



HAL
open science

Conception et développement d'une cathode utilisant la laccase de *Trametes versicolor*

Meihui Zheng

► **To cite this version:**

Meihui Zheng. Conception et développement d'une cathode utilisant la laccase de *Trametes versicolor*. Autre. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66684 . tel-00839451

HAL Id: tel-00839451

<https://theses.hal.science/tel-00839451>

Submitted on 28 Jun 2013

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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

CHIMIE
(Ecole doctorale 406)

Présentée par

Mlle ZHENG Meihui

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Conception et développement d'une cathode utilisant la laccase de *Trametes versicolor*

soutenue le 19 décembre 2012

devant le jury composé de :

M. V. NOEL	Maître de Conférences Université Paris Diderot	Rapporteur
Mme P. GENTILI	Associate professor Université La Sapienza, Rome	Rapporteur
Mme F. AREFI	Professeur Université Pierre et Marie Curie	
Mme N. DEMONT-CAULET	Maître de Conférences Université Paris Diderot	
Mlle S. GRIVEAU	Maître de Conférences ChimieParisTech	
Mme C. JOLIVALT	Professeur Université Pierre et Marie Curie	

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été effectuée au laboratoire Charles Friedel de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris dans le cadre d'une bourse du Ministère de la Recherche.

Je tiens tout d'abord à remercier Mme le Professeur Claude Jolivald pour m'avoir encadrée durant ma thèse.

Je souhaite adresser mes remerciements à Mme le professeur Anne Vessières-Jaouen, directrice du laboratoire, de m'avoir accueillie au laboratoire Charles Friedel.

Je remercie particulièrement Mme. Patrizia GENTILI, M. Vincent NOEL, Mme. Farnazeh AREFI, Mme. Nathalie DEMONT-CAULET et Mlle Sophie GRIVEAU pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier très sincèrement Dr. Malika Ardhaoui, chercheur visiteur, pour sa grande disponibilité, sa gentillesse, son aide sur le traitement du plasma et ses conseils sur mes travaux et mes carrières durant les deux dernières années. Je ne peux pas terminer ma thèse sans son aide.

Je remercie Jérôme Pulpytel, MCF et sudhir BHATT, Oliver Lesage et Dhia BEN SALEM pour leurs aides précieuses sur le traitement du plasma.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Mme directeur de recherche Michèle Salmain et Nathalie Fischer-Durand pour leur aide durant mes expériences pratiques au sein de laboratoire.

Je remercie également Michel Genet, responsable service XPS chez Université catholique de Louvain (Belgique), pour les analyses XPS.

Merci à Rabia Mazmouz pour son accompagnement tout au long de ces trois années, pour son soutien, pour son encouragement, pour sa gentillesse, pour sa tolérance à mon bavardage, et pour ses conseils sur ma rédaction. Je ne peux pas m'en sortir sans toi.

Je souhaite également remercier Marie-Aude Plamont pour avoir rendu les moments sympathiques durant ces trois ans, pour son enthousiasme et pour ses précieux conseils durant ma rédaction.

Un grand merci à mes collègues Anne Decristoforo, Carine Ganem-Elbaz, Arnaud Hequet, Perrine Zeller, Alexandre Roussis et Guillaume Paci pour avoir rendu agréables et conviviaux les moments passés au laboratoire.

Merci à Houssam Fakhouri pour son aide durant la préparation des documents administratifs à la fin de ma thèse.

Je remercie Stéphane Mann, CR, pour son aide en synthèse organique.

Je remercie M. le professeur Olivier Ploux et Mme. Annick Méjean, MCF, pour avoir rendu une ambiance humaine et agréable pendant ces trois ans.

Merci à mon collègue Simon Léoment de m'accompagner à la fin de ma thèse et m'avoir sauvée plusieurs fois ainsi que pour sa gentillesse, son enthousiasme, son compréhension, ses conseils précieux durant ma rédaction de thèse et surtout son humour.

Je remercie ma copine Xu Jie pour son accompagnement durant la rédaction, c'est toujours plus motivant de travailler en binôme, ainsi que pour tous les repas superbes que nous avons profité ensemble.

Merci à mes parents pour leur confiance et leur soutien.

A Nuria Vázquez Mera et Jaime qui m'ont toujours soutenue et encouragée et m'ont apportée la grande amitié de ma vie.

A tous mes amis.

Liste des abréviations

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6- acide sulphonique
APPJ	jet de plasma à pression hors équilibre atmosphérique
BO _x	bilirubine oxydase
Bu ₄ NBF ₄	tetrabutylammonium tetrafluoroborate
CG	carbone graphite
DET	transfert d'électron direct
DMF	diméthylformamide
DTT	Dithiothreitol
ECS	Electrode au calomel saturé
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
ENH	électrode normale à hydrogène
f. e. m.	force électromotrice
GO _x	glucose oxydase
MCO	Multi-Copper Oxidase (oxydase multicuivre)
MET	transfert d'électron médié
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NTA	nitrilotriacétique
PCT	temps de cycle (plasma cycle time)
Ppy	polypyrrole
PV	plasma voltage (tension de plasma)
SAMs	self-assembled monolayers (couche auto-assemblée)
SPDP	ester 3-(2-pyridyldithio) propionic acid N-hydroxysuccinimide
TBO	(7-amino-8-methyl- phenothiazin-3-ylidene)- dimethyl-ammonium (Toluidine blue O)

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les biopiles à combustible.	4
I.1.1. Introduction.	4
I.1.2. Classification des biopiles	6
<u>I.1.2.1. Les biopiles microbiennes</u>	6
<u>I.1.2.2. Les biopiles à mitochondrie</u>	6
<u>I.1.2.3. Les biopiles enzymatiques</u>	7
<u>I.1.2.4. Les biopiles hybrides</u>	12
I.1.3. Les applications des biopile	13
I.1.4. Conclusion	14
I.2. La biopile à glucose/O₂	16
I.2.1. Introduction.	16
I.2.2. Principe.	17
I.2.3. Quelques exemples des biopiles à glucose/O ₂ implantées.	18
I.3. Biocathode enzymatique	20
I.3.1. Les enzymes employées pour la réduction du dioxygène	20
<u>I.3.1.1. La Laccase (Lc, E.C. 1.10.3.2)</u>	20
<u>I.3.1.2. La Bilirubine Oxydase (E.C. 1.3.3.5)</u>	22
I.3.2. Réduction du dioxygène	22
I.3.3. Méthode d'immobilisation des enzymes	23
<u>I.3.3.1. Adsorption</u>	23
<u>I.3.3.2. Assemblage biomoléculaire</u>	23
<u>I.3.3.3. Encapsulation dans une matrice polymère</u>	24
<u>I.3.3.4. Greffage covalent</u>	24
I.3.4. Mode de transfert d'électron: MET contre DET	26
<u>I.3.4.1. Influence de l'enzymes basées sur le transfert d'électron</u>	26

I.3.4.2. <u>transfert d'électron médié (MET)</u>	28
I.3.4.3. <u>Transfert d'électron direct (DET)</u>	30
I.4. Conclusion, enjeux et description de l'étude	34
Bibliographie.	35

CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE

II.1. Prétraitement de la surface de l'électrode	46
II.2. Matériels et méthodes électrochimiques	46
II.2.1. Matériels électrochimiques.	46
II.2.2. Fonctionnalisation de surface par réduction électrochimique d'un sel de diazonium	
II.2.2.1. <u>Fonctionnalisation de la surface de l'électrode avec des groupements amines</u>	47
II.2.2.2. <u>Fonctionnalisation de la surface de l'électrode avec des groupements carboxyliques</u>	49
II.2.2.3. <u>Fonctionnalisation de la surface d'électrode avec des groupements hydrazides</u>	50
II.3. Fonctionnalisation de surface par traitement du plasma	50
II.3.1. Réacteur plasma utilisé pour le traitement de surface de l'électrode.	52
II.3.2. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode avec les groupements carboxyliques et amines	53
II.4. Immobilisation de la laccase à la surface fonctionnalisée	54
II.4.1. Laccase utilisée pour modifier la surface de l'électrode	54
II.4.2. Mesure de l'activité de la laccase	54
II.4.2.1. <u>Activité de la laccase en solution</u>	56
II.4.2.2. <u>Activité de la laccase à la surface de l'électrode</u>	56
II.4.3. Immobilisation de la laccase à la surface fonctionnalisée.	56
II.4.3.1. <u>Immobilisation de la laccase à la surface de l'électrode fonctionnalisée avec -NH₂</u>	56
II.4.3.2. <u>Immobilisation de la laccase à la surface de l'électrode fonctionnalisée avec -COOH</u>	57

II.4.4. Oxydation de la laccase.	58
II.5. Caractérisation des surfaces fonctionnalisées et de laccase immobilisée	59
II.5.1. Mesure de l'angle de contact	59
II.5.2. Quantification des groupements carboxyliques	61
II.5.3. Quantification des groupements amines	62
<u>II.5.3.1. Détermination colorimétrique de la densité surfacique des groupements amines</u>	<u>62</u>
<u>II.5.3.2. Détermination de la densité surfacique des groupements amines avec une sonde ferrocène aldéhyde</u>	<u>63</u>
II.5.4. La microscopie électronique à balayage	65
II.5.5. La spectroscopie de photoélectrons induits par rayon X (XPS).	65
II.5.6. Voltammétrie cyclique	69
<u>II.5.6.1. Détermination de la surface électroactive de l'électrode graphite</u>	<u>69</u>
<u>II.5.6.2. Etude du courant cathodique de réduction de l'oxygène catalysé par la laccase (et la laccase oxydée) immobilisée à la surface de l'électrode</u>	<u>71</u>
II.5.7. Chronoampérométrie	71
Bibliographie.	73

CHAPITRE III REALISATION D'UNE ELECTRODE

III.1. Réalisation d'une électrode enzymatique fonctionnalisée par réduction électrochimique d'un sel dediazonium.	76
III.1.1. Caractérisation de l'électrode graphite	76
III.1.2. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode par réduction électrochimique de sel de diazonium	80
<u>III.1.2.1. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode avec des groupements amines</u>	<u>80</u>
<u>III.1.2.2. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode avec des groupements carboxyliques par la réduction des 4.carboxybenzène.diazonium</u>	<u>89</u>
<u>III.1.2.3 Fonctionnalisation de la surface d'électrode avec des groupements hydrazide</u>	<u>96</u>

III.1.3. Immobilisation de la laccase.	102
<u>III.1.3.1. Contrôle de la quantité d'enzyme immobilisée par mesure de son activité</u>	
<u>III.1.3.2. Caractérisation par MEB de la surface après immobilisation de l'enzyme</u>	
<u>III.1.3.3. Caractérisation de la laccase à la surface par XPS</u>	110
III.1.4. Etude du courant cathodique de la réduction de l'oxygène catalysé par la laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée	120
<u>III.1.4.1. Laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée avec $-NH_2$</u>	120
<u>III.1.4.2. Laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée avec $-COOH$</u>	122
<u>III.1.4.3. Laccase oxydée immobilisée à la surface fonctionnalisée avec les groupements d'hydrazide</u>	125
<u>III.1.4.4. Effet du pH</u>	129
<u>III.1.4.5. Le courant cathodique sur une électrode tournante</u>	129
III.1.5. Discussion	130
III.1.6. Conclusion	134

III.2. Réalisation d'une électrode enzymatique fonctionnalisée par traitement du plasma

III.2.1. Fonctionnalisation de surface par traitement du plasma à pression atmosphérique	
<u>III.2.1.1. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode par traitement au plasma d'azote.</u>	137
<u>III.2.1.2. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode par traitement au plasma d'air.</u>	140
<u>III.2.1.3. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode par traitement au plasma d'oxygène.</u>	142
<u>III.2.1.4. Discussion</u>	143
III.2.2. Immobilisation de la laccase sur l'électrode fonctionnalisée.	144
<u>III.2.2.1. Immobilisation de la laccase sur l'électrode traitée au plasma d'air et d'oxygène.</u>	144
<u>III.2.2.2. Immobilisation de la laccase sur l'électrode traitée au plasma d'azote.</u>	145
<u>III.2.2.3. Discussion.</u>	146
III.2.3. Etude du courant cathodique de la réduction de l'oxygène catalysé par la laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée.	147
<u>III.2.3.1. Laccase immobilisée à la surface traitée au plasma d'air et d'oxygène.</u>	147
<u>III.2.3.2. Laccase immobilisée à la surface traitée au plasma d'azote.</u>	150

<u>III.2.3.3. Discussion.</u>	150
III.2.4. Conclusion.	152
Bibliographie.	154
CONCLUSION ET PERSPECTIVE.	158

Introduction générale

Les biopiles sont une source d'énergie prometteuse dans le domaine du développement d'énergie alternative et durable. En conséquence, la recherche sur les biopiles a un connu essor surprenant cette dernière décennie. Elles présentent de nombreux avantages par rapport aux piles à combustible conventionnelles et possèdent un large spectre d'applications potentielles telles que l'alimentation des dispositifs portatifs, les dispositifs implantables, les robots, etc.

Parmi les différents types des biopiles existant, les biopiles enzymatiques sont les plus attractives. Les biopiles enzymatiques à glucose/O₂ présentent un intérêt particulier, car elles pourraient alimenter des dispositifs médicaux implantables dans l'avenir. Les principaux challenges pour le développement des biopiles enzymatiques sont la stabilité des enzymes sur les électrodes et la communication électronique entre l'enzyme et l'électrode. De nombreuses méthodes d'immobilisation de l'enzyme ont été développées pour favoriser le transfert d'électron et stabiliser les enzymes. Les nouveaux matériaux sont également intégrés dans la configuration des biopiles enzymatiques afin d'améliorer leurs performances.

Au laboratoire, nous travaillons à développer une biocathode de la biopile enzymatique à glucose/O₂ avec une bonne performance. La laccase a été employée en raison de son haut potentiel thermodynamique et de ses excellents paramètres catalytiques. Elle a été immobilisée à la surface de l'électrode de carbone fonctionnalisée par deux méthodes différentes, avec deux objectifs principaux : i) favoriser le transfert des électrons direct efficace entre l'électrode et l'enzyme, notamment en orientant le site actif d'oxydation de l'enzyme face à l'électrode par des méthodes de couplage appropriées. ii) comparer de façon systématique les performances obtenues pour chaque type de support par immobilisation de l'enzyme soit par physisorption, soit par greffage covalent, ce qui est peu réalisé dans la littérature. La première des méthodes de fonctionnalisation utilisée consiste à réduire sur la surface un sel de diazonium substitué avec les groupements avec lesquels on veut fonctionnaliser l'électrode. Cette méthode a été largement décrite dans la littérature, notamment avec des substituants de type amine ou carboxylique. Dans un premier temps, ce type d'électrode nous a servi de référence et de point de comparaison, puis a été élargi à de nouveaux types de groupements fonctionnels, notamment de type hydrazide. La seconde

méthode de fonctionnalisation des électrodes utilisée dans ce travail utilise un procédé plasma à pression atmosphérique dont l'utilisation pour réaliser des biopiles est originale.

Le premier chapitre contient les données bibliographiques concernant les biopiles, les biopiles enzymatiques à glucose/O₂ dans l'application d'implantation et la configuration de la biocathode enzymatique.

Dans le deuxième chapitre, nous présentons les méthodes expérimentales pour développer une biocathode modifiée avec la laccase et les méthodes de caractérisation de la surface et d'étude des performances de l'électrode.

Le troisième chapitre présente les résultats expérimentaux obtenus. La première partie est dédiée à la fonctionnalisation de la surface par la réduction des sels de diazonium qui ont permis de fonctionnaliser la surface avec des groupements carboxyliques, amines ou hydrazides. La deuxième partie est consacrée à la fonctionnalisation de la surface par traitement du plasma. Différentes paramètres au cours du traitement du plasma ont été étudiés.

Enfin, différentes méthodes de fonctionnalisation de la surface et d'immobilisation de la laccase ont été comparées afin de conclure sur une stratégie optimale afin de développer une biocathode de bonne performance en utilisant la laccase.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les biopiles à combustible

I.1.1. Introduction

La demande mondiale en énergie s'accroît chaque année. Les énergies fossiles alimentent actuellement en grande partie cette demande, pourtant la ressource s'épuise et il existe des problèmes associés tels que la pollution et l'effet de serre. Ces difficultés sont à l'origine d'une nécessité de chercher des sources d'énergie alternative durables. Dans ce contexte, les biopiles semblent une source d'énergie électrique prometteuse [1].

Le concept de biopiles est maintenant connu depuis près d'un siècle après la publication de la première biopile microbienne en 1911 [2]. Les biopiles sont des dispositifs capables de transformer directement l'énergie chimique en énergie électrique par des réactions électrochimiques impliquant des voies biochimiques [3]. Le principe des biopiles est identique à celui des piles à combustible : une réaction d'oxydation a lieu à l'anode et une réaction de réduction se produit à la cathode. La réaction d'oxydation libère des électrons qui se déplacent vers la cathode par un circuit externe et qui seront utilisés par la réaction de réduction. Le circuit est complété par le mouvement des charges de compensation souvent sous forme d'ions positifs à travers l'électrolyte [4]. Les biopiles utilisent des enzymes pour catalyser l'oxydation de réducteur tels que l'hydrogène [5], certains alcools [6], [7], le glucose [8], etc. et la réduction d'un oxydant, par exemple le dioxygène [9]. La figure 1.1 représente le modèle d'une biopile.

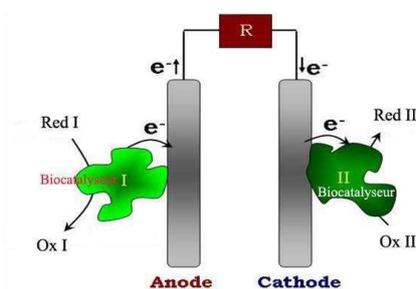


Figure 1.1 Présentation du modèle d'une biopile

Cette dernière décennie, le nombre de publications concernant la recherche sur les biopiles a augmenté progressivement reflétant l'intérêt croissant pour cette recherche (voir Figure 1.2). D'un côté, des problèmes de fourniture et de pollution concernant l'utilisation de combustibles fossiles et les espoirs d'alimenter des petits appareils implantables dans le corps comme les pacemakers poussent cette recherche. D'un autre côté, les techniques développées

dans le domaine des biocapteurs favorisent la recherche dans le domaine des biopiles.

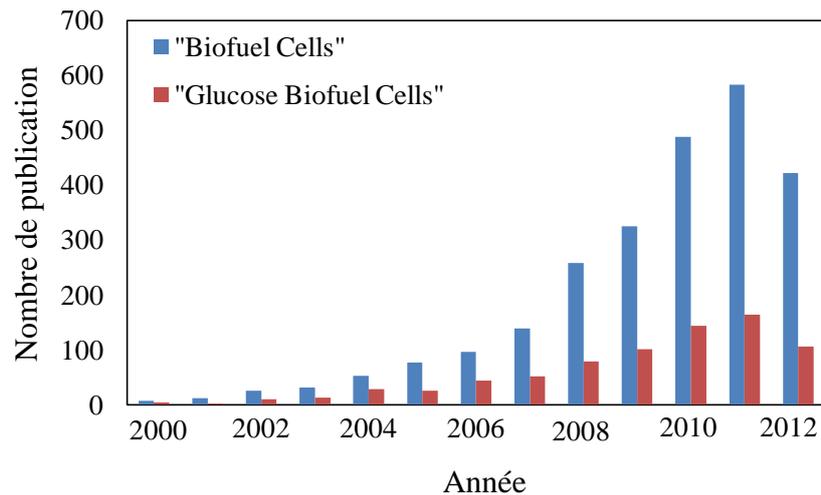


Figure 1.2 Nombre d'articles entre 1998 et 2012 concernant l'étude des biopiles.
Source **Web of Knowledge**, édité en août 2012.

Les biopiles possèdent divers intérêts comparés aux piles à combustible conventionnelles:

- 1) Les piles à combustible conventionnelles requièrent des conditions extrêmes de pH ou une haute température, par exemple une SOFC (pile à oxyde solide) nécessite une température comprise entre 500°C et 1000°C et une PEMFC (piles à combustibles à membrane échangeuse de protons) entre 50°C et 100°C [10]. En revanche, les biopiles utilisant les enzymes comme catalyseur tendent à fonctionner de façon optimale sous des conditions douces (température ambiante et un pH quasi-neutre) [3]. Ainsi, les biopiles sont attractives parce qu'elles fonctionnent à température ambiante ou inférieur à 50°C.
- 2) Les biocatalyseurs des biopiles pourraient offrir un avantage significatif de coût comparé aux catalyseurs des piles conventionnelles à hydrogène ou à alcool qui sont constitués de métaux précieux. Par contre, pour les biopiles, la production des enzymes reste onéreuse mais l'utilisation à grande échelle des biocatalyseurs pourra à terme abaisser le coût de production [3].
- 3) Les piles à combustible conventionnelles fonctionnent avec les combustibles fossiles issues d'énergies fossiles, tandis que les biopiles sont alimentés par des combustibles renouvelables car issues de la biomasse ou le dioxygène [11].
- 4) Les biocatalyseurs permettent l'utilisation des combustibles plus complexes contrairement aux piles à combustible conventionnelles qui consomment typiquement de l'hydrogène et du méthanol comme combustibles, puisque les substrats naturels des biocatalyseurs sont

abondants dans la nature [12].

Néanmoins, actuellement, les biopiles, en termes de densité de puissance, de durée de vie et de stabilité opérationnelle, sont largement moins performantes que les piles à combustibles chimiques [13].

I.1.2. Classification des biopiles

Les biopiles peuvent être classées selon le type de biocatalyseur utilisé :

I.1.2.1. Les biopiles microbiennes

Les biopiles microbiennes utilisent des microorganismes vivants dont les systèmes enzymatiques sont mis à profit pour produire de l'énergie électrique. Les microorganismes utilisés sont soit une espèce pure isolée soit une culture complexe.

Ce sont généralement des systèmes robustes qui peuvent fonctionner sur une large gamme de substrats grâce aux nombreux enzymes d'oxydo-réduction présents dans les microorganismes. Ce type de biopile est généralement capable de décomposer complètement le combustible en dioxyde de carbone et eau avec plusieurs étapes de réaction catalysées par plusieurs enzymes. Elles disposent d'une durée de vie remarquable, parce que les microorganismes sont capables de produire tout au long de leur cycle de vie les enzymes nécessaires au fonctionnement de la biopile. Ces organismes peuvent aussi croître et s'adapter à l'environnement. Les biopiles microbiennes sont également résistantes à l'empoisonnement dû aux systèmes où elles résident [3].

Cependant, ce type de biopile présente en général une faible densité de puissance due à la limitation du transport de matière à travers la membrane des cellules et d'un faible transfert électronique. D'autre part, la biopile n'est pas immédiatement opérationnelle : il existe un temps de latence qui couvre la période de croissance des microorganismes avant qu'elles ne produisent les enzymes d'oxydo-réduction impliquées dans le fonctionnement de la biopile[4].

I.1.2.2. Les biopiles à mitochondrie

Les biopiles à mitochondrie sont une nouvelle classe de biopile qui utilise des organites entiers comme catalyseurs [14]. La mitochondrie est un organite qui contient de nombreux enzymes et cofacteurs qui sont responsables du métabolisme cellulaire. Comme les systèmes biologiques utilisés dans les électrodes des biopiles sont principalement des microbes ou des

enzymes, les biopiles à mitochondrie sont effectivement un groupe intermédiaire.

Ces biopiles sont encore très nouvelles dans le domaine de bioélectrocatalyse, mais elles sont prometteuses. Car elles contiennent toutes les enzymes et les voies nécessaires pour atteindre l'oxydation complète d'un substrat comme un microorganisme entier. En revanche, contrairement à un microorganisme, il n'y a plus de parois cellulaires responsables du ralentissement du transport du substrat et de la charge limitant la performance. Pourtant, la stabilisation des mitochondries est une étape importante parce qu'elles ne sont pas capables de se reproduire [15].

En 2008, l'équipe de Minter a montré que les mitochondries immobilisées pouvaient rester intègres, viables sans larguer leur NAD(P)^+ ou NAD(P)H intériorisé. D'ailleurs, les mitochondries immobilisées à l'électrode du papier du carbone ont manifesté un transfert d'électron direct par contact de la cytochrome c oxydase présente à la surface de la mitochondrie. Ce transfert d'électron direct est avantageux parce qu'il diminue la complexité du système en évitant le recours à des médiateurs externes [14].

Les mitochondries contiennent tous les composants nécessaires, y compris le cycle de l'acide citrique pour catalyser l'oxydation complète du substrat tel que le pyruvate et une large variété d'acides gras [16]. L'équipe de Minter a montré l'oxydation complète du pyruvate à l'anode d'une biopile mitochondrie [14] et a évalué la capacité de cette anode d'oxyder des acides gras [15].

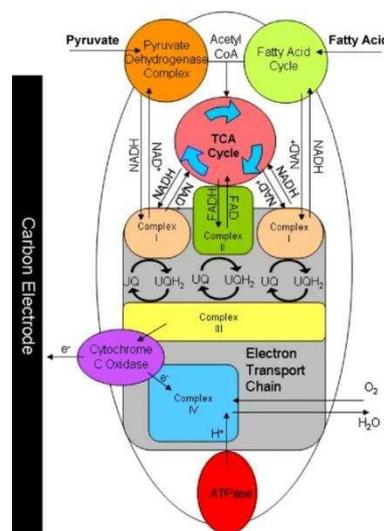


Figure 1.3 Schéma d'une électrode modifiée avec mitochondrie où la réaction chimique se produit avec des acides gras ou pyruvate [15].

I.1.2.3. Les biopiles enzymatiques

Le premier travail concernant une biopile à base d'enzyme a été publié en 1964 et utilisait la

glucose oxydase (GOx) comme catalyseur anodique et du glucose comme oxydant, dit “combustible” [17]. Aujourd’hui, la recherche sur les biopiles enzymatiques est toujours attractive grâce à leur turnover élevé [1].

Les biopiles enzymatiques utilisent des enzymes isolés et purifiés pour catalyser une réaction spécifique. Les enzymes sont immobilisés à la surface des électrodes. Plusieurs enzymes peuvent être combinés, “une cascade d’enzymes” [18], [19], [20], pour oxyder complètement le combustible.

Le temps de réponse de ce type de biopile est plus court que celui des biopiles microbiennes car elle sont directement opérationnelles [4]. Elles offrent généralement des densités de courant (ou puissance) supérieures à celles obtenues dans le cas de biopiles microbiennes limitées par la résistance du transport de matière à travers la membrane cellulaire des bactéries [21].

Dans certains cas, les biopiles requièrent la séparation de l’anode et de la cathode dans des compartiments séparés généralement par une membrane semi-perméable parce que les combustibles nécessaires respectivement pour les réactions à l’anode et la cathode interfèrent très souvent avec la réaction à l’électrode opposée [1]. Par conséquent, la puissance serait nulle ou négligeable. Par contre, dans d’autres cas, la grande sélectivité des enzymes vis-à-vis de leurs substrats évite des réactions non désirées à l’autre électrode. Ainsi la conception de biopiles ne nécessite pas forcément la présence d’une membrane séparatrice entre bioanode et biocathode contrairement aux autres piles à combustibles [12]. L’absence de membrane séparatrice permet la miniaturisation de biopile à micro-échelle.

Un autre facteur qui conditionne les performances de la biopile est l’efficacité du transfert d’électrons à l’électrode. L’optimisation du transfert d’électrons entre des enzymes et l’électrode devient un challenge pour augmenter la puissance de ce type de biopile [1]. Différents types de méthodes d’immobilisation des enzymes à la surface de l’électrode ont été développées [22] et permettent de faciliter considérablement le transfert d’électron entre des enzymes et la surface de l’électrode.

Malheureusement, les enzymes ne sont pas encore compétitifs avec les microbes en terme d’oxydation complète du combustible et de stabilité à long terme [12]. La durée de vie des biopiles enzymatiques est très limitée à cause de la faible stabilité de certaines enzymes [13].

En plus, la performance de la biopile enzymatique est limitée du fait de l’oxydation incomplète des combustibles utilisés, parce que la plupart des biopiles enzymatiques

développées ne se servent que d'une seule enzyme pour l'oxydation du substrat à l'anode. Cela ne conduit qu'à un transfert de 2 électrons [23] et provoque la perte d'une grande partie de l'énergie chimique de la molécule initiale. Pour limiter l'oxydation incomplète du combustible due à l'utilisation d'un seul enzyme et ainsi bénéficier de l'énergie chimique du substrat, différents enzymes peuvent être couplés à l'anode. Par exemple, si une molécule de glucose était oxydée complètement en CO₂ (généralement par O₂ atmosphérique qui joue le rôle de l'oxydant), il y aurait 24 électrons disponibles pour la génération du courant. Ce phénomène de cascade enzymatique permettrait l'accumulation des électrons de chaque réaction simple et augmenterait ainsi la densité de courant total délivrée par la pile [19].

Réactions anodiques

- Combustibles utilisés :

De nombreux réducteurs, dits "combustibles", y compris plusieurs sucres et alcools aliphatiques peuvent être utilisés au niveau de l'anode.

Parmi les sucres, le glucose [24] est le combustible le plus commun pour les biopiles enzymatiques dû à sa grande abondance dans la nature et son rôle essentiel dans le métabolisme humain. D'autres sucres tels que le fructose [25], le lactose et la cellobiose peuvent aussi être utilisés comme combustibles.

Les alcools aliphatiques les plus employés comme combustibles sont le méthanol [19], l'éthanol [26] et le glycérol [18], etc. Le méthanol est identifié comme un des meilleurs combustibles dans les piles à combustible conventionnelles alimentant les dispositifs portatifs. L'éthanol présente des avantages parce qu'il peut être produit par fermentation de la biomasse. Le glycérol est attractif car sa haute densité d'énergie, sa faible pression de vapeur et sa faible toxicité (contraire à méthanol et éthanol). De plus le glycérol est un sous produit peu utilisé de la production de biodiesel.

Il existe d'autres sources de combustibles tels que le pyruvate [27] qui est intéressant en raison de son abondance et son rôle comme intermédiaire métabolique et l'hydrogène [28] qui est un combustible sans carbone et un substrat optimal pour les piles à combustibles conventionnels.

Combustible	Enzyme	Cofacteur	Demi-réaction	Accepteur naturel
	glucose oxydase, EC 1.1.3.4	FAD	glucose \rightarrow glucono-1,5-lactone + 2H ⁺ + 2e ⁻	O ₂
glucose	glucose déshydrogénase, EC 1.1.1.47	NAD	voir ci-dessus	NAD
	glucose déshydrogénase, EC 1.1.5.2	PQQ	voir ci-dessus	quinone
	cellobiose déshydrogénase, EC 1.1.99.18	FAD, hème	voir ci-dessus	accepteur
fructose	fructose déshydrogénase, EC 1.1.99.11	FAD, hème	fructose \rightarrow 5-déshydrofructose + 2H ⁺ + 2e ⁻	accepteur
cellobiose	cellobiose déshydrogénase, EC 1.1.99.18	FAD, hème	cellobiose \rightarrow cellobiono-1,5-lactone + 2H ⁺ + 2e ⁻	accepteur
lactose	cellobiose déshydrogénase, EC 1.1.99.18	FAD, hème	lactose \rightarrow 4-O-(galactopyranosyl)-glucono-1,5-lactone + 2H ⁺ + 2e ⁻	accepteur
	alcool déshydrogénase, EC 1.1.1.1	NAD	alcool \rightarrow aldéhyde + 2H ⁺ + 2e ⁻	NAD
méthanol	aldéhyde déshydrogénase, EC 1.2.1.5	NAD	aldéhyde + H ₂ O \rightarrow acid + 2H ⁺ + 2e ⁻	NAD
	formiate déshydrogénase, EC 1.2.1.2	NAD	formiate \rightarrow CO ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻	NAD
	alcool déshydrogénase, EC 1.1.99.8	PQQ, hème	alcool \rightarrow aldéhyde + 2H ⁺ + 2e ⁻	accepteur
	alcool déshydrogénase, EC 1.1.1.1	NAD	voir ci-dessus	voir ci-dessus
éthanol	aldehyde déshydrogénase, EC 1.2.1.5	NAD	voir ci-dessus	voir ci-dessus
	alcool déshydrogénase, EC 1.1.99.8	PQQ, hème	voir ci-dessus	voir ci-dessus
glycérol	alcool déshydrogénase, -	PQQ, hème	alcool \rightarrow aldéhyde + 2H ⁺ + 2e ⁻	-
	aldéhyde déshydrogénase, -	PQQ, hème	aldéhyde + H ₂ O \rightarrow acide + 2H ⁺ + 2e ⁻	-
	oxalate oxydase, EC 1.2.3.4	FAD, Mn	oxalate \rightarrow 2CO ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻	O ₂
pyruvate	pyruvate déshydrogénase, EC 1.2.4.1	NAD	pyruvate + CoA \rightarrow acétylCoA + 2H ⁺ + 2e ⁻	NAD
hydrogène	Hydrogénase associée à la membrane, -	-	H ₂ \rightarrow 2H ⁺ + 2e ⁻	-

Table 1.1 Combustibles et enzymes utilisés dans les biopiles enzymatiques [12].

- Les enzymes utilisés à l'anode :

Parmi les enzymes capables d'oxyder le glucose, la glucose oxydase (EC 1.1.3.4, GOx) est la plus largement utilisée dans le domaine des biocapteurs électrochimiques et des biopiles. Elle catalyse la conversion du glucose en gluconolactone qui est hydrolysé spontanément en acide gluconique. La présence du dioxygène au cours de la réaction doit être évitée car le

dioxygène est un co-substrat naturel pour la GOx et peut être réduit en peroxyde d'hydrogène qui a des fortes propriétés oxydantes et qui peut être nocif pour les composants biologiques tels que les enzymes [29]. Surtout, dans une pile sans membrane, le dioxygène pourrait être compétitif avec l'électrode et accepter les électrons libérés, entraînant une diminution de la densité de courant anodique.

La cellobiose déshydrogénase (EC 1.1.99.18, CDH) est un enzyme prometteur récemment utilisé pour les applications de biopile [30]. Son substrat naturel est la cellobiose mais il peut également oxyder d'autres disaccharides comme le lactose, ainsi que divers monosaccharides y compris le glucose [31].

D'autres enzymes de la famille des déshydrogénases [19] peuvent également employés pour l'oxydation des combustibles à l'anode. Les hydrogénases associées aux membranes avec un centre catalytique de Ni-Fe et qui présente une grande tolérance au monoxyde de carbone et à l'oxygène sont utilisés pour l'oxydation de l'hydrogène [32].

Réaction cathodique

- Les oxydants utilisés :

L'oxydant le plus largement utilisé dans les biopiles enzymatiques est l'oxygène. C'est un oxydant typique dans les piles à combustible conventionnels où il est utilisé sous forme de gaz pur ou l'air. D'un autre côté, la molécule de dioxygène est un élément essentiel pour la respiration de tous les organismes aérobies et son omniprésence chez l'homme dirige ses utilisations comme oxydant des systèmes des piles à combustibles potentiellement implantables [33], [34].

Il y a très peu de données dans la littérature concernant d'autres oxydants. Le peroxyde d'hydrogène a été rarement utilisé parce qu'il peut être nocif pour les enzymes comme un oxydant très fort [35]. L'hydroperoxyde de cumène a été utilisé comme oxydant dans une biopile basée sur deux solvants non miscibles [36].

Oxydant	Enzyme	Métal/ Cofacteur	Demi-réaction
oxygène	laccase, EC 1.10.3.2	Cu	$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$
	bilirubine oxydase, EC 1.3.3.5	Cu	voir ci-dessus
	cytochrome oxydase, EC 1.9.3.1	Cu, Fe / hème	voir ci-dessus
	cytochrome c, -	Fe / hème	-
peroxyde d'hydrogène	microperoxydase-11, -	Fe / hème	$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O$
	peroxydase du raifort, EC 1.11.1.7	Fe / hème	voir ci-dessus
	(glucose, GOx) microperoxydase-8, -	Fe / hème	voir ci-dessus
hydroperoxyde de cumène	microperoxydase-11, -	Fe / hème	$C_9H_{12}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow C_9H_{12}O + H_2O$

Table 1.2 Oxydants et enzymes utilisés dans les biopiles enzymatiques [12].

- Les enzymes utilisés à la cathode :

Les enzymes typiques capable de catalyser la réduction du dioxygène sont des oxydoréductases qui contiennent des atomes de cuivre (Multi-Copper Oxidase, MCO en anglais) comme centres actifs tels que des laccases [34] et des bilirubines oxydases (BOx) [33]. La laccase présente une activité à un pH légèrement acide et elle est généralement utilisée à pH 5 alors que la BOx a une activité maximale en milieu plus alcalin, ce qui permet son utilisation à pH neutre.

Il existe d'autres types d'enzymes utilisées pour la réduction du dioxygène telle que la cytochrome oxydase (EC 1.9.3.1, COx) et le cytochrome c [37]. Tous les deux contiennent un centre hémique actif. Microperoxydase-11 (MP-11) [35] et horseradish peroxydase (EC 1.11.1.7, HRP) [38] sont des enzymes capables de réduire peroxyde d'hydrogène.

1.1.2.4. Les biopiles hybrides

Afin d'augmenter la stabilité et la performance des biopiles, les biopiles hybrides se sont développées en associant une électrode abiotique, généralement constituée d'un métal et d'une autre électrode possédant un catalyseur enzymatique. Une électrode abiotique à catalyseur métallique apporte une forte stabilité et permet d'atteindre un voltage le plus élevé possible. La performance des biopiles hybrides sont limitées par les électrodes enzymatiques (biotiques). On utilise également souvent une électrode conventionnelle à catalyseur métallique pour compléter le circuit électrique avec l'électrode enzymatique pour étudier les performances de l'électrode enzymatique [39], [40], [41].

En 2011, l'équipe de R. Vazquez-Duhalt [40] a développé une biopile en associant une anode composée de zinc où la réaction d'oxydation du Zn en Zn^{2+} a lieu et une cathode modifiée avec la laccase qui catalyse la réduction de O_2 . Les deux électrodes ont été séparées par une membrane de Nafion. La densité de puissance maximale atteinte est de $1190 \mu W \cdot cm^{-2}$ à 0,41 V, ce qui est la valeur la plus élevée obtenue avec les bio-cathodes modifiées avec des laccases.

I.1.3. Les applications des biopiles

La plupart des études récentes ont été consacrées à des applications spécifiques:

I.1.3.1. Génération de l'énergie et sécurité du transport

Le développement de l'utilisation des biopiles en utilisant des glucides combustibles atténue les problèmes de pollution et d'épuisement d'énergie apportés par l'utilisation du combustible fossile, particulièrement le pétrole. L'utilisation des biopiles pourrait également éviter le risque lié au transport de grande quantité de combustibles volatils et inflammables outre le risque d'incendie suite à un accident de la route [1].

I.1.3.2. La source électronique pour des dispositifs implantables

L'utilisation des biopiles comme la source d'alimenter les dispositifs implantables dans les systèmes vivants est une application potentiel et très active, car l'oxygène et le combustible nécessaire peut être raisonnablement pris dans l'environnement immédiat [1]. Idéalement, une biopile implantée utilise un métabolite biologique comme le combustible par exemple le glucose et le lactate qui sont tout disponibles dans les fluides physiologiques comme le sang. L'utilisation des biopiles sur les applications médicales tels que les biocapteurs pour surveiller les fonctions physiologiques et les systèmes de livraison de médicament est particulièrement proposée [12].

Toutefois, il existe plusieurs problèmes à aborder. Le plus important est que la plupart des électrodes enzymatiques décrites dans la littérature jusqu'au présent ont une durée de vie de l'ordre de semaines, pourtant une longévité de l'ordre d'années serait nécessaire pour les dispositifs in vivo dans les applications pratiques. Malheureusement, la plupart des biopiles décrites aujourd'hui ne pourraient répondre qu'aux demandes des appareils biomédicaux implantés pour les applications à court terme. Bien que les études de stabilisation des enzymes soient effectuées depuis de nombreuses années, l'état de l'art ne peut pas encore répondre aux demandes de stabilité à long terme des biopiles. A l'avenir, une solution à ce problème pourrait être apportée par des techniques d'ingénierie protéique. Le problème de la

biocompatibilité doit être également abordé. Une biopile doit être capable de fonctionner dans l'environnement physiologique sans produire de biofouling à un niveau inacceptable pendant une période prolongée, ce qui conduirait à l'entartrage du dispositif ou le préjudice physiologique aux patients [1], [21].

I.1.3.3. Robots

La conception de robots qui utilisent des biopiles pour générer une source électrique a été décrite et les différents enjeux à surmonter ont été discutés [1], [3]. Un des premiers exemples est le robot chasseur de limaces ("Slugbot" en anglais) [43]. Il est alimenté par une batterie rechargeable et garde les limaces dans un récipient de stockage. Dès que la batterie est épuisée, "Slugbot" retourne à une biopile microbienne qui transfère les limaces stockées et produit de l'énergie par cet effet de "digestion" pour recharger leur batterie.

I.1.3.4. La source électrique des dispositifs portable

Les biopiles ont le potentiel d'alimenter les dispositifs électroniques portatifs. Quoique la densité de puissance qu'ils offrent soit tout de même faible [4], ils sont envisagés pour les dispositifs qui requièrent de faibles puissances et qui peuvent être facilement rechargés [44].

Par exemple, la compagnie SONY® en collaboration avec l'équipe de Kenji Kano a proposé une biopile enzymatique à glucose/O₂, fonctionnant dans une solution concentrée de glucose (0,4 mol·L⁻¹), qui peut délivrer une puissance de 50 mW. Un montage de quatre piles connectées en série est capable d'alimenter un lecteur MP3 [45]. En 2009, la biopile de même principe qui est capable d'alimenter une voiture radiocommandée a été développée [46].



Figure 1.4 Une biopile à glucose/O₂ et le montage de 4 piles qui alimente un lecteur MP3[45].

I.1.4. Conclusion

Les biopiles sont une source d'énergie durable et prometteuse qui possède de nombreux avantages avec diverses applications potentielles telles que l'alimentation des dispositifs portatifs, les dispositifs implantables, les robots, etc. La recherche sur ce domaine s'accroît et

jouit d'un nouvel essor depuis une dizaine d'années.

Dans le développement des biopiles, la puissance, la stabilité opérationnelle et la durée de vie de la biopile sont les enjeux essentiels. Dans ces domaines, les biopiles sont inférieures aux piles à combustibles chimiques. Les connaissances de la biocatalyse, les processus électroniques à la surface et la stabilité du matériel biologique et d'autres matériaux devraient être améliorées pour résoudre tous ces problèmes. Il est également important d'étudier la performance à long terme.

Les biopiles microbiennes disposent d'une durée de vie remarquable mais présentent une faible densité de puissance et une limitation de temps de réponse. Les biopiles enzymatiques ont un temps de réponse plus court et des densités de puissance plus élevées, malgré l'oxydation incomplète des substrats et leur durée de vie est très courte. La recherche antérieure a été ciblée le développement de la chimie des enzymes [3]. Depuis 5 ans, beaucoup d'efforts ont été faits pour développer de nouvelles méthodes et des matériaux permettant l'immobilisation des enzymes sur l'électrode pour maximiser la quantité d'enzymes à l'électrode et optimiser le transfert d'électron entre les enzymes et l'électrode. La recherche s'oriente également vers l'utilisation de matériaux présentant une grande surface spécifique ou nanostructurées, permettant ainsi d'immobiliser une plus grande quantité d'enzymes [4].

Le développement de la recherche des biopiles augmente leur potentiel et elles seront employées communément dans des applications pratiques.

I.2. La biopile à glucose/O₂

I.2.1. Introduction

La plupart des études récentes consacrées aux biopiles sont orientées vers des applications spécifiques telles l'alimentation d'appareils portatifs, de dispositifs médicaux implantables, de livraison de médicaments ou de micro-puces. Les biopiles enzymatiques à glucose/O₂ sans membrane présentent un intérêt particulier, car ils pourraient alimenter les dispositifs médicaux implantés [21], [47]. Les dispositifs médicaux implantés, y compris les pacemakers, stimulateurs nerveux, les pompes de livraison de médicament, moniteurs de glucose et biocapteurs offrent des avantages non négligeables aux patients, par exemple la régulation de la glycémie chez les patients atteints du diabète [12].

Les biopiles glucose/O₂ pourraient fournir une source d'énergie en utilisant les combustibles endogènes présents dans l'hôte [8]. Le glucose et l'oxygène sont en effet naturellement présents dans l'organisme. Pour des hôtes mammifères, le sang est une excellente source de glucose et d'oxygène qui peuvent être utilisés respectivement comme combustible et oxydant par une biopile à glucose/O₂. L'atout des piles enzymatiques à glucose/O₂ est donc de pouvoir utiliser des combustibles renouvelables dans l'organisme mais également leur biocompatibilité avec les systèmes vivants. Pour alimenter un dispositif de manière autonome, la biopile doit pouvoir fournir une puissance minimale de 3μW [48].

Puissance Requise	Application envisagée
10 μW – 100 nW	Électrodes de neuromodulation
100 nW – 10 μW	Appareils de mesures implantables
10 μW – 1000 μW	Délivrance de médicaments
1 mW – 10 mW	1 mW – 10 mW Micro-actionneurs (sphincter urinaire artificiel robotisé) Mesure et délivrance de médicaments (pompe à insuline)
10 mW – 1 W	Suppléances de fonctions vitales défaillantes - Rein artificiel implantable - Myopathies - Assistance vasculaire

Tableau 1.3 : Les différents types de dispositifs médicaux implantables et des puissances requises.

Une autre application des biopiles à glucose/O₂ serait la fabrication des micropiles. Nous pouvons moduler les conditions de fonctionnement de la pile (pH, concentration des

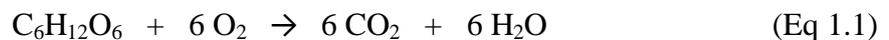
réactifs...). Il est possible d'éliminer du milieu électrolytique toutes les espèces qui peuvent empoisonner et/ou d'inhiber les catalyseurs [21].

Cependant, la puissance et la stabilité de la biopile glucose/O₂ ne sont pas suffisant malgré le développement de la performance des biopiles enzymatiques. Ces limitations sont généralement attribuées à la cathode dans la plupart des cas [49].

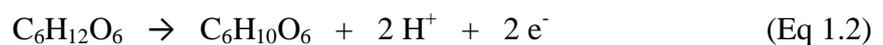
La puissance et la stabilité de la biopile à glucose/O₂ sont souvent perturbées par certaines espèces. Par exemple, l'O₂, un accepteur naturel pour GOx, pourrait être compétitif avec l'électrode pour accepter les électrons libérés par GOx, cela conduit une diminution de la densité du courant anodique [50] et surtout générer du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). La production de peroxyde d'hydrogène n'est pas recommandable in vivo, car il a des fortes propriétés oxydantes et peut être nocif pour les composants biologiques. Ainsi, elle tend à diminuer la stabilité de l'enzyme et donc la durée de vie de la biopile [51]. D'ailleurs, il est possible que certaines espèces endogènes (p.ex. l'urate ou l'ascorbate) ou exogènes (ex. le paracétamol) puissent s'oxyder sur les électrodes et diminuer leur durée de vie [52].

I.2.2. Principe

A l'anode, la GOx est plus communément utilisée dans les anodes de biopiles [53], [54]. Le glucose est électro-oxydé à l'électrode. Son oxydation totale permet théoriquement sa transformation en dioxyde de carbone (CO₂) en libérant 24 électrons:



Pourtant, cette oxydation totale n'a jamais été observée [55], [56]. L'oxydation du glucose conduit généralement à la formation gluconolactone qui est hydrolysé spontanément en acide gluconique [29]. L'oxydation du glucose en gluconolactone se produit selon la réaction suivante :



A la cathode, deux enzymes, en particulier, sont utilisés pour bioélectrocatalyse : la laccase (Lc) et la bilirubin oxydases (BOx). Tous les deux appartiennent à la famille des oxydases multicuivre (MCO an anglais) qui utilise quatre ions cuivriques pour catalyser la réduction du dioxygène en eau à quatre électrons sans libérer H₂O₂ [57]. L'oxygène est réduit en eau à la cathode :



La réaction globale associée au fonctionnement de la pile et donc :



I.2.3. Quelques exemples des biopiles à glucose/O₂ implantées

La recherche sur les biopiles à glucose a considérablement progressée depuis la biopile développée par SONY en 2007. La plupart des nouvelles biopiles à glucose se servent d'une solution avec une concentration en glucose identique à celle du milieu physiologique [58], [59], [60] ($5,5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en moyenne).

Néanmoins, le nombre de biopiles à glucose/O₂ complètement implantées n'est pas encore élevé. Initialement, elle a pu être implantée dans des végétaux: une biopile à glucose/O₂ miniaturisée a été implantée dans un grain de raisin [50]. Cette biopile contient deux électrodes en fibre de carbone de sept μm de diamètre et de deux centimètres de long. Les enzymes (GOx à l'anode et BOx à la cathode respectivement) ont été immobilisés sur les électrodes avec des médiateurs à base d'osmium à l'aide d'hydrogel. Cette pile présente une f.e.m. de 0,8V et délivrait une densité de puissance maximale de $240 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$.

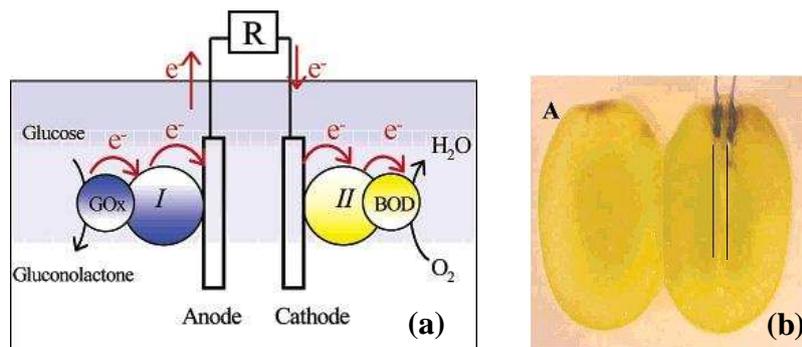


Figure 1.5 (a) Modèle de la biopile à glucose/O₂. I et II sont les polymères redox à base d'osmium utilisés comme médiateurs. (b) Biopile à glucose/O₂ dans un grain de raisin [50].

Un autre exemple de biopile à glucose implantée dans des végétaux est dans un cactus [61]. Cette biopile est basée sur le même système enzymes/médiateurs que celui de biopile implantée dans le grain de raisin. Les courants anodique et cathodique sont augmentés ou diminués suivant qu'une lampe éclairait (ON) ou non (OFF) le cactus, ce qui confirme la génération du courant en présence de glucose et O₂ généré au cours de la photosynthèse induit par l'éclairage et démontre la possibilité de la mesure en continu de O₂ et glucose générés.

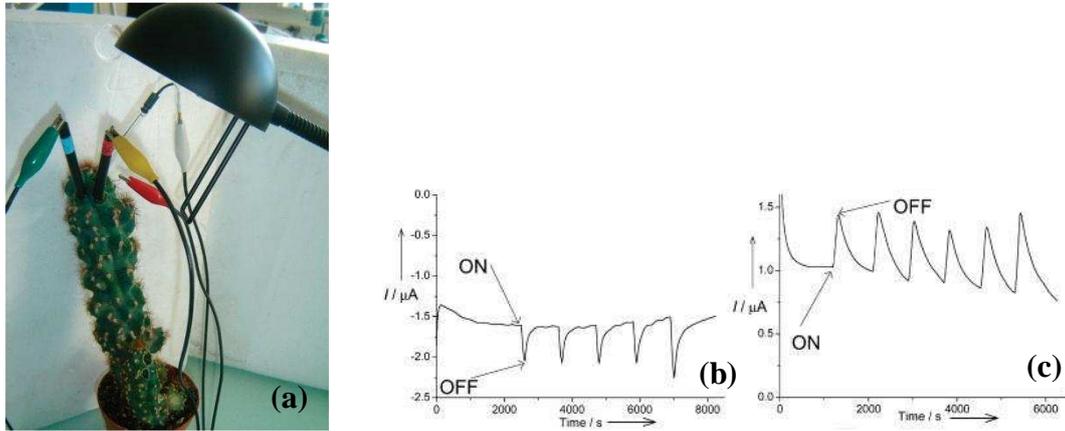


Figure 1.6 Biopile implantée dans un cactus(a). Courant cathodique(b) et courant anodique (c) suivant que la lampe éclairait (ON) ou non (OFF) le cactus [61].

En 2010, une biopile implantée dans un animal a été développée. Cette biopile a été implanté dans un rat. Une membrane semi-perméable permettant le passage du glucose, de l'O₂ et de leurs produits après la réaction a été utilisée pour confiner le collecteur d'électron, l'enzyme et le médiateur redox et éviter la contamination due aux espèces exogènes [62]. Cette biopile implantée présente une différence de potentiel de 0,275V et délivre puissance maximale de 6,5μW.

