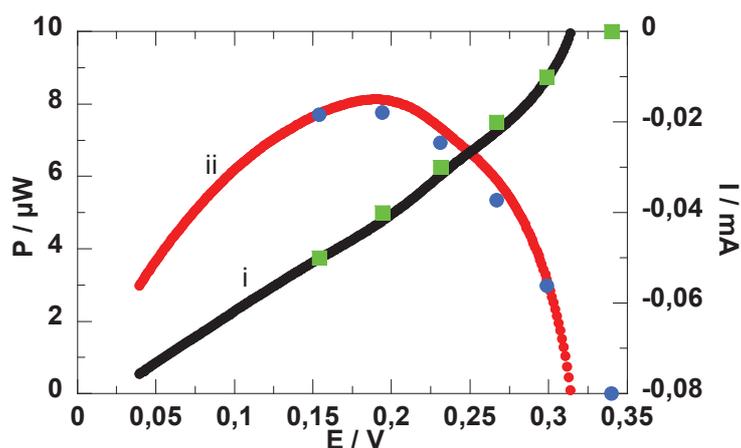


Figure IV-40: i- Courbe de polarisation de la biopile TTF/PQ décrite dans la **Figure IV-39** immergée dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, HEPES 25.10⁻³ mol.L⁻¹, glucose 5,5.10⁻³ mol.L⁻¹ (pH = 7,2, T_{ambiante}, air saturé), v_b = 1 mV.s⁻¹; ii- courbe de puissance correspondante. (■) Mesures de chronopotentiométrie à courant constant, (●) puissances correspondantes, temps d'attente pour la lecture du potentiel t = 120 s

IV.4.c.2 Association de deux biopiles en série et en parallèle

Dans les conditions décrites, les résultats sont reproductibles ($P_m = 8,06 \pm 0,07 \mu W$). Deux piles caractérisées en premier lieu chacune dans des compartiments différents sont ensuite associées en série et en parallèle pour augmenter les performances du système (**Figure IV-41**).

Le montage en série consiste à connecter la cathode la pile 1 (C₁) à l'anode de la pile 2 (A₂). Les deux piles sont immergées dans des volumes séparés pour ne pas avoir d'autodécharge entre les deux électrodes C₁ et A₂. Comme attendu, le potentiel du montage est la somme des potentiels des deux piles (E₁ = 0,315 V, E₂ = 0,315 V, E_{série} = 0,63 V). La puissance augmente jusqu'à 12,8 μW (+63 %) à 368 mV (**iii**).

Dans le cas du montage en parallèle, le problème d'autodécharge ne se pose pas. Il n'y a pas de court-circuit entre deux cathodes ou deux anodes reliées entre elles. Il est donc possible de travailler dans le même volume de solution tampon (a fortiori, ce branchement est utilisable en condition *in vivo*). La *f.e.m.* d'une telle pile est la moyenne des *f.e.m.* de chaque pile. Les courants, eux, se somment. Théoriquement, deux piles assemblées en parallèle devraient donc fournir une puissance deux fois plus élevée. Ce résultat est expérimentalement obtenu (**iv**) avec une pile donnant une puissance maximale de 15,7 μW à 185 mV.

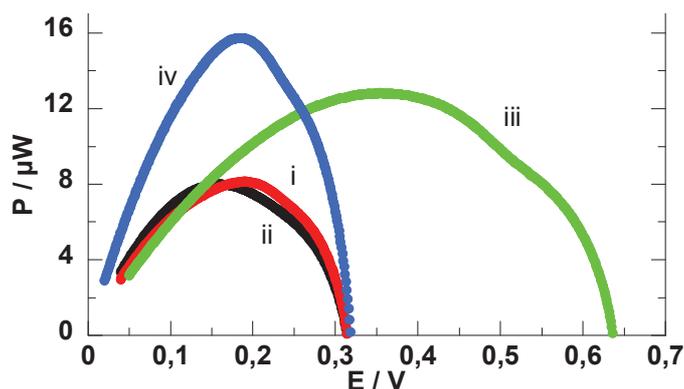


Figure IV-41: Courbes de puissance : i et ii- de deux piles identiques aux conditions décrites dans la Figure IV-39, iii- des piles i et ii associées en série, iv- des piles i et ii associées en parallèle, $v_b = 1 \text{ mV.s}^{-1}$

IV.4.c.3 Biopile de grandes surfaces

En passant avec des électrodes de grandes surfaces ($\varnothing = 13 \text{ mm}$) pour la réalisation de piles complètes, l'augmentation de la puissance maximale du biogénérateur est nettement plus importante. La courbe de polarisation indique un courant maximal de l'ordre de $300 \mu\text{A}$ corroborant la limitation des performances de la pile par la cathode (voir courbe de polarisation d'une biocathode de $\varnothing = 13 \text{ mm}$, Figure IV-33). La biopile a une force électromotrice de 317 mV et une puissance maximale de $27 \pm 2 \mu\text{W}$ à $0,155 \text{ V}$. Les mesures de chronopotentiométrie se sont avérées en accord avec les mesures faites en potentiodynamique. Elles décrivent relativement bien la courbe de puissance même si des disparités entre les deux méthodes sont remarquables pour certains courants.

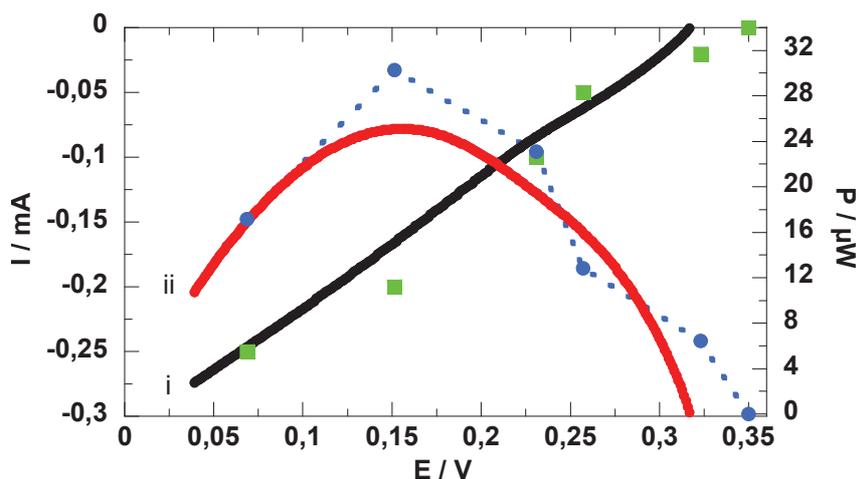


Figure IV-42: i- courbe de polarisation d'une biopile TTF/PQ ($\varnothing = 13 \text{ mm}$) décrite dans la Figure IV-39 immergée dans une solution de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, HEPES $25.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, glucose $5,5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 7,2, T_{ambiante} , air saturé), $v_b = 1 \text{ mV.s}^{-1}$; ii- courbe de puissance correspondante. (■) Mesures de chronopotentiométrie à courant constant, (●) puissances correspondantes, temps d'attente pour la lecture du potentiel, $t = 120 \text{ s}$

