

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

UNIVERSITE SETIF-1

FACULTE DE TECHNOLOGIE

DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCEDES

## THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

**Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle**

*Option: Electrochimie des Matériaux*

Par

Mr : SELLOUM Djamel

*Thème*

***Développement de Matériaux d'Electrodes pour Biopiles à  
Combustibles***

Soutenue le : 22 / 10 / 2014 devant la commission d'examen :

<b>T. DOUADI</b>	<b>Pr, U. Sétif-1</b>	<b>Président</b>
<b>A. ZOUAOUI</b>	<b>Pr, U. Sétif-1</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>S. TINGRY</b>	<b>Mc, U, Montpellier 2-France</b>	<b>Co-rapporteur</b>
<b>B. NESSARK</b>	<b>Pr, U. Sétif-1</b>	<b>Examineur</b>
<b>R. BOUKHERROUB</b>	<b>Pr, U, Lille 1-France</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. CRETIN</b>	<b>Pr, U, Montpellier 2-France</b>	<b>Examineur</b>

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**Docteur**

Délivré par l'**Université Montpellier II**

Préparée au sein de l'école doctorale ED459

Spécialité : **Chimie et Physicochimie des Matériaux**

Présentée par **Djamel SELLOUM**

## **Développement de Matériaux d'Electrodes pour Biopiles à Combustible**

Soutenue le 22 Octobre 2014 devant le jury composé de

Mr B. NESSARK , Professeur, Université Sétif-1 Algérie	Rapporteur
Mr R. BOUKHERROUB, Directeur de recherche, Université de Lille-1 France.	Rapporteur
Mr M. CRETIN, Professeur, Université de Montpellier 2, France	Examineur
Mr T. DOUADI, Professeur, Université Sétif-1 Algérie	Président
Mr A. ZOUAOUI, Professeur, Université de Sétif-1 Algérie	Directeur de thèse
Mme Sophie TINGRY, Chargée de Recherche, Université de Montpellier II	Codirectrice de thèse



## REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Ce travail à été réalisé en cotutelle (dans le cadre d'une bourse de formation Averroès pour la période du 1<sup>er</sup> octobre 2012 au 30 avril 2014) entre le Laboratoire Croissance et Caractérisation de Nouveaux Semi Conducteurs, Faculté de Technologie, sous la direction du Professeur Ameer ZEGADI et l'Institut Européen des Membranes de Montpellier, sous la direction du Professeur P. MIELE. Je tiens à les remercier vivement pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et m'avoir permis de travailler dans de très bonnes conditions. Ma reconnaissance au programme AVERROES qui m'a permis de réaliser mon travail en finançant mon séjour de 20 mois à l'Institut Européen des Membranes, Université Montpellier 2 et en particulier à Mme A. GONZALEZ.

Je tiens à remercier Monsieur T. DOUADI, Professeur à l'Université Sétif 1 de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ma thèse.

J'adresse mes remerciements à Messieurs M. CRETIN, Professeur à l'université Montpellier 2, B. NESSARK, Professeur à l'Université SETIF 1 et R. BOUKHERROUB, Maître de Conférences à l'Université Lille 2 qui ont accepté de faire partie du jury.

Mes vifs et sincères remerciements à madame S. TINGRY, Maître de conférences à l'Université Montpellier 2, qui a dirigé mes travaux de recherche avec beaucoup de compétence et efficacité et pour la grande disponibilité dont elle a fait preuve au cours de la réalisation de ma thèse.

Tous mes remerciements vont à Ahmed ZOUAOUI, Professeur à l'Université SETIF 1, qui a dirigé mes travaux de recherche avec un grand professionnalisme, et l'aide précieux qui m'a apporté durant la réalisation du présent travail.

Je tiens à remercier les membres du laboratoire de l'IEM. Merci C. Innocent pour ton aide et ta gentillesse. Un merci aussi aux doctorants de l'équipe DM3 : Vincent, Joffret, Adriana, Ummy....

Un grand merci au Docteur L. Renaud de l'Université de Lyon pour son aide surtout dans la partie microfluidique.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres du laboratoire LCCNS-Sétif et à tous le personnel de la faculté de Technologie.

Enfin, Merci à ma famille qui m'a toujours encouragé

# Table des matières

---

## Table des matières

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

### Etude bibliographique

I- Les piles à combustible .....	4
II- Les piles à combustible biologique.....	6
II-1 Généralités .....	6
II-2 Classification des biopiles.....	7
II-2-1 Les biopiles microbiennes .....	7
II-2-2 Les biopiles à mitochondrie.....	7
II-2-3 Les biopiles enzymatiques.....	7
II-2-4 Les biopiles hybrides .....	11
III- Les enzymes.....	12
III-1 Définition et généralités .....	12
III-2 Classification des enzymes .....	15
III-3 Les différents types d'enzymes anodiques et cathodiques .....	17
III-3-1 Les enzymes anodiques.....	17
III-3-2 Les enzymes cathodiques .....	19
IV- Les biomatériaux d'électrodes.....	20
IV-1 Définition .....	20
IV-2 Méthodes d'immobilisation des enzymes .....	20
IV-2-1- L'adsorption.....	21
IV-2-2- La réticulation.....	22
IV-2-3- Le greffage covalent .....	22
IV-2-4- L'encapsulation.....	23
V- Les différents types de transfert d'électrons .....	23
V-1 Transfert d'électrons direct (DET).....	24

## Table des matières

V-2 Transfert d'électrons indirect (MET).....	25
V-2-1 Médiateurs en solution .....	25
V-2-2 Médiateurs immobilisés à la surface de l'électrode .....	28
VI- Matériaux d'électrodes utilisés dans les biopiles .....	28
VII- biopile à glucose/O <sub>2</sub> .....	29
VII-1 Principe .....	29
VII-2 Implantation des biopiles enzymatiques dans le corps humain.....	29
VIII- Biopiles à alcool .....	30
VIII-1-Généralités .....	30
IX-Objectifs de la thèse .....	34
Références .....	36

## Chapitre I : Bioélectrodes enzymatiques

Introduction .....	46
<b>Partie I : Bioélectrodes enzymatiques à base Au .....</b>	<b>49</b>
I-1-Biocathode pour la réduction de O <sub>2</sub> sur électrode Au.....	50
I-1-1-Principe de fonctionnement.....	50
I-1-2-Oxydoréduction du médiateur ABTS sur Au.....	50
I-1-3-Construction de la biocathode.....	51
I-1-4- Etude de la réponse électrochimique de la biocathode .....	53
I-1-5-Effet du pH sur le fonctionnement de la biocathode .....	55
I-1-6-Effet d'une couche d'adhésion préalable sur Au .....	55
I-1-7- Effet de la nature de la poudre de carbone .....	57
I-1-7-1 Caractérisation structurale et physique des poudres de carbone .....	57
I-1-7-1-a Caractéristiques physiques .....	58
I-1-7-1-b Caractéristiques structurales.....	59

## Table des matières

I-1-7-2 Influence de la poudre de carbone.....	61
I-1-8-Stabilité des biocathodes en fonction du temps.....	62
I-2- Bioanode pour l'oxydation de l'éthanol sur électrode Au .....	65
I-2-1-Principe de fonctionnement.....	65
I-2-2-Oxydoréduction du médiateur VK3 sur Au.....	65
I-2-3-Construction de la bioanode .....	66
I-2-4- Etude de la réponse électrochimique de la bioanode.....	68
I-2-5-effet du pH .....	69
I-2-6- effet de la nature de la poudre de carbone .....	70
I-2-7- Stabilité des bioanodes .....	72
 <b>Partie II- Bioélectrodes enzymatiques à base Au/NFsPAN/Silicium .....</b>	 <b>75</b>
II-1-Généralité et description du procédé d'électrospinning.....	75
II-2- préparation du matériau NFsPAN/Si.....	76
II-3- Caractérisation électrochimique des bioélectrodes à base de Au /NFsPAN/ Silicium...	83
II-3-1-Biocathode à base de Au /NFsPAN/Silicium .....	84
II-3-1-1- Construction de la biocathode.....	84
II-3-1-2- Réponse électrochimique de la biocathode.....	84
II-3-2-Bioanode à base Au/NFsPAN/Silicium.....	86
Conclusion .....	89
Références.....	90

# Table des matières

---

## Chapitre II : Biopile à éthanol/Oxygène

Introduction .....	95
Méthodes de caractérisation d'une biopile .....	97
 <b>Partie I : Biopile à éthanol/O<sub>2</sub> à base d'électrodes Au.....</b>	 <b>101</b>
I-1-Construction de la biopile .....	101
I-2-Charactérisation de la biopile .....	102
I-2-1-Charactérisation des biopiles par polarisation .....	103
I-2-1-1-Biopile à base d'une bioanode KS6 et une biocathode Super P <sup>®</sup> .....	103
I-2-1-2-Biopile avec une bioanode et une biocathode Super P <sup>®</sup> .....	106
I-2-1-3-Stabilité de la biopile.....	109
I-2-2-Charactérisation des biopiles par résistance imposée.....	111
I-2-2-1-Montage de caractérisation.....	111
I-2-2-2-Imposition de résistances croissantes et décroissantes.....	111
I-2-2-3-Stabilité de la biopile évaluée avec des résistances fixes imposées .....	113
 <b>Partie II : Biopile à éthanol/O<sub>2</sub> à base d'électrodes Au/NFsPAN/Si.....</b>	 <b>117</b>
II-1- Caractérisation de la biopile Au/NFsPAN .....	117
II-1-1- Caractérisation par polarisation.....	117
II-1-2- Caractérisation par résistance imposée .....	119
Conclusion .....	124
Références .....	125



# Table des matières

---

## Chapitre III : miniaturisation des biopiles

Introduction .....	129
<b>Partie I : Généralité sur les piles à combustible microfluidiques .....</b>	<b>130</b>
<b>Partie II : biopiles microfluidiques à éthanol/O<sub>2</sub> avec enzymes immobilisées.....</b>	<b>136</b>
II-1 Construction d'une biopile microfluidique à éthanol/O <sub>2</sub> avec enzymes immobilisées .....	136
II-1-1- fabrication du microcanal .....	139
II-1-2- Fabrication des bioélectrodes .....	142
II-1-2-a-Dépôt Au sur résine époxy .....	142
II-1-2-b-Dépôt d'enzymes anodiques et cathodiques .....	142
II-1-2-c-Assemblage du système microfluidique.....	143
II-1-3-Caractérisation des biopiles microfluidiques alcool/O <sub>2</sub> .....	143
II-1-3-1-biopile avec bioanode KS6 et biocathode Super P <sup>®</sup> .....	143
II-1-3-1-a-Influence du débit d'écoulement .....	145
II-1-3-1-b- Influence de la configuration des électrodes .....	146
II-1-3-2- Biopile microfluidique avec une bioanode et une biocathode Super P <sup>®</sup> ...	149
Stabilité de la biopile microfluidique .....	151
<b>Partie III : biopile microfluidique glucose/O<sub>2</sub> .....</b>	<b>153</b>
III-1 biopiles microfluidiques à glucose/O <sub>2</sub> avec enzymes en solution.....	153
III-1-1- fabrication des puces microfluidiques 2D et 3D .....	154
III-1-1-a puces microfluidiques 2D .....	154
III-1-1-b puces microfluidiques 3D .....	156
III-1-2- Caractérisation des biopiles microfluidiques .....	159

## Table des matières

---

III-1-2-a- Performances électrochimiques du dispositif 2D .....	159
III-1-2-b- Performances électrochimiques du dispositif 3D .....	160
Conclusion .....	163
Références.....	164
Conclusion générale.....	168

### Perspective : vers les biopiles microfluidiques hybrides

I-Introduction.....	171
II- Synthèse et caractérisation d'une électrode anodique à base de np-Au .....	172
II-1-Macroanode à base de np-Au .....	172
II-2- Microanode à base de np-Au .....	173
III- Synthèse et caractérisation de la biopile hybride avec une anode de np-Au et une biocathode à base de laccase .....	174
Références.....	178

### Matériels et Méthodes

1-Produits chimiques.....	181
1-1-Solvants et électrolytes.....	181
1-2-Réactifs .....	181
2- Electrochimie .....	182
2-1- Appareillage .....	182
2-2- Protocol .....	182
2-3- Méthodes de caractérisation électrochimique .....	182
2-4-analyse physique.....	183

## Table des matières

---

3- Partie expérimentale du chapitre 1 .....	184
3-1- Conception des électrodes (Au/NFsPAN/Si).....	184
3-2- Bioanode .....	186
3-3- Biocathode .....	187
4- Partie expérimentale du chapitre 2 .....	187
5- Partie expérimentale du chapitre 3 .....	188

## Introduction générale

La bioélectrochimie est un domaine scientifique dont le principe repose sur la compréhension, l'exploitation et l'étude de phénomènes électrochimiques initiés par des molécules biologiques comme les enzymes. Deux applications principales en découlent : la première concerne l'exploitation des diverses réactions biologiques afin de détecter ou quantifier des molécules en solution. La deuxième application, plus récente, concerne la production de l'énergie électrique par le biais d'espèces redox (enzymes, microbes) pour l'oxydation et la réduction de carburant et de comburant respectivement, mettant en évidence l'activité biocatalytique des espèces redox. Ce domaine de recherche a su s'engouffrer dans la brèche ouverte par l'émergence des consciences environnementalistes sur l'utilisation des ressources d'énergie fossile. Lié aux besoins énergétiques de l'activité humaine, il profite de l'attrait pour les nouvelles énergies dites renouvelables. Les biopiles présentent de nombreux avantages par rapport aux piles à combustible conventionnelles et elles pourraient alimenter dans l'avenir des dispositifs implantables, des robots et des dispositifs portatifs. Dans ce domaine de recherche, la géométrie et la nature des électrodes, et l'immobilisation des molécules biologiques (enzymes) sont les paramètres déterminants pour la réalisation des biopiles. Ainsi, l'effort des chercheurs se concentre sur la mise au point de nouveaux matériaux d'électrodes et de nouvelles méthodes d'immobilisation pour améliorer leurs performances, voire pour développer des dispositifs miniatures. En conséquence, dans cette dernière décennie, la recherche sur les biopiles a connu un essor surprenant. Parmi les différents types des biopiles qui existent, les biopiles enzymatiques sont les plus attractives. Les principaux défis pour le développement des biopiles enzymatiques sont le transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode et la stabilité des enzymes sur les électrodes. De nombreuses méthodes d'immobilisation de l'enzyme ont été développées pour favoriser le transfert d'électron et stabiliser les enzymes.

Ce travail de doctorat repose sur le développement des biopiles enzymatiques. Notre choix s'est porté sur le développement d'une biopile à éthanol/O<sub>2</sub> (oxydation de l'éthanol à l'anode et réduction de l'oxygène à la cathode). Le point de départ a été la fabrication de bioélectrodes enzymatiques constituant la biopile par immobilisation d'enzymes et de médiateurs utilisés pour faciliter le transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode. Ces bioélectrodes ont été assemblées pour construire et caractériser une biopile. L'objectif final a été la miniaturisation de ce dispositif.

La présentation de ce manuscrit comporte une étude bibliographique sur les biopiles à combustibles, plus particulièrement sur les biopiles à glucose/O<sub>2</sub> et éthanol/O<sub>2</sub>. Nous décrivons de façon détaillée les enzymes comme catalyseurs dans les réactions redox, leurs

## Introduction générale

---

applications possibles pour la production d'énergie et leur rôle pour la réalisation de bioanodes et de biocathodes dans les biopiles à alcool et à glucose.

Le premier chapitre du manuscrit s'intéresse au choix du matériau d'électrode, qui est un élément important dans la constitution d'une biopile puisqu'il permet d'assurer le transfert électronique entre les espèces. Ce chapitre est divisé en deux parties. Dans la première partie, le matériau d'électrode choisi est une électrode en or réalisée en couches minces. Ce matériau conducteur a permis la fabrication de bioélectrodes enzymatiques (bioanode pour l'oxydation de l'éthanol et la biocathode pour la réduction de l'oxygène) par immobilisation d'enzymes en présence de poudres de carbone graphite ou amorphe qui ont été caractérisées par électrochimie. Dans la deuxième partie, nous avons construit une électrode à base de nanofibres de polyacrylonitrile (NFsPAN) déposées par la méthode d'électrospinning sur une électrode de silicium, puis recouvertes d'une couche mince de or déposée par pulvérisation cathodique pour rendre les fibres conductrices. Ce matériau tridimensionnel (Au/NFsPAN/Si) a été testé pour fabriquer les mêmes bioélectrodes construites dans la partie précédente afin d'évaluer l'influence des nanofibres sur les performances électrochimiques des bioélectrodes.

Le deuxième chapitre est consacré à la réalisation de la biopile. Après un court rappel sur les méthodes de caractérisation des biopiles, ce chapitre se divise en deux parties. La première partie présente les caractérisations des biopiles construites à base des électrodes or par deux méthodes électrochimiques. La deuxième partie est consacrée à l'assemblage des bioélectrodes optimisées à base de Au/NFsPAN/Si afin d'évaluer l'influence des nanofibres sur les performances de la biopile complète à éthanol/O<sub>2</sub>.

Le troisième chapitre présente la miniaturisation des biopiles obtenue en combinant des procédés de microfabrication avec des concepts de la microfluidique. Un premier sous-chapitre détaille cette nouvelle technologie ainsi que la fabrication d'une biopile microfluidique à éthanol/O<sub>2</sub> en s'appuyant sur des résultats obtenus pour la réalisation de bioélectrodes macroscopiques étudiées précédemment. Afin d'augmenter les performances électriques des biopiles microfluidiques, dans un deuxième sous-chapitre, des résultats préliminaires présentent la préparation et le développement d'un nouveau dispositif obtenu par empilement d'électrodes en série ou parallèle fonctionnant avec du glucose comme carburant et des enzymes en solution.

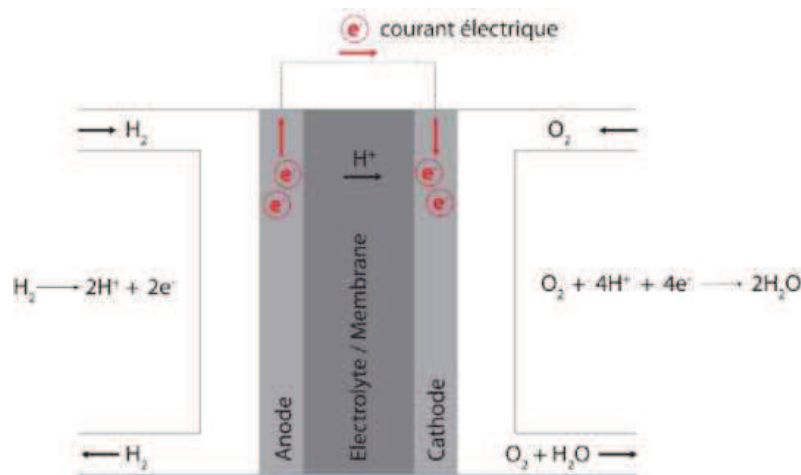
# **Etude bibliographique**

## I- Les piles à combustible

Avant d'aborder les piles à combustible biologiques, il est nécessaire de présenter le fonctionnement des piles à combustible. Une pile à combustible est définie comme un dispositif électrochimique qui convertit l'énergie chimique en énergie électrique. Dans le domaine de la production d'électricité, la technologie la plus ancienne date du milieu du 19<sup>ème</sup> siècle (Christian Friedrich Schoenbein et Sir William Robert Grove 1838-1845) [1]. Néanmoins, le développement des piles à combustible est resté limité jusqu'à la moitié du 20<sup>ème</sup> siècle en raison de l'utilisation restreinte de l'électricité et de l'abondance de l'énergie fossile. Cependant, la croissance de la demande en électricité tout le long du 20<sup>ème</sup> siècle a conduit au développement de sources d'énergie importantes capables de produire de l'électricité à l'échelle du mégawatt.

Dans le but de réduire notre dépendance aux énergies fossiles épuisables, une véritable course au développement de nouvelles sources d'énergie renouvelables et non polluantes s'est engagée. L'un des objectifs du Grenelle de l'environnement (lancé en 2007) est de transformer le paysage énergétique français pour qu'au moins 20 % de la production d'énergie devienne d'origine renouvelable d'ici 2020. Une des conditions de réalisation de ce projet est le développement d'un réseau intelligent et décentralisé de distribution de l'énergie et la diversification des sources d'énergie renouvelable. Pour cela, le développement des piles à combustibles a considérablement évolué ces trente dernières années.

La figure 1 présente le schéma de fonctionnement d'une pile à combustible. Le système est composé de deux électrodes séparées par un électrolyte. L'oxydation du carburant (hydrogène, éthanol, méthanol...) a lieu à l'anode et la réduction du comburant, qui est principalement l'oxygène, a lieu à la cathode. Généralement les deux compartiments doivent être séparés par une membrane échangeuse d'ions car ils fonctionnent dans des conditions différentes. Les catalyseurs inorganiques utilisés (à base de platine par exemple) sont très peu spécifiques. Cependant, la séparation des compartiments est parfois insuffisante pour empêcher toute pollution d'une électrode à l'autre (réactions secondaires, empoisonnement des catalyseurs).



**Figure 1 :** schéma de fonctionnement d'une pile à combustible fonctionnant à partir de  $H_2$  (carburant) et de  $O_2$  (comburant). Les deux électrodes sont séparées par une membrane ionique permettant l'échange d'ions [2].

Aujourd'hui, en fonction du combustible utilisé et de la température de fonctionnement, on distingue cinq principaux types de piles à combustible: les piles à combustible alcalines (AFC), les piles à membrane échangeuse de protons (PEMFC), les piles à acide phosphorique (PAFC), les piles à carbonate fondu (MCFC) et les piles à oxyde solide (SOFC) (tableau 1).

**Tableau 1 :** Principaux types de pile à combustible [2].

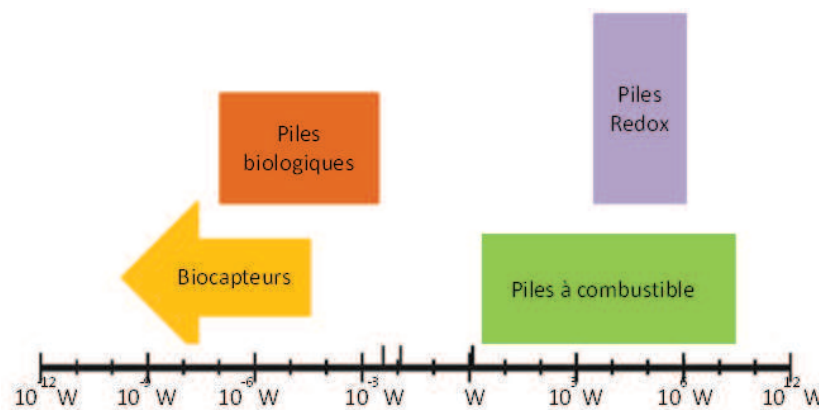
Type de piles à combustible	Porteur de charge	Température de fonctionnement (°C)	Combustible	Puissance
AFC	$OH^-$	50-200	$H_2$	5kW
PEMFC	$H^+$	50-100	$H_2$	5-250 kW
PAFC	$H^+$	~220	$H_2$	200kW
MCFC	$CO_3^{2-}$	~650	$H_2$ -CO- $CH_4$ autres hydrocarbures	200kW-MW
SOFC	$O^{2-}$	500-1000	$H_2$ -CO- $CH_4$ autres hydrocarbures	2kW-MW

Cependant, l'utilisation des piles à combustible reste limitée à des cas spécifiques à cause du coût très élevé de production d'électricité, qui atteint 3000€ par kW, 300 fois supérieur à un moteur à combustion (10€ par kW) [3]. Ceci est dû à la composition des électrodes comprenant des catalyseurs coûteux (généralement à base de platine) et à la présence de membranes également coûteuses. Leurs applications sont limitées par le



stockage de l'hydrogène (principal carburant utilisé), et aux conditions drastiques de fonctionnement (pH,  $T^0$ , P). La technologie est en plein développement pour palier à ces inconvénients, afin de créer une pile à combustible peu coûteuse en gardant les mêmes rendements énergétiques.

Les piles à combustible peuvent générer des puissances largement supérieures à celles des piles biologiques ce qui donne des domaines d'application tout à fait différents en fonction de la nature des catalyseurs (Figure 2). C'est dans ce contexte et à partir des années 1990, que les piles à combustible biologique ont fait leur apparition. Elles ont suscité un réel intérêt dans les années 2000. Le travail qui suit décrit le développement des biopiles biologiques.



**Figure 2 :** représentation des gammes de puissance approximatives de différents types de piles. De la droite vers la gauche, une diminution de la puissance générée est observée avec une diminution de la taille des systèmes [2].

## II- Les piles à combustible biologique

### II-1 Généralités

Le concept d'une biopile est équivalent à celui d'une pile à combustible dans le sens où elle convertit l'énergie chimique en énergie électrique, avec une principale différence qui réside dans la nature du catalyseur d'origine biologique. Ce dernier rend cette technologie très attrayante pour de nombreuses raisons : la large variété de choix du couple carburant/comburant, les catalyseurs spécifiques et renouvelables, le faible coût de production et des conditions douces de fonctionnement (pression, température, pH). En effet, le coût de production des biopiles à combustible peut diminuer considérablement en raison de la spécificité des biocatalyseurs permettant dans certain cas de s'affranchir de la membrane

échangeuse d'ions pour un fonctionnement en compartiment unique [4].

### **II-2 Classification des biopiles**

Selon le type de biocatalyseur utilisé, les biopiles peuvent être classées en 3 types :

#### **II-2-1 Les biopiles microbiennes**

Ces biopiles utilisent des microorganismes vivants qui sont soit une espèce pure isolée soit une culture complexe, dont le système enzymatique est mis à profit pour produire de l'électricité. Les microorganismes sont constitués de nombreuses enzymes qui les rendent généralement plus robustes vis-à-vis de l'environnement et capables de fonctionner avec une large gamme de substrats. Puisque ces microorganismes sont capables de produire les enzymes nécessaires au fonctionnement de la biopile tout le long de leur cycle de vie, les biopiles microbiennes disposent d'une durée de vie remarquable (quelques mois) et elles sont également résistantes à l'empoisonnement dû aux systèmes où elles résident [2].

Cependant, la biopile n'est pas immédiatement opérationnelle puisque il existe une période de croissance (temps de latence) des microorganismes avant qu'elles ne produisent les enzymes nécessaires pour le fonctionnement de la biopile. D'autre part, ce type de biopile présente en général un faible transfert électronique et une faible densité de puissance due à la limitation du transport de matière à travers la membrane des cellules [5].

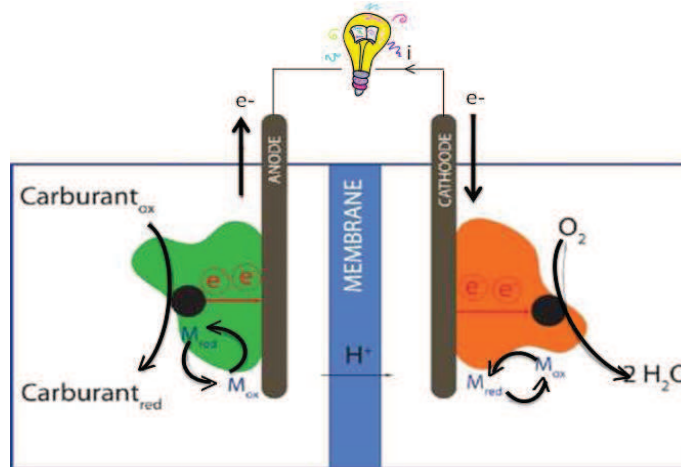
#### **II-2-2 Les biopiles à mitochondrie**

Les systèmes biologiques utilisés dans les biopiles sont des enzymes ou des microbes, mais les biopiles à mitochondrie sont effectivement un groupe intermédiaire. Ce type de biopiles utilise des organites entiers comme catalyseurs [6]. La mitochondrie est un organite contenant de nombreux cofacteurs et enzymes qui sont responsables du métabolisme cellulaire. Ces biopiles sont nouvelles et prometteuses dans le domaine de la bioélectrocatalyse car elles contiennent toutes les espèces nécessaires pour contribuer à l'oxydation complète d'un substrat comme les acides gras et le pyruvate [6-8].

#### **II-2-3 Les biopiles enzymatiques**

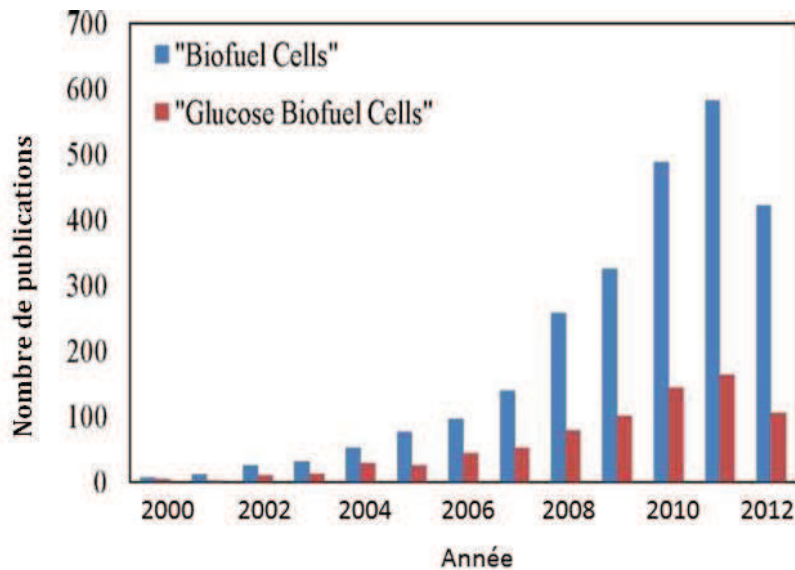
Les biopiles enzymatiques utilisent des enzymes comme biocatalyseurs, et plus précisément des enzymes rédox (Figure 3). Ces enzymes catalysent les transferts d'électrons qui se produisent dans chaque compartiment. Dans le compartiment anodique, l'oxydation du carburant est catalysée par une enzyme et des électrons sont transférés dans le compartiment cathodique permettant la réduction du comburant par une autre enzyme. Un médiateur rédox

« M » peut intervenir pour faciliter le lien entre le site actif de l'enzyme et l'électrode et assurer le transfert d'électrons. Les enzymes sont placées soit dans la solution, soit immobilisées à la surface des électrodes.



**Figure 3 :** schéma de fonctionnement d'une biopile enzymatique fonctionnant à partir de l'oxydation d'un carburant et la réduction d'un comburant par des enzymes spécifiques. *M* : médiateur redox pour assurer le transfert d'électrons entre le site actif de l'enzyme et l'électrode.

Le concept de biopile est connu depuis 1911 avec la toute première biopile microbiologique [9]. En 1964, Yahiro et ses collaborateurs ont constitué la première biopile enzymatique fonctionnant avec du glucose en présence de glucose oxydase comme catalyseur anodique [10]. Au cours des trois décennies suivantes, on ne trouve que peu d'exemples dans la littérature présentant quelques avancées prometteuses [11-13]. Le nombre de publications sur les biopiles a augmenté progressivement au cours de cette dernière décennie reflétant l'intérêt croissant pour cette recherche, favorisée par le développement des biocapteurs, pour alimenter des petits appareils implantables dans le corps comme les pacemakers (Source Web of Knowledge, édité en août 2012) (Figure 4).



**Figure 4 :** nombre d'articles traitant des biopiles entre 2000 et 2012. (Source Web of Knowledge, édité en août 2012)

Comme témoigne le nombre d'articles publiés, il a fallu attendre les années 2000 pour assister au véritable essor de ce domaine de recherche sur les biopiles, expliqué par une prise de conscience générale quant aux applications possibles de cette technologie. Les biopiles présentant de faibles durées de vie et de puissances délivrées, il a en été admis que cette technologie ne peut être compétitive par rapport aux piles à combustible classiques (Tableau 2), mais les biopiles enzymatiques se sont développées pour des applications plus spécifiques qui nécessitent généralement la miniaturisation de système (biocapteurs, alimentations portables).

**Tableau 2 :** Comparaison des durées de vie et puissances entre les piles à combustible classiques et les biopiles enzymatiques.

Pile	Puissance	Durée de vie
Piles à combustible	kW – MW	3 mois – 1 an
Biopiles enzymatiques	μW - mW	1 - 30 jours

Les biopiles enzymatiques utilisent des enzymes spécifiques, purifiées et isolées pour catalyser une réaction spécifique. Pour oxyder complètement le combustible, plusieurs

enzymes peuvent être combinées en cascade d'enzymes [14-16]. Les biopiles enzymatiques offrent généralement des densités de puissance supérieures à celles fournies par les biopiles microbiennes qui sont limitées par la résistance du transport de matière à travers la membrane cellulaire des bactéries [17]. Les biopiles enzymatique sont directement opérationnelles donc leur temps de réponse est plus court que celui des biopiles microbiennes [5].

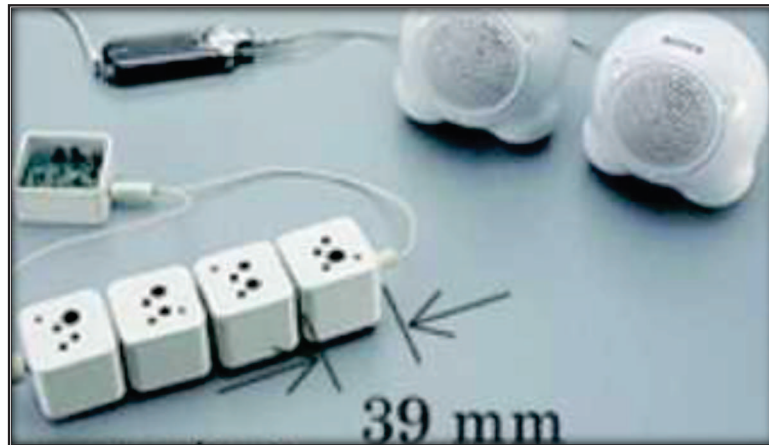
Ces dispositifs nécessitent dans certains cas une séparation entre les deux compartiments anodique et cathodique par une membrane semi-perméable, car les carburants et comburant nécessaires à l'anode et la cathode peuvent aussi interférer avec la réaction à l'électrode opposée [18]. Cependant certaines biopiles ne nécessitent pas forcément la présence d'une membrane séparatrice contrairement aux autres piles à combustibles, puisque la grande sélectivité des enzymes (vis-à-vis de leurs substrats) évite les réactions indésirables à l'autre électrode [19].