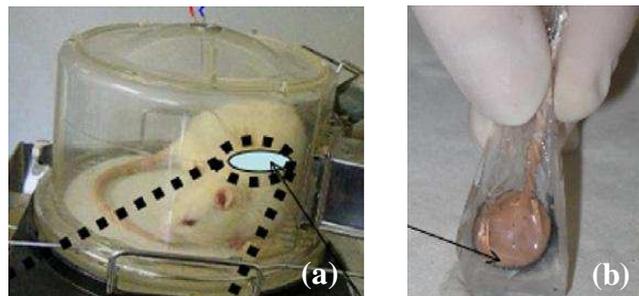


Figure 1.7 Biopile (b) implantée dans un rat (a) [62].

I.3. Biocathode enzymatique

I.3.1. Les enzymes employés pour la réduction du dioxygène

Les oxydases au cuivre bleues tels que la laccase (Lc) et la bilirubine oxydase (BOx) sont les enzymes utilisés à la biocathode pour catalyser la réduction du dioxygène. La laccase et la bilirubine oxydase appartiennent à la famille de l'oxydase multicuivre (MCO en anglais) [57]. Les ions cuivriques de ces enzymes sont classés en trois types en fonction de leurs propriétés optiques et magnétiques. Le centre de cuivre de type 1 (T1) accepte les électrons des substrats qui sont donneur d'électron et les transmet au site de réduction de O₂. Le site de réduction est un cluster trinuécléaire qui contient un ion cuivrique de type 2 (T2) et une paire d'ions cuivriques de type 3 (T3) couplés de manière antiferromagnétique par l'intermédiaire d'un hydroxyde.

Les laccases ont la propriété d'être très actives à faible pH (4~5) et de posséder un potentiel élevé (jusqu'à + 0,57 V/ENH à pH 6 [63]). Elles sont considérées comme un électrocatalyseur efficace pour l'électroréduction du dioxygène [49], [64], [65], [66]. Cependant, elles sont très peu actives en milieu pseudo-physiologique (pH 7,4 et en présence de chlorure [21], [47]). Par contre, les BOx conservent une bonne activité à pH neutre et en présence de chlorure [67].

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

La laccase est une oxydase multicuivre qui catalyse l'oxydation de différents composés phénoliques et d'amines aromatiques à la fois avec la réduction de l'oxygène en eau à quatre électrons [57]. Les oxydases multicuivres sont largement distribuées chez les plantes et les champignons et ont été identifiées chez les bactéries et les insectes [68], [69].



Figure 1.8 T. versicolor, champignon de la pourriture blanche produisant la laccase.

Les substrats des laccases sont généralement des dérivés phénoliques ou arylamines. Etant donné qu'elles ont une faible spécificité de substrat, elles peuvent oxyder une large gamme de

substrats d'origine naturelle ou industrielle. Les laccases fongiques sont commercialisées en tant que molécule du blanchiment dans l'industrie du textile et du colorant. D'autres applications potentielles existent dans l'industrie du papier, la conversion enzymatique de produits chimiques intermédiaires, la transformation oxydative des polluants environnementaux, etc [68].

Les laccases ont un potentiel redox élevé et d'excellents paramètres catalytiques, ce qui est bénéfique pour les technologies de biocapteur et de biopile. Le potentiel redox de site T1 pour différents laccases est compris entre +430 et +790mV par rapport à une électrode normale à hydrogène (NHE) [70], [71]. Le potentiel redox du site de T1 déterminé pour la laccase *T. versicolor* est de près de 780mV par rapport à NHE et celui de T2 site est proche de 400 mV[72].

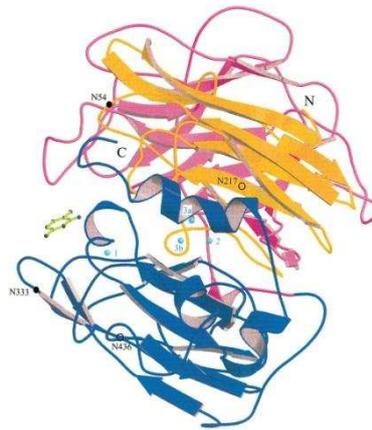


Figure 1.9 Structure de la laccase de *T. versicolor* [68].

La laccase de *T. versicolor* a une dimension approximative de $70 \times 50 \times 50 \text{ \AA}$ [68]. Le site T1 qui est mononucléaire contient un ion cuivre Cu^{I} , sa coordination à une cystéine très proche est responsable d'une bande d'adsorption intense autour de 600nm, ce qui donne sa couleur bleue à l'enzyme. Le cuivre T1 est situé à environ $6,5 \text{ \AA}$ en-dessous de la surface de l'enzyme. Le site T2 qui est aussi mononucléaire a une résonance paramagnétique électronique (RPE) caractéristique. Dans le site T3, une paire d'ions cuivreux T3 fortement couplés de manière antiferromagnétique est ponté par une espèce oxygénée, ce qui rend ces cuivres silencieux en RPE. Les sites T2 et T3 forment un centre de cuivre trinucéaire T2/T3 qui est situé à environ 12 \AA au fond d'une crevasse au sein de l'enzyme. Le cuivre T1 est relié au site trinucéaire T2/T3 par un histidine-cystéine-histidine tri-peptide [68], [73].

1.3.1.2. La Bilirubine Oxydase (E.C. 1.3.3.5)

La bilirubine oxydase (BOx) est un autre enzyme largement utilisé pour l'élaboration de biocathode. Elle attire l'attention car, contrairement à la laccase, elle conserve son activité à pH neutre et montre une grande tolérance envers le chlorure, ce qui confère un avantage dans les applications en milieu physiologique. Pourtant, le potentiel de site T1 de BOx est plus bas que celui de la laccase, ce qui conduit à une diminution de la puissance des biopiles. Cet enzyme a des limitations significatives de faible turnover de l'activité et d'instabilité, ce qui motive la recherche de nouveaux BOx avec des propriétés améliorées [67]. De plus, elle est désactivée par les ions uréate [52].

I.3.2. Réduction du dioxygène

La catalyse implique que le substrat réducteur soit oxydé au site T1, ce qui s'accompagne de la réduction de l'ion Cu^{2+} de ce site T1 en Cu^+ , puis le transfert d'électron de T1 au cluster T2/T3, où a lieu la réduction subséquente d'une molécule de O_2 en H_2O [74].

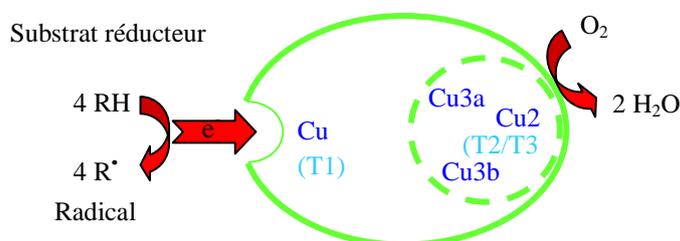


Figure 1.10 Réaction catalysée par la laccase.

Le mécanisme accepté de la laccase propose que les électrons intra-moléculaires sont transférés du groupe donneur à celui d'accepteur par un « hopping mécanisme » [57], [75], [76], [77], [78]. Les ions cuivriques de la protéine offrent les réactions du transfert d'électron par « switch » leurs états d'oxydation entre Cu^{2+} et Cu^+ . La fonction de centre T1 la fonction du site T1 est d'oxyder le substrat réducteur est de fournir le transfert d'électron intramoléculaire à grande distance du substrat ou médiateur à centre de cuivre redox T2/T3 [57], [78], [79]. Quatre électrons sont fournis successivement par le site T1, les trois ions Cu^{2+} du centre trinuéculaire sont ainsi réduits et en Cu^+ [21], [80]. Le centre cuivre T2/T3 joue un rôle crucial dans la réduction de l'oxygène en eau. Le solvant et l'oxygène accèdent au centre T2/T3 à travers deux chenaux [73]. Le centre cuivrique trinuéculaire qui est complètement réduit réagit avec dioxygène et le réduit en eau :



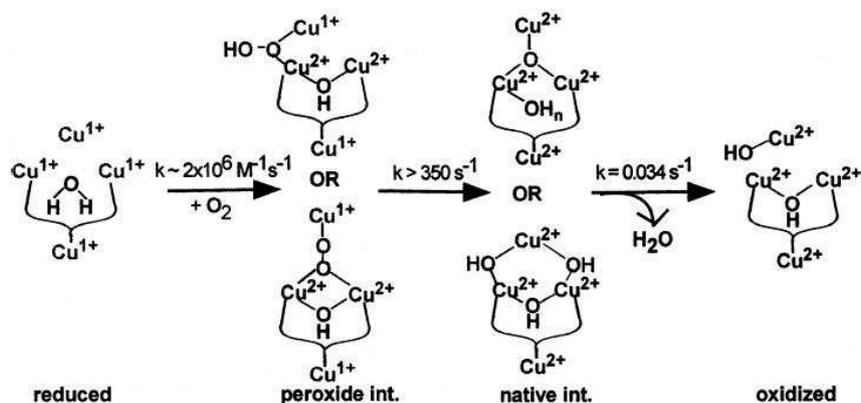


Figure 1.11 Mécanisme de la réduction du dioxygène en eau à 4 électrons par l'oxydase multicuivre [80].

I.3.3. Méthode d'immobilisation des enzymes

L'étape d'immobilisation des enzymes est cruciale pour la fabrication des électrodes enzymatiques. Le choix de la méthode d'immobilisation influe directement sur les performances des électrodes. L'immobilisation doit être réalisée de façon à fixer une quantité maximale d'enzymes et orienter correctement l'enzyme. De plus, l'immobilisation ne doit pas modifier la structure tridimensionnelle des enzymes. Les méthodes principales d'immobilisation des enzymes sont :

I.3.3.1. Adsorption

C'est la technique la plus simple à réaliser. Les enzymes peuvent être déposés à la surface de l'électrode pour un temps défini. Les enzymes sont fixés à la surface de l'électrode par des interactions de type Van der Waals ou hydrophobes. L'avantage de cette méthode est sa grande simplicité, puisqu'elle ne nécessite ni fonctionnalisation de la surface ni modification de l'enzyme. Des électrodes enzymatiques utilisant les laccases ont été développées par l'adsorption des enzymes à la surface du graphite spectrographique [81].

Cependant, cette méthode souffre d'un manque de stabilité dans le temps, puisque les interactions impliquées entre les enzymes et la surface de l'électrode sont faibles [82].

I.3.3.2. Assemblage biomoléculaire

Cette technique consiste à utiliser l'affinité entre différentes molécules. Un exemple de cette méthode est d'immobilisation des enzymes par le biais de complexe métallique : un polymère

(ou une couche auto-assemblée, SAMs en anglais) qui porte un groupe nitrilotriacétique (NTA) peut former un complexe avec des ions tels que le nickel ou le cuivre. Les acides aminés histidines des enzymes jouent alors le rôle de ligands conduisant à leur fixation[83], [84], [85].

I.3.3.3. Encapsulation dans une matrice polymère

Une autre technique consiste à inclure des enzymes dans une matrice de polymère. Les enzymes présentes dans la solution dans laquelle immerge l'électrode au cours de l'électropolymérisation du monomère sont emprisonnées physiquement dans le film de polymère durant sa formation. Les polymères conducteurs tels que polypyrrole (Ppy) [86] et polyaniline [87] sont souvent employés afin de réaliser ce type d'immobilisation.

Il est possible d'immobiliser une quantité importante d'enzyme grâce à cette méthode. De plus, dans cet environnement, l'enzyme se dénature moins rapidement. Pourtant, le film polymère gêne la diffusion de matière, ce qui entraîne une limitation des courants catalytiques.

Des polymères médiateurs sont développés pour favoriser le transfert d'électrons entre le site actif de l'enzyme et l'électrode. Les polymères à base d'osmium sont les plus étudiés. Ils ont l'avantage de posséder une large gamme de potentiel, un taux de transfert d'électrons élevé et une bonne stabilité chimique [82] (voir paragraphe I.3.4.2.)

I.3.3.4. Greffage covalent

Le greffage covalent est la technique d'immobilisation la plus irréversible et stable. Le greffage covalent de l'enzyme sur une surface modifiée avec des groupements fonctionnels fait le plus souvent intervenir une réaction entre un acide et une amine via un agent de couplage de type carbodiimide. L'agent de couplage le plus utilisé est le 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et N-Hydroxysuccinimide (NHS).

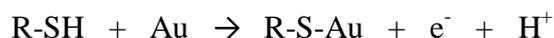
Pourtant, la quantité d'enzyme immobilisé sur l'électrode est limitée [82]. Et la formation de liaisons covalentes risque de conduire à une diminution de la réactivité des enzymes à cause de la mauvaise orientation du site actif ou de la dénaturation en présence de substance chimique. Enfin, le temps de fabrication des électrodes enzymatiques est prolongé à cause du processus d'au moins deux étapes.

La première étape du greffage chimique consiste à modifier la surface de l'électrode avec les groupements fonctionnels, c'est ce que l'on appelle la fonctionnalisation de la surface.

Certaines méthodes courantes sont présentées ci-dessous :

1. SAMs

La chimisorption des monocouches auto-assemblées (self assembled monolayer, SAM en anglais) est une méthode généralement utilisée pour fonctionnaliser la surface de l'électrode d'or. Cette méthode utilise l'affinité des thiols pour l'or, qui forment des SAMs.



Chaque molécule déposée porte un groupement thiol et un groupement fonctionnel aux deux extrémités d'une chaîne alkyle (C-C)_n. Le groupement thiol s'accroche à la surface de l'électrode, le groupement fonctionnel peut ainsi interagir avec des fonctions des enzymes afin de l'immobiliser [88].

2. Réduction électrochimique d'un sel de diazonium

Une méthode employée très souvent pour fonctionnaliser la surface des électrodes de carbone est de réduire les sels de diazonium de façon électrochimique. Elle permet de former une liaison covalente entre la couche fonctionnelle et l'électrode. Ces systèmes possèdent une haute stabilité et une grande variété de groupements fonctionnels.

Cette méthode a été découverte au début des années 90 par Delamar et al. [89] et appliquée aux substrats tels que le carbone, les métaux, les semi-conducteurs. Le mécanisme de cet électrogreffage a été éclairci par Andrieux et Pinson [90] ce mécanisme met en jeu un transfert d'électron vers le sel de diazonium ce qui entraîne le clivage de l'azote lors de la réduction conduisant à la formation d'un radical aryl, puis la formation d'une liaison covalente carbone-carbone ou carbone-métal (voir figure 1.12). Une couche organique liée à la surface de l'électrode de façon covalente se forme lorsque la réduction du diazonium se prolonge.

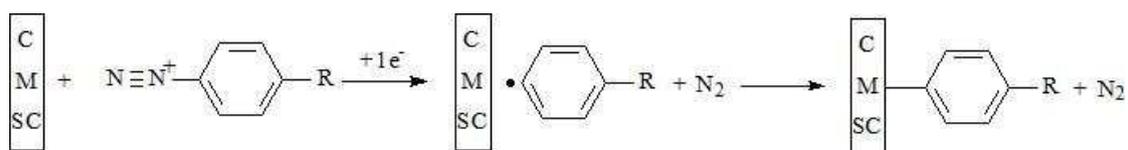


Figure 1.12 : Mécanisme d'électrogreffage.

3. Plasma

Le plasma est une méthode alternative pour fonctionnaliser la surface de l'électrode. Cette technique a l'avantage d'être rapide, stable et non polluante et de posséder un faible coût.

Cette méthode peut également éviter la formation de couches qui provoquent une résistance électrique à la surface de l'électrode. Effectivement, les techniques de plasma sont largement utilisées pour les différentes applications industrielles.

Récemment, le jet de plasma à pression hors équilibre atmosphérique (APPJ) est particulièrement utilisé car il est facile à intégrer dans les chaînes de production existantes et capable de traiter les parties spécifiques d'un substrat de manière sélective. De plus, il peut être employé pour des structures tridimensionnelles sans être limité aux supports plats et fins[92].

Les plasmas contenant l'azote créent généralement une large gamme des fonctions azotées telles que des groupements amines, imines, cyanos, etc. Et les plasmas contenant l'oxygène peut fonctionnaliser la surface d'une électrode de carbone par l'apport de groupements oxygénés tels que l'hydroxyle, carbonyle, carboxyle, etc. La densité des groupements fonctionnels peut être contrôlée à partir des paramètres au cours du traitement de plasma [91].

L'utilisation d'APPJ pour traiter les polymères [93], les métaux [94] et les nanotube de carbone [95] a été rapportée. L'immobilisation de la laccase sur des membranes de polymère traitées par plasma à basse pression a été étudiée et une bonne stabilité pour l'enzyme immobilisé a été démontrée [96], [97].

I.3.4. Mode de transfert des électrons: MET contre DET

Le mode de transfert d'électron pour les électrodes enzymatiques peut être classé en deux catégories : le transfert d'électron médié (MET) et transfert d'électron direct (DET) [3].

I.3.4.1. Influence de l'enzyme sur le transfert d'électrons

Les enzymes redox peuvent être classées en trois groupes en fonction de la localisation du site actif et le mode de transfert d'électron entre les enzymes et les électrodes [3], [98], [82].

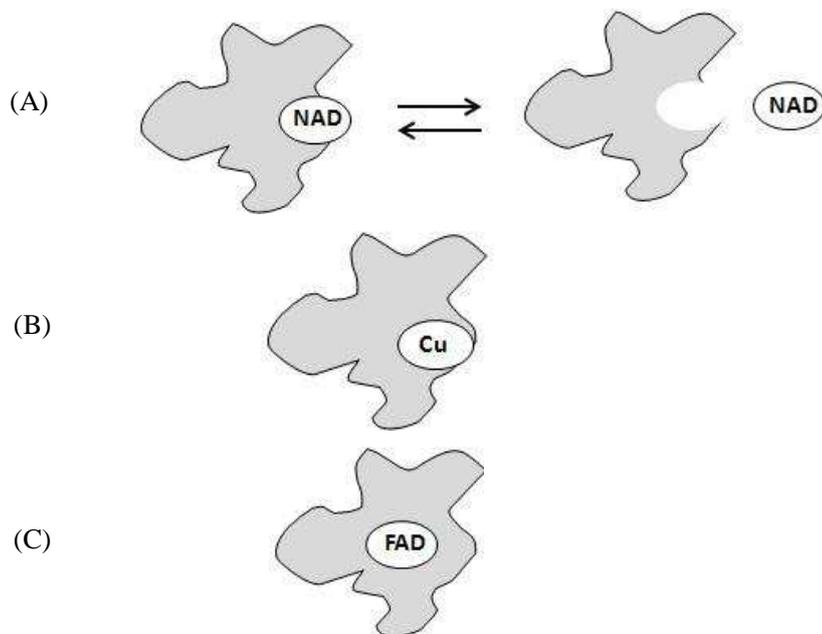


Figure **1.13** Trois groupes d'enzyme basée sur la location du site actif : (A) Site actif diffusif (B) Site actif situé à la périphérie de l'enzyme (C) Site active fortement lié à l'enzyme et enterré profondément [82].

1. Les co-facteurs nicotinamide adénine dinucléotide (NADH/NAD⁺) ou nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH/NADP⁺) sont souvent faiblement liés à l'enzyme [82]. Cette interaction faible permet à ces centres redox de diffuser hors de l'enzyme. Ainsi, ils jouent le rôle du transporteur d'électron, ce qui est une de leur fonction biologique dans la cellule [3]. La glucose déshydrogénase et l'alcool déshydrogénase appartiennent à ce groupe.

2. Enzymes dans lesquels au moins une partie du centre redox est situé à la périphérie de l'enzyme ou à proximité. Ces enzymes sont donc capables de transférer directement des électrons à l'électrode [3]. La peroxydase, la laccase et d'autre oxydase multicuivre entrent dans cette catégorie.

3. Les enzymes avec un centre redox fortement lié à l'enzyme et enfoui à l'intérieure de protéine ou glycoprotéine. Ce type d'enzyme ne communique pas facilement avec les électrodes et ne libère pas le centre actif pour qu'il agisse comme une navette d'électrons [3]. Le glucose oxydase est l'enzyme le plus étudié dans ce groupe.

Les enzymes du premier groupe sont en mesure d'effectuer un transfert d'électron direct (DET) entre le site actif de l'enzyme et la surface de l'électrode. Les enzymes du troisième groupe ne sont pas capables d'effectuer un transfert d'électron direct à cause de la distance large séparant le centre redox et la surface de la protéine. Par contre, la communication électrique entre le site actif de ces enzymes et l'électrode peut être réalisée par l'intermédiaire

d'un médiateur, on parle de transfert d'électron médié (MET). Le médiateur collecte ou apporte des électrons à l'électrode après avoir été oxydé ou réduit, respectivement, par l'enzyme.

Pour les enzymes du deuxième groupe auquel la laccase appartient, le DET entre le site actif et l'électrode est possible. Le challenge principal pour est d'orienter l'enzyme sur l'électrode en gardant son activité optimale pour permettre un transfert d'électron rapide tout en minimisant les limitations diffusionnelles du co-substrat, en l'occurrence le dioxygène dans le cas de la laccase [82].

I.3.4.2. Transfert d'électron médié (MET)

Afin de favoriser le transfert d'électron, certains systèmes engagent plusieurs types des médiateurs. Un médiateur agit comme un relais électronique et donc raccourcit la distance du transfert d'électron.

Les médiateurs circulent en continu entre l'enzyme et l'électrode. Ils peuvent être libres dans la solution mais aussi être immobilisés à la surface de l'électrode [82].

Le potentiel redox du médiateur choisi doit être inférieur à celui de l'enzyme redox à la cathode et inversement à l'anode. En effet le courant, correspondant à une électrode enzymatique combinée avec une électrode de référence, s'accroît suivant l'augmentation de la force motrice du transfert électronique entre l'enzyme et le médiateur [99], [100]. Et la force motrice du transfert électronique entre l'enzyme et le médiateur augmente en fonction de la différence de potentiel entre ces deux espèces redox. En conséquence, une différence de potentiel importante entre l'enzyme et le médiateur favorise la densité du courant. Cependant, plus la différence de potentiel entre les deux espèces redox est importante, plus la force électromotrice de la pile (f.e.m.) diminue. Un bon médiateur résulte d'un compromis entre le courant délivré et la tension d'une biopile pour atteindre une puissance optimale [100].

D'ailleurs, les médiateurs doivent être stables chimiquement sous l'effet des cycles de transfert d'électrons et en fonction du temps. Pour les applications d'implantation, les médiateurs utilisés doivent être surtout non toxiques et biocompatibles [21].

Pour les laccases, le médiateur le plus courant est 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-acide sulphonique) (ABTS).

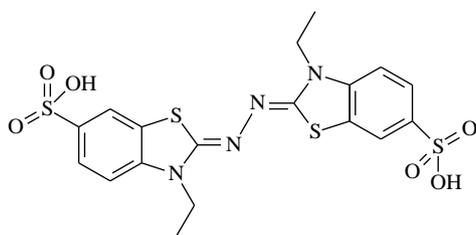


Figure 1.14 Structure d'ABTS

La forme de ABTS^{2-} peut être oxydée en radical $\text{ABTS}^{\cdot-}$ par la laccase. Le couple redox $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\cdot-}$ a un potentiel élevé ($\sim 0,67\text{V}$ vs ENH) [101] mais inférieur à celui de laccase de *T. versicolor*. Cela permet de garder un potentiel le plus élevé possible pour la biocathode et donc une différence de potentiel la plus importante possible pour la biopile. Il peut être immobilisé à la surface de l'électrode dans les matrices de polymère pyrrolique par encapsulation [86], [102].

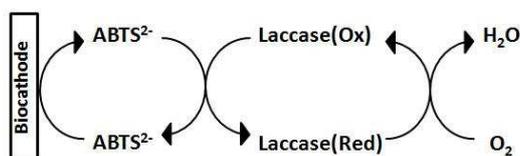


Figure 1.15 Transfert d'électron à l'aide du médiateur ABTS à la biocathode.

Un autre type de médiateur, les polymères ou hydrogel redox à centre d'osmium, a été également développé par certaines équipes [103], [104]. Cette méthode est basée sur une technique initiée par l'équipe de Heller [105]. Les complexes à base d'osmium sont fixés sur des monomères de type poly(vinyle-pyridine) (PVP) [106], [107], poly(N-vinyleimidazole) (PVI) [103],[99], copolymère poly(vinylimidazole)/poly(acrylamide) (PVI/PA) [108] par des espaceurs. Le potentiel redox des centres métalliques est modulé par le changement de la nature de leurs ligands [103], [104].

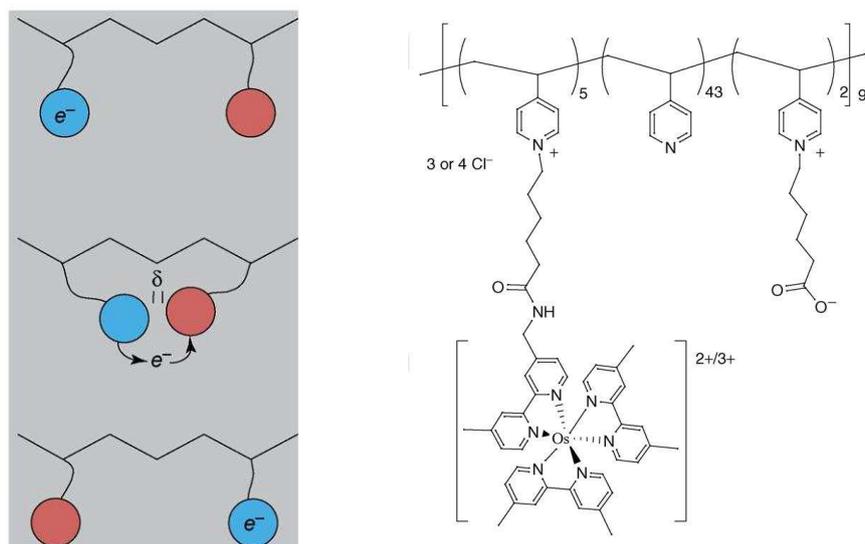


Figure 1.16 (a) Diffusion de l'électron dans l'hydrogel redox par la collision entre les centres redox mobiles qui sont attachés au squelette du polymère. (b) Structure d'un polymère redox à base de PVP qui est destiné à connecter le site actif de la laccase et l'électrode [107].

Les médiateurs peuvent également être immobilisés sur des électrodes préalablement fonctionnalisées (par un film de polymère ou par l'électroréduction d'un sel de diazonium comportant un groupement fonctionnel) par former une liaison covalente [109].

L'inconvénient de l'utilisation d'un médiateur est la diminution la différence du potentiel de la biopile. Il faut choisir un médiateur qui permet un bon compromis entre le courant délivré et la tension d'une biopile afin d'obtenir une puissance optimale. Le risque majeur concernant les médiateurs, est la fuite des médiateurs dans les systèmes. D'ailleurs la toxicité de nombreux médiateurs limite les applications d'implantation des biopiles.

I.3.4.3. Transfert d'électron direct (DET)

La réalisation du transfert d'électron direct entre l'enzyme redox et l'électrode peut éviter d'abaisser la tension d'une biopile et favorise de biocompatibilité des biopiles pour les applications in vivo en absence des médiateurs généralement toxiques.

La première publication sur DET pour une enzyme redox concernait la laccase de *Polyporus versicolor*. Dans ce travail, une électroréduction du dioxygène sans médiateur catalysée par la laccase adsorbée à la cathode a été montrée. Depuis 1978, plusieurs publications ont rapporté des phénomènes de DET par la laccase de *P. versicolor*. En 2005, l'équipe de Shleev a rapporté des phénomènes de DET pour différents types de laccases et le mécanisme de DET à

la surface d'électrode [34]. Ils ont également étudié le DET pour les enzymes à base de cuivre [110].

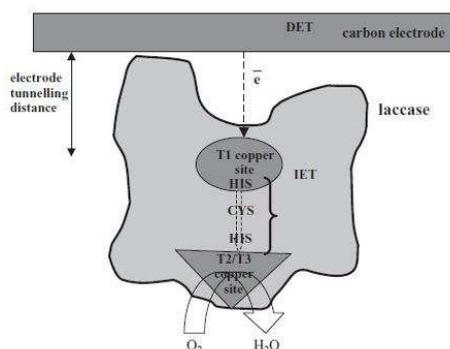


Figure 1.17 Un mécanisme possible de DET pour la laccase adsorbée sur une électrode de carbone [34].

Le mécanisme proposé l'électroréduction du dioxygène au niveau de l'électrode de carbone modifiée avec la laccase est le suivant :

Les électrons sont transférés de l'électrode au site T1 de l'enzyme adsorbée. La distance la plus courte entre la surface de l'enzyme et le site T1 est d'environ 6,5 Å [73]. Et si la laccase est orientée correctement sur la surface, une telle distance permettrait un effet tunnel efficace [111].

L'électron est ensuite transféré par un mécanisme de transfert d'électron interne du site T1 au cluster T2/T3 (la distance est 12~13Å) où la molécule d'oxygène est réduite en eau. Le processus du transfert d'électron entre le carbone de l'électrode et le cuivre au site T1 est probablement indépendant de l'état redox du cluster T2/T3. Ce mécanisme peut également être proposé à toutes les "bleu" oxydases multicuivres sur l'électrode de carbone [34].

Le défi principal pour le DET est actuellement d'orienter l'enzyme sur l'électrode pour favoriser le transfert DET entre l'enzyme et la surface de l'électrode. Des méthodes différentes ont été développées pour l'immobilisation de la laccase avec une orientation correcte.

En 2007, Blanford et al. [112] ont effectué des expériences avec une orientation de la laccase à la surface de l'électrode graphite modifiée avec de l'anthracène qui est une espèce analogue au substrat de la laccase.

La surface du graphite pyrolytique a été modifiée avec de l'anthracène par la réduction d'anthracène-2-diazonium. L'immobilisation de la laccase orientée est réalisée par l'interaction affaiblissante de l'anthracène à la surface de l'électrode avec la poche hydrophobe sur l'enzyme pointant vers le site T1. Cependant, il n'y a pas de liaison covalente impliquée entre

l'électrode modifiée et l'enzyme.

Vaz-Dominguez et al. [113] ont immobilisé la laccase de *T. hirsuta* par une liaison covalente stable à la surface de l'électrode graphite modifiée avec des dérivés de phényle avec une orientation adéquate pour le DET. La densité du courant allant jusqu'à $0,5\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour la réduction électrocatalytique du dioxygène a été obtenue en absence de médiateur.

Ils ont modifiée la surface de l'électrode avec une monocouche de groupements aminophényle ou 2-aminophénol par réduction des diazoniums. La laccase a ensuite été immobilisée à l'électrode modifiée de façon covalente à l'aide de 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyle) carbodiimide (EDC) et N-Hydroxysuccinimide (NHS) qui active le couplage amide.

Probablement, ces dérivés d'aryle qui portent des groupements fonctionnels interagissent favorablement avec la région de la laccase autour du site T1, ce qui conduit à une orientation préférentielle de la laccase avec le site T1 en face de l'électrode ce qui permet un DET entre ce site de cuivre de la laccase et l'électrode. Une de ces interactions favorables peut être l'interaction électrostatique entre les groupements amines chargés positivement de la monocouche sur l'électrode et la région chargée négativement de la surface de l'enzyme. Deux autres types d'interactions sont possibles : i) la liaison d'hydrogène entre les résidus de l'acide aspartique et d'histidine conservés au site T1 de la laccase et les groupements fonctionnels de l'électrode, ii) l'interaction hydrophobe entre les cycles aromatiques de la monocouche de l'électrode et certains acides aminés qui forment la cavité du site T1.

L'équipe de Vazquez-Duhalt [40] a orienté la laccase à la surface de l'électrode du graphite modifiée avec la fonction d'acide benzoïque, un DET entre le site T1 de laccase et la surface de l'électrode a été réalisé.

Ils ont modifié la surface de l'électrode graphite avec l'acide 4-(2-aminoéthyl) benzoïque (AEBA) qui ressemble au substrat de la laccase. La fonction d'acide benzoïque de l'AEBA peut interagir avec le site T1 de la laccase comme un ligand avec une affinité importante (constante d'association $K_a = 6,6 \times 10^{-6}\text{M}$). La laccase a été ensuite immobilisée à la surface par une liaison covalente activée par EDC.

Une biopile semi-enzymatique a ensuite été constituée avec une anode de zinc et une biocathode sur laquelle la laccase a été immobilisée. Elle présente une densité de courant de $2977\ \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ et délivre une densité de puissance de $1190\ \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0,41 V.

Les exemples présentés ci-dessus concernent tous l'immobilisation de la laccase sur une électrode de carbone. Un exemple d'orientation de la laccase sur l'électrode d'or est le travail de Pita et al. [114].

Ils ont modifié la surface de l'électrode d'or avec une monocouche mixte de p-amino-phényle et de 6-mercapto-1-hexanol. Les sucres existant à la surface de l'enzyme ont été oxydés par NaIO_4 . Les groupements aldéhydes ainsi formés sur l'enzyme ont ensuite réagi avec les groupements d'aminophényle à la surface de l'électrode, formant une base de Schiff. Cela conduit à l'orientation de la laccase parce que la plupart des résidus de sucre ont situées près de site T1. Dans une seconde étape, des liaisons amides ont été formées entre les groupements carboxyliques présents à la surface de la laccase et les groupements amines à la surface de l'électrode à l'aide d'EDC et NHS. L'immobilisation de la laccase est donc orientée et stable avec cette stratégie.

L'immobilisation de la laccase à la surface d'or est moins efficace par rapport à la surface de carbone. En effet l'adsorption physique sur l'or provoque une forte dénaturation de l'enzyme, alors que l'utilisation de la monocouche auto-assemblée (SAMs) conduit à l'électroréduction du dioxygène en H_2O_2 [115], [116]. Les densités du courant catalytique obtenus sur l'électrode d'or, même en utilisant des médiateurs, sont beaucoup plus faibles par rapport aux électrodes en carbone modifiées avec la laccase à base de DET [117], [118]. De plus, la plupart des électrodes d'or utilisent les laccases de faible potentiel [116], [77] ou la bioélectrocatalyse est observé à des potentiels beaucoup plus faibles que prévu pour les enzymes de haut potentiel [116], [119].

Sur cette électrode d'or modifiée avec la laccase oxydée, le courant catalytique correspondant à la réduction du dioxygène commence à 650 mV (vs Ag/AgCl), ce qui correspond aux potentiels sur l'électrode du graphite modifiée avec la laccase [112], [113].

La densité du courant jusqu'à $40\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ a été obtenue par la réduction électrocatalytique du dioxygène en absence de médiateur. Cette stratégie est un grand progrès dans le développement de l'électrode d'or modifiée avec la laccase pour la réduction bioélectrocatalytique de O_2 [114].

I.4. Conclusion, enjeux et description de l'étude

La biopile est une source électrique ayant de grands potentiels. Parmi les différents types des biopiles, les biopiles enzymatiques, surtout celles à glucose/O₂, attirent de plus en plus l'attention en raison de leurs taux biocatalytiques bien élevés et les applications in vivo. Les challenges principaux pour le développement des biopiles enzymatiques sont la stabilité des enzymes sur les électrodes à long terme et l'efficacité du transfert d'électron entre l'enzyme et l'électrode, ce qui influence la puissance des biopiles.

Une grande partie de la recherche se focalise sur la réalisation d'une communication électronique efficace entre l'enzyme et l'électrode. Pour cela, beaucoup de nouveaux méthodes et matériaux pour l'immobilisation de l'enzyme sont développés. Et les nanomatériaux commencent à être intégrés dans la structure de l'électrode enzymatique. L'ingénierie des protéines est également une stratégie favorable.

Cette thèse se concentre sur le développement de la biocathode enzymatique en carbone modifiée avec la laccase qui est capable de catalyser la réduction du dioxygène. L'objectif est d'optimiser la performance de cette biocathode en augmentant la quantité de la laccase immobilisée et favoriser le transfert d'électron entre la laccase et l'électrode.

La laccase a été immobilisée de façon covalente à la surface de l'électrode fonctionnalisée avec des méthodes différentes : la réduction du diazonium et le plasma à pression atmosphère. Les différentes méthodes de fonctionnalisation et immobilisation ont été étudiées en mesurant le courant catalytique de la réduction du dioxygène et l'activité de la laccase pour atteindre une quantité maximale de la laccase immobilisée.

L'oxydation des sucres à la surface de la laccase a été effectuée pour permettre l'orientation de la laccase à la surface de l'électrode afin de favoriser le transfert d'électron entre l'enzyme et l'électrode.

Bibliographie

1. Davis, F., and Higson, S. P. J. (2007) Biofuel cells—Recent advances and applications, *Biosensors and Bioelectronics* 22, 1224–1235.
2. Potter, M. C. (1911) Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds, *Proc. R. Soc. Lond. B* 84, 260–276.
3. Bullen, R. A., Arnot, T. C., Lakeman, J. B., and Walsh, F. C. (2006) Biofuel cells and their development, *Biosensors and Bioelectronics* 21, 2015–2045.
4. Osman, M. H., Shah, A. A., and Walsh, F. C. (2011) Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells, *Biosensors and Bioelectronics* 26, 3087–3102.
5. Lojou, E., and Bianco, P. (2006) Layer-by-Layer Assemblies of Montmorillonite and Bacterial Cytochromes for Bioelectrocatalytic Devices, *Electroanalysis* 18, 2426–2434.
6. Aquino Neto, S., Forti, J. C., Zucolotto, V., Ciancaglini, P., and de Andrade, A. R. (2011) Development of nanostructured bioanodes containing dendrimers and dehydrogenases enzymes for application in ethanol biofuel cells, *Biosensors and Bioelectronics* 26, 2922–2926.
7. Chakraborty, D., and Barton, S. C. (2011) Influence of Mediator Redox Potential on Fuel Sensitivity of Mediated Laccase Oxygen Reduction Electrodes, *J. Electrochem. Soc.* 158, B440–B447.
8. Kim, J., Parkey, J., Rhodes, C., and Gonzalez-Martin, A. (2009) Development of a biofuel cell using glucose-oxidase- and bilirubin-oxidase-based electrodes, *Journal of Solid State Electrochemistry* 13, 1043–1050.
9. Zheng, W., Zhao, H. Y., Zhang, J. X., Zhou, H. M., Xu, X. X., Zheng, Y. F., Wang, Y. B., Cheng, Y., and Jang, B. Z. (2010) A glucose/O₂ biofuel cell base on nanographene platelet-modified electrodes, *Electrochemistry Communications* 12, 869–871.
10. Larminie, J., and Dicks, A. (2003) *Fuel Cell Systems Explained*. Wiley.
11. Lovley, D. R. (2006) Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches, *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 327–332.
12. Ivanov, I., Vidaković-Koch, T., and Sundmacher, K. (2010) Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells: Experiments and Modeling, *Energies* 3, 803–846.
13. Kim, J., Jia, H., and Wang, P. (2006) Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells, *Biotechnology Advances* 24, 296–308.

14. Arechederra, R., and Minteer, S. D. (2008) Organelle-based biofuel cells: Immobilized mitochondria on carbon paper electrodes, *Electrochimica Acta* 53, 6698–6703.
15. Arechederra, R. L., Boehm, K., and Minteer, S. D. (2009) Mitochondrial bioelectrocatalysis for biofuel cell applications, *Electrochimica Acta* 54, 7268–7273.
16. Robinson, J. B., and Srere, P. A. (1985) Organization of Krebs tricarboxylic acid cycle enzymes in mitochondria., *J. Biol. Chem.* 260, 10800–10805.
17. Yahiro, A. T., Lee, S. M., and Kimble, D. O. (1964) Bioelectrochemistry: I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Biophysical Subjects* 88, 375–383.
18. Arechederra, R. L., and Minteer, S. D. (2009) Complete Oxidation of Glycerol in an Enzymatic Biofuel Cell, *Fuel Cells* 9, 63–69.
19. Addo, P. K., Arechederra, R. L., and Minteer, S. D. (2010) Evaluating Enzyme Cascades for Methanol/Air Biofuel Cells Based on NAD⁺-Dependent Enzymes, *Electroanalysis* 22, 807–812.
20. Zebda, A., Innocent, C., Renaud, L., Cretin, M., Pichot, F., Ferrigno, R., and Tingry, S. (2011) Enzyme-Based Microfluidic Biofuel Cell to Generate Micropower, in *Biofuel's Engineering Process Technology* (Dos Santos Bernardes, M. A., Ed.). InTech.
21. Calabrese Barton, S., Gallaway, J., and Atanassov, P. (2004) Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices, *Chem. Rev.* 104, 4867–4886.
22. Davis, F., and Higson, S. P. J. (2005) Structured thin films as functional components within biosensors, *Biosensors and Bioelectronics* 21, 1–20.
23. Cooney, M. J., Svoboda, V., Lau, C., Martin, G., and Minteer, S. D. (2008) Enzyme catalysed biofuel cells, *Energy & Environmental Science* 1, 320.
24. Coman, V., Ludwig, R., Harreither, W., Haltrich, D., Gorton, L., Ruzgas, T., and Shleev, S. (2010) A Direct Electron Transfer-Based Glucose/Oxygen Biofuel Cell Operating in Human Serum, *Fuel Cells* 10, 9–16.
25. Kamitaka, Y., Tsujimura, S., Setoyama, N., Kajino, T., and Kano, K. (2007) Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis, *Physical Chemistry Chemical Physics* 9, 1793.
26. Deng, L., Shang, L., Wen, D., Zhai, J., and Dong, S. (2010) A membraneless biofuel cell powered by ethanol and alcoholic beverage, *Biosensors and Bioelectronics* 26, 70–73.
27. Sokic-Lazic, D., and Minteer, S. D. (2009) Pyruvate/Air Enzymatic Biofuel Cell Capable of Complete Oxidation, *Electrochem. Solid-State Lett.* 12, F26–F28.
28. Tsujimura, S., Fujita, M., Tatsumi, H., Kano, K., and Ikeda, T. (2001)

- Bioelectrocatalysis-based dihydrogen/dioxygen fuel cell operating at physiological pH, *Physical Chemistry Chemical Physics* 3, 1331–1335.
29. Wilson, R., and Turner, A. P. F. (1992) Glucose oxidase: an ideal enzyme, *Biosensors and Bioelectronics* 7, 165–185.
 30. Tasca, F., Gorton, L., Harreither, W., Haltrich, D., Ludwig, R., and Nöll, G. (2008) Highly Efficient and Versatile Anodes for Biofuel Cells Based on Cellobiose Dehydrogenase from *Myriococcum thermophilum*, *J. Phys. Chem. C* 112, 13668–13673.
 31. Coman, V., Vaz-Domínguez, C., Ludwig, R., Harreither, W., Haltrich, D., De Lacey, A. L., Ruzgas, T., Gorton, L., and Shleev, S. (2008) A membrane-, mediator-, cofactor-less glucose/oxygen biofuel cell, *Physical Chemistry Chemical Physics* 10, 6093.
 32. Vincent, K. A., Cracknell, J. A., Lenz, O., Zebger, I., Friedrich, B., and Armstrong, F. A. (2005) Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels, *PNAS* 102, 16951–16954.
 33. Ramírez, P., Mano, N., Andreu, R., Ruzgas, T., Heller, A., Gorton, L., and Shleev, S. (2008) Direct electron transfer from graphite and functionalized gold electrodes to T1 and T2/T3 copper centers of bilirubin oxidase, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1777, 1364–1369.
 34. Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T., and Gorton, L. (2005) Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes, *Bioelectrochemistry* 67, 115–124.
 35. Willner, I., Katz, E., Patolsky, F., and Bückmann, A. F. (1998) Biofuel cell based on glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 1817–1822.
 36. Katz, E., Filanovsky, B., and Willner, I. (1999) A biofuel cell based on two immiscible solvents and glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes, *New Journal of Chemistry* 23, 481–487.
 37. Katz, E., Willner, I., and Kotlyar, A. B. (1999) A non-compartmentalized glucose | O₂ biofuel cell by bioengineered electrode surfaces, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 479, 64–68.
 38. Pizzariello, A., Stred'ansky, M., and Miertuš, S. (2002) A glucose/hydrogen peroxide biofuel cell that uses oxidase and peroxidase as catalysts by composite bulk-modified bioelectrodes based on a solid binding matrix, *Bioelectrochemistry* 56, 99–105.
 39. Nogala, W., Celebanska, A., Wittstock, G., and Opallo, M. (2010) Bioelectrocatalytic Carbon Ceramic Gas Electrode for Reduction of Dioxygen and Its Application in a Zinc–

- Dioxygen Cell, *Fuel Cells* 10, 1157–1163.
40. Martinez-Ortiz, J., Flores, R., and Vazquez-Duhalt, R. (2011) Molecular design of laccase cathode for direct electron transfer in a biofuel cell, *Biosensors and Bioelectronics* 26, 2626–2631.
 41. Jensen, U. B., Lörcher, S., Vagin, M., Chevallier, J., Shipovskov, S., Koroleva, O., Besenbacher, F., and Ferapontova, E. E. (2012) A 1.76 V hybrid Zn-O₂ biofuel cell with a fungal laccase-carbon cloth biocathode, *Electrochimica Acta* 62, 218–226.
 42. Logan, B. E. (2005) Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation, *Water Sci. Technol.* 52, 31–37.
 43. Kelly, I., and Melhuish, C. (2001) SlugBot: A Robot Predator, in 6th European Conference on Artificial Life (ECAL).
 44. Gellett, W., Kesmez, M., Schumacher, J., Akers, N., and Minteer, S. D. (2010) Biofuel Cells for Portable Power, *Electroanalysis* 22, 727–731.
 45. SONY., *Sony Develops “Bio Battery” Generating Electricity from Sugar.*
 46. Sakai, H., Nakagawa, T., Tokita, Y., Hatazawa, T., Ikeda, T., Tsujimura, S., and Kano, K. (2009) A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions, *Energy & Environmental Science* 2, 133.
 47. Heller, A. (2004) Miniature biofuel cells, *Physical Chemistry Chemical Physics* 6, 209.
 48. Heller, A. (2005) Integrated medical feedback systems for drug delivery, *AIChE Journal* 51, 1054–1066.
 49. Gallaway, J., Wheeldon, I., Rincon, R., Atanassov, P., Banta, S., and Barton, S. C. (2008) Oxygen-reducing enzyme cathodes produced from SLAC, a small laccase from *Streptomyces coelicolor*, *Biosensors and Bioelectronics* 23, 1229–1235.
 50. Mano, N., Mao, F., and Heller, A. (2003) Characteristics of a Miniature Compartmentless Glucose–O₂ Biofuel Cell and Its Operation in a Living Plant, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 6588–6594.
 51. Binyamin, G., and Heller, A. (1999) Stabilization of Wired Glucose Oxidase Anodes Rotating at 1000 rpm at 37°C, *J. Electrochem. Soc.* 146, 2965–2967.
 52. Kang, C., Shin, H., Zhang, Y., and Heller, A. (2004) Deactivation of bilirubin oxidase by a product of the reaction of urate and O₂, *Bioelectrochemistry* 65, 83–88.
 53. Gao, F., Courjean, O., and Mano, N. (2009) An improved glucose/O₂ membrane-less biofuel cell through glucose oxidase purification, *Biosensors and Bioelectronics* 25, 356–361.
 54. Mano, N., Mao, F., and Heller, A. (2005) On the parameters affecting the characteristics

- of the “wired” glucose oxidase anode, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 574, 347–357.
55. Kerzenmacher, S., Ducreé, J., Zengerle, R., and von Stetten, F. (2008) An abiotically catalyzed glucose fuel cell for powering medical implants: Reconstructed manufacturing protocol and analysis of performance, *Journal of Power Sources* 182, 66–75.
 56. Kerzenmacher, S., Ducreé, J., Zengerle, R., and von Stetten, F. (2008) Energy harvesting by implantable abiotically catalyzed glucose fuel cells, *Journal of Power Sources* 182, 1–17.
 57. Solomon, E. I., Sundaram, U. M., and Machonkin, T. E. (1996) Multicopper Oxidases and Oxygenases, *Chem. Rev.* 96, 2563–2606.
 58. Okuda-Shimazaki, J., Kakehi, N., Yamazaki, T., Tomiyama, M., and Sode, K. (2008) Biofuel cell system employing thermostable glucose dehydrogenase, *Biotechnol. Lett.* 30, 1753–1758.
 59. Coman, V., Ludwig, R., Harreither, W., Haltrich, D., Gorton, L., Ruzgas, T., and Shleev, S. (2010) A Direct Electron Transfer-Based Glucose/Oxygen Biofuel Cell Operating in Human Serum, *Fuel Cells* 10, 9–16.
 60. Zebda, A., Gondran, C., Goff, A. L., Holzinger, M., Cinquin, P., and Cosnier, S. (2011) Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes, *Nature Communications* 2, 370.
 61. Flexer, V., and Mano, N. (2010) From Dynamic Measurements of Photosynthesis in a Living Plant to Sunlight Transformation into Electricity, *Anal. Chem.* 82, 1444–1449.
 62. Cinquin, P., Gondran, C., Giroud, F., Mazabrard, S., Pellissier, A., Boucher, F., Alcaraz, J.-P., Gorgy, K., Lenouvel, F., Mathé, S., Porcu, P., and Cosnier, S. (2010) A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats, *PLoS ONE* 5, e10476.
 63. Kano, K. (2002) Redox Potentials of Proteins and Other Compounds of Bioelectrochemical Interest in Aqueous Solutions, *Review of Polarography* 48, 29–46.
 64. Mano, N. (2008) A 280 $\mu\text{W cm}^{-2}$ biofuel cell operating at low glucose concentration, *Chemical Communications* 2221.
 65. Hussein, L., Rubenwolf, S., von Stetten, F., Urban, G., Zengerle, R., Krueger, M., and Kerzenmacher, S. (2011) A highly efficient buckypaper-based electrode material for mediatorless laccase-catalyzed dioxygen reduction, *Biosensors and Bioelectronics* 26, 4133–4138.
 66. Rincón, R. A., Lau, C., Luckarift, H. R., Garcia, K. E., Adkins, E., Johnson, G. R., and Atanassov, P. (2011) Enzymatic fuel cells: Integrating flow-through anode and air-

- breathing cathode into a membrane-less biofuel cell design, *Biosensors and Bioelectronics* 27, 132–136.
67. Durand, F., Kjaergaard, C. H., Suraniti, E., Gounel, S., Hadt, R. G., Solomon, E. I., and Mano, N. (2012) Bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*: A promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells, *Biosensors and Bioelectronics* 35, 140–146.
 68. Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., and Mougin, C. (2002) Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics^{†,‡}, *Biochemistry* 41, 7325–7333.
 69. Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T., and Gorton, L. (2005) Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes, *Bioelectrochemistry* 67, 115–124.
 70. Shleev, S. V., Morozova, O. V., Nikitina, O. V., Gorshina, E. S., Rusinova, T. V., Serezhenkov, V. A., Burbaev, D. S., Gazaryan, I. G., and Yaropolov, A. I. (2004) Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes, *Biochimie* 86, 693–703.
 71. Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A. I., Whittaker, J. W., and Gorton, L. (2005) Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes, *Biosensors and Bioelectronics* 20, 2517–2554.
 72. Ivnitski, D., and Atanassov, P. (2007) Electrochemical Studies of Intramolecular Electron Transfer in Laccase from *Trametes versicolor*, *Electroanalysis* 19, 2307–2313.
 73. Piontek, K., Antorini, M., and Choinowski, T. (2002) Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers, *J. Biol. Chem.* 277, 37663–37669.
 74. McGuirl, M. A., and Dooley, D. M. (1999) Copper-containing oxidases, *Current Opinion in Chemical Biology* 3, 138–144.
 75. Solomon, E. I., Szilagy, R. K., DeBeer George, S., and Basumallick, L. (2004) Electronic Structures of Metal Sites in Proteins and Models: Contributions to Function in Blue Copper Proteins, *Chem. Rev.* 104, 419–458.
 76. Rorabacher, D. B. (2004) Electron Transfer by Copper Centers, *Chem. Rev.* 104, 651–698.
 77. Johnson, D. L., Thompson, J. L., Brinkmann, S. M., Schuller, K. A., and Martin, L. L. (2003) Electrochemical Characterization of Purified *Rhus vernicifera* Laccase:

- Voltammetric Evidence for a Sequential Four-Electron Transfer†, *Biochemistry* 42, 10229–10237.
78. Machonkin, T. E., and Solomon, E. I. (2000) The Thermodynamics, Kinetics, and Molecular Mechanism of Intramolecular Electron Transfer in Human Ceruloplasmin, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12547–12560.
 79. Léger, C., Lederer, F., Guigliarelli, B., and Bertrand, P. (2006) Electron Flow in Multicenter Enzymes: Theory, Applications, and Consequences on the Natural Design of Redox Chains, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 180–187.
 80. Palmer, A. E., Lee, S. K., and Solomon, E. I. (2001) Decay of the Peroxide Intermediate in Laccase: Reductive Cleavage of the O–O Bond, *J. Am. Chem. Soc.* 123, 6591–6599.
 81. Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T., and Gorton, L. (2005) Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes, *Bioelectrochemistry* 67, 115–124.
 82. Hao Yu, E., and Scott, K. (2010) Enzymatic Biofuel Cells—Fabrication of Enzyme Electrodes, *Energies* 3, 23–42.
 83. Haddour, N., Cosnier, S., and Gondran, C. (2005) Electrogeneration of a Poly(pyrrole)-NTA Chelator Film for a Reversible Oriented Immobilization of Histidine-Tagged Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 5752–5753.
 84. Roullier, V., Clarke, S., You, C., Pinaud, F., Gouzer, G., Schaible, D., Marchi-Artzner, V., Piehler, J., and Dahan, M. (2009) High-Affinity Labeling and Tracking of Individual Histidine-Tagged Proteins in Live Cells Using Ni²⁺ Tris-nitrilotriacetic Acid Quantum Dot Conjugates, *Nano Lett.* 9, 1228–1234.
 85. Balland, V., Hureau, C., Cusano, A. M., Liu, Y., Tron, T., and Limoges, B. (2008) Oriented Immobilization of a Fully Active Monolayer of Histidine-Tagged Recombinant Laccase on Modified Gold Electrodes, *Chemistry – A European Journal* 14, 7186–7192.
 86. Brunel, L., Denele, J., Servat, K., Kokoh, K. B., Jolival, C., Innocent, C., Cretin, M., Rolland, M., and Tingry, S. (2007) Oxygen transport through laccase biocathodes for a membrane-less glucose/O₂ biofuel cell, *Electrochemistry Communications* 9, 331–336.
 87. Raitman, O. A., Katz, E., Bückmann, A. F., and Willner, I. (2002) Integration of Polyaniline/Poly(acrylic acid) Films and Redox Enzymes on Electrode Supports: An in Situ Electrochemical/Surface Plasmon Resonance Study of the Bioelectrocatalyzed Oxidation of Glucose or Lactate in the Integrated Bioelectrocatalytic Systems, *J. Am. Chem. Soc.* 124, 6487–6496.
 88. Samanta, D., and Sarkar, A. (2011) Immobilization of bio-macromolecules on self-

- assembled monolayers: methods and sensor applications, *Chem. Soc. Rev.* 40, 2567–2592.
89. Delamar, M., Hitmi, R., Pinson, J., and Saveant, J. M. (1992) Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts, *J. Am. Chem. Soc.* 114, 5883–5884.
 90. Andrieux, C. P., and Pinson, J. (2003) The Standard Redox Potential of the Phenyl Radical/Anion Couple, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 14801–14806.
 91. Siow, K. S., Britcher, L., Kumar, S., and Griesser, H. J. (2006) Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review, *Plasma Processes and Polymers* 3, 392–418.
 92. Weltmann, K.-D., Brandenburg, R., von Woedtke, T., Ehlbeck, J., Foest, R., Stieber, M., and Kindel, E. (2008) Antimicrobial treatment of heat sensitive products by miniaturized atmospheric pressure plasma jets (APPJs), *Journal of Physics D: Applied Physics* 41, 194008.
 93. Lommatzsch, U., Pasedag, D., Baalman, A., Ellinghorst, G., and Wagner, H.-E. (2007) Atmospheric Pressure Plasma Jet Treatment of Polyethylene Surfaces for Adhesion Improvement, *Plasma Processes and Polymers* 4, S1041–S1045.
 94. Kim, M. C., Yang, S. H., Boo, J.-H., and Han, J. G. (2003) Surface treatment of metals using an atmospheric pressure plasma jet and their surface characteristics, *Surface and Coatings Technology* 174–175, 839–844.
 95. Kolacyak, D., Ihde, J., Merten, C., Hartwig, A., and Lommatzsch, U. (2011) Fast functionalization of multi-walled carbon nanotubes by an atmospheric pressure plasma jet, *Journal of Colloid and Interface Science* 359, 311–317.
 96. Labus, K., Gancarz, I., and Bryjak, J. (2012) Immobilization of laccase and tyrosinase on untreated and plasma-treated cellulosic and polyamide membranes, *Materials Science and Engineering: C* 32, 228–235.
 97. Tastan, E., Önder, S., and Kok, F. N. (2011) Immobilization of laccase on polymer grafted polytetrafluoroethylene membranes for biosensor construction, *Talanta* 84, 524–530.
 98. Heller, A. (1992) Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes, *J. Phys. Chem.* 96, 3579–3587.
 99. Gallaway, J. W., and Calabrese Barton, S. A. (2008) Kinetics of Redox Polymer-Mediated Enzyme Electrodes, *J. Am. Chem. Soc.* 130, 8527–8536.
 100. Tamaki, T., Ito, T., and Yamaguchi, T. (2009) Modelling of Reaction and Diffusion

- Processes in a High-surface-area Biofuel Cell Electrode Made of Redox Polymer-grafted Carbon, *Fuel Cells* 9, 37–43.
101. Bourbonnais, R., Leech, D., and Paice, M. G. (1998) Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1379, 381–390.
 102. Servat, K., Tingry, S., Brunel, L., Querelle, S., Cretin, M., Innocent, C., Jolival, C., and Rolland, M. (2007) Modification of porous carbon tubes with enzymes: application for biofuel cells, *Journal of Applied Electrochemistry* 37, 121–127.
 103. Barrière, F., Ferry, Y., Rochefort, D., and Leech, D. (2004) Targetting redox polymers as mediators for laccase oxygen reduction in a membrane-less biofuel cell, *Electrochemistry Communications* 6, 237–241.
 104. Jenkins, P. A., Boland, S., Kavanagh, P., and Leech, D. (2009) Evaluation of performance and stability of biocatalytic redox films constructed with different copper oxygenases and osmium-based redox polymers, *Bioelectrochemistry* 76, 162–168.
 105. Gregg, B. A., and Heller, A. (1990) Cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications, *Anal. Chem.* 62, 258–263.
 106. Rajagopalan, R., Aoki, A., and Heller, A. (1996) Effect of Quaternization of the Glucose Oxidase “Wiring” Redox Polymer on the Maximum Current Densities of Glucose Electrodes, *J. Phys. Chem.* 100, 3719–3727.
 107. Heller, A. (2006) Electron-conducting redox hydrogels: design, characteristics and synthesis, *Current Opinion in Chemical Biology* 10, 664–672.
 108. Kang, C., Shin, H., and Heller, A. (2006) On the stability of the “wired” bilirubin oxidase oxygen cathode in serum, *Bioelectrochemistry* 68, 22–26.
 109. Boland, S., Foster, K., and Leech, D. (2009) A stability comparison of redox-active layers produced by chemical coupling of an osmium redox complex to pre-functionalized gold and carbon electrodes, *Electrochimica Acta* 54, 1986–1991.
 110. Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A. I., Whittaker, J. W., and Gorton, L. (2005) Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes, *Biosensors and Bioelectronics* 20, 2517–2554.
 111. Gray, H. B., and Winkler, J. R. (2003) Electron tunneling through proteins, *Quarterly Reviews of Biophysics* 36, 341–372.
 112. Blanford, C. F., Heath, R. S., and Armstrong, F. A. (2007) A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O₂ reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface, *Chemical Communications* 1710.