Pour évaluer la capacité de la pile à fonctionner en générateur un courant constant de 100 μA est appliqué aux bornes de la pile. Le potentiel chute alors brusquement de 285 mV à 220 mV, correspondant à la zone de perte dû à l'activation des mécanismes de transfert électronique. Ensuite, l'évolution du potentiel devient linéaire (due aux chutes ohmiques) avec une pente de $-2,7 \text{ mV}\cdot\text{min}^{-1}$. Il faut ici remarquer que la pente de diminution de E est identique à celle dans le cas de la pile *QQH₂/UQ* exposée en début de chapitre. Cependant, le courant imposé est ici 20 fois supérieur ce qui indique que la nouvelle pile *TTF/PQ* est nettement plus performante.

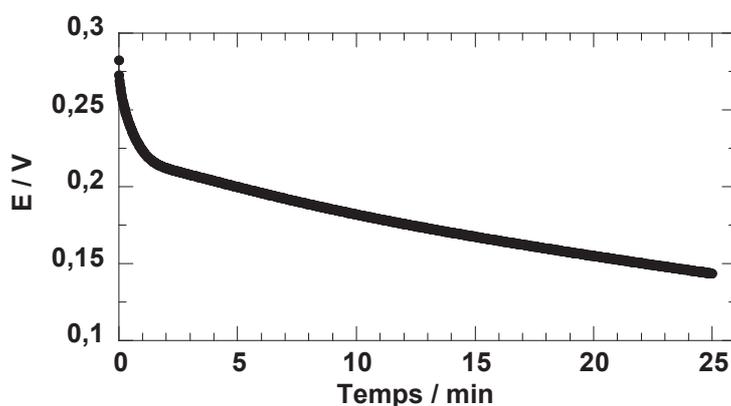


Figure IV-43: Courbe de décharge à courant constant ($I = 100 \mu\text{A}$) d'une pile à glucose oxygène *TTF/PQ* ($\varnothing = 13 \text{ mm}$) immergée dans une solution de $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{HEPES } 25\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, glucose $5,5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,2$, T_{ambiante} , air saturé)

IV.5 Conclusions du Chapitre IV

Dans la première partie du chapitre, le fonctionnement d'une pile enzymatique à glucose/oxygène « bioinspirée » a été démontré. L'utilisation de composés dérivés de quinone incorporés à du carbone graphite et en présence d'oxydoréductase a permis cette réalisation. Cette pile est constituée d'une bionanode et d'une biocathode à base de glucose oxydase et de polyphénol oxydase pour l'oxydation du glucose et la réduction de l'oxygène moléculaire respectivement. Pour assurer les transferts électroniques entre les centres actifs des enzymes et le carbone de l'électrode, l'ubiquinone est utilisée à l'anode et la quinhydrone à la cathode. Dans des conditions *in vitro*, la pile offre une puissance maximale de 2 μW à 62 mV (*f.e.m.* = 250 mV) en présence d'une faible concentration de glucose ($5,5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, à $\text{pH} = 7,2$). Cette partie a également eu pour but principal de démontrer la faisabilité et le fonctionnement de l'implantation de la biopile dans un organisme vivant. Ainsi, la pile atteint 1,75 μW (*f.e.m.* = 180 mV) une fois implantée dans un rat.

La seconde partie fait part des résultats obtenus dans la recherche de nouveaux médiateurs rédox utilisables soit à la cathode, soit à l'anode pour augmenter les performances et la stabilité de la pile. Une grande majorité des espèces caractérisées sont des composés insolubles ou faiblement solubles. Quelques uns d'entre eux se sont montrés potentiellement intéressants dans la catalyse de la réduction de l'oxygène ou de l'oxydation du glucose, comme le tétrathiafulvalène (*TTF*) pour le côté cathodique, la phénanthèrenequinone (*PQ*) et la 1,4-naphtoquinone (*14-NQ*) pour le côté anodique.

La dernière partie a consisté à caractériser et optimiser une nouvelle biopile basée sur l'utilisation des médiateurs révélés dans la partie précédente (*TTF* et *PQ* à la cathode et à l'anode respectivement). Il a pu être démontré que plusieurs paramètres pouvaient influencer sur la réponse des électrodes. L'effet de la proportion de médiateur, de la charge d'enzyme immobilisée, de la pression, du pH des solutions tampon utilisées, de la surface des électrodes ont été évaluées en rapport avec les courants catalytiques mesurés. Une pile conçue avec des électrodes de faible surface ($\varnothing = 5$ mm) a pu être développée et fournir une *f.e.m.* de 320 mV et une puissance maximale de 8 μ W (40,8 μ W.cm⁻²) à 180 ± 10 mV sur une période de 25 jours. Finalement, avec des électrodes de grande surface ($\varnothing = 13$ mm), les performances de la pile ont pu être accrues avec une puissance maximale de 27 ± 2 μ W (soit une augmentation d'un facteur 13,5 par rapport à la première pile *QQH₂/UQ* développée).

A l'heure actuelle, aucune implantation n'a été réalisée avec le nouveau prototype de biopile à glucose. Des problèmes liés à la diffusion persistante des espèces rédox et à des problèmes de connections électriques des implants sont les freins à l'expérimentation *in vivo*.