L'efficacité du transfert d'électrons entre les enzymes et l'électrode est un autre facteur qui conditionne les performances de la biopile. Pour augmenter l'efficacité des biopiles enzymatiques, l'optimisation de ce transfert d'électrons devient un challenge [19]. Différents types de méthodes d'immobilisation des enzymes à la surface de l'électrode ont été développées pour favoriser ce transfert d'électrons [20].

A cause de la faible stabilité des enzymes, la durée de vie des biopiles enzymatiques est limitée [21], et donc les enzymes ne sont pas encore compétitifs avec les microbes en termes de stabilité à long terme [19]. De plus, la plupart des biopiles enzymatiques utilisent une seule enzyme pour l'oxydation du substrat à l'anode, ce qui limite les performances de la biopile enzymatique du fait de l'oxydation incomplète des combustibles utilisés, entraînant une perte de l'énergie chimique de la molécule initiale [22]. Pour limiter cette perte et bénéficier de l'énergie chimique du substrat, il est possible de coupler différentes enzymes à l'anode pour réaliser l'oxydation complète du substrat. Ce phénomène de cascade enzymatique permet d'augmenter la densité de courant total délivrée par la biopile par accumulation des électrons de chaque réaction [15]. Par exemple, si une molécule de glucose est oxydée complètement en  $\text{CO}_2$ , il y aura alors 24 électrons possibles pour générer de l'électricité.

En 1999 le groupe de Willner a développé la première biopile enzymatique fonctionnant dans un compartiment unique, qui utilise la microperoxydase-11 à la cathode pour réduire  $\text{H}_2\text{O}_2$  et la glucose oxydase à l'anode pour oxyder le glucose [23]. Bien que la puissance générée soit très faible, ce résultat a suscité un grand intérêt chez les chercheurs puisque l'élimination de la membrane a ouvert la voie à la miniaturisation du système et a simplifié l'ingénierie des prototypes.

Plus récemment, des biopiles plus performantes ont été développées générant des densités de puissance de  $1,6 \text{ mW.cm}^{-2}$  [24] ou  $1,45 \text{ mW.cm}^{-2}$  [25]. Le dernier exemple concerne un prototype développé en 2009 par SONY, basé sur 4 biopiles associées en série, capable d'alimenter un baladeur par exemple (Figure 5).



**Figure 5 :** Illustration du prototype développé par SONY, basé sur quatre biopiles enzymatiques en série, pour alimenter un lecteur mp3: chaque unité utilise des enzymes (glucose déshydrogénase et diaphorase à l'anode, et bilirubine oxydase à la cathode) dans le tampon phosphate (pH 7, 1 M) contenant 0.4 M de glucose [25].

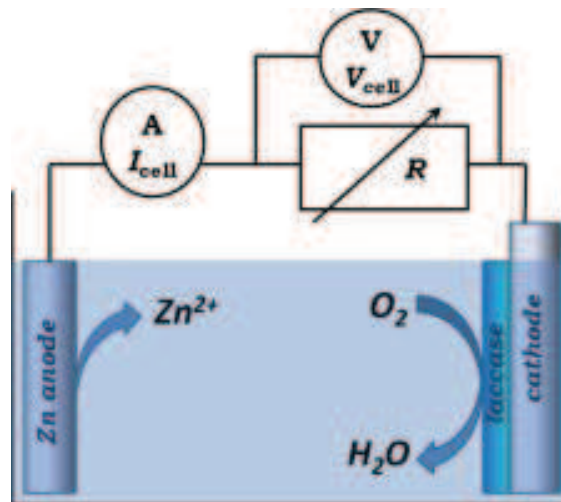
Les principaux verrous scientifiques et technologiques limitant les performances électriques des biopiles (densité de puissance  $\ll 1 \text{ mW/cm}^2$ ) concernent entre autre:

- la faible stabilité des enzymes au cours du temps
- la faible quantité d'enzymes immobilisées sur les électrodes
- le transfert d'électrons lent entre le site actif de l'enzyme et l'électrode.

### II-2-4 Les biopiles hybrides

Les biopiles hybrides sont constituées d'une électrode enzymatique et d'une électrode abiotique à base de catalyseur métallique, afin d'augmenter les performances et la stabilité des biopiles. L'électrode abiotique permet d'atteindre un voltage plus élevé et apporte une forte stabilité à la biopile. Par exemple, U. B. Jensen et ses collaborateurs [26] ont construit une biopile hybride à base d'une anode Zn et d'une cathode en graphite modifiée par la laccase (Figure 6). Ce dispositif a délivré des densités de puissance de l'ordre de  $\mu\text{W}$ , et la stabilité de la biopile hybride est liée à l'électrode enzymatique. Un autre exemple décrit le

développement d'une biopile hybride fonctionnant avec une anode enzymatique pour oxyder l'alcool et une cathode abiotique à base de platine pour réduire  $O_2$ . [27-29].



**Figure 6** : Biopile hybride à base d'une anode Zn et d'une cathode  $O_2$ /graphite/Laccase [26]

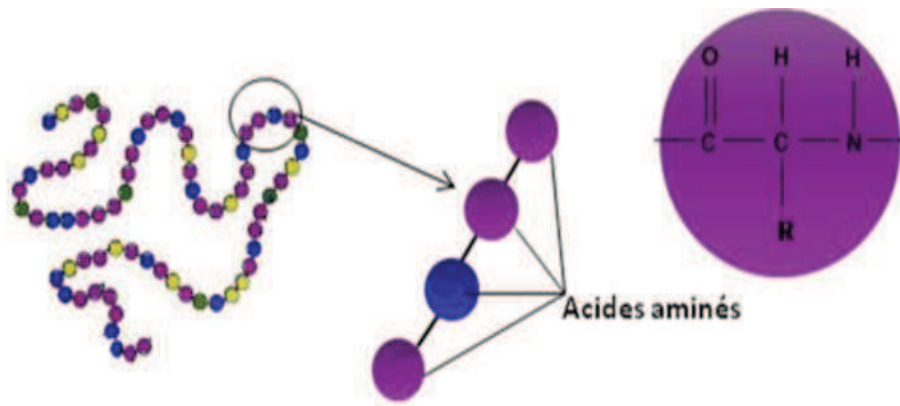
### III- Les enzymes

#### III-1 Définition et généralités

Une enzyme est une macromolécule d'origine protéique qui joue un rôle de catalyseur biologique; elle est majoritairement de nature chirale et protéique [30]. Elle est composée de plusieurs acides  $\alpha$ -aminés liés entre eux par des liaisons amide. Les enzymes ont des masses moléculaires élevées entre 10 à 1 000 kDa.

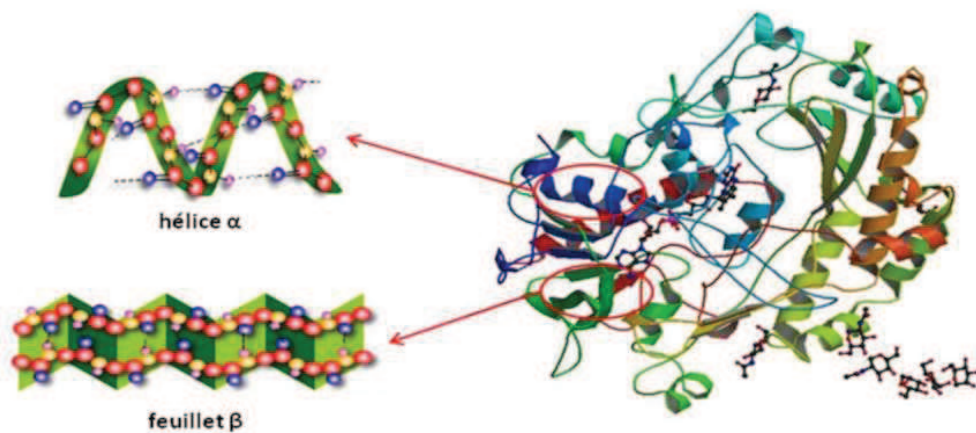
La structure primaire des enzymes est définie comme un ordre dans lequel les acides aminés sont arrangés (figure 7).





**Figure 7 :** schéma de la structure primaire d'une protéine [30]

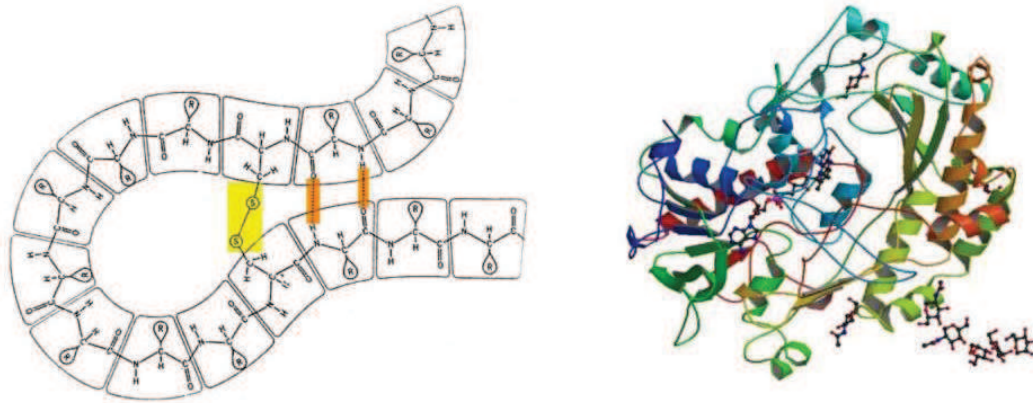
Afin de former des structures secondaires principalement en feuillets  $\beta$  et en hélices  $\alpha$ , ces protéines ont tendance à se replier sur elles-mêmes (figure 8). Ces structures sont plus stables grâce à la formation de liaisons hydrogènes.



**Figure 8 :** schéma de la structure secondaire d'une protéine (en feuillets  $\beta$  et en hélices  $\alpha$ ) [30].

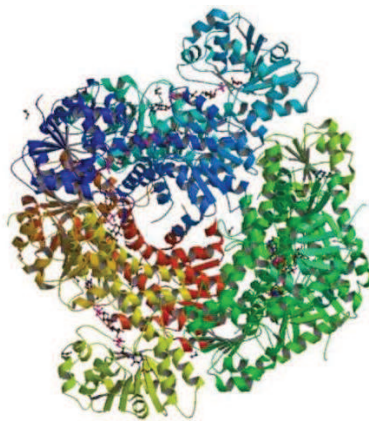
L'arrangement de ces structures entre elles forme une structure tertiaire plus stable avec l'apparition de ponts disulfures (figure 9).





**Figure 9 :** schéma de la structure tertiaire d'une protéine (ex: glucose oxydase) [30].

La structure quaternaire est décrite pour les grosses enzymes comme la glucose deshydrogénase (GDH) (figure 10). La formation de cette structure permet l'apparition de résidus aminoacides où des cavités vont se rapprocher au niveau de la structure de l'enzyme. Ces résidus forment donc des groupes catalytiques et confèrent ainsi à une région précise de l'enzyme des propriétés physico-chimiques qui participent au clivage ou à la formation des liaisons. Cette structure tridimensionnelle donne à l'enzyme une spécificité permettant de reconnaître un substrat en particulier à partir de cette région distincte appelée « site actif ».



**Figure 10 :** schéma de la structure quaternaire d'une protéine (glucose deshydrogénase) [30].

### III-2 Classification des enzymes

L'effet catalytique des enzymes permet de produire de l'énergie qui est indispensable au bon fonctionnement des organismes vivants. Les enzymes sont classées en six grandes

## Etude bibliographique

classes, en fonction de leur activité catalytique (tableau 3) [30] (nomenclature fixée par l'Union Internationale de Biochimie). Chaque classe est divisée en sous-classe et en sous-sous-classe. Un numéro spécifique à chaque enzyme, appelé « EC number » (Enzyme Commission number), se définit comme suit :

EC [numéro de la classe].[numéro de la sous-classe].[numéro de la sous-sous-classe].[numéro spécifique de l'enzyme].

Par exemple le numéro spécifique de la Laccase est : **EC 1.10.3.2**. Il est expliqué comme suit :

- EC 1 : Oxydoréductase.
- EC 1.10 : Agit sur les diphénols comme donneur.
- EC 1.10.3 : réagit avec l'oxygène comme accepteur.
- 2 : numéro spécifique de l'enzyme.

*Tableau 3 : Classification des enzymes [30].*

E.C (classe)	groupe	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Coupure de liaison par Hydrolyse
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de doubles liaisons
E.C.5	Isomérases	Isomérisation (changement de configuration)
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse à haut potentiel énergétique

Dans le cadre de ce travail de thèse, on s'intéresse aux Oxydoréductases. Le tableau 4 suivant montre des exemples d'enzymes utilisées dans les biopiles, en fonction du substrat, des produits et du coenzyme, ou en fonction du site actif de l'enzyme.

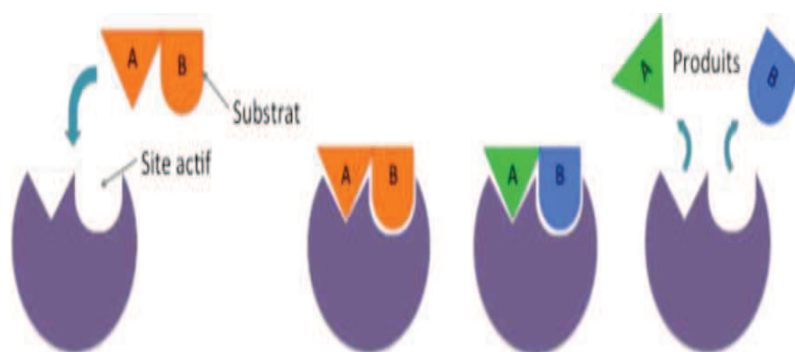
## Etude bibliographique

**Tableau 4 :** Exemples d'enzymes oxydoréductases utilisées pour réaliser des biopiles, en fonction du substrat, des produits et du coenzyme, ou en fonction du site actif de l'enzyme [19].

Substrat	Enzyme	Co-enzyme	Produit
<b>Anode</b>			
Méthanol	Alcool déshydrogénase	NAD <sup>+</sup>	Formaldéhyde
Formaldéhyde	Formaldéhyde déshydrogénase	NAD <sup>+</sup>	Formiate
Formiate	Formiate déshydrogénase	NAD <sup>+</sup>	CO <sub>2</sub>
Ethanol	Alcool déshydrogénase	NAD <sup>+</sup>	Acétaldéhyde
	Alcool déshydrogénase	PQQ lié covalement	Acétaldéhyde
Acétaldéhyde	Aldéhyde déshydrogénase	NAD <sup>+</sup>	Acétate
	Aldéhyde déshydrogénase	PQQ lié covalement	Acétate
Glucose	Glucose oxydase	FAD lié	Gluconolactone + peroxide
	Glucose déshydrogénase	NAD <sup>+</sup> /PQQ	Glucose-6-phosphate
	Glucose oxydase	PQQ lié covalement	Glucose-6-phosphate
Fructose	Fructose déshydrogénase	NAD <sup>+</sup>	5-déhydro-D-fructose
Lactate	Lactate déshydrogénase	NAD <sup>+</sup>	Pyruvate
<b>Cathode</b>			
Oxygène	Bilirubin oxydase	Cuivre (site actif)	Eau
	Laccase	Cuivre (site actif)	Eau
Peroxide	Horseradish peroxidase	Hème (site actif)	Eau
	Microperoxidase	Hème (site actif)	Eau
	Cyclooxygénase	Hème (site actif)	Eau

La catalyse enzymatique se fait à l'intérieur de l'enzyme et exactement au niveau de son site actif. En 1890, Fischer a établi le principe « clé-serrure » qui explique la manière de reconnaissance des substrats (catalyse des substrats) par le site actif de l'enzyme avec formation d'un complexe enzyme-substrat (figure 11). Grâce à ce système de reconnaissance, les enzymes sont des catalyseurs hautement spécifiques du type de réaction catalysée ainsi que de leur substrat.

Néanmoins, les enzymes sont sensibles à l'environnement où elles se trouvent. En effet, leur activité catalytique est fortement influencée par des paramètres physicochimiques comme le pH ou la température [21-33].



**Figure 11:** Schéma montrant la reconnaissance « clé-serrure » entre le substrat et le site actif de l'enzyme.

### III-3 Les différents types d'enzymes anodiques et cathodiques

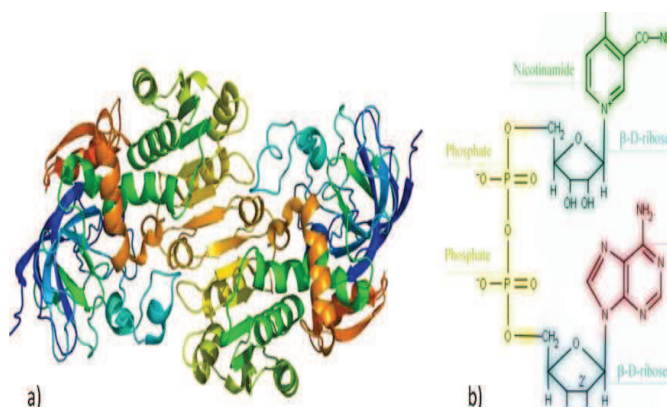
#### III-3-1 Les enzymes anodiques

Selon le cofacteur (une substance chimique liée à une protéine, et qui est nécessaire à l'activité biologique de celle-ci), les biocatalyseurs qui sont capables d'oxyder un combustible organique (éthanol, méthanol...) peuvent être classés en 2 groupes :

1- Les déshydrogénases : ce groupe de biocatalyseurs possède un cofacteur faiblement lié à l'enzyme et utilise des hèmes (cytochrome) comme accepteur d'électrons, comme le  $\text{NADP}^+$  (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) et  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamide Adénine Dinucléotide). Citons comme exemple les alcools déshydrogénases et les Glucose déshydrogénases à  $\text{NAD}^+$  [34].

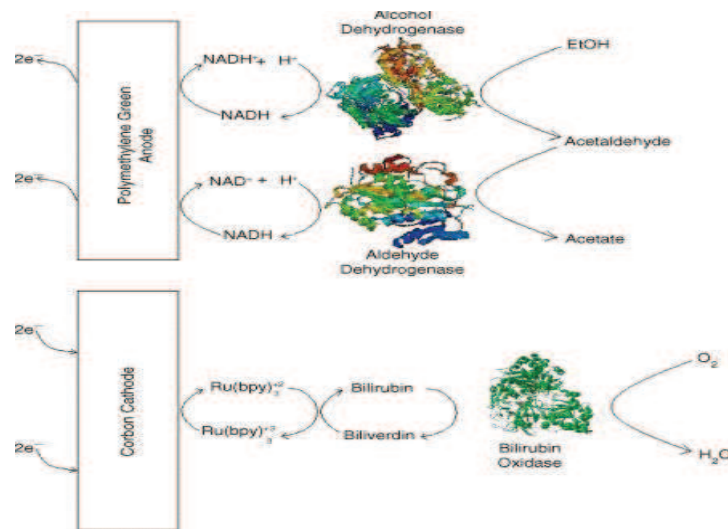
2- Les oxydases avec un centre redox FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) : Ces oxydases utilisent l' $\text{O}_2$  comme accepteur d'électrons, leur centre redox (FAD) est profondément lié à l'enzyme. Le transfert d'électrons avec ce type d'enzymes est difficile, il nécessite généralement un médiateur redox. Une des enzymes les plus connues est la glucose oxydase (GOD) [34]. Il a été démontré que cette enzyme est capable de faire un transfert d'électrons direct avec des électrodes nanostructurées [35-37].

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé une protéine dimérique, cytosolique contenant deux atomes de zinc par sous-unité, qui est l'alcool déshydrogénase (ADH figure 12-a), utilisant le  $\text{NAD}^+$  comme cofacteur (figure 12-b), qui sera détaillée dans la partie suivante.



**Figure 12 :** Structure d'ADH (a) et NAD (b).

Comme nous avons expliqué précédemment, le bon fonctionnement des enzymes peut nécessiter la présence d'un cofacteur (NAD ou FAD). Au cours de la réaction enzymatique, l'effet catalytique de l'enzyme entraîne une modification de celui-ci. Les cofacteurs ont un rôle de donneur et/ou d'accepteur des protons et des électrons, puisqu'ils peuvent interagir avec l'enzyme afin qu'elle retrouve son état initial et intervenir dans un nouveau cycle catalytique. Le cofacteur Nicotinamide Adenine Dinucléotide (NADH) est associé à plus de 300 enzymes de la famille des déshydrogénases [23,27,38-44]. Le couple redox  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  est associé à l'oxydation/réduction enzymatique d'un substrat. Le changement de degré d'oxydation du substrat se fait par transfert d'un proton. La régénération de ce couple redox peut être réalisée par exemple en utilisant une protéine redox supplémentaire qui est la diaphorase [45-48], ou un polymère redox comme dans l'exemple de biopile à alcool/ $\text{O}_2$  décrit par Topcagic et al. [49] fonctionnant à partir de l'oxydation de l'éthanol à l'anode en présence de deux déshydrogénases, l'alcool déshydrogénase (ADH) et l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), couplée à la réduction de l'oxygène à la cathode avec une bilirubine oxydase (figure 13).



**Figure 13 :** biopile à éthanol/oxygène développée par Topcagic et al. [49]

### III-3-2 Les enzymes cathodiques

#### III-3-2-1 La Laccase (E.C. 1.10.3.2)

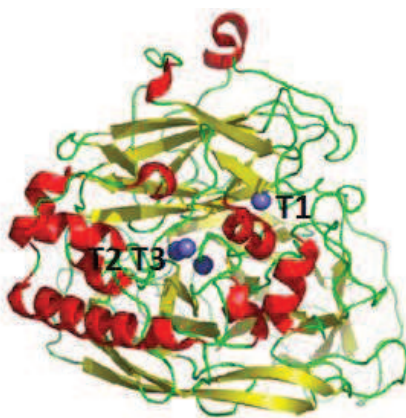
La laccase est une oxydase multicuivre que l'on retrouve dans de nombreuses plantes, champignons (figure 14) et micro-organismes [50-51]. Elle catalyse l'oxydation de différentes amines aromatiques et composés phénoliques à la fois avec une réduction à quatre électrons de l'oxygène en eau [52].



**Figure 14 :** champignon de la pourriture blanche (versicolor) qui produit la laccase.

Les laccases ont d'excellents paramètres catalytiques et un potentiel redox élevé qui est avantageux pour les technologies de biopile et de biocapteur. Leur potentiel redox du site T1 est compris entre 430 et 790 mV par rapport à une électrode standard à hydrogène (ESH)

[53-54]. Pour la laccase *Trametes Versicolor*, le potentiel redox du site T1 est proche de 780 mV et celui de T2 site est proche de 400 mV par rapport à ESH (Figure 15) [55]. Le site T1 est responsable de l'électrooxydation du substrat donneur d'électrons. Les sites T2 et T3 sont responsables de la réduction du dioxygène. Les dimensions approximatives de cette enzyme sont :  $70 \times 50 \times 50$  Å [50]. Le site T1 (mononucléaire) possède un ion cuivre CuI, il est situé à environ 6,5 Å en-dessous de l'enzyme et il est relié au site trinucéaire T2/T3 par un histidine-cysteine-histidine tri-peptide. Les sites T2 et T3 forment un centre de cuivre trinucéaire T2/T3 qui est situé à environ 12 Å au sein de l'enzyme [50,56].



**Figure 15:** laccase de *Trametes versicolor* [50].

### III-3-2-2 La Bilirubine Oxydase (E.C. 1.3.3.5)

Une autre enzyme utilisée pour la construction des biocathodes est la bilirubine oxydase (BOD). Elle a la particularité de conserver son activité catalytique à pH neutre, ce qui est avantageux pour des applications en milieu physiologique. Son potentiel du site T1 est plus bas que celui de la laccase qui conduit à une diminution de la puissance des biopiles. Cette enzyme présente une faible activité et stabilité, et elle se désactive en présence d'ions uréate [57-58].

## IV- Les biomatériaux d'électrodes

### IV-1 Définition

Les biopiles sont constituées de bioélectrodes construites par immobilisation d'une espèce biologique (enzyme, ADN,...) à la surface d'un matériau conducteur [59] par



différentes méthodes décrites dans la suite de cette partie. Dans le domaine de la chimie analytique, les bioélectrodes permettent de construire des biocapteurs pour la détection d'espèces chimiques comme des bactéries, des virus, et des biopiles pour la conversion d'énergie chimique en énergie électrique destinée à l'alimentation de petits dispositifs portatifs [59].

### IV-2 Méthodes d'immobilisation des enzymes

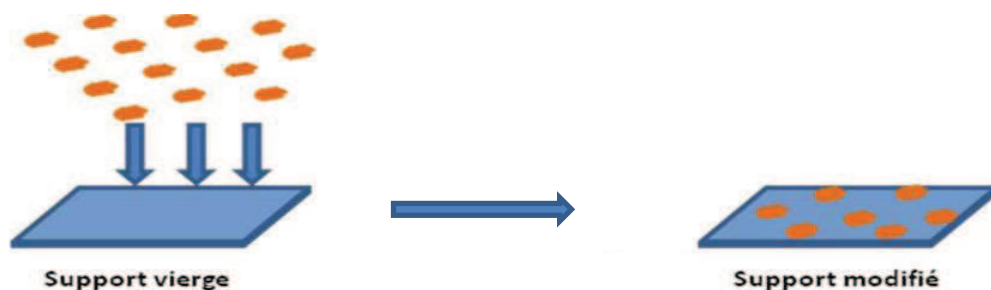
Les enzymes ont un grand intérêt dans le domaine de la biocatalyse. En revanche, leur faible stabilité dans le temps est un facteur qui limite leur utilisation industrielle, ce qui a conduit à proposer des stratégies d'immobilisation de ces espèces. En 1916, Nelson et Griffin sont les premiers à démontrer que l'enzyme invertase immobilisée par adsorption sur du charbon actif a conservé son activité catalytique. A partir des années 1950, cette technique a évolué avec des premières applications dans divers domaines [59]. Il existe quatre méthodes d'immobilisation couramment utilisées :

- L'adsorption
- La réticulation
- Le greffage covalent
- L'encapsulation

Les avantages et les inconvénients de ces techniques sont détaillés ci-dessous.

#### IV-2-1- L'adsorption

L'adsorption est basée sur la capacité de certains corps organiques ou minéraux à fixer une molécule à leur surface [60-62], par des faibles interactions de type liaisons hydrogène, Van der Waals, transfert de charges (liaisons ioniques) ou échanges d'ions (figure 16).



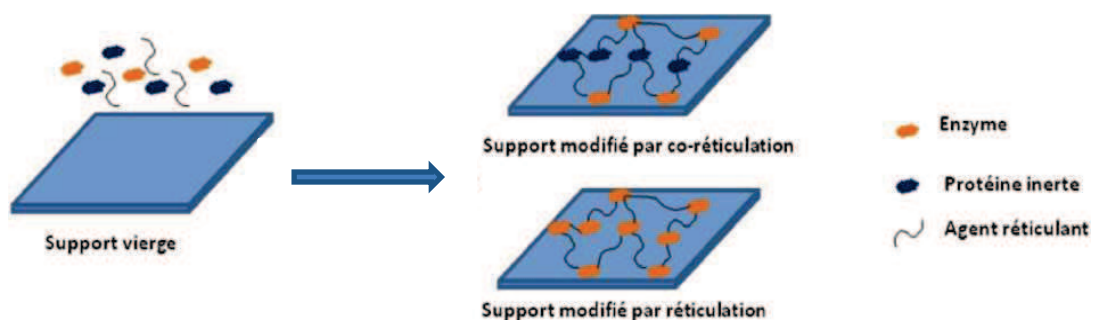
*Figure 16: immobilisation par adsorption [59].*



Cette méthode d'immobilisation présente plusieurs avantages, elle est facile, économique, et ne nécessite aucun réactif chimique qui peut dénaturer l'enzyme. De plus, c'est une méthode simple à mettre en œuvre qui nécessite seulement de mettre l'enzyme sur le support dans des conditions données (force ionique, pH et température). Cependant, ces systèmes sont peu stables et l'enzyme se désorbe au cours du temps à cause des faibles interactions liant l'enzyme au support.

### IV-2-2- La réticulation

Cette méthode est basée sur l'utilisation d'agents appelés « réticulant » qui permettent de lier les enzymes entre elles par des liaisons chimiques d'une façon directe (réticulation), ou par l'utilisation d'une protéine inerte pour faciliter ou améliorer la réticulation avec l'agent réticulant (co-réticulation) (figure 17) [63-65].



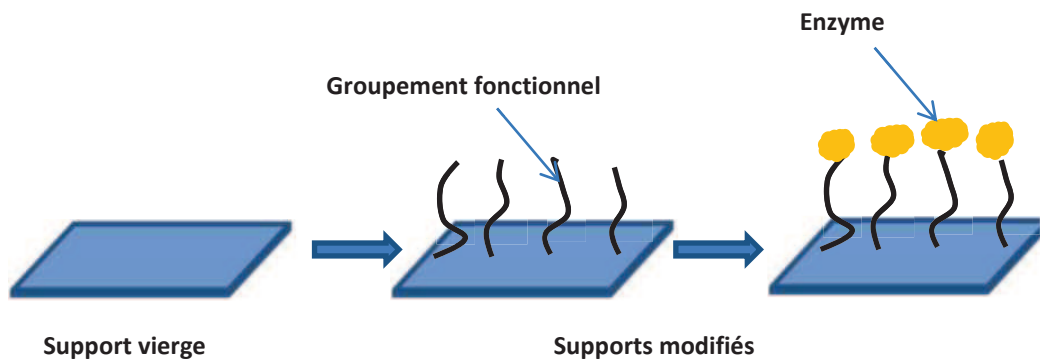
**Figure 17:** immobilisation par réticulation et co-réticulation [59].

Cette méthode forme un réseau enzymatique tridimensionnel, par simple adsorption des enzymes sur un support et en contact avec un agent réticulant. Cette méthode d'immobilisation, simple à mettre en œuvre, offre une bonne stabilité au système par la formation de liaisons chimiques entre les enzymes. En revanche, cette méthode peut causer une perte d'activité enzymatique par l'utilisation de réactifs non biocompatibles qui peuvent modifier les propriétés physiques du système et altérer l'activité de l'enzyme.

### IV-2-3- Le greffage covalent

Cette méthode d'immobilisation conduit à la réaction d'un groupement fonctionnel d'un réactif (fonction hydroxyle, carboxylique, ou thiol) avec le groupement fonctionnel libre de l'enzyme [65-66] (figure 18). Ces groupements fonctionnels du réactif sont préalablement

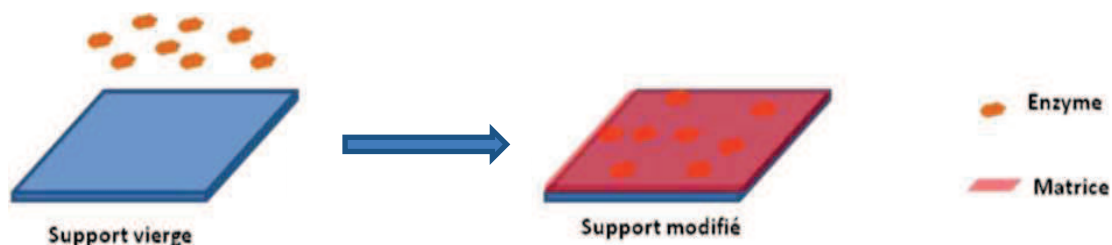
activés pour pouvoir réagir avec les groupements de l'enzyme. L'avantage de cette méthode réside dans la fixation de l'enzyme de façon permanente qui augmente sa stabilité, et lui confère une durée de vie plus importante. En revanche, il est possible de dénaturer l'enzyme et de provoquer donc une perte d'activité de celle-ci à cause des réactifs indispensables au greffage.



*Figure 18: immobilisation par greffage covalent [59].*

#### IV-2-4- L'encapsulation

Dans cette méthode, contrairement au greffage covalent, l'immobilisation se fait de manière physique. Son principe repose sur la fixation des enzymes dans une matrice qui permet la diffusion des petites molécules seulement pour que les enzymes ne puissent pas s'en échapper [67-68] (figure 19). Les matrices utilisées peuvent être de différentes natures: organiques (Nafion...) [69], inorganiques (gels de silice...) [70], composites (pâte de carbone...) [71], ou polymères (polyacrylamide, polyuréthanes...) [72].



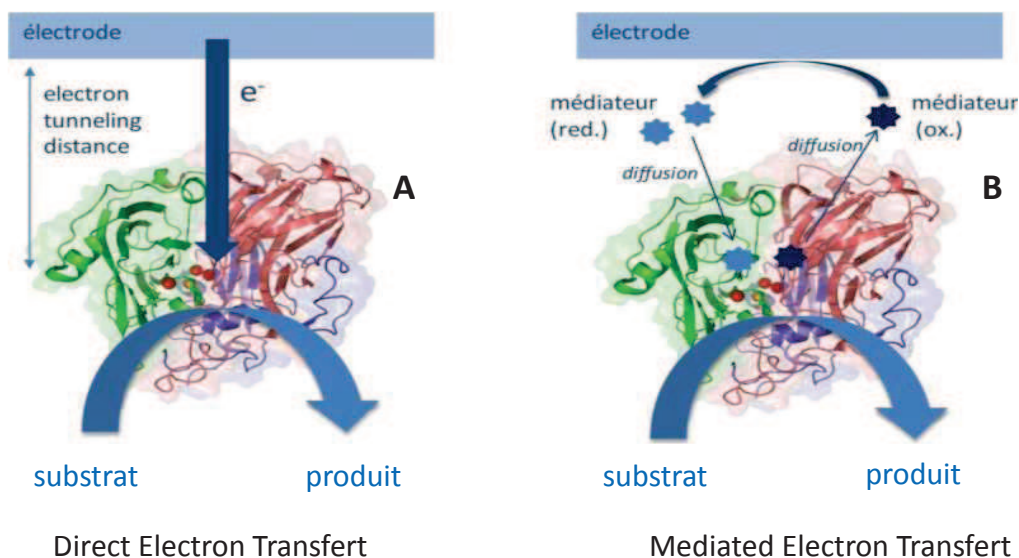
*Figure 19 : immobilisation par encapsulation [59].*

Cette méthode présente plusieurs avantages : elle permet d'immobiliser une quantité élevée d'enzymes, elle est économique et facile à mettre en œuvre. En revanche, elle n'est applicable que pour des substrats de petite taille.