113. Vaz-Dominguez, C., Campuzano, S., Rüdiger, O., Pita, M., Gorbacheva, M., Shleev, S., Fernandez, V. M., and De Lacey, A. L. (2008) Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition, *Biosensors and Bioelectronics* 24, 531–537.
114. Pita, M., Gutierrez-Sanchez, C., Olea, D., Velez, M., Garcia-Diego, C., Shleev, S., Fernandez, V. M., and De Lacey, A. L. (2011) High Redox Potential Cathode Based on Laccase Covalently Attached to Gold Electrode, *J. Phys. Chem. C* 115, 13420–13428.
115. Pita, M., Shleev, S., Ruzgas, T., Fernández, V. M., Yaropolov, A. I., and Gorton, L. (2006) Direct heterogeneous electron transfer reactions of fungal laccases at bare and thiol-modified gold electrodes, *Electrochemistry Communications* 8, 747–753.
116. Gupta, G., Rajendran, V., and Atanassov, P. (2004) Bioelectrocatalysis of Oxygen Reduction Reaction by Laccase on Gold Electrodes, *Electroanalysis* 16, 1182–1185.
117. Ressine, A., Vaz-Domínguez, C., Fernandez, V. M., De Lacey, A. L., Laurell, T., Ruzgas, T., and Shleev, S. (2010) Bioelectrochemical studies of azurin and laccase confined in three-dimensional chips based on gold-modified nano-/microstructured silicon, *Biosensors and Bioelectronics* 25, 1001–1007.
118. González Arzola, K., Gimeno, Y., Arévalo, M. C., Falcón, M. A., and Hernández Creus, A. (2010) Electrochemical and AFM characterization on gold and carbon electrodes of a high redox potential laccase from *Fusarium proliferatum*, *Bioelectrochemistry* 79, 17–24.
119. Qiu, H., Xu, C., Huang, X., Ding, Y., Qu, Y., and Gao, P. (2008) Adsorption of Laccase on the Surface of Nanoporous Gold and the Direct Electron Transfer between Them, *J. Phys. Chem. C* 112, 14781–14785.

CHAPITRE II

PARTIE EXPERIMENTALE

II.1. Prétraitement de la surface de l'électrode graphite

Les électrodes de carbone utilisées sont préparées avec des tiges de carbone graphite commercialisées ($S = 0,385 \text{ cm}^2$, $d = 7 \text{ mm}$, Mersen, France).

Deux types de surface ont été préparés :

Surface "lisse" : l'électrode est polie avec du papier de carbure de silicium (SiC) de type P800 (la taille moyenne des grains est de $21,8 \mu\text{m}$, Struers, Danemark) avec de l'eau pendant une minute puis avec du papier abrasif de type P1200 (taille moyenne des grains est $15,3 \mu\text{m}$) et P2400 (la taille moyenne des grains est de $10 \mu\text{m}$) pendant deux minutes pour chaque type d'abrasif. Ensuite, l'électrode est polie sur des toiles à polir (LAM PLAN, France) avec de la pâte à diamant (LAM PLAN, France) constituée de particules de tailles décroissantes ($1 \mu\text{m}$ puis $1/4 \mu\text{m}$) pendant deux minutes respectivement. Elle est ensuite rincée avec de l'eau distillée et séchée à l'air.

Surface "rugueuse" : L'électrode est polie avec du papier abrasif (PRESI, France) de type P80 (la taille moyenne des grains est de $201 \mu\text{m}$) avec de l'eau pendant une minute. Elle est ensuite rincée avec de l'eau distillée et séchée à l'air. La rugosité de la surface (R_a) est déterminée par "Veeco Dektak 6M Stylus surface profiler". La moyenne des valeurs de rugosité a été calculée en utilisant le logiciel de "Veeco 32m profiler". La rugosité (R_a) de la surface "rugueuse" est d'environ $(2500 \pm 250) \text{ nm}$. Pour la suite du texte, ce type de surface est appelée électrode nue.

II.2. Matériels et méthodes électrochimiques

II.2.1. Matériels électrochimiques

Le montage électrochimique est constituée d'un système classique à trois électrodes, une électrode de travail en carbone graphite, une contre électrode de platine et d'une électrode de référence au calomel saturé. En milieu organique, un pont, rempli par le même solvant et le même support électrolyte que dans la cellule électrochimique, est utilisé pour électrode de référence.

L'ensemble est piloté par un potentiostat (modèle 263A, AMETEK, USA) et un logiciel de « Power Suite ».

II.2.2. Fonctionnalisation de surface par réduction électrochimique d'un sel de diazonium

II.2.2.1 Fonctionnalisation de la surface de l'électrode avec des groupements amines

Du 4-nitrobenzene-diazonium tetrafluorobonate ($C_6H_4N_3O_2 \cdot BF_4$, 2 mM et 5 mM) a été dissout en milieu acétonitrile anhydre avec du tetrabutylammonium tetrafluoroborate, Bu_4NBF_4 (0,1 M). Cette solution a été dégazée sous azote pendant 15min. La réduction du 4-nitrobenzene-diazonium a été réalisée par voltammétrie cyclique entre 0,77 V et -0,03 V (vs SCE) pendant un cycle (50 mVs^{-1}) sur une électrode de carbone graphite (CG) (voir figure 2.1).

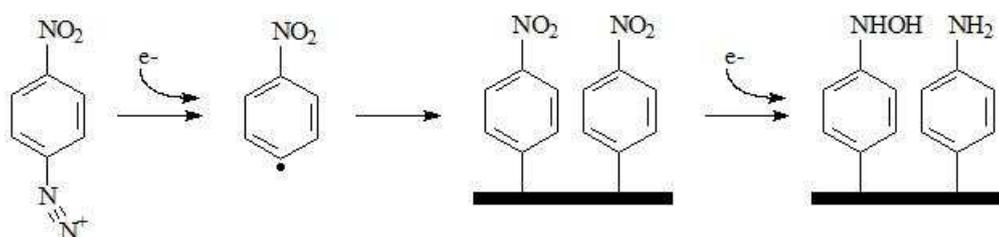


Figure 2.1 : Fonctionnalisation de l'électrode avec les groupements d'aminophényle et d'hydroxylaminophényle.

Lors du balayage en potentiel, un pic en réduction est visible à 0,49 V (voir figure 2.2). Ce pic est attribué à la formation d'un radical aryl. Lors du deuxième cycle, le courant faradique cathodique est nettement plus faible par rapport au premier cycle.

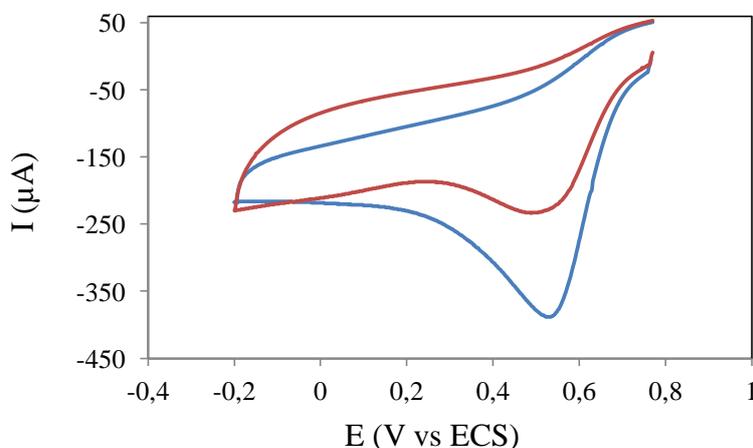


Figure 2.2 : Voltammétrie cyclique d'une électrode de carbone graphite nue dans 5×10^{-3} M de 4-nitrobenzene-diazonium tetrafluorobonate et 0,1M de Bu_4NBF_4 ($v=50 \text{ mVs}^{-1}$) en milieu acétonitrile (premier cycle en bleu et deuxième cycle en rouge).

La réduction du 4-nitrobenzene-diazonium a également été réalisée par chronoampérométrie pendant 30 secondes à un potentiel de 0,25 V (vs ECS). La figure 2.3 représente la variation du courant de réduction du diazonium en fonction du temps.

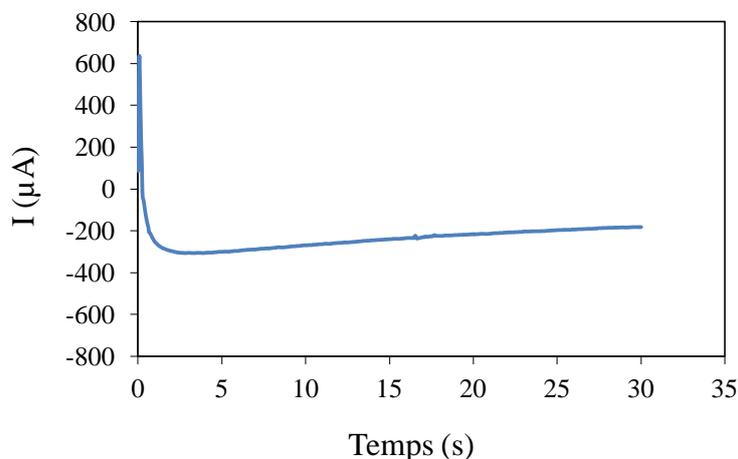


Figure 2.3 Chronoampérométrie d'une électrode de carbone graphite nue dans 5×10^{-3} M de 4-nitrobenzene-diazonium tetrafluoroborate et 0,1 M de Bu_4NBF_4 ($v=50 \text{ mVs}^{-1}$) en milieu acétonitrile.

Après l'attachement des nitrophényles, l'électrode a ensuite été rincée à l'eau et transférée dans un mélange éthanol : eau 1:9 (volume à volume) contenant 0,1 M de KCl préalablement dégazée. Deux cycles de balayage en potentiel ont été réalisés entre 0,02 V et -1,38 V (vs SCE) à une vitesse de 10 mVs^{-1} pour réduire les groupements nitro des cycles phényles attachés à la surface de l'électrode. Au premier cycle, un pic de réduction irréversible est visible à 0,97 V (voir figure 2.4). Ce pic est attribué à la réduction de groupement nitro (NO_2) en groupement amine (NH_2) et disparaît au deuxième cycle. Cela indique qu'il n'y a pas de réduction de groupements nitro lors du second cycle.

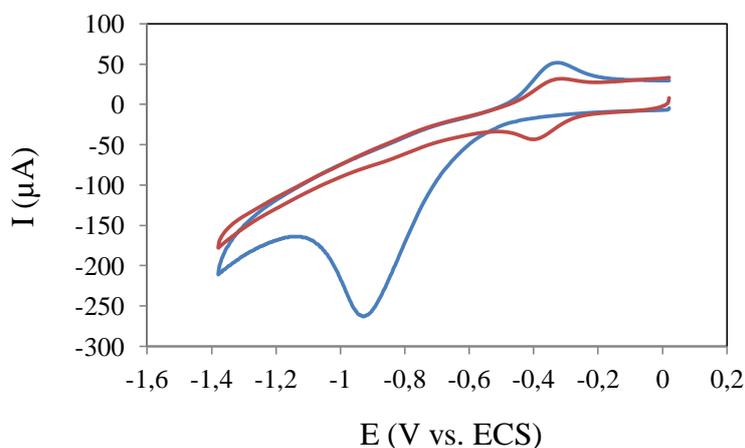


Figure 2.4 : Réduction des groupements nitro dans une solution EtOH : H_2O 1:9v/v contenant 0,1 M de KCl (premier cycle en bleu et deuxième cycle en rouge).

II.2.2.2. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode avec des groupements carboxyliques

La surface des électrodes a été fonctionnalisée avec des groupements carboxyliques par réduction du 4-carboxybenzène diazonium selon deux protocoles :

Protocole A : le diazonium préalablement synthétisé a été dissout dans la cellule électrochimique puis réduit en milieu aqueux (H_2SO_4 , 0,1 M).

Protocole B : le diazonium a été synthétisé in situ dans la cellule électrochimique [1], [2]:

Le précurseur, l'acide 4-aminobenzoïque (5 mM), portant un 4-amino-benzène, a réagi avec un équivalent de nitrite de sodium, NaNO_2 (5 mM) et 0.5 M d'acide chlorhydrique en milieu aqueux sous agitation à température ambiante pour générer in situ des cations de diazonium, 4-carboxybenzène-diazonium (voir figure 2.5). Pour cela, 1mM de NaNO_2 (0.1 M) a été ajouté progressivement dans la solution aqueuse contenant 5mM d'acide 4-aminobenzoïque et 0,5 M d'acide chlorhydrique sous agitation à température ambiante. On a laissé réagir cette solution pendant 15 minutes puis elle a été dégazée sous azote.

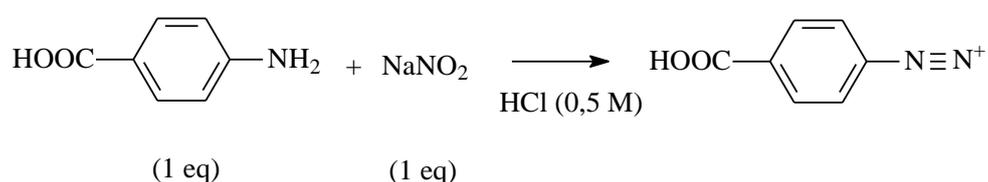


Figure 2.5 : Génération in situ des cations de 4-carboxybenzène-diazonium

Le 4-carboxybenzène-diazonium (synthétisé préalablement ou généré in situ) a été réduit par voltammétrie cyclique entre 0,6 V et -0,5 V (vs SCE) pendant un cycle (50 mVs^{-1}) sur une électrode de carbone graphite (CG) (voir figure 2.6). Lors du balayage en potentiel, deux pics de réduction sont visibles à -0.24 V et 0.21 V qui sont attribués à la formation d'un radical aryl qui forme ensuite une liaison covalente avec le carbone à la surface. Si on réalise un deuxième cycle, le courant faradique cathodique est significativement plus faible comparé au premier cycle. Ceci confirme le blocage de la surface dû à l'attachement du radical aryl sur la surface.

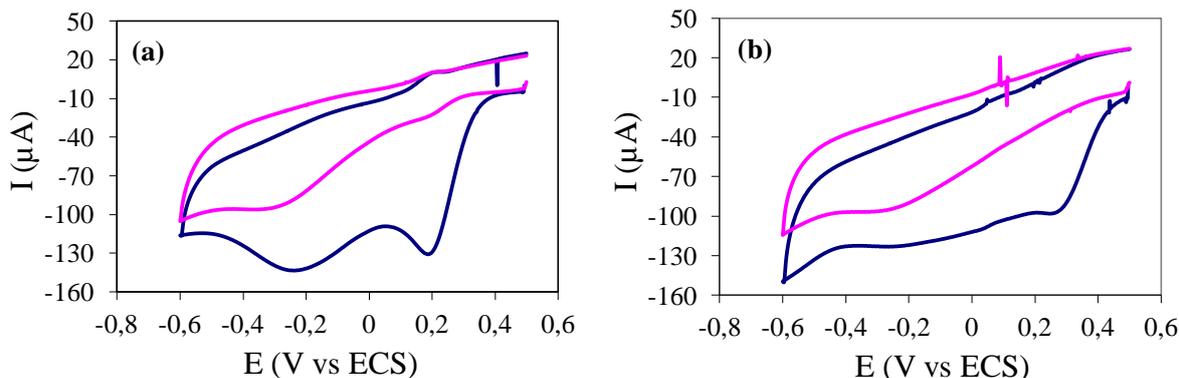


Figure 2.6 : Réduction du 4-carboxybenzène-diazonium (5×10^{-3} M) (a) généré in situ, (b) synthétisé préalablement à la surface d'une électrode de carbone graphite nue en milieu aqueux ($v=50 \text{ mVs}^{-1}$, premier cycle en bleu et deuxième cycle en rouge).

II.2.2.3. Fonctionnalisation de la surface d'électrode avec des groupements hydrazides

II.2.2.3.1. Formation de la fonction hydrazide à la surface fonctionnalisée avec l'ester méthylique (méthode 1)

Tout d'abord, la surface de l'électrode a été fonctionnalisée avec un groupement ester méthylique. Le protocole que nous avons suivi est le même que celui pour le 4-carboxybenzène-diazonium (II.2.2.2). Pour cette fonctionnalisation, nous avons travaillé à partir du précurseur méthyl 4-aminobenzoate (voir figure 2.7).

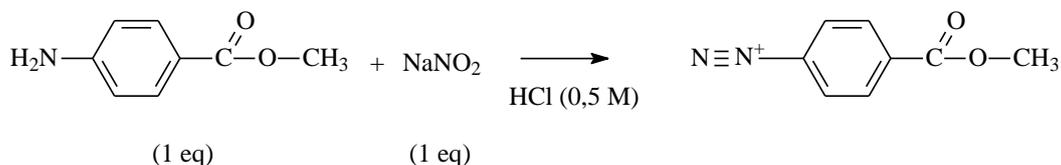


Figure 2.7 : Génération in situ des cations de 4-(methoxycarbonyl)benzene diazonium.

Le 4-(methoxycarbonyl)benzene diazonium généré in situ a été réduit par voltammétrie cyclique entre 0,6 V et -0,9 V (vs SCE) pendant un cycle (50 mVs^{-1}) sur une électrode de carbone graphite (CG) (voir figure 2.8).

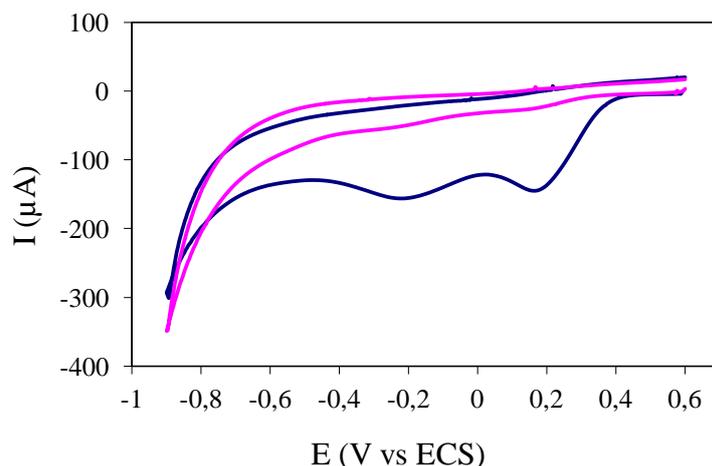


Figure 2.8 : Réduction du 4-(methoxycarbonyl)benzene diazonium (5×10^{-3} M) à la surface d'une électrode de carbone graphite nue en milieu aqueux ($v=50 \text{ mVs}^{-1}$, premier cycle en bleu et deuxième cycle en rouge).

L'ester méthylique à la surface de l'électrode a ensuite réagi avec une solution à 10mM d'hydrazine (NH_2NH_2) ou hydrazine protégé (NH_2NHboc) en milieu basique (tampon carbonate de 0,2 M, $\text{pH}=9,7$) pendant une nuit pour former une fonction hydrazide [3] (voir Figure 2.9). Une étape supplémentaire de déprotection de l'hydrazide a été réalisée en trempant l'électrode dans une solution de H_3PO_4 (1 M) pendant 30 minutes pour le cas de l'hydrazine protégée.

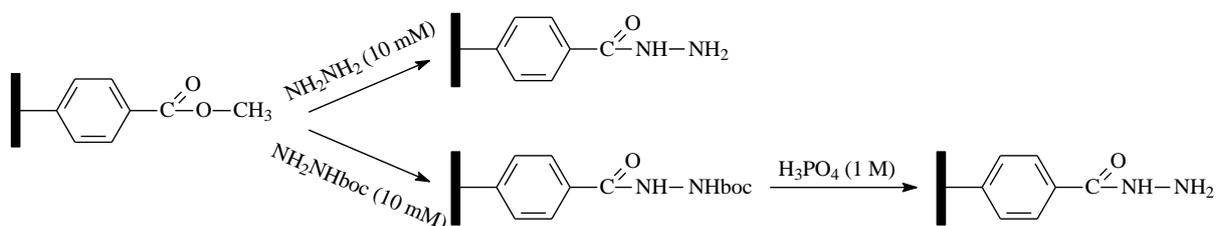


Figure 2.9 Formation de la fonction hydrazide à la surface fonctionnalisée avec l'ester méthylique (méthode 1).

II.2.2.3.2. Formation de la fonction hydrazide à la surface fonctionnalisée avec un groupement carboxylique (méthode 2)

La surface de l'électrode a été fonctionnalisée avec un groupement carboxylique par réduction du 4-carboxybenzène-diazonium généré in situ.

Le groupement carboxylique à la surface de l'électrode a ensuite réagi avec une solution à 5mM d'hydrazine protégée (NH₂NHboc) dans le tampon phosphate de 10mM (pH=7) en présence de 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC, 10 mM) et N-Hydroxysuccinimide (NHS, 5 mM) pendant une nuit. L'électrode a ensuite été trempée dans une solution de H₃PO₄ (1 M) pendant 30 minutes pour réaliser la déprotection de l'hydrazide.

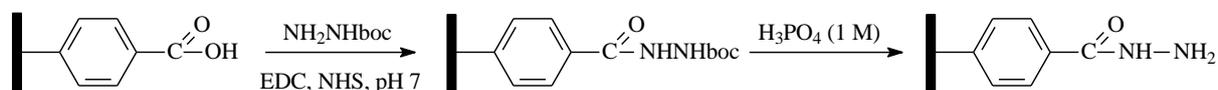


Figure 2.10 : Formation de la fonction hydrazide à la surface fonctionnalisée avec un groupement carboxylique.

II.3. Fonctionnalisation de surface par traitement du plasma

II.3.1. Réacteur plasma utilisé pour le traitement de surface de l'électrode

Un réacteur à jet de plasma hors équilibre à pression atmosphérique (APPJ) de la société Plasmatreteat (Plasmatreater AS400) (Figure 2.11 et 2.12)^{[4], [5]} a été utilisé pour activer et fonctionnaliser la surface des électrodes de carbone par des groupements carboxyliques et amines en utilisant respectivement l'air ou l'oxygène et l'azote. Par ailleurs, le plasma est susceptible de modifier la rugosité de surface des électrodes par gravure chimique du substrat en formant des espèces volatiles. Toutes les expériences ont été effectuées en environnement atmosphérique. Par conséquent, l'air ambiant était susceptible d'interagir avec l'échantillon et le jet de plasma.



Figure 2.11 Le système laboratoire Plasmatreater AS 400 Openair® [4].

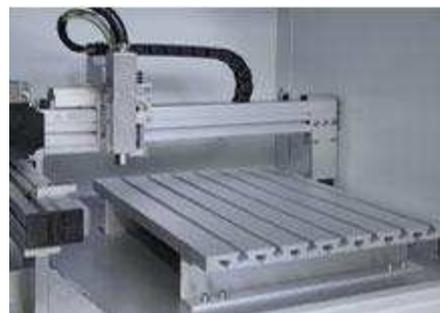


Figure 2.12 La torche plasma se déplace à l'aide d'un robot 2 axes. Le déplacement de la torche permet de contrôler le temps de traitement du substrat [5].

Une haute tension pulsée ($I = 4 \text{ A}$, $U = 320 \text{ V}$, $f = 20 \text{ kHz}$) est appliquée entre deux électrodes métalliques séparées par un matériau diélectrique (figure 2.13). L'arc ainsi créé permet d'ioniser le flux gazeux d'air ou d'oxygène ($Q = 2400 \text{ L/h}$) et de former un jet de plasma d'environ 20 mm de long et 6 mm de diamètre à la sortie d'une buse. Le jet plasma est relativement chaud et peut atteindre des températures comprises entre 500 K et 1000 K en fonction des conditions opératoires. Ainsi l'échauffement de l'électrode durant le traitement dépend de la durée de traitement de cette dernière et donc de la vitesse à laquelle le jet de plasma se déplace au dessus de la surface. Dans les conditions standards de traitement, le jet se déplace à une vitesse de 15 m/min et la température du substrat atteint environ 100-120 °C.

La modulation de la puissance fournie au plasma est assurée grâce au contrôle du temps de cycle (Plasma Cycle Time ou PCT). Pour un PCT de 100%, la durée d'impulsion est égale à la durée de pause, ainsi pour une fréquence d'impulsion de 20 kHz ($T = 50 \mu\text{s}$), le temps d'allumage (T_{on}) est égal au temps d'extinction (T_{off}) soit 25 μs , alors que pour un PCT de 50%, $T_{\text{on}} = 16 \mu\text{s}$ et $T_{\text{off}} = 34 \mu\text{s}$.

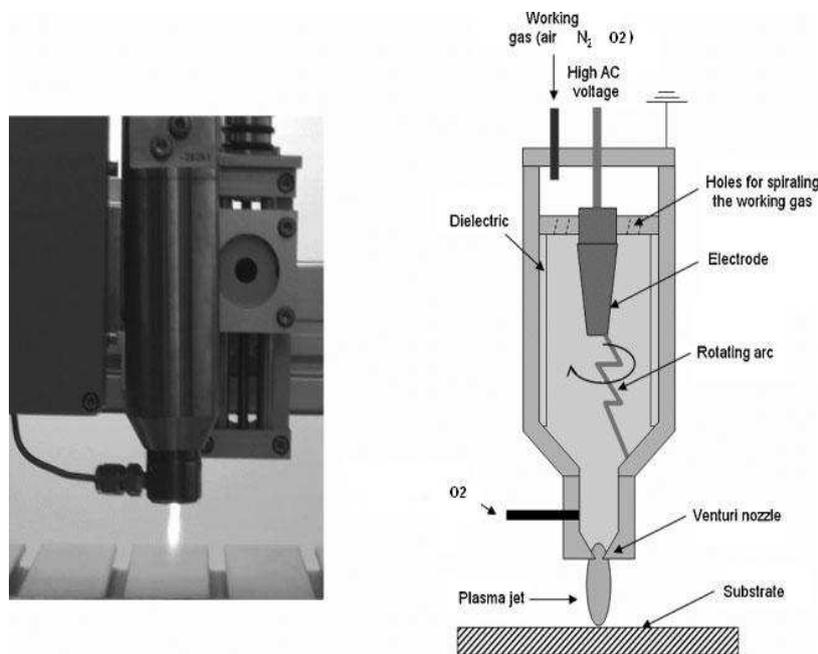


Figure 2.13 Photographie et schéma représentant le système APPJ utilisé pour activer et fonctionnaliser la surface de l'électrode de carbone [6].

II.3.2 Fonctionnalisation de la surface de l'électrode avec les groupements carboxyliques et amines

Le traitement a été réalisé avec un PCT de 50% ($T_{\text{on}} = 16 \mu\text{s}$ et $T_{\text{off}} = 34 \mu\text{s}$) en utilisant de

l'azote (pureté 99.999%), l'air atmosphérique ou bien de l'air enrichi en dioxygène (pureté 99.999%, à une pression d'entrée de 5 bars). Une tension de plasma (U) de 315 V (90% de la valeur maximale) a été appliquée. La distance de la buse du plasma par rapport à la surface à traiter a été fixée à 10 mm. Les effets du PCT (30%, 50%, 100%), du nombre du passage (Ps, 1 et 3), de la vitesse du jet (5, 15, 20 et 40 m·min⁻¹), et de la nature du gaz du plasma (azote, air atmosphérique et air + oxygène) sur la fonctionnalisation de la surface de l'électrode ont été évalués.

II.4 Immobilisation de la laccase à la surface fonctionnalisée

II.4.1. Laccase utilisée pour modifier la surface de l'électrode

La laccase est produite à partir de *Trametes versicolor* (ATCC 32745), un champignon de la pourriture blanche dont le taux de production de laccase peut être fortement stimulé en présence de xénobiotiques qualifiés d' « inducteurs ». Nous avons utilisé comme inducteur la 2,5-diméthylaniline (ou 2,5-xylydine). La souche de *T. versicolor* (ATCC 32745) produit au moins deux laccases, dites A et B. Nous avons utilisé la laccase B pour les expériences de l'immobilisation de l'enzyme. La production de laccase B est induite en présence de 2,5-xylydine. La laccase B induite a été purifiée selon un protocole incluant deux chromatographies sur résine échangeuse d'anion et d'interaction hydrophobe. Une protéine apparemment homogène sur gel d'électrophorèse a été obtenue. Cinq litres de milieu de culture ont été suffisants pour obtenir quelques milligrammes de laccase nécessaires aux essais de cristallisation. La laccase purifiée (autour de 900 U·mL⁻¹) est stockée à -20 °C dans un tampon phosphate (50 mM, pH 6.8) en présence de glycérol (15% massique).

II.4.2. Mesure de l'activité de la laccase

Nous avons utilisé le 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6- acide sulphonique (ABTS, voir figure 2.14) comme substrat pour mesurer l'activité de la laccase en solution et également à la

surface de l'électrode. 1 unité (U) de la laccase correspond 1 micromole de substrat transformé par minute ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$).

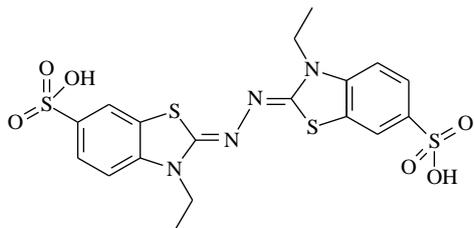


Figure 2.14 Structure de l'ABTS

On suit la cinétique de l'oxydation de l'ABTS²⁻ (voir équation 2.1) en mesurant l'absorbance de la solution à $\lambda=420$ nm au spectromètre UV-visible (VARIAN Cary-50 Series UV-visible Spectrophotometer) à la température de 30 °C.



Une courbe de l'absorbance en fonction du temps est obtenue. La pente (dAbs/dt) de cette courbe linéaire croissante permet de calculer la vitesse de formation du radical et ainsi l'activité de la laccase en solution ou à la surface de l'électrode.

A partir de la loi de Beer Lambert, nous avons :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C = \frac{\varepsilon \cdot n \cdot l}{V} \quad (2.2)$$

où A est densité optique (sans unité) ;

ε est coefficient d'extinction molaire de ABTS à 420 nm ($36000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$);

l correspond à l'épaisseur de la cuvette utilisée (1 cm) ;

n est la quantité de matière d'ABTS (en mol)

V est volume de la solution d'ABTS (10^{-3} L pour la laccase en solution et 2×10^{-3} L pour la laccase à la surface)

Donc

$$n = \frac{A \cdot V}{\varepsilon \cdot l} \quad (2.3)$$

Nous pouvons alors décrire l'activité de l'enzyme avec l'équation :

$$\text{Activité (U)} = \frac{dn(\mu\text{mol})}{dt(\text{min})} = 10^6 \times \frac{dn(\text{mol})}{dt(\text{min})} = 10^6 \times \frac{dA}{dt} \times \frac{V}{\varepsilon \cdot l} \quad (2.4)$$

II.4.2.1. Activité da la laccase en solution

Le support de cuve du spectrophotomètre est thermostaté à 30 °C. Dans une cuve de 1,5 mL semi-micro sont déposés :

- 940 µL de tampon citrate-phosphate (CPB) à 0,25 M, pH 3 saturé en air par bullage.
- 50 µL d'une solution mère à 20mM d'ABTS dans l'eau.

La cuve est placée sur bloc chauffant pendant 10 minutes (jusqu'à ce que la solution atteigne 30 °C). Puis 10 µL de la solution contenant l'enzyme est ajoutée, la cuve est agitée manuellement et la mesure est réalisée sur 1min.

A partir de l'équation (2.4), en entrant la valeur de V (10^{-3} L), nous pouvons alors calculer l'activité de la laccase par millilitre d'enzyme (en U/mL) dans la solution :

$$2,7777 \times \frac{dA}{dt} \quad (2.5)$$

II.4.2.2 Activité da la laccase à la surface de l'électrode

L'électrode est trempée dans 2mL de la solution d'ABTS (la même solution que II.4.2.1) dans une cuve sous agitation par un barreau magnétique pendant 1 minute.

A partir l'équation (2.4), en entrant la valeur de V (2×10^{-3} L), nous pouvons calculer l'activité de la laccase (en U) à la surface de l'électrode par l'équation :

$$5,56 \times 10^{-2} \times \frac{dA}{dt} \quad (2.6)$$

II.4.3 Immobilisation de la laccase à la surface fonctionnalisée

II.4.3.1 Immobilisation de la laccase à la surface de l'électrode fonctionnalisée avec $-\text{NH}_2$

Nous avons été inspirés dans un premier temps d'un protocole décrit dans la littérature, celui de Vaz Dominguez [7], décrit ci-dessous :

5 µL d'une solution de laccase (200 U/mL, dans tampon phosphate 10 mM, pH=7) a été déposé sur l'électrode et maintenu pendant 20 minutes pour favoriser la concentration et l'orientation de l'enzyme à la surface de l'électrode. 4,5 µL de la solution de NHS (20 mM,

dans tampon phosphate 10 mM, pH=7) et 5,5 μ L de la solution d'EDC (40 mM, dans tampon phosphate 10 mM, pH=7) ont été ensuite déposés sur l'électrode pour être mélangés avec la solution de laccase. Ce mélange a été ensuite maintenu sur l'électrode pendant 2 h à température ambiante pour former une liaison covalente à la surface de l'électrode.

L'électrode modifiée a ensuite été lavée dans 10 mL de tampon phosphate 10 mM (pH=7) pendant 30 minutes sous agitation pour éliminer tous les composants non liés à l'électrode. Ce lavage a été répété deux fois en changeant la solution de tampon. Au bout de deux lavages, on ne détecte plus d'activité dans la solution de lavage. Lorsque ce n'est pas le cas, le lavage est répété jusqu'à ce qu'aucune activité laccase ne soit plus détectée. L'électrode est ensuite conservée dans un tampon phosphate 10 mM, pH=7 à 4 °C pour une utilisation ultérieure.

Ce protocole a été suivi en utilisant 10 μ L de la solution de laccase au lieu de 5 μ L. Comme nous avons une électrode dont la surface est 5,4 fois plus importante que celle de l'électrode utilisée par Vaz Dominguez et al., nous avons doublé le volume de la solution pour bien couvrir la surface de l'électrode.

II.4.3.2 Immobilisation de la laccase à la surface de l'électrode fonctionnalisée avec -COOH

II.4.3.2.1 Immobilisation de la laccase

Cette fois, on va d'abord activer les groupements carboxyliques à la surface du carbone, puis qu'ensuite la laccase est déposée en surface.

4,5 μ L de la solution de NHS (20mM, dans tampon phosphate 10 mM, pH=7) et 5,5 μ L de la solution d'EDC (40mM, dans tampon phosphate 10 mM, pH=7) ont été mélangés et déposés à la surface de l'électrode et maintenus pendant 20min à température ambiante pour activer les groupements carboxyliques à la surface de l'électrode. 10 μ L d'une solution de laccase (200 U/mL, dans tampon phosphate 10 mM, pH=7) ont ensuite été rajoutés à la surface de l'électrode. La goutte mélangée a été maintenue pendant 2 heures à température ambiante.

L'électrode modifiée a été ensuite lavée dans 10 mL de tampon phosphate 10 mM (pH=7) pendant 30 minutes sous agitation pour enlever la laccase non adsorbée. Ce lavage a été répété deux fois en changeant la solution de tampon. Au bout de deux lavages, on ne détecte plus d'activité dans la solution de lavage. Lorsque ce n'est pas le cas, le lavage est répété jusqu'à ce qu'aucune activité laccase ne soit plus détectée. L'électrode est ensuite conservée

en tampon phosphate 10mM, pH=7 à 4 °C pour une utilisation ultérieure.

II.4.3.2.2 Immobilisation de la laccase oxydée

D'autres protocoles ont été utilisés :

20µL d'une solution de la laccase ont été déposés et maintenus pendant 2 heures à la surface de l'électrode fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques à température ambiante. La goutte de laccase a ensuite été retirée de la surface. 20 µL d'un mélange NHS 4,5 mM et EDC 11 mM dans tampon phosphate 10 mM, pH=7) ont ensuite été déposés à la surface de l'électrode et maintenus pendant 2 heures. L'électrode a ensuite été lavée selon le protocole précédemment décrit.

Pour chacune des électrodes fonctionnalisées, la laccase a également été immobilisée par adsorption sur la surface, en absence d'EDC/NHS mais pendant la même durée que dans le cas de l'immobilisation covalente. Ceci afin de comparer les deux méthodes d'immobilisation et de tenter d'estimer quelle est l'influence du processus d'adsorption dans l'immobilisation puisque le processus d'adsorption de l'enzyme à la surface a lieu, même dans le cas d'une immobilisation covalente. En effet, l'expérience d'adsorption de la laccase peut être un contrôle pour vérifier l'immobilisation covalente de la laccase sur l'électrode, puisque la quantité de la laccase immobilisée de façon covalente sur l'électrode est généralement supérieure à celle de la laccase adsorbée dans la même condition.

II.4.4. Oxydation de la laccase

Dans un premier temps, le glycérol a été éliminé de la solution stock de laccase par chromatographie d'exclusion (par la taille, filtration sur gel) puis la laccase a été oxydée en présence de NaIO₄, qui a ensuite été éliminé par une nouvelle filtration sur gel.

L'oxydation de la laccase a été réalisée selon un protocole précédemment publié [8]. Le protocole utilisé a été le suivant :

150 µL d'une solution concentrée de laccase (900 U/mL) ont été déposés sur la colonne de filtration (Amersham Biosciences, PD-10, Suède) pour enlever le glycérol de la solution de

laccase. Des échantillons de 500 μL ont été récupérés à la sortie de la colonne. L'essentiel de l'activité laccase était contenu dans quatre de ces aliquotes, soit au total 2 mL qui ont été utilisés pour l'étape d'oxydation. 100 μL de periodate de sodium (NaIO_4) (0,1 M, dans tampon pH7, 0,1 M) a été ajouté dans 2 mL de la solution de la laccase récupérée pour oxyder l'enzyme. Cette solution a été gardée pendant 30 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante. La solution de la laccase oxydée chromatographiée sur colonne P10 pour enlever le NaIO_4 . L'enzyme oxydée a ensuite été concentrée par ultrafiltration (AMicon, Y M-30) jusqu'à obtenir une activité de 100 U/mL.

II.5. Caractérisation des surfaces fonctionnalisées et de laccase immobilisée

II.5.1. Mesure de l'angle de contact

La détermination de l'énergie libre de surface permet de qualifier les modifications morphologiques et chimiques de l'extrême surface. L'évolution de l'énergie de la surface fonctionnalisée en fonction des paramètres opératoires a été étudiée à l'aide de la technique de mesure de la mouillabilité des surfaces par angle de contact. Cette technique consiste à mesurer le travail réversible d'adhésion des forces d'interaction mise en jeu lors de la formation d'une interface entre un solide et un liquide. La figure 2.15 illustre le principe de cette méthode. Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelée angle de contact. L'interaction liquide/surface est régie par les trois paramètres suivants :

- γ_{SV} énergie libre de surface du solide (J/m^2)
- γ_{LV} énergie libre de surface du liquide (J/m^2)
- γ_{SL} énergie libre interfaciale solide-liquide (J/m^2)

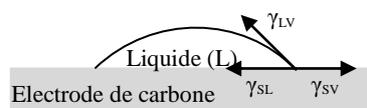


Figure 2.15 Représentation des énergies libres de surface.

L'équilibre du système est donné par la relation de Young (Equation 2.7) qui est la base de la

majorité des méthodes de calcul de l'énergie de surface :

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cdot \cos\theta \quad (2.7)$$

Le travail d'adhésion entre une surface solide et un liquide peut s'exprimer à l'aide de l'équation combinée de Young-Dupré (Equation 2.8) qui donne une relation directe entre l'adhésion thermodynamique et l'angle de contact de la goutte de liquide déposée sur la surface fonctionnalisée :

$$W_{SL} = \gamma_{LV} (1 + \cos\theta) \quad (2.8)$$

Avec :

γ_{LV} : énergie libre de surface du liquide

θ : angle de contact du liquide sur la surface fonctionnalisée

La mesure de l'angle de contact rend compte de l'aptitude du liquide choisi à s'étaler sur la surface d'un solide ; elle permet de qualifier la surface après traitement : hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface). La mesure peut se faire soit à l'équilibre (mouillage statique), soit pendant une augmentation ou une diminution du volume de la goutte sur la surface ou bien pendant un déplacement de cette goutte (mouillage dynamique : hystérésis). Dans ce travail, les mesures des angles de contact ont été réalisées en mode statique avec un appareil de capture vidéo (Digidrop GBX-3S system, France) immédiatement après la fonctionnalisation de la surface. Le dispositif expérimental, disponible au « Laboratoire des Procédés Plasma et Traitements de Surfaces » à l'ENSCP, est décrit à la figure 2.16.

Il se compose :

- d'une source de lumière blanche
- d'une micro-seringue permettant de déposer un volume précis de liquide sur le porte-échantillon sur lequel est déposé le substrat
- d'une caméra reliée à un ordinateur qui permet à l'aide d'un logiciel de traitement d'image de visualiser la goutte déposée.

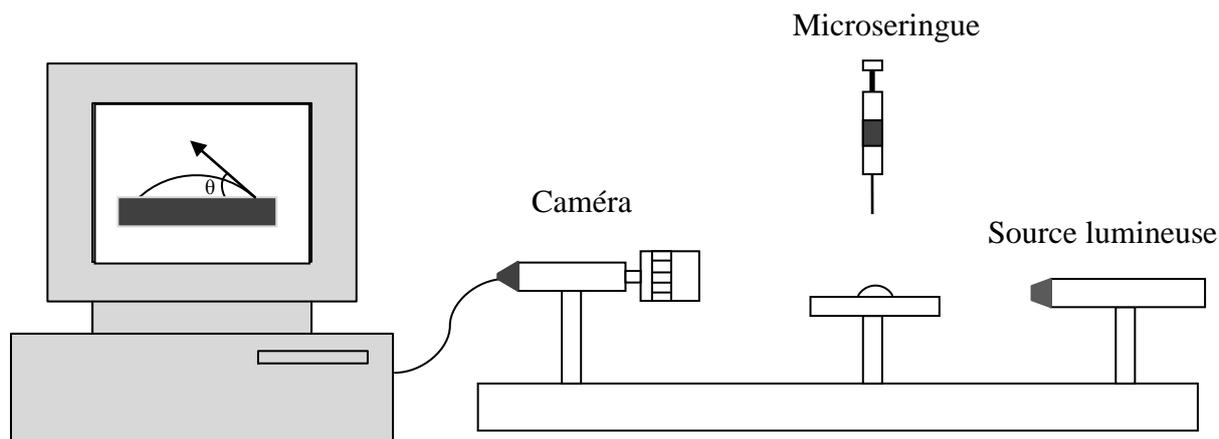


Figure 2.16 Dispositif de la mesure de l'angle de contact

Pour chaque mesure, une goutte d'eau distillée de 6 μL a été déposée à la surface de l'électrode et l'image de la goutte d'eau a été enregistrée en continu en fonction du temps jusqu'à l'équilibre. Une valeur moyenne a été calculée à partir de trois analyses effectuées en différents endroits de l'échantillon. Les valeurs d'angle de contact sont données à $\pm 3^\circ$ compte tenu des incertitudes de lecture.

II.5.2. Quantification des groupements carboxyliques

La molécule toluidine bleue (TBO), un colorant absorbant à 633 nm (cf. figure 2.17), a été utilisé comme sonde pour déterminer la quantité de groupements carboxyliques à la surface de l'électrode [9].

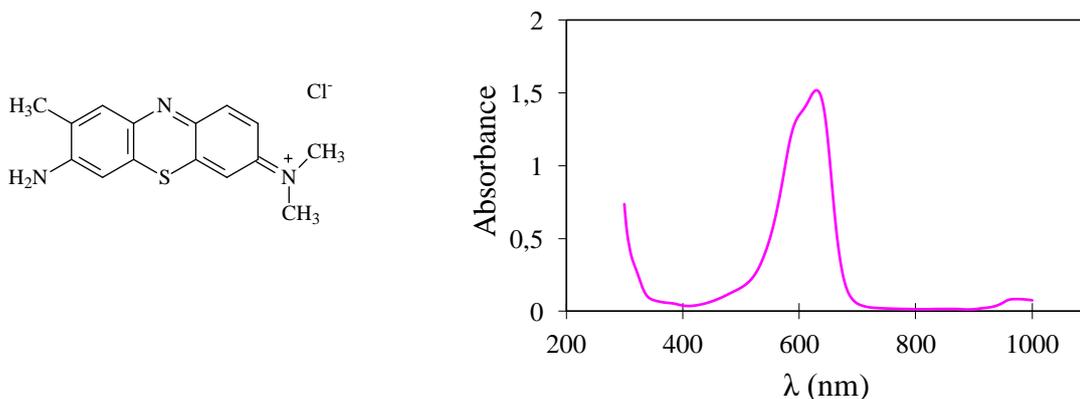


Figure 2.17 : Structure du TBO et son absorbance à $\lambda=633$ nm à UV-visible.

L'électrode fonctionnalisée avec des groupements carboxyliques a été plongée dans 1 mL de solution de TBO (5×10^{-4} M) préparée en milieu basique (NaOH, pH 10) pendant 6 heures sous agitation. En milieu basique, les groupements carboxyliques sont déprotonnés et chargés négativement. Les colorants chargés positivement peuvent s'accrocher aux groupements carboxyliques par interaction électrostatistique.

Ensuite, deux étapes de lavage ont été réalisées afin d'éliminer les TBOs adsorbées à la surface. Elles consistent à plonger l'électrode dans une solution de NaOH (pH 10) puis dans de l'eau distillée sous agitation pendant 15 minutes à deux reprises.

Après les lavages de la surface, l'électrode a été trempée dans 150 μ L d'acide acétique (50%, volumique) pendant 10 minutes. En milieu acide, les groupements carboxyliques ne sont plus chargés négativement et les colorants accrochés sur des les groupements carboxyliques sont relargués dans la solution d'acide acétique. L'absorbance de cette solution est mesurée à $\lambda=633$ nm au spectrophotomètre UV-visible. Une électrode sans traitement a été utilisée comme témoin.