Références bibliographiques

- (1) Solomon, E. I.; Chen, P.; Metz, M.; Lee, S. K.; Palmer, A. E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 4570-4590.
- (2) Matoba, Y.; Kumagai, T.; Yamamoto, A.; Yoshitsu, H.; Sugiyama, M. *Journal Of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 8981-8990.
- (3) Yoon, J.; Fujii, S.; Solomon, E. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 6585-6590.
- (4) Duran, N.; Rosa, M. A.; D'Annibale, A.; Gianfreda, L. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 907-931.
- (5) Jolival, C.; Brenon, S.; Caminade, E.; Mougins, C.; Pontie, M. *J. Membr. Sci.* **2000**, *180*, 103-113.
- (6) Blanford, C. F.; Foster, C. E.; Heath, R. S.; Armstrong, F. A. *Faraday Discuss.* **2008**, *140*, 319-335.
- (7) Shin, H.; Cho, S.; Heller, A.; Kang, C. *J. Electrochem. Soc.* **2009**, *156*, F87-F92.
- (8) Shin, H.; Kang, C.; Heller, A. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 638-643.
- (9) Nistor, C.; Emneus, J.; Gorton, L.; Ciucu, A. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *387*, 309-326.
- (10) Munjal, N.; Sawhney, S. K. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 613-619.
- (11) Daigle, F.; Leech, D. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4108-4112.
- (12) Cosnier, S.; Innocent, C.; Allien, L.; Poitry, S.; Tsacopoulos, M. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 968-971.
- (13) Molyneux, S. *Thèse de doctorat: "Development of Assays for Coenzyme Q10 and Vitamin K, and their Application in Clinical Trials"* **2006**, University of Canterbury, New Zealand.
- (14) Lamraoui, H.; Bonvilain, A.; Robain, G.; Combrisson, H.; Basrou, S.; Moreau-Gaudry, A.; Cinquin, P.; Mozer, P. *Ieee-Asme Transactions On Mechatronics* **2010**, *15*, 916-924.
- (15) Roll, S.; Muller-Nordhorn, J.; Keil, T.; Scholz, H.; Eidt, D.; Greiner, W.; Willich, S. N. *BMC surgery* **2008**, *8*, 22.
- (16) Shleev, S.; Tkac, J.; Christenson, A.; Ruzgas, T.; Yaropolov, A. I.; Whittaker, J. W.; Gorton, L. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2517-2554.
- (17) Yaropolov, A. I.; Kharybin, A. N.; Emneus, J.; MarkoVarga, G.; Gorton, L. *Bioelectroch. Bioener.* **1996**, *40*, 49-57.
- (18) Liu, X. Q.; Zhang, Z. L.; Cheng, G. J.; Dong, S. J. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 103-107.
- (19) Palmore, G. T. R.; Kim, H. H. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *464*, 110-117.
- (20) Cosnier, S.; Ionescu, R. E.; Keddam, M.; Vivier, V. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 750-756.
- (21) Ndamani, J. C.; Bo, X. J.; Guo, L. P. *Analyst* **2010**, *135*, 621-629.
- (22) Olaya, A. J.; Ge, P.; Gonthier, J. F.; Pechy, P.; Corminboeuf, C.; Girault, H. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12115-12123.
- (23) Land, E. J.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A.; Stratford, M. R. L. *Arkivoc* **2008**, 258-267.
- (24) Nogala, W.; Rozniecka, E.; Rogalski, J.; Opallo, M. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *608*, 31-36.

Conclusion générale

Ce travail de recherche comportait deux objectifs principaux. L'un était de développer un biocapteur immunologique pour une détection sans marquage d'un antibiotique, l'autre était de proposer de nouvelles méthodes originales de production d'énergie par l'utilisation d'enzymes.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, deux aspects de la bioélectrochimie ont été présentés. Ceci a permis de faire transparaître les enjeux, les besoins et les stratégies actuelles utilisées pour le développement en bioanalyse et en bioénergétique. Dans le cas de la biodétection, le regard s'est posé plus en détail sur les différentes méthodes de détection pour le cas de capteurs immunologiques. Pour celui de la bioénergétique, après avoir décrit les principales approches en vue de production électrique par voie bioélectrochimique, l'attention s'est centrée sur les enzymes rédox dans le but de promouvoir l'oxydation de différents combustibles dits « renouvelables ».

Dans le deuxième chapitre, dédié à la biodétection, le travail s'est orienté sur l'élaboration d'un immunocapteur impédancemétrique pour la détection d'un antibiotique : la ciprofloxacine. Le but était de mesurer une perte progressive d'un anticorps préalablement immobilisé à la surface du transducteur par liaison affine et spécifiquement dirigé contre l'antibiotique à détecter.

Après avoir modifié la surface du transducteur par le film de polymère, un modèle de l'antibiotique a pu être immobilisé de façon covalente sur les chaînes alkyles du polymère par la formation de liaison amide. Cette étape a été vérifiée indirectement par les variations de perméabilité du film avant et après greffage.

Les électrodes ainsi modifiées ont été ensuite mises en présence de l'anticorps spécifique à la ciprofloxacine qui se lie au modèle de l'antibiotique par un couplage affin, typique des interactions existantes entre anticorps et antigène. Le succès de ce couplage a été vérifié par une détection ampérométrique en « sandwich » qui vise à immobiliser un second anticorps étiqueté d'une enzyme rédox, ici, la *HRP*.

Finalement, la mesure de la détection de la ciprofloxacine a été réalisée grâce à la spectroscopie d'impédance électrochimique en présence d'une sonde rédox. Les spectres d'impédance ont permis de visualiser clairement la fixation de l'anticorps spécifique à la ciprofloxacine sur l'assemblage moléculaire et d'identifier un décrochage progressif de cet anticorps en présence d'une concentration croissante en ciprofloxacine en solution. Le capteur possède une limite de détection extrêmement faible de 1.10^{-12} g.mL⁻¹.

Le troisième chapitre s'est orienté sur la production électrique par production d'un gradient de concentration. Une oxydoréductase (la glucose oxydase) et une hydrolase (l'uréase) ont été utilisées dans des compartiments séparés pour générer des protons et des ions hydroxydes respectivement à partir de glucose et d'urée.

Le gradient de pH qui s'établit entre les deux compartiments a été converti en différence de potentiel électrique par la présence d'un couple rédox identique, sensible au pH à chacune des électrodes. La quinhydrone immergée dans le compartiment acide est responsable d'une augmentation du potentiel de l'électrode. Inversement, la quinhydrone immergée dans la solution alcaline entraîne la diminution de la valeur de E. La particularité de cette biopile réside alors dans l'émergence d'une force électromotrice provoquée uniquement par l'apparition du gradient de pH.

Plusieurs prototypes et matériaux d'électrode ont été utilisés pour l'assemblage des piles à gradient de pH. Les meilleures performances ont été obtenues en présence de concentrations élevées de glucose et d'urée ($0,4 \text{ mol.L}^{-1}$). La pile offre alors une *f.e.m.* de 208 mV avec une puissance de $30 \mu\text{W}$ et peut délivrer des courants de 10 à $20 \mu\text{A}$.