### V- Les différents types de transfert d'électrons

Afin d'améliorer le transfert des électrons entre la surface de l'électrode et le site actif de l'enzyme, il est important de développer des bioélectrodes performantes. Les transferts d'électrons se divisent en deux classes :

- le transfert d'électrons direct ("Direct Electron Transfer" DET).
- le transfert d'électrons indirect ("Mediated Electron Transfer" MET) nécessitant un médiateur, entre la surface de l'électrode et le site actif de l'enzyme [73] (Figure 20).



**Figure 20:** schéma des deux mécanismes de transfert d'électrons: (A) Transfert d'électrons direct (DET), (B) Transfert d'électrons indirect (MET) [73].

#### V-1 Transfert d'électrons direct (DET)

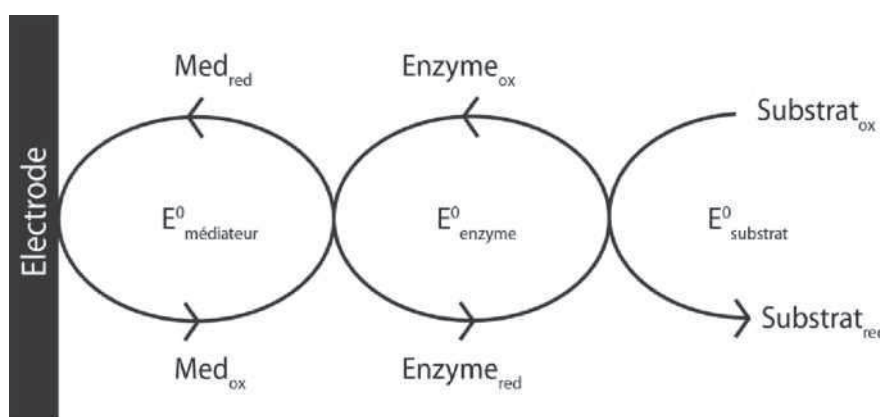
Le développement des bioélectrodes qui fonctionnent avec un transfert d'électrons direct efficace est un défi majeur de la recherche sur les biopiles enzymatiques. Peu d'enzymes permettent un transfert DET significatif une fois immobilisées sur une électrode puisque leur site redox est souvent caché profondément dans la structure de l'enzyme [74]. Les enzymes possédant un centre métallique dans leur site actif proche de la surface de la

structure sont capables d'interagir directement avec une électrode [75-76].

Aujourd'hui, la catalyse à partir d'un transfert d'électrons directe a été démontrée pour quelques enzymes, comme l'alcool déshydrogénase, la laccase, la peroxydase... [77-78]. Le transfert d'électrons direct est plus efficace lorsque le site actif de l'enzyme est proche de la surface d'électrode, et aussi lorsque l'enzyme est orientée de manière à présenter son site actif face à l'électrode [79].

### V-2 Transfert d'électrons indirect (MET)

Le transfert d'électrons indirect (MET) augmente la vitesse d'électrons entre l'électrode et le site actif de l'enzyme en utilisant un médiateur. Celui-ci participe directement à la réaction catalytique, il est réduit ou oxydé par l'enzyme pour être ensuite régénéré à la surface de l'électrode en transférant des électrons (Figure 21).



**Figure 21** : schéma d'un transfert d'électrons indirect (MET)

Les médiateurs sont divisés en deux sous-classes : les médiateurs à base de métaux et les médiateurs organiques. Ils peuvent être utilisés en solution ou immobilisés sur une électrode.

#### V-2-1 Médiateurs en solution

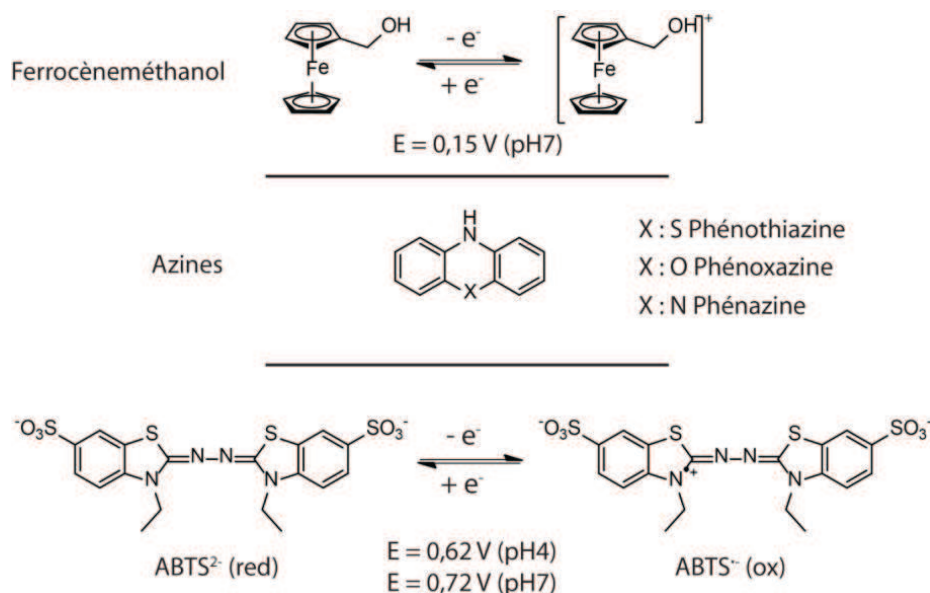
Les médiateurs les plus utilisés en solution sont des molécules rédox de faible poids moléculaire pour favoriser la diffusion de l'espèce rédox jusqu'au centre actif de la protéine.

- Les médiateurs anodiques les plus utilisés sont :

- l'acide ferrocénecarboxylique [80], le ferrocéneméthanol [81] et le ferrocène (1-1'-dicarboxyferrocène) [82] avec la glucose oxydase.

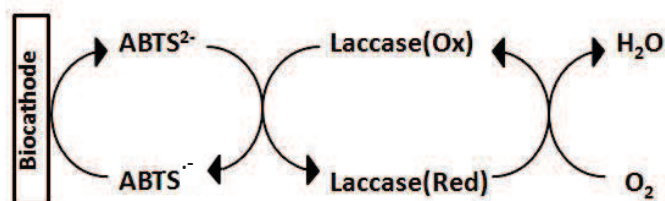
## Etude bibliographique

- des azines (phenazine, phenoxazine ou phénothiazine) avec des déshydrogénases (PQQ ou NAD dépendantes) (Figure 22).



**Figure 22:** exemples de médiateurs utilisés généralement en solution: ABTS, Ferrocèneméthanol et Azines. Les potentiels sont donnés par rapport à une électrode normale à hydrogène (ENH) [83].

L'ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) est le médiateur cathodique le plus utilisé dans les biopiles enzymatiques pour interagir avec des enzymes comme la bilirubine oxydase [83] ou la laccase [84-86] à haut potentiel rédox (Figures 22, 23). L'ABTS sous sa forme réduite (ABTS<sup>2-</sup>) s'oxyde en un radical ABTS<sup>•-</sup> à un potentiel d'environ 0,72 V/ENH à pH 7 et qui agit comme co-substrat de ces enzymes lors de la réduction de l'oxygène. En 1999, l'ABTS a été utilisé pour la première fois par Palmore et al. [84] comme médiateur cathodique en solution avec la laccase de *Pyricularia oryzae*. Les biopiles qui utilisent des médiateurs en solution donnent le plus souvent des densités de courant intéressantes [87]. En revanche, ce type de biopile avec des médiateurs en solution est limité par la sélectivité, la stabilité et le transport de masse du médiateur vers l'électrode.



**Figure 23:** transfert d'électrons à l'aide du médiateur ABTS pour une biocathode.

### V-2-2 Médiateurs immobilisés à la surface de l'électrode

Il est possible d'immobiliser les médiateurs par simple adsorption sur des électrodes. Cosnier et ses collaborateurs ont rapporté l'immobilisation physique des enzymes glucose oxydase et laccase avec les médiateurs ABTS et Ferrocène au sein d'une électrode composée de graphite pressé [88]. Une autre technique de médiation a été rapportée dans la littérature basée sur le piégeage de l'enzyme laccase au sein d'un hydrogel rédox, qui est généralement constitué par des complexes rédox à base de ruthénium ou d'osmium incorporés dans un polymère hydrosoluble comme le poly(allylamide) ou le poly(vinylimidazole)) pour former un polymère redox [89-90].

Dans la littérature, de nombreux exemples d'utilisation d'enzymes et de médiateurs immobilisés sur l'électrode sont décrits, comme des bioanodes à base de glucose oxydase [91-96], des biocathodes à base de laccase ou de bilirubine oxydase [97-98].

Les médiateurs doivent être non toxiques et biocompatibles et stables chimiquement en fonction du temps et des cycles de transfert d'électrons [17]. Le potentiel redox du médiateur doit être supérieur à celui de l'enzyme à l'anode et inversement à la cathode. En effet, la force électromotrice entre l'enzyme et le médiateur augmente en fonction du courant et de la différence de potentiel entre ces deux espèces redox [99,100].

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé deux médiateurs redox, l'ABTS à la cathode et le 2-méthyl-1,4-naphtoquinone (vitamine K3, VK3) à l'anode qui fonctionne avec la diaphorase (Dp). La VK3 est un des médiateurs les plus prometteurs pour le transfert d'électrons entre la diaphorase et la surface d'une électrode [101-104], mais elle est sensible en présence d'oxygène [105-106]. A titre d'exemple, la VK3 a été immobilisée en présence de diaphorase dans un film de poly-L-lysine pour réaliser une anode capable d'oxyder le glucose [107-108].

### VI- Matériaux d'électrodes utilisés dans les biopiles

Dans la fabrication des biopiles, le choix du matériau d'électrode est un des éléments clés. Les électrodes collectent les électrons provenant des réactions électrochimiques pour assurer leur passage dans le circuit électrique. Elles contribuent ainsi à la transformation de l'énergie chimique en une énergie électrique. Le choix du matériau d'électrode adéquate est fonction de son aptitude à pouvoir immobiliser efficacement les enzymes et les médiateurs, et à permettre un transfert efficace des électrons avec l'enzyme.

Les travaux de recherche se sont axés vers des matériaux comme le carbone et Au, qui sont connus pour leur conductivité électrique élevée. Ces matériaux peuvent être utilisés sous forme d'électrodes commerciales Au [109-110], carbone vitreux [111-112], ou graphite [113]. L'ajout de nanoparticules métalliques à base de Au, de palladium ou de platine améliorent les propriétés des matériaux d'électrodes [21], de par leur surface spécifique plus importante qui permet d'immobiliser de grandes quantités d'enzymes [114] et de faciliter les transferts électroniques entre le site actif de l'enzyme et l'électrode [115]. Dans la littérature, plusieurs travaux décrivent la construction d'électrodes constituées de nanoparticules métalliques [116-120]. D'autres types de nanomatériaux à base de carbone peuvent être également ajoutés sur un matériau dense afin d'augmenter la surface spécifique pour immobiliser une grande quantité d'espèces redox. C'est le cas des poudres de carbone [121-122,108], des nanotubes de carbone [123] ou des nanofibres de carbone [21].

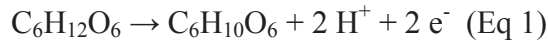
### VII- biopile à glucose/O<sub>2</sub>

La biopile la plus développée actuellement est la biopile à glucose/O<sub>2</sub> dont une application potentielle majeure concerne l'alimentation de petits appareils électriques portables ou de dispositifs médicaux implantables [17,124]. Ces biopiles à glucose utilisent une concentration en glucose identique à celle du milieu physiologique (environ  $5,5 \times 10^{-3}$  mol/L) [125-126,154].

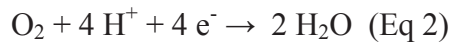
#### VII-1 Principe

Dans une biopile à glucose/O<sub>2</sub>, à l'anode, le glucose est oxydé à l'électrode le plus souvent par la GOD [127-128] pour conduire à la formation de gluconolactone qui se transforme facilement en acide gluconique [129], selon la réaction suivante :





A la cathode, l'oxygène est réduit en eau par des enzymes comme la laccase (Lc) ou la bilirubin oxydase (BOD) [52], selon la réaction suivante :

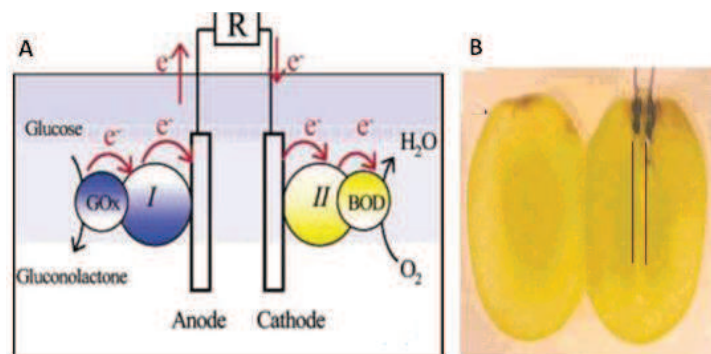


La réaction globale de la biopile en assemblant ces deux bioélectrodes est la suivante :



### VII-2 Implantation des biopiles enzymatiques dans le corps humain

L'intérêt de l'implantation réside dans la création d'un microsystème pouvant fonctionner grâce aux carburants disponibles dans le corps humain (alimentation d'une pompe à insuline, d'un pacemaker, ou d'un rein artificiel). Cosnier et ses collaborateurs ont réalisé une biopile à Glucose/ $\text{O}_2$  implantée dans un espace rétro-péritonéal d'un rat, qui a délivré une puissance de  $2 \mu\text{W}$  de manière stable pendant un mois [130]. Plusieurs travaux sur les biopiles enzymatiques glucose/ $\text{O}_2$  décrivent les pistes de recherche mises en œuvre pour améliorer la technique d'immobilisation des enzymes, la stabilité ou la puissance générée du système et la composition des électrodes [3,124,170,186]. Mano et ses collaborateurs ont implanté une biopile à glucose/ $\text{O}_2$  miniaturisée dans un grain de raisin (figure 24-B). Dans ce prototype, les enzymes BOD à la cathode et GOD à l'anode en présence de médiateurs à base d'osmium ont été immobilisées à l'aide d'un hydrogel sur des électrodes en fibre de carbone de  $7 \mu\text{m}$  de diamètre et de 2 cm de longueur (figure 24-A). Cette pile a délivré une densité de puissance de  $240 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  et une force électromotrice de 0,8V [133].



**Figure 24:** (A) schéma de fonctionnement d'une biopile à glucose/ $\text{O}_2$ . I et II sont des médiateurs à base d'osmium. (B) photographie de la biopile implantée dans un grain de raisin [133].



### VIII- Biopiles à alcool

#### VIII-1-Généralités

Pour réduire notre dépendance au pétrole, les chercheurs tentent d'exploiter l'énergie à partir de ressources renouvelables. Des techniques ont été développées pour produire efficacement l'éthanol à partir du maïs et de la biomasse [134-135]. Les chercheurs ont tenté de mettre au point des piles à combustible à éthanol, mais les catalyseurs traditionnels à base de platine sont incapables de catalyser efficacement l'oxydation de l'éthanol et sont facilement passivés [136-137]. Toutefois, les organismes vivants peuvent catalyser l'oxydation des carburants [138], comme par exemple *Pseudomonas aeruginosa* [139], *acetobacter* [140], *gluconobacter* [141] qui contiennent des enzymes oxydoréductases qui oxydent l'éthanol. Des biopiles à alcools ont été développées en remplaçant les catalyseurs métalliques par des enzymes ou des cellules vivantes [142-143,155].

Dans la littérature il existe plusieurs travaux sur les biopiles à alcool (tableau 5), décrivant des transferts indirects d'électrons pour la bioanode à cause de la nécessité d'employer un cofacteur pour les déshydrogénases et de l'accès difficile du centre actif redox. Ces exemples varient en fonction du type d'immobilisation des médiateurs et des enzymes utilisées et surtout en fonction du type d'électrode.

La plupart des travaux de recherche sur les biopiles à alcool se sont orientés sur l'optimisation des méthodes d'immobilisation des enzymes sur les électrodes [145-146], sur le développement de nouvelles stratégies pour améliorer le transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode [146] et sur l'étude de l'ingénierie des enzymes pour augmenter leur activité catalytique [147]. D'autres travaux se sont intéressés à l'étude de matériau de l'électrode. A titre exemple, l'équipe de L. Deng a développé un sol gel de (3-mercaptopropyl)-triméthoxysilane partiellement sulfoné (PSSG), ce qui peut co-immobiliser le Bleu de Meldola (MDB) et les nanoparticules Au (np-Au) sur la surface de l'électrode modifiée PSSG. L'incorporation des np-Au sur une électrode modifiée par MDB pourrait améliorer la performance catalytique de l'électrode enzymatique [24,148].

## Etude bibliographique

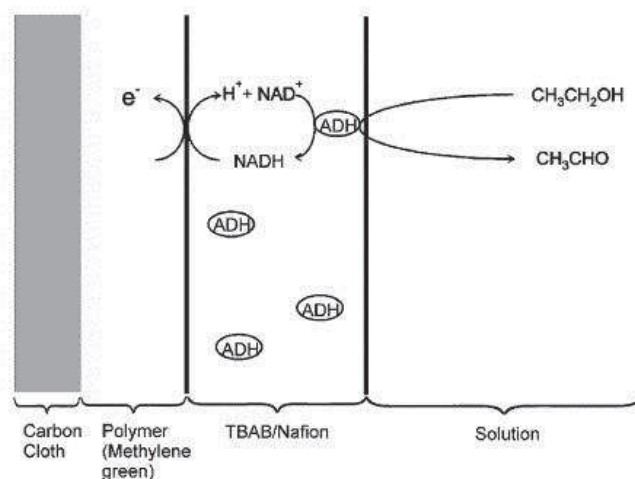
**Tableau 5 : Exemples de biopiles à alcool**

(BV : benzyl viologène, MP-8 : microperoxydase-8, AOx : alcool oxydase, QH : quino hémoprotéine, PQQ : pyrroloquinoléine quinone, BOD : bilirubine oxydase, Ru(bpy)<sub>3</sub> : tris(bipyridine) ruthénium, MDB : Meldola blue, ADH, FDH et AldDH : alcool, formate et aldéhyde déshydrogénases)

Carburant/ Comburent	Cathode électrode/enzyme(s) / médiateur	Anode électrode/enzyme(s) / médiateur	Densité De puissance ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )	références
Méthanol/O <sub>2</sub>	Platine	Graphite/ ADH, FDH, AldDH/BV	680	Palmore et al. [27]
Méthanol/O <sub>2</sub>	Platine	Graphite/ADH, AldDH, FDH, NAD <sup>+</sup> et Dp/ BV	600	Tayhas et al. [149]
Méthanol/O <sub>2</sub>	Platine	Papier de C / ADH, AldDH et FDH immobilisées dans le Nafion modifié par le bromure de tétrabutylamonium	250	Addo et al. [150]
Éthanol/O <sub>2</sub>	Platine, Vulcan <sup>®</sup>	Papier de carbone/ PQQ-ADH, PQQ- AldDH	19 à 38	Aquino Neto et al.[28]
Éthanol/ Éthanol	MP-8, AOx	Tige de carbone/ QH- ADH	1,5	Ramanavicius et al.[151]
Éthanol/O <sub>2</sub>	Tissu de carbone/BOD /(Ru(bpy) <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Carbone vitreux/ ADH, AldDH/Polyméthylène green	300	Topcagic et al.[152]
Éthanol/O <sub>2</sub>	Platine, Vulcan <sup>®</sup>	Feutre de carbone/ADH, AldDH/Polyméthylène green	1160 à 2040	Akers et al. [29]
Éthanol/O <sub>2</sub>	Feutre de carbone + Nanoparticules d'or/ /Laccase	Feutre de carbone + Nanoparticules d'or/ ADH/MDB	1560	Deng et al. [24]
Éthanol/O <sub>2</sub>	Pt	feutre de carbone/ADH NAD <sup>+</sup> dans Nafion	1,55	Akers et al [153]

S. Topcagic a construit une biopile à éthanol/ $O_2$  sans membrane présentant une durée de vie prolongée de plus de 10 jours. A l'anode, le polyméthylène Green est utilisé comme médiateur, avec les enzymes  $NAD^+$ , ADH et AldDH en solution. La cathode est constituée de fibres de carbone comme support de l'enzyme BOD et du médiateur  $Ru(bpy)_3^{+2}$  (tris(bipyridine) ruthénium) immobilisés dans un polymère de Nafion<sup>®</sup>. Cette biopile délivre une puissance de  $300 \mu W/cm^2$  [152].

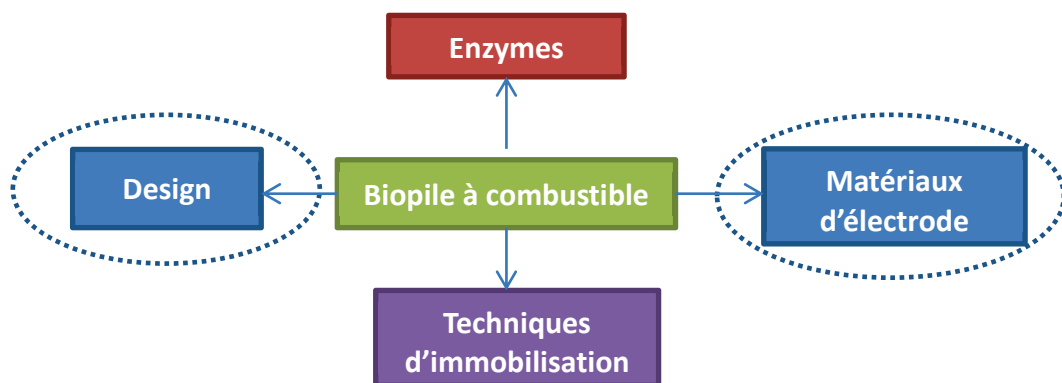
L. Nick et ses collaborateurs ont développé une biopile à éthanol à base de feutre de carbone comme support sur lequel ils ont déposé un polymère (méthylène green) puis immobilisé l'enzyme alcool déshydrogénase (ADH) et le cofacteur  $NAD^+$  dans une membrane de Nafion<sup>®</sup> modifiée par le bromure de tétrabutylammonium (TBAB) (figure 25). Cette bioanode a été associée à une cathode en Pt [153]. La puissance délivrée par cette biopile est  $1,55 mW/cm^2$ .



**Figure 25 :** Schéma du système de réaction se produisant dans les couches de la membrane de la bioanode [153]

### IX-Objectifs de la thèse

Les biopiles sont caractérisées par une courte durée d'utilisation dans le temps (de quelques jours à quelques semaines) et par des puissances générées comprises entre  $10^{-6}$  et  $10^{-3}$  Watt. Afin d'augmenter les performances des biopiles, la plupart des travaux de recherche se sont principalement orientés vers l'optimisation des méthodes d'immobilisation des enzymes sur les électrodes ainsi que vers le développement de nouvelles stratégies pour améliorer le transfert électronique (figure 26).



**Figure 26 :** Les différentes pistes de recherche pour améliorer les performances des biopiles.

Dans cette thèse nous présentons notre contribution au développement de biopiles enzymatiques de type alcool-oxygène en s'orientant sur les propriétés des matériaux d'électrode et la miniaturisation de ces systèmes.

L'originalité de notre travail a été de préparer un nouveau matériau à grande surface spécifique à base de nanofibres, utilisé pour la première fois dans la construction de biopiles enzymatiques. Ce matériau est constitué de nanofibres de PAN (déposés par électrospinning), modifiées par un film mince Au obtenu par pulvérisation cathodique afin de rendre ces nanofibres conductrices. Ce matériau d'électrode a été modifié par les enzymes laccase et ADH pour développer des biocathodes et des bioanodes. Nous avons également introduit différentes poudres de carbone, en mélange avec les enzymes, pour augmenter la surface spécifique et surtout améliorer la connexion entre les constituants immobilisés et la surface des électrodes.

## Etude bibliographique

---

Ces bioélectrodes ont été assemblées pour construire une biopile à éthanol/O<sub>2</sub> en vue de réaliser l'oxydation de l'éthanol par l'enzyme ADH en présence du cofacteur NAD<sup>+</sup> régénéré par l'enzyme Dp et le médiateur VK3 à l'anode, et la réduction de O<sub>2</sub> à la cathode en présence de laccase et d'ABTS.

Enfin, nous avons utilisé les résultats précédents et utilisé les concepts de la microfluidique pour développer des biopiles miniatures fonctionnant soit avec les enzymes immobilisées à la surface des électrodes (biopile alcool/O<sub>2</sub>), soit en solution (biopile glucose/O<sub>2</sub>) pour mettre au point un premier prototype 3D.

### Références

- [1] L. Carrete, K. A. Friedrich, K. U. Stimming 1 (2001) 5-39.
- [2] R. A. Bullen, T. C. Arnot, J. B. Lakeman and F. C. Walsh, *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006) 2015-2045.
- [3] G. T. R. Palmore, *Fundamentals, Experimental Techniques and Application*. Bartlett, P., Ed. John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, England, (2008) 359-375.
- [4] B. Min, J. Kim, S. Oh, J. M. Regan, B. E. Logan, *Water Research* 39 (2005) 4961-4968.
- [5] M. H. Osman, A. A. Shah, F. C. Walsh, Part I: Enzymatic cells, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011) 3087–3102.
- [6] R. Arechederra, S. D. Minter, *Electrochimica Acta* 53 (2008) 6698–6703.
- [7] R. L. Arechederra, K. Boehm, S. D. Minter, *Electrochimica Acta* 54 (2009) 7268–7273.
- [8] J. B. Robinson, P. A. Srere, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 10800–10805.
- [9] M. C. Potter, *Proceedings of The Royal Society B. Biological Sciences* 84 (1911) 260-276.
- [10] A. T. Yahiro, S. M. Lee, D. O. Kimbe. *Biochim. Biophys. Acta* 88 (1964) 375-383.
- [11] J. O. M. Bockris, S. Srinivasan,. “Fuel cells: their electrochemistry”. McGraw-Hill, New York (1969).
- [12] G. Govil, A. Saran. *J Indian Chem Soc* 59 (1982) 1226-1228.
- [13] G. T. R. Palmore, G. M. Whitesides, *ACS Symp. Ser.* 566 (1994) 271-290.
- [14] R. L. Arechederra, S. D. Minter, *Fuel Cells* 9 (2009) 63–69.
- [15] P. K. Addo, R. L. Arechederra, S. D. Minter, *Electroanalysis* 22 (2010) 807–812.
- [16] A. Zebda, C. Innocent, L. Renaud, M. Cretin, F. Pichot, R. Ferrigno, S. Tingry, in *Biofuel’s Engineering Process Technology* (Dos Santos Bernardes, M. A., Ed.). InTech. (2011).
- [17] B. S. Calabrese, J. Gallaway, P. Atanassov, *Chem. Rev.* 104 (2004) 4867–4886.
- [18] F. Davis, S. P. J. Higson, *Biofuel cells, Recent advances and applications*, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1224–1235.
- [19] L. Ivanov, T. Vidaković-Koch, K. Sundmacher, *Energies* 3 (2010) 803–846.

- [20] F. Davis, S. P. J. Higson), *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005) 1–20.
- [21] J. Kim, H. Jia, P. Wang, P, *Biotechnology Advances* 24 (2006) 296–308.
- [22] M. J. Cooney, V. Svoboda, C. Lau, G. Martin, S. D. Minter, *Energy & Environmental Science* 1 (2008) 320-337.
- [23] E. Katz, L. Willner, A. B. Kotlyar. *J. Electroanal. Chem* 479 (1999) 64-68.
- [24] L. Deng, L. Shang, D. Wen, J. Zhai, S. Dong, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2010) 70–73.
- [25] H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, K. Kano, *Energy and Environmental Science* 2 (2009) 133-138.
- [26] U. B. Jensen, S. Lörcher, M. Vagin, J. Chevallier, S. Shipovskov, O. Koroleva, F. Besenbacher, E. E. Ferapontova, *Electrochimica Acta* 62 (2012) 218–226.
- [27] G. T. R. Palmore, H. Bertschy, S. H. Bergens, and G. M. Whitesides, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 443 (1998) 155-161.
- [28] S. Aquino Neto, E. L. Suda, S. Xu, M. T. Meredith, A. R. De Andrade, and S. D. Minter, *Electrochimica Acta*, 87 (2013) 323-329.
- [29] N. L. Akers, C. M. Moore, and S. D. Minter, *Electrochimica Acta*, 50 (2005) 2521-2525.
- [30] Donald Voet, Judith G. Voet, *Biochimie, De Boeck Université, Bruxelles* (1998).
- [31] B. Augère, *Les enzymes, biocatalyseurs protéiques*, Ellipses. 2001.
- [32] X. Luo, M. Brugna, P. Tron-Infossi, M. T. Giudici-Orticoni, and E. Lojou, *Journal of biological inorganic chemistry : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 14 (2009) 1275-1288.
- [33] J.-P. Sine, *Enzymologie et applications*, Ellipses. 2010.
- [34] M. H. Osman, A.A. Shah, F.C. Walsh. Part I: enzymatic cells, *Biosens Bioelectron* 26 (2011) 3087-3102.
- [35] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J.F. Hainfeld, I. Willner, *Science* 299 (2003) 1877-1881.
- [36] M. Zayats, E. Katz, R. Baron, I. Willner, *J Am Chem Soc* 127 (2005) 12400-12406.
- [37] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *Angew Chem Int Ed Engl* 43 (2004) 2113-2117.
- [38] E. Katz, A.F. Buckmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 10752-10753.
- [39] E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 6803-6813.

- [40] I. Willner, G. Arad, E. Katz, *Bioelectroch. Bioener.* 44 (1998) 209-220.
- [41] E. Katz, O. Lioubashevski, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2005) 3979-3988.
- [42] S. Tsujimura, K. Kano, T. Ikeda, *Electrochemistry* 70 (2002) 940-942.
- [43] S. Tsujimura, H. Tatsumi, J. Ogawa, S. Shimizu, K. Kano, T. Ikeda, *J. Electroanal. Chem.* 496 (2001) 69-75.
- [44] A. Brune, G. Jeong, P.A. Liddell, T. Sotomura, T.A. Moore, A.L. Moore, D. Gust, *Langmuir* 20 (2004) 8366-8373.
- [45] L. Gorton, P. N. Bartlett, in *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications* (Ed: P. N. Bartlett), Wiley, Chichester, UK 2008, pp. 157–198.
- [46] T. Matsue, H. Yamada, H. C. Chang, I. Uchida, K. Nagata, K. Tomita, *Biochim. Biophys. Acta* 29 (1998) 1038-1047.
- [47] K. Takagi, K. Kano, T. Ikeda, *J. Electroanal. Chem.* 445 (1998) 211-219.
- [48] V. Urbanov, M. Etienne, A. Walcarius *Electroanalysis* 25 (2013) 85–93.
- [49] S. Topcagic, S. Minter, *Electrochimica Acta*, 51 (2006) 2168-2172.
- [50] T. Bertrand, C. Jolival, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak, C. Mougin, *Biochemistry* 41 (2002) 7325–7333.
- [51] Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T., and Gorton, L. *Bioelectrochemistry* 67 (2005) 115–124.
- [52] S. Brakmann, *Chembiochem* 2 (2001) 865-871.
- [53] S. V. Shleev, O. V. Morozova, O. V. Nikitina, E. S. Gorshina, T. V. Rusinova, V. A. Serezhenkov, D. S. Burbaev, I. G. Gazaryan, A. I. Yaropolov, *Biochimie* 86 (2004) 693–703.
- [54] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker, L. Gorton, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005) 2517–2554.
- [55] D. Ivnitski, P. Atanassov, *P. Electroanalysis* 19 (2007) 2307–2313.
- [56] K. Piontek, M. Antorini, T. Choinowski, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 37663–37669.
- [57] F. Durand, C.H. Kjaergaard, E. Suraniti, S. Gounel, R. G. Hadt, E. I. Solomon, N. Mano, *Biosensors and Bioelectronics* 35 (2012) 140–146.
- [58] C. Kang, H. Shin, Y. Zhang, A. Heller, *Bioelectrochemistry* 65 (2004), 83–88.