La concentration en TBO (C , $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) est déterminée à partir de la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (2.2)$$

où A est densité optique (sans unité) ;

ε est coefficient d'extinction molaire (en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) ;

l correspond à l'épaisseur de la cuvette utilisée (1 cm) ;

C est la concentration molaire de la solution (en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Le coefficient d'extinction molaire est déterminé à partir d'une courbe de calibration réalisée pour des concentrations de TBO comprises entre 10^{-6} et 1.5×10^{-5} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (cf. figure 2.18). On a ainsi établi que $\varepsilon = 26400$ $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

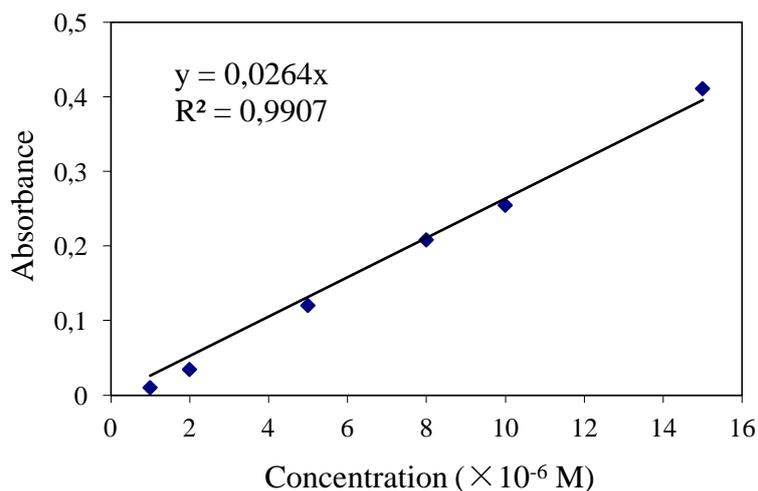


Figure 2.18 : Courbe de calibration du TBO à 633 nm

La concentration en TBO (C , $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) est ensuite convertie en densité de groupements carboxyliques à la surface (Γ , $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) par la formule suivante :

$$\Gamma = \frac{C \cdot V}{S} \quad (2.9)$$

où V est le volume de la solution d'acide acétique (1.5×10^{-4} L) ;

S est la surface géométrique de l'électrode (en cm^2) ;

Ce calcul est à base sur la supposition que 1 mole de TBO s'accroche sur 1 mole de groupements carboxyliques.

II.5.3. Quantification des groupements amines

II.5.3.1. Détermination colorimétrique de la densité surfacique des groupements amines

La densité des groupements amines à la surface de l'électrode de carbone a également été déterminée en utilisant l'ester 3-(2-pyridyldithio) propionic acid N-hydroxysuccinimide (SPDP) en suivant le protocole publié par M. Minier [10].

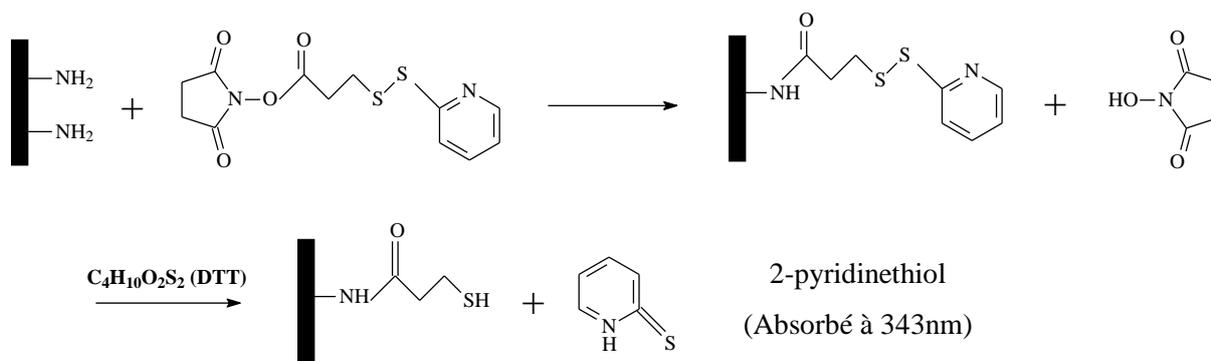


Figure 2.19 Principe de la méthode de détermination des groupements amines avec SPDP.

L'électrode fonctionnalisée est d'abord trempée dans 100 μL d'une solution de SPDP (10 mM, dans DMF) pendant 1 heure à température ambiante. Le SPDP peut réagir avec le groupement amine à la surface de l'électrode par formation d'une liaison amide. Elle est ensuite lavée dans 10 mL de DMF pendant 30 minutes sous agitation pour enlever le SPDP non lié avec le groupement amine. Ce lavage a été répété deux fois en changeant le DMF. Et puis l'électrode est trempée dans 200 μL de la solution aqueuse de DTT (20 mM) pendant 30 minutes pour que le DTT coupe la liaison S-S sur l'électrode et relargue le 2-pyridinethiol qui absorbe à 343 nm. Après avoir retiré l'électrode, l'absorbance de cette solution est mesurée à $\lambda=343$ nm au spectrophotomètre UV-visible. Une électrode fonctionnalisée par réduction du 4-nitrobenzene-diazonium sans réduire les groupements nitro à la surface a été utilisée comme témoin.

La concentration en 2-pyridinethiol est déterminée à partir de la loi de Beer-Lambert (équation 2.2) où ϵ , le coefficient d'extinction molaire de 2-pyridinethiol, est de 8080 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. La concentration en 2-pyridinethiol (C , $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) est ensuite convertie en densité de groupements amines à la surface (Γ , $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) par la formule suivante :

$$\Gamma = \frac{C \cdot V}{S} \quad (2.9)$$

où le volume de la solution de DTT est de 2×10^{-4} L.

II.5.3.2. Détermination de la densité surfacique des groupements amines avec une sonde ferrocène aldéhyde

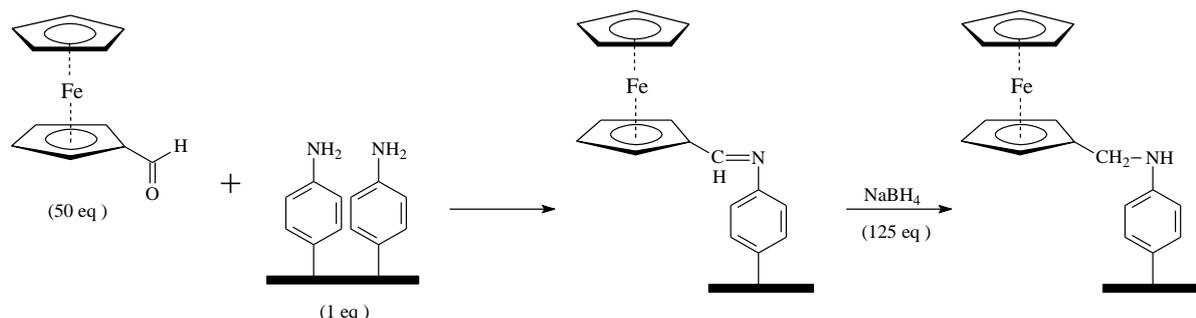


Figure 2.20 Principe de la méthode de détermination des groupements amines avec ferrocène aldéhyde.

La densité des groupements amines à la surface a été déterminée en utilisant un ferrocène fonctionnalisé par une fonction aldéhyde susceptible de réagir avec les fonctions amines de la surface de l'électrode pour former une base de Schiff [11]. Pour cela, l'électrode fonctionnalisée a été trempée dans une solution qui contenant 50 équivalents de ferrocène aldéhyde (dans du méthanol) en supposant que la densité des groupements amines sur la surface est de 2×10^{-9} mol/cm². La réaction est réalisée sous agitation, dans l'obscurité et pendant 2 heures. Le système est placé sous atmosphère d'argon pour le protéger. 125 équivalents de NaBH₄ ont ensuite été ajoutés progressivement dans le système pour réduire la base de Schiff. La deuxième étape dure également 2 heures et sous agitation. Le ferrocène couplé de façon covalente à la surface sert alors de sonde électrochimique. La figure 2.21 présente les pics redox de ferrocène aldéhyde libre dans une solution de KNO₃ sur une électrode nue.

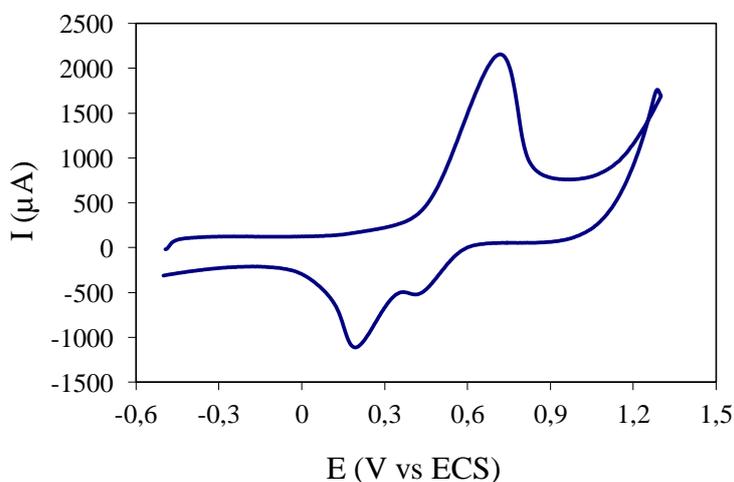


Figure 2.21 Voltammétrie cyclique d'une électrode nue dans la solution de ferrocène aldéhyde contenant 0,1 M de KNO₃.

L'électroactivité de l'électrode après l'immobilisation du ferrocène aldéhyde a été mesurée dans la solution contenant le support d'électrolyte KNO_3 par voltammétrie cyclique. Le potentiel est balayé entre 0,9 et -0,3 V (vs SCE) avec une vitesse de 200 mVs^{-1} . Les pics redox en réduction et en oxydation du ferrocène sont respectivement attendus à 0,2 V et 0,7 V.

II.5.4. La microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet de visualiser la surface d'un matériau conducteur jusqu'à des détails micro ou nanométriques selon le type d'appareil et le matériau utilisé. Le principe est basé sur l'interaction électron-matière. Un faisceau incident d'électrons balaye la surface de l'échantillon inclinée. La diffusion inélastique de ces électrons à travers le matériau provoque l'émission d'électrons secondaires provenant des niveaux de cœur des atomes. La quantité émise est fonction de la topographie de la surface. La profondeur analysée est de l'ordre de $1 \mu\text{m}$ pour une distance de travail de 10 mm.

Nos mesures ont été réalisées au laboratoire LISE (Laboratoire d'Interface et Systèmes Electrochimiques : UPR 15 CNRS). Le microscope à balayage utilisé est le LEICA S440 piloté par le logiciel LEO à filament de tungstène. La tension d'accélération des électrons était de 7 ou 10 keV.

II.5.5. La spectroscopie de photoélectrons induits par rayon X (XPS)

La technique de référence utilisée pour analyser la composition chimique de l'extrême surface d'un matériau est la spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS ou ESCA). L'XPS est une analyse semi quantitative. Elle est basée sur l'effet photoélectrique qui traduit l'émission d'électrons par un matériau lors que ce dernier est soumis à un flux de photons X (Energie incidente $E=h\nu$). Les informations obtenues permettent de déterminer :

- les éléments chimiques présents en surface (à l'exception de H et He)
- les états chimiques de ces éléments
- des quantités des espèces présentées en surface (leur concentration atomique)

Principe :

La mesure de l'énergie cinétique E_c des différents photoélectrons émis permet de déterminer l'énergie de liaison E_l correspondante et de déterminer la nature de l'élément émetteur. En effet, l'énergie cinétique d'un photoélectron est directement reliée à l'énergie du faisceau de rayons X primaire par la relation :

$$h\nu = E_c + E_l + W \quad (2.10)$$

où $h\nu$ correspond à l'énergie du faisceau de rayon X primaire, E_c représente l'énergie cinétique du photoélectron émis par un élément donné, E_l caractérise l'énergie de liaison de ce photoélectron et W correspond au travail d'extraction du spectromètre (fonction de travail d'un spectromètre). De ce fait, la profondeur d'analyse de la spectroscopie XPS dépend du libre parcours moyen λ des électrons dans le matériau. Le libre parcours moyen des électrons dépend de la nature du matériau (composé organique, minéral, métallique, polymère, cristal...), de sa densité volumique. De façon générale, 95% du signal caractéristique provient d'une profondeur d'analyse de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres.

: Appareil et Analyse

Les analyses XPS pour étudier la composition chimique de la surface de l'électrode dans le chapitre III-1 ont été réalisées en collaboration avec l'Institut de la matière condensée et des nanosciences (Belgique).

Les analyses par spectroscopie de photoélectrons (XPS) ont été réalisées sur un spectromètre Kratos Axis Ultra (Kratos Analytical - UK) équipé d'une source en aluminium (10 mA et 15 kV), d'un monochromateur et de 8 multiplicateurs d'électrons. Le spectromètre était interfacé avec un ordinateur pour le contrôle de l'appareil et l'acquisition des données à l'aide du logiciel Vision2 du constructeur.

Les électrodes de carbone analysées, dont l'épaisseur a été réduite à maximum 4 mm, ont été fixées à l'aide d'un ruban adhésif double face isolant (Scotch 3M réf. 34-8509-3289-7) sur un porte-échantillons en acier inoxydable dont l'âme centrale creuse en aluminium permet de disposer des échantillons épais. Ceux-ci ont donc été isolés du porte-échantillon afin d'éviter l'effet de charge différentielle entre le support graphitique, conducteur, et la surface recouverte de composés organiques, isolante.

La pression dans la chambre d'analyse était d'environ $1.0 \cdot 10^{-6}$ Pa. L'angle de détection entre la normale à l'échantillon et la direction de collecte des photoélectrons était de 0° . Le mode d'acquisition « Hybride » (combinaison des lentilles électrostatique et magnétique) a été utilisé ; la taille de la zone analysée était de $700 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$. L'énergie de passage au niveau de l'analyseur était de 160 eV pour le spectre général et de 40 eV pour les spectres individuels ; dans ce dernier cas la largeur à mi-hauteur du pic Ag $3d_{5/2}$ d'un standard d'argent est d'environ 0.9 eV.

La charge qui se développe à la surface de ces échantillons isolés de la masse du spectromètre a été stabilisée grâce à une source d'électrons de faible énergie injectés dans le champ de la lentille magnétique à partir d'un filament (ajusté à 1.9-2.1 A ou 0.16 A selon le type de filament) situé à la base de la lentille électrostatique. Ces électrons suivent les lignes de champ vers l'échantillon. Puisque les électrons de neutralisation suivent les mêmes lignes de champ que celles utilisées pour extraire et focaliser les photoélectrons émis par l'échantillon, ils arrivent exactement à l'endroit d'où sont émis ces photoélectrons. La source d'électrons fonctionnait avec une polarisation de -1.1 ou -1.2 eV et la plaque de compensation de charge était ajustée entre -3.5 et -4.1 eV.

Les spectres suivants ont été enregistrés : spectre général, C 1s, O 1s, N 1s, Cl 2p, S 2p, P 2p, Na 1s et dans certains cas B 1s et F 1s, puis à nouveau C 1s afin de vérifier la stabilité de la charge au cours du temps et de détecter un effet éventuel de dégradation de la surface de l'échantillon. L'échelle en énergie de liaison a été réglée en fixant la composante C-(C,H) du pic C 1s à 284.8 eV.

Les spectres ont été traités à l'aide du logiciel CasaXPS (Casa Software Ltd - UK). Les pics, à l'exception du C 1s, ont été décomposés avec un produit Gaussien/Lorentzien (70/30), après soustraction d'une ligne de base linéaire et en imposant certaines contraintes décrites dans les résultats. La décomposition du pic C 1s serait hasardeuse vu la présence concomitante de la composante C-(C, H) asymétrique et du « shake up » typiques du carbone graphitique, avec les différentes composantes du carbone organique de la surface.

Les rapports de concentrations molaires ont été calculés à partir des aires de pics normalisées sur la base des paramètres d'acquisition, après soustraction d'une ligne de base linéaire, des facteurs de sensibilités expérimentaux fournis par le constructeur et des facteurs de transmission (dépendant de l'énergie cinétique, de l'énergie de passage et de la combinaison de lentilles utilisée). Les fractions molaires des éléments sont données en excluant l'hydrogène, qui n'est pas détecté par XPS.

Les analyse XPS, pour étudier la composition chimique de la surface de l'électrode dans le chapitre III-2, ont été réalisées au Laboratoire de Physico-Chimie des Surfaces (UMR 7045). Le dispositif expérimental (VG Microlab 310-F) est un spectromètre avec une source monochromatique MgK α ($h\nu=1253,6$ eV). La pression dans la chambre de préparation et d'analyse était de 2×10^{-8} Pa et 1×10^{-8} Pa respectivement. La haute résolution des spectres a été réalisée dans un mode d'énergie constant de l'analyseur selon une énergie passante de 20 eV. Les spectres C 1s, O 1s, N 1s ont été enregistrés.

Le tableau suivant représente les valeurs de référence pour les éléments carbone, azote et oxygène dans les matériaux organiques.

	Groupe fonctionnel	Structure chimique	Energie de liaison (eV)
C 1s	Hydrocarbures	C-H, C-C	285,0
	Amine	C-N	285,7
	Ether, alcool	C-O-C, C-O-H	286,5
	Imine, nitrile	C=N, CN	287,0
	Cétone, aldéhyde	C=O	287,8
	Amide	N-C=O	288,0
	Acide carboxylique, ester	-COOH, -COOR	289,0
	Carbonates	-O-C(=O)-O	290,5
N 1s	Imine	-N=C	398,5
	Amine aliphatique	-NH	399,3
	Amide	N-C=O	399,8
	Ammonium	-NH ₄ ⁺	401,5
	Nitro	-NO ₂	405,5
O 1s	Carbonyle	C=O, O-C=O	532,2
	Alcool, éther	C-O-H, C-O-C	532,8
	Ester	-O-C=O	533,7

Tableau 2.1 : Energies de liaison du C 1s, N 1s et O 1s engagés dans les principaux groupes fonctionnels [12].

II.5.6. Voltammétrie cyclique

II.5.6.1. Détermination de la surface électroactive de l'électrode graphite

La surface effective, en termes d'électroactivité des électrodes de carbone graphite fonctionnalisées ou non a été déterminée en étudiant le comportement électrochimique du ferrocyanure Fe(CN)₆⁴⁻ par voltammétrie cyclique entre -0,5V et 0,6V à différentes vitesses de

balayage (20 mVs⁻¹, 30 mVs⁻¹, 40 mVs⁻¹, 50 mVs⁻¹, 60 mVs⁻¹).

Dans le cas d'un système lent, l'expression du courant de pic en régime de diffusion naturelle est donnée par la relation de Randles-Sevcik [13] :

$$i_p = (2,69 \times 10^5) \cdot \alpha^{\frac{1}{2}} \cdot n^{\frac{3}{2}} \cdot S \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot C \cdot v^{\frac{1}{2}} \quad (2.11)$$

avec i_p le courant exprimé en A, S la surface de l'électrode en cm², C la concentration de l'espèce électroactive en mol·cm⁻³, la vitesse de balayage v en Volt·s⁻¹, n le nombre d'électrons échangés, soit n=1 pour le couple ferro/ferricyanure, D le coefficient de diffusion du couple, soit: $D([\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]) = 6,32 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [14] et α le coefficient de transfert de charge.

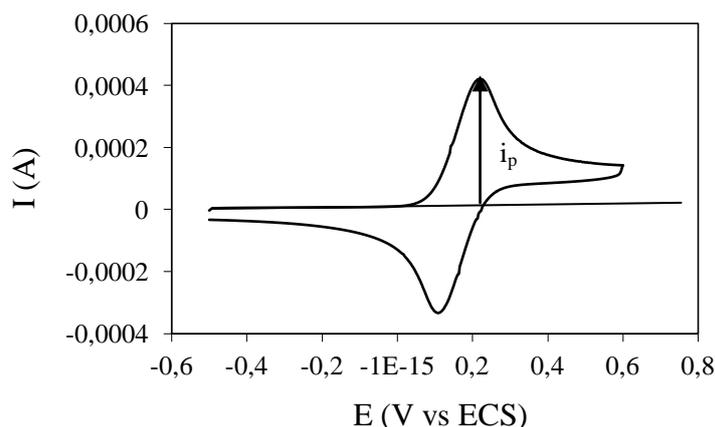


Figure 2.22 Courant faradique obtenu par le pic du voltammétrie cyclique.

Dans le cas d'un système lent, la courbe $E_p = f(\lg v)$ est une droite, la valeur absolue de pente est de $0,03/\alpha$. Nous pouvons alors déterminer la valeur de α à partir la pente de cette droite. La surface « électroactive » de l'électrode peut être déterminée à partir de la pente (voir figure 2.23) de la droite $i_p = f(v^{\frac{1}{2}})$.

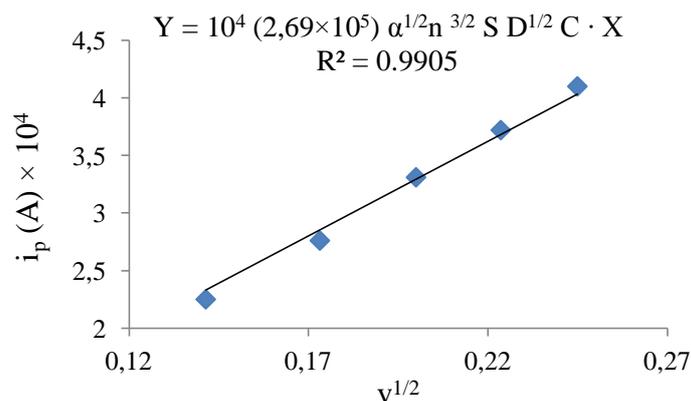


Figure 2.23 : Courant faradique en fonction de $v^{1/2}$.

II.5.6.2. Etude du courant cathodique de réduction de l'oxygène catalysé par la laccase (et la laccase oxydée) immobilisée à la surface de l'électrode

La réduction de l'oxygène catalysée par la laccase (et la laccase oxydée) est mesurée dans un tampon acétate (50 mM) en présence de NaClO_4 (0,1 M) à saturation d'air par bullage. Le potentiel est balayé entre 0,9 et -0,3V (vs SCE) avec une vitesse de 10 mVs^{-1} sans rotation de l'électrode. La même manipulation est faite dans la solution dégazée par l'azote comme le contrôle avant bullage d'air.

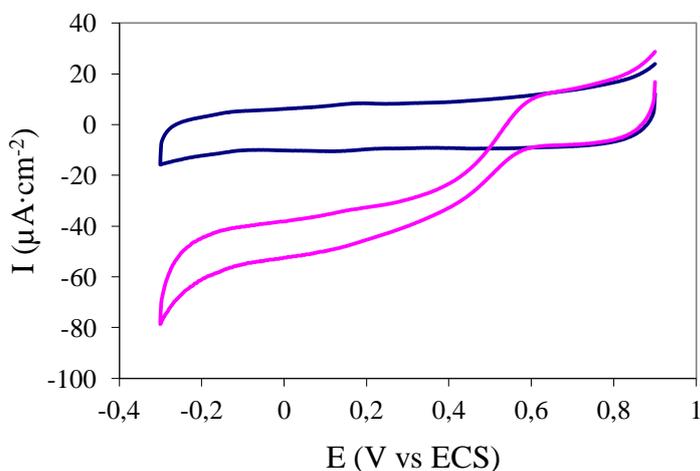


Figure 2.24 : Voltammétrie cyclique sous N_2 (courbe bleu) et sous 1 atm d'air (courbe rose) d'une électrode (fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques précédemment) modifiée avec la laccase de façon covalente. (La mesure est effectuée dans 50 mM tampon d'acétate, pH 4,2, 100 mM NaClO_4 . $v= 10 \text{ mVs}^{-1}$)

II.5.7. Chronoampérométrie

Des mesures de chronoampérométrie ont également été effectuées dans le même milieu (tampon d'acétate 50 mM, NaClO_4 0,1M) avec un potentiel imposé de 0,2 V. La solution est d'abord désaérée pendant 600 s par bullage d'azote, puis de l'air est introduit par bullage. Le système est toujours sous l'agitation grâce à bulles de gaz.

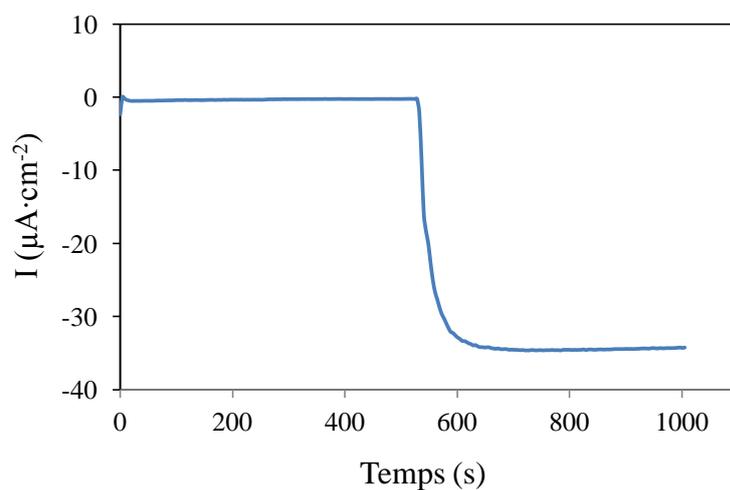


Figure **2.25** Chronoampérométrie (sous N₂ et sous 1 atm d'air) d'une électrode (fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques précédemment) modifiée avec la laccase de façon covalente. (La mesure est effectuée dans 50 mM tampon d'acétate, pH 4,2, 100 mM NaClO₄ à 0,2 V vs ECS)

Bibliographie

1. Baranton, S., and Bélanger, D. (2005) Electrochemical Derivatization of Carbon Surface by Reduction of in Situ Generated Diazonium Cations, *J. Phys. Chem. B* 109, 24401–24410.
2. Lyskawa, J., and Bélanger, D. (2006) Direct Modification of a Gold Electrode with Aminophenyl Groups by Electrochemical Reduction of in Situ Generated Aminophenyl Monodiazonium Cations, *Chem. Mater.* 18, 4755–4763.
3. Sahoo, P. K., Sharma, R., and Pattanayak, P. (2010) Synthesis and evaluation of 4-amino-5-phenyl-4H-[1,2,4]-triazole-3-thiol derivatives as antimicrobial agents, *Med Chem Res* 19, 127–135.
4. Plasmatreteat. The Plasmatreteater AS 400 Openair® plasma laboratory system. [En ligne] <http://www.plasmatreteat.co.uk/plasma_laboratory_systems.html> (consulté le 10/07/2012)
5. Plasmatreteat. Movement system for freely configurable treatment parameters such as spacings, etc. [En ligne] <http://www.plasmatreteat.co.uk/plasma_laboratory_systems.html> (consulté le 10/07/2012)
6. Pulpytel, J., Kumar, V., Peng, P., Micheli, V., Laidani, N., and Arefi-Khonsari, F. (2011) Deposition of Organosilicon Coatings by a Non-Equilibrium Atmospheric Pressure Plasma Jet: Design, Analysis and Macroscopic Scaling Law of the Process, *Plasma Processes and Polymers* 8, 664–675.
7. Vaz-Dominguez, C., Campuzano, S., Rüdiger, O., Pita, M., Gorbacheva, M., Shleev, S., Fernandez, V. M., and De Lacey, A. L. (2008) Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition, *Biosensors and Bioelectronics* 24, 531–537.
8. Jolivalt, C., Brenon, S., Caminade, E., Mougin, C., and Pontié, M. (2000) Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater, *Journal of Membrane Science* 180, 103–113.
9. Chollet, C., Chanseau, C., Brouillaud, B., and Durrieu, M. C. (2007) RGD peptides

grafting onto poly(ethylene terephthalate) with well controlled densities, *Biomolecular Engineering* 24, 477–482.

10. Ghasemi, M., Minier, M., Tatouliau, M., and Arefi-Khonsari, F. (2007) Determination of amine and aldehyde surface densities: application to the study of aged plasma treated polyethylene films, *Langmuir* 23, 11554–11561.
11. Heldt, J.-M., Fischer-Durand, N., Salmain, M., Vessières, A., and Jaouen, G. (2004) Preparation and characterization of poly(amidoamine) dendrimers functionalized with a rhenium carbonyl complex and PEG as new IR probes for carbonyl metallo immunoassay, *Journal of Organometallic Chemistry* 689, 4775–4782.
12. Masha GHASEMI. Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma. Thèse. Génie des procédés et haute technologie. Université Pierre et Marie Curie, 2007.
13. Christopher M. A. Brett and Ana Maria Oliveira Brett. (1994). *Electrochemistry, Principles, Methods, and applications*. New York : OXFORD UNIVERSITY PRESS
14. Tortolini, C., Rea, S., Carota, E., Cannistraro, S., and Mazzei, F. (2012) Influence of the immobilization procedures on the electroanalytical performances of *Trametes versicolor* laccase based bioelectrode, *Microchemical Journal* 100, 8–13.

CHAPITRE III

RESULTATS EXPERIMENTAUX

ET DISCUSSION

III.1. Réalisation d'une électrode enzymatique fonctionnalisée par réduction électrochimique d'un sel de diazonium

III.1.1. Caractérisation de l'électrode graphite

Les tiges de carbone graphite utilisées pour réaliser les électrodes ont été découpées en tronçons de 1 cm environ et leurs sections a été polie de deux façons différentes (cf. Chapitre II.1). On a donc travaillé avec des surfaces dites « rugueuses », qui ont été polies avec du papier abrasif de type P80, ou des surfaces dites « lisses », polies avec des particules de taille décroissante jusqu'à 1/4 μm . Ces deux types de surface ont été analysés par XPS.

Electrode	Pourcentage molaire (%)						
	O	N	C	Cl	Na	S	P
Electrode rugueuse	2,19	0,11	97,67	0,02	0,01	0	sous la limite de détection
Electrode lisse	9,35	0,65	89,72	0,04	0,10	0,12	0,02

Tableau 3.1 Répartition du pourcentage molaire des éléments à la surface de l'électrode.

Le tableau 3.1 présente la répartition du pourcentage molaire des éléments sur les électrodes à surfaces “lisses” et “rugueuses”. Nous constatons que la surface “lisse” est notoirement contaminée, puisque que les pourcentages molaires en O et N ainsi qu'en éléments mineurs, Na, Cl, S et P pour l'électrode “lisse” sont plus importants que pour l'électrode “rugueuse”. Sur l'électrode « rugueuse », on retrouve plus de 2% d'oxygène, ce qui pourrait résulter d'une oxydation consécutive au polissage.

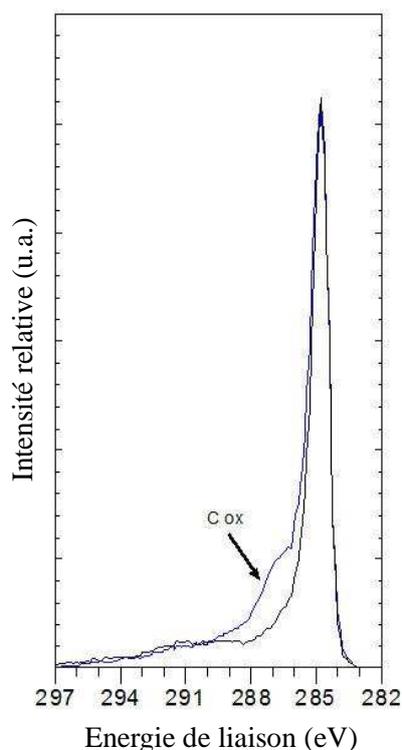


Figure 3.1 Spectre XPS des électrons C 1s d’une surface “lisse” (en bleu) et “rugueuse” (en noir) de l’électrode.

En comparant les pics C 1s des deux électrodes (voir figure 3.1), nous avons observé que le pic C_{1s} de l’électrode “lisse” est élargi à plus haute énergie de liaison par rapport à celui de l’électrode “rugueuse”. Cet élargissement du pic peut être attribué à la formation des liaisons C-N et/ou C-O, ce qui confirme le constat précédent.

La rugosité de la surface “rugueuse” (R_a) est déterminée par “Veeco Dektak 6M Stylus surface profiler”. La moyenne des valeurs de rugosité a été calculée en utilisant le logiciel de “Veeco 32m profiler”. La rugosité (R_a) de la surface “rugueuse” est de (2500 ± 250) nm. Nous avons principalement utilisé des électrodes “rugueuses” pour la fonctionnalisation et l’immobilisation de la laccase dans la suite des travaux, qui seront désignées par l’expression “électrodes nues” lorsqu’elles n’ont pas subi de traitement ultérieur à leur polissage, et utilisé comme contrôle lors d’expériences de fonctionnalisation ou d’immobilisation.

La surface électroactive de ces électrodes nues a été déterminée en étudiant le comportement électrochimique du ferrocyanure de potassium par voltammétrie cyclique (voir figure 3.2).

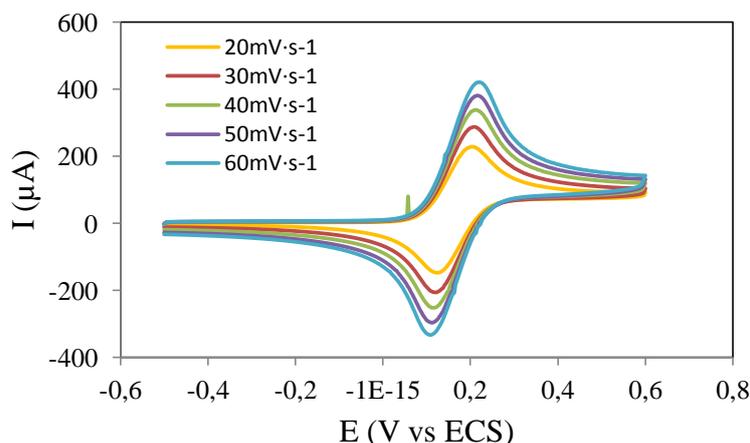


Figure 3.2 : Voltammétrie cyclique d'une électrode de CG nue dans $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ à 5×10^{-3} M dans KNO_3 (0,1 M)

On constate que le courant faradique (voir figure 3.3a) augmente avec la vitesse de balayage. La différence de potentiel entre le pic anodique et cathodique est toujours supérieure à 58 mV (voir 3.3b). Nous avons un système lent (irréversible) en raison de la rugosité de la surface de l'électrode, bien que le $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ soit un couple redox réputé rapide. Dans le cas d'un système lent, l'expression du courant de pic en régime de diffusion naturelle est donnée par la relation de Randles-Sevcik [1]:

$$i_p = (2,69 \times 10^5) \cdot \alpha^{\frac{1}{2}} \cdot n^{\frac{3}{2}} \cdot S \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot C \cdot v^{\frac{1}{2}} \quad (3.1)$$

avec i_p le courant exprimé en A, S la surface de l'électrode en cm^2 , C la concentration de l'espèce électroactive en $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$, la vitesse de balayage v en $\text{Volt} \cdot \text{s}^{-1}$, n le nombre d'électrons échangés, soit $n=1$ pour le couple ferro/ferricyanure, D le coefficient de diffusion du couple, soit: $D([\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]) = 6,32 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [2] et α le coefficient de transfert de charge.

Dans le cas d'un système lent, la courbe $E_p = f(\lg v)$ est une droite, la valeur absolue de la pente est de $0,03/\alpha$. A partir de la pente de cette droite (voir figure 3.4), la valeur de 0,88 a pu être déterminée pour α . Une moyenne a été prise pour les deux valeurs de α obtenus avec les courbes pour le potentiel anodique et cathodique.

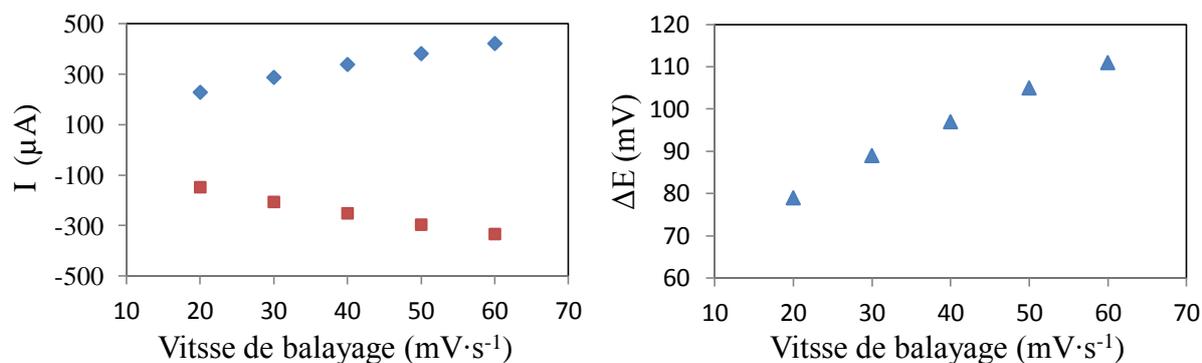


Figure 3.3 (a) Courant de pic faradique anodique (en bleu) et cathodique (en rouge) du ferrocyanure de potassium en fonction de vitesse de balayage. (b) $(E_{pa} - E_{pc})$ en fonction de la vitesse de balayage.

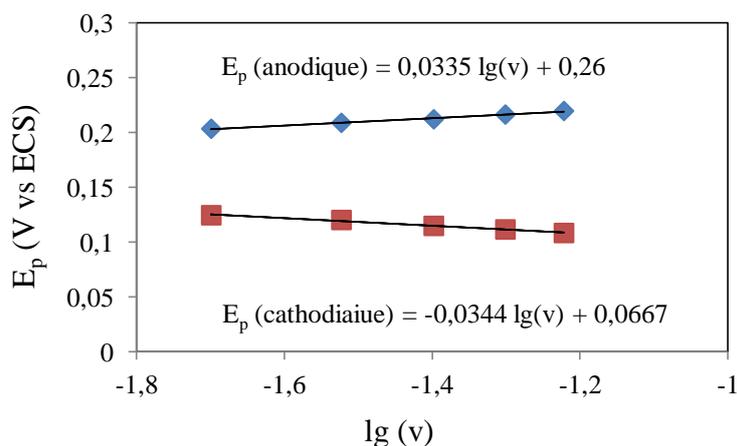


Figure 3.4 Potentiel anodique (en bleu) et cathodique (en rouge) du ferrocyanure de potassium en fonction de $\lg(v)$.

La surface « électroactive » de l'électrode peut être déterminée à partir de la pente (voir figure 3.5) de la droite $i_p = f(v^{\frac{1}{2}})$. La surface électroactive moyenne obtenue avec trois essais à partir des courants faradiques i_p est de $0,464 \pm 0,024 \text{ cm}^2$ pour une électrode de graphite nue, ce qui est faiblement supérieur à sa surface géométrique, soit $0,385 \text{ cm}^2$.

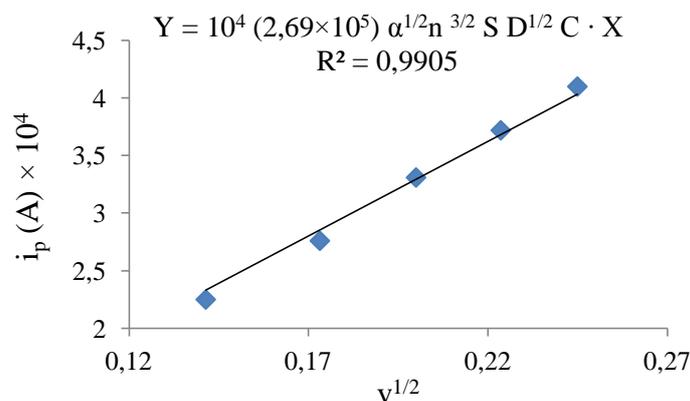


Figure 3.5 : Courant faradique en fonction de $v^{1/2}$

III.1.2. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode par réduction électrochimique de sel de diazonium

III.1.2.1. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode avec des groupements amines

La réduction du 4-nitrobenzene-diazonium a été réalisée par voltammétrie cyclique sur une électrode du graphite (CG) rugueuse. Lors du balayage en potentiel, un pic en réduction est visible à 0,49 V (voir figure 3.6). Cette valeur est élevée par rapport à d'autres expériences de réduction du 4-nitrobenzene-diazonium sur du carbone. Par exemple, Broosky et al. [3] observent deux pics en réduction autour de -0,2 V/Ag/Ag⁺ et 0,1 V/Ag/Ag⁺ sur le carbone traité par pyrolyse. Et Bélanger et al. [4] observe deux pics en réduction autour de 0,15 V et 0,5 V (vs Ag/AgCl) sur l'électrode de carbone vitreux. Une telle différence pourrait être due à des états de surface différente des carbones utilisés. Ce pic est attribué à la formation d'un radical aryl. Lors du deuxième cycle, le courant faradique cathodique est nettement plus faible comparé au premier cycle. Ceci est attribué au blocage de la surface dû à l'attachement du radical aryl [5] sur la surface par former une liaison covalente C-C. Les électrodes de carbone utilisées pour les analyses et expériences suivantes ont été fonctionnalisées en réalisant un seul cycle. Nous pouvons déterminer la charge totale lors de la réduction de diazonium par l'intégration du courant faradique du pic cathodique :

$$Q_{\text{tot}} = \int i_f(t) dt \quad (3.2)$$

La charge correspondant à l'attachement des nitrophényles peut être calculée par la formule :

$$Q_{\text{tot}} = F \cdot n(\text{nitrophényle}) \quad (3.3)$$

On calcule que le nombre de mole de diazonium qui ont été réduits est de $(1,71 \pm 0,04) \times 10^{-8}$ moles, soit un recouvrement Γ de $(4,44 \pm 0,10) \times 10^{-8}$ mol/cm².

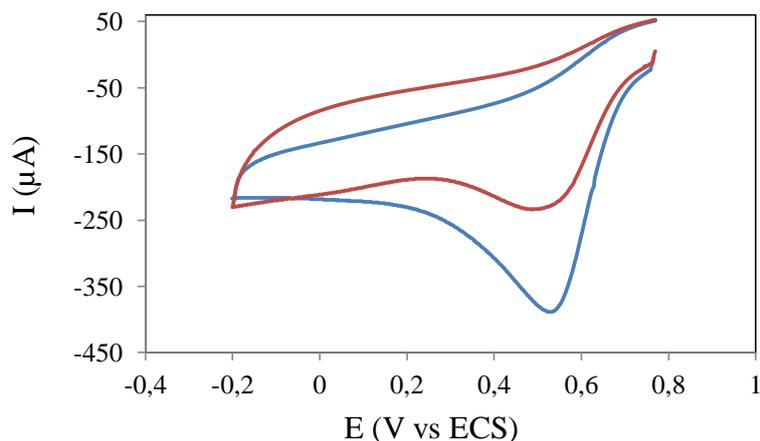


Figure 3.6 : Voltammétrie cyclique d'une électrode de carbone graphite nue dans 5×10^{-3} M de 4-nitrobenzene-diazonium tetrafluorobonate et 0,1 M de Bu_4NBF_4 ($v=50$ mVs⁻¹) dans l'acétonitrile (premier cycle en bleu et deuxième cycle en rouge).

Nous avons également réduit le 4-nitrobenzene-diazonium par chronoampérométrie pendant 30 secondes. Le potentiel imposé doit être au moins de 0,15 V inférieur au potentiel du pic de réduction observé par voltammétrie cyclique [6]. Nous avons donc choisi un potentiel de 0,25 V/ECS, ce qui est 0,24 plus faible que le pic de réduction. La figure 3.7 représente le courant de la réduction de diazonium en fonction du temps. Nous pouvons déterminer la charge totale lors de la réduction par l'intégration du courant par la formule 3.1. Nous avons également calculé le nombre de moles des nitrophényles attachés à la surface d'électrode : $(7,4 \pm 0,4) \times 10^{-8}$ moles, soit un recouvrement Γ de $(1,9 \pm 0,1) \times 10^{-7}$ mol/cm².

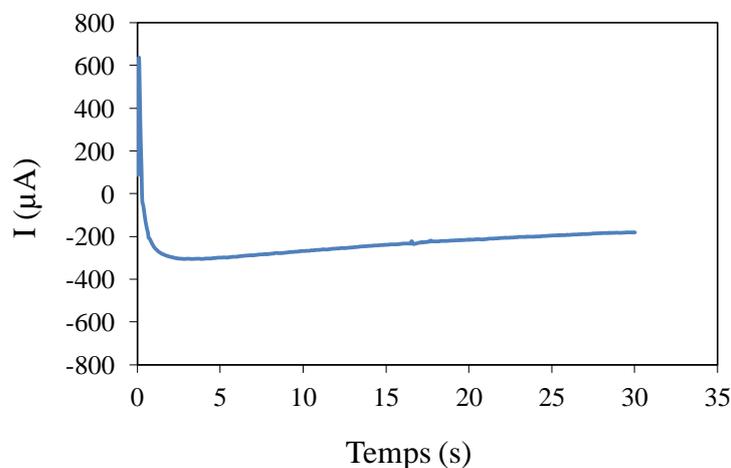


Figure 3.7 Chronoampérométrie d'une électrode de carbone graphite nue dans 5×10^{-3} M de 4-nitrobenzene-diazonium tetrafluorobonate et 0,1 M de Bu_4NBF_4 ($v=50$ mVs⁻¹) en milieu acétonitrile.

Avec les deux méthodes de réduction du 4-nitrobenzene-diazonium, nous avons un recouvrement qui est supérieur à celui d'une monocouche compacte de nitro phényles $1.2 \times 10^{-9} \text{ mol/cm}^2$ [7] ou de phényles : $6,7 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ [8]. Et le recouvrement est moins important par la méthode de voltammétrie cyclique. On n'a pas pu faire de mesures de l'épaisseur de la couche déposée car la surface n'est pas plane, on ne peut donc pas utiliser des méthodes comme l'AFM. Mais d'après la littérature[3], les mesures qui ont été réalisées sur des surfaces de carbone planes montrent que l'épaisseur de la couche atteint une limite autour de 5-6 nm quelque soit la durée du dépôt par chronampérométrie.

Après dépôt de la couche de nitrobenzène par réduction du sel de diazonium correspondant, deux cycles de balayage en potentiel ont ensuite été réalisés entre 0,02V et -1,38V (vs SCE) à une vitesse de $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ afin de réduire les groupements nitro des cycles phényles attachés à la surface de l'électrode. Lors du premier cycle, un pic de réduction irréversible est visible à 0,97 V (voir figure 3.8). Ce pic est attribué à la réduction de groupement nitro ($-\text{NO}_2$) en groupement amine ($-\text{NH}_2$) et hydroxylamine ($-\text{NHOH}$). Ce pic disparaît au deuxième cycle. Cela indique qu'il n'y a pas de réduction de groupements nitro lors du second cycle.

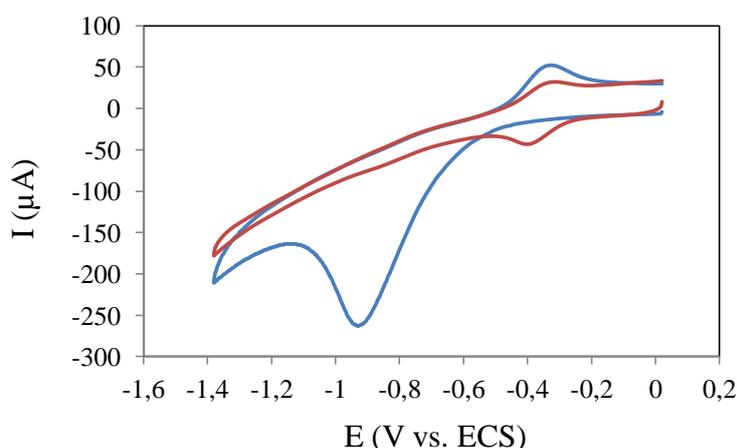


Figure 3.8 : Réduction des groupements nitro dans une solution EtOH : H₂O (1:9, v/v) contenant 0,1 M de KCl (premier cycle en bleu et deuxième cycle en rouge) sur l'électrode où des nitrophényles ont été attachés par réduire le 4-nitrobenzene-diazonium avec voltammétrie cyclique. Vitesse de balayage $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

1. Détermination des groupements amines par l'intégration coulométrique du pic cathodique

Les groupements nitro des phényles attachés à la surface de l'électrode sont réduits pendant deux cycles de balayage en potentiel entre 0 V et -1,4 V (vs SCE). Au premier cycle, les groupements nitro sont réduits en $-\text{NHOH}$ selon:



Une partie des groupements –NHOH sont réduits en –NH₂ au cours de ce même balayage en réduction:



Nous pouvons obtenir une équation globale pour la réduction de –NO₂ en –NH₂ au premier cycle :



Le pic cathodique du premier cycle correspond à la formation groupements –NH₂ et –NHOH. Nous pouvons obtenir la charge totale lors de la réduction irréversible par l'intégration du courant faradique:

$$Q_{\text{tot}} = \int i_f(t) dt \quad (3.1)$$

Or la charge totale est la somme de deux charges :

$$Q_{\text{tot}} = Q (-\text{NHOH}) + Q (-\text{NH}_2) \quad (3.7)$$

Les charges correspondantes à la formation de groupements –NH₂ et –NHOH peuvent être calculées par les formules 3.8 et 3.9 obtenues à partir des équations 3.4 et 3.6 respectivement:

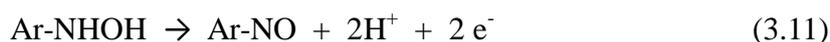
$$Q (-\text{NHOH}) = 4 \cdot F \cdot n (-\text{NHOH}) \quad (3.8)$$

$$Q (-\text{NH}_2) = 6 \cdot F \cdot n (-\text{NH}_2) \quad (3.9)$$

La charge totale du pic cathodique du premier cycle s'écrit donc:

$$Q_{\text{tot}} = 4 \cdot F \cdot n (-\text{NHOH}) + 6 \cdot F \cdot n (-\text{NH}_2) \quad (3.10)$$

Les groupements –NHOH qui ne sont pas réduits au premier cycle sont oxydés en groupes nitroso –N=O lors du balayage en oxydation selon[5]:



Cette réaction est réversible. Le pic caractéristique de la réduction des groupements nitroso lors du deuxième cycle permet d'obtenir la charge échangée lors de l'oxydation réversible des hydroxylamines par intégration du courant faradique selon la formule 3.1.

Le nombre de groupements hydroxylamine est relié à la charge du pic anodique ou cathodique correspondant à l'oxydation du groupement NHOH, ou à sa réduction, respectivement, par la relation 3.12 :

$$Q(-\text{NHOH}) = 2 \cdot F \cdot n(-\text{NHOH}) \quad (3.12)$$

$Q(-\text{NHOH})$ et Q_{tot} sont déterminées par l'intégration coulométrique du pic cathodique, et on en déduit donc $n(-\text{NHOH})$ et $n(-\text{NH}_2)$ grâce aux équations 3.10 et 3.12 [9]. La densité Γ des groupements $-\text{NH}_2$ et $-\text{NHOH}$ à la surface de l'électrode peut ensuite être calculée à partir de la formule suivante :

$$\Gamma = \frac{n}{S} \quad (3.13)$$

où n est exprimé en mole, S en cm^2 et Γ en mol/cm^2 .

Sur l'électrode où le 4-nitrobenzene-diazonium a été réduit par voltammétrie cyclique à l'étape de l'attachement des nitrophényles (voir figure 3.6). On obtient des recouvrements de $(5,5 \pm 1,3) \times 10^{-9} \text{ mol}/\text{cm}^2$ pour $-\text{NHOH}$ et $(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-8} \text{ mol}/\text{cm}^2$ pour le groupement $-\text{NH}_2$. $\Gamma(-\text{NH}_2)$ est donc deux à quatre fois plus important que $\Gamma(-\text{NHOH})$. On peut donc en déduire que la densité de groupements nitro réduits est de $(1,8 \pm 0,1) \times 10^{-8} \text{ mol}/\text{cm}^2$, ce qui correspond à la densité de groupements fonctionnels à la surface de l'électrode.

2. Détermination colorimétrique des groupements amines

La densité des groupements amines à la surface de l'électrode de carbone a également été déterminée en utilisant l'ester 3-(2-pyridyldithio) propionic acid N-hydroxysuccinimide (SPDP). Le protocole a été décrit dans chapitre II.2.5.3.1. La figure 3.9 représente le principe de cette méthode.

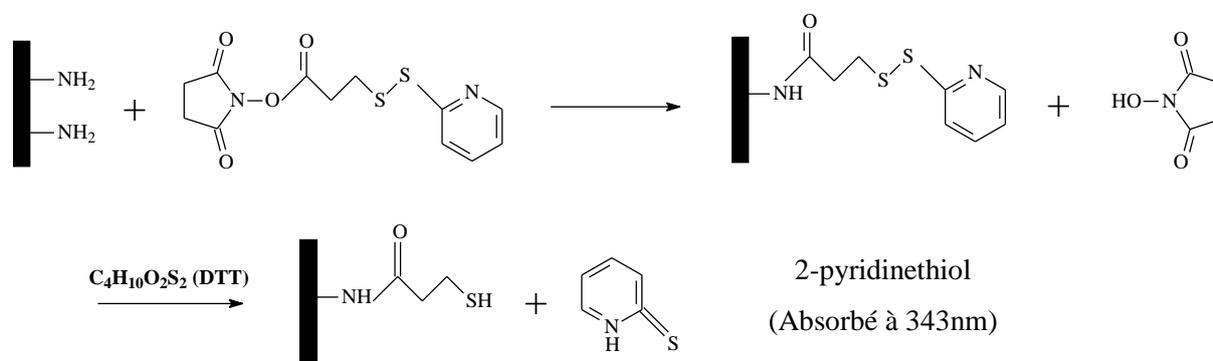


Figure 3.9 Principe de la méthode de détermination des groupements amines avec SPDP.