Le quatrième et dernier chapitre de ce manuscrit se propose de fournir une solution au développement de biogénérateurs à caractère implantable pour des applications médicales. L'idée fondatrice du projet est de drainer l'énergie chimique directement présente dans le corps humain avec la présence de molécules comme le glucose ou l'oxygène dans le but de la convertir en énergie électrique. Pour cela, des enzymes associées à des médiateurs rédox sont utilisés à chacune des électrodes et sont immobilisés par simple compression mécanique ce qui facilite la fabrication des bioélectrodes.

La première biopile implantable a été conçue en s'inspirant des phénomènes de transferts électroniques nécessaires à la vie des cellules. L'ubiquinone a tout d'abord été sélectionnée pour accomplir ces transferts entre la glucose oxydase (*GOx*, *Aspergillus Niger*) et le carbone à l'anode lors de l'oxydation du glucose. La quinhydrone, elle, a été immobilisée pour conduire les électrons de l'électrode jusqu'à la polyphénol oxydase (*PPO*, *Agaricus Bisporus*) pour la réduction de l'oxygène moléculaire. Il faut, par ailleurs, remarquer qu'il s'agit de la première biopile à glucose/ O_2 développée avec l'utilisation de la *PPO* à la cathode pour la réduction de l'oxygène moléculaire.

Cette pile à ubiquinone/quinhydrone a d'abord été caractérisée au laboratoire dans des conditions physiologiques puis, a été implantée dans un animal vivant. Les performances obtenues ont été similaires ce qui a prouvé le bon fonctionnement de la biopile aussi bien *in vitro* que *in vivo* (193 mV et $1,75 \mu\text{W}$).

Afin d'augmenter les performances du système, de nouvelles espèces rédox ont été étudiées en vue de leur utilisation à chaque électrode. Deux médiateurs de choix ont pu être identifiés, l'un pour l'anode, la phénanthrènequinone et l'autre pour la cathode, le tétrathiafulvalène.

La caractérisation des nouvelles électrodes a pu mettre en évidence une forte dépendance des performances par rapport aux paramètres tels que la concentration en médiateur immobilisé, la charge enzymatique utilisée, la valeur du pH des solutions, la valeur de la pression de compression. Une fois, ces paramètres expérimentaux optimisés,

l'assemblage d'une pile complète a pu donner lieu à une nouvelle biopile. Toujours dans les conditions physiologiques, cette nouvelle biopile offre une puissance maximale de 27 μW augmentant les performances d'un facteur 13,5 par rapport à la première biopile implantée.

Des études complémentaires devraient être réalisées pour mieux appréhender les mécanismes réactionnels ayant lieu à chacune des bioélectrodes, notamment les interactions entre médiateur et centre actif des enzymes dans le but d'obtenir des données sur les cinétiques de ces réactions.

L'utilisation de nouveaux matériaux d'électrode (nanotubes de carbone, nanoparticule,...), l'immobilisation des espèces rédox (dans des polymères, par couplage covalent), sont autant de pistes qu'il faut encore arpenter dans la quête de l'augmentation des performances des biopiles enzymatiques développées ici.

E. Experimental part

E.1 Immunosensor

E.1.a Organic compounds synthesis

E.1.a.1 Synthesis of pyrrole-NHS

The monomer pyrrole-NHS (N-hydroxysuccinimido 11-(pyrrol-1-yl) undecanoate) was synthesized according to Ionescu's work by changing the length of the alkyl chain from 4 to 11 carbon atoms¹.

The pyrrole-NHS monomer was synthesized in the following way: 4-pyrrolyl butanoic acid (298 mg, 1.9 mmol), N-hydroxysuccinimide (NHS) 228 mg, 2 mmol) and 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (398 mg, 2 mmol) were dissolved in dry tetrahydrofuran. The mixture was stirred under argon overnight at room temperature and then filtered. The organic phase was evaporated and the residue was washed with CH₂Cl₂. Crystallization from CH₂Cl₂ gave 494 mg of pyrrole-NHS (60% yield).

E.1.a.2 Synthesis of the fluoroquinolone model

The fluoroquinolone model, 7-(2-aminoethylamino)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-3-quinoline-3-carboxylic acid (hapten) was provided by the Spanish partner AMRg-CSIC involved in the project. It was synthesized from ethyl 6,7-difluoro-4-hydroxyquinoline-3-carboxylate prepared following described procedures developed by Kamal et al.² and further alkylated at the nitrogen by treatment with propyl iodide to give ethyl 1-propyl-6,7-difluoro-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylate. Hydrolysis of the ethyl ester provided the corresponding carboxylic acid of the quinolone. Finally, the ethylenediamine group was introduced at the C-7 position by nucleophilic substitution of the fluorine atom to yield the desired compound.

E.1.b Solvents, reagents and apparatus

E.1.b.1 Solvents

All aqueous solutions were prepared with deionised water obtained from ONDEO pur1TE select.

Organic solutions for electrochemistry were prepared with acetonitrile (CH₃CN) (Rathburn, HPLC grade, [H₂O] ≤ 100 ppm) used as received. Dimethylformamide (DMF) (analytical grade) was dried over Na₂SO₄ for one day.

E.1.b.2 Raising of the polyconal antisérum model

The polyclonal antiserum was raised in rabbit against 1-(3-mercaptopropyl)-6-fluoro-7-(piperanicyl)-1,4-dihydro-4-oxo-quinoline-3-carboxylic acid coupled to horseshoe crab hemicyanin. Preparations of the immunogen and antibodies were previously described by Adrian et al.³ and were provided by the Spanish partner AMRg-CSIC involved in the project.

E.1.b.3 Other reagents

Tetrabutylammonium perchlorate (TBAP, purified, electrochemical grade, $\geq 99.9\%$) and ciprofloxacin (analytical grade) were obtained from Fluka.

KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, Tween 20 (10%), Hydroquinone (purity $\geq 99\%$), triethylamine (purity $\geq 99\%$), H₂O₂ (30%), and [Ru^{III}(NH₃)₆]Cl₃ (purity 98%) were Sigma-Aldrich products. K₃Fe(CN)₆ and K₄Fe(CN)₆ · 3H₂O and AgNO₃ were purchased from Prolabo products.

Sodium chloride (NaCl) and Sodium hydroxide (NaOH) was provided from Carlo Erba.

All chemicals were analytical grade and used without further purification.