- [59] thèse Fabien GIROUD, 2011, UNIVERSITÉ DE GRENOBLE, « Biomatériaux d'électrode appliqués à la réalisation et à la caractérisation d'un biocapteur immunologique et de biopiles enzymatiques ».
- [60] D. Shan, Y. He, S. Wang, H. Xue, H. Zheng, *Anal. Biochem.* 356 (2006) 215-221.
- [61] S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 443-456.
- [62] R. Haddad, M. Holzinger, R. Villalonga, A. Neumann, J. Roots, A. Maaref, S. Cosnier, *Carbon* 49 (2011) 2571-2578.
- [63] N. Haddour, S. Cosnier, C. J. Gondran, *Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 5752-5753.
- [64] V. Roullier, S. Clarke, C. You, F. Pinaud, G. Gouzer, D. Schaible, V. M. Artzner, J. Piehler, M. Dahan. *Nano Lett.* 9 (2009) 1228-1234.
- [65] N. Ferreyra, L. Coche-Guerente, P. Labbe, *Electrochim. Acta* 49 (2004) 477-484.
- [66] A. A. Karyakin, G. V. Presnova, M. Y. Rubtsova, A. M. Egorov, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3805-3811.
- [67] Clark, L. C. Jr. Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102 (1962) 29-45.
- [68] Smith, R. G. D'Souza, N. Nicklin, S. *Analyst* 133 (2008) 571-584.
- [69] Scarano, S. Mascini, M. Turner, A. P. F. Minunni, M. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 957-966.
- [70] Goebel, G. Dietz, T. Lisdat, F. *Electroanalysis* 22 (2010) 1581-1585.
- [71] Zhang, Y. Y. Tadigadapa, S. In 2005 IEEE Sensors, 1 (2005) 41-44.
- [72] Soledad Belluzo, M. Elida Ribone, M. Marina Lagier, C. *Sensors* 8 (2008) 1366-1399.
- [73] Barton, S.C. Gallaway, J. Atanasov, P. *Chem. Rev.* 104 (2004) 4867-4886.
- [74] Armstrong, F.A. Hill, H.A.O. Walton, N.J. N.J., *Q. Rev. Biophys.* 18 (1985), 261-271.
- [75] Gorton, L. Lindgren, A. Larsson, T. Munteanu, F.D. Ruzgas, T. Gazaryan, I. *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 91-108.
- [76] Christenson, A.; Dimcheva, N. Ferapontova, E.E. Gorton, L. Ruzgas, T. Stoica, L. ; Shleev, S. Yaropolov, A.I. Haltrich, D.; Thorneley, R.N.F. Aust, S.D. *Electroanalysis* 16 (2004) 1074-1092.
- [77] Ghindilis, A.L. Atanasov, P.; Wilkins, E. *Electroanalysis* 9 (1997) 661-674.
- [78] Varfolomeev, S.D. Kurochkin, I.N. Yaropolov, A.I. *Biosensors and Bioelectronics* 11 (1996) 863-871.

- [79] Gutiérrez-Sánchez, C. Olea, D.; Marques, M. Fernandez, V.M. Pereira, I.A.C.; Vélez, M. De Lacey, A.L. *Langmuir* 27 (2011) 6449-6457.
- [80] Nazaruk, E. Bilewicz, R. *Bioelectrochemistry* 71 (2007) 8-14.
- [81] Pellissier, M. Barrière, F. Downard, A.J. Leech, D. *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 835-838.
- [82] Liu, Y. Dong, S. *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2007) 593-597.
- [83] Tsujimura, S. Tatsumi, H. Ogawa, J. Shimizu, S. Kano, K. Ikeda, T. J. *Electroanal. Chem.* 496 (2001) 69-75.
- [84] G.T.R. Palmore, H. Kim, J. *Electroanal. Chem* 464 (1999) 110-117.
- [85] Vaz-Dominguez, C.; Campuzano, S.; Rüdiger, O. Pita, M.; Gorbacheva, M.; Shleev, S.; Fernandez, V.M. De Lacey, A.L. *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 531-537.
- [86] Merle, G. Brunel, L. Tingry, S. Cretin, M. Rolland, M. Servat, K. Jolival, C.; Innocent, C.; Seta, P.. *Mater. Sci. Eng. C* 28 (2008) 932-938.
- [87] Liu, Y.; Wang, M.; Zhao, F.; Liu, B.; Dong, S.. *Chem. Eur. J.* 11 (2005) 4970-4974
- [88] Cosnier, S. Shan, D. Ding, S-N.. *Electrochem. Commun.* 12 (2010) 266-269.
- [89] Gregg, B.A. Heller, A. J. *Phys. Chem.* 95 (1991) 5970-5975.
- [90] Gao, Z. Binyamin, G. Kim, H-H. Barton, S.C.; Zhnag, Y.; Heller, A.. *Angew. Cheml. Int. Ed.* 41 (2002) 810-813.
- [91] Mao, F. Mano, N. Heller, A. J. *Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4951-4957.
- [92] de Lumley-Woodyear, T. Rocca, P. Lindsay, J. Dror, Y. Freeman, A.; Heller, A.. *Anal. Chem.* 67 (1995) 1332-1338.
- [93] Barrière, F. Ferry, Y.; Rochefort, D. ; Leech, D. *Electrochem. Commun.* 6 (2004) 237-241.
- [94] Mano, N. Heller, A. J. *Electrochem. Soc.* 125 (2003) A1136.
- [95] Chen, T. Barton, S.C.; Binyamin, G.; Gao, Z.; Zhang, Y. Kim, H-H. Heller, A. J. *Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 8630-8631.
- [96] Soukharev, V.; Mano, N. Heller, A. J. *Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 8368-8369.
- [97] Barton, S.C. Kim, H-H.; Binyamin, G. Zhang, Y.; Heller, A.. *J. Phys. Chem B* 105 (2001) 11197-11921.

- [98] Jenkins, P.A. Boland, S. Kavanagh, P. Leech, D. Bioelectrochemistry 76 (2009) 162-168.
- [99] Gallaway, J. W., and Calabrese Barton, S. A. J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 8527–8536.
- [100] Tamaki, T., Ito, T., and Yamaguchi, T. Fuel Cells 9 (2009) 37–43.
- [101] A. Sato, K. Kano, T. Ikeda, Chem. Lett. 32 (2003) 880-881.
- [102] Y. Ogino, K. Takagi, K. Kano, T. Ikeda, J. Electroanal. Chem. 396 (1995) 517-524.
- [103] Y. Ogino, K. Takagi, K. Kano, T. Ikeda, J. Electroanal. Chem. 396 (1996) 517-524
- [104] K. Takagi, K. Kano, T. Ikeda, J. Electroanal. Chem. 445 (1998) 211-219.
- [105] J. Q. Chambers, in The Chemistry of Quinonoid Compounds (Eds: S. Patei, Z. Rappoport), Wiley, New York (1988) 719–757.
- [106] H. Tatsumi, H. Nakase, K. Kano, T. Ikeda, J. Electroanal. Chem. 443 (1998) 236-240.
- [107] F. Sato, M. Togo, M. K. Islam, T. Matsue, J. Kosuge, N. Fukasaku, S. Kurosawa, M. Nishizawa, Electrochem. Commun. 7 (2005) 643-796.
- [108] Fuyuki Sato, Makoto Togo, Mohammed Kamrul Islam, Tomokazu Matsue , Junichi Kosuge, Noboru Fukasaku, Satoshi Kurosawa, Matsuhiko Nishizawa, Electrochemistry Communications 7 (2005) 643–647.
- [109] P. Ramirez, N. Mano, R. Andreu, T. Ruzgas, A. Heller, L. Gorton, and S. Shleev, Biochimica et biophysica acta, 1777 (2008) 1364-1369, 2008.
- [110] M. Pita, S. Shleev, T. Ruzgas, V. Fernandez, a Yaropolov, and L. Gorton, Electrochemistry Communications, 8 (2006) 747-753.
- [111] S. Boland, Langmuir, 24 (2008) 6351-6358.
- [112] M. N. Arechederra, P. K. Addo, and S. D. Minter, Electrochimica Acta, 56 (2011) 1585-1590.
- [113] E. Lojou, X. Luo, M. Brugna, N. Candoni, S. Dementin, and M. T. Giudici-Orticoni, Journal of biological inorganic chemistry JBIC a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry, 13 (2008) 1157-1167.
- [114] H. Jia, G. Zhu, and P. Wang, Biotechnology and bioengineering, 84 (2003) 406-414.
- [115] F. P. Cardoso, S. Aquino Neto, P. G. Fenga, P. Ciancaglini, and A. R. De Andrade, Electrochimica Acta, 90 (2013) 90-94.
- [116] 227,231, Y.-M. Yan, I. Baravik, R. Tel-Vered, and I. Willner, Advanced Materials, 21

(2009) 4275-4279.

[117] C. Burda, X.B. Chen, R. Narayanan, M.A. El-Sayed, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1025-1102.

[118] N.L. Rosi, C.A. Mirkin, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1547-1562.

[119] B. Yoon, H. Hakkinen, U. Landman, A.S. Worz, J.M. Antonietti, S. Abbet, K. Judai, U. Heiz, *Science* 307 (2005) 403-407.

[120] M. Date, M. Okumura, S. Tsubota, M. Haruta, *Angew. Chem., Int. Ed.* 43 (2004) 2125-2129.

[121] C. Liu, S. Alwarappan, Z. Chen, X. Kong, and C.-Z. Li, *Biosensors & Bioelectronics*, 25 (2010) 1829-1833.

[122] T. Szabo, A. Szeri, and I. Dekany, *Carbon*, 43 (2005).87-94.

[123] M. Holzinger, A. Le Goff, and S. Cosnier, *Electrochimica Acta*, vol. 82, 179-190, 2012.

[124] Heller, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 209-216.

[125] Okuda-Shimazaki, J., Kakehi, N., Yamazaki, T., Tomiyama, M., and Sode, K. *Biotechnol. Lett.* 30 (2008) 1753–1758.

[126] Coman, V., Ludwig, R., Harreither, W., Haltrich, D., Gorton, L., Ruzgas, T., and Shleev, S., *Fuel Cells* 10 (2010) 9–16.

[127] Gao, F., Courjean, O., and Mano, N. *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2009) 356–361.

[128] Mano, N., Mao, F., and Heller, A., *Electroanalytical Chemistry* 574 (2005) 347– 357.

[129] Wilson, R., and Turner, A. P. F. *Biosensors and Bioelectronics* 7 (1992) 165–185.

[130] P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J. P Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathé, P. Porcu, S. Cosnier, *PlosOne* 5 (2010) 5-12.

[131] Ikeda, T.; kano, K., *J. Biosci. Bioeng.* 92 (2001) 9-18.

[132] Barton, S.C. Vielstich, W.; Yokokawa, H.; Gasteiger, H.A.; Ed. John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, England, (2009) chapitre 8, pp 1-18.

[133] Mano, N., Mao, F., and Heller, A., *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 6588–6594.

[134] D.V. Hunt, *The Gasohol Handbook*, Industrial Press, New York, NY, 1981.

[135] L.O. Ingram, *Biotechnol. Prog.* 15 (1999) 855-866.

[136] W.J. Zhou, *J. Power Sources* 126 (2004) 16.

- [137] W. Zhou, *Appl. Catal. B: Environ.* 46 (2003) 273.
- [138] J. D. Enderle, S.M. Blanchard, J.D. Bronzino, *Introduction to Biomedical Engineering*, Academic Press, San Diego, CA, 2000.
- [139] H. Gorisch, *Biochimica et Biophysica Acta* 1647 (2003) 98-102.
- [140] T. Ikeda, K. Kato, H. Tatsumi, K. Kano, *J. Electroanal. Chem.* 440 (1997) 265-269.
- [141] F. Molinari, R. Villa, M. Manzoni, F. Aragozzini, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43 (1995) 989-995.
- [142] S. Chaudhuri, D.R. Lovley, *Nature Biotechnol.* 21 (2003) 1229-1232.
- [143] N. Mano, F. Mao, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 6588-6594.
- [144] M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret. A review. *Sensors and Actuators B: Chemical* 69 (2000) 153-163.
- [145] Y.-G. Li, Y.-X. Zhou, J.-L. Feng, Z.-H. Jiang, L.-R. Ma. *Analytica Chimica Acta* 382 (1999) 277-282.
- [146] M. G. Boutelle, C. Stanford, M. Fillenz, W.J. Albery, P.N. Bartlett. *Neuroscience Letters* 72 (1986) 283-288.
- [147] M. Pellissier, F. Barrière, A.J. Downard, D. Leech. *Electrochemistry Communications* 10 (2008) 835-838.
- [148] Deng, L., Zhang, L. H., Shang, L., Guo, S.J., Wen, D., Dong, S.J.,. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2273–2276.
- [149] G. Tayhas R. Palmore, Hugo Bertschy b, Steven H. Bergens, George M. Whitesides, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 443 (1998) 155–161.
- [150] Paul K. Addo, Robert L. Arechederra, Shelley D. Minter, *Electroanalysis* 22 (2010) 807-812.
- [151] Arunas Ramanavicius, Asta Kausaitea, Almira Ramanaviciene, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 761–766.
- [152] Sabina Topcagic, Shelley D. Minter *Electrochimica Acta* 51 (2006) 2168–2172.
- [153] Nick L. Akers, Christine M. Moore, Shelley D. Minter, *Electrochimica Acta* 50 (2005) 2521–2525.
- [154] Zebda, A., Gondran, C., Goff, A. L., Holzinger, M., Cinquin, P., and Cosnier, S., *Nature Communications* 2 (2011) 370-376.

## Etude bibliographique

---

[155] N. Mano, F. Mao, A. Heller, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 12962-12963.

# **Chapitre I : Bioélectrodes enzymatiques**

## Introduction

L'ensemble formé par la biomolécule immobilisée et son environnement constitue un biomatériau qui permet à l'espèce biologique de conserver son activité et sa stabilité. Les biomatériaux bénéficient du comportement de l'espèce biologique et des matériaux les constituant. Une électrode enzymatique est constituée d'un système biologique (enzyme,...), généralement immobilisé sur une électrode pour former une bioélectrode. Dans le domaine des biopiles ou des biocapteurs, une espèce biologique est généralement immobilisée à la surface d'une électrode par différentes méthodes d'immobilisation qui ont été décrites dans la partie bibliographique.

La fabrication de l'électrode est une étape importante pour un fonctionnement efficace d'une biopile. Pour assurer un bon transfert électronique entre les espèces, l'électrode doit posséder une surface spécifique importante pour pouvoir y confiner une grande quantité d'espèces redox en utilisant un matériau à grande surface spécifique comme les nanomatériaux. L'électrode doit posséder ainsi une conductivité électrique suffisante.

Les nanomatériaux ont stimulé un grand intérêt dans de nombreux domaines tel que la catalyse, les capteurs biologiques et chimiques, et les nanotechnologies, à cause de leur grande surface spécifique, qui augmente la quantité d'enzymes immobilisées et améliore les échanges électroniques [1-9]. L'électrospinning est une méthode simple, flexible et rentable pour fabriquer des nanofibres de polymère avec un diamètre allant de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs micromètres [10-11]. Au cours des dernières années, la technique d'électrospinning a été reconnue comme une méthode efficace pour fabriquer des structures fibreuses nanométriques. Récemment, des nanofibres organiques [12-16], inorganiques [17-19], et hybrides organique-inorganique [20, 21] avec une surface importante et uniforme ont été fabriquées pour des applications potentielles dans les domaines des membranes, capteurs optiques et biocapteurs [12-21]. En outre, des microfibres ou microtubes de métaux tels que l'or, le cuivre, l'argent et l'aluminium ont été fabriqués à l'aide de la méthode d'électrospinning [22-25].

Les polymères déposés par la méthode d'électrospinning ne sont pas conducteurs. Pour les rendre conducteurs il est possible de déposer un matériau conducteur sous forme de nanoparticules par pulvérisation cathodique. Il s'agit d'une technique qui permet la synthèse de couches minces conductrices à partir de la condensation d'une vapeur métallique issue d'une source solide (cible) sur un substrat. La plupart des travaux pour rendre conductrices ces nanofibres de polyacrylonitrile ont été réalisées avec des NpsAu (nanoparticules d'or) [26-27]. Kim et ses collaborateurs [26] ont préparé un arrangement unidimensionnel de NPsAu



sur des nanofibres d'oxyde de polyéthylène. Man et ses collaborateurs [27] ont immobilisé des NPsAu sur la surface des nanofibres hybrides de polyéthylèneimine/alcool polyvinylique, par une première réticulation avec du glutaraldéhyde, puis réaction avec  $\text{HAuCl}_4$ .

Les auteurs ont montré que les électrodes à base de nanoparticules de carbone (nPC) tridimensionnelles ont joué un rôle important pour augmenter les densités de courant de la réduction de l'oxygène. Des biocathodes à base de nanoparticules de carbone-laccase ont été préparées par piégeage des nPC dans une matrice polymère-enzyme pour la réduction de l' $\text{O}_2$  [28]. L'amélioration des performances a été attribuée à l'augmentation de la quantité d'enzymes par l'augmentation de la surface spécifique. Le carbone « Ketjen black » a été combiné avec l'oxydase cuivreux [29] ou de la bilirubine oxydase (BOD) [30] pour la réduction de l'oxygène, ou avec la glucose déshydrogénase (GDH) pour l'oxydation du glucose [31]. Sa surface développée a conduit à une augmentation des densités de courant. Le carbone Vulcan<sup>®</sup> a été mélangé avec des oxydases multicuivre dans le Nafion pour construire une biopile à éthanol [32] et des biopiles à glucose/ $\text{O}_2$  [33-34]. D'autres études dans le domaine des piles à combustibles ont démontré l'effet important des propriétés de poudres de carbone sur l'activité catalytique des bioélectrodes [35,36].

Dans ce travail, l'idée est de construire des bioélectrodes avec une grande surface spécifique en utilisant des matériaux appropriés. Nous nous sommes donc orientés vers :

- la synthèse d'un matériau d'électrode tridimensionnel à base de nanofibres de polyacrylonitrile recouvertes d'une couche mince en Au.
- l'utilisation de différentes poudres de carbone (graphite ou amorphe) afin de favoriser la proximité des espèces immobilisées et donc les échanges électroniques.

Dans le but d'améliorer les performances électriques et électrochimiques des biopiles à combustibles, nous allons explorer dans ce chapitre l'intérêt de synthétiser un nouveau matériau d'électrode à grande surface spécifique par la méthode d'électrospinning dans l'objectif d'immobiliser de plus grandes quantités d'enzymes. Il s'agit de déposer des nanofibres de polyacrylonitrile sur une électrode de silicium, puis de former une couche mince en Au par pulvérisation cathodique afin de rendre ces nanofibres conductrices. Notre objectif a été d'immobiliser des enzymes redox par piégeage en présence de poudre de carbone et d'un polymère sur des électrodes synthétisées à base de Au/nanofibres de polyacrylonitrile/Si notées (Au/NFsPAN/Si). Avant de mettre en œuvre cette approche, nous avons fait une étude préliminaire pour étudier l'influence de la nature des poudres de carbone sur les performances des bioélectrodes construites sur un substrat simple en Au. Les résultats obtenus ont permis de fabriquer des bioélectrodes à base de Au/NFsPAN/Si.

## Chapitre I

---

Dans la première partie, nous présenterons et caractériserons des bioélectrodes construites d'abord sur une électrode Au afin d'optimiser les performances en utilisant différentes poudre de carbone graphite (KS6) ou amorphe (Super P<sup>®</sup> ou Carbone Vulcan<sup>®</sup>) et voir leur influence sur l'oxydation et la réduction électrochimique de l'éthanol et de l'oxygène successivement.

Dans la deuxième partie, nous présenterons la synthèse et la caractérisation structurale du matériau de polyacrylonitrile tridimensionnel préparé par électrospinning et modifiée par une couche mince Au. Nous présenterons l'utilisation de ce matériau pour améliorer les performances des bioélectrodes construites dans la première partie.

### **Partie I : Bioélectrodes enzymatiques à base Au**

Nous avons utilisé Au déposé en couche mince comme matériau de base conducteur pour la fabrication des électrodes. Ce matériau est l'un des métaux les plus conducteurs ( $40.10^6$  S/m), le potentiel redox du couple  $\text{Au}^+/\text{Au}$  est 1,69 V/ESH (électrode standard à hydrogène), qui est en dehors de la fenêtre balayée lors de l'utilisation des biopiles et élimine donc l'oxydation de ce matériau. Au a été utilisé largement comme matériau d'électrode dans les biopiles [37,38].

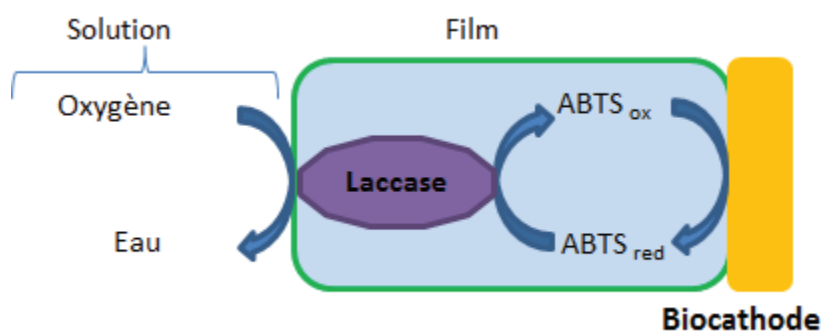
Dans un premier temps, nous avons synthétisé et caractérisé les performances des bioélectrodes obtenues par immobilisation des enzymes sur électrode Au.

## I-1-Biocathode pour la réduction de $O_2$ sur électrode Au

### I-1-1-Principe de fonctionnement

Pour un fonctionnement efficace de la biocathode, la cinétique de transfert d'électrons entre le site actif de l'enzyme et le médiateur doit être rapide. Il est donc souhaitable de retenir les espèces en surface de l'électrode pour maintenir une concentration et une activité importante. Pour ce faire, nous avons immobilisé un mélange d'enzyme Laccase et du médiateur ABTS avec de la poudre de carbone sur une électrode Au.

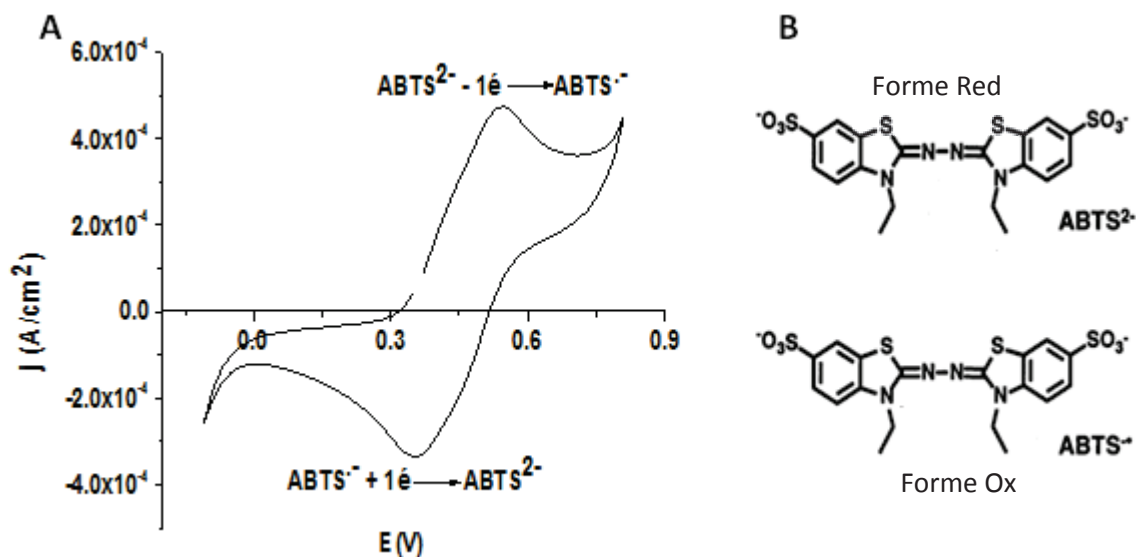
Sur la figure 1, nous présentons le schéma des réactions redox à la biocathode qui catalyse la réduction de l'oxygène en  $H_2O$ . L'oxygène dissout diffuse dans le film et réagit avec la laccase<sub>red</sub> pour être réduit en eau. La laccase est ensuite régénérée par oxydation de ABTS<sub>red</sub> en ABTS<sub>ox</sub>. La réduction de ABTS<sub>ox</sub> est la réaction observée à la cathode.



*Figure 1: schéma des réactions redox à la biocathode*

### I-1-2-Oxydoréduction du médiateur ABTS sur Au

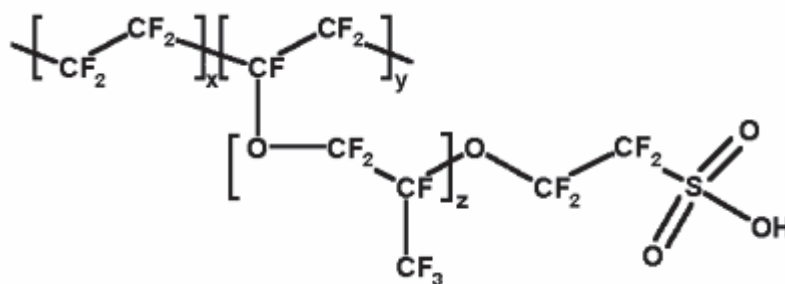
Comme c'est la réduction de l'ABTS<sub>ox</sub> qui est observée à l'électrode, nous avons donc effectué une étude par voltammétrie cyclique d'une solution d'ABTS 10 mM sur une électrode d'or en milieu tampon phosphate (pH=5). La courbe de voltammétrie cyclique obtenue (figure 2-A) est caractérisée par un pic de réduction vers 345 mV/ECS correspondant à la réduction de l'ABTS<sup>•+</sup> en ABTS<sup>2-</sup> et un pic d'oxydation vers 545 mV/ECS attribué à l'oxydation de l'ABTS<sup>2-</sup> en ABTS<sup>•+</sup> (figure 2-B). Le potentiel  $E_{1/2}$  du médiateur ABTS utilisé dans la biocathode ( $E_{1/2} = (E_{ox} + E_{red}) / 2$ ) est de l'ordre de 445 mV, très proche de celui donné par la littérature (440 mV/ECS) [39-40].



**Figure 2:** (A) voltammétrie cyclique du médiateur ABTS (10mM) sur une électrode Au, testée dans du tampon phosphate pH 5,  $v = 20\text{mV s}^{-1}$ . (B) formes Ox et Red de l'ABTS

## I-1-3-Construction de la biocathode

Généralement, les médiateurs sont immobilisés avec l'enzyme en solution par simple adsorption physique à la surface des électrodes par des liaisons Van der Waals et des réactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles). Par contre, ces espèces immobilisées se dissolvent rapidement dès contact de l'électrode dans la solution. Pour lier les enzymes et les médiateurs efficacement à l'électrode nous avons utilisé la méthode d'encapsulation en ajoutant une matrice polymère. La matrice doit permettre la diffusion seulement des petites molécules afin que les enzymes ne puissent pas s'en échapper. Pour cela, nous avons utilisé du Nafion<sup>®</sup> (figure 3), non modifié et déjà utilisé par A. Habrioux et coll. [41] pour piéger des enzymes dans une matrice propice à son fonctionnement. Le Nafion<sup>®</sup> modifié par le bromure de tétrabutylammonium (TBAB) a été également utilisé pour augmenter la stabilité des enzymes immobilisées [42].



**Figure 3:** Formule développée du Nafion®

Les électrodes Au ont été fabriquées par pulvérisation cathodique par dépôt de particules Au sur une plaque d'époxy. De la poudre de carbone a été ajoutée au mélange enzyme-médiateur afin d'augmenter la surface effective de l'électrode [42-43]. Dans la littérature, différentes natures des poudres de carbone ont été utilisées [42,43,30,34], comme le carbone amorphe KetjenBlack® (KB) pour modifier des fibres de carbone afin d'immobiliser l'alcool déshydrogénase [30], ou comme le noir de carbone (KB®) immobilisé dans une bicouche de (PLL-VK3/Dp/GDH) [43]. On peut également citer le Carbone Vulcan® qui a été utilisé sous forme de pastille pour immobiliser l'enzyme laccase [34]. L'ensemble de ces travaux a mis en évidence une meilleure activité catalytique des bioélectrodes.

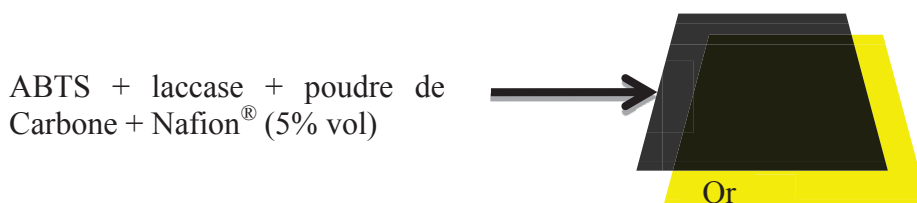
L'optimisation des quantités de chaque espèce immobilisées a été réalisée lors de travaux antérieurs au laboratoire auxquels j'ai participé et qui ont été présentés dans le cadre d'une thèse récemment soutenue [44]. Les résultats ont montré que le dépôt suivant donne les meilleures densités de courant pour la bio cathode vis-à-vis de la réduction de  $O_2$  à 28°C:

- 7,5mg/ml de poudre de Carbone®
- 5% vol Nafion®
- 7,5mg/mL de Laccase ( $75 \mu g cm^{-2}$ )
- 2,7 mg/mL de médiateur ABTS ( $27 \mu g cm^{-2}$ )

Les conditions expérimentables fixées pour la synthèse du dépôt à la surface de Au sont :

- Dépôt des espèces par « drop casting » d'un volume  $83 \mu L/cm^2$  du mélange (ABTS, Laccase, poudre de carbone et Nafion® dans une solution de tampon phosphate (0,1M) à pH 5) sur une électrode Au, séché à l'air (figure 4).
- Le Nafion® a été choisi après avoir testé également d'autres polymères Poly-L-Lysine PLL et polyéthylène imine PEI. La meilleure performance du Nafion® s'explique par le fait qu'il gonfle dans l'eau et présente des cavités propices au confinement des

espèces et à leur mouvement dans la matrice. De plus, le Nafion<sup>®</sup> est un échangeur de protons qui permet de favoriser la diffusion des protons  $H^+$  nécessaire à la réduction de  $O_2$ .

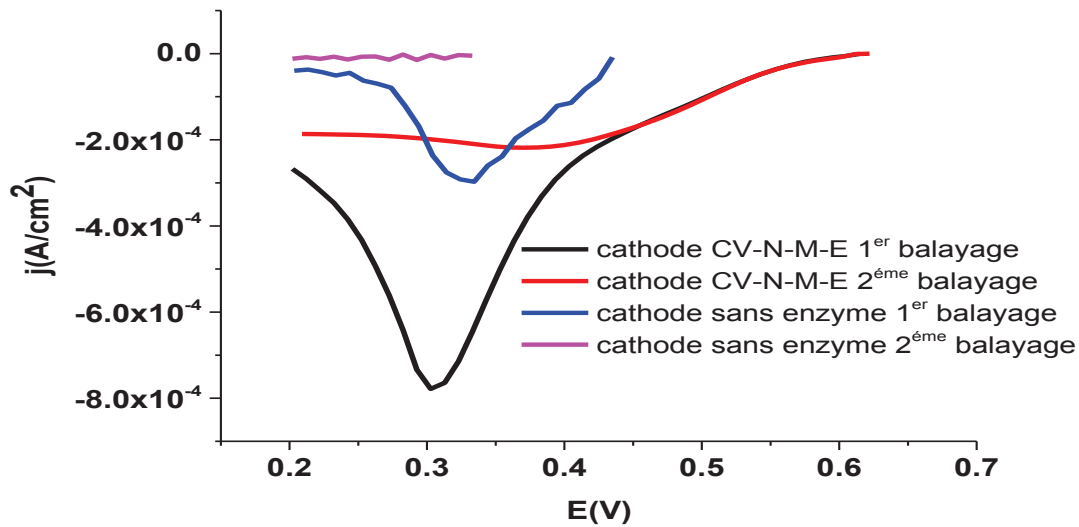


**Figure 4:** Immobilisation des espèces sur l'électrode Au

Dans ce travail, nous avons étudié l'influence de nouveaux paramètres comme la valeur du pH, le dépôt préalable d'une couche d'adhésion sur Au et la nature de la poudre de carbone.

### **I-1-4- Etude de la réponse électrochimique de la biocathode**

Les performances des biocathodes, vis-à-vis de la réduction de  $O_2$ , ont été évaluées à partir des courbes de polarisation obtenues en mesurant le courant délivré lors du balayage du potentiel de  $E_{i=0}$  (potentiel d'équilibre en absence de courant) jusqu'à 0 V/ECS à l'aide d'un potentiostat. Les courbes de polarisation correspondant aux électrodes préparées précédemment avec et sans enzymes laccase sont présentées sur la figure 5. Ces bioélectrodes ont été réalisées en utilisant la poudre de carbone Vulcan<sup>®</sup>.



**Figure 5 :** Courbes de polarisation des biocathodes construites avec et sans enzymes, testées dans une solution tampon phosphate 0.1M, avec barbotage d'O<sub>2</sub>. pH5,  $\nu = 3.33 \text{ mV/s}$ . (CV : carbone Vulcan<sup>®</sup>, N : Nafion<sup>®</sup>, E : laccase, M : ABTS).

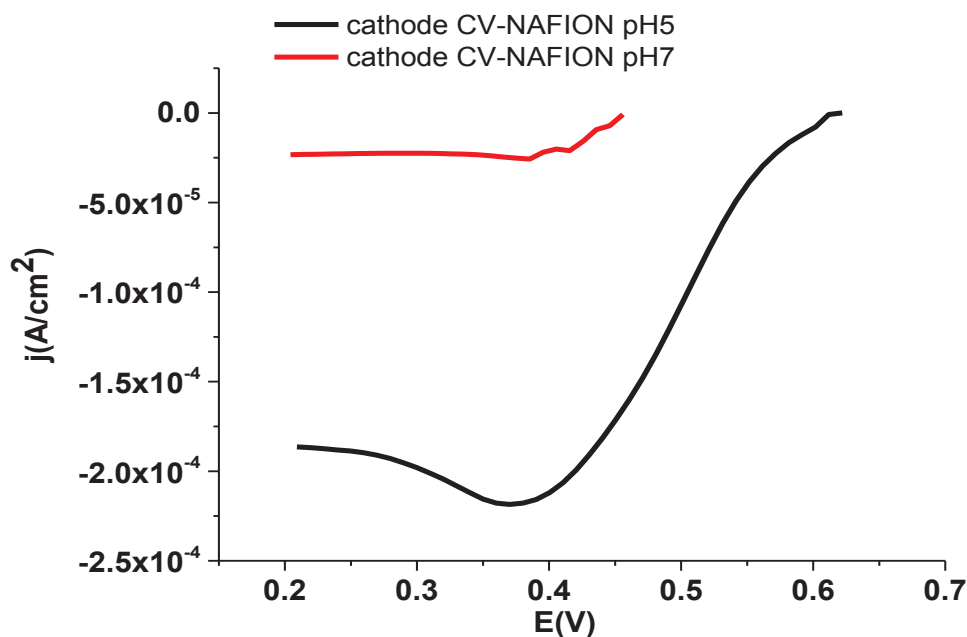
En présence de l'enzyme laccase, le potentiel d'équilibre  $E_{i=0}$  de la biocathode est 0.62 V/ECS. Le 1<sup>er</sup> balayage est caractérisé par un pic de réduction vers 0.3V/ECS, qui correspond à la réduction d'ABTS en excès présent sur l'électrode, qui disparaît au cours du second balayage en raison de sa désorption [45]. Cette désorption de l'ABTS est confirmée par l'apparition d'une coloration verte localisée sur la biocathode. Lors du 2<sup>ème</sup> balayage, l'allure de la courbe est caractérisée par un semi-plateau indiquant le contrôle de la réaction électrocatalytique par la diffusion de l'oxygène jusqu'à la surface de l'électrode. La densité de courant observée ( $-200 \mu\text{A/cm}^2$ ) est attribuée à la réduction de l'oxygène en eau ( $\text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$ ) catalysée par l'enzyme Laccase.