Les expériences ont montré que l'absorbance de la 2-pyridinethiol mesurée en présence de l'électrode fonctionnalisée après réduction des groupements nitros est plus faible que celle obtenue avec l'électrode de contrôle qui a été fonctionnalisée de selon le même protocole

mais sans réduction des groupements nitro (voir figure 3.10). Ce résultat peut s'expliquer par la dégradation de la couche de nitrophényles lors de l'étape de greffage du SPDP, qui a été réalisée dans le diméthylformamide. Cela est déduit selon une expérience qui sera détaillée dans la suite du manuscrit. L'électroactivité du ferrocyanure a été étudiée sur l'électrode fonctionnalisée par la réduction des 4-carboxybenzène-diazonium après traitement de l'électrode fonctionnalisée pendant 1 heure dans le DMF. Ces expériences ont montré que l'électroactivité de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ augmente considérablement après avoir traité l'électrode fonctionnalisée dans le DMF. Le DMF dégrade donc la couche fonctionnelle formée par la réduction de diazonium. Cette méthode ne permet donc pas de déterminer les groupements amines.

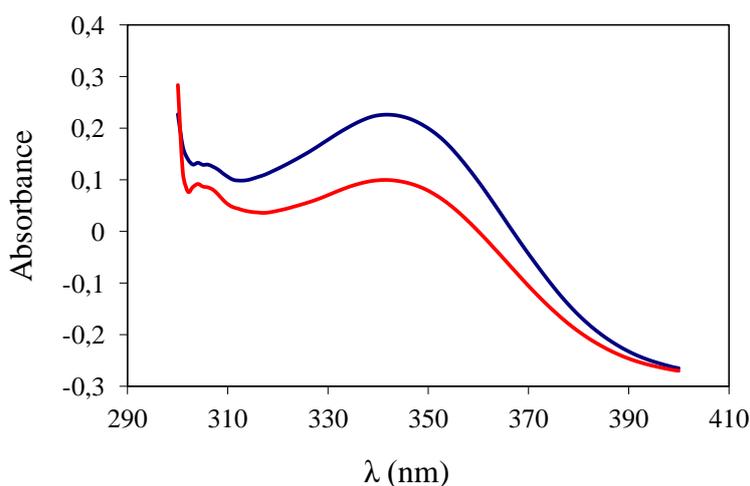


Figure 3.10 Absorbance de 2-pyridinethiol relargué de l'électrode fonctionnalisée avec les groupements amines (en rouge) et nitro (bleu) à 343nm.

3. Détermination des groupements amines avec une sonde ferrocène aldéhyde

Comme la méthode de SPDP ne permet pas de déterminer des groupements amines à la surface de l'électrode, nous avons utilisé une autre méthode chimique en utilisant un ferrocène fonctionnalisé par une fonction aldéhyde susceptible de réagir sur les fonctions amines de la surface de l'électrode pour former une base de Schiff (voir chapitre II.5.3.2). Le ferrocène couplé de façon covalente à la surface sert alors de sonde électrochimique. La figure 3.11 représente les pics redox de ferrocène aldéhyde libre dans la solution de KNO_3 sur une électrode nue.

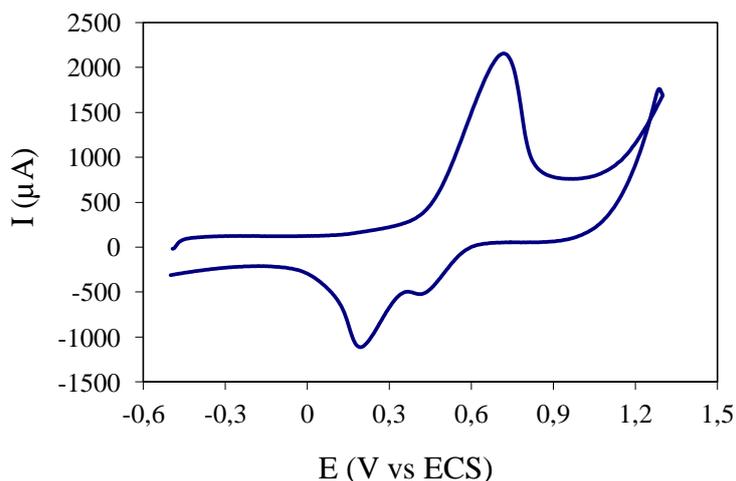


Figure 3.11 Voltammétrie cyclique d'une électrode nue dans la solution de ferrocène aldéhyde contenant 0,1 M de KNO_3 .

L'électroactivité de l'électrode après l'immobilisation du ferrocène aldéhyde a été mesurée dans la solution contenant le support d'électrolyte KNO_3 . Les pics redox en réduction et en oxydation du ferrocène sont attendus respectivement à 0,2 V et 0,7 V. Néanmoins, aucun pic n'a été observé (voir figure 3.12). Cette méthode ne permet pas de déterminer la densité des groupements amines à la surface de l'électrode.

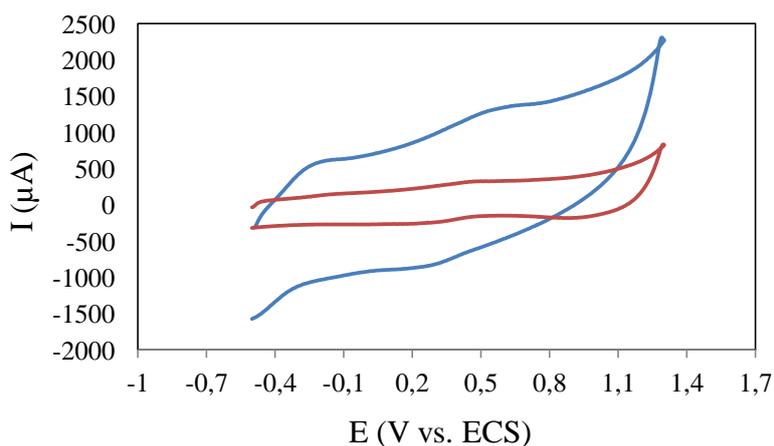


Figure 3.12 : Voltammétrie cyclique d'une électrode de graphite fonctionnalisée avec les groupements amines (en bleu) et ferrocène (en rouge) dans 0,1 M de KNO_3 ($v=200 \text{ mVs}^{-1}$).

4. Caractérisation des surfaces fonctionnalisées par XPS

Nous avons caractérisé la surface de l'électrode fonctionnalisée avec les groupements amines par XPS pour confirmer la présence des groupements fonctionnels.

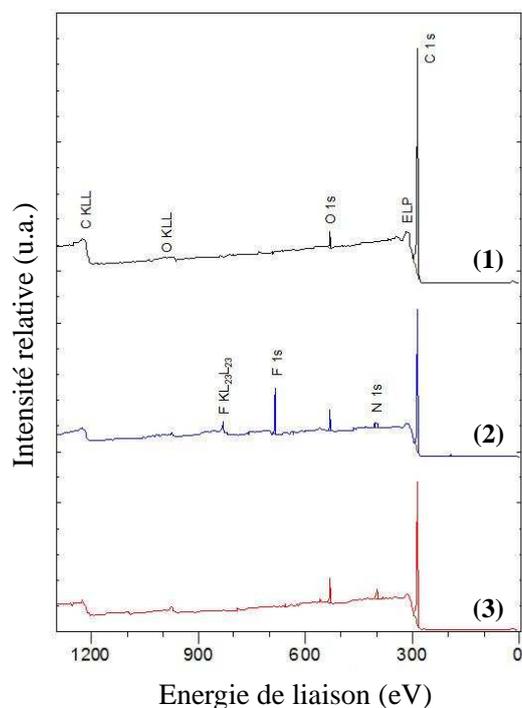


Figure 3.13 Spectre XPS de la surface de l'électrode (1) nue, (2) fonctionnalisée avec les nitrophényles et (3) après la réduction des groupements nitros du nitrophényles.

La figure 3.13 présente le spectre général analysé entre 0 et 1300 eV de la surface de l'électrode nue (1), fonctionnalisée avec les nitrophényles (2) et après la réduction des groupements nitros du nitrophényle (3). On détecte sur le spectre des électrodes (2) et (3) l'augmentation de l'intensité du pic d'azote par rapport au spectre de l'électrode (1), ce qui montre la fonctionnalisation de la surface de l'électrode. Nous avons également observé l'apparition du pic de fluor sur l'électrode fonctionnalisée avec les nitrophényles. Ce pic doit provenir du résidu de Bu_4NBF_4 à la surface de l'électrode qui est le support d'électrolyte au cours de la réduction du 4-nitrobenzène-diazonium.

L'électrode nue présente un pourcentage molaire d'azote quasiment nul ($N_{\text{tot}}/C_{\text{tot}} = 0,001$). Le rapport des pourcentages molaires d'azote/carbone augmente jusqu'à 0,036 après la réduction de 4-nitrobenzène-diazonium (tableau 3.2). Cela peut être interprété comme la présence des nitrophényles à la surface de l'électrode. Après l'étape de réduction des groupements nitro, ce rapport est de 0,040. Cette valeur est très proche de celle à la surface de nitrophényle. En effet, la réduction des groupements nitro ne modifie pas le pourcentage molaire de l'azote.

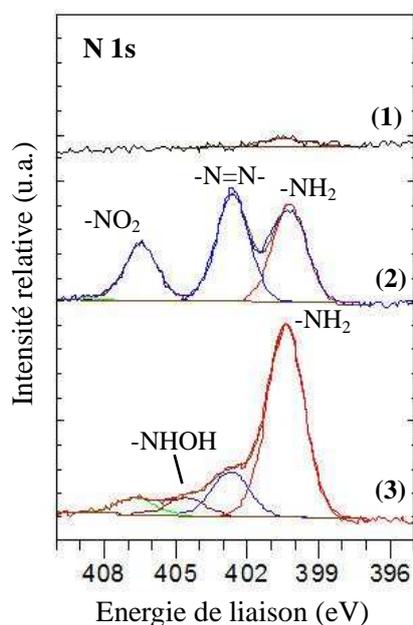


Figure 3.14 Spectre XPS des électrons N1s de la surface de l'électrode (1) nue, (2) fonctionnalisée avec les nitrophényles et (3) après la réduction des groupements nitros.

La déconvolution du pic N1s au spectre permet d'effectuer une analyse plus fine des liaisons chimiques présentées à la surface. Le spectre après réduction du 4-nitrobenzene-diazonium montre la présence des groupements nitro (N1 à 406,2 eV) [10],[5]. Nous avons observé le pic correspondant aux groupements amines (N4 à 400,1 eV) [8] sur la surface de l'électrode (3), ce qui montre qu'une partie des groupements nitro ont été réduit en groupement amine. A noter qu'ici, nous pouvons également observer ce pic sur la surface de l'électrode (2). Dans la littérature, la présence de ce pic s'explique par la réduction des groupements nitro en groupements amines sous le faisceau de rayons X dans la chambre d'analyse XPS au cours de la mesure [11], [4]. Le spectre indique également un pic à 402,4 eV (N3). Compte-tenu de la capacité du cation de diazonium à se coupler avec un autre cycle aromatique et à former un azobenzène, ce pic correspondrait aux groupements azo à la surface [12],[13].

Energie de liaison (eV)	-NO ₂ (N1)	-NHOH (N2)	-N=N- (N3)	-NH ₂ (N4)	N _{tot}	N _{tot} /C _{tot}
	406,4	404,5	402,6	400,4		
Electrode	Pourcentage molaire (%)					
nue	-	-	-	0,11	0,11	0,001
fonctionnalisée avec les nitrophényles	0,81	-	1,56	1,43	2,99	0,036
après la réduction des groupements nitros	0,26	0,28	0,69	2,96	3,65	0,040

Tableau 3.2 Répartition du pourcentage molaire des composantes du pic N 1s.

Après réduction des groupements nitro, on observe que l'aire de la composante N1 (-NO₂) décroît, alors que l'aire de composante N4 (-NH₂) augmente. De plus, nous observons la formation de groupements -NHOH (N3 à 404,5 eV). Cela montre la réduction des groupements nitro en -NH₂ et -NHOH.

Sur l'électrode après la réduction des groupements nitros, les pourcentages molaires du group amine et nitro sont de 2,96 et 0,28 respectivement. La quantité de -NH₂ réduit à partir de -NO₂ des nitrophényle est 10,6 fois plus importante que celle de -NHOH, ce qui est plus important que le résultat obtenu avec par mesure de la charge échangée lors de l'étape de réduction des groupements nitros. Cela peut s'expliquer par le fait que le pourcentage de -NH₂ est surestimé à cause de la réduction des groupements nitro dans la chambre d'analyse XPS au cours de la mesure. En effet, les groupements nitros ont été partiellement réduits à l'étape de réduction électrochimique.

III.1.2.2. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode avec des groupements carboxyliques par la réduction des 4-carboxybenzène-diazonium

La surface des électrodes a été fonctionnalisée avec des groupements carboxyliques par réduction du 4-carboxybenzène diazonium selon deux protocoles :

Protocole A : le diazonium synthétisé préalablement a été dissout dans la cellule électrochimique puis réduit en milieu aqueux (H₂SO₄, 0,1 M).

Protocole B : le diazonium a été synthétisé in situ dans la cellule électrochimique 15 minutes avant l'étape de réduction, en milieu aqueux (HCl 0,5 M) [13],[4]selon le protocole ci-dessous :

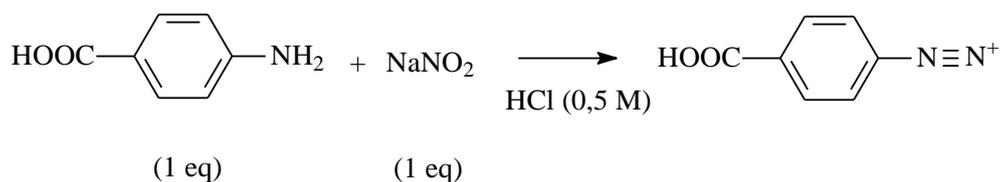


Figure 3.15 : Génération in situ des cations de 4-carboxybenzène-diazonium.

Lors de l'étape de réduction du diazonium, deux pics de réduction sont visibles à -0.24 V et 0.21 V (voir figure 3.16) qui sont attribués à la formation d'un radical aryl qui forme ensuite une liaison covalente avec le carbone à la surface. Le pic de réduction à -0,24 V correspond à la réduction de diazonium libre dans la solution, alors que le pic à 0,21 V est attribué à la réduction de diazonium adsorbé à la surface de l'électrode. Si on réalise un deuxième cycle, le

courant faradique cathodique est significativement plus faible comparé au premier cycle. Ceci confirme le blocage de la surface dû à l'attachement du radical aryl sur la surface. Les électrodes de carbone utilisées pour les analyses et expériences suivantes ont été fonctionnalisées en réalisant un seul cycle.

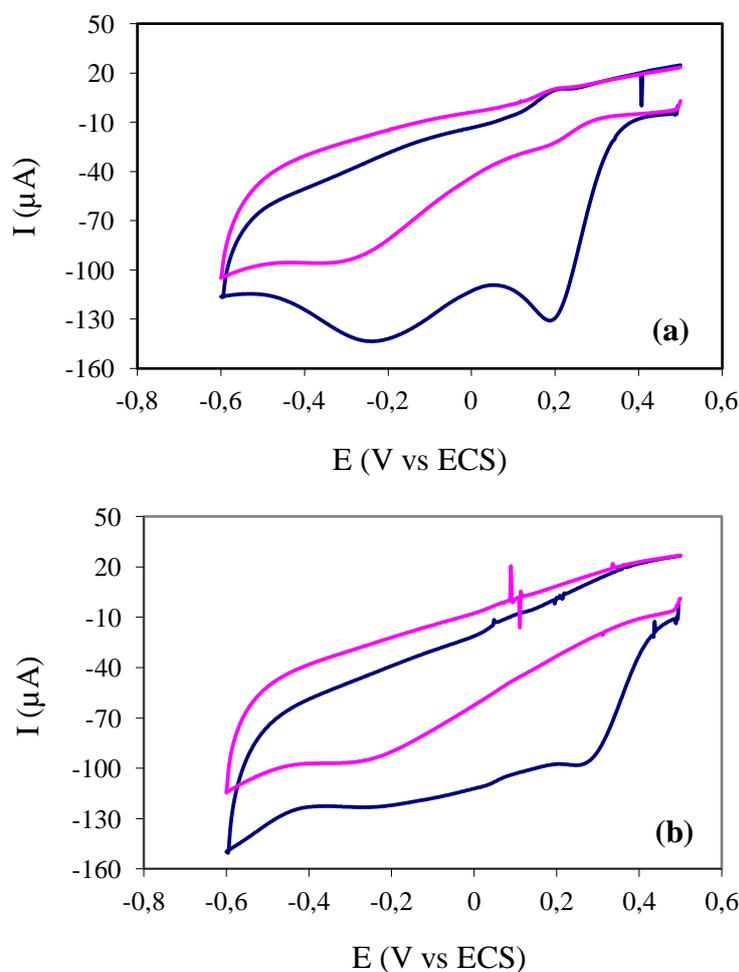


Figure 3.16 : Réduction du 4-carboxybenzène-diazonium (a) généré in situ (5×10^{-3} M), (b) synthétisé préalablement (5×10^{-3} M) à la surface d'une électrode de carbone graphite nue en milieu aqueux ($v=50 \text{ mVs}^{-1}$, premier cycle en bleu et deuxième cycle en rose).

1. Etude du blocage de la surface

L'électroactivité de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ a été étudiée par voltammétrie cyclique entre -0,5 V et 0,6 V sur l'électrode nue et celle modifiée. Le couple ferri/ferrocyanure ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) a un potentiel rédox de 0,19 V (vs ECS). Sur l'électrode nue, les pics en oxydation et en réduction de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ sont visibles à 0,22 V et 0,13 V (vs ECS), respectivement. On constate que l'intensité de ces pics diminue de façon importante sur les électrodes modifiées. Cela montre que la surface est partiellement bloquée par les groupements fonctionnels.

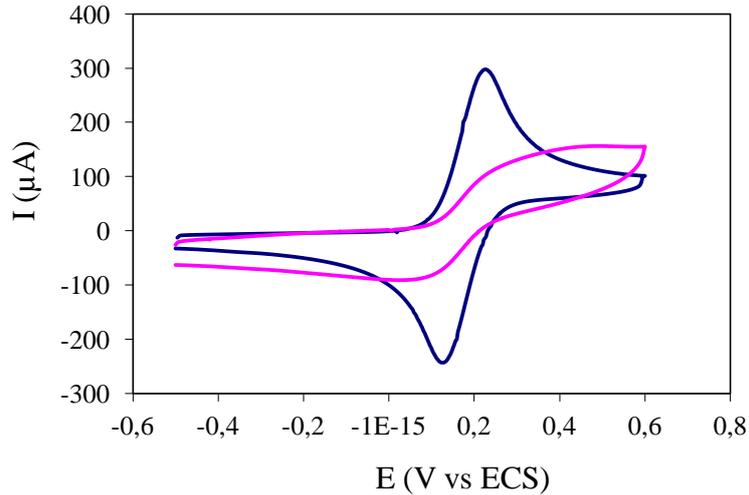


Figure 3.17: Voltammétrie cyclique d'une électrode de CG nue (bleu) et d'une électrode fonctionnalisée par groupements carboxyliques (rose, avec protocole B) dans $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ à 5×10^{-3} M dans 0,1 M de KNO_3 ($v=50 \text{ mVs}^{-1}$).

2. Etude de stabilité de la couche fonctionnelle dans le solvant organique

L'électrode fonctionnalisée par groupements carboxyliques avec protocole B a été trempée dans diméthylformamide pendant une heure. Et puis nous avons contrôlé l'électroactivité du ferrocyanure sur l'électrode. Nous avons constaté que l'électroactivité de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ a augmenté considérablement après traitement de l'électrode fonctionnalisée dans le DMF. Le DMF dégrade donc la couche fonctionnelle formée par la réduction de diazonium. Cela peut expliquer l'échec de la méthode de déterminer les groupements amines sur l'électrode avec SPDP dans les paragraphes III.1.2.1.2. C'est également la raison pour laquelle nous avons choisi d'effectuer les réactions de fonctionnalisation de la surface de l'électrode avec les groupements hydrazides en milieu aqueux.

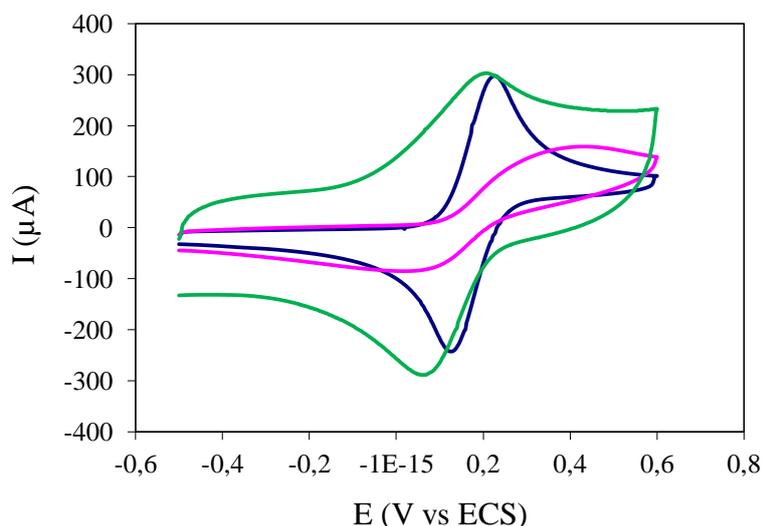


Figure 3.18 Voltammétrie cyclique d'une électrode de CG nue (bleu) et d'une électrode fonctionnalisée modifiée par groupements carboxyliques avec protocole B avant (rose) et après (vert) le traitement dans le DMF pendant 1 heure (mesure dans $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ à 5×10^{-3} M dans 0,1 M de KNO_3 , $v=50 \text{ mVs}^{-1}$).

3. Détermination colorimétrique des groupements carboxyliques

Nous avons utilisé la molécule sonde toluidine bleue, un colorant qui absorbe à 633 nm, pour déterminer la quantité de groupements carboxyliques à la surface de l'électrode (voir chapitre II.5.2). En milieu basique, les groupements carboxyliques à la surface de l'électrode sont déprotonnés et alors chargés négativement. Les colorants chargés positivement peuvent s'accrocher aux groupements carboxyliques par interaction électrostatistique. En milieu acide, les groupements carboxyliques ne sont plus chargés et les colorants accrochés sur les groupements carboxyliques sont relargués dans la solution d'acide acétique (voir figure 3.19). L'absorbance de cette solution est mesurée à $\lambda=633 \text{ nm}$ au spectrophotomètre UV-visible. La quantité de groupements carboxyliques sur la surface peut alors être calculée en supposant que 1 mole de TBO s'accroche sur 1 mole de groupements carboxyliques.

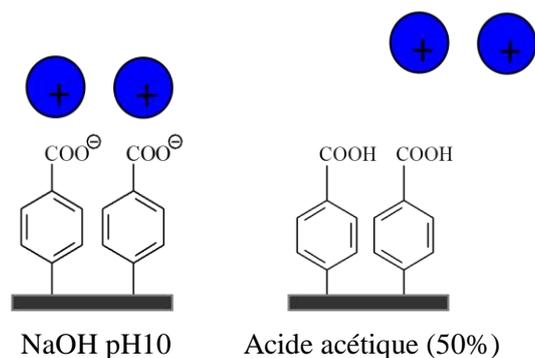


Figure 3.19 Le principe de détermination des groupements carboxyliques avec toluidine bleue.

Nous avons obtenu une densité de $(1,1 \pm 0,2) \times 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour les groupements carboxyliques à la surface fonctionnalisée à partir de 4-carboxybenzène-diazonium synthétisé préalablement. Par contre, nous avons une densité plus importante $(1,91 \pm 0,15) \times 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ à la surface fonctionnalisée à partir du diazonium généré in situ, ce qui est seize fois plus que la valeur de densité calculée pour une couche dense de nitrophényles : $1,2 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ [7]. Cette valeur élevée de la densité de groupements fonctionnels pourrait provenir du fait que la surface réelle du carbone est très supérieure à la surface géométrique du carbone graphite et même celle déterminée électrochimiquement, comme le laisse supposer les images de microscopie qui montrent une surface très rugueuse. Toutefois, en l'absence de données précises sur la surface réelle de l'électrode, on peut également émettre l'hypothèse que des multicouches pourraient s'être déposées à la surface.

4. Caractérisation des surfaces fonctionnalisées par XPS

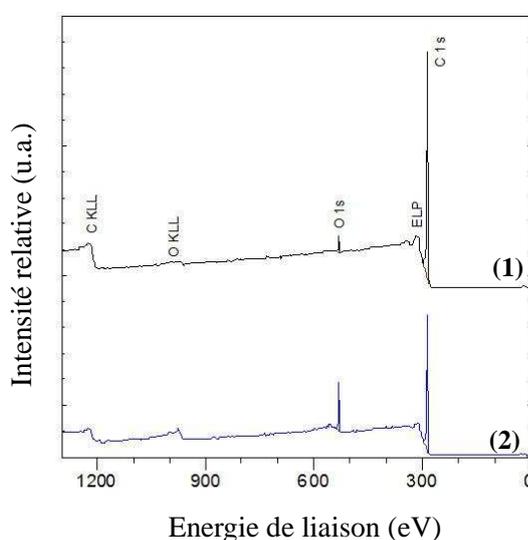


Figure 3.20 Spectre XPS de la surface de l'électrode (1) nue, (2) fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques par protocole B.

La figure 3.20 présente le spectre général analysé entre 0 et 1300 eV de la surface des électrodes nue et fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques par protocole B. L'électrode nue présente un faible pourcentage molaire d'oxygène ($O_{\text{tot}}/C_{\text{tot}} = 0,02$) dû à des contaminations extérieures lors de la procédure de polissage qui oxyde le carbone à la surface en créant les groupements carboxyliques. Cette valeur augmente jusqu'à respectivement 0,116 et 0,058 après la réduction de 4-carboxybenzène-diazonium généré in situ et synthétisé

préalablement. Ces résultats sont la conséquence de la fonctionnalisation de la surface de l'électrode. Les groupements carboxyliques obtenus à partir de diazonium généré in situ présente une densité plus importante. Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus avec la méthode TBO.

La figure 3.21 présente le spectre de O 1s après déconvolution. On observe que les pics correspondant aux liaisons C-O (O1 à 533,6 eV) et C=O (C2 à 532,4 eV) [14] ont une intensité significativement plus importante à la surface fonctionnalisée que sur la surface sans traitement. De plus les intensités des deux pics sont presque identiques. Cela indique la présence des groupements carboxyliques à la surface fonctionnalisée.

Si on suppose que la surface est recouverte d'une multicouche de groupements carboxybenzène, le rapport O/C mesuré par XPS devrait être du même ordre que celui représentatif de la structure de ce groupement, qui contient deux atomes d'oxygène pour sept atomes de carbone, soit un rapport de $2/7=0,28$. Or le rapport O/C mesuré par XPS n'est au plus que de 0,116. Comme d'autre part on observe après fonctionnalisation que le pic du carbone garde sa forme caractéristique dissymétrique du carbone graphite, on peut penser que la couche déposée sur la surface est inférieure à 10 nm, profondeur maximale détectée par XPS.

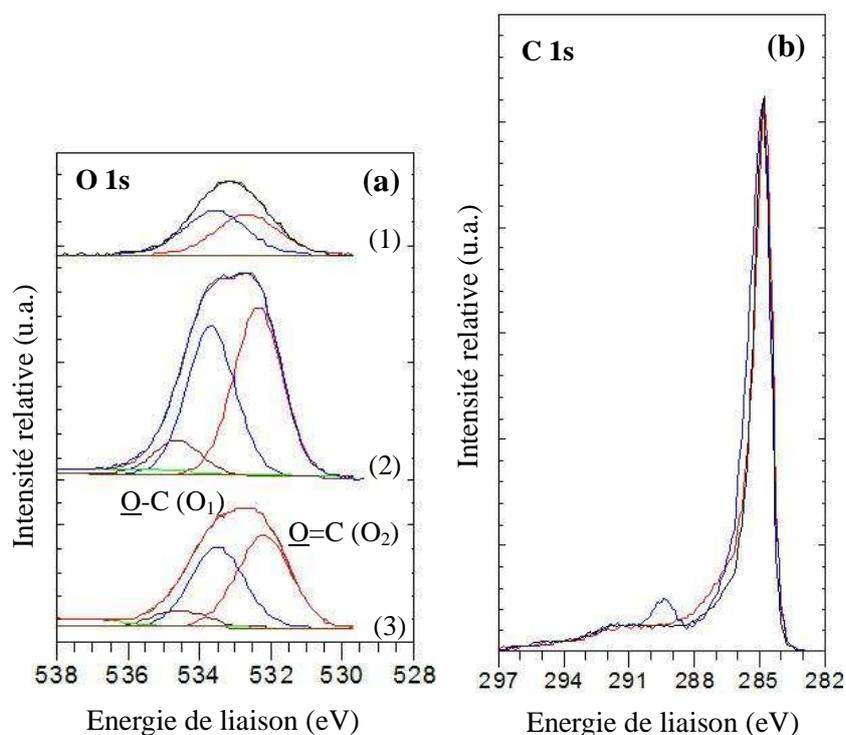


Figure 3.21 : Spectre XPS des électrons O 1s et C 1s de la surface de l'électrode nue (1 et en noir à droite) et fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques par la réduction de 4-carboxybenzène-diazonium généré in situ (2 et en bleu à droite) et synthétisé préalablement (3 et en rouge à droite).

Energie de liaison (eV)	O-C	O=C	O _{tot}	O _{tot} /C _{tot}
		533,6	532,4	-
Electrode	Pourcentage molaire (%)			
nue	1,12	0,98	2,19	0,02
après la réduction de diazonium (génééré in situ)	4,08	4,64	10,23	0,116
après la réduction de diazonium (synthétisé préalablement)	2,13	2,45	5,45	0,058

Tableau 3.3 Répartition du pourcentage molaire des composantes du pic O 1s.

5. MEB

La comparaison des photos de l'électrode nue et fonctionnalisée montre que la morphologie de la surface n'a pas été modifiée de façon remarquable.

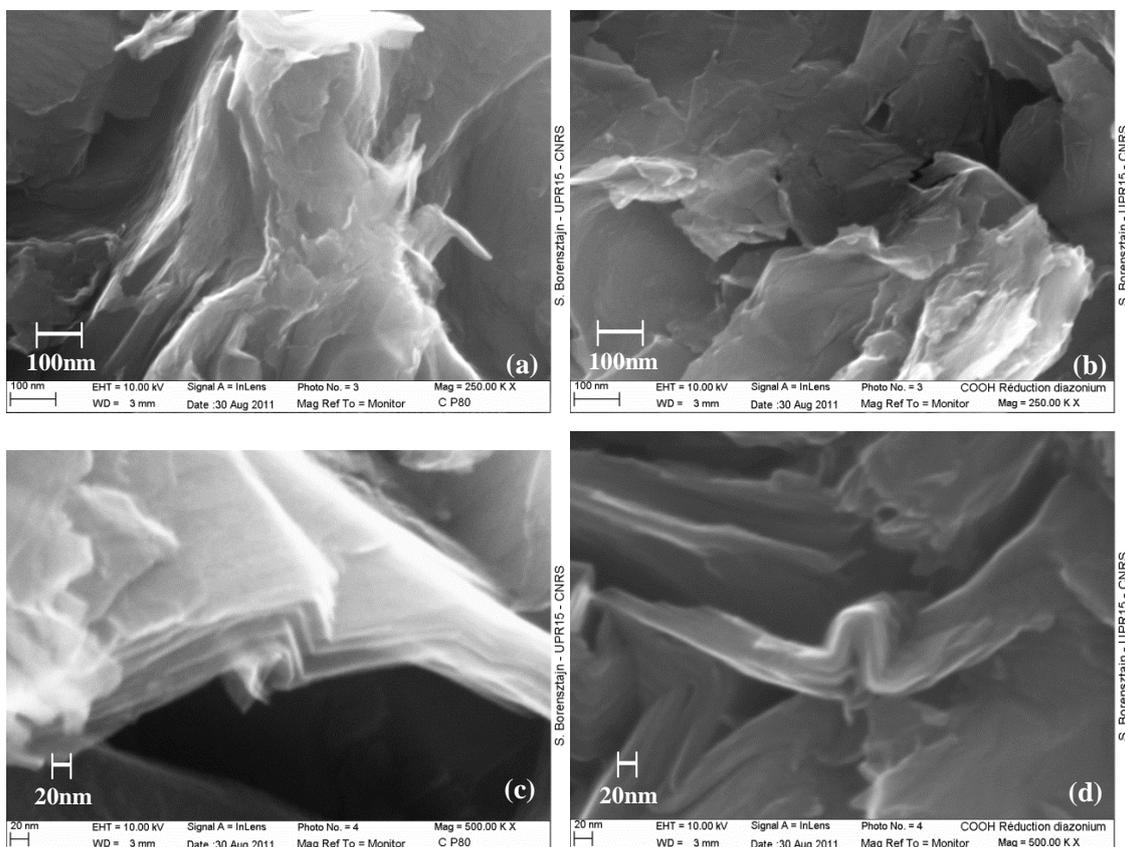


Figure 3.22 Micrographies MEB d'une surface de l'électrode non traitée (a), (c) et fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques(b), (d).

III.1.2.3. Fonctionnalisation de la surface d'électrode avec des groupements hydrazide

L'électrode a été fonctionnalisée avec des groupements hydrazide par réaction de l'hydrazine (protégée ou non) sur deux type de groupements à la surface de l'électrode, soit un ester méthylique immobilisé par réduction du diazonium correspondant (méthode 1 sur la figure 3.23), soit directement sur le groupement carboxylique activé (méthode 2 sur la figure 3.24).

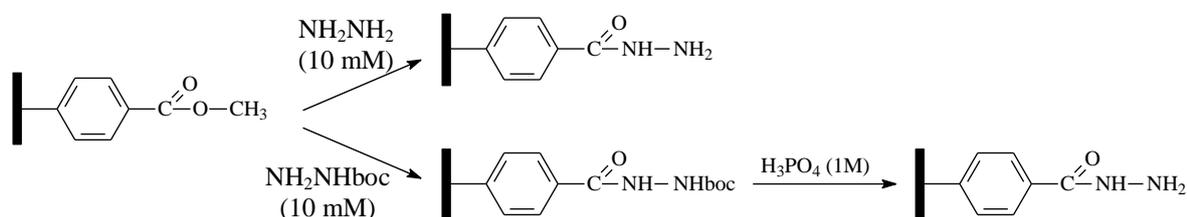


Figure 3.23 Formation de la fonction hydrazide à la surface fonctionnalisée avec l'ester méthylique (méthode 1).

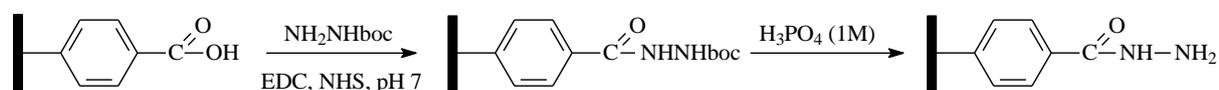


Figure 3.24 : Formation de la fonction hydrazide à la surface fonctionnalisée avec un groupement carboxylique (méthode 2).

III.1.2.3.1. Méthode 1

▪ *Fonctionnalisation de la surface de l'électrode avec l'ester méthylique*

Afin de fonctionnaliser la surface de l'électrode avec l'ester méthylique, le diazonium généré in situ à partir méthyl 4-aminobenzoate a été réduit sur l'électrode. Nous pouvons observer les deux pics de réduction à -0,20 V et 0,18 V (voir figure 3.25). Le courant faradique cathodique au deuxième cycle est plus faible comparé au premier cycle. Un seul cycle a été réalisé pour fonctionnaliser les électrodes utilisées pour les analyses et expériences suivantes.

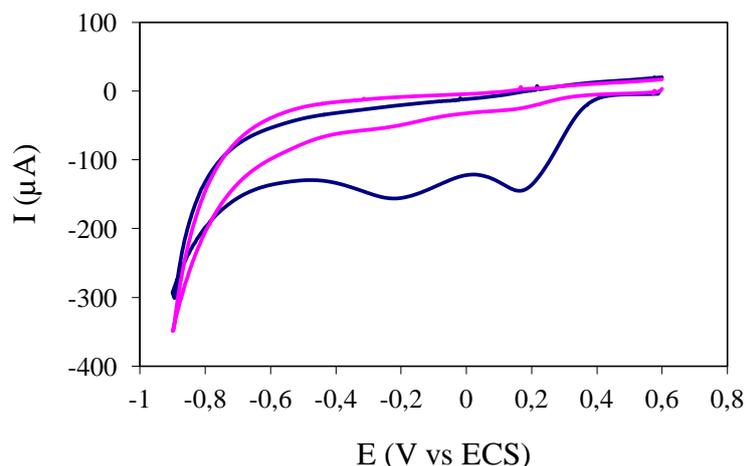


Figure 3.25 : Réduction du 4-(methoxycarbonyl)benzene diazonium (5×10^{-3} M) à la surface d'une électrode de carbone graphite nue en milieu aqueux ($v=50 \text{ mVs}^{-1}$, premier cycle en bleu et deuxième cycle en rose).

La présence de la couche fonctionnelle à la surface peut être vérifiée par le suivi de l'électroactivité de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ par voltammétrie cyclique. La surface est partiellement bloquée par les groupements fonctionnels, parce que l'intensité des pics en oxydation et en réduction de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ diminue de façon importante sur l'électrode fonctionnalisée.

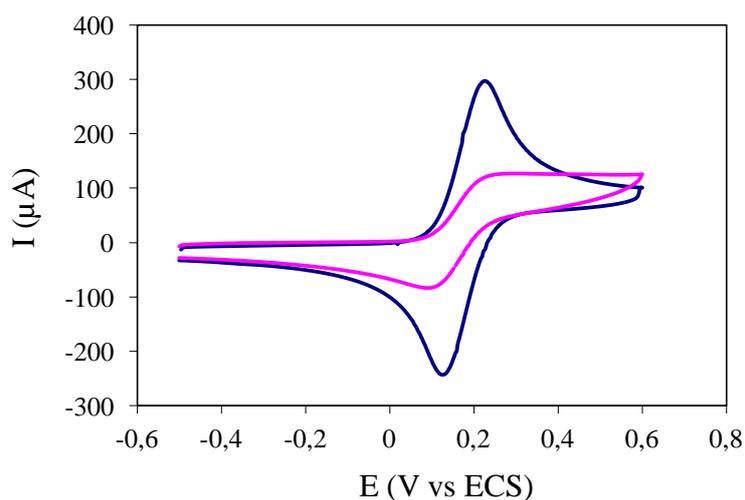


Figure 3.26 Voltammétrie cyclique d'une électrode de CG nue (en bleu) et d'une électrode fonctionnalisée avec l'ester (en rose) dans $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ à 5×10^{-3} M dans 0,1 M de KNO_3 ($v=50 \text{ mVs}^{-1}$).

▪ Caractérisation des surfaces fonctionnalisées par XPS

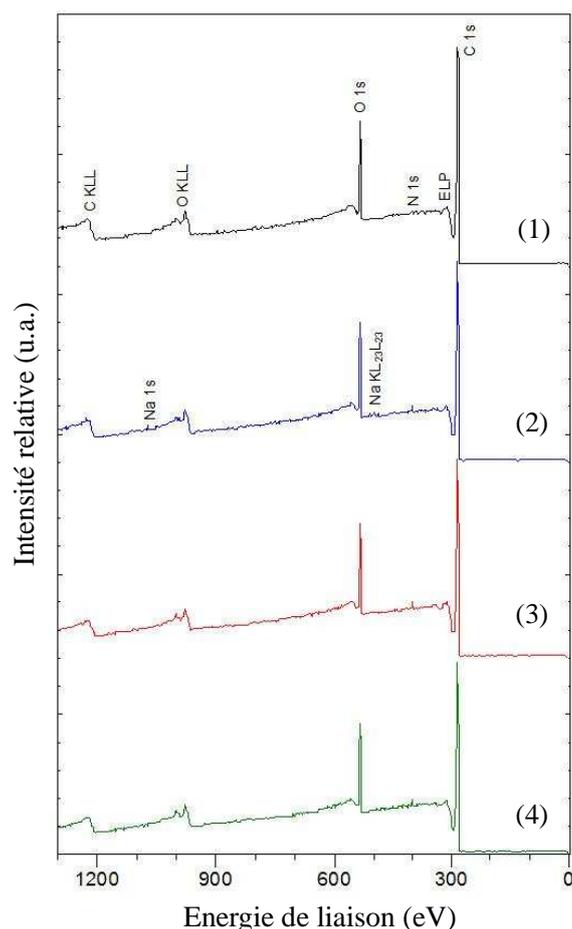


Figure 3.27 Spectre XPS de la surface de l'électrode fonctionnalisée avec (1) l'ester méthylique, (2) $-\text{CONHNH}_2$ (par la réaction entre $-\text{COOCH}_3$ et NH_2NH_2), (3) $-\text{CONHNHboc}$ (par la réaction entre $-\text{COOCH}_3$ et NH_2NHboc), (4) $-\text{CONHNH}_2$ (après la déprotection de l'hydrazide sur l'électrode 3).

La figure 3.27 présente le spectre général analysé entre 0 et 1300 eV de la surface des électrodes fonctionnalisées avec l'ester méthylique, $-\text{CONHNH}_2$ (produit de la réaction entre $-\text{COOCH}_3$ et NH_2NH_2), $-\text{CONHNHboc}$ (produit de la réaction entre $-\text{COOH}$ et NH_2NHboc) et $-\text{CONHNH}_2$ (après la déprotection de l'hydrazide sur l'électrode 3). L'ensemble des spectres enregistrés sur ces quatre électrodes ont des allures très semblables. Après réaction avec NH_2NH_2 ou NH_2NHboc , une diminution de la fraction molaire de l'oxygène sur les électrodes 2 et 4 est attendue. Cependant, nous n'observons pas cette diminution. En effet, les rapports des fractions molaires $\text{O}_{\text{tot}}/\text{C}_{\text{tot}}$ pour les électrodes 2 et 4 sont très proches de celui de l'électrode 1. La superposition des pics C 1s normalisés à leur sommet confirme le peu de différence entre les quatre électrodes. Aucune réaction n'a lieu sur la surface de l'ester. La surface de l'électrode n'a pas été fonctionnalisée avec les groupements d'hydrazide avec cette

méthode.

Electrode fonctionnalisée	O _{tot} /C _{tot}	N _{tot} /C _{tot}
avec l'ester méthylique (1)	0,140	0,008
-CONHNH ₂ (2) (par la réaction entre -COOCH ₃ et NH ₂ NH ₂)	0,141	0,015
-CONHNHboc (3) (par la réaction entre -COOCH ₃ et NH ₂ NHboc)	0,136	0,015
-CONHNH ₂ (4) (après la déprotection de l'hydrazide sur l'électrode 3)	0,144	0,016

Tableau 3.4 Répartition du pourcentage molaire des éléments.

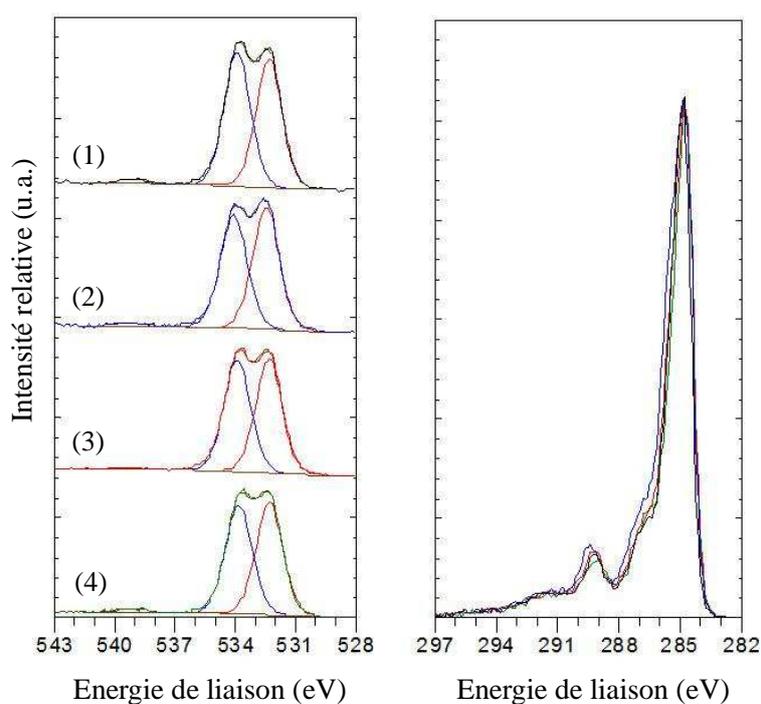


Figure 3.28 Spectre XPS des électrons N1s et C1s de la surface de l'électrode fonctionnalisée avec (1 à gauche, en noir à droite) l'ester méthylique, (2 à gauche, en bleu à droite) -CONHNH₂ (par la réaction entre -COOCH₃ et NH₂NH₂), (3 à gauche, en rouge à droite) -CONHNHboc (par la réaction entre -COOCH₃ et NH₂NHboc), (4 à gauche, en vert à droite) -CONHNH₂ (après la déprotection de l'hydrazide l'électrode 3).

III.1.2.3.1. Méthode 2

La fonctionnalisation de la surface avec les groupements carboxyliques a été étudiée dans la partie précédente

▪ Caractérisation des surfaces fonctionnalisées par XPS

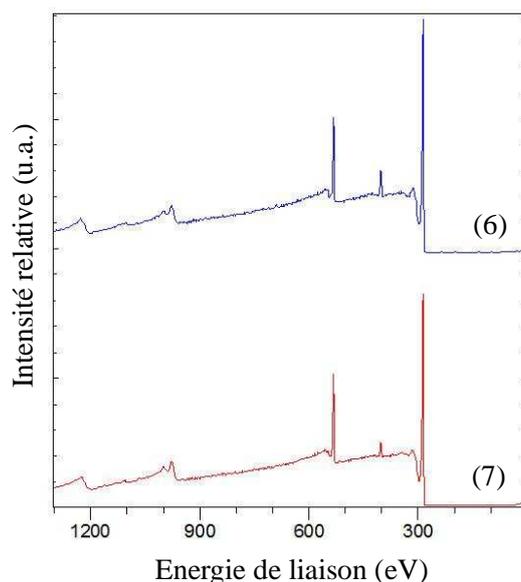


Figure 3.29 Spectre XPS de la surface de l'électrode fonctionnalisée avec (6) –CONHNHboc, (7) –CONHNH₂ (après la déprotection).

La figure 3.29 présente le spectre général analysé entre 0 et 1300 eV de la surface des électrodes fonctionnalisée avec –CONHNHboc (6, par réaction de l'hydrazine protégée sur le groupement carboxylique à la surface de l'électrode) et –CONHNH₂ (7, après la déprotection de l'hydrazide sur l'électrode 6). Le pourcentage molaire d'azote sur les électrodes 6 et 7 est de 4,82 et 3,06, respectivement, ce qui est plus important que celui sur l'électrode 5, soit 1,19 (voir tableau 3.5). Cela pourrait provenir la présence du groupement d'hydrazide (ou protégé) à la surface de l'électrode.

La figure 3.30a présente le spectre de O 1s après déconvolution. On observe les pics correspondant aux liaisons C-O (O1 à 533,6 eV) et C=O (C2 à 532,4 eV) sur les électrodes 5, 6 et 7. Le rapport des pourcentages molaires de carbone correspondant à la liaison C=O et la liaison C-O pour la surface de –COOH (l'électrode 5) est de 1,12 qui est proche de 1, ce qui est cohérent avec la composition du groupement carboxylique. Ce rapport augmente jusqu'à 1,50 après la réaction avec NH₂NHBoc. Cela indique la perte de la liaison C-O qui doit être dû à la formation du couplage entre les groupements carboxyliques de l'électrode et NH₂NHBoc. Après la déprotection de l'électrode 6, le rapport C=O/C-O est de 1,6, ce qui n'a pas de modification significative par rapport à l'électrode avant la protection.

La superposition des pics C 1s normalisés à leur sommet montre la présence d'un évasement un peu plus marqué du pic C 1s à plus haute énergie de liaison vers 286,5 eV, attribué aux

fonctions C-N, sur l'électrode 6 mais pas l'électrode 7. Une augmentation du rapport N/O est attendue, ce qui n'est pas le cas. D'ailleurs sur le spectre du carbone, après déprotection, le spectre est presque identique à celui de l'électrode COOH, on ne voit presque plus de liaisons C-N. Nous n'avons pas de groupement d'hydrazide après l'étape de déprotection de l'électrode.

Electrode fonctionnalisée	Fraction molaire (% et rapport)						O_{tot}/C_{tot}	N_{tot}/C_{tot}
	O-C (O1)	O=C (O2)	O_{tot}	-N=N- (N3)	-NH ₂ /-(C=O)-NH- (N4)	N_{tot}		
Energie de liaison (eV)	533,6	532,4	-	402,3	400,8	-	-	-
avec -COOH	4,08	4,64	10,23	0,17	0,94	1,19	0,116	0,013
avec -CONHNHboc (6)	3,40	5,11	9,28	1,33	3,18	4,82	0,108	0,056
avec -CONHNH ₂ (7) (après la déprotection)	3,95	6,22	11,13	1,13	1,93	3,06	0,130	0,036

Tableau 3.5 Répartition de la fraction molaire des composantes du pic N 1s et O 1s.

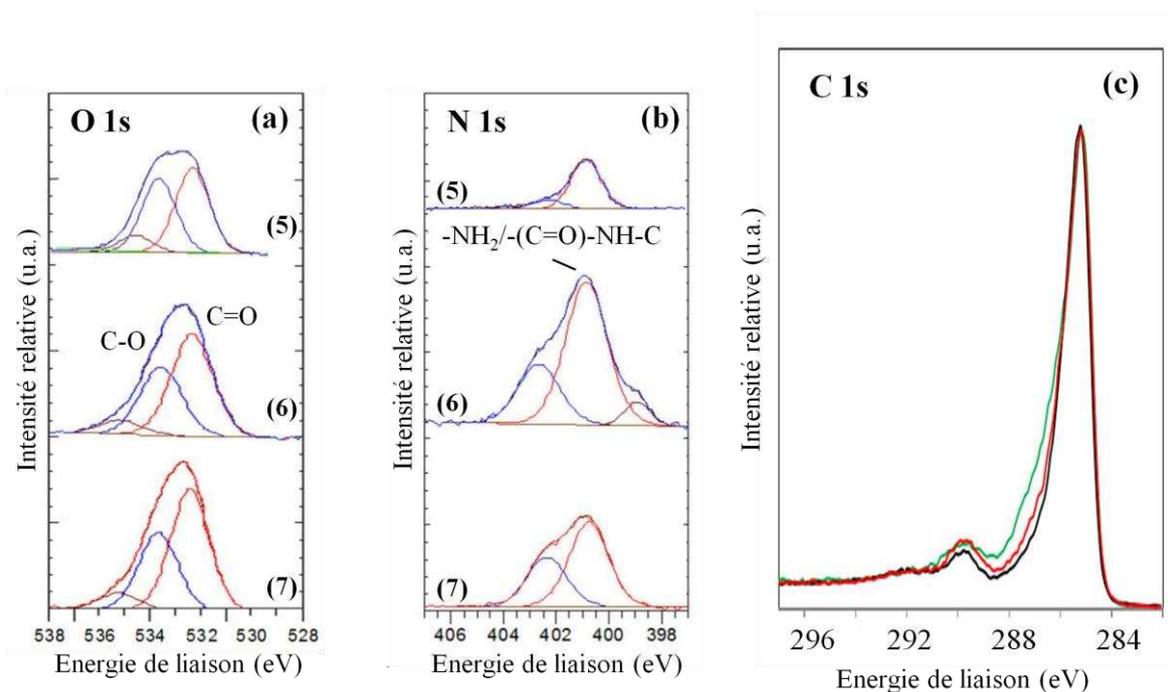


Figure 3.30 Spectre XPS des électrons O 1s, et C 1s de la surface de (5, en noir à droite) l'électrode fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques, (6, en vert à droite) -CONHNHboc, (7, rouge à droite) -CONHNH₂ (après la déprotection).