E.1.b.4 Apparatus

Cyclic voltammetry and electropolymerization experiments were performed with an Autolab potentiostat 100 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) controlled by the GPES software. Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) was carried out with the same machine using the FRA software. Simulations (Processings) of data obtained were done with the Zview software using equivalent electrical circuit.

An electrochemical three-electrode cell (Metrhom) was employed. Glassy carbon disk electrodes ($\varnothing = 3-5$ mm) were used as working electrodes and polished with 1 μm diamond paste (MECAPREX Press PM), thoroughly rinsed with distilled water, ethanol and acetone and finally dried under argon before use. A platinum wire was used as the counter electrode for both organic (CH₃CN) and aqueous (PBS) media. An Ag/Ag⁺ ([Ag⁺] = [NO₃⁻] 10⁻² mol L⁻¹ in CH₃CN + 0.1 mol L⁻¹ TBAP) electrode and a saturated calomel electrode (SCE) were used as reference electrode in acetonitrile electrolyte and aqueous solutions, respectively.

The Phosphate Buffer Saline (PBS, 10⁻² mol L⁻¹) solution is made from the mixture of 0.137 mol L⁻¹ NaCl, 1.5 · 10⁻³ mol L⁻¹ KH₂PO₄, 8.0 · 10⁻³ mol L⁻¹ Na₂HPO₄, 2.7 · 10⁻³ mol L⁻¹ KCl and adjust at pH = 7.5. PBST is PBS buffer with 0.05% Tween 20.

Permeability measurements were carried out with [Ru^{III}(NH₃)₆]³⁺ (2.0 · 10⁻³ mol L⁻¹) as a redox probe in PBS solution. The rotating disk voltammograms were recorded at 10 mV s⁻¹, the rotating rate varying from 250 to 2500 rpm from 0 to -0.65 V vs. SCE.

Amperometric measurements were carried out with hydroquinone ($2.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) as enzyme substrate in presence of hydrogen peroxide ($2.9 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). The enzymatically generated quinone was detected through its reduction at the electrode surface at -0.5 V vs. SCE .

All experimental impedance spectra were recorded with a 500 rpm rotation speed at room temperature ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) in phosphate buffer saline solutions (PBS, 0.15 mol L^{-1} , $\text{pH} = 7.5$) containing the redox system $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ($10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). The frequency sweep ranged from 50 kHz to 0.1 Hz at the equilibrium potential (0.2 V vs. SCE) with an ac potential amplitude of 5 mV rms.

E.1.c Electrode modifications

The polypyrrole films were electrochemically generated from pyrrole-NHS ($2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) in $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ TBAP, by controlled potential oxidation at $0.85 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ at room temperature under an argon atmosphere. The charge passed during the electropolymerization step was fixed at 2.5 mC cm^{-2} .

The steps carried out for the construction of the biosensor on the modified glassy carbon electrodes are the following:

- ❖ The first step consisted in the deposition of a drop ($20 \text{ } \mu\text{L}$) of the antibiotic model solution on the polypyrrole film followed by an incubation step overnight at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. The solution of antibiotic model was a mixture of 1.2 mg of the model in $250 \text{ } \mu\text{L}$ of dry DMF with $2 \text{ } \mu\text{L}$ of triethylamine. Then, the resulting electrodes were washed for 30 min in dry stirred DMF solution, rinsed carefully several times with PBS solution and dried under argon.
- ❖ The polypyrrole-antibiotic model electrodes were then incubated with $15 \text{ } \mu\text{L}$ of the anticiprofloxacin antibody solution (dilution 1/100 in PBST) for 30 min at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Finally, the antibody-modified electrodes were washed under stirring in PBS for 30 min.
- ❖ Before impedance experiments, the resulting immunosensors were immersed, for 30 min, in aqueous solutions containing different concentrations of ciprofloxacin from 1 pg mL^{-1} to $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ in PBS with 0.5 mol L^{-1} NaOH.
- ❖ For the amperometric measurements, an additional incubation of the immunosensors with $15 \text{ } \mu\text{L}$ of a secondary antibody marker labeled by a HRP was performed for 30 min at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ and followed by a washing step with PBS solution.

E.2 Biofuel cells

E.2.a pH Gradient Biofuel Cell

E.2.a.1 Reagents

All aqueous solutions were prepared with deionised water obtained from ONDEO pur1TE select.

Potassium chloride (KCl), Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, quinhydrone (equimolar mixture of quinone and hydroquinone, 97 %), D-glucose, glucose oxidase (*GOx*, E.C. 1.1.3.4 type VII, from *Aspergillus niger*, 179 U mg⁻¹), catalase (E.C. 1.11.1.6, from Bovine Liver, 1610 U mg⁻¹), urease (E.C. 3.5.1.5, type IX, from Jack Beans, 70.4 U mg⁻¹) were Sigma-Aldrich products.

Urea and agar were Fluka products.

Sodium chloride (NaCl) and Sodium hydroxide (NaOH) was provided from Carlo Erba.

Carbon felt was supplied from Carbone Lorraine, while Graphite Flake particles were purchased from Sigma-Aldrich.

All chemicals were analytical grade and used without further purification.

Dialysis membranes were purchased from Spectrumlabs: Spectra/Por® Dialysis membrane, MWCO 6-8000 g mol⁻¹, flat width 32 mm, diameter 20.4 mm, vol/length 3.3 mL cm⁻¹; Spectra/Por® CE, cellulose ester membrane, MWCO 100 g mol⁻¹, flat width 31 mm, diameter 20 mm, vol/length 3.1 mL cm⁻¹.

E.2.a.2 Apparatus

Linear Sweep Voltammetry and galvanostatic experiments were performed with an Autolab potentiostat 100 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) controlled by the GPES software.

Both Carbon felt ($V = 0.9 \times 0.9 \times 0.9 \text{ cm}^3$) or disk electrodes ($\varnothing = 13 \text{ mm}$) (biocathode or bioanode) were used as working electrode for half cell characterization. A platinum wire was used as the counter electrode. A saturated calomel electrode (SCE) was used as reference electrode the phosphate buffer. For full-cell experiments, the biocathode was chosen as working electrode whilst the bioanode was the counter/reference electrode.

Aqueous solution is prepared with 0.15 mol L⁻¹ NaCl (and adjust at pH = 7.2 with Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 25.10⁻³ mol.L⁻¹ and NaOH in the case of a buffered solution). pH shifts were carried using a CRISON pH-meter GLP 21+ with a dual electrode.