Des électrodes en absence de laccase ont été également évaluées pour confirmer que le courant de réduction observé vers  $-200 \mu\text{A/cm}^2$  correspond à l'activité catalytique de l'enzyme (figure 5). Les courbes de polarisation indiquent, d'une part, la diminution de  $E_{i=0}$  de 0,6 V à 0.43 V traduisant la présence d'une quantité inférieure d'ABTS sous forme oxydée. D'autre part, un pic de réduction vers 0.3 V est observé qui confirme la réduction de l'ABTS à ce potentiel, et la biocathode délivre une faible densité de courant. Cela confirme qu'il y a bien un couplage entre la laccase et son médiateur ABTS pour effectuer la réduction catalytique de l'oxygène.



### I-1-5-Effet du pH sur le fonctionnement de la biocathode

L'influence du pH sur l'activité de la biocathode a été étudiée (figure 6). Comme nous l'avons mentionné dans la partie bibliographique, la laccase utilisée dans ce travail fonctionne à un pH acide (entre 3 et 5). Cependant, certains travaux dans la littérature décrivent le fonctionnement d'une biocathode à pH physiologique pour des dispositifs implantables avec d'autres types de laccase [45]. Dans le but de déterminer l'influence du pH du milieu sur le comportement de la biocathode, les courbes de polarisation ont été tracées dans une solution tampon phosphate oxygénée 0.1M à pH 5 et 7.



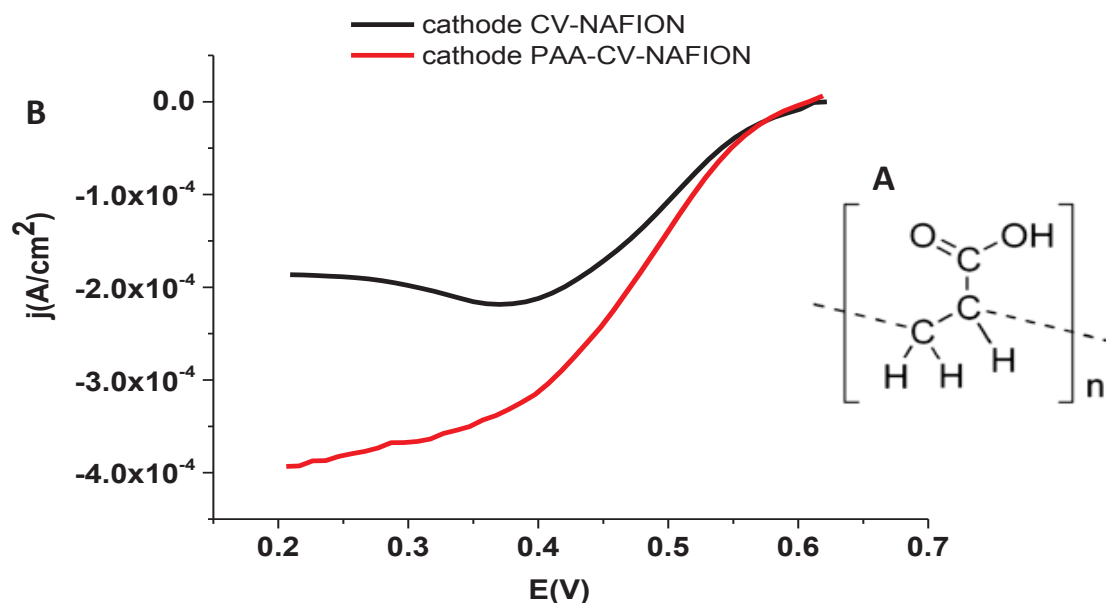
**Figure 6 :** Courbes de polarisation des biocathodes testées dans une solution tampon phosphate (0.1M) avec barbotage d'O<sub>2</sub>, pH = 5 et 7.  $v = 3.33 \text{ mV/s}$

La courbe de polarisation tracée à pH 7 présente une densité de courant de l'ordre de  $25 \mu\text{A/cm}^2$ , qui est huit fois plus faible par rapport à celle obtenue à pH 5 ( $200 \mu\text{A/cm}^2$ ). Ce résultat est en parfait accord avec la littérature puisque le pH optimum de fonctionnement de la laccase est 5 pour la laccase *versicolor* [46,47]. Au-delà de son pH optimum, l'activité de l'enzyme décroît.

### I-1-6-Effet d'une couche d'adhésion préalable sur Au

Afin de mieux piéger les constituants à l'électrode, nous avons testé le dépôt d'une couche d'adhésion préliminaire d'acide polyacrylique (PAA) (3,4 mg/ml) à la surface de

l'électrode Au ( $V=12\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ) avant de réaliser le dépôt des espèces. Cette étude a été inspirée par les travaux de Sato et al. qui ont utilisé le PAA pour construire une électrode modifiée avec une bicouche d'enzymes DP/GDH utilisée pour l'oxydation du glucose [43,48]. A pH=5, ce polymère est neutre et sa structure est donnée sur la figure 7-A [49].



**Figure 7:** (A) Courbes de polarisation des biocathodes avec ou sans couche de PAA, testées dans une solution tampon phosphate (0.1M) avec barbotage d' $\text{O}_2$ , pH5,  $v = 3.33 \text{ mV/s}$ . (B) Formule semi développée du PAA.

La courbe de polarisation obtenue pour l'électrode avec couche de PAA (figure 7-B) présente des densités de courant de l'ordre de  $400\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , deux fois supérieure à celle obtenue sans le PAA. Ce résultat s'explique par une meilleure adsorption des espèces par interactions électrostatiques à la surface de l'électrode Au qui conduit à une augmentation des densités de courant.

Nous avons donc préparé les biocathodes en ajoutant une couche de PAA au préalable sur l'électrode Au.

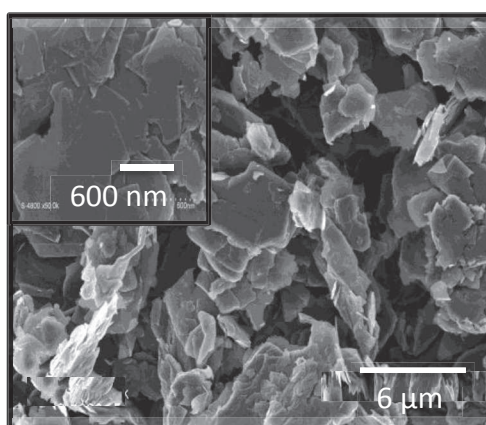
## I-1-7- Effet de la nature de la poudre de carbone

Il a été démontré que les nanoparticules de carbone peuvent améliorer la connexion entre les espèces réactives et augmenter la surface spécifique des électrodes modifiées. De nombreux articles présentent l'utilisation de nanoparticules de carbone (Ketjen black, carbone Vulcan...) pour modifier des bioélectrodes [38,50]. Dans ce travail, nous avons choisi de décrire pour la première fois, l'influence de la nature des poudres sur la réponse électrocatalytique des bioélectrodes. Pour cela, trois différentes poudres ont été testées : du carbone vulcan, du carbone KS6, ou du carbone Super P® présentant des caractéristiques physiques différentes (granulométrie, surface spécifique, conductivité électrique).

### I-1-7-1 Caractérisation structurale et physique des poudres de carbone

- **Le carbone graphite (KS6)**

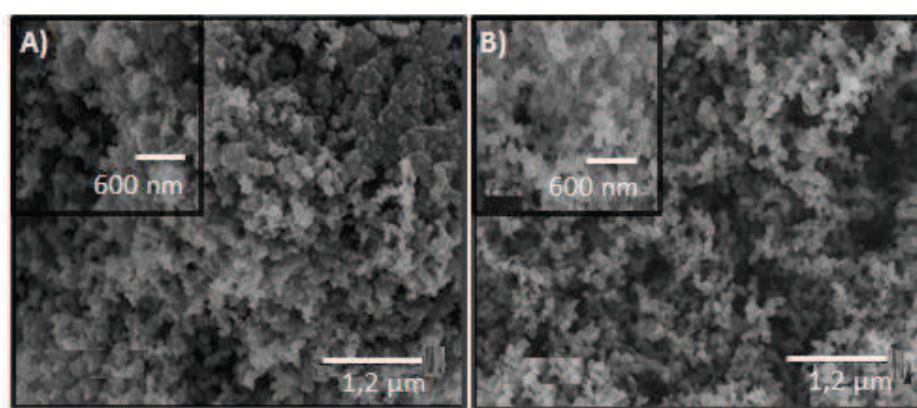
Le graphite a été utilisé pour la fabrication d'électrodes enzymatiques pour réaliser des biopiles. A titre exemple l'équipe de Cosnier [51] a préparé des bioélectrodes sous forme de pastilles obtenues en mélangeant le catalyseur biologique avec du graphite. Dans ce travail, nous avons utilisé comme poudre graphite du carbone KS6 en provenance de l'entreprise TIMCAL. L'image obtenue par microscopie électronique à balayage (MEB) du KS6 (figure 8) montre une structure en feuillets de la poudre de graphite, avec des tailles de particules comprises entre 3-4  $\mu\text{m}$ .



**Figure 8 :** Image MEB de la poudre de graphite KS6

## • Le carbone amorphe (Carbone Vulcan<sup>®</sup> et Super P<sup>®</sup>)

Le noir de carbone, est une forme amorphe de carbone Vulcan<sup>®</sup> constitué de nanoparticules sphériques qui est aussi largement utilisé dans le domaine des biopiles. Il provient de l'entreprise CABOT. Il donne à l'électrode une surface spécifique plus importante qui peut être exploitée pour l'adsorption des enzymes [33]. Le Super P<sup>®</sup> est aussi du noir de carbone mais il possède des caractéristiques physiques différentes. Il provient de l'entreprise TIMCAL. Les images MEB de ces poudres de carbone présentent des particules sous formes d'agrégats de tailles similaires, qui semblent plus compacts dans le cas du carbone Vulcan<sup>®</sup> (figure 9).



**Figure 9 :** Images MEB des poudres de carbone amorphe (A) C Vulcan<sup>®</sup> et (B) Super P<sup>®</sup>

### I-1-7-1-a Caractéristiques physiques

Les caractéristiques physiques des poudres KS6, Vulcan<sup>®</sup> et Super P<sup>®</sup> sont résumées dans le tableau 1.

**Tableau 1 :** Caractéristiques physiques des poudres de carbone : KS6, Vulcan<sup>®</sup> et Super P<sup>®</sup>

Poudres de Carbone	Tailles des particules (μm)*	Surface spécifique (m <sup>2</sup> /g)	Conductivité électrique (S/m)
KS6	6	18	30900
Super P <sup>®</sup>	0,04	60	930
Carbone Vulcan <sup>®</sup>	0,03-0,06	200	500

\*Données fournisseur

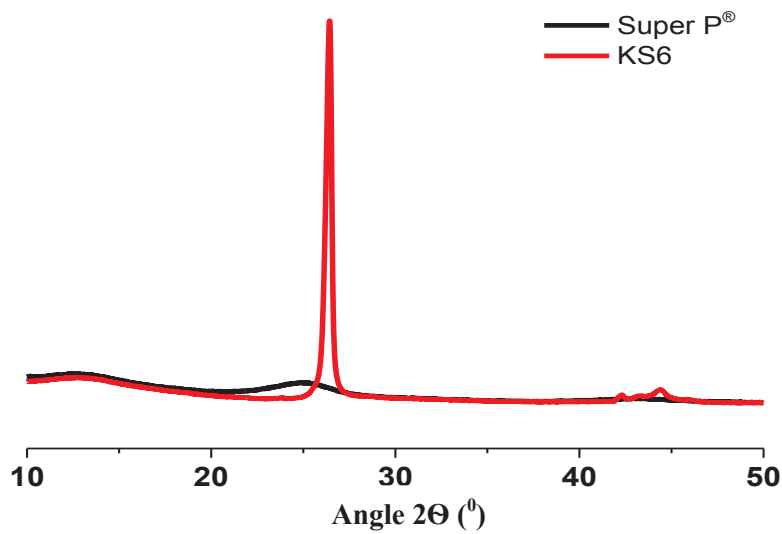
Le Super P<sup>®</sup> et le Vulcan<sup>®</sup> présentent des tailles de particules plus petites que le KS6, ce qui est en accord avec les tailles observées au microscope électronique à balayage. Cependant, les poudres de carbone amorphe (Super P<sup>®</sup> et Vulcan<sup>®</sup>) présentent des surfaces spécifiques de 3 à 20 fois plus élevées que la poudre de carbone graphitique. Ces valeurs ont été déterminées en appliquant la méthode BET (Brunauer, Emmett et Teller).

Nous avons utilisé la méthode des 4 pointes pour mesurer la conductivité électrique des poudres de carbone (voir chapitre Matériels et Méthodes) qui ont été mises sous forme de pastilles par pressage à 6 tonnes. Sachant que cette méthode est généralement utilisée pour analyser des matériaux sous forme de couches minces, nous avons utilisé cette méthode pour obtenir une indication approximative de la conductivité de nos matériaux. D'après les résultats rassemblés dans le tableau 1, la poudre de carbone graphite a une conductivité 30 fois supérieure à celle des poudres amorphes. Cette différence est expliquée par la structure amorphe du Super P<sup>®</sup> et du Vulcan<sup>®</sup> qui conduit à des matériaux moins conducteurs, alors que la structure en feuillets du carbone graphite (observé au MEB) favorise la conduction électronique.

En conclusion, le carbone graphite (KS6) est le plus conducteur alors que les carbones amorphes (Super P<sup>®</sup> et carbone Vulcan<sup>®</sup>) possèdent une surface spécifique plus importante.

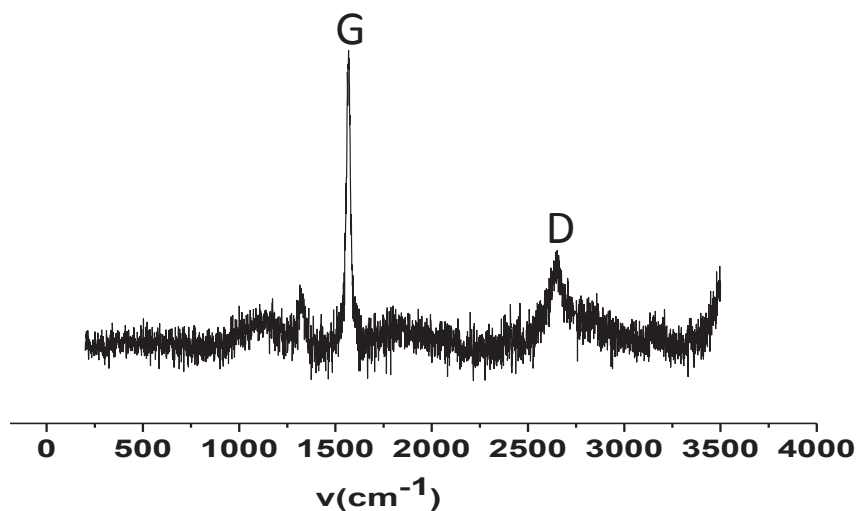
### **I-1-7-1-b Caractéristiques structurales**

Le KS6 et le Super P<sup>®</sup> ont été analysés par diffraction des rayons X (DRX) et par spectroscopie Raman. Sur la figure 10, le diffractogramme du KS6 donne un pic centré à  $2\theta = 26^\circ$  caractéristique de la structure cristalline de cette poudre qui est en accord avec sa structure graphitique [52]. En revanche, le Super P<sup>®</sup> ne présente aucun pic, mais un signal écrasé en accord avec le caractère amorphe de ce carbone. Le même résultat a été observé pour le carbone vulcan<sup>®</sup>.



**Figure 10:** *Diffractogrammes caractéristiques des poudres KS6 et Super P®.*

D'après le spectre Raman (figure 11), le KS6 est caractérisé par 2 bandes, une située à  $1560\text{ cm}^{-1}$  (noté G) caractéristique d'un carbone désordonné et une bande à  $1315\text{ cm}^{-1}$  (noté D) caractéristique du graphite [53]. Le rapport d'intensité ( $I_D/I_G$ ) entre ces deux pics indique la forme prépondérante du carbone qui est en faveur de la forme graphitique dans le cas du KS6. L'analyse de la poudre de carbone Super P® par cette technique n'a pas donné de pic identifiable.



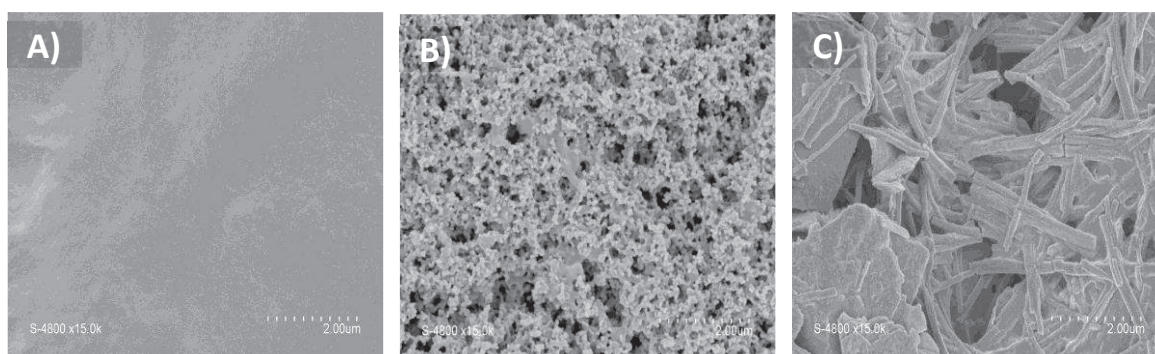
**Figure 11:** *spectre Raman caractéristique de la poudre de carbone KS6*

### I-1-7-2 Influence de la poudre de carbone sur la réponse électrochimique des bioélectrodes

Les différentes poudres de carbone ont été utilisées pour fabriquer des biocathodes à base de PAA/Laccase/ABTS/Nafion<sup>®</sup>, et leur influence sur la performance électrochimique de la biocathode vis-à-vis de la réduction de l'O<sub>2</sub> a été testée.

La figure 12 montre des différentes courbes de polarisation des biocathodes. La biocathode préparée en présence de KS6 délivre des densités de courant de 250  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  alors qu'avec les poudres de carbone amorphe (carbone Vulcan<sup>®</sup> et Super P<sup>®</sup>) les densités de courant sont deux fois supérieures (500  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Cette différence de performance peut s'expliquer par la plus grande surface spécifique (surface d'échanges électroniques) des poudres de carbone amorphe par rapport au KS6 qui conduit à l'immobilisation d'une plus grande quantité d'enzymes. De plus, la structure poreuse des poudres amorphes améliore la diffusion de l'oxygène dans le film. La réduction de O<sub>2</sub> débute à 0,62V/ECS quelque soit la nature de la poudre de carbone, amorphe ou graphite, avec une surtension de 50 mV. En conclusion, on peut dire que la surface spécifique des poudres de carbone est le paramètre le plus significatif (par rapport à la conductivité électrique) pour améliorer les performances électrochimiques des biocathodes.

Cette hypothèse a été corroborée en partie par la structure des bioélectrodes observées par MEB dans la figure 12. Les bioélectrodes préparées en absence de nanoparticules présentent une surface homogène sans aucune porosité. Cependant, la présence des nanoparticules de carbone crée un film poreux sur la surface de l'électrode d'autant plus grand en présence de la Super P<sup>®</sup>.

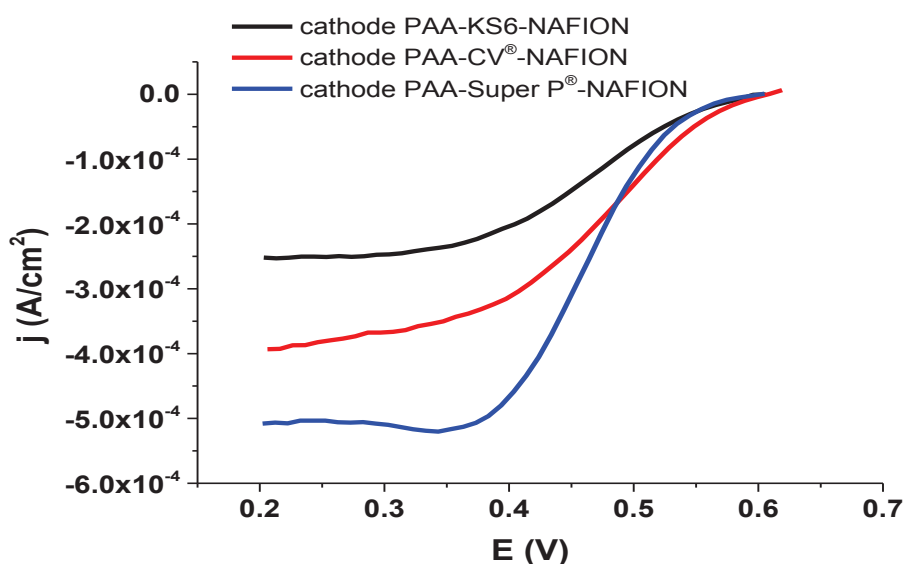


**Figure 12:** Images MEB de bioélectrodes préparées en absence de nanomatériaux de carbone (A), en présence de carbone Super P<sup>®</sup> (B) et de carbone KS6 (C).



La comparaison entre les deux poudres de carbone amorphe (carbone Vulcan<sup>®</sup> et Super P<sup>®</sup>) sur la réponse électrochimique des biocathodes, montre qu'en présence de Super P<sup>®</sup> la densité de courant est supérieure à celle obtenue en présence de carbone Vulcan<sup>®</sup>, malgré sa surface spécifique élevée. Ceci peut s'expliquer par la conductivité de la poudre Super P<sup>®</sup> qui est plus élevée (tableau 1).

Pour résumer, la biocathode la plus performante délivre des densités de courant de 500  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  en présence de Super P<sup>®</sup>, ce qui est intéressant pour une utilisation en biopile. Dans la suite, nous avons évalué la stabilité de la biocathode qui est un critère important pour le fonctionnement d'une biopile.



**Figure 13 :** Courbes de polarisation de biocathodes préparées avec différentes poudres de carbone (C Vulcan<sup>®</sup>, KS6, Super P<sup>®</sup>), testées dans une solution tampon phosphate (0.1M) avec barbotage d'O<sub>2</sub>, pH 5,  $\nu = 3.33 \text{ mV/s}$

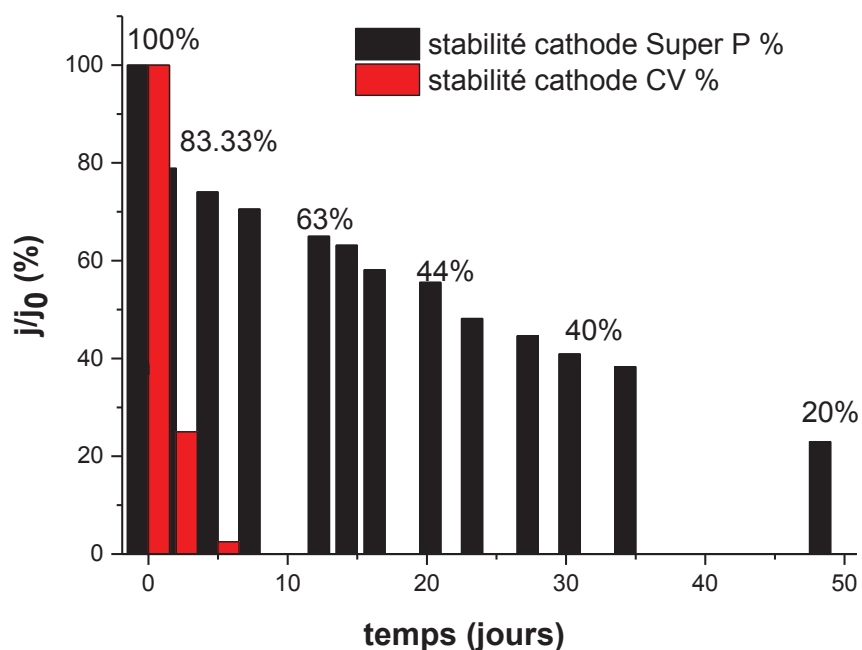
### I-1-8-Stabilité des biocathodes en fonction du temps

Nous avons testé la stabilité des biocathodes les plus performantes préparées à partir des poudres de carbone (Super P<sup>®</sup> et C Vulcan<sup>®</sup>) sur électrodes Au modifiées au préalable avec une couche de polymère PAA. Nous avons étudié l'évolution des courbes de polarisation au cours de balayages successifs et sur plusieurs jours dans les mêmes conditions en conservant après chaque analyse les électrodes au réfrigérateur (5 °C) sous atmosphère



humide. Les résultats ont montré qu'après le 4<sup>ème</sup> balayage, les biocathodes conservent 90% de leur densité de courant initiale. Cependant, l'ajout d'ABTS en solution a permis de récupérer 95% des performances initiale, ce qui démontre que la désorption de cette molécule est en partie responsable de la perte de densité de courant.

D'après l'histogramme de la figure 14 (colonnes noires), la biocathode fabriquée à base de Super P<sup>®</sup> a conservé 83% de sa densité de courant après 2 jours, puis 45% après 25 jours et puis 20 % au bout de 50 jours. Cependant, la biocathode fabriquée à base de carbone Vulcan<sup>®</sup> (colonnes rouges) n'a conservé que 25% de sa densité de courant après 2 jours, puis 2,5% après seulement 5 jours. Cette perte très élevée de performance avec le carbone Vulcan<sup>®</sup> est probablement due à la perte d'activité de l'enzyme ou à une forte désorption des espèces redox à travers la matrice puisque l'ajout ultérieur d'enzyme et de médiateur en solution a permis d'augmenter de nouveau la densité de courant délivrée. Ce comportement est en accord avec la diminution progressive du potentiel de départ ( $E_{i=0}$ ) pour les deux bioélectrodes, caractéristique de la perte de médiateur dans le mélange. La stabilité différente de ces biocathodes peut être expliquée par la structure différente des 2 poudres de carbone. En effet, le carbone Vulcan<sup>®</sup> a une granulométrie similaire à celle du Super P<sup>®</sup>, mais il présente une structure nanométrique conduisant à une surface spécifique plus élevée (x4), qui entraîne une perte d'espèces plus importante à cause des propriétés d'adsorption moins bonnes que le Super P<sup>®</sup>.



**Figure 14:** Histogramme présentant la stabilité des deux biocathodes

## Chapitre I

---

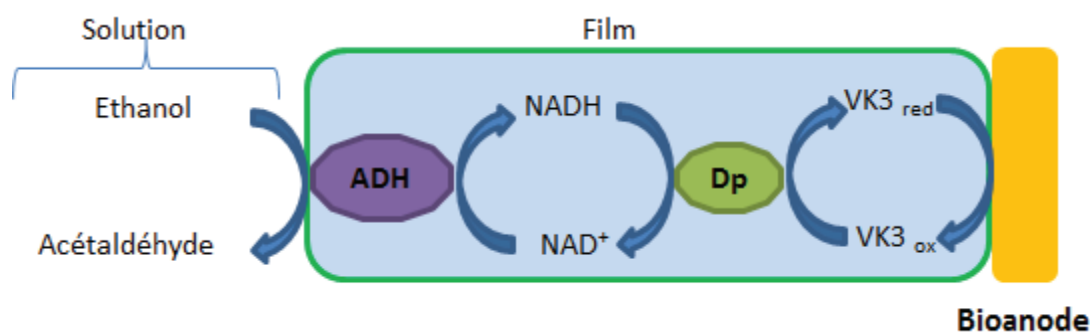
*Laccase/ABTS/Nafion/Au à base de Super P<sup>®</sup> (colonnes noires) et Carbone Vulcan<sup>®</sup> (colonne rouges) en fonction du temps.*

Pour résumé, nous avons fabriqué une biocathode Laccase/ABTS/Nafion/Au à base de poudre de carbone délivrant une densité de courant initiale de  $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  et qui conserve 40% de ces performances au bout de 4 semaines. Notre résultat est comparable à ceux de la littérature. A titre d'exemple, on peut citer les travaux de Merle et al. [54] qui ont construit une biocathode délivrant une densité de courant de  $50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  tout en gardant 50 % de ces performances initiales après 150 jours, et ceux de Servat et al. [45] qui ont construit une biocathode délivrant  $280 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  avec une diminution de 50% d'activité après 60 jours d'utilisation non continue.

## I-2- Bioanode pour l'oxydation de l'éthanol sur électrode Au

### I-2-1-Principe de fonctionnement

La bioanode fonctionne à base du carburant éthanol en solution, qui est oxydé en acétaldéhyde en présence d'ADH et son cofacteur  $\text{NAD}^+$ . La régénération du cofacteur est réalisée à l'aide d'une protéine redox supplémentaire, la diaphorase, qui fonctionne de façon efficace en présence du médiateur VK3. Pour construire la bioanode, l'ensemble des espèces redox ont été encapsulée à la surface de l'électrode, sauf l'éthanol qui est présent en solution.

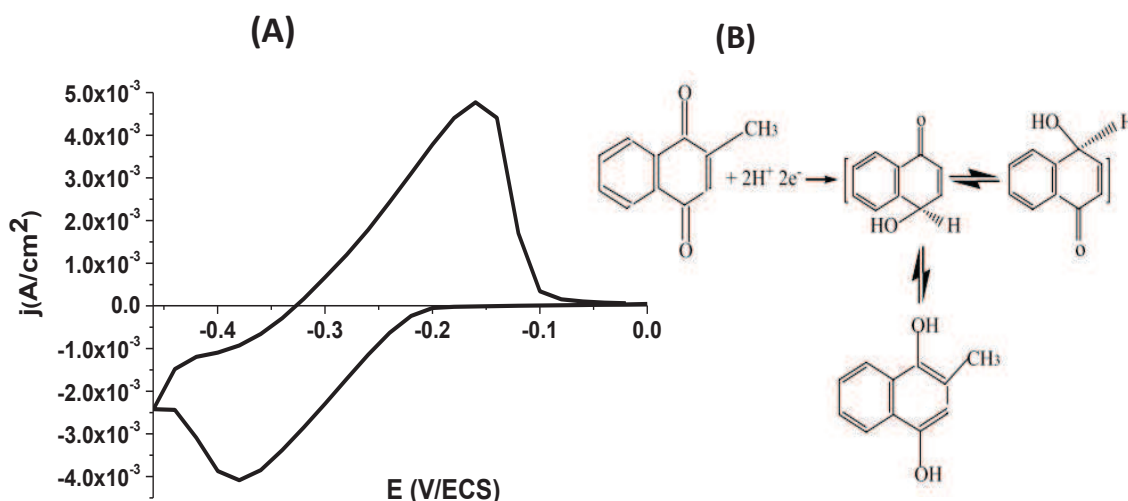


*Figure 15 : schéma des réactions redox à la bioanode*

### I-2-2-Oxydoréduction du médiateur VK3 sur Au

Comme indiqué dans le schéma réactionnel (figure 15), la réaction observée à l'électrode est l'oxydation de la VK3. La VK3 n'étant pas soluble dans l'eau, pour caractériser son comportement électrochimique, cette espèce a été immobilisée dans une matrice de PEI en présence de Super P<sup>®</sup>. L'oxydation de VK3 à l'électrode produit à la fois des électrons, qui sont transmis à la biocathode par le circuit électrique, et des protons qui diffusent dans la solution jusqu'à la biocathode. Les formes oxydée (ménadione) et réduite (ménadiol) de la VK3 sont présentées sur la figure 16-B. L'oxydation de la VK3 produit

2 électrons et 2 protons par cycle.



**Figure 16 :** (A) Voltammétrie Cyclique caractéristique de la VK3 immobilisée sur une électrode Au / poudre de carbone / PEI, testée dans une solution tampon phosphate pH 7.  $\nu = 20\text{mV/s}$ . (B) formes réduite et oxydée de la VK3 [55]

Sur la courbe de voltammétrie cyclique (figure 16-A) on observe un pic de réduction vers -380 mV attribué à la réduction de VK3<sub>Ox</sub> en VK3<sub>Red</sub> et un pic d'oxydation vers -160 mV attribué à l'oxydation de VK3<sub>Red</sub> en VK3<sub>Ox</sub>. Le potentiel de demi-vague se situe à  $E_{1/2} = -270\text{ mV}$ , proche de la valeur du potentiel de la VK3 donné par la littérature (-290 mV/ ECS) [56].