III.1.3. Immobilisation de la laccase

La laccase a été immobilisée sur les différentes électrodes fonctionnalisées par réduction du diazonium, ce qui a permis d'introduire en surface des groupements fonctionnels carboxyliques, amines ou hydrazides, permettant le greffage covalent de la laccase selon différents protocoles. Pour chacune des électrodes fonctionnalisées, la laccase a également été immobilisée par adsorption sur la surface, et ce afin de comparer les deux méthodes d'immobilisation et de tenter d'estimer quelle est l'influence du processus d'adsorption dans l'immobilisation puisque le processus d'adsorption de l'enzyme à la surface a lieu, même dans le cas d'une immobilisation covalente.

III.1.3.1. Contrôle de la quantité d'enzyme immobilisée par mesure de son activité

III.1.3.1.1. Laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée avec une fonction carboxylique

La méthode d'immobilisation covalente de la laccase à la surface d'électrodes fonctionnalisées avec des groupements carboxyliques consiste à activer ces derniers en présence d'EDC et de NHS. La laccase ensuite ajoutée forme avec le groupement carboxylique activé une liaison amide via l'un des cinq résidus lysine qu'elle contient. Dans d'autres expériences menées en parallèle, la laccase est adsorbée sur l'électrode fonctionnalisée, en absence d'EDC/NHS mais pendant la même durée que dans le cas de l'immobilisation covalente. Pour chacune des deux méthodes d'immobilisation, le couplage est généralement réalisé sur au moins trois électrodes différentes, les résultats présentés sont donc la moyenne de ceux obtenus sur ces trois électrodes.

Dans un premier temps, l'efficacité de l'immobilisation de la laccase est testée en mesurant l'activité de l'enzyme. En pratique, on suit par spectrophotométrie UV-visible à 420 nm la cinétique d'oxydation d'un substrat de la laccase, l'ABTS qui est oxydé par l'enzyme en un radical stable coloré, ABTS[•]. La vitesse de formation du radical ABTS[•] est utilisée pour calculer l'activité de l'enzyme immobilisée sur l'électrode, exprimée en unités (U), c'est-à-dire en nombre de micromoles d'ABTS transformé par minute. L'activité est ensuite ramenée à la surface géométrique de l'électrode, et donc exprimée en U/cm² afin de pouvoir la comparer de façon plus pertinente aux résultats de la littérature.

Dans le cas de la fonctionnalisation de la surface par des groupements carboxyliques par voie électrochimique, deux méthodes ont été utilisées : soit le sel de diazonium dont la

réduction électrochimique à la surface de l'électrode va permettre sa fonctionnalisation a été synthétisé préalablement, c'est-à-dire obtenu sous forme de poudre et solubilisé dans la cellule électrochimique au moment de l'expérience de réduction du sel de diazomium (méthode A), soit il a été généré in situ dans la cellule électrochimique par réaction du nitrite de sodium sur une amine aromatique (méthode B). La laccase a ensuite été immobilisée sur ces deux types de surface. Les résultats d'activité de l'enzyme obtenus après immobilisation sont présentés sur la figure 3.31.

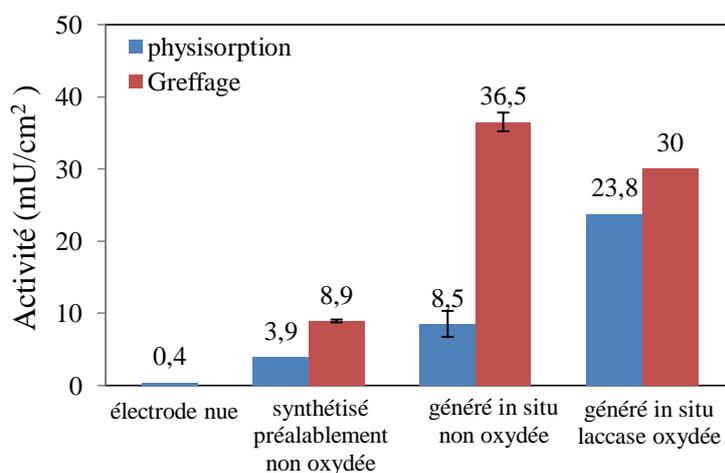


Figure 2.31 Activité de la laccase non oxydée ou oxydée à la surface de l'électrode fonctionnalisée avec $-\text{COOH}$ par réduction du 4-carboxybenzène diazomium (à 5 mM, synthétisé préalablement ou généré in situ, réduit par voltammétrie cyclique) et celle de la laccase non oxydée adsorbée sur l'électrode nue.

Lorsque la surface a été fonctionnalisée par la réduction de diazomium synthétisé préalablement, l'activité enzymatique mesurée après immobilisation de la laccase est de $3,9 \text{ mU}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour la laccase adsorbée et $17,7 \text{ mU}/\text{cm}^2$ pour la laccase greffée. Par contre, sur la surface fonctionnalisée par la réduction de diazomium généré in situ, la laccase présente pour chacune des méthodes d'immobilisation une activité plus importante : $8,5\pm 1,8 \text{ mU}/\text{cm}^2$ pour la laccase adsorbée et $36,5\pm 1,3 \text{ mU}/\text{cm}^2$ pour la laccase greffée par une liaison covalente. Sur l'électrode nue, la laccase qui est effectivement adsorbée à la surface présente une activité de $0,4 \text{ mU}/\text{cm}^2$.

L'activité de la laccase greffée est toujours trois à quatre fois plus importante que celle de la laccase adsorbée, même après une procédure de lavage poussée : après l'étape d'immobilisation, l'électrode a été trempée dans plusieurs solutions de tampon qui ont été renouvelées jusqu'à ce qu'aucune activité enzymatique ne soit plus détectée dans la solution.

Ce résultat est donc une preuve indirecte de l'efficacité du greffage covalent de la laccase sur la surface de l'électrode, comparé à l'adsorption de l'enzyme.

A noter qu'ici, sur l'électrode fonctionnalisée par réduction du 4-carboxybenzène-diazonium générés in situ, quand nous avons retirée la goutte du mélange EDC/NHS de la surface avant de déposer la solution d'enzyme, l'activité enzymatique diminue fortement : $3,0 \pm 0,5$ mU/cm². Cela montre que la présence simultanée de EDC/NHS et de la laccase est indispensable au cours du greffage de la laccase.

Le meilleur résultat obtenu lorsque l'électrode a été fonctionnalisée par la méthode de synthèse in situ du diazonium est à mettre en parallèle avec la plus forte densité de groupements COOH mesurée à la surface de ces électrodes ($1,91 \pm 0,15$) $\times 10^{-8}$ mol/cm² par comparaison aux électrodes fonctionnalisées avec le diazonium présynthétisé ($(1,1 \pm 0,2) \times 10^{-8}$ mol/cm²). En présence d'un plus grand nombre de groupements carboxyliques en surface, le couplage de l'enzyme serait plus efficace. Deux raisons peuvent être évoquées : une plus grande hydrophilicité de la surface qui favorise l'adsorption, et un plus grand nombre de groupements fonctionnels, qui favorise le couplage covalent. La réduction de diazonium généré in situ est donc une méthode favorable pour la fonctionnalisation de la surface et l'immobilisation de la laccase.

On a également immobilisé de la laccase après l'avoir oxydée en présence de périodate de sodium. Initialement, cette modification de la laccase par oxydation a été réalisée afin de permettre le couplage covalent de l'enzyme de façon « orientée » sur la surface, selon un protocole qui sera détaillé dans la suite du manuscrit. Il nous a semblé néanmoins intéressant de tester l'efficacité du couplage « non orienté » de la laccase ainsi oxydée. Dans ce cas, le protocole a été légèrement différent. La durée de formation du couplage à la surface est toujours de deux heures, nous avons d'abord laissé la solution de la laccase oxydée pendant deux heures à la surface de l'électrode au lieu d'activer préalablement la surface fonctionnalisée avec EDC et NHS pendant 20 min avant la formation du couplage comme pour le cas de la laccase non oxydée. La durée de l'adsorption a alors été de 4 heures pour l'échantillon comme pour le contrôle. La laccase oxydée greffée sur l'électrode présente une activité de 30 mU/cm², ce qui est légèrement plus important que celle de la laccase oxydée adsorbée : 23,8 mU/cm². Il nous semble que la formation de liaisons covalentes permet également d'immobiliser plus de laccase oxydée à la surface. En revanche, l'activité de la laccase oxydée greffée par couplage covalent est légèrement plus faible que celle de la laccase non oxydée greffée par la même méthode, soit $(36,5 \pm 1,3)$ mU/cm². Pour l'adsorption, le

comportement de la laccase est inversé par rapport au greffage : la laccase oxydée adsorbée à la surface de l'électrode présente une activité de $23,8 \text{ mU/cm}^2$, ce qui est plus important que l'activité de la laccase non oxydée adsorbée de $(8,5 \pm 1,8) \text{ mU/cm}^2$. Effectivement, la laccase a été purifiée par filtration sur gel avant et après oxydation, ce qui a éliminé le glycérol, qui peut avoir une influence en s'adsorbant sur la surface de l'électrode.

Nous avons ensuite étudié la stabilité des laccases immobilisées en mesurant leur activité fonction du temps (voir figure 3.32). La diminution de l'activité des laccases greffées est plus importante le premier mois et particulièrement pendant les 10 premiers jours. Au bout de 83 jours, la laccase greffée possède encore 50% de son activité initiale. Dans le cas des laccases adsorbées, la décroissance de l'activité est plus rapide dans les premiers jours. Après 10 jours, elles ont déjà perdu plus que 50% de leur activité. Ensuite, l'activité reste stable. Il faut noter que dans le cas des laccases adsorbées, l'activité mesurée est très faible et est à la limite de la sensibilité de la méthode de mesure, ce qui génère une grande incertitude sur les résultats expérimentaux.

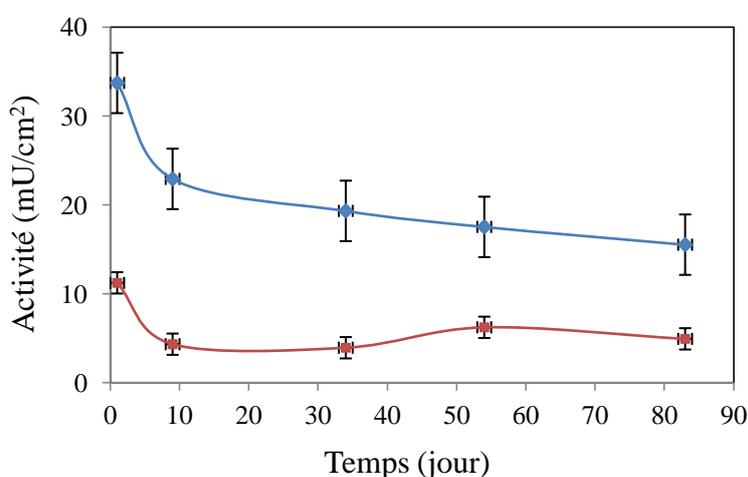


Figure 3.32 : Evolution de l'activité de la laccase greffée (en bleu) et adsorbée (en rouge) en fonction du temps.

III.1.3.1.2. Laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée avec un groupement amine

La figure 3.33 présente les activités de la laccase non oxydée, immobilisée à la surface de l'électrode fonctionnalisée par la réduction du diazonium, à des concentrations différentes, pour des méthodes et des paramètres différents.

Quand le 4-nitrobenzene-diazonium (5 mM) a été réduit pendant un cycle avec une vitesse de balayage de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ par voltampérométrie cyclique, nous avons obtenu une activité de

42,5±3,6 mU/cm² pour la laccase immobilisée à la surface de façon covalente. Pour la laccase adsorbée à la surface, nous avons une activité de 28,5 mU/cm², ce qui représente une diminution de 33% par rapport à celle de la laccase immobilisée de façon covalente.

Lorsque le 4-nitrobenzene-diazonium de 2 mM a été réduit pour deux cycles avec la vitesse de balayage de 50 mV·s⁻¹ par voltampérométrie cyclique, la laccase immobilisée de façon covalente à la surface fonctionnalisée présente une activité de 35,3±2,0 mU/cm², ce qui est plus faible qu'avec les paramètres précédents. La laccase adsorbée présente quant à elle une activité de 33,7 mU/cm², ce qui est très proche de l'activité de la laccase immobilisée de façon covalente sur l'électrode fonctionnalisée de même façon.

Nous avons également réduit 4-nitrobenzene-diazonium par chronoampérométrie avec un potentiel de 0,25 V pendant 30 s. Nous avons une activité enzymatique de 31,1 mU/cm² pour la laccase immobilisée de façon covalente et 29,1 mU/cm² pour la laccase adsorbée. Les deux activités pour les deux types sont quasiment identiques.

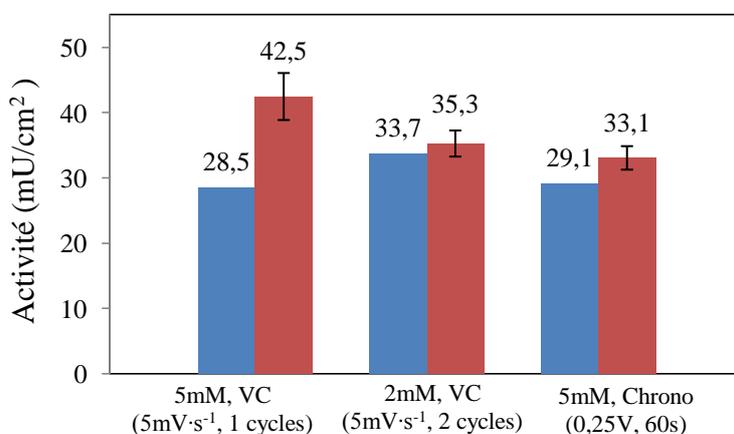


Figure 2.33 Activité de la laccase non oxydée à la surface de l'électrode, fonctionnalisée avec -NH₂ par réduction du 4-nitrobenzene-diazonium à 2 et 5 mM, réduit par voltammétrie cyclique (VC) ou chronoampérométrie (Chrono).

En conclusion, c'est donc en réduisant le diazonium par voltamétrie cyclique pendant un cycle que l'on obtient la plus forte activité enzymatique à la surface. Si on compare les résultats obtenus après fonctionnalisation par des groupements amines ou carboxyliques présentés au paragraphe précédent, on constate que l'écart entre l'activité de l'enzyme physisorbée et greffée de façon covalente est nettement plus faible en présence de groupements amines : au moins 70 % d'écart en présence de COOH et au plus 30% en présence de -NH₂. Ceci pourrait résulter de l'absence d'interactions électrostatiques

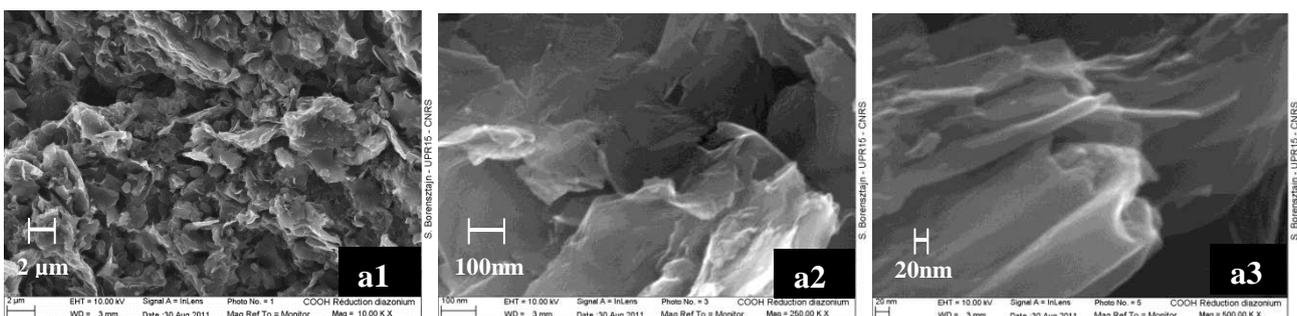
défavorables entre la laccase chargée négativement (pI autour de 3) et les groupements fonctionnels de surface alors que ces interactions sont défavorables lorsque la surface est fonctionnalisée par des groupements carboxyliques, sous forme d'anions au pH de l'expérience (pH 7).

III.1.3.1.3. Laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée avec un groupement hydrazide

Nous avons immobilisé de la laccase sur une électrode nous avons tenté de fonctionnaliser avec un groupement hydrazide après avoir oxydé des sucres de l'enzyme en présence de périodate de sodium. Cette modification de la laccase a été réalisée afin de permettre le couplage covalent de façon « orientée » sur la surface entre les groupements hydrazide et les groupements aldéhyde de la laccase dont les sucres ont été oxydés. Nous avons obtenu une activité de $(98,1 \pm 3,3)$ mU/cm² sur l'électrode avec cette méthode d'immobilisation. Le couplage est réalisé sur trois électrodes différentes, les résultats présentés sont donc la moyenne de ceux obtenus sur ces trois électrodes. Dans une autre expérience menée en parallèle, la laccase non oxydée, comme le contrôle, est adsorbée sur l'électrode fonctionnalisée pendant la même durée que dans le cas de laccase oxydée. L'électrode présente une activité de 55,1 mU/cm², ce qui correspond à une réduction de 44% par rapport à la laccase oxydée immobilisée à la surface de l'électrode.

Avec les résultats d'XPS, nous avons constaté que nous n'avons pas de groupement d'hydrazide à la surface de l'électrode. Effectivement, la laccase oxydée immobilisée à cette surface n'a pas été orientée. Elle présente toutefois une activité importante par rapport à la laccase non oxydée immobilisée sur l'électrode. La performance de cette électrode sera étudiée avec les méthodes électrochimiques dans la partie suivante.

III.1.3.2. Caractérisation par MEB de la surface après immobilisation de l'enzyme



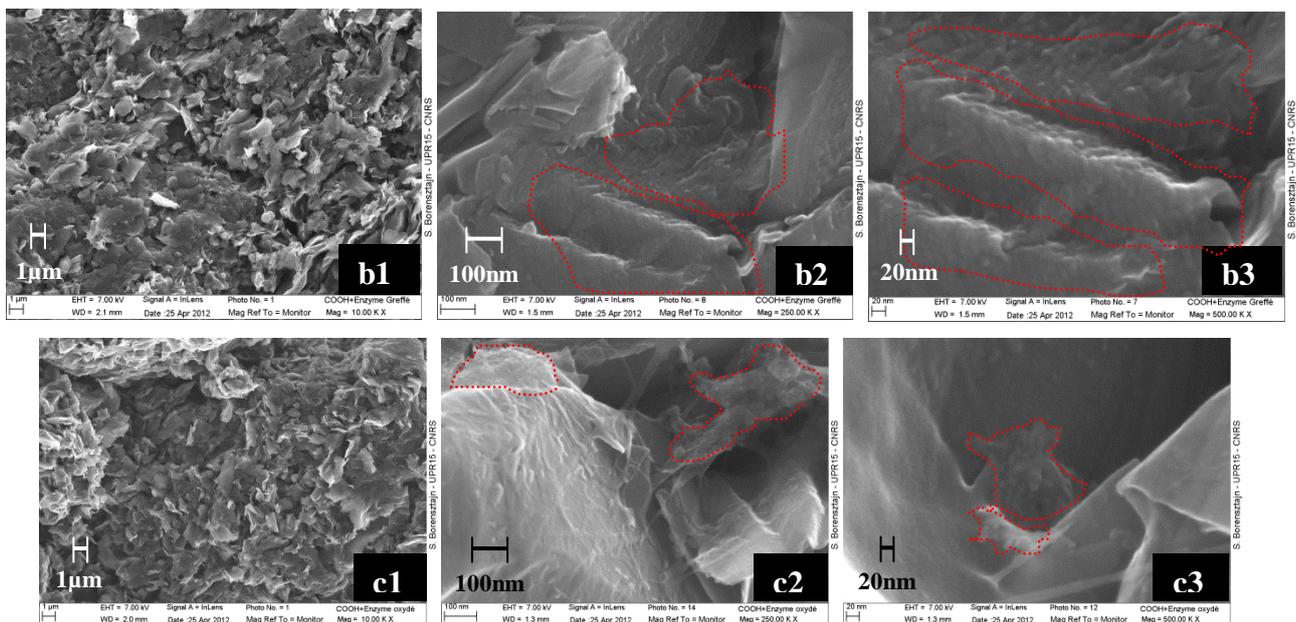


Figure 3.34 : Micrographies MEB à trois échelles différentes d'une surface de l'électrode fonctionnalisée avec des groupements carboxyliques (a1), (a2), (a3), de la même électrode après greffage de la laccase (b1), (b2), (b3) ou de la laccase oxydée (c1), (c2), (c3).

La figure 3.34 présente les micrographies MEB de la surface fonctionnalisée par réduction du 4-carboxybenzène-diazonium générés in situ avant et après immobilisation de la laccase. On peut observer la présence d'amas sur la surface après le greffage de la laccase (non oxydée et oxydée) qui pourraient être attribués à la présence d'enzyme. Cela confirmerait la présence de la laccase (non oxydée et oxydée) immobilisée de façon covalente sur l'électrode.

L'analyse élémentaire a été effectuée à la surface de l'électrode après le greffage de la laccase oxydée. Nous pouvons observer sur le spectre (voir figure 3.35) les pics d'azote et oxygène qui pourraient être dus à la présence de l'enzyme, qui contient ces éléments. Nous avons également observé les pics de phosphore et sodium attribués au NaH_2PO_4 et Na_2HPO_4 du résidu de tampon phosphate à la surface de l'électrode. Les pourcentages atomiques de l'oxygène et l'azote à la surface de l'électrode sont respectivement de 18,39 et 6,09.

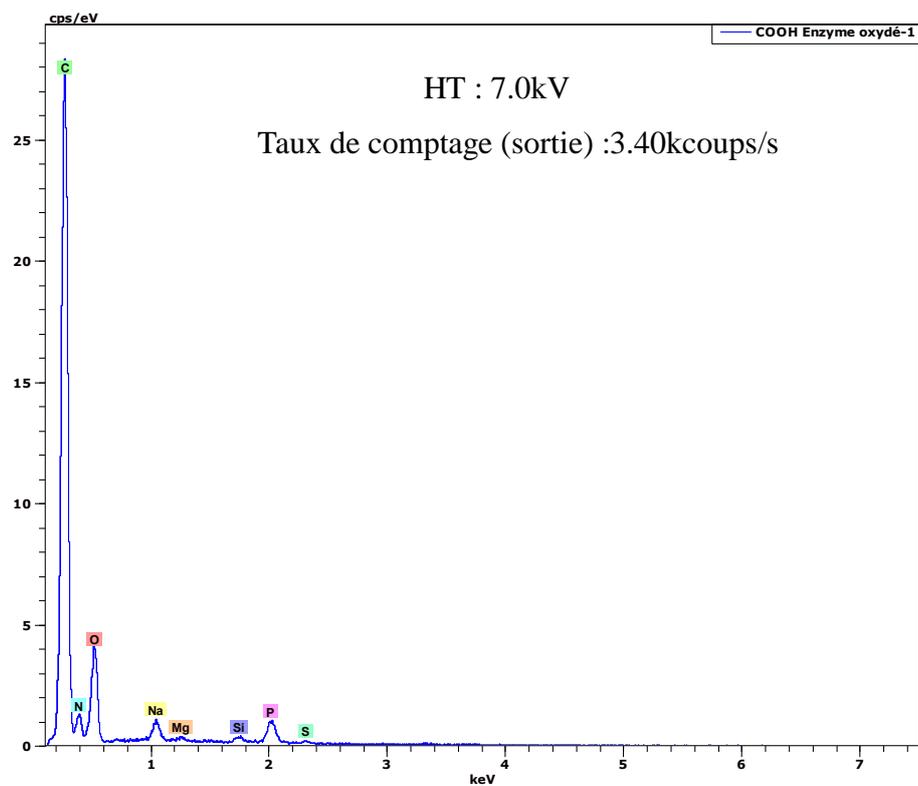


Figure 3. 35 Le spectre de l’analyse élémentaire par microscopie électronique à balayage pour l’électrode fonctionnalisée avec des groupements carboxyliques après le greffage de la laccase oxydée.

Element	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]
oxygène	K-series	18.39	18.39	15.25
carbone	K-series	68.50	68.50	75.66
silicium	K-series	0.64	0.64	0.30
azote	K-series	6.09	6.09	5.76
phosphore	K-series	3.94	3.94	1.69
sodium	K-series	1.76	1.76	1.02
magnésium	K-series	0.26	0.26	0.14
soufre	K-series	0.42	0.42	0.17
Total:		100.00	100.00	100.00

Tableau 3.6 Proportion des éléments à la surface de l’électrode fonctionnalisée avec des groupements carboxyliques après le greffage de la laccase oxydée.

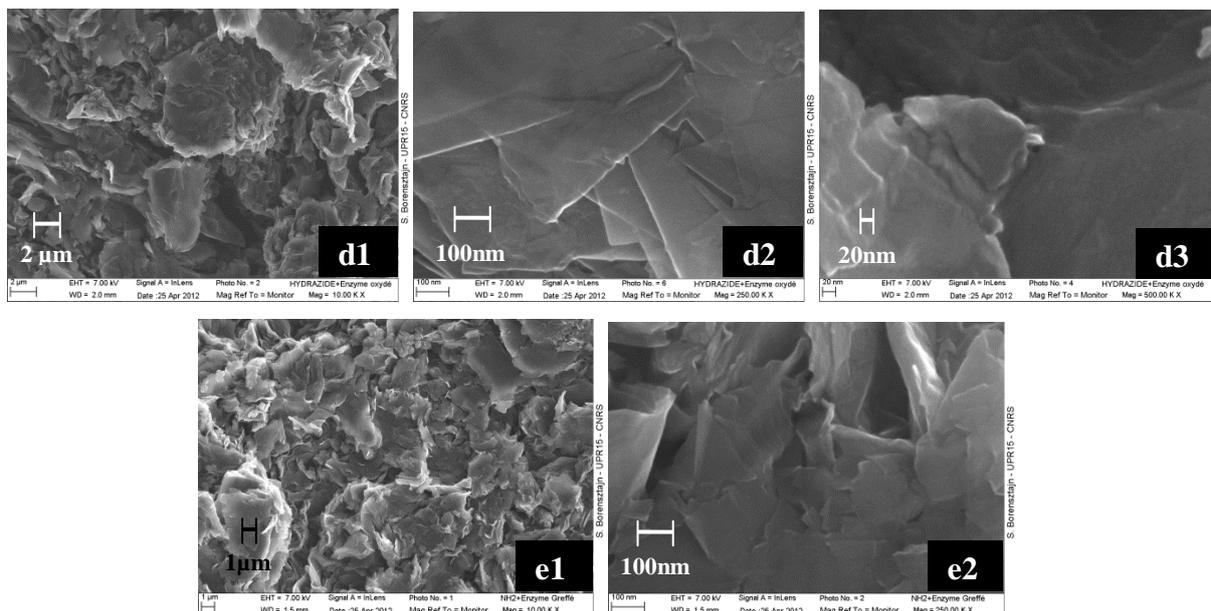


Figure 3.36 : Micrographies MEB d’une surface de l’électrode fonctionnalisée avec l’ester où la laccase oxydée est adsorbée (d1), (d2), (d3), de $-NH_2$ où la laccase non oxydée est immobilisée de façon covalente.

Sur la surface fonctionnalisée avec l’ester méthylique où la laccase oxydée a été adsorbée (voir figure 3.36, d1, d2 et d3), nous ne pouvons pas observer le dépôt de la laccase oxydée. Cela est probablement dû au détachement de la laccase dans la solution, l’enzyme n’étant qu’adsorbée à la surface. Sur les surfaces fonctionnalisées avec des groupements amines voir figure 3.36, e1 et e2), le dépôt de la laccase n’a pas pu être observé, bien que nous ayons détecté l’activité de la laccase à la surface de l’électrode. La présence de la laccase à la surface de $-NH_2$ a été vérifiée avec l’analyse XPS.

III.1.3.3. Caractérisation de la laccase à la surface par XPS

III.1.3.3.1. Laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée avec $-COOH$

III.1.3.3.1.1. Laccase non oxydée

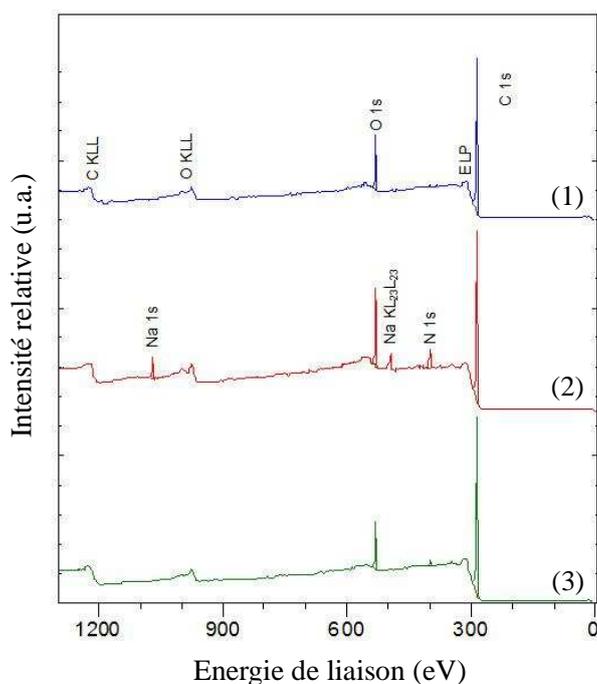


Figure 3.37 : Spectre XPS de la surface de l'électrode (1) fonctionnalisée avec $-\text{COOH}$ (2) de la laccase greffée, (3) de la laccase adsorbée.

La figure 3.37 présente le spectre général analysé entre 0 et 1300 eV des surfaces fonctionnalisées avec des groupements carboxyliques par réduction du 4-carboxybenzène-diazonium générés in situ (1), ainsi que de ces mêmes surfaces après greffage covalent (2) ou adsorption (3) de la laccase.

On observe sur cette figure ainsi que sur la figure 3.38 une augmentation de l'intensité du pic de l'azote après immobilisation de la laccase. Cela est dû à la présence de cet élément dans la séquence primaire de l'enzyme, tant dans les liaisons peptidiques que dans les résidus lysine, asparagine ou arginine qui contiennent également de l'azote. Ainsi le rapport atomique $N_{\text{tot}}/C_{\text{tot}}$ passe de 0,011 pour l'électrode fonctionnalisée avant immobilisation de l'enzyme à 0,016 pour l'électrode avec de la laccase adsorbée et 0,054 pour celle recouverte de laccase greffée de façon covalente. Le signal de l'azote est donc trois fois plus important lorsque la laccase est immobilisée de façon covalente. On retrouve les mêmes proportions que celles observées en comparant les activités mesurées sur ces mêmes électrodes. Cela confirme que l'on a greffé trois fois plus de laccase par liaison covalente que par chimisorption. La quantité d'oxygène en surface est également plus importante dans le cas de l'enzyme greffée comparée à l'enzyme adsorbée. Dans ce dernier cas, la contribution de l'oxygène sous forme $\text{C}=\text{O}$ augmente légèrement par comparaison à la surface avant immobilisation de la protéine

alors qu'elle double dans le cas de l'enzyme greffée, résultant du plus grand nombre de groupements carboxyliques de la liaison peptidique de l'enzyme.

Energie de liaison (eV)	$-\text{N}=\text{N}-/\text{R}-\text{NH}_3^+$ (N3)	$-\text{NH}_2$ / $-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{C}$ (N4)	N_{tot}	O-C	O=C	O_{tot}	$\text{N}_{\text{tot}}/\text{C}_{\text{tot}}$	$\text{O}_{\text{tot}}/\text{C}_{\text{tot}}$
	402,5	400,6	-	533,6	532,3	-	-	-
Electrode	Fraction molaire (% et rapport)							
fonctionnalisée avec -COOH	0,13	0,87	1,00	4,71	4,83	10,06	0,011	0,113
laccase adsorbée	0,12	1,37	1,48	3,03	3,81	7,31	0,016	0,08
laccase greffée	0,44	3,97	4,40	3,29	7,84	11,59	0,054	0,14

Tableau 3.7 : Répartition de la fraction molaire des composantes du pic N 1s.

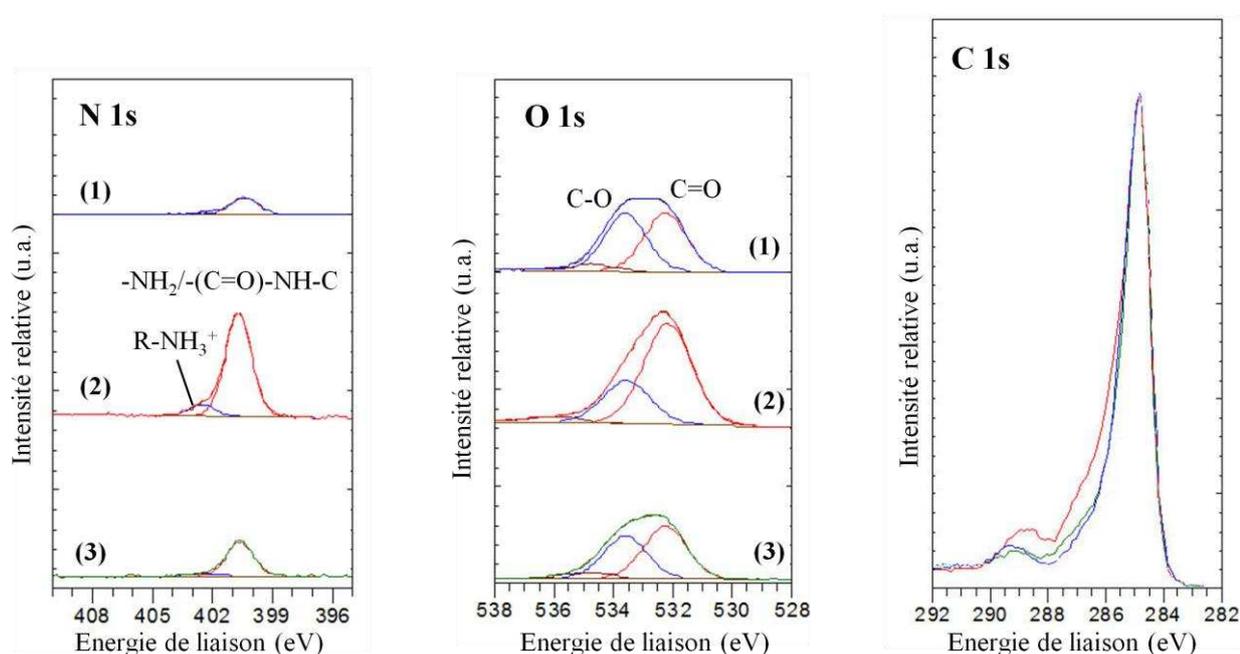


Figure 3.38 : Spectre XPS des électrons O 1s, N 1s et C 1s de la surface de l'électrode fonctionnalisée avec -COOH (1 et en bleu sur la figure de droite, C 1s), de la laccase greffée (2 et en rouge sur la figure de droite, C 1s), de la laccase adsorbée (3 et en vert sur la figure de droite, C 1s).

Le signal de l'azote peut être déconvolué en deux pics. Le pic majoritaire (90 % du signal de total de l'azote) à 400 eV peut être attribué aux amines et aux fonctions amides, l'autre à 402,4 eV pourrait être lié à la présence de groupements aminés protonés, notamment les résidus basiques de la protéine, effectivement protonés dans les conditions dans lesquelles les

électrodes ont été utilisées, c'est-à-dire à pH 4.2 pour la mesure de la réduction du dioxygène.

Sur le signal du carbone C 1s, on peut observer un net élargissement du pic vers les hautes énergies de liaison sur l'électrode avec la laccase greffée, que l'on peut attribuer à la fois à la présence de groupements C-N ou C-O vers 286 eV, et à des groupements NH-C=O amide ou cétone vers 288-289 eV. Ce dernier pic est souvent attribué à la liaison peptidique, et donc est un marqueur de la présence de protéine sur la surface. Cet élargissement, comparé à la surface seulement fonctionnalisée, est moins marqué dans le cas de la laccase adsorbée, ce qui est cohérent avec les résultats concernant l'azote et confirme le fait que la surface est moins couverte d'enzyme lorsque celle-ci est simplement adsorbée par comparaison avec l'immobilisation covalente.

III.1.3.3.1.2. Laccase oxydée

On a également immobilisé de la laccase sur une électrode fonctionnalisée par un groupement carboxylique après avoir oxydé les sucres de l'enzyme par du périodate de sodium. Cette enzyme ainsi oxydée était principalement destinée à être immobilisée de façon orientée via la formation d'une base de Schiff (voir paragraphe suivant). Toutefois, on l'a également utilisée dans le cadre d'une méthode de greffage non « orientée » après activation des groupements carboxyliques de surface par EDC/NHS.

Energie de liaison (eV)	-N=N- /R-NH ₃ ⁺ (N3)	-NH ₂ /-(C=O)-NH-C (N4)	N _{tot}	O-C (O1)	O=C (O2)	O _{tot}	N _{tot} /C _{tot}	O _{tot} /C _{tot}
	402,5	400,6	-	533,6	532,4	-	-	-
Electrode	Pourcentage molaire (%)							
Electrode COOH	0,13	0,87	1,00	4,71	4,83	10,06	0,011	0,113
fonctionnalisée avec -COOH + laccase oxydée adsorbée	0,07	0,73	0,80	4,89	4,10	9,57	0,009	0,108
fonctionnalisée avec -COOH + laccase oxydée greffée	1,14	1,31	2,45	3,95	4,70	10,09	0,028	0,116

Tableau 3.8 : Répartition de la fraction molaire des composantes du pic N 1s.

Après déconvolution du signal de O1s, le rapport des pourcentages d'oxygène correspondant aux liaisons C=O et C-O est de 0,84 pour la laccase oxydée adsorbée et de 1,19 pour la laccase oxydée immobilisée par couplage covalent. Cela indique que les liaisons amides présentent à la surface après adsorption de l'enzyme sont moins nombreuses qu'à la surface

après greffage covalent. Nous avons donc immobilisé plus de laccase oxydée sur l'électrode par liaison covalente que par physisorption. Ce résultat est confirmé par les données concernant l'azote : le pourcentage d'azote impliqué dans une liaison amide ou amine (400,6 eV) est de 1,31 après greffage alors qu'il reste inchangé à 0,73 après adsorption par rapport à l'électrode sans enzyme. Le pic à 402,5 eV pour l'électrode après le greffage de la laccase oxydée pourrait être attribué aux groupements aminés protonés de l'enzyme à la surface de l'électrode.

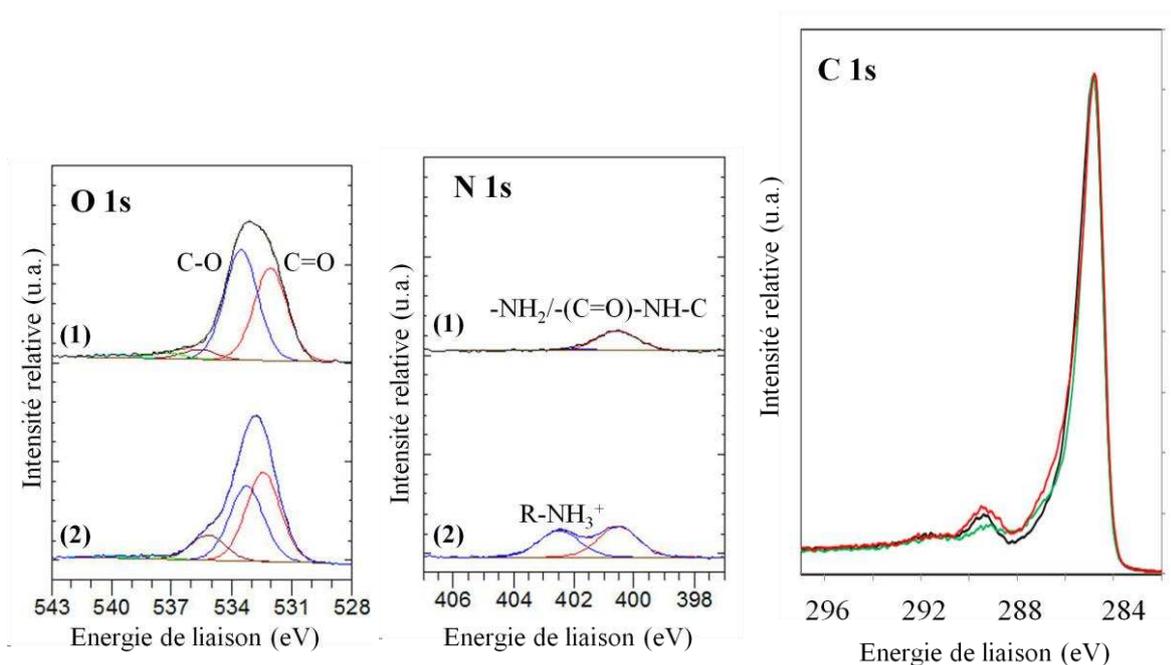


Figure 3.39 : Spectre XPS des électrons des atomes O 1s, N 1s et C 1s de la surface de l'électrode fonctionnalisée avec des groupements -COOH (courbe noire à droite), de la laccase oxydée adsorbée (1 et courbe vert à droite), de la laccase greffée par une liaison amide (2 et courbe rouge à droite).

III.1.3.3.2. Laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée avec $-NH_2$

III.1.3.3.2.1. Laccase non oxydée

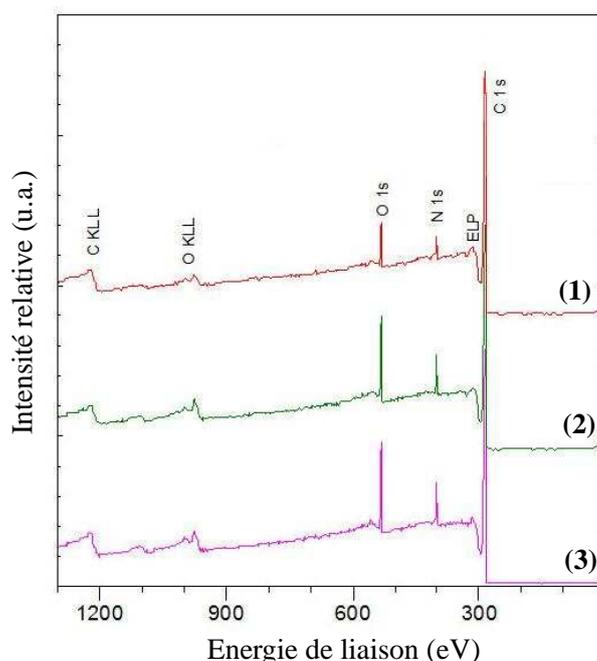


Figure 3.40 : Spectre XPS de la surface de l'électrode (1) fonctionnalisée avec les groupements amine, (2) de laccase greffée, (3) de laccase adsorbée.

La figure 3.40 présente le spectre général analysé entre 0 et 1300 eV des surfaces fonctionnalisées avec les groupements amines, sur lesquelles on a ensuite immobilisé de la laccase par adsorption ou greffage covalent. Le rapport atomique N_{tot}/C_{tot} à la surface fonctionnalisée avec des groupements amines est de 0,049. Après adsorption de la laccase, cette valeur augmente jusqu'à 0,079, ce qui est la même que celle de l'électrode où la laccase est greffée. Le rapport atomique O_{tot}/C_{tot} passe de 0,047 pour l'électrode fonctionnalisée à 0,102 après la physisorption ou le greffage de la laccase.

Electrode	Fraction molaire (% et rapport)						N_{tot}/C_{tot}	O_{tot}/C_{tot}
	$-N=N-/R-NH_3^+(N3)$	$-NH_2/-(C=O)-NH-C(N4)$	N_{tot}	O-C	O=C	O_{tot}		
Energie de liaison (eV)	402,5	400,6	-	533,6	532,4	-	-	-
fonctionnalisée avec $-NH_2$	0,81	3,16	4,49	2,61	1,53	4,25	0,049	0,047
laccase adsorbée (3)	0,52	5,79	6,64	3,18	4,50	8,58	0,079	0,102
laccase greffée (2)	0,53	5,80	6,69	3,03	4,37	8,61	0,079	0,102

Tableau 3.9 : Répartition de la fraction molaire des composantes du pic N 1s et O 1s.

Cette augmentation significative de l'intensité du pic de l'azote correspond essentiellement à la liaison $-(C=O)-NH-C$ à 400,6 eV, ce qui montre la présence des liaisons amides de la laccase à la surface. On en déduit donc que les quantités de laccase immobilisée sont identiques pour les deux types d'immobilisation. On peut faire l'hypothèse que l'enzyme est uniquement immobilisée par adsorption puisqu'on n'est pas en mesure d'immobiliser plus d'enzyme dans les conditions d'un couplage covalent.

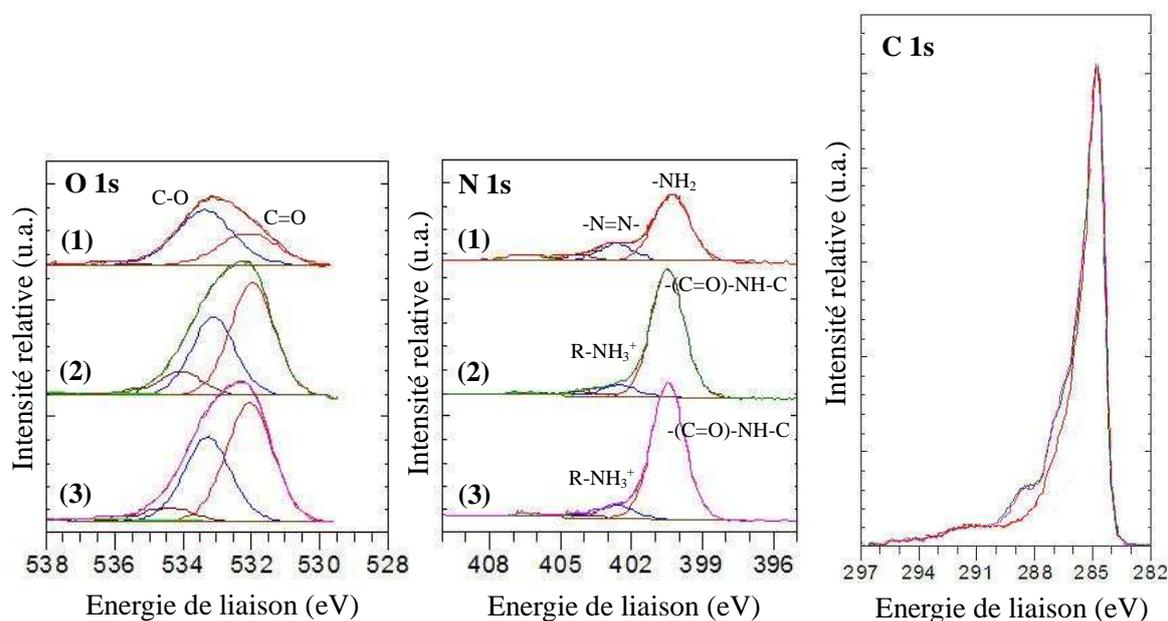


Figure 3.41 : Spectre XPS des électrons O1s, N1s et C1s de la surface de l'électrode fonctionnalisée avec les groupements amine (1, en rouge à droite), de laccase greffée (2, en vert à droite), de laccase adsorbée (3, en rose à droite).

Sur le spectre de C 1s, nous pouvons observer vers 287 eV un élargissement du pic (comparé à celui de l'électrode seulement fonctionnalisée) dû à des liaisons C-O ou C-N, ainsi que vers 288,5 eV, un très net épaulement, attribuable aux liaisons amides de la protéine, ainsi qu'à la possible présence de groupements carboxyliques. On constate que les spectres C1s des électrodes portant de l'enzyme sont superposables, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus avec les spectres de l'azote et confirme que la méthode d'immobilisation ne modifie pas la quantité d'enzyme immobilisée.

A noter qu'ici, l'électrode fonctionnalisée avec NH_2 contient un fort pourcentage d'oxygène de 4,25. Cela est dû à la fois à la contamination introduite par la procédure de polissage qui oxyde le carbone à la surface (l'électrode nue présente un pourcentage molaire d'oxygène de 2,88) et à une réduction incomplète des groupements nitro à l'issue de la procédure de réduction.

III.1.3.3.2.2. Laccase oxydée

Au cours du greffage de la laccase non oxydée, la laccase n'a pas été orientée à la surface de l'électrode. Pour faciliter le transfert d'électron à la surface, on a voulu orienter la laccase pour que son site actif soit proche de la surface de l'électrode. Une stratégie possible est d'immobiliser la laccase par l'intermédiaire de ses sucres, localisés en surface de l'enzyme, qui sont proches du site actif (voir figure 3.42). Après oxydation de ces groupements glycosidiques (voir figure 3.42), la laccase a été immobilisée à la surface des électrodes fonctionnalisées par les groupements anilines via la formation d'une base de Schiff (voir figure 3.44) entre les groupements amines de surface et les groupements aldéhyde de la laccase dont les sucres ont été oxydés par action du périodate de sodium. La dernière étape de la procédure d'immobilisation a été la réduction de la base de Schiff formée en présence de cyanoborohydrure de sodium afin d'assurer sa stabilité de la liaison entre le support et l'enzyme (voir figure 3.44).

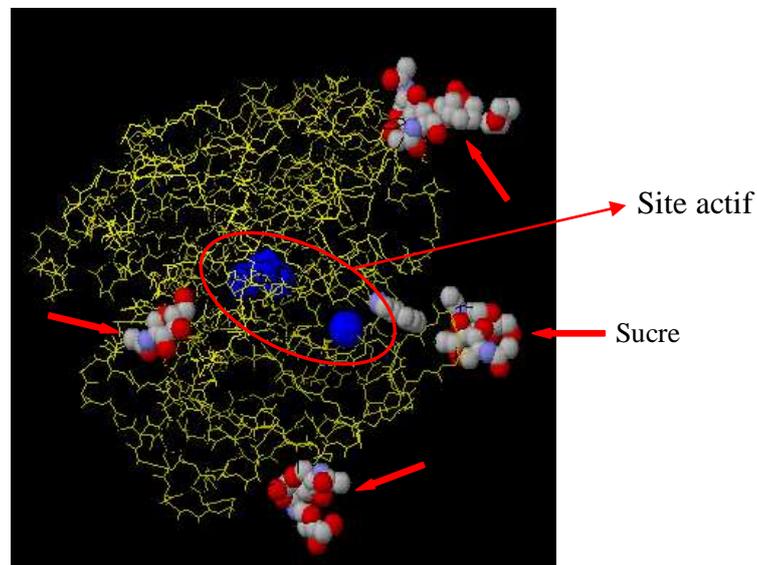


Figure 3.42 Les sucres, localisés à la surface de la structure de la laccase.

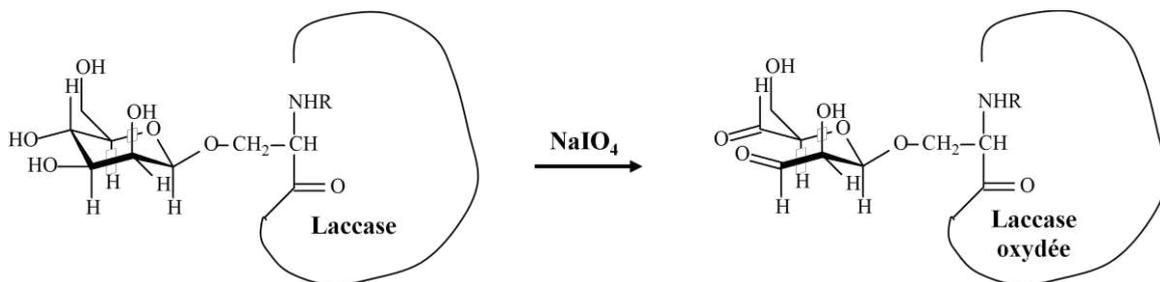


Figure 3.43 Oxydation de la laccase.

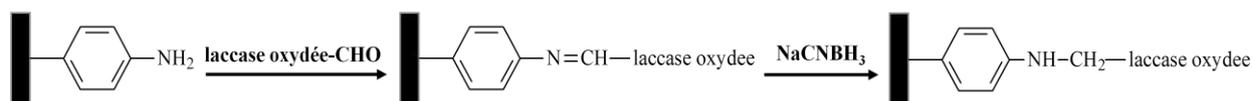


Figure 3.44 Formation et réduction de la base de Schiff entre la laccase et $-\text{NH}_2$ sur l'électrode.