A Cary 100 spectrophotometer (Varian) with a 1 cm path length cuvette was used for the UV-Visible spectroscopy controlled with a Varian software.

E.2.a.3 Electrode fabrication

The dimensions of the cubic carbon felt electrodes were (0.9×0.9×0.9 cm³).

Quinhydrone electrodes were prepared as follows: 175 mg graphite flake particles, 85 mg of quinhydrone, 0.15 mL water and glycerol (25 μL) were thoroughly mixed in a ceramic mortar. The resulting graphite-quinhydrone paste was pressed at 10,000 kg cm⁻² to form a disk. The surface area and thickness of disk are 1.33 cm² and 0.1 cm, respectively. A platinum wire was fixed by a conductive carbon glue on one side of the disk, which was then covered by an insulating silicon film to reinforce the mechanical strength of the biocoating.

E.2.a.4 Biofuel cell assembly

❖ Demonstrator unit / Carbon felt electrodes

The agar-agar wall is a 1.5 % agar: water (w:w). First, the agar-0.15 mol L⁻¹ NaCl/water mixture was melt at 85 °C. Then, under its liquid form, it was introduced between the compartments junction. Finally, the wall was cooled under ambient temperature and the demonstrator was used once the wall solidification was complete.

Both carbon felt electrodes were immersed in an aqueous 0.15 mol L⁻¹ NaCl solution (1 mL) containing quinhydrone (3.2 10⁻³ mol L⁻¹) and enclosed in a dialysis membrane with a molecular weight cut-off of 100 g mol⁻¹. The biofuel cell was constituted by two compartments (6 mL each) separated by a hydrogel wall (agar-agar; thickness: 5 mm). The anode and the cathode bags containing carbon felt electrode and quinhydrone were immersed in 0.15 mol L⁻¹ NaCl containing different concentrations of D-glucose and urea. In addition to the electrolyte, substrates and electrode bag, the bioanode compartment contained urease (57.4 mg) while the biocathode compartment contained *GOx* (22.5 mg) and catalase (3.8 mg). The electrochemical measurements of the biofuel cell performance were carried out after a 1-h waiting whatever the concentration of D-glucose and urea.

E.2.a.5 Miniaturised unit / Carbon felt electrodes

Both carbon felt electrodes were immersed in an aqueous 0.15 mol L⁻¹ NaCl solution (1 mL) containing quinhydrone (3.2 10⁻³ mol L⁻¹) and enclosed in a dialysis membrane with a molecular weight cut-off of 100 g mol⁻¹. Each dialysis bag (anode and cathode) was placed in another dialysis bag with a molecular weight cut-off of 6-8000 g mol⁻¹ containing 0.15 mol L⁻¹ NaCl (2 mL) and urease (57.4 mg) for the anode or *GOx* (22.5 mg) and catalase (3.8 mg) for the cathode. The two resulting bags were soaked in 25 mL of 0.15 mol L⁻¹ NaCl containing different concentrations of D-glucose and urea.

❖ Demonstrator unit / Compacted quinhydrone electrodes

The quinhydrone electrodes obtained by mechanical compression were immersed in an aqueous 0.15 mol L⁻¹ NaCl solution (1 mL) and enclosed in a dialysis membrane with a molecular weight cut-off of 100 g mol⁻¹. The biofuel cell was constituted by two compartments (6 mL each) separated by a hydrogel wall (agar-agar; thickness: 5 mm). In addition to the electrolyte, substrates and electrode bag, the bioanode compartment contained urease (57.4 mg) while the biocathode compartment contained GOx (22.5 mg) and catalase (3.8 mg). The electrochemical measurements of the biofuel cell performance were carried out after potential stabilization whatever the concentration of D-glucose and urea.

❖ Miniaturised unit / Compacted quinhydrone electrodes

The compacted quinhydrone electrodes were immersed in an aqueous 0.15 mol L⁻¹ NaCl solution (1 mL) and enclosed in a dialysis membrane with a molecular weight cut-off of 100 g mol⁻¹. Each dialysis bag (anode and cathode) was placed in another dialysis bag with a molecular weight cut-off of 6-8000 g mol⁻¹ containing 0.15 mol L⁻¹ NaCl (2 mL) and urease (57.4 mg) for the anode or GOx (22.5 mg) and catalase (3.8 mg) for the cathode. The two resulting bags were soaked in 25 mL of 0.15 mol L⁻¹ NaCl containing different concentrations of D-glucose and urea.

E.2.a.6 UV-visible measurements

The leakage of the quinhydrone was followed by UV-Visible spectroscopy from 800 to 220 nm in a 3 mL quartz cell (length = 1 cm). A quinhydrone compacted electrode was introduced in a 100 Da dialysis bag and immersed in a 0.15 mol.L⁻¹ NaCl solution (75 mL). Every 20 minutes, 3 mL were taken from the flask to perform the UV-visible spectra and replaced after measurement. Mass loss was determined using the absorption band at $\lambda = 290$ nm ($\epsilon_{290} = 2875$ L.mol⁻¹.cm⁻¹).

E.2.b Enzymatic based Glucose/O₂ Biofuel Cell

E.2.b.1 Reagents

All aqueous solutions were prepared with deionised water obtained from ONDEO pur1TE select.

Potassium chloride (KCl), quinhydrone (97 %) (*Q/QH₂*), ubiquinone (Coenzyme Q₁₀, *UQ*), menaquinone (Vitamin K₂, *VK₂*), catechol (≥ 99 %) (*C*), 1,4-naphtoquinone (*1,4-NQ*), methylbenzoquinone (98 %) (*MBQ*), 2,3,5,6-tétraméthyl-1,4-benzoquinone (Duroquinone, *DQ*), syringaldazine (*SGZ*), 9,10-phenanthrenequinone (*PQ*) (99%), D-glucose, glucose oxidase (*GOx*) (E.C. 1.1.3.4 type VII, from *Aspergillus niger*, 179 U mg⁻¹), catalase (E.C. 1.11.1.6, from Bovine Liver, 1610 U mg⁻¹), PolyPhenol Oxidase (*PPO*) (E.C. 1.1.14.18, from Mushroom, 5333 U mg⁻¹) were Sigma-Aldrich products.

4-methylcatechol (*4-MC*) ($\geq 98\%$) was an Acros Organic product. Tetrathiafulvalene (*TTF*) (97%) was purchased from Alfa Aesar. Sodium chloride (NaCl) and Sodium hydroxide (NaOH) was provided from Carlo Erba. Graphite Flake particles were purchased from Sigma-Aldrich. HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) was obtained from Euromedex. All chemicals were analytical grade and used without further purification.