## I-2-3-Construction de la bioanode

L'optimisation des quantités de chaque espèce immobilisées a été réalisée lors de travaux antérieurs au laboratoire auxquels j'ai participé et qui ont été présentés dans le cadre d'une thèse récemment soutenue [44]. Les résultats ont montré que le dépôt suivant donne les meilleures densités de courant pour la bioanode vis-à-vis de l'oxydation de l'éthanol à 28 °C:

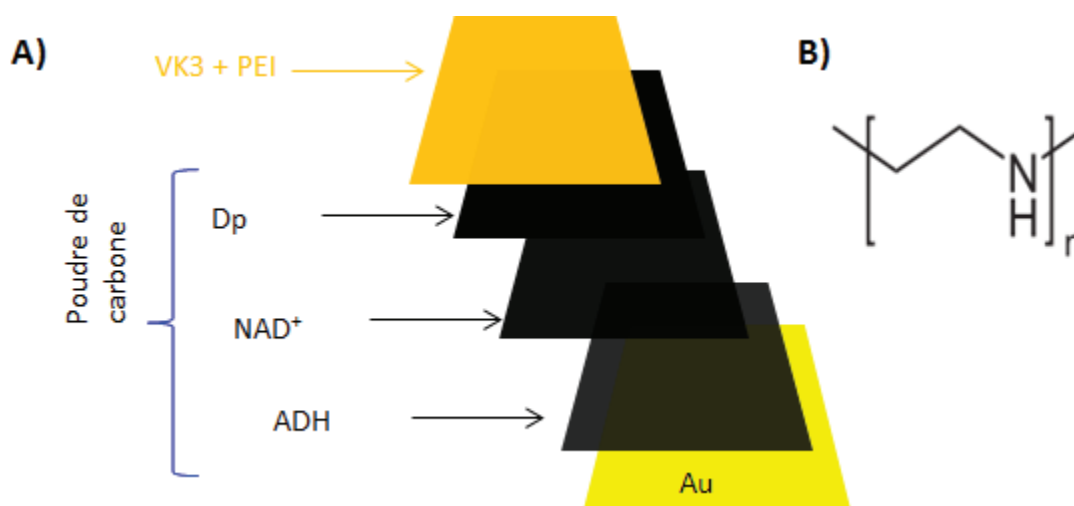
- 30 mg/mL (soit 2,5 mg/cm<sup>2</sup>) ADH + 15 mg/mL (soit 1,25 mg/cm<sup>2</sup>) carbone Vulcan<sup>®</sup>
- 30 mg/mL (soit 2,5 mg/cm<sup>2</sup>) NAD<sup>+</sup> + 15 mg/mL (soit 1,25 mg/cm<sup>2</sup>) carbone Vulcan<sup>®</sup>
- 20 mg/mL (soit 1,7 mg/cm<sup>2</sup>) Diaphorase + 15 mg/mL (soit 1,25 mg/cm<sup>2</sup>) carbone

Vulcan<sup>®</sup>

- 60 mg/mL (soit 3 mg/cm<sup>2</sup>) VK3.
- 5% vol. (soit 2,5 µL/cm<sup>2</sup>) PEI.

Les conditions expérimentales fixées pour la synthèse du dépôt à la surface de Au sont :

- Dépôt couche par couche des espèces (ADH, NAD<sup>+</sup> et diaphorase) préparées dans une solution tampon à pH 7 et mélangée avec le C Vulcan<sup>®</sup>. Après séchage à l'air, dépôt de VK3 (insoluble dans l'eau) dissoute dans l'acétone et mélangée avec le PEI, comme présenté sur la figure 17-A. Cette méthode de dépôt a été choisie car elle a donné de meilleures performances par rapport au dépôt obtenu en mélangeant toutes les espèces. Cette stratégie d'immobilisation a été inspirée des travaux de Sakai et ses collaborateurs [57] qui ont construit une bioanode pour l'oxydation de l'éthanol à partir de ADH.
- Le polymère PEI (formule chimique figure 17-B) a été retenu pour encapsuler les espèces à la surface de l'électrode car en présence de Nafion<sup>®</sup>, les performances de la bioanode sont diminuées de 50%. Ce résultat a été expliqué par la présence d'interactions électrostatiques entre le PEI (chargé positivement) et les enzymes rédox (chargées négativement) à pH > 7.

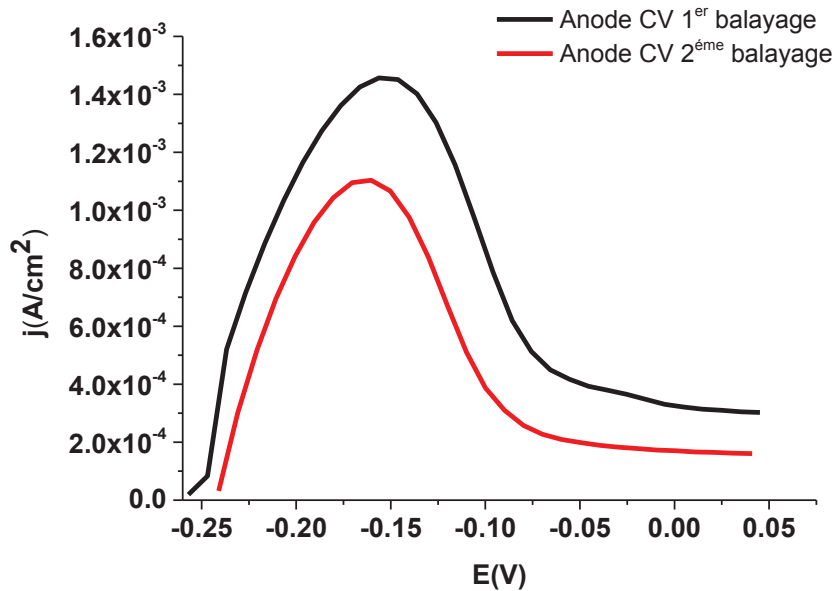


**Figure 17 :** (A) Schéma de dépôt couche par couche des espèces sur une électrode Au.  
(B) Formule développée du PEI

Dans ce travail, nous avons étudié l'influence de nouveaux paramètres comme la valeur du pH et la nature de la poudre de carbone sur les performances de la bioanode.

### I-2-4- Etude de la réponse électrochimique de la bioanode

Les performances des bioanodes, vis-à-vis de l'oxydation de l'éthanol, ont été évaluées à partir des courbes de polarisation obtenues en mesurant le courant délivré lors du balayage du potentiel de  $E_{i=0}$  (potentiel d'équilibre en absence de courant) jusqu'à 0 V/ECS à l'aide d'un potentiostat. Les courbes de polarisation, correspondant aux électrodes préparées précédemment, ont été obtenues à pH 7 en présence d'éthanol (figure 18). Ces bioélectrodes ont été réalisées en utilisant la poudre de carbone Vulcan<sup>®</sup>.



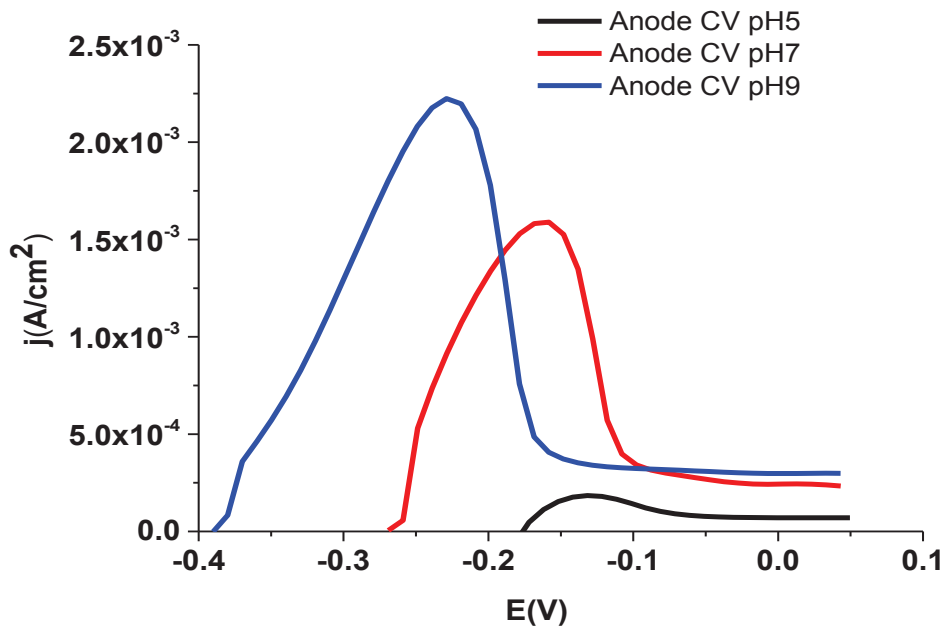
**Figure 18 :** Courbes de polarisation d'une bioanode obtenues dans une solution tampon phosphate en présence de 70 mM d'éthanol (pH 7, 0.1M, 28°C).  
 $v = 3.33 \text{ mV/s}$

Les courbes de polarisation sont caractérisées par un pic d'oxydation vers -160 mV/ECS qui correspond à l'oxydation du VK3<sub>Red</sub> déposé sur l'électrode avec une densité de courant de 1,4 mA/cm<sup>2</sup>, et par un palier d'oxydation observé à partir de -70 mV/ECS qui correspond à l'oxydation catalytique de l'éthanol en acétaldéhyde avec un courant de 0,4 mA/cm<sup>2</sup>.

Les courbes de polarisation présentent 2 zones : (1) une forte croissance de densité de courant et de potentiel liée à l'oxydation de la VK3 qui donne une cinétique de transfert de charge rapide. Le pic observé vers -160 mV correspond à la cinétique maximale de cette oxydation. (2) une densité de courant stable, qui correspond à la limitation du système par la diffusion des espèces redox dans le film vers l'électrode. La présence du pic d'oxydation de la VK3 ne disparaît pas au cours des balayages successifs, ce qui peut s'expliquer par le confinement de l'excès de médiateur à l'électrode à cause de son insolubilité dans l'eau. Nous observons un potentiel à courant nul de -260 mV/ECS puisque la VK3 est majoritairement sous sa forme réduite en présence de la diaphorase<sub>Red</sub>.

### I-2-5- Effet du pH

Le pH du milieu joue un rôle très important dans le fonctionnement des réactions enzymatiques [58]. En effet, chaque enzyme a un pH optimal de fonctionnement. A titre d'exemple, dans le cas de notre bioanode, la diaphorase atteint son activité maximale à pH = 8,5 [59] alors que celui de l'ADH est compris entre 8,6 et 9 [60]. Nous avons tracé les courbes de polarisation des bioanodes à différents pH: 5, 7 et 9 (figure 19).



**Figure 19 :** Courbes de polarisation des bioanodes avec PEI, testées dans une solution tampon phosphate (0.1M) en présence de 70 mM d'éthanol à différents pH : 5, 7 et 9. ( $T=28C^0$ )  $v= 3.33 \text{ mV/s}$

Les courbes obtenues (figure 19) montrent qu'à pH 5 le potentiel à courant nul (en valeur absolue) est de -180 mV avec une densité de courant ne dépassant pas  $230 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . A pH 7, ce potentiel est de -270 mV, avec une densité de courant délivrée par la bioanode (de  $1,4 \text{ mA}/\text{cm}^2$ ), soit 6 fois supérieure qu'à pH 5. A pH 9, le potentiel à courant est au voisinage de -390 mV et la bioanode délivre une densité de courant de  $2,4 \text{ mA}/\text{cm}^2$ . Ces résultats montrent clairement que le pH optimal pour le fonctionnement de la bioanode est 9. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature. A titre d'exemple, d'après les travaux de Li et ses collaborateurs [55], une augmentation de la valeur du pH engendre un décalage des potentiels vers les valeurs négatives du signal redox de la VK3, avec une diminution des intensités de courant anodiques et cathodiques.

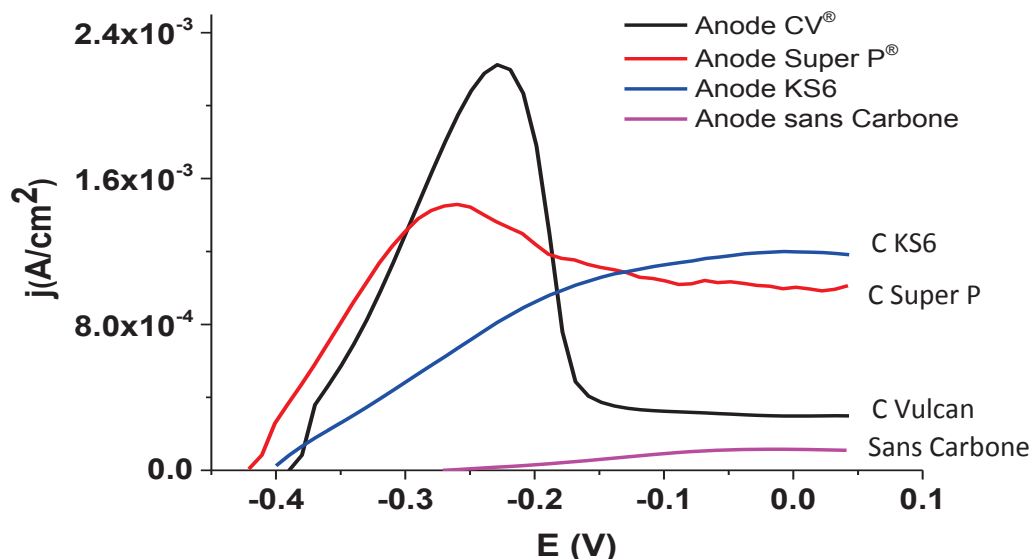
## I-2-6- Effet de la nature de la poudre de carbone

Dans le but de d'améliorer les performances de la bioanode, différentes poudres de carbone (CV<sup>®</sup>, Super P<sup>®</sup> et KS6) ont été étudiées.

La figure 20 montre les différentes courbes de polarisation d'une électrode Au modifiée successivement par trois couches d'enzymes: ADH, NAD<sup>+</sup> et Dp mélangées avec



les poudres de carbone et recouvertes d'une couche VK3/PEI. Les poudres de carbone utilisées sont le carbone amorphe (Vulcan<sup>®</sup> et Super P<sup>®</sup>) et le graphite (KS6). Les résultats les plus significatifs sont rassemblés dans le tableau 2. Afin de voir l'influence de la poudre de carbone sur le comportement électrochimique de la bioanode, nous avons préparé une bioanode sans poudre de carbone.



**Figure 20:** Courbes de polarisation des bioanodes (PEI) avec différentes poudres de carbones (CV<sup>®</sup>, Super P<sup>®</sup> et KS6), obtenues dans une solution tampon phosphate (0.1M) en présence de 70 mM d'éthanol,  $T=28C^0$ ,  $pH=9$ .  $v = 3.33 \text{ mV/s}$

**Tableau 2 :** densités de courant délivrées par des bioanodes préparées avec différentes poudre de carbone

Nature de la poudre de carbone	Densité de courant du palier (mA/cm <sup>2</sup> )	Densité de courant du pic de VK3 (mA/cm <sup>2</sup> )	Surface spécifique (m <sup>2</sup> /g)	Conductivité électrique (S/m)
Sans poudre de carbone	0,03	—	—	—
KS6	1,25	—	18	30900
Super P <sup>®</sup>	1	1,5	60	930
Carbone Vulcan <sup>®</sup>	0,25	2,2	200	500

Les performances des bioanodes ont été comparées par rapport aux densités de courant observées aux paliers (après -150 mV/ECS). Nous constatons une différence de performance entre les électrodes selon la nature de la poudre de carbone amorphe (Vulcan<sup>®</sup> et Super P<sup>®</sup>) ou graphite (KS6).

Le premier résultat observé est que l'ajout de nanoparticules de carbone dans les couches d'enzymes améliore les processus bioélectrocatalytiques. La grande surface spécifique des nanoparticules augmente les quantités d'espèces réactives et ainsi les sites actifs disponibles pour la production d'électrons. Par ailleurs, la conductivité électronique des nanoparticules de carbone peut améliorer le taux de transfert d'électrons aux électrodes.

D'après les courbes de polarisation, le potentiel à courant nul pour l'ensemble des bioanodes est observé vers -0.4V/ECS. Au niveau des paliers de diffusion, la densité de courant la plus élevée a été observée avec le KS6 (1,25 mA/cm<sup>2</sup>), qui possède la plus grande conductivité électrique (30,9 10<sup>3</sup> S/m) (Tableau 2).

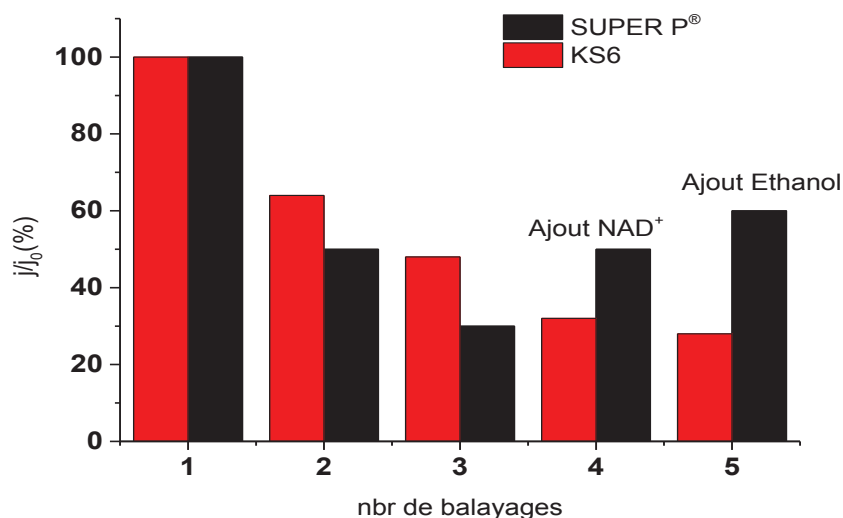
Avec la poudre de carbone amorphe de Super P<sup>®</sup>, la densité de courant au niveau du palier atteint 1 mA/cm<sup>2</sup>, soit une augmentation de 75% par rapport au carbone Vulcan<sup>®</sup> (0,25 mA/cm<sup>2</sup>). Ce qui est due probablement à sa conductivité électrique plus élevée (tableau 2). Par contre le pic d'oxydation de la VK3 est plus faible, voire inexistant, avec Super P<sup>®</sup> et KS6. Ceci est du probablement dû à la diminution de la surface spécifique de la poudre de carbone qui passe de 200 m<sup>2</sup>/g avec carbone Vulcan<sup>®</sup> à 60 m<sup>2</sup>/g pour le Super P<sup>®</sup> (tableau 2).

Nous pouvons dire donc que la grande surface spécifique de la poudre de carbone amorphe (Vulcan<sup>®</sup> et Super P<sup>®</sup>) influence le contact entre les espèces immobilisées, favorisant les transferts électroniques, et qui résulte à une augmentation de la densité de courant du pic d'oxydation de VK3 (-220 mV). En revanche, la poudre de graphite (KS6), ayant une conductivité électrique élevée, peut favoriser l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde.

Nous avons donc retenu les poudres de carbones Super P<sup>®</sup> et KS6 pour la construction de la bioanode en raison des meilleures performances électrochimiques observées au niveau du palier de diffusion.

### I-2-7- Stabilité des bioanodes

Nous avons testé la stabilité des deux bioanodes (KS6 et Super P<sup>®</sup>) au cours des balayages ou au cours du temps après stockage à 5°C sous atmosphère humide. Pour évaluer la stabilité des deux bioanodes, nous avons évalué la densité de courant obtenue à -50 mV/ECS pour faciliter les comparaisons.



**Figure 21 :** Histogramme présentant la stabilité des bioanodes à base de Super P® et de KS6 à partir de la densité de courant obtenue au potentiel fixe de -50 mV sur les courbes de polarisation.

Sur l'histogramme présenté figure 21, la densité de courant délivrée par les s deux bioanodes Super P® et KS6 diminue avec le nombre de balayage, l'électrode KS6 présentant une meilleure performance. Cependant, ces électrodes réagissent différemment à l'ajout supplémentaire d'espèces redox en solution.

Pour la bioanode à base de Super P®, la densité de courant augmente à nouveau en présence de NAD<sup>+</sup> et d'éthanol dans la solution. En revanche l'ajout d'enzymes ADH et diaphorase (données non présentés ici), n'a pas d'influence sur la variation de densité de courant. Ce résultat a été attribué à la structure poreuse du Super P® par rapport au KS6, qui permet une meilleure diffusion des espèces à travers le dépôt.

En revanche, après un jour de stockage, la densité de courant et même la valeur du potentiel à courant nul des bioanodes chutent de façon importante (90% de perte d'activité). Cette diminution des performances peut être due à la désorption d'espèces à travers le dépôt. Une autre hypothèse est la production importante locale de protons à la bioanode dont la diffusion difficile à travers le dépôt conduirait à une augmentation locale de l'acidité ce qui inhiberait l'activité catalytique de l'ADH et la diaphorase comme décrit par Sakai et ses collaborateurs [57].

Pour résumé, nous avons fabriqué une bioanode ADH/NAD<sup>+</sup>/Dp/VK3/PEI/Au performante à base de poudre de carbone KS6 par dépôts couche par couche de chaque espèce. La bioanode fonctionne à pH 9 et délivre une densité de courant initiale de 1,25 mA/cm<sup>2</sup> correspondant à l'oxydation de l'éthanol, qui diminue au cours des balayages successifs et plus particulièrement après un jour de stockage.

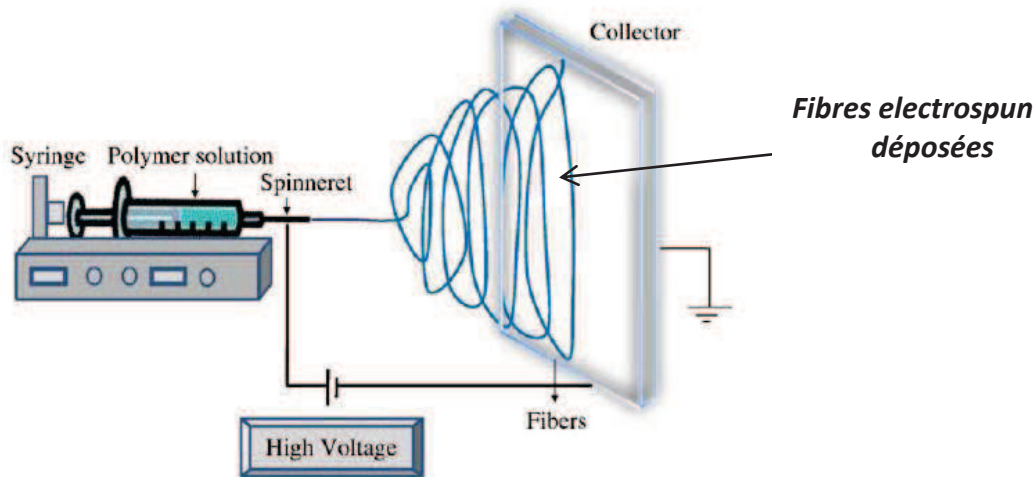
### **Partie II- Bioélectrodes enzymatiques à base Au/NFsPAN/Silicium**

Pour améliorer les performances électrochimiques des bioélectrodes, nous avons synthétisé un nouveau support d'électrode à base de nanofibres de polyacrylonitrile dans le but d'augmenter la surface spécifique de l'électrode. Ce type de matériaux a été appliqué pour la première fois à la réalisation de bioélectrodes en vue de constituer une biopile à éthanol/O<sub>2</sub>.

#### **II-1-Généralité et description du procédé d'électrospinning**

Les débuts de l'électrospinning en tant que technique de filage se situent au début des années 1930. C'est en 1934 que Formhals [61] écrit le premier brevet relatif au principe de fonctionnement de la technique s'appuyant sur l'utilisation de charges électriques pour produire des filaments synthétiques. La description du mode d'obtention de ces filaments a été reportée par filage de l'acétate de cellulose, ou de la viscose dans l'acétone.

Aujourd'hui, l'électrospinning s'inscrit comme une technique incontournable dans le domaine du textile mais aussi dans le domaine des matériaux innovants. L'électrospinning a été reconnu par la communauté scientifique comme une technique complètement opérationnelle en utilisant des forces électrostatiques pour le filage de nanofibres de polymère avec des diamètres allant de quelques microns à une centaine de nanomètres. Cette technique est aujourd'hui assez largement répandue de par le monde universitaire et bon nombre de laboratoires possèdent leur propre dispositif. La figure 22 représente le schéma de principe du dispositif de filage par voie électrostatique le plus répandu [10-11].



**Figure 22 : Schéma du dispositif d'électrospinning [62]**

L'électrospinning est un procédé de filage assez simple d'un point de vue technique et facilement modulable en fonction des solutions que l'on veut transformer. L'appareillage se compose d'une alimentation haute tension de polarité négative ou positive, d'une seringue, d'un pousse-seringue, de tubulures, et d'une aiguille métallique. Le collecteur métallique peut être de différentes formes, plat, circulaire, tubulaire. Il peut être également statique ou rotatif. Le polymère à filer, sous forme de solution, est conduit sous pression à travers une buse (ou aiguille) d'un diamètre de 400 à 700 micromètres. Une tension élevée, de l'ordre de plusieurs milliers de Volts est appliquée entre la buse et une contre-électrode (collecteur). Une fois le fluide en mouvement, une goutte de polymère perle à la pointe de la buse. Cette goutte est déformée par le champ électrostatique et forme un cône nommé cône de Taylor [62]. Le fluide est soumis principalement à deux forces : la force exercée par le champ électrostatique et la force de résistance à la déformation liée à la tension de surface du fluide. Lorsque le champ électrique est assez élevé pour surmonter la tension superficielle du fluide, ce dernier s'étire pour former un très mince filament qui est fortement étiré [63]. Les filaments se déposent sur le substrat à une vitesse atteignant jusqu'à 100 mètres par seconde.

## II-2- préparation du matériau NFsPAN/Si

Des nanofibres de polyacrylonitrile ont été préparées par la technique d'électrospinning sur un support en silicium pour obtenir un matériau tridimensionnel. Les nanofibres n'étant pas conductrices, un film mince sous forme de nanoparticules de Au a été déposé par pulvérisation cathodique (PVD). Nous avons optimisé la conductivité du matériau en variant soit l'épaisseur du film de nanofibres, soit l'épaisseur du dépôt de Au.

Dans un premier temps, l'épaisseur du dépôt de Au a été fixée à 142 nm. L'épaisseur du film de PAN a été modifiée en faisant varier le temps d'électrospinning (30, 60, 120, 240 et 600 s). Le tableau 3 présente la conductivité des matériaux obtenue par la méthode de deux points de contact connectés à la surface de l'échantillon séparés par une distance fixe. Un courant constant a été appliqué entre ces deux points en utilisant l'appareil EG&G (Princeton Applied Research), puis le potentiel résultant a été mesuré. La résistance électrique a été calculée à partir de la courbe I-E, puis la conductrice  $G=1/R$ . Quand le temps d'électrospinning augmente entre 30 et 240 s, l'épaisseur de PAN augmente et la conductance électrique du matériau diminue légèrement. Une diminution importante est observée pour un temps d'électrospinning de 600 s, qui pourrait être attribuée à la faible diffusion d'Au déposé ultérieurement par pulvérisation à travers le dépôt trop épais. En effet, plus l'épaisseur des fibres est importante et moins Au peut recouvrir par diffusion l'ensemble de toutes les fibres. Au vu des résultats, nous avons retenu le temps d'électrospinning optimal de 240 s pour la suite du travail.

**Tableau 3 :** Conductance électrique de Au/NFsPAN/Si en fonction de temps d'électrospinning du PAN (épaisseur de la couche Au : 142 nm)

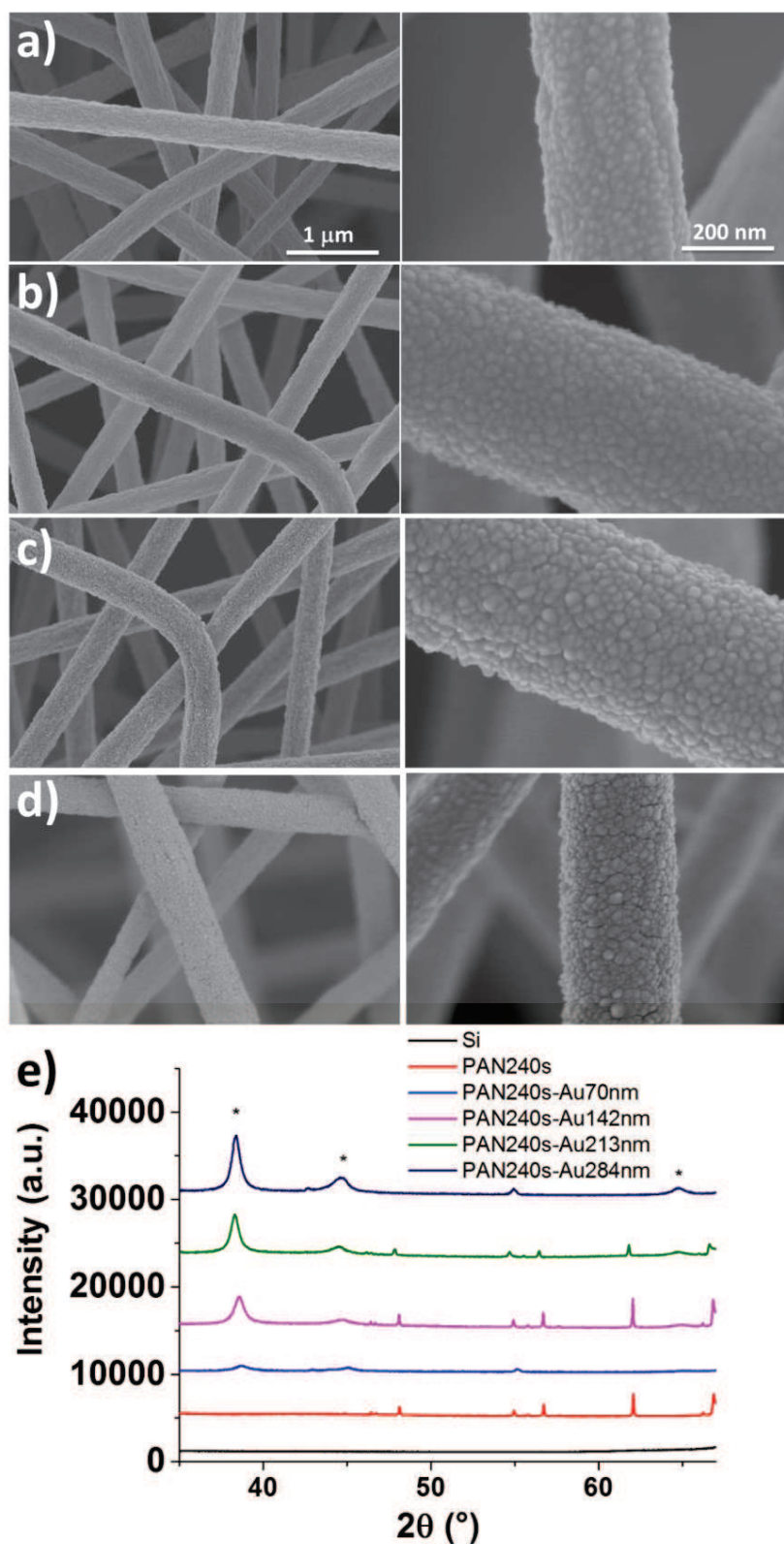
Temps d'électrospinning de PAN (s)	G (ohm <sup>-1</sup> )
30	0,08
60	0,07
120	0,03
240	0,015
600	$4,5 \cdot 10^{-4}$

Nous avons ensuite étudié l'influence de l'épaisseur du dépôt Au obtenu par pulvérisation cathodique sur un support de silicium modifié par des nanofibres de polyacrylonitrile obtenues avec un temps d'électrospinning à 240 s. Nous avons varié l'épaisseur Au de 70, 142, 213 à 284 nm, en appliquant respectivement un temps de 300, 600, 900 et 1200 secondes de pulvérisation, d'après la détermination du taux de croissance moyen

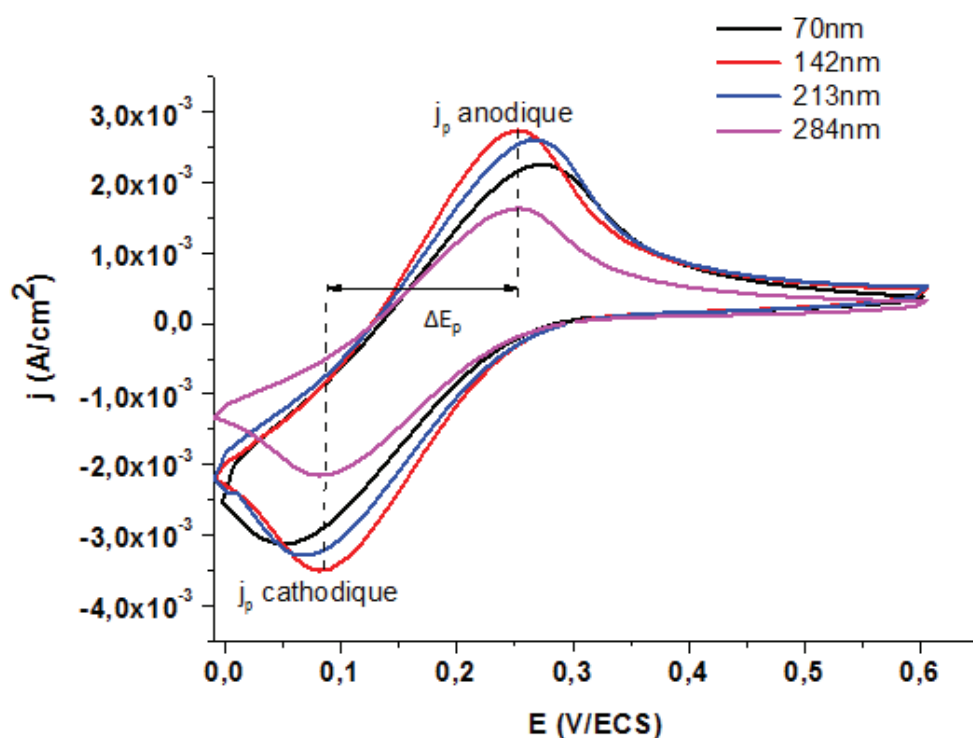
de 14,2 nm/min (tableau 4).