Les spectres XPS des éléments C 1s, N 1s et O 1s à la surface des électrodes après immobilisation de la laccase par cette procédure sont illustrés figure 3.45. On constate que le rapport C-O/C=O s'inverse après immobilisation de la laccase, indice de la présence probable d'oxygène impliqué dans une liaison peptidique, que l'on détecte également sur le spectre du carbone avec un très net élargissement du pic de C 1s aux hautes énergies, avec notamment un épaulement vers 286 eV attribuable aux liaisons C-O, ainsi qu'un pic vers 288,5 eV, qui pourrait correspondre à la liaison peptidique. Il faut toutefois noter qu'on n'a retrouvé ce pic très net dans aucun autre échantillon sur lequel on a déposé de la laccase. On observe également un doublement du rapport atomique $O_{\text{tot}}/C_{\text{tot}}$ après greffage, puisqu'il passe de 4,25 sur l'électrode fonctionnalisée à 10,34 après immobilisation de la laccase oxydée. Le pourcentage d'azote augmente également de 4,49 à 7,92 après greffage de l'enzyme.

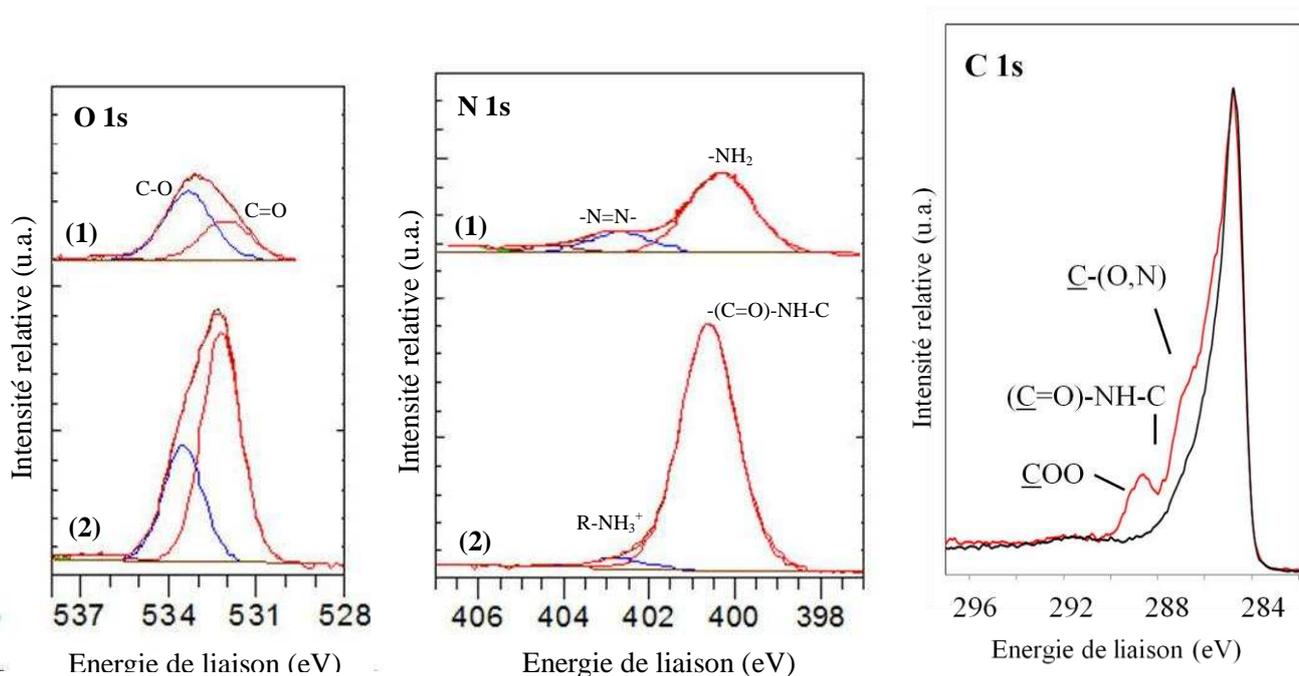


Figure 3.45 : Spectre XPS des électrons O 1s, N 1s et C 1s de l'électrode $-\text{NH}_2$ (1 et courbe noire sur la figure de droite) et sur la même électrode après greffage de la laccase par formation d'une base de Schiff (2 et courbe rouge sur la figure de droite).

Energie de liaison (eV)	-N=N- /R-NH ₃ ⁺ (N3)	-NH ₂ /-(C=O)-NH-C (N4)	N _{tot}	O-C (O1)	O=C (O2)	O _{tot}	N _{tot} /C _{tot}	O _{tot} /C _{tot}
	402,5	400,6	-	533,6	532,4	-	-	-
Electrode	Pourcentage molaire (%)							
fonctionnalisée avec -NH ₂	0,81	3,16	4,49	2,61	1,53	4,25	0,049	0,047
fonctionnalisée avec -NH ₂ + laccase oxydée greffée	0,3	7,62	7,92	3,43	6,87	10,34	0,099	0,129

Tableau 3.10 : Répartition de la fraction molaire des composantes du pic N 1s et O 1s.

Si on superpose le signal du carbone C 1s des surfaces sur lesquelles sont immobilisées des laccases oxydées (voir figure 3.46), on constate que c'est dans le cas de la formation d'une liaison C-N (via une base de Schiff) que l'élargissement du pic est le plus important. On peut donc supposer que c'est dans ce cas que l'on a immobilisé le plus d'enzyme.

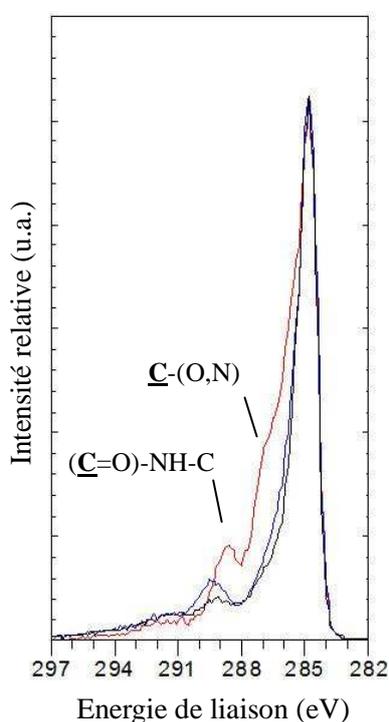


Figure 3.46 : Spectre XPS des électrons O1s, N 1s et C 1s de la surface de l'électrode -COOH après adsorption de la laccase oxydée (en noir) et greffage de la laccase oxydée (en bleu) par formation d'une liaison amide et l'électrode -NH₂ après greffage de la laccase oxydée par formation d'une base de Schiff (en rouge).

III.1.4. Etude du courant cathodique de la réduction de l'oxygène catalysé par la laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée

Le courant cathodique de réduction de l'oxygène catalysée par la laccase (ou la laccase oxydée) immobilisée sur l'électrode a été mesuré par voltammétrie cyclique ou chronoampérométrie. En absence de dioxygène, aucun pic de réduction n'est détecté. Lorsqu'on a utilisé la voltammétrie cyclique, un courant capacitif est quelquefois observé. Afin de s'affranchir de ce courant capacitif, les valeurs du courant de biocatalyse du dioxygène qui sont présentées dans la suite de ce chapitre sont le résultat de la différence entre le courant mesuré en présence de dioxygène et celui mesuré en absence de dioxygène. La densité de courant, en $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ est le rapport de cette valeur par la surface géométrique de l'électrode.

III.1.4.1. Laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée avec $-\text{NH}_2$

Sur l'électrode fonctionnalisée par réduction du 4-nitrobenzene-diazonium suivie de la réduction des groupements nitro, puis l'immobilisation de la laccase, on a observé un courant de réduction du dioxygène catalysé par la laccase à partir vers 0,6 V en présence d'air, ce qui est proche du potentiel redox de la laccase (voir figure 3.46). A 0,2 V, nous avons une densité de courant de $6,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ par voltammétrie cyclique et $12,5 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ par chronoampérométrie et ce malgré une activité de l'enzyme à la surface mesurée en présence d'ABTS de $(42,5\pm 3,6) \text{ mU}/\text{cm}^2$. On note également la présence d'un fort courant capacitif. Malheureusement, les résultats ne sont pas reproductibles. C'est-à-dire qu'on a observé un courant que sur quelques échantillons.

Nous avons observé à la fois des pics redox vers 0 V, qui sont attribués à l'espèce inconnu à la surface de l'électrode de nouvelle série reçue du fournisseur.

Vaz-Domínguez et al. [15]. ont rapporté une densité de courant maximal de $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ et les densités de courant autour de $300 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ mesuré par voltammétrie cyclique, ce qui est ~ 40 fois supérieure à celle de l'électrode décrite au-dessus. Cette différence pourrait être due à : (1) une différence de la surface électroactive des électrodes de carbone. La surface électroactive des tiges Sigma utilisées par Vaz dominguez et al. est de $(1 \pm 0,3) \text{ cm}^2$ pour une surface géométrique de 0.07 cm^2 alors que pour le carbone spectrographique (surface géométrique : 0.385 cm^2) que nous avons utilisée, la surface électroactive n'est que $0,5 \text{ cm}^2$.

(2) le type de laccase testé (laccase de *T. versicolor* contre *T. hirsuta*), (3) l'épaisseur de la couche fonctionnelle. Vaz-Domínguez et al. ont réduit le 4-nitrobenzene-diazonium par voltammétrie cyclique avec une vitesse de balayage de $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ à l'étape de fonctionnalisation de la surface de l'électrode avec des nitrophényles, alors que nous avons utilisé une vitesse de balayage de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ pour comparer avec l'électrode de $-\text{COOH}$ fonctionnalisée par réduction du 4-carboxybenzène diazonium avec la même vitesse de balayage, ce qui peut probablement aboutir à une couche fonctionnelle plus épaisse.

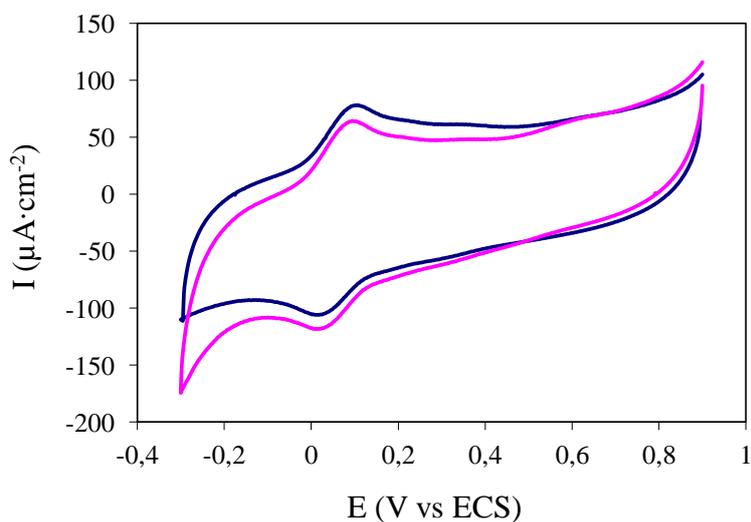


Figure 3.47 : Voltammétrie cyclique sous N_2 (bleu) et sous 1 atm d'air (rose) d'une électrode (fonctionnalisée avec les groupements amines) modifiée avec la laccase de façon covalente.

Face aux difficultés rencontrées pour réaliser la réduction du dioxygène sur les électrodes fonctionnalisées avec des groupements amines, nous avons testé une méthode alternative de couplage de l'enzyme par formation d'une base de Schiff avec la laccase dont les groupements glycosidiques ont été oxydés en aldéhyde.

La densité de courant de réduction du dioxygène après ce type de couplage est de $30,9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ par chronoampérométrie, ce qui est 2,5 fois plus élevé que celle obtenue avec la laccase non oxydée immobilisée via la méthode de couplage utilisant l'activation des groupements carboxyliques de l'enzyme avec EDC/NHS. Ce courant plus élevé, conséquence d'un meilleur transfert des électrons pourrait résulter d'une meilleure orientation de l'enzyme lorsqu'elle est couplée via ses groupements glycosidiques que via ses groupements carboxyliques.

Nous avons également immobilisé la laccase oxydée sur l'électrode de $-\text{NH}_2$ en présence de EDC/NHS, la densité de courant est de $34 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ par voltammétrie cyclique et $51,0 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ par chronoampérométrie.

Toutefois, ce courant est plus faible que dans le cas (voir paragraphe III.1.4.3) où la laccase oxydée est immobilisée sur une électrode fonctionnalisée avec des groupements carboxyliques car dans le cas des groupements amine une couche fonctionnelle plus épaisse pourrait être à l'origine d'une limitation du transfert des électrons.

Par contre, il est à noter que ces résultats ne sont pas reproductibles : l'immobilisation de la laccase oxydée par formation d'une base de Schiff a été réalisée une seule fois, et la laccase (non oxydé et oxydée) immobilisée via la méthode de couplage utilisant l'activation des groupements carboxyliques de l'enzyme avec EDC/NHS conduit à un courant catalytique une seule fois sur plusieurs essais.

III.1.4.2. Laccase immobilisée à la surface de l'électrode fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques :

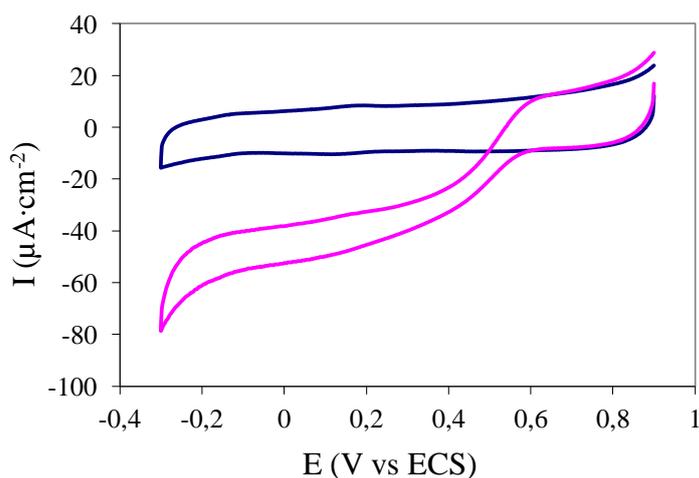


Figure 3.48 : Voltammétrie cyclique sous N_2 (bleu) et sous 1 atm d'air (rose) d'une électrode (fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques) modifiée avec la laccase de façon covalente. (La mesure est effectuée dans 50mM tampon d'acétate, pH4.2, 100 mM NaClO_4 , $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$)

Sur l'électrode fonctionnalisée par réduction de diazonium généré in situ par voltammétrie cyclique avec un balayage en potentiel et une vitesse de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, nous avons observé le courant de réduction du dioxygène catalysé par la laccase immobilisée à partir vers 0,6 V

(vs ECS) en présence d'air (voir figure 3.48). L'apparition du courant cathodique montre que le transfert d'électron a lieu entre l'électrode et la laccase immobilisée. A 0,2V, on a observé une densité de courant de $25,1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour la laccase greffée et de $5,0 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour la laccase adsorbée, alors que les activités de l'enzyme immobilisée sont, respectivement, $36,5 \pm 1,3 \text{ mU}/\text{cm}^2$ et $8,5 \pm 1,8 \text{ mU}/\text{cm}^2$.

Nous avons également mesuré le courant de réduction du dioxygène par chronoampérométrie. Le potentiel est fixé à 0,2 V. En absence de dioxygène, on n'a pas du courant de réduction. En présence de dioxygène, on voit bien le courant de réduction correspondant à la réduction du dioxygène catalysée par la laccase (figure 3.49). Nous avons également compté la différence entre les courants de réduction en présence et en absence de dioxygène pour obtenir la densité du courant comme avec la méthode de voltammétrie cyclique. Nous avons alors une densité de courant de $27,6 \pm 6,1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour la laccase greffée. Ce résultat est reproductible après plusieurs répétitions. Cette valeur est proche de celle obtenue avec voltammétrie cyclique, soit $25,1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$.

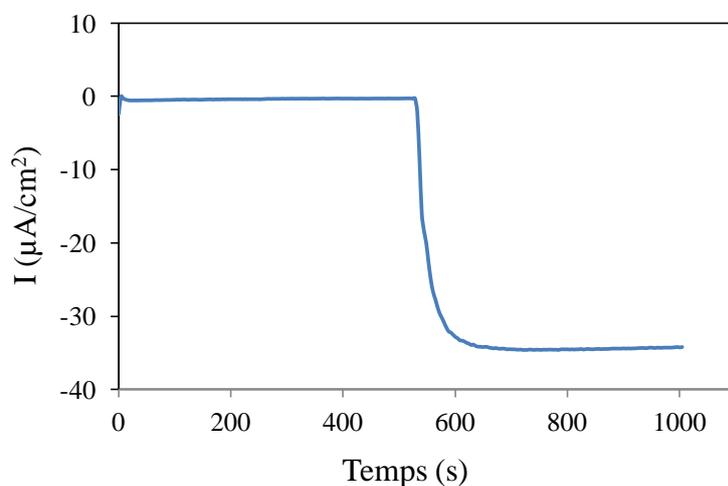


Figure 3.49 : Chronoampérométrie (sous N_2 et sous 1 atm d'air) d'une électrode (fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques) après le greffage de la laccase non oxydée. (La mesure est effectuée dans 50mM tampon d'acétate, pH 4.2, 100 mM NaClO_4 à 0,2 V vs ECS)

La densité du courant sur l'électrode fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques est plus importante que sur l'électrode fonctionnalisée avec les groupements amines lorsqu'on utilise une stratégie de couplage utilisant l'activation des groupements carboxyliques, bien que la quantité de la laccase immobilisée à ce type de l'électrode soit plus faible, d'après les mesures d'activité.

Ce résultat (plus de laccase sur les amines que sur les groupements carboxyliques) s'explique assez bien par la nature des interactions entre les groupements fonctionnels et la laccase. Dans les conditions d'immobilisation à pH 7, la laccase est chargée négativement, alors que les groupements carboxyliques sont déprotonés, donc l'interaction électrostatique avec l'enzyme est défavorable alors que les amines sont chargées positivement, et donc que dans ce cas les interactions électrostatiques sont favorables.

La méthode de couplage utilisant EDC/NHS déposé sur l'électrode en présence de la laccase pouvant induire une réticulation intermoléculaire de l'enzyme, puis conduire à la formation de « paquets » d'enzyme à la surface plutôt que la monocouche de laccase recherchée, on a légèrement modifié le protocole de greffage : les groupements carboxyliques à la surface de l'électrode ont été activés dans une première étape, puis la goutte du mélange EDC/NHS a été retirée de la surface avant de déposer la solution d'enzyme. Malheureusement, cette méthode n'a pas permis d'observer de réduction du dioxygène. Parce que la quantité de la laccase immobilisée sur l'électrode par cette méthode est bien faible, la laccase sur l'électrode présente très peu d'activité : $3,0 \pm 0,5 \text{ mU/cm}^2$.

Sur l'électrode fonctionnalisée par réduction du diazonium synthétisé préalablement, nous avons une densité de courant de $14,5 \mu\text{A/cm}^2$ à 0,2 V pour la laccase greffée et de $2,6 \mu\text{A/cm}^2$ pour la laccase adsorbée. Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues avec l'électrode fonctionnalisée par la réduction de diazonium généré in situ. Quand 5 balayages ont été réalisés pour réduire le diazonium synthétisé préalablement par voltammétrie cyclique, nous n'avons observé aucun pic de réduction du dioxygène bien que la laccase greffée soit active à la surface de l'électrode (activité mesurée de $5,6 \text{ mU/cm}^2$). On peut donc supposer que 5 balayages en potentiel conduisent à la formation d'une couche fonctionnelle trop épaisse et que les électrons issus de la réduction du dioxygène ne peuvent pas être transférés à l'électrode. Un seul balayage en voltammétrie cyclique a été choisi à l'étape de fonctionnalisation de la surface de l'électrode dans la suite de l'étude.

En comparant les deux électrodes fonctionnalisées par réduction de diazonium obtenus de façon différente, nous avons une densité du courant plus importante avec la laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée par la réduction de diazonium généré in situ. Nous avons alors immobilisé plus de laccase sur l'électrode fonctionnalisée de cette façon. Ce résultat correspond aux résultats de l'activité de la laccase à la surface de l'électrode. Cette méthode de fonctionnalisation est donc préférée pour développer la biocathode. Nous avons utilisé cette méthode pour préparer l'électrode fonctionnalisée avec d'autres groupements

fonctionnels.

Bien que la réduction de diazonium généré in situ forme une multicouche fonctionnelle à la surface de l'électrode plus épaisse que la couche fonctionnelle formée par la réduction de diazonium synthétisé préalablement, d'après la densité de groupements fonctionnels mesurée sur la surface, la densité du courant est plus importante sur la première électrode. Cela montre que cette multicouche sur la surface de l'électrode n'a pas gêné le transfert d'électron entre l'électrode et la laccase.

Nous avons également immobilisé la laccase sur des électrodes de type " lisse " fonctionnalisées avec les groupements carboxyliques, le courant de la réduction du dioxygène n'a pas été observé. L'activité de la laccase greffée sur l'électrode est de $16,0 \pm 3,9$ mU/cm².

III.1.4.3. Laccase oxydée immobilisée à la surface fonctionnalisée avec les groupements d'hydrazide:

L'immobilisation de la laccase via ses groupements glycosidiques oxydés en aldéhydes et le groupement hydrazide de la surface par formation d'une base de Schiff est une stratégie d'orientation de la laccase à la surface. En effet, certains groupements glycosidiques de la laccase se trouvent à proximité du site actif T1 d'oxydation du substrat réducteur, ce qui faciliterait le transfert des électrons vers l'électrode. De plus, les groupements hydrazides sont déprotonés à des pH plus bas que les amines primaires, de sorte que la réaction de couplage est facilitée par rapport à la stratégie utilisant la réaction entre les amines et les groupements carboxyliques.

Sur l'électrode nous avons tenté de fonctionnaliser avec les groupements d'hydrazides, le courant de réduction du dioxygène (voir figure 3.50) atteint la valeur de $103,8 \pm 17,4$ μ A/cm² par voltammétrie cyclique et $115,2 \pm 17,2$ μ A/cm² par chronoampérométrie, ce qui est 5 fois plus élevé que la valeur obtenue avec la laccase non oxydée greffée à surface fonctionnalisée par des groupements carboxyliques. Une électrode où la laccase non oxydée a été immobilisée en suivant le même protocole a été utilisée comme contrôle. Cette électrode de contrôle donne une densité de courant de $11,2$ μ A/cm².

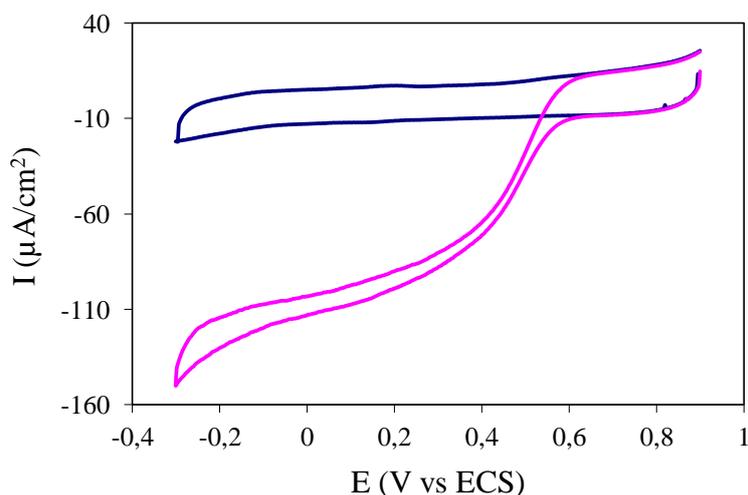


Figure 3.50 : Voltammétrie cyclique sous N₂ (bleu) et sous 1 atm d'air (rose) d'une électrode (fonctionnalisée avec les groupements d'hydrazide précédemment) après le greffage de la laccase oxydée.

Effectivement, par les résultats de XPS, nous avons trouvé que nous n'avons pas de groupement d'hydrazide sur l'électrode. La laccase oxydée est adsorbée sur l'électrode. Nous avons également mesuré le courant en adsorbant la laccase oxydée à la surface d'une électrode fonctionnalisée avec des groupements carboxyliques et constaté que le courant obtenu est également très élevé : $121,9 \pm 13,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. La laccase oxydée en elle-même semble donc suffire pour atteindre un courant élevé. On peut alors utiliser cette méthode dont le protocole est plus simple pour l'immobilisation de la laccase.

La modification de l'enzyme immobilisée sur l'électrode pourrait améliorer l'efficacité de la catalyse de l'électrode enzymatique. L'équipe de M. Mano [16] a augmenté la densité de courant de l'électrode modifiée avec la glucose oxydase par déglycosylation de l'enzyme, ce qui crée une structure de la matrice redox qui est plus efficace pour catalyser l'oxydation du glucose.

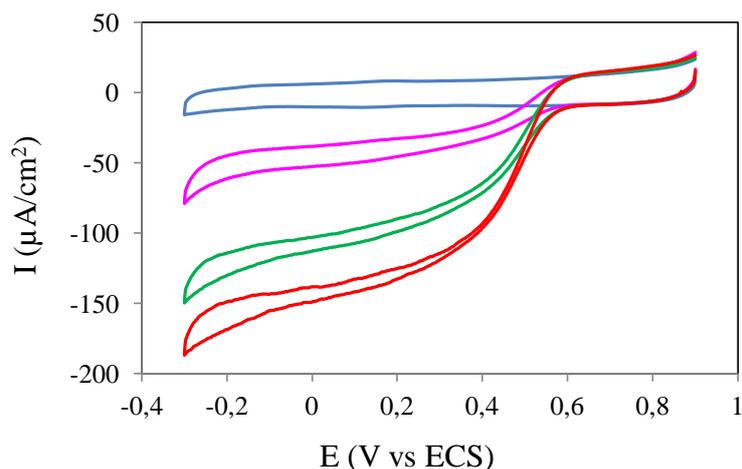


Figure 3.51 : Voltammétrie cyclique sous N_2 (en bleu) et sous 1 atm d'air de l'électrode fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques après le greffage de la laccase non oxydée (en rose), la physisorption de la laccase oxydée (en rouge) et la physisorption de la laccase oxydée après le processus de fonctionnalisation de l'électrode avec des groupement d'hydrazide (en vert).

Avec l'objectif d'augmenter la quantité de laccase à la surface, nous avons immobilisé la laccase oxydée par former une liaison covalente en utilisant le protocole d'activation des groupements carboxyliques de la surface utilisé classiquement et décrit dans la partie « méthodes expérimentales » (Chapitre II.4.3.2.1). Le courant de réduction de dioxygène peut alors atteindre $118,7 \pm 34,1 \mu A/cm^2$ mesuré par voltammétrie cyclique et $140,8 \pm 37,2 \mu A/cm^2$ mesurée par chronoampérométrie, ce qui est environ cinq fois plus élevé que le courant obtenu avec la laccase non oxydée alors que l'activité de l'enzyme à la surface est du même ordre, soit $30 mU/cm^2$.

On a ensuite cherché à améliorer le courant obtenu avec la laccase oxydée à la surface des électrodes fonctionnalisées avec des groupements carboxyliques (voir figure 3.52), puisque ces conditions avaient conduits aux plus forts des courants mesurés.

Augmentation de la durée de physisorption

Quand on a effectué la physisorption pendant 4 heures, nous avons une densité du courant de $114,7 \pm 5,8 \mu A/cm^2$ (mesurée par chronoampérométrie). Quand on a effectuée la physisorption pendant 1 nuit, une densité du courant de $139,3 \pm 14,1 \mu A/cm^2$ (mesurée par chronoampérométrie) est obtenue.

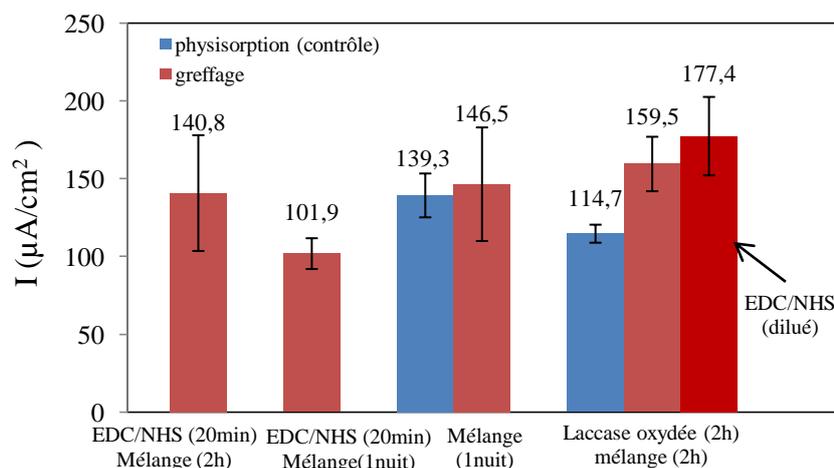


Figure 3.52 : Densité du courant de l'électrode modifiée avec la laccase oxydée avec les protocoles différents.

Greffage covalent de la laccase oxydée

L'augmentation de la durée d'incubation de la laccase oxydée sur la surface en présence d'EDC/NHS de 2 heures à une nuit a permis d'obtenir une densité du courant de $(101,9 \pm 9,9) \mu\text{A}/\text{cm}^2$, au lieu de $139,3 \pm 14,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ lorsque l'enzyme est uniquement adsorbée pendant la même durée, et $140,8 \pm 37,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ par la méthode « classique de couplage covalent » (Chapitre II.4.3.2.1).

Nous avons également effectué directement le greffage de la laccase oxydée dans une solution du mélange de la laccase, EDC et NHS pendant une nuit sans activer préalablement la surface de $-\text{COOH}$. Nous avons obtenu une densité du courant de $146,5 \pm 36,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ce qui est meilleur qu'en activant préalablement le $-\text{COOH}$ sur la surface par EDC et NHS ($101,9 \pm 9,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) et donc montre que l'activation préalable de la surface par EDC et NHS perturbe l'orientation de la laccase oxydée.

En s'inspirant du protocole de Marcos Pita et al. [17]., nous avons modifié le protocole de greffage (Chapitre II.4.3.2.2) :

Etape 1 : la laccase oxydée est déposée sur la surface de l'électrode. Après deux heures d'incubation, la solution est retirée de la surface.

Etape 2 : ajout de EDC et NHS sur la surface.

Avec cette méthode, nous avons obtenu une densité du courant de $159,5 \pm 17,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, ce qui est plus important que celle sur l'électrode développée par effectuer le greffage directement dans une solution du mélange de la laccase oxydée+EDC+NHS. Pour optimiser ce protocole, nous avons lavé la surface de l'électrode au bout de 2 heures pour avoir une couche plus

mince de la laccase oxydée. Malheureusement nous avons une densité du courant plus faible : $129,5 \pm 5,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Effectivement cette étape a risqué d'enlever la laccase adsorbée à la surface. Par contre, quand nous avons dilué la concentration de EDC et NHS par 2, nous avons la meilleure densité du courant : $177,4 \pm 25,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

III.1.4.4. Effet du pH

Nous avons étudié l'effet du pH sur la catalyse de la laccase vis-à-vis à réduction de dioxygène par mesurer le courant de réduction de dioxygène sur la biocathode. Le courant de la réduction sur l'électrode fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques où la laccase oxydée a été greffée a été mesuré dans les solutions de pH différents. Nous avons une densité du courant relativement faible à pH inférieur à 4,2. A pH 4,2, nous avons obtenu la densité du courant le plus importante. La laccase immobilisée sur l'électrode est donc plus active à pH 4,2. Effectivement, c'est le pH que nous avons choisi pour mesurer le courant de la réduction de l'oxygène sur toutes les biocathodes. Dans la solution dont pH est supérieure à pH 4,2, la densité du courant a diminué suivant l'augmentation de pH. Parce que l'activité de la laccase est inhibée à haut pH.

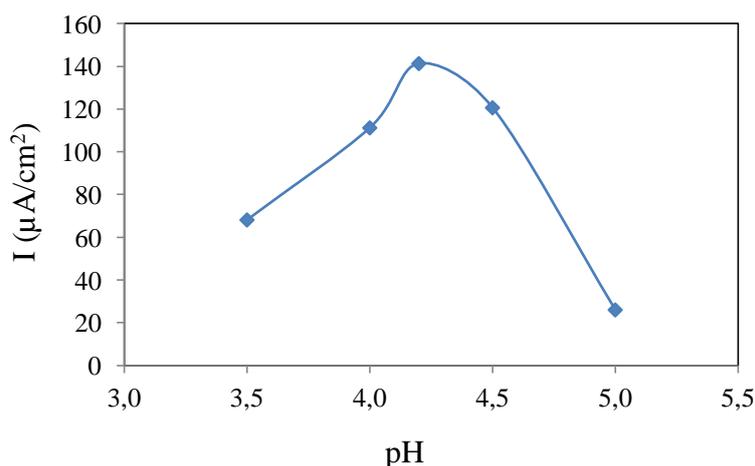


Figure 3.53 : Les densités de courant de la biocathode mesurées dans les solutions de pH différents.

III.1.4.5. Le courant cathodique sur une électrode tournante

Nous avons mesuré le courant de réduction du dioxygène sur l'électrode en la faisant tourner à des vitesses différentes. Nous avons utilisé l'électrode fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques sur laquelle la laccase oxydée a été immobilisée. Sur l'électrode tournante avec

les vitesses différentes, nous n'avons pas observé de modification significative du courant de réduction. On peut donc considérer que la diffusion du dioxygène dans la couche de laccase ne constitue pas une limitation au courant de réduction.

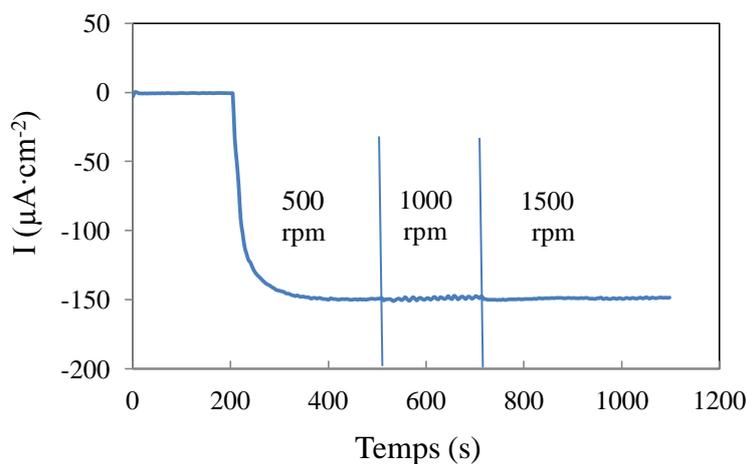


Figure 3.54 : Chronoampérométrie (sous N₂ et sous 1 atm d'air) d'une biocathode modifiée avec la laccase oxydée de façon covalente qui est tournée avec les vitesses de 500rpm, 1000 rpm et 1500 rpm.

III.1.5. Discussion

La surface de l'électrode peut être fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques ou amines par la réduction de diazonium correspondant.

Pour fonctionnaliser la surface de l'électrode avec les groupements amines, la réduction du 4-nitrobenzene-diazonium avec la vitesse de balayage de 50 mV·s⁻¹ par voltampérométrie cyclique est préférée à la réduction du diazonium par chronoampérométrie pendant 30s. La couche fonctionnelle formée par la première méthode est plus fine car l'expérience dure moins longtemps : 8 secondes au lieu de 30 pour la chronoampérométrie, sauf erreur. De plus le pic de réduction est visible au cours de la réduction, ce qui confirme la réduction du sel de diazonium. Nous avons obtenu une couche fonctionnelle mixte de -NH₂ et -NHOH. La densité totale des groupements est de $(1,8 \pm 0,1) \times 10^{-8}$ mol·cm⁻². La densité de -NH₂ est 2~4 fois plus élevée que celle de -NHOH. La présence des groupements fonctionnels a été mise en évidence par analyse XPS. En revanche, la microscopie électronique à balayage ne permet pas de différencier la surface non traitée et fonctionnalisée au niveau de la morphologie.

Nous avons effectué l'immobilisation covalente de la laccase non oxydée à la surface de l'électrode fonctionnalisées avec des groupements amines en présence de EDC et de NHS en

utilisant une électrode où la laccase est adsorbée pendant la même durée que dans le cas de l'immobilisation covalente, utilisée comme contrôle.

Nous obtenons l'activité enzymatique la plus élevée à la surface de l'électrode quand l'électrode a été fonctionnalisée par la réduction de 4-nitrobenzene-diazonium (5 mM) pour un cycle avec une vitesse de balayage de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ par voltammétrie cyclique. La laccase immobilisée de façon covalente présente une activité de $(42,5\pm 3,6) \text{ mU}/\text{cm}^2$ à la surface de l'électrode. Pour l'électrode du contrôle où la laccase est adsorbée à la surface, nous avons une activité enzymatique de $28,5 \text{ mU}/\text{cm}^2$, soit une diminution de 33% par rapport à la laccase immobilisée de façon covalente. La différence entre les activités de la laccase immobilisée de façon covalente et adsorbée est moins évidente par rapport au cas de l'électrode de $-\text{COOH}$.

Nous n'avons pas observé le dépôt de la laccase non oxydée à la surface avec les micrographies MEB. Ce sont les résultats de l'analyse XPS qui ont confirmé la présence de la laccase non oxydée à la surface de l'électrode fonctionnalisée avec les groupements amines. Par contre, l'analyse a montré que les quantités de laccase sont identiques pour l'électrode avec laccase non oxydée immobilisée de façon covalente et l'électrode avec laccase non oxydée adsorbée. Nous pouvons alors faire l'hypothèse que l'enzyme est effectivement adsorbée à la surface de l'électrode et le couplage covalent n'a pas eu lieu entre l'enzyme et l'électrode.

Nous pouvons immobiliser la laccase oxydée sur l'électrode de $-\text{NH}_2$ en présence de EDC/NHS et obtenir le courant de réduction du dioxygène. Nous pouvons également immobiliser et orienter la laccase oxydée à la surface fonctionnalisées par les groupements anilines via la formation d'une base de Schiff entre les groupements fonctionnels à la surface de l'électrode et les groupements aldéhyde de la laccase oxydée. L'analyse de l'XPS indique la présence de la laccase oxydée sur l'électrode et montre que nous avons immobilisé le plus de la laccase oxydée avec cette méthode comparé à l'immobilisation de la laccase oxydée par formation d'une liaison amide.

Pour fonctionnaliser la surface avec le groupement carboxylique. La fonctionnalisation de la surface peut être montrée par la différence des intensités au premier et au deuxième cycle au cours de la réduction de diazonium et la mesure du blocage de la surface après la fonctionnalisation de la surface. La présence des groupements fonctionnels a été mise en évidence par analyse XPS. En revanche, la microscopie électronique à balayage ne permet pas de différencier la surface non traitée et celle fonctionnalisée au niveau de la morphologie. La

densité des groupements carboxyliques sur l'électrode peut être déterminée par la méthode colorimétrique en utilisant le TBO.

La réduction de diazonium généré in situ est la méthode préférée. La densité de groupements fonctionnels obtenue par cette méthode est de $(1,91 \pm 0,15 \times 10^{-8}) \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$, ce qui est deux fois supérieur à celle des groupements carboxyliques obtenus par la réduction de diazonium préalablement synthétisé. A la surface de l'électrode fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques, nous pouvons immobiliser la laccase non oxydée ou oxydée de façon covalente par formation d'une liaison amide entre le groupement carboxylique à la surface de l'électrode et un des 5 résidus lysine de la laccase en présence de EDC et de NHS.

Nous avons une activité de $(36,5 \pm 1,3) \text{ mU/cm}^2$ pour le greffage covalente de la laccase non oxydée et de $(8,5 \pm 1,8) \text{ mU/cm}^2$ pour l'adsorption à la surface fonctionnalisée par la réduction de 4-carboxybenzène-diazonium généré in situ. A la surface, fonctionnalisée par la réduction de 4-carboxybenzène-diazonium synthétisé préalablement, la laccase non oxydée greffée présente une activité de $17,7 \text{ mU/cm}^2$ et celle adsorbée présente une activité de $3,9 \text{ mU/cm}^2$. Cela montre que nous pouvons immobiliser 3~4 fois plus de laccase non oxydée à la laccase non oxydée à la surface de l'électrode de façon covalente par rapport à l'adsorption de l'enzyme. Cela est confirmé par l'analyse de l'XPS. De plus, nous avons constaté que la méthode préférée de fonctionnalisation de la surface de l'électrode pour immobiliser la laccase est de réduire le 4-carboxybenzène-diazonium généré in situ grâce auquel nous pouvons immobiliser plus d'enzyme à la surface de l'électrode et avoir une densité de courant de l'électrode plus importante.

L'activité présentée par la laccase oxydée greffée à la surface de l'électrode fonctionnalisée par la réduction de diazonium généré in situ est de 30 mU/cm^2 , ce qui est légèrement inférieure à celle de la laccase non oxydée greffée mais plus importante que celle de la laccase oxydée adsorbée: $23,8 \text{ mU/cm}^2$. Les résultats de l'analyse de l'XPS montrent également que nous avons immobilisé plus de laccase oxydée sur l'électrode par liaison covalente que par physisorption. La présence de la laccase non oxydée et oxydée immobilisée de façon covalente à la surface de $-\text{COOH}$ peut également être confirmée par les micrographies MEB, puisque nous pouvons observer la présence d'amas sur la surface après le greffage de la laccase (non oxydée ou oxydée).

A partir des activités de laccase à la surface de l'électrode, nous avons estimé le taux de couverture de la surface par la laccase à partir de l'activité de la laccase immobilisée en

supposant que la surface occupée par la laccase est $5 \times 7 = 35 \text{ nm}^2$, valeur déduite des dimensions de la laccase déterminée par la résolution de sa structure tridimensionnelle ($50 \times 50 \times 70 \text{ \AA}$). Comme, d'autre part, l'activité spécifique de la laccase utilisée est de 300 U/mg , l'activité mesurée peut être reliée à la quantité d'enzyme sur la surface en mg. Sachant que la laccase a une masse molaire de $60\,000 \text{ Da}$, on peut en déduire la quantité d'enzyme présente sur la surface en nombre de molécules, puis la surface totale occupée par l'enzyme, selon la formule :

$$\frac{S_{\text{occupée}}}{S_{\text{électrode}}} = \frac{dA}{dt} \times 1,691$$

Le taux de couverture de la surface après immobilisation de la laccase a été également estimé à partir des rapports N/C en surface mesurées par XPS en faisant l'hypothèse qu'une monocouche d'épaisseur égale à 5 nm de protéine (une des dimensions de la laccase) est formée (voir tableau 3.11). Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus à partir de l'activité de la laccase mesurée avec l'ABTS. Et nous avons constaté que la surface de l'électrode n'a pas été complètement couverte par la laccase immobilisée.

Electrode	N/C	Taux de couverture (%)	
		D'après résultats XPS	D'après mesure d'activité
fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques+laccase adsorbée	0,016	17	13
fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques+laccase greffée	0,046	43-48	43
fonctionnalisée avec les groupements amines+laccase adsorbée	0,054	64	49 ± 16

Tableau **3.11** : Taux de couverture de la surface par la laccase.

La laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée peut catalyser la réduction du dioxygène avec les électrons transférés de l'électrode. Nous pouvons observer le courant de réduction du dioxygène par voltammétrie cyclique et chronoampérométrie.

A la surface fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques où nous avons immobilisé la laccase non oxydée, nous pouvons obtenir une densité du courant plus importante par rapport à la surface fonctionnalisée avec les groupements amines. Quand la surface de l'électrode a été fonctionnalisée par la réduction de 4-carboxybenzène-diazonium généré in situ,

nous obtenons une densité de courant plus élevée, puisque nous avons immobilisé plus de laccase (non oxydée) à cette surface par rapport à la surface fonctionnalisée par la réduction de diazonium préalablement synthétisé. A cette surface, nous avons une densité de courant environ 7 fois plus importante avec la laccase oxydée greffée qu'avec la laccase non oxydée, soit $177,4 \pm 25,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. C'est le courant le plus élevé obtenu dans ce travail avec une électrode de type tige de carbone. Le transfert d'électrons entre la laccase (oxydée) est donc plus facile et conduit à une densité du courant plus importante.

L'épaisseur de la couche fonctionnelle influence la performance de la biocathode, puisqu'elle influence le transfert d'électron entre la laccase et l'électrode. La couche fonctionnelle formée par réduction du 4-carboxybenzène-diazonium généré in situ ne perturbe pas le transfert d'électrons entre la laccase et l'électrode mais favorise l'immobilisation de la laccase par rapport celle formée par réduction du 4-carboxybenzène-diazonium synthétisé préalablement, puisque la quantité de la laccase immobilisée sur la surface fonctionnalisée par réduction du 4-carboxybenzène-diazonium généré in situ est plus importante. A la surface de l'électrode fonctionnalisée avec les groupements amines, une couche plus épaisse a été formée à la surface, ce qui a perturbé le transfert d'électron au cours de la réduction de dioxygène. Nous avons alors une densité de courant plus faible et moins reproductible sur ce type de surface par rapport à la surface fonctionnalisée avec les groupements carboxylique dans les cas de la laccase non oxydée et oxydée, bien que l'activité de la laccase immobilisée à la surface de $-\text{NH}_2$ soit plus importante. La laccase oxydée immobilisée à la surface de $-\text{NH}_2$ par la base de Schiff est orientée et donc présente une densité de courant plus importante que celle de la laccase non oxydée. La laccase oxydée immobilisée sur l'électrode de $-\text{NH}_2$ en présence de EDC/NHS présente également une densité de courant plus importante que la laccase non oxydée.

III.1.6. Conclusion

Nous avons fonctionnalisé la surface de l'électrode avec les groupements fonctionnels différents pour immobiliser et orienter la laccase à la surface de l'électrode.

Nous pouvons fonctionnaliser la surface de l'électrode avec $-\text{COOH}$. La présence des groupements a été confirmée par analyse XPS et ils ont été quantifiés par méthode

colorimétrique. Par contre, le MEB ne permet pas d'observer la présence de la couche fonctionnelle à la surface. L'immobilisation de la laccase a été détectée par la mesure de l'activité de la laccase à la surface de l'électrode et l'analyse XPS. La mesure de l'activité de la laccase permet également de quantifier la laccase immobilisée et de déterminer le taux de couverture de la surface par la laccase oxydée.

Quand nous avons fonctionnalisé la surface de l'électrode par réduction de 4-carboxybenzène-diazonium généré *in situ*, nous obtenons une multicouche à la surface, par contre, nous pouvons immobiliser plus de la laccase sur cette surface et obtenir une densité du courant plus importante par rapport à la surface fonctionnalisée par la réduction de diazonium préalablement synthétisé. La multicouche formée par la réduction de diazonium n'a pas perturbé le transfert d'électrons.

Nous avons immobilisé la laccase à la surface de l'électrode fonctionnalisée avec les groupements carboxyliques par physisorption ou par formation d'une liaison covalente entre la laccase et l'électrode. Nous pouvons immobiliser plus de la laccase et alors obtenir une densité du courant plus importante en présence d'une liaison covalente à cette surface.

Nous avons fonctionnalisé la surface de l'électrode par réduction de 4-nitrobenzène-diazonium avec les mêmes paramètres que la réduction de 4-carboxybenzène-diazonium. Néanmoins, la réduction des groupements nitro des nitrophényles attachés à la surface de l'électrode nécessite une étape supplémentaire. La présence des groupements $-NH_2$ a été détectée par l'analyse de l'XPS, ce qui nous permet d'immobiliser la laccase sur la surface, mais cette immobilisation a été réalisée par physisorption et non par greffage. Nous ne pouvons pas greffer la laccase par formation d'une liaison amide en présence d'EDC et NHS. Après avoir immobilisé la laccase suivant un protocole de greffage, la quantité de la laccase immobilisée à la surface de l'électrode est la même que par physisorption. Cela a été montré par l'analyse de l'XPS. En revanche, par physisorption de la laccase, nous pouvons immobiliser plus de la laccase à la surface de $-NH_2$ par rapport à la surface de $-COOH$ et nous avons détecté une activité plus importante à la surface de $-NH_2$. Cela est également montré par l'analyse de l'XPS. Cela s'explique par la nature des interactions entre les groupements fonctionnels et la laccase. Dans les conditions d'immobilisation à pH 7, l'interaction électrostatique avec l'enzyme est défavorable à la surface de $-COOH$ alors que dans le cas de $-NH_2$ l'interaction électrostatique est favorable. C'est dans le cas où la laccase oxydée a été immobilisée à la surface de $-NH_2$ par la base de Schiff que l'on a immobilisé le plus d'enzyme. La laccase oxydée est orientée et donc présente une densité du courant plus

importante que celle de la laccase non oxydée. La laccase oxydée immobilisée sur l'électrode de $-NH_2$ en présence de EDC/NHS présente également une densité de courant plus importante que la laccase non oxydée. Cependant, la couche fonctionnelle de l'électrode de $-NH_2$ est épaisse, et nous avons observé que le courant capacitif à la surface de $-NH_2$ est plus important. Le transfert d'électrons à la surface de l'électrode fonctionnalisée avec des groupements amines a été perturbé par cette couche épaisse. La densité du courant est très faible à cette surface et de plus, le résultat obtenu avec ce type de surface n'est pas reproductible.

Nous avons tenté de fonctionnaliser la surface de l'électrode avec les groupements d'hydrazide pour immobiliser la laccase oxydée à la surface fonctionnalisée et orienter la laccase à la surface de l'électrode. On n'a malheureusement pas fonctionnalisé la surface de l'électrode avec les groupements d'hydrazide. La laccase oxydée immobilisée à la surface de l'électrode suivant un protocole de fonctionnalisation de la surface avec des groupements d'hydrazide est effectivement adsorbée sur l'électrode. Elle présente toutefois une densité du courant qui est 5 fois plus importante que celle de l'électrode où la laccase non oxydée est greffée, ce qui montre que la laccase oxydée en elle-même semble donc suffire pour atteindre un courant élevé. On peut alors utiliser cette méthode dont le protocole est plus simple pour l'immobilisation de la laccase. Avec la laccase oxydée greffée à la surface de $-COOH$ par une liaison amide, nous avons une densité du courant très importante, ce qui est la meilleure performance de biocathode dans nos travaux.

III.2. Réalisation d'une électrode enzymatique fonctionnalisée par traitement du plasma

III.2.1. Fonctionnalisation de surface par traitement plasma à pression atmosphérique

La surface de l'électrode de carbone a été traitée par une torche plasma à pression atmosphérique avec l'azote, l'oxygène et l'air comme gaz réactif pour fonctionnaliser la surface de l'électrode avec les groupements amines et/ou carboxyliques. L'effet de la nature du gaz du plasma (azote, oxygène ou air), du nombre de passage (Ps, 1 ou 3), de la durée d'allumage du plasma (Plasma cycle time, PCT), de la vitesse de passage du jet sur la surface de l'électrode, a été évalué par l'analyse d'XPS, la détermination colorimétrique des groupements carboxyliques sur la surface et la mesure de mouillabilité de la surface fonctionnalisée et nue.

III.2.1.1. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode par traitement au plasma d'azote

Les électrodes ont été traitées pas plasma d'azote avec une vitesse de passage du jet de $15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$, des PCT différentes (30%, 50% et 100%) et le nombre de passage différent (1 ou 3).

III.2.1.1.1. Caractérisation des surfaces fonctionnalisées par XPS

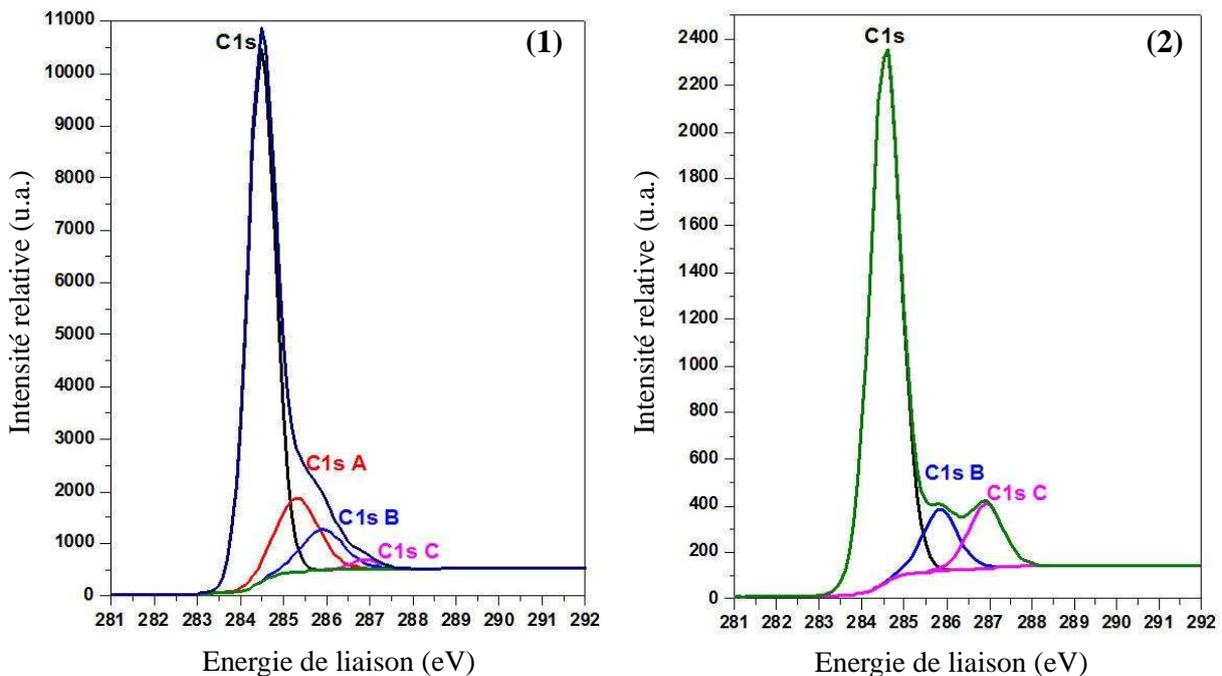


Figure 3.55 Spectre XPS des électrons C1s de la surface de l'électrode (1) nue, (2) traitée par le plasma d'azote avec une PCT de 50%.