Dialysis membranes were purchased from Spectrumlabs: Spectra/Por® Dialysis membrane, MWCO 6-8000 g mol⁻¹, flat width 32 mm, diameter 20.4 mm, vol/length 3.3 mL cm⁻¹; Spectra/Por® CE, cellulose ester membrane, MWCO 100 g mol⁻¹, flat width 31 mm, diameter 20 mm, vol/length 3.1 mL cm⁻¹.

E.2.b.2 Apparatus

Cyclic or Linear Sweep Voltammetry and galvanostatic experiments were performed with an Autolab potentiostat 100 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) controlled by the GPES software.

Disk electrodes ($\varnothing = 13 - 5$ mm) (biocathode or bioanode) were used as working electrode for half cell characterization. A platinum wire was used as the counter electrode. A saturated calomel electrode (SCE) was used as reference electrode in the HEPES buffer. For full-cell experiments, the biocathode was chosen as working electrode whilst the bioanode was the counter/reference electrode.

Aqueous solution is prepared with 0.15 mol L⁻¹ NaCl, 25 10⁻³ mol L⁻¹ HEPES and addition of NaOH into solution to obtain the required pH value (pH = 7.2).

A Cary 100 spectrophotometer (Varian) with a 1 cm path length cuvette was used for the UV-Visible spectroscopy with a Varian software to determine the amount of mediator released out of the compacted electrodes.

E.2.b.3 Electrode fabrication

Compacted electrodes ($\varnothing = 13$ mm) were prepared as follows: graphite flake particles, redox mediator, 0.1 mL water and glycerol (25 μ L) were thoroughly mixed in a ceramic mortar. The desired enzyme was added into the mortar and gently mixed with the paste. The resulting graphite-redox mediator-enzyme paste was pressed at 10,000 kg cm⁻² (first glucose fuel cell) to form a disk. The pressure was then adjusted to 5,000 kg cm⁻² for following electrodes. The geometrical surface area and thickness of disk are 2.15 cm² and 0.2 cm, respectively. A platinum wire was fixed by a conductive carbon glue on one side of the disk, which was then covered by an insulating silicon film to reinforce the mechanical strength of the biocoating.

The same procedure was selected for $\varnothing = 5$ mm electrodes with an applied pressure of 1,000 kg cm⁻². The surface area and thickness of disk are 0.51 cm² and 0.2 cm, respectively.

Mediator ratios were based on the total mass graphite/mediator (w:w), enzyme ratios were based on enzyme/mediator ratio (w:w)

The next table summarizes weights and volumes involved in the development of the *QQH₂/UQ* fuel cell for both conditions (*in vitro* and *in vivo*) described in the **chapter IV, §2**.

	Carbon Flakes / mg	Mediator / mg (ratio Med/GC)	Enzyme / mg (ratio Enzyme/Med)		Volume / μ L Water - glycerol
Biocathode (<i>Q/QH₂</i>)	200	100 (50 %)	<i>PPO</i> 4,5 (4,5 %)		50 - 50
Bioanode (<i>UQ</i>)	160	51 (32 %)	<i>GOx</i> 7 (13 %)	<i>Catalase</i> 3 (6 %)	150 - 50

The next table summarizes weights and volumes involved in the development of the optimized electrodes for *TTF/PQ* fuel cell using $\varnothing = 5$ mm electrode described in the **chapter IV, §4**.

$\varnothing = 5$ mm	Carbon Flakes / mg	Mediator / mg (ratio Med/GC)	Enzyme / mg (ratio Enzyme/Med)		Volume / μ L Water - glycerol
Biocathode (<i>TTF</i>)	95	5 (5,2 %)	<i>PPO</i> 2,3 (47 %)		50 - 25
Bioanode (<i>PQ</i>)	75	25 (32 %)	<i>GOx</i> 13 (52 %)	<i>Catalase</i> 7,2 (29 %)	125

Larger electrodes ($\varnothing = 13$ mm) based on *TTF*, *PQ* or *1,4-NQ* mediator were adapted from this table to obtain a 400 mg (carbon/mediator) mass.

E.2.b.4 Biofuel cell assembly

❖ Half cells

The compacted biocathodes were immersed in an aqueous 0.15 mol L⁻¹ NaCl, 25 10⁻³ mol L⁻¹ HEPES solution (1 mL) and enclosed in a dialysis membrane with a molecular weight cut-off of 100 g mol⁻¹ and soaked in 25 mL of the same aqueous solution.

The compacted bioanodes were immersed in an aqueous 0.15 mol L⁻¹ NaCl, 25 10⁻³ mol L⁻¹ HEPES, 5.5 10⁻³ mol L⁻¹ glucose solution (2 mL) and enclosed in a dialysis membrane with a molecular weight cut-off of 6-8000 g mol⁻¹ and soaked in 75 mL of the same aqueous solution.

Both electrolytes were changed daily.

E.2.b.5 Full cell (*in vitro*)

The compacted biocathodes were immersed in an aqueous 0.15 mol L⁻¹ NaCl, 25 10⁻³ mol L⁻¹ HEPES, 5.5 10⁻³ mol L⁻¹ glucose solution (1 mL) and enclosed in a dialysis membrane with a molecular weight cut-off of 100 g mol⁻¹ and soaked in 25 mL of the same aqueous solution. The resulting enclosed electrode and the bioanode were immersed in 2 mL (same aqueous solution) and enclosed in a dialysis membrane with a molecular weight cut-off of 6-8000 g mol⁻¹. The resulting bag was soaked in 75 mL of the same aqueous solution. The electrolyte was changed daily.

❖ Full cell (*in vivo*)

The cells were assembled into a laminar flow hood to preserve the implantable device to be contaminated before the surgery. All the equipment required was sterilized by autoclaving. The compacted biocathodes were immersed in a Ringer's solution containing 5.5 10⁻³ mol L⁻¹ glucose solution (1 mL) and enclosed in a dialysis membrane with a molecular weight cut-off of 100 g mol⁻¹ and soaked in 25 mL of the same aqueous solution. The resulting enclosed electrode and the bioanode were immersed in 2 mL (same aqueous solution) and enclosed in a dialysis membrane with a molecular weight cut-off of 6-8000 g mol⁻¹. The resulting bag was placed into a third and biocompatible membrane made in polytetrafluoroethylene (PTFE, Dacron®) and soaked in 50 mL of the same aqueous solution and stored at 4°C for 2 hours before the surgery.