Les diffractogrammes (diffraction des rayons X) des électrodes Au/NFsPAN/Si avec différentes épaisseurs de couche Au sont présentés sur la figure 23. On constate que l'échantillon le plus mince (70 nm d'épaisseur Au) présente des faibles pics de diffraction des rayons X à  $2\theta=38,18$  et  $44,39$ , résultant de la faible dimension des tailles de grain Au ( $<10$  nm). L'augmentation de l'épaisseur de la couche (142 nm) conduit à l'apparition de pics de diffraction plus intenses. Pour des dépôts de 213 et 284 nm, des pics très intenses sont observés. La croissance des couches Au est assistée par la croissance de la taille des grains (Tableau 4), comme montrent les images MEB de la figure (23 a-d).





**Figure 23:** Images MEB avec différents grossissements de nanofibres de Au/PAN obtenues pour  $t = 240$  s d'électrospinning suivi par dépôt d'une couche Au de 70 (a), 142 (b), 214 (c) et 285 nm (d) d'épaisseur. (e) Diffractogrammes de RX obtenus sur les électrodes Au/NFsPAN/Si pour différentes épaisseurs Au.



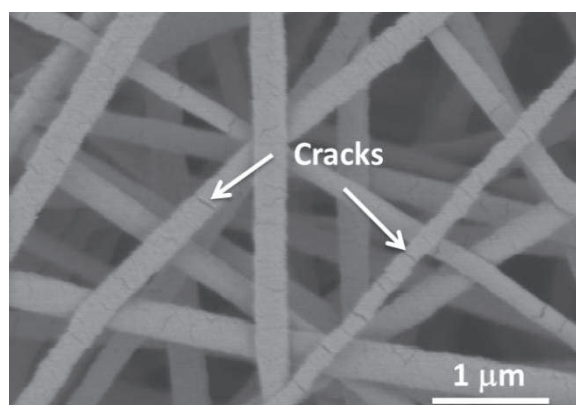
**Figure 24 :** Voltammétrie cyclique d'une solution de  $K_3Fe(CN)_6$  10mM obtenue sur des électrodes Au/NFsPAN/Si avec différente épaisseur Au, en milieu tampon phosphate pH=7,  $v=20mV/s$

**Tableau 4:** Tailles des grains,  $\Delta E$  et  $J_p$  en fonction de l'épaisseur Au déposée par pulvérisation

Temps de pulvérisation Au (s)	Epaisseur Au (nm)	Tailles des grains Au (Å)	$\Delta E$ (mV)	$J_p$ oxydation ( $mA/cm^2$ )
300	70	98,1	220	2,20
600	142	140,89	170	2,75
900	213	147,5	200	2,60
1200	284	156,88	170	1,63

$J_p$  est la densité de courant maximale correspondant au sommet du pic anodique ou cathodique, proportionnelle à la quantité d'espèces oxydées ou réduites à la surface de l'électrode.  $\Delta E_p$  représente la différence de potentiel entre les deux pics anodique et cathodique, plus cette différence est petite plus la cinétique de transfert d'électrons est rapide, ce qui est assimilé à une meilleure conductivité électrique du matériau. La figure 24 présente les pics d'oxydation ( $j > 0$ ) et de réduction ( $j < 0$ ) caractéristique de l'espèce redox  $K_3Fe(CN)_6$  en solution sur les électrodes préparées précédemment (Au/NFsPAN/Si) avec différents épaisseurs Au. A partir des courbes de voltammétrie cyclique, l'évolution de la densité de courant max (J) et de la différence de potentiel ( $\Delta E$ ) a été déterminée (Tableau 4).

L'épaisseur du film Au optimisé a donc été fixée à partir de la valeur de  $\Delta E$  du matériau, déterminée à partir des courbes de voltammétrie cyclique. Les valeurs de  $\Delta E$  (tableau 4) montrent que les matériaux avec des épaisseurs en Au de 142 et 284 nm présentent une meilleure conduction électronique, puisque plus  $\Delta E$  est faible et plus la cinétique du transfert d'électrons est rapide. On constate que la densité de courant anodique augmente avec l'augmentation de l'épaisseur en Au jusqu'à un maximum de 142 nm, puis elle diminue. Toutefois, elle est faible pour le matériau le plus épais (284 nm), ce qui suggère une surface électroactive accessible plus faible, attribuée à la présence de fissures résultant de l'accumulation de Au déposé sur les nanofibres de PAN, comme indiqué sur les images MEB (figure 25). Le film Au d'épaisseur 142 nm a donc été choisi pour préparer les bioélectrodes de la biopile à éthanol/ $O_2$ .



**Figure 25:** Image MEB de nanofibres de Au/PAN obtenues par électrospinning ( $t=240$  s), suivie par pulvérisation d'une couche Au de 285 nm

A partir des résultats précédents, nous avons caractérisé l'électrode de Au/NFsPAN/Si

construite avec les paramètres optimisés (temps d'électrospinning = 240s de PAN et épaisseur d'or = 142 nm) par MEB, EDX et DRX. Les nanofibres sont caractérisées par un diamètre de 200 nm (image MEB figure 26-a) et développent une surface rugueuse avec des diamètres de nanoparticules Au inférieurs à 20 nm.

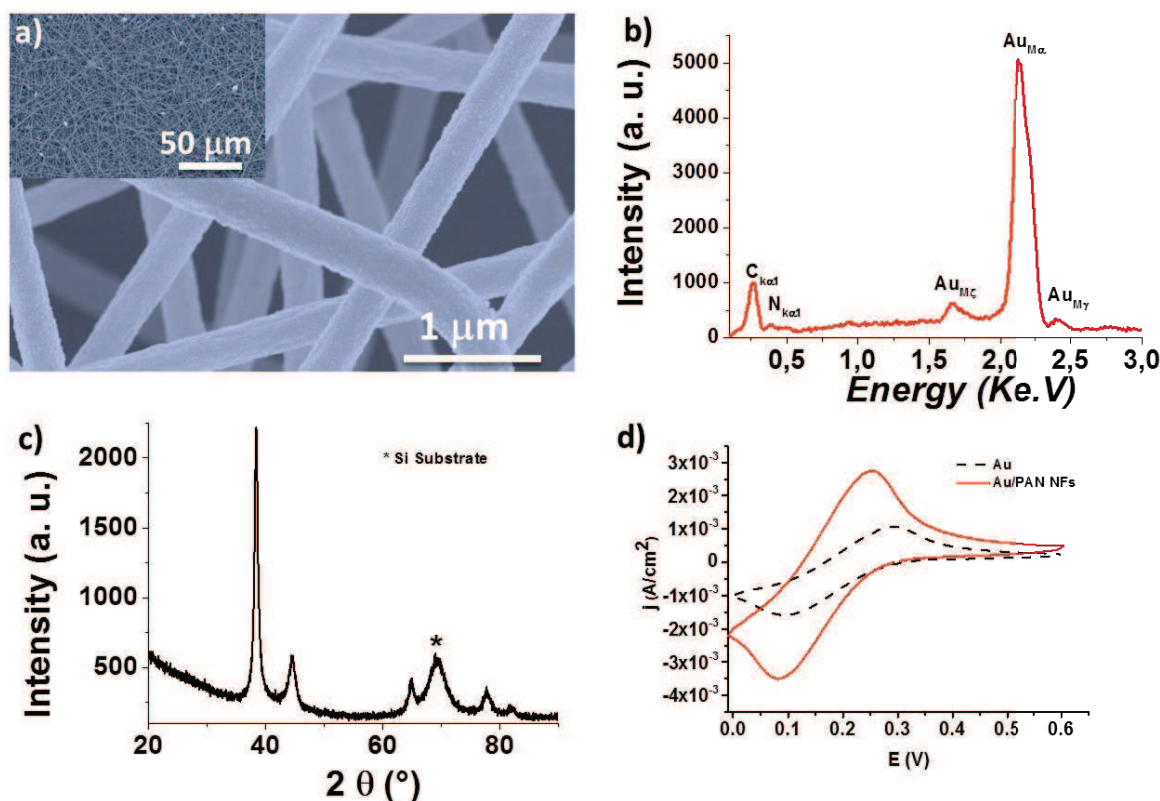
La mesure EDX (figure 26-b) a été effectuée sur l'échantillon en vue d'évaluer la composition chimique. Il est observé la présence Au, C et N. La diffraction DRX (figure 26-c) montre des pics à  $2\theta = 38,18^\circ, 44,39^\circ, 64,6^\circ, 77,6^\circ$  et  $81,7^\circ$  correspondant aux plans (111), (200), (220), (311) et (222) de la phase cubique centrée Au, comme généralement observé avec les matériaux à base d'or préparés par pulvérisation [64]. La taille des cristallites calculée en utilisant la formule de Scherrer (Eq. 1) est de 14 nm ce qui confirme bien l'observation de la taille des grains inférieure à 20 nm observée par MEB.

$$t = \frac{180}{\pi} \frac{K \lambda}{\varepsilon \cos \theta} \quad (\text{Eq.1})$$

$$t = \frac{180}{\pi} \frac{0,89 \cdot 1,6}{0,6 \cos 17} = 140 \text{ \AA} = 14 \text{ nm}$$

Sachant que  $t$  : la taille du cristallite,  $\lambda$  : la longueur d'onde,  $K$  : constante de Scherrer (0,89),  $\varepsilon$  : la largeur intégrale du pic,  $\theta$  : la moitié de la déviation de l'onde (la moitié de la position du pic sur le diffractogramme).

L'avantage de la structure tridimensionnelle du PAN a été mise en évidence en comparant une électrode Au avec et sans NFsPAN à partir du voltammogramme de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  en solution. La réversibilité du couple  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  est améliorée en présence de NFsPAN car une diminution de  $\Delta E_p$  (entre les pics d'oxydation et de réduction) est observée (200 à 170 mV), ainsi qu'une augmentation de la densité de courant de pic  $j_p$  (2,5 fois supérieure avec le PAN) (figure 26-d). La présence de PAN améliore donc notablement la réversibilité, la conductivité électronique et la surface spécifique électroactive de l'électrode, ce qui est dû à la structure 3D des nanofibres de PAN.



**Figure 26:** a) Images MEB à différents agrandissements de Au/NFsPAN obtenues pour 240 s d'électrospinning suivie par pulvérisation d'une couche Au de 142 nm; b, c) diffractogramme EDX et DRX des électrodes de Au/NFsPAN, d) voltammétrie cyclique de 10 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  sur des électrode Au et Au/NFsPAN dans le tampon phosphate pH 9; vitesse de balayage 20  $\text{mV s}^{-1}$ .

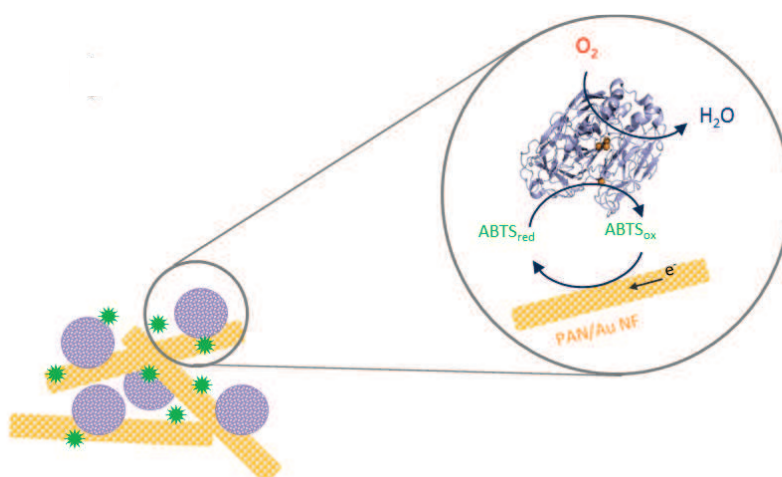
## II-3- Caractérisation électrochimique des bioélectrodes à base de Au /NFsPAN/ Silicium

Les électrodes modifiées par des enzymes sont l'élément clé qui agit sur la performance des biopiles à combustible. La puissance peut être améliorée en utilisant des matériaux d'électrode à grande surface, comme les électrodes de Au/NFsPAN/Si qui ont été utilisé dans notre travail comme support pour l'immobilisation d'enzymes afin de préparer des bioélectrodes avec les paramètres optimisés précédemment.

## II-3-1-Biocathode à base de Au /NFsPAN/Silicium

### II-3-1-1-Construction de la biocathode

Le transfert d'électrons à la biocathode vis-à-vis de la réduction de l' $O_2$  est illustré sur la Figure 27. Les électrons sont transférés de la cathode pour réduire  $ABTS_{ox}$ . Ensuite, quatre équivalents de l' $ABTS_{red}$  sont transférés aux quatre ions actifs de Cu (II) de laccase qui acquiert les électrons nécessaires pour réduire le dioxygène en eau [65]. Les Au/NFsPAN sont recouvertes à la surface par un mélange de laccase et ABTS piégés dans un polymère de Nafion<sup>®</sup>. L'enzyme a été préalablement mélangée avec le Super P<sup>®</sup> comme hôte efficace pour les enzymes, fournissant une connexion électrique entre les enzymes et l'électrode et une surface supplémentaire pour l'adsorption de la laccase active [42,66].

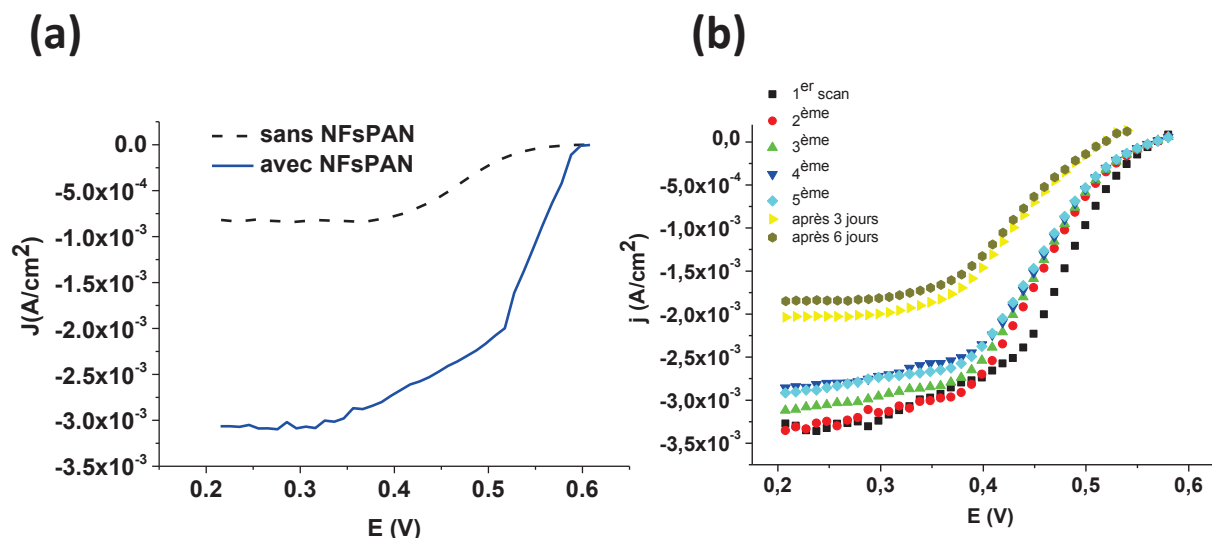


**Figure 27:** schéma du transfert d'électrons à la bio cathode vis-à-vis de la réduction de l' $O_2$ .

### II-3-1-2-Réponse électrochimique de la biocathode

La réponse électrochimique de la biocathode dans une solution tampon phosphate pH 5 saturée en  $O_2$  est représentée sur la figure 28-a, et comparée avec une biocathode réalisée en absence de NFsPAN.





**Figure 28:** a) Courbes de polarisation d'une biocathode Super P<sup>®</sup> avec et sans NFsPAN dans une solution de phosphate saturée en O<sub>2</sub> (pH 5, 0,1 M). Vitesse de balayage 3,3 mVs<sup>-1</sup>. b) Stabilité de la biocathode à base de nanofibres évaluée à partir des courbes de polarisation après balayages successifs, après 3h, et le 3<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour.

Le courant de réduction de l'oxygène commence à 0,59 V/ECS, sans surtension, l'allure de la courbe est typique d'un contrôle de la réaction électrocatalytique par diffusion de l'oxygène à la surface de l'électrode. La présence de NFsPAN conduit à une augmentation de la densité de courant jusqu'à 3 mA/cm<sup>2</sup>, soit 3 fois supérieure à celle construite sans PAN. Ce résultat peut être attribué à la structure poreuse du PAN qui offre un contact intime entre le matériau d'électrode et les enzymes et améliore la limitation de transfert de masse des espèces à travers la matrice.

La stabilité de la biocathode a été étudiée (figure 28-b) à partir de l'évolution des courbes de polarisation, tracées le même jour et après stockage de l'électrode en atmosphère humide à 5 °C pendant 3 et 5 jours. Les balayages successifs conduisent à une perte de 17 % de l'activité électrochimique initiale. Cette perte s'élève à 36 % et 42 % après 3 et 6 jours respectivement, associée à une diminution de la valeur de tension en circuit ouvert  $E_{i=0} = 0.55V$ . Ce phénomène est principalement attribué au lessivage de l'ABTS de la matrice [67].

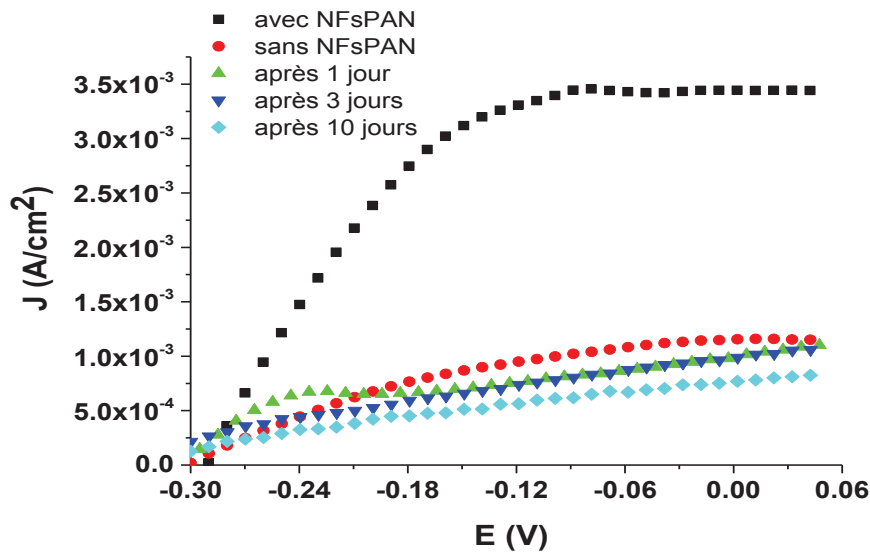
Il existe dans la littérature de nombreux exemples de cathodes à base de laccase. Comme nous l'avons dit dans la partie bibliographique, il est toutefois difficile de comparer l'efficacité des bioélectrodes tant les différences sont importantes d'une étude à l'autre au niveau de la nature des matériaux d'électrode, des médiateurs, des polymères et des conditions expérimentales. Zebda et ses collaborateurs ont construit récemment une biocathode Laccase/O<sub>2</sub> constituée de nanotubes de carbone pressés sous forme de pastilles,

qui délivre la meilleure densité de courant jusqu'à aujourd'hui ( $4 \text{ mA/cm}^2$ ) [68]. Cette biocathode donne une densité de courant un peu plus grande que notre biocathode de par la quantité d'enzymes et de carbone très élevée utilisée (90 mg et 250 mg respectivement) par rapport aux électrodes que nous avons fabriquées (0,075 mg pour l'enzyme et le carbone). En prenant en considération la quantité d'enzymes très élevée utilisée, notre biocathode est plus performante. Servat et ses collaborateurs, ont construit une biocathode en immobilisant la laccase et l'ABTS dans un film de polypyrrole qui a fourni une densité de courant plus faible ( $280 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$ ), sachant que la quantité d'enzymes n'était pas quantifiable [45].

### II-3-2-Bioanode à base Au /NFsPAN/Silicium

La bioanode fonctionne à base du carburant éthanol en solution, qui est oxydé en acétaldéhyde en présence d'ADH et son cofacteur  $\text{NAD}^+$ . La régénération du cofacteur est réalisée à l'aide d'une protéine redox supplémentaire, la diaphorase, qui fonctionne de façon efficace en présence du médiateur VK3. Après détermination des meilleures conditions opératoires, nous avons fabriqué des bioanodes ( $\text{ADH/NAD}^+/\text{DP/VK3}$ ) par immobilisation des espèces sur une électrode Au nue et modifiée par les nanofibres de PAN. Les courbes de polarisation enregistrées sont présentées sur la figure 29.





**Figure 29:** Courbes de polarisation d'une bioanode éthanol/ADH/NAD<sup>+</sup>/VK3/Dp, avec et sans nanofibres de Au/PAN, après 1, 3 et 10 jours en présence de poudre de carbone KS6, pH=9,  $v=3.33 \text{ mV/s}$

La densité de courant fournie par la bioanode construite avec les nanofibres de PAN est de l'ordre de  $3,5 \text{ mA/cm}^2$ , soit presque 4 fois supérieure à celle construite sans nanofibres, due à l'augmentation significative de la surface spécifique de l'électrode. Néanmoins, une diminution de la stabilité de la bioanode est observée (perte de 70% et 85% de sa densité du courant initial après 3 et 10 jours respectivement). Cela peut être dû à la désorption d'espèces à travers le dépôt de la bioanode entraînant une diminution de leur performance. Une autre hypothèse, démontrée par Sakai et al. [57], est la production importante de protons à la bioanode qui diffusent difficilement à travers le dépôt, ce qui conduit à une augmentation locale de l'acidité et par conséquent à une diminution de l'activité des enzymes ADH et diaphorase.

La bioanode construite sans PAN ne conserve que 10 % de ses performances après un jour, alors que celle avec les nanofibres garde 30 % de son activité électrochimique après 10 jours de stockage. Cela démontre l'intérêt d'utiliser des polymères avec une structure tridimensionnelle comme le PAN afin d'augmenter la surface spécifique et d'améliorer la connexion électrique entre les différents constituant de la matrice.

Il est intéressant de comparer notre bioanode à celles de la littérature, et en particulier, la densité de courant délivrée. Deng et ses collaborateurs [69] ont développé une bioanode à base de feutre de carbone modifiée par des nanoparticules Au pour oxyder l'éthanol par

l'ADH, cette bioanode a délivré une densité de courant de  $3,21 \text{ mA/cm}^2$ . On peut citer la bioanode construite par Sakai et ses collaborateurs [57], par dépôts successifs des espèces redox : GDH, diaphorase,  $\text{NAD}^+$  et VK3 (sans poudre de carbone) sur une électrode de fibre de carbone. Cette bioanode a délivrée une densité de courant de  $4 \text{ mA/cm}^2$ , proche de celle de la bioanode avec Au/NFsPAN.

L'originalité de ce travail a été d'utiliser pour la première fois les nanofibres de PAN modifiées par une mince couche en Au comme matériau d'électrode pour une application dans les biopiles à alcool. Ce matériau a démontré un intérêt important pour augmenter les performances de la biopile grâce à sa structure tridimensionnelle.

Les électrodes à base de Au/NFsPAN que nous avons fabriquées ont permis de délivrer des densités de courant de  $3,5 \text{ mA/cm}^2$  pour la biocathode avec une bonne stabilité au cours du temps (conservation de 60 % de la performance initiale au bout de 6 jours), et aussi pour l'anode mais avec une perte de performance après 1 jour.

## Conclusion

Les objectifs des travaux décrits dans ce chapitre ont concerné d'une part, l'optimisation de la construction de bioélectrodes à base Au et des conditions expérimentales pour améliorer leur performance électrochimique. En particulier, nous avons étudié l'influence de la nature de la poudre de carbone qui permet d'améliorer le confinement des espèces réactives à la surface d'une électrode. Les résultats ont montré que les propriétés structurales des poudres ont une influence majeure par rapport à leur conductivité.

Ces résultats ont été ensuite transposés à la réalisation de bioélectrodes à base de nanofibres modifiées par de l'or utilisées pour la première fois dans la réalisation de bioélectrodes. L'introduction des nanofibres de Au/PAN offre une grande surface spécifique pour l'immobilisation d'enzymes et une meilleure conductivité aux électrodes. Ces deux paramètres intéressants doivent permettre des applications de ces électrodes nanostructurées dans d'autres domaines, tels que les capteurs, la production d'hydrogène [70] et dans des applications photocatalytiques et photovoltaïques [71].

D'après nos résultats, nous pouvons conclure que l'augmentation de la surface spécifique de l'électrode, fournie par le réseau du NFsPAN est une approche efficace pour améliorer la densité de courant des bioélectrodes et par conséquent la puissance de la biopile à combustible résultante par l'assemblage des deux bioélectrodes présenté dans le chapitre suivant. Notre objectif est d'associer ces bioélectrodes afin de fabriquer une biopile à éthanol/oxygène.

### Références

- [1] C. Burda, X.B. Chen, R. Narayanan, M.A. El-Sayed, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1025-1102.
- [2] N.L. Rosi, C.A. Mirkin, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1547-1562.
- [3] B. Yoon, H. Hakkinen, U. Landman, A.S. Worz, J.M. Antonietti, S. Abbet, K. Judai, U. Heiz, *Science* 307 (2005) 403-407.
- [4] M. Date, M. Okumura, S. Tsubota, M. Haruta, *Angew. Chem., Int. Ed.* 43 (2004) 2129-2132.
- [5] S.Y. Lin, S.W. Liu, C.M. Lin, C.H. Chen, *Anal. Chem.* 74 (2002) 330-335.
- [6] Y.J. Kim, R.C. Johnson, J.T. Hupp, *NanoLett.* 1 (2001) 165-167.
- [7] J.W. Liu, Y. Lu, *Angew. Chem., Int. Ed.* 45 (2006) 90-94.
- [8] C. Loo, A. Lowery, N. Halas, J. West, R. Drezek, *NanoLett.* 5 (2005) 709-711.
- [9] W.L. Barnes, A. Dereux, T.W. Ebbesen, *Nature* 424 (2003) 824-830.
- [10] D. Yang, B. Lu, Y. Zhao and X. Jiang, *Adv. Mater.* 19 (2007) 3702-3706.
- [11] C. Zhou, Z. Liu, J. Dai and D. Xiao, *Analyst*, 135 (2010) 1004-1009.
- [12] G.Y. Han, G.Q. Shi, *J. Appl. Polym. Sci.* 103 (2007) 1490-1494.
- [13] M.S. Khil, H.Y. Kim, M.S. Kim, S.Y. Park, D.R. Lee, *Polymer* 45 (2004) 295-301.
- [14] J.R. Kim, S.W. Choi, S.M. Jo, W.S. Lee, B.C. Kim, *Electrochim. Acta* 50 (2004) 69-75.
- [15] S. Madhugiri, A. Dalton, J. Gutierrez, J.P. Ferraris, K.J. Balkus Jr., *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 14531-14538.
- [16] L. Yao, T.W. Haas, A. Guiseppi-Elie, G.L. Bowlin, D.G. Simpson, G.E. Wnek, *Chem. Mater.* 15 (2003) 1860-1864.
- [17] G. Larsen, R. Velarde-Ortiz, K. Minchow, A. Barrero, I.G. Loscertales, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1154-1155.
- [18] H.Q. Hou, D.H. Reneker, *Adv. Mater.* 16 (2004) 69-73.
- [19] F. Ko, Y. Gogotsi, A. Ali, N. Naguib, H. Ye, G. Yang, C. Li, P. Wills, *Adv. Mater.* 15 (2003) 1161-1165.
- [20] Z.M. Huang, Y.Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramkrishna, *Compos. Sci. Technol.* 63

(2003) 2223-2253.

[21] D. Li, Y.N. Xia, *Adv. Mater.* 16 (2004) 1151-1170.

[22] G.Y. Han, B. Guo, L.W. Zhang, B.S. Yang, *Adv. Mater.* 18 (2006) 1709-1712.

[23] M. Bognitzki, M. Becker, M. Graeser, W. Massa, J.H. Wendorff, A. Schaper, D. Weber, A. Beyer, A. Goelzhaeuser, *Adv. Mater.* 18 (2006) 2384-2386.

[24] F. Ochanda, W.E. Jones, *Langmuir* 21 (2005) 10791-10796.

[25] F. Ochanda, W.E. Jones, *Langmuir* 23 (2007) 795-810.

[26] G. M. Kim, A. Wutzler, H. J. Radusch, G. H. Michler, P. Simon, R. A. Sperling and W. J. Parak, *Chem. Mater.* 17 (2005) 4949–4957.

[27] G. Y. Han, B. Guo, L. W. Zhang and B. S. Yang, *Adv. Mater.* 18 (2006) 1709–1712.

[28] U. B. Jensen, M. Vagin, O. Koroleva, D. S. Sutherland, F. Besenbacher, E. E. Ferapontova, *J. Electroanal. Chem.* 667 (2012) 11-18.

[29] R. Kontani, S. Tsujimura, K. Kano, *J. Bioelectrochem.* 76 (2009) 10-13.

[30] M. Masuda, Y. Motoyama, K. Murata, N. Nakamura, H. Ohno, *J. Electroanalysis* 23 (2011) 2297-2301.

[31] M. Ammam, J. Fransaer, *J. Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 1601-1609.

[32] L. N. Akers, M. C. Moore, D. S. Minteer, *J. Electrochimica Acta* 50 (2005) 2521-2525.

[33] A. Habrioux, K. Servat, S. Tingry, K. B. Kokoh, *J. Electrochem. Comm.* 11 (2009) 111-113.

[34] G. Gupta, C. Lau, B. Branch, V. Rajendran, D. Ivnitski, P. Atanasov, *J. Electrochimica acta* 56 (2011) 10767-10771.

[35] K.-Y. Chan, J. Ding, J. Ren, S. Cheng, and K. Y. Tsang, *Materials Chemistry*, 14 (2004) 4505-4510.

[36] S. An, J.-H. Park, C.-H. Shin, J. Joo, E. Ramasamy, J. Hwang, and J. Lee, *Carbon*, 49 (2011) 1108-1117.

[37] R. A. Bullen, T. C. Arnot, J. B. Lakeman, and F. C. Walsh. *Biosensors & bioelectronics*, 21 (2006) 2015-2045.

[38] K. Schubert, G. Goebel, and F. Lisdat. *Electrochimica Acta*, 54 (2009) 3033-3038.

[39] G. T. R. Palmore and H.-H. Kim. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 464 (1999) 110-117.

- [40] L. S. Susannah, W. Chen, A. Bakac, and J. H. Espenson. *Journal of Physical Chemistry*, 97 (1993) 6710-6714.
- [41] A. Habriouxa, T. Napporna, K. Servata, S. Tingryb, K.B. Kokoha, *Electrochimica Acta* 55 (2010) 7701–7705.
- [42] S. D. Minter, P. Atanasov, H. R. Luckarift, and G. R. Johnson. *Materials Today*, 15 (2012) 166-173.
- [43] Makoto Togo, Akimasa Takamura, Tatsuya Asai, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, *Electrochimica Acta* 52 (2007) 4669–4674.
- [44] Thèse V. TECHER, 2013, université de Montpellier 2, « Electrodes catalytiques nanostructurées à base d'enzymes pour le développement de biopiles alcool/O<sub>2</sub> microfluidiques ».
- [45] K. Servat, S. Tingry, L. Brunel, S. Querelle, M. Cretin, C. Innocent, C. Jolival, and M. Rolland. *Journal of Applied Electrochemistry*, 37 (2006) 121-127.
- [46] 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), *Biochimie* 86, 693–703.
- [47] Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A. I., Whittaker, J. W., and Gorton, L. (2005), *Biosensors and Bioelectronics* 20, 2517–2554.
- [48] Y. Choi, G. Wang, M. H. Nayfeh, and S.-T. Yau. *Biosensors & Bioelectronics*, 24 (2009) 3103-3107.
- [49] K. Lienkamp, C. F. Kins, S. F. Alfred, A. E. Madkour, and G. N. Tew. *Journal of Polymer Science*, 47 (2009) 1266-1273.
- [50] T. Miyake, M. Oike, S. Yoshino, Y. Yatagawa, K. Haneda, H. Kaji, and M. Nishizawa. *Chemical Physics Letters*, 480 (2009) 123-126.
- [51] A. Zebda, C. Gondran, P. Cinquin, and S. Cosnier. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 173 (2012) 760-764.
- [52] T. Szabo, A. Szeri, and I. Dekany. *Carbon*, 43 (2005) 87-94.
- [53] A. Both Engel, A. Cherifi, S. Tingry, D. Cornu, A. Peigney, and C. Laurent. *Nanotechnology*, 24 (2013) 245402.
- [54] G. Merle, L. Brunel, S. Tingry, M. Cretin, M. Rolland, K. Servat, C. Jolival, C. Innocent, and P. Seta. *Materials Science and Engineering: C*, 28 (2008) 932-938.
- [55] G. Li and J. Hao. *Journal of The Electrochemical Society*, 156 (2009) 134-138, 2009.