Figure 3.55 présente le spectre de C1s de la surface de l'électrode nue et traitée par le plasma d'azote. Nous pouvons observer le pic principal à 284,6 eV correspondant au signal du carbone sous la forme graphite. On constate que le pourcentage molaire du carbone correspondant à ce pic est proche de 70% pour la surface de l'électrode nue et traitée par le plasma d'azote. Cela indique que l'électrode de carbone a maintenu ses propriétés de carbone graphite originales après être traitée par le plasma d'azote.

Le pic C 1s de l'électrode traitée par le plasma d'azote est élargi à plus haute énergie de liaison par rapport celui de l'électrode nue. Cet élargissement du pic peut être attribué à la formation des liaisons C-N et/ou C-O correspondant à la présence des groupements amines/amide, hydroxyle, aldéhyde et cétone. Dans la littérature, l'augmentation de la quantité des groupements fonctionnels tels que -C-OH, C-O-C-, O=C-O, pyridine et azote quaternaire sur la surface après le traitement de plasma d'azote a été publiée [18]. Le groupement aldéhyde est particulièrement attractif vis-à-vis du groupement amine grâce à sa forte réactivité même en absence des agents de couplage conduisant à la formation de d'une base de Schiff [19], [20], [21].

	C1s	C1s A	C1s B	C1s C	O1s	N1s
Energie de liaison (±0,2, eV)	284,6	285,2	285,8	286,9	532,4	399,6
Pourcentage molaire (%)						
Electrode nue	71,83	14,37	6,12	1,69	5,24	0,76
Electrode traitée par le plasma d'azote	70,01	0	8,18	9,14	11,66	1,01

Tableau 3.11 Répartition du pourcentage molaire des composantes du pic C 1s, O 1s et N 1s sur l'électrode nue et traitée par le plasma d'azote.

Le spectre de N 1s de l'électrode nue et celui de l'électrode traitée par le plasma d'azote sont tout centrés à 399,6 eV et il n'existe pas de différence majeure entre les deux spectres. En revanche, on constate que le pourcentage molaire d'azote passe de 0,76 pour l'électrode nue à 1,01 pour l'électrode fonctionnalisée. Cette faible quantité d'azote introduit au cours du traitement de plasma d'azote pourrait être due à la faible réactivité de l'azote dans le plasma.

Le spectre de O 1s de l'électrode nue et celui de l'électrode traitée par le plasma d'azote sont centrés à 533,4 eV. Après le traitement du plasma, le pourcentage molaire de l'oxygène sur la surface a doublé: de 5,24 à 11,66. Cette consommation de l'oxygène sur l'électrode traitée par plasma est un procédé bien connu [22], [23], [24], [25], ce qui, dans notre cas particulier, pourrait être dû à la diffusion de l'oxygène dans le jet de plasma et/ou post-oxydation de la

surface activée par plasma.

III.2.1.1.2. Mesure de l'angle de contact

	PCT, Ps	Angle de contact de l'eau (θ)	Rugosité de la surface (Ra, nm)
Electrode nue		130 (± 3)	2500 (± 300)
Electrode traitée par le plasma d'azote	100, 3	5 (± 3)	500 (± 100)
	50, 3	12 (± 3)	2400 (± 350)
	50, 1	14 (± 3)	-
	30, 3	18,3 (± 3)	2600 (± 300)

Tableau **3.12** Angle de contact de l'eau sur les surfaces de l'électrode et les rugosités de la surface de l'électrode.

L'angle de contact de l'eau à la surface de l'électrode nue est de $130 \pm 3^\circ$. Après le traitement au plasma d'azote, les angles de contact de l'eau sont inférieurs à 20° , ce qui indique également la réussite de fonctionnalisation de la surface.

La durée du cycle de plasma (PCT) influence l'hydrophilicité de la surface de l'électrode. Plus la PCT est élevée, plus la surface de l'électrode est hydrophile. Sur la surface de l'électrode nue dont la rugosité est de 2500 ± 300 nm, l'angle de contact de l'eau est de $130 \pm 3^\circ$. Après le traitement de la surface de l'électrode par plasma d'azote en fixant le PCT à 30% puis 50%, les angles de contact mesurés sur la surface ont diminué jusqu'à $18 \pm 3^\circ$ et $5 \pm 3^\circ$ respectivement, alors que la rugosité n'a pas évolué sur aucun des deux types de l'électrode. Sur la surface de l'électrode traitée par plasma d'azote avec une PCT de 100%, l'angle de contact est encore plus faible : $5 \pm 3^\circ$. De plus, la rugosité de la surface passe à 500 ± 100 nm. Cette diminution de l'angle de contact est dû à la fois à la fonctionnalisation de la surface et le lissage par phénomène de gravure. Effectivement, ce phénomène de gravure a déjà été observé dans les cas de plasma à basse pression et à pression atmosphérique [26],[22],[27],[28]. Donc l'augmentation du PCT conduit à augmenter le caractère énergétique de la décharge et des différentes espèces réactives formées, ce qui entraîne plus de chance de réagir avec la surface de carbone et d'éliminer des zones de carbone amorphe qui sont plus sensibles au gravure. Pour obtenir une surface fonctionnalisée et éviter le phénomène de la gravure au plasma, nous avons choisi la PCT de 50% pour le traitement du plasma d'aire et d'oxygène de la suite.

III.2.1.2. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode par traitement au plasma d'air

Les électrodes ont été traitées pas plasma d'air ou d'oxygène en fixant la PCT à 50%, des vitesses de passage du jet différentes (5, 20, 40 m·min⁻¹), et un nombre de passage différent (1 ou 3).

III.2.1.2.1. Caractérisation des surfaces fonctionnalisées par XPS

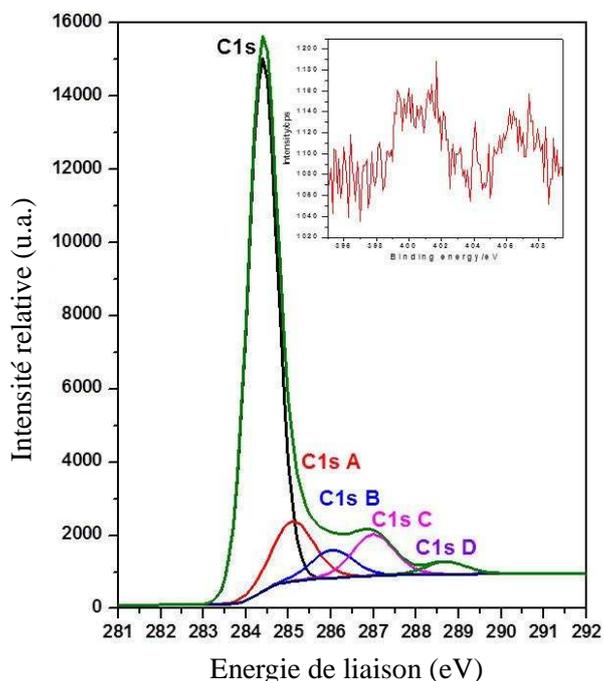


Figure 3.56 Spectre XPS des électrons C1s de la surface de l'électrode traitée par le plasma d'air avec une PCT de 50%, 3 passages du jet et une vitesse de passage du jet de 5 m·min⁻¹.

Electrode	C1s	C1s A	C1s B	C1s C	C1s D	O1s	N1s	N1s A	
nue	284,6	285,2	285,8	286,9	-	532,4	399,6	-	Energie de liaison (±0,2)
	71,83	14,37	6,12	1,69	-	5,24	0,76	-	Pourcentage molaire (%)
traitée par le plasma d'air	284,36	285,1	286,01	287,03	288,7	532,4	400,4	406,2	Energie de liaison (±0,2)
	58,36	10,33	5,95	6,87	3,1	14,47	0,65	0,27	Pourcentage molaire (%)

Tableau 3.13 Répartition du pourcentage molaire des composantes du pic C1s, O1s et N1s sur l'électrode nue et traitée par le plasma d'air.

Figure 3.56 présente le spectre de C 1s de la surface de l'électrode traitée par le plasma d'air. Nous pouvons observer le pic principal à 284,6 eV correspondant au signal du carbone C-C

qui correspond au graphite sur l'électrode étudiée. Et le pic C 1s de l'électrode traitée par le plasma d'air est élargi à plus haute énergie de liaison par rapport celui de l'électrode nue. Cet élargissement est dû à la présence des trois pics attribués à la formation des liaisons C-O correspondant à l'hydroxyle $286,01 \pm 0,2$ eV, le carbonyle $287,03 \pm 0,2$ eV et le carboxyle $288,7 \pm 0,2$ eV respectivement [26], [18]. Par rapport à l'électrode traitée par le plasma d'azote, nous avons un pic supplémentaire à $285,2 \pm 0,2$ eV qui est attribué à l'atome de carbone sp^3 . De plus, un point très important à noter, le pourcentage molaire du carbone correspondant au pic $284,36$ eV sur la surface traitée par plasma d'air est de $58,36$, ce qui est inférieur à ceux sur l'électrode nue et traitée par plasma d'azote qui sont de $71,83$ et $70,01$ respectivement. Cela indique que la teneur en graphite est plus faible sur l'électrode traitée par plasma d'air.

Le pourcentage molaire de l'oxygène a passé de $5,24$ à $14,47$ après le traitement du plasma d'air. Le spectre de N1s de l'électrode traitée par plasma d'air présente un pic correspondant aux espèces imine et amide (à $400,4$ eV) et un pic à plus haute énergie de liaison (vers $406,2$ eV) correspondant probablement à l'espèce de l'azote oxydé attribué au groupement nitro [29]. La formation de ces groupements fonctionnels peut s'expliquer par l'existence simultanée des espèces réactives d'oxygène et d'azote, ainsi que NO et NO₂ dans le plasma d'air.

III.2.1.2.2. Détermination colorimétrique des groupements carboxyliques à la surface de l'électrode

Nous avons utilisé la molécule sonde toluidine bleue, un colorant qui absorbe à 633 nm, pour déterminer la quantité des groupements carboxyliques à la surface de l'électrode traitée par plasma d'air. Figure 3.57 présente les densités du groupement carboxylique à la surface quand les électrodes ont été traitées par plasma d'air en effectuant une PCT de 50% avec différents vitesses de passage du jet et nombre de passage (Ps).

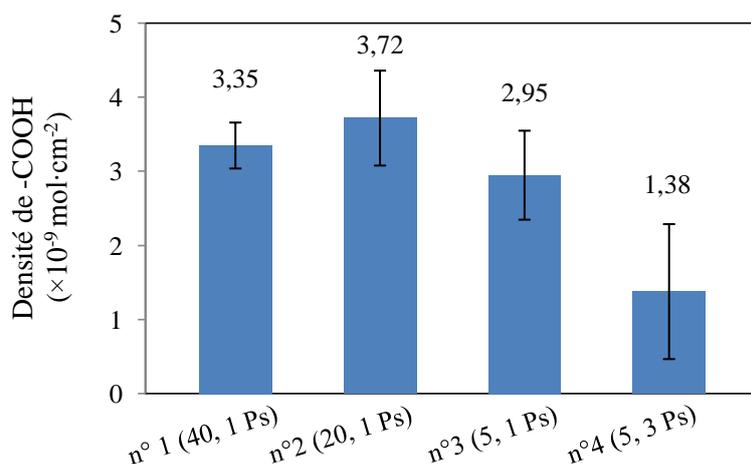


Figure 3.57 Densités du groupement carboxylique à la surface traitée par plasma d'air avec différents vitesses de passage du jet (40, 20 et 5 m·min⁻¹) et nombre de passage (1 et 3 Ps).

Quand l'électrode a été traitée par plasma d'air avec 1 passage du jet, la densité de -COOH sur l'électrode traitée avec une vitesse de passage du jet de 20 m·min⁻¹ est légèrement plus élevée que celle sur l'électrode traitée avec une vitesse de 40 m·min⁻¹, vraisemblablement parce que la durée du traitement a été doublée quand on effectue une vitesse de 20 m·min⁻¹. En revanche, quand le traitement du plasma a été effectué avec une vitesse de 5 m·min⁻¹ qui est encore plus faible, la densité de -COOH sur l'électrode a baissé. Cette perte du groupement fonctionnel doit être dû à l'effet du phénomène de gravure. Cet effet est plus évident quand la durée du traitement a continué à être prolongée en effectuant 3 passages du jet avec une vitesse de 5 m·min⁻¹ (électrode n° 4): la densité du groupement fonctionnel a diminué jusqu'à $(1,38 \pm 0,91) \times 10^{-9}$ mol·cm⁻². Effectivement, la surface de l'électrode n° 4 a une rugosité de 430±100 nm et sur laquelle l'angle de contact de l'eau est 1,6±0,3°. Cela témoigne également le lissage par phénomène de gravure.

III.2.1.3. Fonctionnalisation de la surface de l'électrode par traitement au plasma d'oxygène

Nous avons également traité la surface de l'électrode par plasma d'oxygène et déterminé la densité de -COOH sur l'électrode avec la méthode utilisant la TBO. A la surface traitée par plasma d'oxygène avec une PCT de 50%, une vitesse de passage du jet de 5 m·min⁻¹ et 3 passages du jet, nous avons une densité de -COOH de $(5,5 \pm 1,6) \times 10^{-10}$ mol·cm⁻², ce qui est 2,5 fois inférieure à celle sur l'électrode traitée par plasma d'air en utilisant les paramètres identiques. L'angle de contact de l'eau à la surface traitée par plasma d'oxygène est de 0°, ce qui est également plus faible que celle sur l'électrode traitée par plasma d'air. Ce

comportement peut être dû à la gravure de surface par plasma d'oxygène discuté dans le paragraphe précédent. De plus, nous avons trouvée que la gravure de surface par plasma d'oxygène est plus importante que celle par plasma d'air dans les mêmes conditions.

III.2.1.4. Discussion

Nous pouvons fonctionnaliser la surface de l'électrode par le traitement au plasma d'air, d'oxygène et d'azote. Quand on effectue le traitement plasma avec les mêmes PCT (50%) et nombre du passage (3 passages), le traitement au plasma d'oxygène permet d'obtenir un l'angle de contact d'eau plus faible (0°) que celui obtenu avec un plasma d'azote ($12\pm 3^\circ$). Cela est probablement dû à une haute concentration totale des hétéroatomes (O, N), particulièrement l'oxygène, qui a été incorporés dans la surface de l'électrode traitée par plasma d'oxygène.

Une autre explication pourrait être la conséquence de la gravure de la surface plus importante au cours du traitement au plasma d'air et d'oxygène qu'au cours du traitement au plasma d'azote [26],[28].

III.2.2. Immobilisation de la laccase sur l'électrode fonctionnalisée

La laccase a été immobilisée sur l'électrode fonctionnalisée par formation d'une liaison covalente à la surface de l'électrode ou par adsorption. L'efficacité de l'immobilisation de la laccase est testée en mesurant l'activité de l'enzyme avec un substrat de la laccase, ABTS.

III.2.2.1. Immobilisation de la laccase sur l'électrode traitée au plasma d'air et d'oxygène

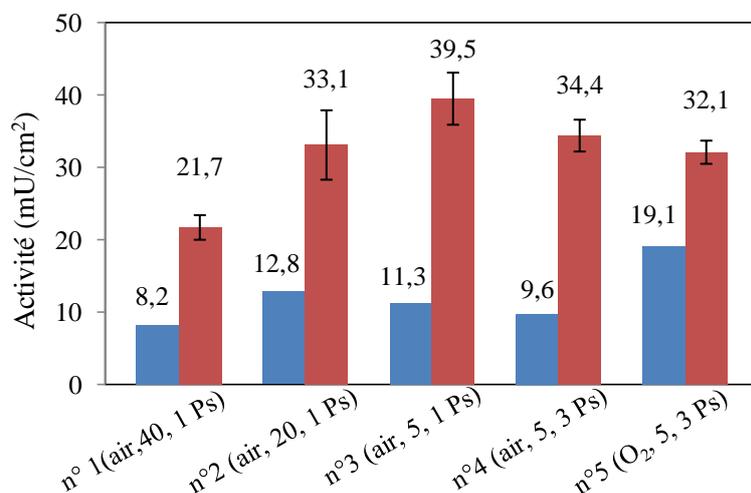


Figure 3.58 Les activités de la laccase adsorbée (en bleu) et greffée (en rouge) sur les électrodes traitées par plasma d'air ou oxygène avec différents vitesses de passage du jet (40, 20 et 5 m·min⁻¹) et nombres de passage du jet (1, et 3 Ps).

La figure 3.58 présente les activités de la laccase sur les électrodes traitées par plasma d'air ou oxygène en utilisant différentes vitesses de passage du jet et nombres de passage. Sur toutes les conditions, nous avons une activité plus importante pour la laccase greffée que pour la laccase adsorbée sur l'électrode. Cela montre que la liaison amide a été formée entre le groupement carboxylique sur l'électrode et l'un des 5 résidus lysine, contient la laccase. Et nous pouvons immobiliser plus de laccase par une liaison covalente que par l'adsorption.

La quantité de la laccase immobilisée est influencée par la densité et la réactivité des groupements fonctionnels sur la surface. Quand l'électrode a été traitée par plasma d'air avec une vitesse de 40 m·min⁻¹ et un passage, l'activité de la laccase greffée sur l'électrode est relativement faible, puisque la densité des groupements fonctionnels sur l'électrode est faible. Quand on a traité la surface avec une vitesse plus lente (20 m·min⁻¹), la quantité de la laccase immobilisée à la surface augmente, puisque nous avons plus de -COOH sur l'électrode en raison d'une durée de traitement plus longue. Quand on a effectué une vitesse de 5 m·min⁻¹ qui

est encore plus lente en réalisant un passage ou trois passages du jet, la densité du groupement fonctionnel sur l'électrode devient plus faible. On a greffé presque la même quantité de la laccase que sur l'électrode n°2, bien que la densité du groupement fonctionnel soit plus faible. Nous pouvons expliquer que le lissage par la gravure au plasma rend la surface plus hydrophile et donc favorise l'adsorption de la laccase à la surface de l'électrode. Ce comportement est plus évident sur l'électrode traitée par plasma d'oxygène : nous avons plus de la laccase adsorbée à la surface hyper hydrophile. Par contre, la proportion de la laccase greffée sur l'électrode traitée par plasma d'oxygène est plus faible par rapport à celle sur l'électrode traitée par plasma d'air avec les paramètres identiques. Parce que les activités enzymatiques totales sont identiques sur les deux types de l'électrode, et la proportion de la laccase adsorbée sur l'électrode traitée par plasma d'oxygène est plus importante. Cela est dû à la faible densité du groupement fonctionnel sur l'électrode traitée par plasma d'oxygène.

III.2.2.2. Immobilisation de la laccase sur l'électrode traitée au plasma d'azote

Sur l'électrode fonctionnalisée par le traitement au plasma d'azote, notre objectif initial est d'immobiliser la laccase par formation d'une liaison amide entre le groupement amine à la surface de l'électrode et le groupement carboxylique sur la laccase. La liaison covalente peut également avoir lieu entre la fonction d'aldéhyde généré à la surface de l'électrode au cours du traitement du plasma et le groupement amine sur la laccase.

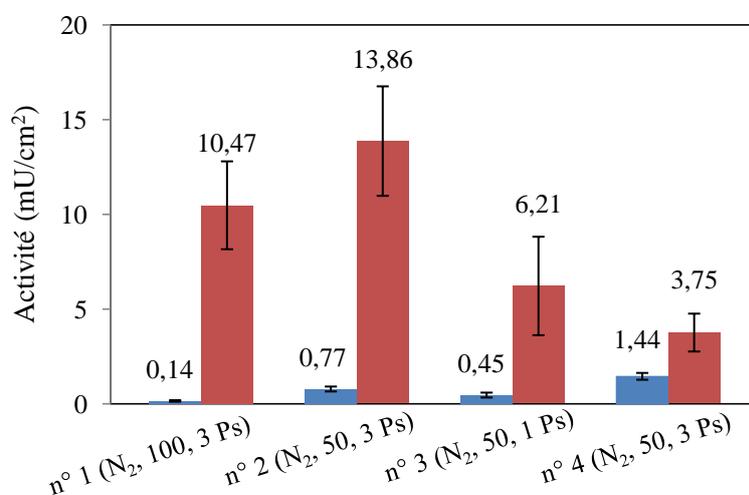


Figure 3.59 Les activités de la laccase adsorbée (en bleu) et greffée (en rouge) sur les électrodes traitées par plasma d'azote avec différents PCT (30, 50 et 100) et nombres de passage du jet (1, et 3 Ps) en effectuant une vitesse de passage du jet de 15 m·min⁻¹.

La figure 3.59 présente les activités sur les électrodes traitées par différents plasmas d'azote. Quand nous avons traité l'électrode avec un PCT de 50%, nous avons obtenu l'activité la plus élevée sur l'électrode avec la laccase greffée : $13,8 \pm 2,9$ mU/cm². Cela pourrait s'expliquer par l'utilisation du plasma avec un PCT élevé, permettant une meilleure activation de la surface de l'électrode, ce qui entraîne un meilleur état de fonctionnalisation de la surface. Ce résultat est également cohérent avec l'évolution de la mouillabilité de la surface de l'électrode traitée par plasma d'azote, ce qui a été discuté dans le manuscrit précédent. Quand l'électrode a été traitée en utilisant un PCT de 100%, l'activité de la laccase greffée sur l'électrode est de $10,4 \pm 2,3$ mU/cm², ce qui est légèrement plus faible que sur l'électrode traitée avec un PCT de 50%.

Quand nous avons traité l'électrode en effectuant une PCT de 50% et 3 passages du jet, nous avons obtenu une activité trois fois supérieure à celle sur l'électrode traitée par 1 passage du jet. Parce que la durée du traitement est plus longue ce qui permet d'avoir une meilleure activation de la surface de l'électrode.

L'activité sur l'électrode pour la laccase greffée par formation d'une liaison covalente à la surface en présence de EDC et NHS est toujours plus importante que celle pour la laccase adsorbée.

III.2.2.3. Discussion

L'activité de la laccase greffée sur l'électrode traitée par plasma d'air ou d'oxygène est au moins deux fois supérieure à celle sur l'électrode traitée par plasma d'azote. Cela peut s'expliquer par le fait que les groupements fonctionnels sur l'électrode traitée par plasma d'air sont plus nombreux que ceux sur l'électrode traitée par plasma d'azote, comme l'indique l'analyse XPS.

Pour la laccase adsorbée, son activité sur l'électrode traitée par plasma d'air et d'oxygène est généralement dix fois supérieure à celle sur l'électrode traitée par plasma d'azote. Cela peut s'expliquer par la super-hydrophilicité de l'électrode contenant des -COOH qui favorisent l'adhésion de la laccase, et par l'orientation de la laccase. Effectivement, comme la forme graphite du carbone en surface a été maintenue quand la surface de l'électrode a été traitée par plasma d'azote, la laccase pourrait être orientée en mettant le site T1 en face de la surface en graphite. Cette orientation peut probablement empêcher la diffusion de l'ABTS vers le site actif T1 [30], [31], ce qui conduit à sous-estimer l'activité de la laccase sur l'électrode traitée

par plasma d'azote par rapport l'électrode traitée par plasma d'air et d'oxygène où la laccase a été orientée de façon aléatoire à la surface.

III.2.3. Etude du courant cathodique de la réduction de l'oxygène catalysée par la laccase immobilisée à la surface fonctionnalisée

III.2.3.1. Laccase immobilisée à la surface traitée au plasma d'air et d'oxygène

Figure 3.60 présente le cycle de voltammétrie cyclique, sous N₂ et sous 1 atm d'air, d'une électrode modifiée avec la laccase adsorbée et greffée. L'électrode a été fonctionnalisée par le traitement au plasma d'air avec un PCT de 50%, une vitesse de passage du jet de 20m·min⁻¹, et 1 passage. Nous avons observé un courant de réduction du dioxygène catalysé par la laccase vers 0,6 V (vs. SCE) en présence d'air, ce qui correspond à l'électrode graphite modifiée avec la laccase présentée dans la littérature [15], [17]. Cette apparition du courant cathodique montre que le transfert d'électron a lieu entre l'électrode et la laccase immobilisée. A 0,2V, on a observé une densité de courant de 49,1±9,4 μA/cm² pour la laccase greffée et de 15,1 μA/cm² pour la laccase adsorbée, alors que les activités de l'enzyme immobilisée sont 33,1±4,8 mU/cm² et 12,8 mU/cm², respectivement. Ce résultat est reproductible après plusieurs répétitions.

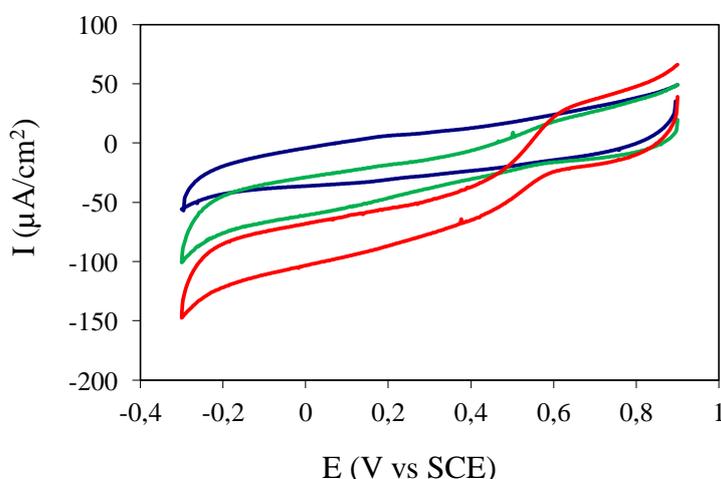


Figure 3.60 Voltammétrie cyclique sous N₂ (bleu) et sous 1 atm d'air d'une électrode (fonctionnalisée par le traitement du plasma d'aire) modifiée avec la laccase adsorbée (vert) et greffée (rouge). (La mesure a été effectuée dans 50 mM tampon d'acétate, pH4,2, 100 mM NaClO₄. v=10 mV·s⁻¹)

La figure 3.61 présente la mesure du courant de réduction du dioxygène par chronoampérométrie pour la même électrode. Le potentiel est fixé à 0,2 V. En présence de dioxygène, on voit bien le courant de réduction correspondant à la réduction du dioxygène catalysée par la laccase. Nous avons une densité de courant de $55,8 \pm 12,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ pour la laccase greffée et de $17,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ pour la laccase adsorbée. Ces valeurs sont proches de celle obtenue avec voltammétrie cyclique. Ce résultat est également reproductible.

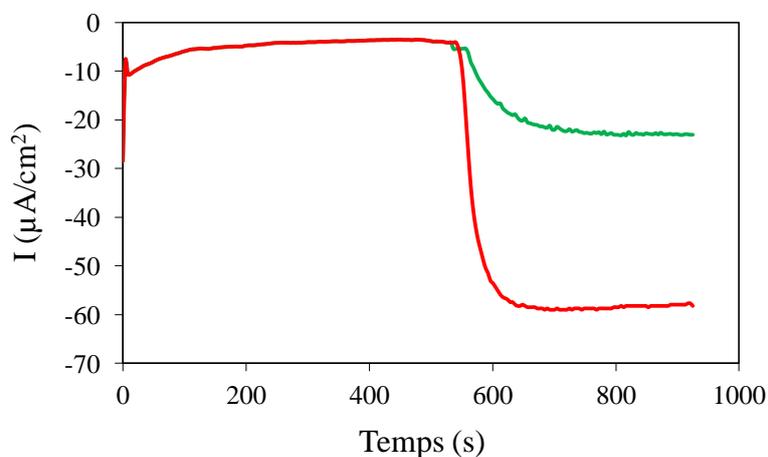


Figure 3.61 Chronoampérométrie sous N_2 (bleu) et sous 1 atm d'air d'une électrode (fonctionnalisée par le traitement du plasma d'air) après l'adsorption (vert) et greffage (rouge) de la laccase. (La mesure a été effectuée dans 50 mM tampon d'acétate, pH 4,2, 100 mM NaClO_4 . $v=10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$)

La densité de courant obtenue avec la laccase greffée est toujours supérieure à celle avec la laccase adsorbée, puisque la quantité de la laccase greffée sur l'électrode est toujours plus importante que celle de la laccase adsorbée sur le même type de l'électrode.

On a traité la surface de l'électrode au plasma d'air et d'oxygène avec un PCT de 50%, une vitesse de passage du jet de $5 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ et 3 passages, et puis mesuré la densité de courant de la réduction du dioxygène de la laccase greffée sur l'électrode. Nous avons les densités de courant $50,8 \pm 9,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ et $36,6 \pm 0,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ pour le cas du plasma d'air et d'oxygène respectivement. Les surfaces de tous les deux types d'électrode sont rendues hydrophiles par le phénomène de gravure.

Cet effet est plus évident avec le traitement du plasma d'oxygène puisque l'angle de contact à la surface de l'électrode traitée par plasma d'oxygène est plus faible, cette surface est alors plus hydrophile. Cela favorise l'adsorption de la laccase sur cette électrode. D'autre part, la gravure provoquée par le traitement plasma provoque une perte du groupement fonctionnel sur la surface, ce qui limite la quantité de laccase greffée. La densité de $-\text{COOH}$ sur

l'électrode traitée par plasma d'oxygène est 2,5 fois inférieure à celle sur l'électrode traitée par plasma d'air. Le greffage de la laccase sur l'électrode traitée par plasma d'air est plus facile. Nous avons obtenu une densité de courant plus élevée avec la laccase immobilisée sur l'électrode traitée par plasma d'air. Ce résultat nous montre que l'ensemble de ces deux effets au dessus favorise l'immobilisation de la laccase sur l'électrode traitée par plasma d'air.

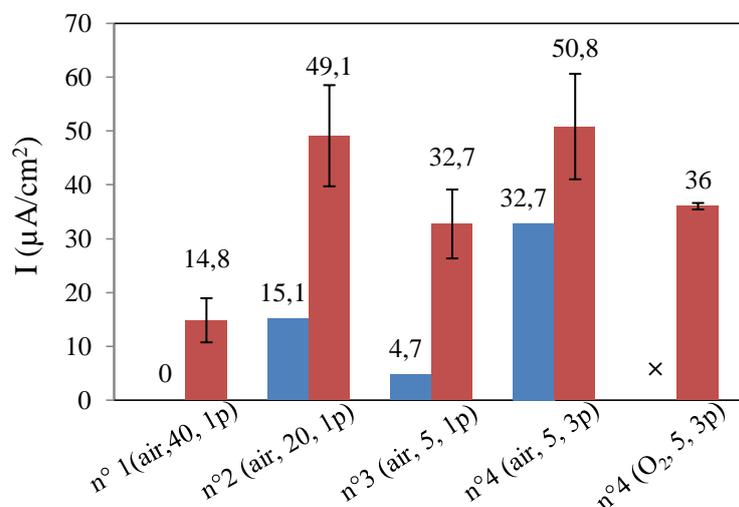


Figure 3.62 Les densités de courant de réduction du dioxygène sur l'électrode traitée par plasma d'air et d'oxygène après l'adsorption (bleu) ou le greffage (rouge) de la laccase. La mesure a été effectuée par voltammétrie cyclique.

Parmi les électrodes traitées par plasma d'air, nous avons une densité de courant plus élevée avec la laccase greffée sur l'électrode traitée par plasma en utilisant une vitesse de $20 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ et 1 passage (électrode n°2) et sur celle traitée en utilisant une vitesse de $5 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ et 3 passages (électrode n°3). Sur l'électrode n°1, la densité de courant obtenue avec la laccase adsorbée est plus faible. Cela montre que la proportion de la laccase adsorbée est moins importante sur ce type d'électrode. La proportion de la laccase greffée est alors plus importante quand on a effectué l'immobilisation de la laccase de façon covalente en présence d'EDC et NHS. Cela peut être expliqué par les nombreux groupements fonctionnels sur ce type d'électrode, ce qui favorise le greffage de la laccase. En revanche, la proportion de la laccase adsorbée sur l'électrode n°3 est plus importante puisque nous avons une densité de courant plus élevée avec la laccase adsorbée. Nous pouvons l'expliquer par le fait que la surface de l'électrode n°3 pourrait être plus hydrophile en raison de l'effet de la gravure au plasma. L'hydrophilicité importante de sa surface favorise l'adsorption de la laccase. La proportion de la laccase greffée est alors moins importante sur l'électrode n°3 que sur l'électrode n°2. Effectivement, une proportion importante de la laccase greffée est préférée, ce

qui correspond les paramètres pour le traitement de l'électrode n°2. De plus, le traitement de l'électrode n°2 est 12 fois plus rapide que celui de l'électrode n°3. Une vitesse de 20 m·min⁻¹ et 1 passage sont donc préférés pour le traitement de l'électrode par plasma d'air.

III.2.3.2. Laccase immobilisée à la surface traitée au plasma d'azote

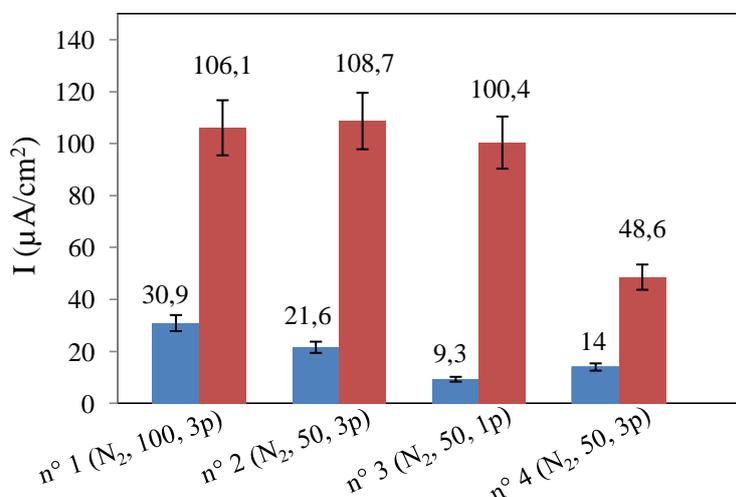


Figure 3.63 Les densités de courant de réduction du dioxygène sur l'électrode traitée par plasma d'azote après l'adsorption (bleu) ou le greffage (rouge) de la laccase. La mesure a été effectuée par voltammétrie cyclique.

Pour toutes les électrodes traitées par le plasma d'azote, la densité de courant obtenue avec la laccase greffée est au moins trois fois plus importante que celle obtenue avec la laccase adsorbée. La densité de courant la plus élevée (108 μA/cm² (±10%)) a été obtenue avec la laccase greffée sur l'électrode traitée au plasma d'azote avec un PCT de 50%, une vitesse de 15 m·min⁻¹ et 3 passages du jet, ce qui correspond à l'activité enzymatique la plus importante. La densité de courant obtenue avec la laccase adsorbée est également significative bien que son activité soit sur l'électrode soit faible.

III.2.3.3. Discussion

Nous avons constaté que l'activité de la laccase immobilisée sur l'électrode traitée par plasma d'air et oxygène est plus élevée que celle sur l'électrode traitée par plasma d'azote. Néanmoins, la laccase greffée sur l'électrode traitée par plasma d'air et oxygène ne présente pas la densité de courant plus élevée. La densité de courant maximale obtenue avec la laccase

greffée sur l'électrode traitée par plasma d'azote est 2 fois plus que celle sur l'électrode traitée par plasma d'air. Cela pourrait s'expliquer par : (1) la haute adsorption de la laccase sur la surface de l'électrode traitée par plasma d'air, qui est plus lisse et hydrophile, limitant le transfert d'électron, (2) une orientation appropriée de la laccase sur l'électrode traitée par plasma d'azote. Effectivement, la laccase est préférentiellement adsorbée sur l'électrode en mettant le site T1 en face de la surface de l'électrode, ce qui améliore le transfert d'électron direct à la surface de l'électrode. Pourtant l'activité semble être faible, parce que la diffusion du substrat vers le site T1 est entravée (ou gênée). Sur l'électrode traitée par plasma d'air, la laccase est orientée de façon aléatoire en raison de la surface de graphite fortement modifiée, ce qui conduit à une activité plus élevée mais une densité de courant plus faible. Cette modification a été montrée par l'analyse de XPS.

Plusieurs articles ont été publiés sur l'immobilisation covalente de la laccase sur une électrode fonctionnalisée avec des groupements carboxyliques, ce qui produit une densité de courant de l'ordre de quelques nA/cm^2 avec le transfert d'électron médié (MET) [32], [33]. Par rapport à l'électrode d'or plane fonctionnalisée avec des groupements amines qui est modifiée avec la laccase par formation d'une liaison covalente et qui a une densité de courant autour de $40 \mu\text{A/cm}^2$ en absence du médiateur redox, ainsi que les travaux antérieurs [30],[32], le traitement de APPJ utilisé dans nos travaux est une approche simple et rapide (quelques secondes) pour la fonctionnalisation la surface de la bioélectrode, tout en conduisant à une performance comparable.

Pour les groupements fonctionnels générés électrochimiquement sur l'électrode de graphite à faible densité par l'électroréduction du sel de diazonium, Vaz-Domínguez et al. [15] ont rapporté une densité de courant maximal de $500 \mu\text{A/cm}^2$ et les densités de courant autour de $300 \mu\text{A/cm}^2$ mesuré par voltammétrie cyclique, ce qui est 3~4 fois supérieure à celle des électrodes fonctionnalisée par le traitement du plasma d'azote dans nos travaux. Cette différence pourrait dû à : (1) la rugosité de surface différente des électrodes, (2) le type de laccase testé (laccase de *T. versicolor* contre *T. hirsuta*). Même si les séquences génomiques des deux laccases sont assez similaires (87% d'identité de leur séquence primaire), il y a trois résidus lysine en plus sur la laccase de *T. hirsuta*, ce qui pourrait accroître l'efficacité de l'immobilisation covalente de la protéine celui-ci. (3) la meilleure électroactivité des électrodes de carbone: la surface électroactive des tiges Sigma utilisées par Vaz dominguez et al. [15] est de $1 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ pour une surface géométrique de $0,07 \text{ cm}^2$ alors que pour le carbone spectrographique (surface géométrique : $0,385 \text{ cm}^2$) que nous avons utilisée, la

surface électroactive n'est que $0,5 \text{ cm}^2$. Si l'on compare les densités de courant calculé en utilisant la surface électroactive plutôt que celle géométrique, nos électrodes traitées par plasma semblent être plus efficace.

Jusqu'à présent, au meilleur de notre connaissance, les densités de courant les plus élevées pour la bioélectrode avec DET qui ont été publiées dans la littérature ont été obtenues pour la laccase adsorbée physiquement sur une électrode de carbone tridimensionnelle nanoporeuse-nanostructurée [34], [35]. Cependant, selon toute vraisemblance, le courant peut être attribué à la très haute surface spécifique de l'électrode utilisée. Pour ces bioélectrodes, la stabilité à long terme reste une question importante.

Le travail actuel montre que la laccase peut être immobilisée de façon covalente sur des électrodes de carbone fonctionnalisées par traitement du plasma, une technique simple est très rapide. D'autres améliorations des densités de courant seront probablement obtenues sur nanoporeuse/nanostructurée électrode de carbone fonctionnalisées qui possède une surface spécifique élevée.

III.2.4. Conclusion

La fonctionnalisation de la surface de l'électrode en carbone graphite est faisable grâce à un système de jet de plasma à pression atmosphérique. Ce système conduit à des surfaces fonctionnalisées contrôlées en quelques secondes, ce qui permet l'immobilisation covalente de la laccase par la suite. La nature et la densité des groupements fonctionnels ainsi que la rugosité de surface peuvent être contrôlées par modulation des conditions de traitement du plasma (durée du traitement, nature du gaz, du PCT, etc.). Contrairement au plasma d'air, le traitement au plasma d'azote crée principalement des groupements carbonyles (probablement groupements aldéhyde) avec seulement une légère consommation d'azote sans former une couche électriquement résistive en maintenant la nature de graphite de l'électrode de carbone. Ces résultats seront utilisés dans des travaux de recherche à venir afin d'optimiser les caractéristiques de la surface de l'électrode qui sont cruciales pour réussir une immobilisation covalente de la laccase.

L'immobilisation covalente présente une meilleure activité enzymatique et une densité de courant plus élevée sur l'électrode par rapport à la simple adsorption physique de l'enzyme.

La quantité de la laccase immobilisée sur l'électrode dépend de la nature du groupement fonctionnel, de la mouillabilité de surface et de la rugosité, qui influencent l'adhésion, la distribution, la conformation et l'orientation de la laccase.

Les activités enzymatiques sur les électrodes traitées par plasma d'air et d'oxygène sont plus élevées que celles sur les électrodes traitées par plasma d'azote. Cependant, la densité de courant obtenue avec l'électrode traitée par plasma d'azote est plus élevée. Une densité de courant supérieure à $108 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ a été obtenue sur la surface plane de carbone traitée par plasma avec seulement quelques secondes de traitement.

Basé sur ces résultats, une étude plus approfondie sera réalisée afin de mettre en corrélation les propriétés de surface, la distribution, la conformation et l'orientation de laccase adsorbée et greffée et son comportement bioélectrochimique. Dans les travaux futurs, les électrodes nanoporeuses fonctionnalisées par plasma seront explorées afin d'augmenter la quantité de laccase et d'améliorer la densité de courant.

Bibliographies

1. Christopher M. A. Brett and Ana Maria Oliveira Brett. (1994). *Electrochemistry, Principles, Methods, and applications*. New York : OXFORD UNIVERSITY PRESS
2. Tortolini, C., Rea, S., Carota, E., Cannistraro, S., and Mazzei, F. (2012) Influence of the immobilization procedures on the electroanalytical performances of *Trametes versicolor* laccase based bioelectrode, *Microchemical Journal* 100, 8–13.
3. Brooksby, P. A., and Downard, A. J. (2004) Electrochemical and Atomic Force Microscopy Study of Carbon Surface Modification via Diazonium Reduction in Aqueous and Acetonitrile Solutions, *Langmuir* 20, 5038–5045.
4. Baranton, S., and Bélanger, D. (2005) Electrochemical Derivatization of Carbon Surface by Reduction of in Situ Generated Diazonium Cations, *J. Phys. Chem. B* 109, 24401–24410.
5. Ortiz, B., Saby, C., Champagne, G. Y., and Bélanger, D. (1998) Electrochemical modification of a carbon electrode using aromatic diazonium salts. 2. Electrochemistry of 4-nitrophenyl modified glassy carbon electrodes in aqueous media, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 455, 75–81.
6. Bélanger, D., and Pinson, J. (2011) Electrografting: a powerful method for surface modification, *Chemical Society Reviews* 40, 3995.
7. Liu, Y.-C., and McCreery, R. L. (1995) Reactions of Organic Monolayers on Carbon Surfaces Observed with Unenhanced Raman Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 11254–11259.
8. Breton, T., and Bélanger, D. (2008) Modification of Carbon Electrode with Aryl Groups Having an Aliphatic Amine by Electrochemical Reduction of In Situ Generated Diazonium Cations, *Langmuir* 24, 8711–8718.
9. Ghilane, J., Martin, P., Fontaine, O., Lacroix, J.-C., and Randriamahazaka, H. (2008) Modification of carbon electrode in ionic liquid through the reduction of phenyl diazonium salt. Electrochemical evidence in ionic liquid, *Electrochemistry Communications* 10, 1060–1063.
10. Allongue, P., Delamar, M., Desbat, B., Fagebaume, O., Hitmi, R., Pinson, J., and Savéant, J.-M. (1997) Covalent Modification of Carbon Surfaces by Aryl Radicals Generated from the Electrochemical Reduction of Diazonium Salts, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 201–207.
11. Adenier, A., Cabet-Deliry, E., Chaussé, A., Griveau, S., Mercier, F., Pinson, J., and

- Vautrin-UI, C. (2005) Grafting of Nitrophenyl Groups on Carbon and Metallic Surfaces without Electrochemical Induction, *Chem. Mater.* 17, 491–501.
12. Hurley, B. L., and McCreery, R. L. (2004) Covalent Bonding of Organic Molecules to Cu and Al Alloy 2024 T3 Surfaces via Diazonium Ion Reduction, *J. Electrochem. Soc.* 151, B252–B259.
 13. Lyskawa, J., and Bélanger, D. (2006) Direct Modification of a Gold Electrode with Aminophenyl Groups by Electrochemical Reduction of in Situ Generated Aminophenyl Monodiazonium Cations, *Chem. Mater.* 18, 4755–4763.
 14. Quinton, D., Galtayries, A., Prima, F., and Griveau, S. (2012) Functionalization of titanium surfaces with a simple electrochemical strategy, *Surface and Coatings Technology* 206, 2302–2307.
 15. Vaz-Dominguez, C., Campuzano, S., Rüdiger, O., Pita, M., Gorbacheva, M., Shleev, S., Fernandez, V. M., and De Lacey, A. L. (2008) Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition, *Biosensors and Bioelectronics* 24, 531–537.
 16. PrévotEAU, A., Courjean, O., and Mano, N. (2010) Deglycosylation of glucose oxidase to improve biosensors and biofuel cells, *Electrochemistry Communications* 12, 213–215.
 17. Pita, M., Gutierrez-Sanchez, C., Olea, D., Velez, M., Garcia-Diego, C., Shleev, S., Fernandez, V. M., and De Lacey, A. L. (2011) High Redox Potential Cathode Based on Laccase Covalently Attached to Gold Electrode, *J. Phys. Chem. C* 115, 13420–13428.
 18. W. Z. Shen, Z. Li, Y. Liu, Surface Chemical Functional Groups Modification of Porous Carbon, *Recent Patent on Chemical Engineering*, 1 (2008) 27-40.
 19. J.J. Gooding, S. Ciampi, The molecular level modification of surfaces: from selfassembled monolayers to complex molecular assemblies, *Chemical Society Reviews*, 40(2011) 2704-2718.
 20. X. Gong, L. Dai, H.J. Griesser, A.W.H. Mau, Surface immobilization of poly(ethylene oxide): Structure and properties, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 38 (2000) 2323-2332.
 21. H. Chen, L. Wang, Y. Zhang, D. Li, W.G. McClung, M.A. Brook, H. Sheardown, J.L. Brash, Fibrinolytic Poly(dimethyl siloxane) Surfaces, *Macromolecular Bioscience*, 8 (2008) 863-870.
 22. D. Kolacyak, J.r. Ihde, C. Merten, A. Hartwig, U. Lommatzsch, Fast functionalization of multi-walled carbon nanotubes by an atmospheric pressure plasma jet, *Journal of Colloid and Interface Science*, 359 (2011) 311-317.

23. M. Lejeune, O. Durand-Drouhin, S. Charvet, A. Grosman, C. Ortega, M. Benlahsen, Correlation between plasma parameters, microstructure and optical properties of sputtering magnetron CN_x films, *Thin Solid Films*, 444 (2003) 1-8.
24. R. Kaltofen, T. Sebald, J. Schulte, G. Weise, Plasma substrate interaction effects on composition and chemical structure of reactively r.f. magnetron sputtered carbon nitride films, *Thin Solid Films*, 347 (1999) 31-38.
25. A. Straboni, L. Pichon, T. Girardeau, Production of stable and metastable phases of zirconium nitrides by NH₃ plasma nitridation and by double ion beam sputtering of zirconium films, *Surface and Coatings Technology*, 125 (2000) 100-105.
26. A. Felten, C. Bittencourt, J.J. Pireaux, G. Van Lier, J.C. Charlier, Radio-frequency plasma functionalization of carbon nanotubes surface O₂, NH₃, and CF₄ treatments, *Journal of Applied Physics*, 98 (2005) 074308-074309.
27. H.-C. Wen, K. Yang, K.-L. Ou, W.-F. Wu, C.-P. Chou, R.-C. Luo, Y.-M. Chang, Effects of ammonia plasma treatment on the surface characteristics of carbon fibers, *Surface and Coatings Technology*, 200 (2006) 3166-3169.
28. Q. Zhu, J. Sun, C. He, J. Zhang, Q. Wang, Influence of Plasma Treatment on the Electroless Deposition of Copper on Carbon Fibers, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 43 (2006) 1853-1865.
29. U. Lommatzsch, D. Pasedag, A. Baalman, G. Ellinghorst, H.-E. Wagner, Atmospheric Pressure Plasma Jet Treatment of Polyethylene Surfaces for Adhesion Improvement, *Plasma Processes and Polymers*, 4 (2007) S1041-S1045.
30. S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A.I. Yaropolov, J.W. Whittaker, L. Gorton, Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2005) 2517-2554.
31. S. Shleev, A. Jarosz-Wilkolazka, A. Khalunina, O. Morozova, A. Yaropolov, T. Ruzgas, L. Gorton, Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes, *Bioelectrochemistry*, 67 (2005) 115-124.
32. R.S. Freire, N. Duran, L.T. Kubota, Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds, *Talanta*, 54 (2001) 681-686.
33. C. Tortolini, S. Rea, E. Carota, S. Cannistraro, F. Mazzei, Influence of the immobilization procedures on the electroanalytical performances of *Trametes versicolor* laccase based bioelectrode, *Microchemical Journal*, 100 (2012) 8-13.
34. L. Hussein, S. Rubenwolf, F. von Stetten, G. Urban, R. Zengerle, M. Krueger, S. Kerzenmacher, A highly efficient buckypaper-based electrode material for mediatorless

laccase-catalyzed dioxygen reduction, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 4133-4138.

35. S. Rubenwolf, O. Strohmeier, A. Kloke, S. Kerzenmacher, R. Zengerle, F. von Stetten, Carbon electrodes for direct electron transfer type laccase cathodes investigated by current density-cathode potential behavior, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2010) 841-845.

Conclusion et perspectives

Ce travail a montré l'intérêt d'immobiliser la laccase de *Trametes versicolor* sur l'électrode fonctionnalisée de façon électrochimique ou par traitement plasma pour développer une biocathode en réalisant le transfert d'électron direct (DET) entre l'enzyme et l'électrode. La laccase a été immobilisée sur l'électrode de façon covalente (liaison amide, ou base de Schiff) ou par adsorption. La présence de la laccase et sa quantité sur l'électrode ont été contrôlées par mesure de l'activité enzymatique sur la surface de l'électrode en utilisant un substrat de la laccase. L'analyse XPS a été également utilisée pour vérifier la présence de la laccase à la surface de l'électrode. La performance de la biocathode a été évaluée par mesure du courant catalytique sur l'électrode avec méthode électrochimique (voltammétrie cyclique et chronoampérométrie).

Sur l'électrode fonctionnalisée de façon électrochimique avec des groupements carboxyliques par réduction du sel de diazonium, nous avons pu immobiliser la laccase par formation d'une liaison covalente sur la surface. En revanche, sur l'électrode fonctionnalisée avec des groupements amines, nous avons une densité de courant relativement faible probablement à cause de l'épaisseur de la couche fonctionnelle qui pourrait perturber le transfert d'électron à la surface de l'électrode, bien que la laccase oxydée immobilisée par la base de Schiff soit orientée sur l'électrode. De plus, nous avons constaté que l'oxydation de la laccase permet d'avoir une densité de courant plus élevée pour l'électrode fonctionnalisée de façon électrochimique. Nous avons une meilleure performance particulièrement avec la laccase oxydée immobilisée sur l'électrode fonctionnalisée avec des groupements carboxyliques.

Sur l'électrode fonctionnalisée par le traitement plasma, la laccase peut être immobilisée à la surface de l'électrode de façon covalente. Sur l'électrode traitée par plasma d'azote, la laccase immobilisée donne une meilleure densité du courant grâce à une orientation favorable de la laccase sur la surface. Le traitement par jet de plasma hors équilibre à pression atmosphérique (APPJ) nous propose une méthode alternative rapide, stable, non polluante et de faible coût pour la fonctionnalisation la surface de l'électrode pour le développement de la bioélectrode.

Dans le travail à venir, des études plus approfondie sur l'évaluation de l'efficacité du transfert d'électron sur la surface de bioélectrode en fonction d'épaisseur de la couche fonctionnelle, l'état de surface et le matériel de l'électrode peuvent être réalisés pour optimiser la performance de la bioélectrode. Les électrodes nanoporeuses pourront être

utilisées pour augmenter la quantité de la laccase, et l'orientation de la laccase sur la surface de l'électrode doit être mieux contrôlée.