E.2.b.6 Surgery, recovery and measurements

Male Wistar rats were chosen for the implantation proof of concept. The rats were anaesthetized and maintain asleep under continuous flow of isoflurane/air. First, the belly was shaved to prevent rat hairs to enter in the incision/slit. Then, with a median laparotomy, the cells were introduced in the left stomach space. The catheters were subcutaneously tunnelled from the cell to the back of the neck of the animal.

The surgery was done by Dr. François Boucher (TIMC-IMAG laboratoty).

- (1) Ionescu, R. E.; Herrmann, S.; Cosnier, S.; Marks, R. S. *Electrochemistry Communications* **2006**, 8, 1741-1748.
- (2) Kamal, A.; Devaiah, V.; Reddy, K. L.; Kumar, M. S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, 13, 2021-2029.
- (3) Adrian, J.; Pinacho, D. G.; Granier, B.; Diserens, J.-M.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M. P. *Analytical And Bioanalytical Chemistry* **2008**, 391, 1703-1712.

Liste des abréviations

1,4-NQ : 1,4-naphtoquinone
4-MC : 4-méthylcatéchol
ABTS : 2,2-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulphonique)
Ac : anticorps
ADN : acide désoxyribonucléique
Ag : antigène
Ag+/Ag : électrode de référence en solution organique, $[Ag] = [NO_3^-] = 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$
BOx : bilirubine oxydase
C : catéchol
Cata : Catalase
CDH : cellobiose déshydrogénase
CF : ciprofloxacine
CFM : modèle de la ciprofloxacine
COx : cytochrome oxydase
CPE : élément à phase constante
d.d.p. : différence de potentiel
Do : Dopamine
DQ : duroquinone, tétraméthyl-*p*-benzoquinone
E.C. : numéro attribué aux enzymes par l' « Enzyme Commission »
ECS : électrode au calomel saturé (référence en milieu aqueux)
EF : enrofloxacine
F : faraday
FAD : flavine adénine dinucléotide
Fc : ferrocène
f.e.m. : force électromotrice
GC : carbone graphite
GDH : glucose déshydrogénase
GOx : glucose oxydase
H₂ase : hydrogénase
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HRP : horse radish peroxidase
Lc : laccase
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
MCO : terme pour désigner les enzymes possédant plusieurs sites actifs à base d'atome de cuivre, « Multi Copper Oxidase »
MBQ : méthylbenzoquinone
NHS : N-hydroxysuccinimide
Q : charge
P_m : coefficient de perméabilité d'une membrane

PPO : polyphénol oxydase, tyrosinase
PQ : phénanthrènequinone
PQQ : pyrroloquinoline quinone
PTFE : polytétrafluoroéthylène
QQH₂ : quinhydrone
SGZ : syringaldazine
TBAP : tétrabutylammonium perchlorate
TTF : tétrathiafulvalène
UQ : ubiquinone, coenzyme Q₁₀
Ur : uréase
umec : ultramicro électrode à cavité
VK₂ : ménaquinone, vitamine K₂
Ø : diamètre
 λ : longueur d'onde
 v_b : vitesse de balayage en tension

Liste des publications

4. F. Giroud, C. Gondran, K. Gorgy and al., "*A quinhydrone biofuel cell based on an enzyme-induced pH gradient*", Journal of Power Sources, **2011**, 196 (3), 1329-1332
3. P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud and al., "*A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats*", PLoS ONE, **2010**, 5(5): e10476.
2. S. Cosnier, C. Gondran, F. Giroud, P. Cinquin. "*Biopile à glucose*"
French Patent FR N°10/52657 accepted the **8.04.2010**
Owner: Université Joseph Fourier
1. F. Giroud, K. Gorgy, C. Gondran and al., "*Impedimetric Immunosensor Based on a Polypyrrole-Antibiotic Model Film for the Label-Free Picomolar Detection of Ciprofloxacin*", Analytical Chemistry, **2009**, 81 (20): 8405-8409.

Electrode biomaterials employed in fabrication and characterization of immunosensor and enzymatic biofuel cells.

Abstract: This work is focused on the development of an impedimetric immunosensor and two enzymatic biofuel cells.

Firstly, poly(pyrrole-NHS) is used to graft a model of the ciprofloxacin antibiotic (*CF*) and its specific antibody (Ab) in two steps. The displacement of the antibody in solution directed by a strong affinity between Ab and *CF* is monitored by electrochemical impedance spectroscopy. The detection limit is 10^{-12} g mL⁻¹.

Secondly, production of electricity is studied by two different methods. The first one is based on the creation of a pH difference driven enzymatically by glucose oxidase (*GOx*) and urease. This pH gradient is converted to *e.m.f.* by adding a pH-dependant redox couple. The second method uses glucose/O₂ fuel cells. Electrocatalytic behaviour of enzymes such as *GOx* or polyphenol oxidase (*PPO*) are used to oxidize glucose and reduce O₂. This cell is functional both *in vitro* and *in vivo*. Once optimized, the cells have an open circuit potential of 315 mV and a power of 27 μW.

Keywords: Electrochemistry, Immunosensor, Biofuel cell, Mediated transfer, Enzymes

Biomatériaux d'électrode appliqués à la réalisation et à la caractérisation d'un biocapteur immunologique et de biopiles enzymatiques.

Résumé: Ce mémoire est consacré au développement d'un immunocapteur impédancemétrique et de deux biopiles enzymatiques.

Premièrement, le poly(pyrrole-NHS) est utilisé pour l'immobilisation successive d'un modèle de la ciprofloxacin (*CF*) et de l'anticorps dirigé spécifiquement contre *CF*. La détection est réalisée par la spectroscopie d'impédance électrochimique. Elle détecte le déplacement en solution de l'anticorps. Le seuil de détection est de 1.10^{-12} g.mL⁻¹.

Deuxièmement, la production énergétique est abordée suivant deux approches. La première se base sur l'apparition d'un gradient de pH produit par deux enzymes (la *GOx* et l'uréase) et converti en *f.e.m.* en utilisant un couple rédox sensible au pH. La seconde, repose sur les propriétés biocatalytiques de la *GOx* d'oxyder le glucose et de la polyphénol oxydase de réduire le dioxygène. Cette pile est capable de fonctionner aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Une fois optimisée, la pile affiche une *f.e.m.* de 315 mV et une puissance de 27 μW.

Mots-clés : Electrochimie, Immunocapteur, Biopile, Transfert médié, Enzymes