- [56] F. Sato, M. Togo, M. K. Islam, T. Matsue, J. Kosuge, N. Fukasaku, S. Kurosawa, and M. Nishizawa. *Electrochemistry Communications*, 7 (2005) 643-647.
- [57] H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, and K. Kano. *Energy&Environmental Science*, 2 (2009) 133-138.
- [58] Y. Zhou and J. Zhi. *Electrochemistry Communications*, 8 (2006) 1811-1816.
- [59] Worthington, "pH optimum de fonctionnement de la diaphorase." [Online]. disponible: <http://www.worthington-biochem.com/DIL/>
- [60] Sigma-Aldrich, "pH optimum de fonctionnement de l'alcool deshydrogenase."
- [61] Formhals US-patent 1975504
- [62] Yarin A.L., Koombhongse S., Reneker D.H., - *Journal of Applied Physics*, Vol. 90, No. 9, (2001)
- [63] Warner S.B., Buer A., Grimler M., Ugbolue S.C. - *National Textile Center Annual Report: M98-D01*, (1999)
- [64] Wang, Z.-G.; Wan, L.-S.; Liu, Z.-M.; Huang, X.-J.; Xu, Z.-K. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 56 (2009) 189-195.
- [65] Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. E. *Multicopper oxidases and oxygenases. Chemical Reviews* 96 (1996) 2563-2605.
- [66] Kim, J.; Jia, H.; Wang, P. *Biotechnology Advances* 24 (2006) 296-308.
- [67] Kim, J.; Yoo, K.-H. *Physical Chemistry Chemical Physics* 15 (2013) 3510-3517.
- [68] A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin, and S. Cosnier. *Nature communications* 2 (2011) 370-376.
- [69] Liu Deng, Li Shang, Dan Wen, Junfeng Zhai, Shaojun Dong, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2010) 70-73
- [70] M. Bechelany, A. Abou Chaaya, F. Frances, O. Akdim, D. Cot, U. B. Demirci and P. Miele, *Journal of Materials Chemistry A* 1 (2013) 2133-2138.
- [71] J. Elias, M. Bechelany, I. Utke, R. Erni, D. Hosseini, J. Michler and L. Philippe, *Nano Energy* 1 (2012) 696-705.

## **Chapitre II :**

# **Biopile à éthanol/Oxygène**



### Introduction

Les biopiles à combustible (BFC) fonctionnant avec des catalyseurs enzymatiques immobilisés sur des électrodes sont des systèmes prometteurs pour la conversion de l'énergie chimique en électricité [1-10]. Ces dispositifs sont construits à partir de l'assemblage d'une bioanode, lieu d'oxydation du carburant, et d'une biocathode lieu de réduction du comburant. Les biopiles à combustible fonctionnent avec des combustibles tels que le glucose, l'éthanol ou le méthanol, et avec l'oxygène comme oxydant. Un facteur important qui influence la performance et la stabilité de ces dispositifs est la densité d'enzymes électrochimiquement actives sur l'électrode [11]. Au cours des dernières années, des efforts ont été faits pour développer de nouveaux matériaux d'électrodes enzymatiques à structure tridimensionnelle qui optimisent le chargement et la stabilité des enzymes sur l'électrode [12]. De nouveaux matériaux ont été explorés à base de carbone comme les nanotubes de carbone mono-paroi [13] et multi-parois [14], les nanofibres de carbone [15], le papier fibre de carbone [16], ainsi que des matériaux à base de Au comme les nanoparticules NPsAu chargés sur des électrodes Au macroporeux [17] ou sur papier carbone [18]. Par exemple, des résultats très prometteurs ont été obtenus pour les biopiles à glucose délivrant des densités de puissance de  $1,3 \text{ mW cm}^{-2}$  à 0,6 V avec des électrodes en nanotubes de carbone comprimés [19], ou  $1,4 \text{ mW cm}^{-2}$  à 0,77V avec des électrodes à base de nanofils en Au électrochimiquement générés à l'intérieur de pores d'oxyde d'aluminium anodisé [20]. Quelques biopiles à combustible à éthanol ont également été développées par immobilisation d'enzymes déshydrogénases immobilisées sur du papier en fibre de carbone commercial comme matériau conducteur [15-16, 20,5,21]. Dans ces dispositifs les carburants à l'alcool sont oxydés en aldéhydes en présence de l'enzyme alcool déshydrogénase et  $\text{NAD}^+$  en tant que cofacteur à l'anode. A la cathode, l'oxygène est réduit en présence des enzymes laccase ou bilirubine oxydase.

L'originalité de cette partie de travail est d'explorer la capacité du matériau de polyacrylonitrile tridimensionnel en tant que nouveau matériau nanostructuré possédant une grande surface pour augmenter la charge d'enzymes et améliorer les performances électrochimiques d'une biopile à éthanol/ $\text{O}_2$ .

Avant d'aborder la construction de la biopile, nous allons présenter un court rappel sur les méthodes électrochimiques utilisées pour caractériser les biopiles à combustible, qui nous a semblé important.

Ensuite, nous présenterons la caractérisation de la biopile réalisée par assemblage de différentes biocathodes et bioanodes construites sur électrodes Au denses, en utilisant deux

méthodes de caractérisation afin d'évaluer la puissance délivrée et la stabilité de la biopile.

Dans une dernière partie, nous mettrons en évidence l'intérêt du matériau d'électrode Au/NFsPAN/Si pour améliorer les performances des bioélectrodes dans la biopile à alcool/O<sub>2</sub>.

### Méthodes de caractérisation d'une biopile

Les paramètres caractéristiques pour évaluer le fonctionnement et les performances des biopiles sont la puissance et l'intensité développées par ces systèmes, qui sont régies par les relations suivantes :

$$I=U / R \quad (1)$$

$$P=U \times I \quad (2)$$

Avec U : tension de la pile (V), I : intensité du courant (A), R : résistance du circuit ( $\Omega$ ), P : puissance (W)

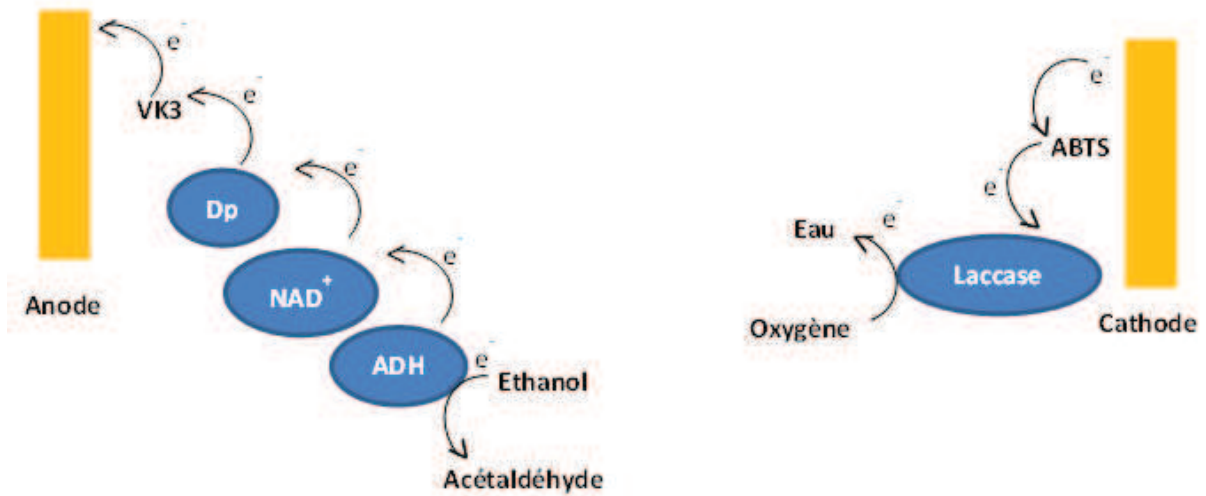
L'allure des courbes de densité de courant-potentiel ( $j/E$ ) permet d'identifier les principaux phénomènes électrochimiques liés au comportement de la biopile.

A  $I=0$ , le potentiel de chaque électrode est donné par la loi de Nernst.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{ox}}{C_{RED}} \quad (3)$$

Avec E : le potentiel de l'électrode (V),  $E^0$  : le potentiel standard (V), T : la température (K), R : la constante des gaz parfaits ( $J.K^{-1}.mol^{-1}$ ), n : le nombre d'électrons, F : le nombre de faraday ( $C.mol^{-1}$ ) et C : la concentration d'espèce ( $mol/dm^3$ ).

Les réactions d'une biopile peuvent être analysées en demi-réactions qui ont lieu à l'anode et à la cathode. Pour une biopile à éthanol/ $O_2$  (figure1), à l'anode, la réaction envisagée est l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde par l'enzyme ADH, son cofacteur  $NAD^+$ , la diaphorase et un médiateur VK3. À la cathode, la réaction envisagée est la réduction de l' $O_2$  en eau catalysée par la laccase en présence d'ABTS comme médiateur. Dans le fonctionnement des biopiles, les potentiels ne sont pas définis par les substrats mais par les médiateurs redox, donc il faut tenir compte des réactions se déroulant à chaque électrode entre le substrat, l'enzyme et le médiateur (ABTS et VK3).



**Figure 1 :** schéma représentant les transferts électroniques d'une biopile à éthanol/oxygène

Les potentiels théoriques  $E$  peuvent être calculés par l'équation de Nernst. Cette dernière s'écrit dans le sens de la réduction, quand la réaction consomme des électrons :

$$\left. \begin{aligned} E_{\text{anode}} &= E^0_{\text{VK3}_{\text{Ox}}/\text{VK3}_{\text{Red}}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\text{VK3}_{\text{Ox}}}{\text{VK3}_{\text{Red}}} \quad (4) \\ E_{\text{cathode}} &= E^0_{\text{ABTS}^{\cdot-}/\text{ABTS}^{2-}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\text{ABTS}^{\cdot-}}{\text{ABTS}^{2-}} \quad (5) \end{aligned} \right\} \begin{array}{l} \text{Demi-équations des} \\ \text{médiateurs} \end{array}$$

La f-e-m de la pile est :  $E = E_{\text{cathode}} - E_{\text{anode}}$

On parle de  $E_{\text{théorique}}$  parce que la tension de la pile n'est jamais égale à la seule différence des potentiels cathodique et anodique, il y a toujours des pertes ohmiques. L'équation devient alors :

$$E_{\text{pile}} = E_{\text{cathode}} - E_{\text{anode}} - \sum I.R \quad \text{avec } \sum I.R \text{ les pertes ohmiques}$$

Les potentiels  $E_{\text{cathode}}$  et  $E_{\text{anode}}$  s'écrivent comme suit :

$$E_{\text{cathode}} = E^0_{\text{cathode}} - \eta$$

$$E_{\text{anode}} = E^0_{\text{anode}} - \eta \quad \text{donc} \quad E_{\text{pile}} = E^0_{\text{cathode}} - \eta_{\text{cath}} - E^0_{\text{anode}} + \eta_{\text{anod}} - \sum I.R$$

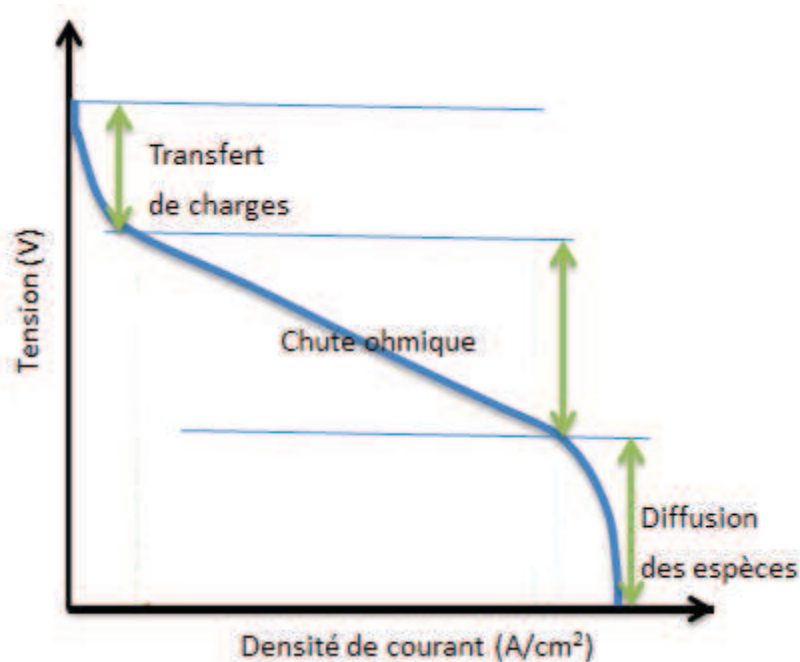
Où  $\eta$  : représente les surtensions des électrodes dues à des phénomènes de transfert de

charge des espèces aux électrodes.

Nous avons utilisé deux méthodes pour tracer la courbe  $E = f(j)$  :

- la ddp entre les bornes de la biopile est variée à l'aide d'un potentiostat et la densité de courant ( $J$ ) est mesurée.
- une résistance variable est imposée au système et la tension ( $E$ ) est mesurée. La loi d'ohm ( $U = R.J$ ) est utilisée pour déterminer la densité de courant.

Pour une biopile complète, la courbe de polarisation résultante du potentiel en fonction de la densité de courant est présentée sur la figure 2.



**Figure 2 :** Courbe de polarisation d'une biopile

D'après la figure 2 on distingue trois domaines :

- Un premier domaine où la tension de la pile est limitée par le transfert de charges, cette surtension se situe dans le domaine des faibles densités de courant, lorsque le transfert de charge à l'électrode est lent.
- Un deuxième domaine où la tension ici est limitée par la chute ohmique liée au système, elle se situe dans le domaine de densités de courant moyennes. Ces pertes ohmiques apparaissent du fait de la résistance au transfert ionique entre l'anode et la cathode, elles obéissent à la loi

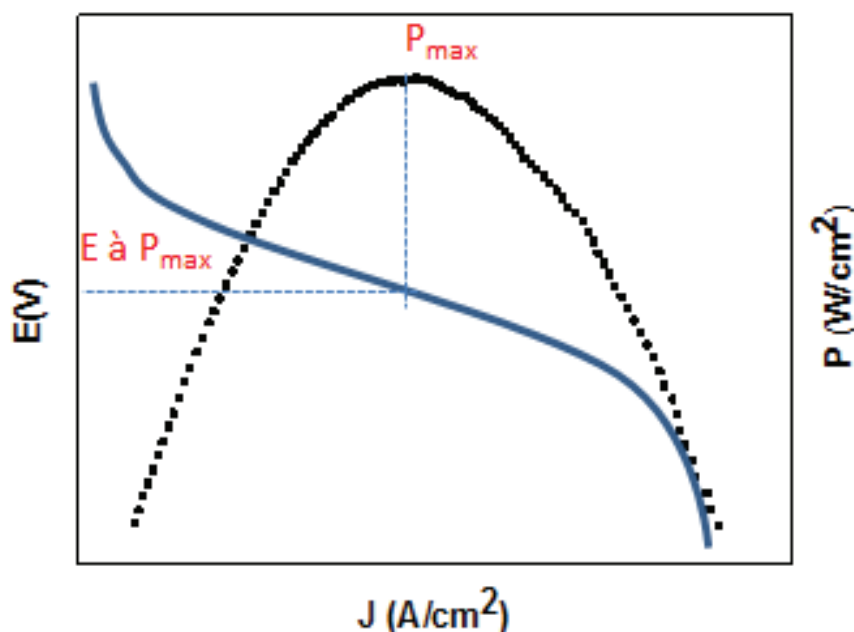
d'Ohm :  $\eta_{ohm} = I \times R$ .

- Un troisième domaine où la tension est limitée par la diffusion des espèces en solution aux électrodes (transfert de masse). Elle se situe dans le domaine de densités de courant fortes. La consommation importante des réactifs aux électrodes entraîne une chute de potentiel liée à l'incapacité du système à maintenir la concentration initiale en substrat aux électrodes, ce qui défavorise la catalyse de réaction.

La densité puissance délivrée par la pile est déterminée par :

$$P_{pile} = E_{pile} \times J_{pile}$$

Pour obtenir la courbe de la densité de puissance à partir des courbes de polarisation, il suffit de faire le produit entre E et J. L'allure de la courbe de densité puissance en fonction de la densité de courant est présentée sur la figure 3. Il est alors possible de déterminer la puissance maximale délivrée pour une tension de la pile déterminée.



**Figure 3:** Schéma représentant la forme des courbes de potentiel et densité de puissance en fonction de la densité de courant.  $P_{max}$  = densité de puissance maximale débitée par la biopile.

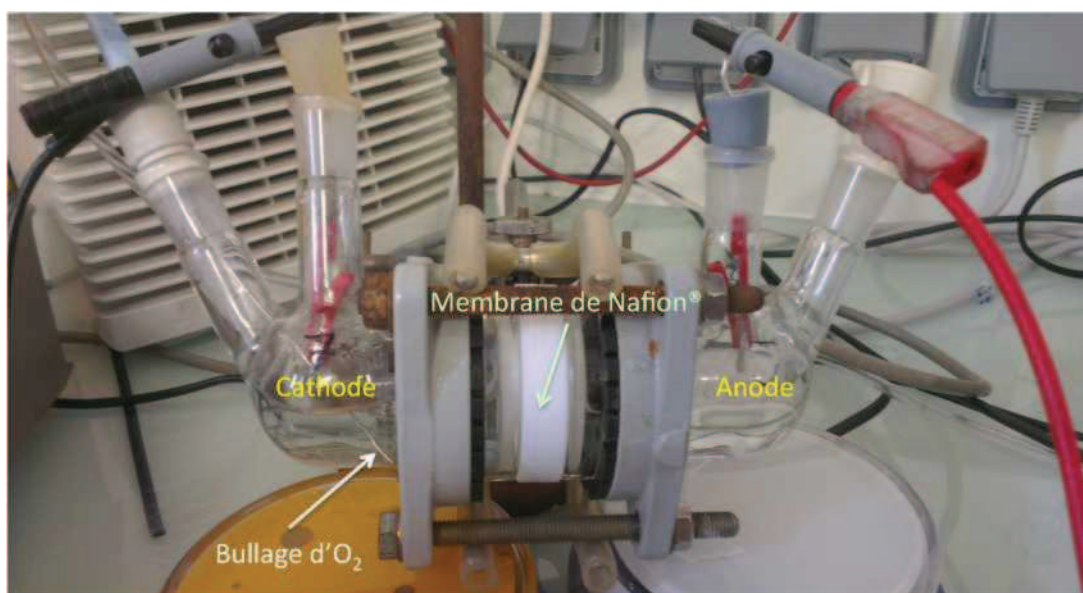
### Partie I : Biopile à éthanol/O<sub>2</sub> à base d'électrodes Au

Dans un premier temps, les bioélectrodes développées à base du substrat Au ont été assemblées pour construire une biopile éthanol/O<sub>2</sub> et évaluer ses performances électriques.

#### I-1-Construction de la biopile

Pour construire la biopile nous avons utilisé une cellule en verre bi-compartmentée séparée par une membrane de Nafion<sup>®</sup> assemblant les 2 bioélectrodes, comme montré en figure 4. Le compartiment anodique est constitué de la bioanode dans une solution tampon phosphate de pH 7 ou 9 en présence d'éthanol 70 mM. Le compartiment cathodique est constitué de la biocathode dans une solution saturée en oxygène à pH 5. La membrane de Nafion<sup>®</sup> assure la circulation des protons dans l'électrolyte entre les deux compartiments.

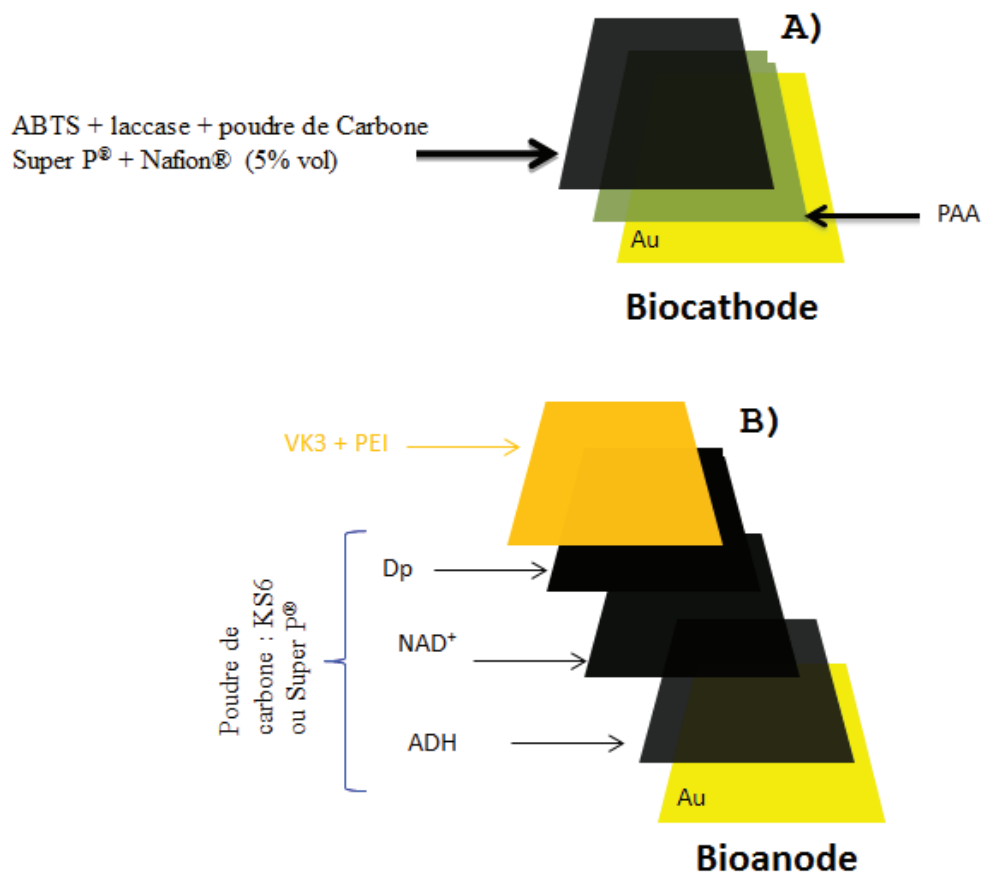
La biopile est caractérisée par la ddp mesurée entre les 2 bioélectrodes.



**Figure 4 :** Photographie d'une cellule bi-compartmentée en verre utilisée pour caractériser la biopile éthanol/oxygène.

### I-2-Characterisation de la biopile

Une 1<sup>ère</sup> série de biopiles ont été construites par assemblage d'une bioanode à ADH à base de poudre de carbone KS6 ou de poudre Super P<sup>®</sup>, et d'une biocathode à laccase à base de Super P<sup>®</sup>. Les bioélectrodes ont été obtenues par immobilisation des espèces réactives sur des électrodes Au (figure 5) comme décrit en détails dans le chapitre précédent.



**Figure 5 :** Schéma d'immobilisation des espèces réactives sur électrodes Au pour construire : (A) une biocathode et (B) une bioanode



Les performances électriques des biopiles ont été évaluées par deux méthodes que nous allons présenter successivement:

- 1<sup>ère</sup> méthode : Polarisation.
- 2<sup>ème</sup> méthode : Résistance imposée.

### I-2-1-Caractérisation des biopiles par polarisation

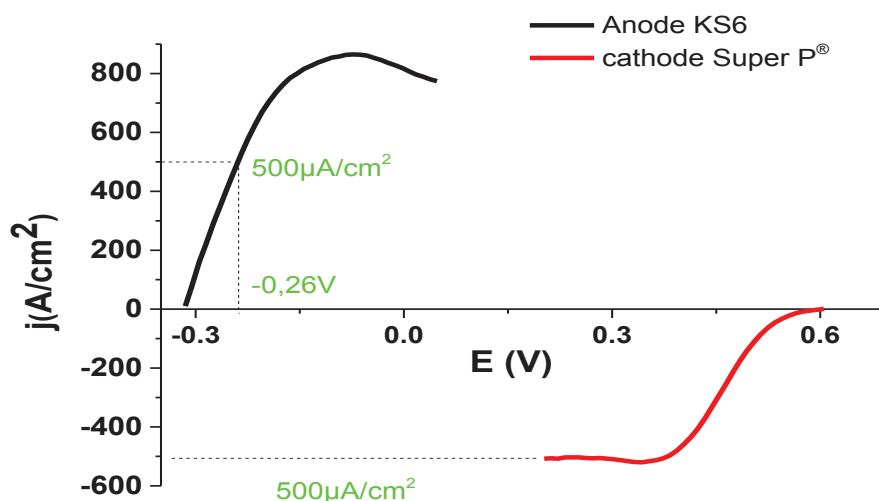
Nous avons caractérisé deux biopiles à alcool/O<sub>2</sub> :

- Une biopile composée d'une bioanode à base de KS6 et une biocathode à base de Super P<sup>®</sup>.
- Une biopile composée d'une bioanode et une biocathode à base de Super P<sup>®</sup>.

Nous avons choisi d'évaluer l'influence du pH de la bioanode (7 et 9) et de la présence de la membrane sur les performances des biopiles. La stabilité des biopiles en fonction du temps de fonctionnement a été étudiée.

#### I-2-1-1-Biopile à base d'une bioanode KS6 et une biocathode Super P<sup>®</sup>

Les courbes de polarisation des demi-biopiles (détaillées dans le chapitre 1) bioanode KS6 à pH 7 et biocathode Super P<sup>®</sup> à pH 5 sont présentées sur la figure 6 :



**Figure 6 :** Courbes de polarisation d'une bioanode KS6 et d'une biocathode Super P<sup>®</sup>, anolyte pH 7 avec 70 mM éthanol / catholyte pH 5 avec barbotage d'O<sub>2</sub>, tampon phosphate 0,1M.  $v = 3.33$  mV/s.

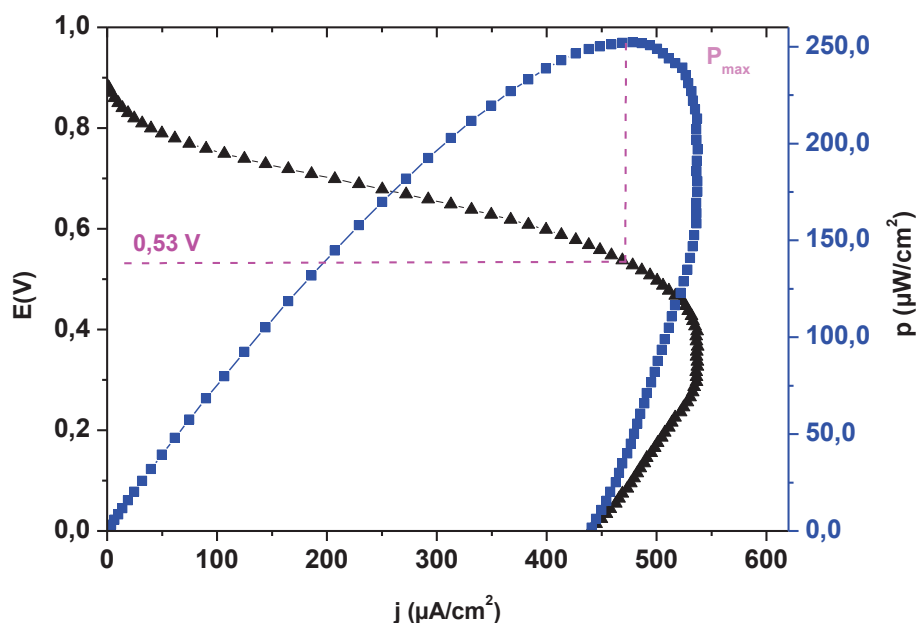
Comme montré sur la figure 6, la densité de courant maximale fournie par la bioanode est 40% plus grande que celle fournie par la biocathode ( $800 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  pour la bioanode et  $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  pour la biocathode). De plus la biocathode présente une surtension d'activation d'environ 50 mV.

On peut observer deux informations importantes :

Le potentiel à courant nul de la biopile devrait correspondre à la différence entre les potentiels à courant nul de chaque électrode,  $E_{i=0} = 0,62 - (-0,31)$  soit 0,93V.

- L'électrode limitante est la biocathode qui délivre la densité de courant la moins élevée ( $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), donc la biopile ne peut pas délivrer une densité de courant supérieure à celle de l'électrode limitante. Le maximum de potentiel délivré par la bioanode ne dépassera pas - 0,26V, qui correspond à la même densité de courant donnée par la biocathode ( $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ).

La courbe de polarisation de la biopile complète (bioanode KS6 / biocathode Super P<sup>®</sup>) obtenue à pH 7 est présentée sur la figure 8 (courbe noire). La densité de puissance (courbe bleue-figure 7) est obtenue par le produit de la différence de potentiel (ddp) entre les deux bioélectrodes et la densité de courant ( $P = j \times \text{ddp}$ ).

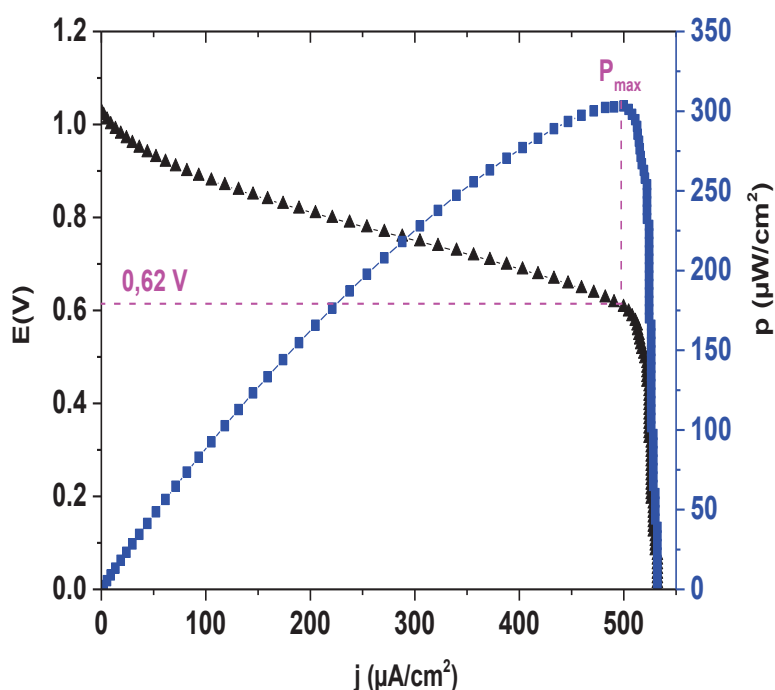


**Figure 7 :** Courbes de polarisation ( $\Delta$ ) et de puissance ( $\square$ ) d'une biopile avec une bioanode KS6 et une biocathode Super P<sup>®</sup> séparées par une membrane de Nafion<sup>®</sup> (anolyte pH 7 et 70 mM éthanol /catholyte pH 5 avec barbotage d' $\text{O}_2$ ), tampon phosphate 0,1M.  $v = 3.33 \text{ mV/s}$ .

## Chapitre II

Comme pressenti d'après les courbes de polarisation des demi-bioélectrodes, la densité de courant maximale délivrée par la biopile est de l'ordre de  $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  et diminue jusqu'à  $450 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  pour des tensions inférieures à  $0,3\text{V}$ . La densité de puissance maximale pour cette biopile est  $250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  à  $0,53\text{ V}$ , correspondant au sommet de la courbe en cloche (figure 7). Le potentiel en circuit ouvert est  $0,88\text{V}$ .

Nous avons vu dans le chapitre I que le pH optimum de fonctionnement de la biocathode est 5, alors que celui de l'anode peut varier entre 7 et 9. Par comparaison, les performances d'une biopile construite avec une anode KS6 opérant à pH 9 et une cathode Super P<sup>®</sup> à pH 5, ont été évaluées (figure 8).



**Figure 8 :** Courbes de polarisation ( $\Delta$ ) et de puissance ( $\square$ ) d'une biopile avec une bioanode KS6 et une biocathode Super P<sup>®</sup> séparées par une membrane de Nafion<sup>®</sup> (anolyte pH 9 et 70 mM éthanol /catholyte pH 5 avec barbotage d' $\text{O}_2$ ), tampon phosphate 0,1M.  $v = 3.33 \text{ mV/s}$ .

## Chapitre II

**Tableau 1 : Influence du pH sur les performances de la biopile à base d'une bioanode KS6 et une biocathode Super P<sup>®</sup>.**

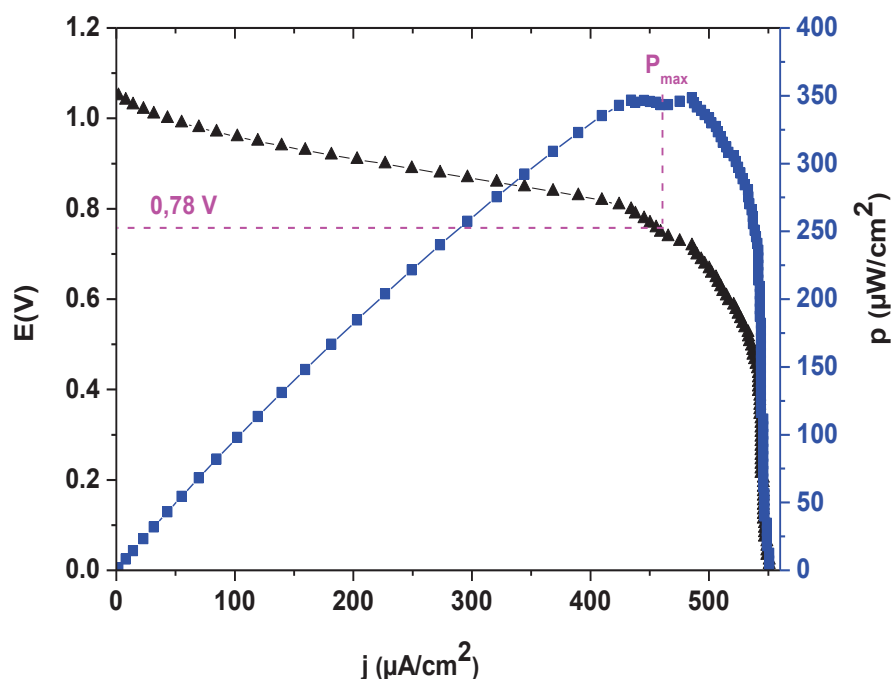
pH catholyte	pH anolyte	ddp à J=0 (V)	ddp à P <sub>max</sub> (V)	Densité de puissance max (μW/cm <sup>2</sup> )	Densité de courant max (μA/cm <sup>2</sup> )
5	7	0,88	0,53	250	540
5	9	1,02	0,62	300	550

D'après la courbe figure 8 et le tableau 1, nous remarquons que la densité de puissance délivrée augmente de 17% quand la bioanode opère à pH 9, due à l'augmentation de la ddp entre la bioanode et la biocathode. Cette variation correspond au décalage du potentiel redox de la VK3 de -0,27V à -0,38V entre pH 7 et pH 9 comme montré dans le chapitre I. Cependant l'évolution du pH n'a pas d'incidence sur la densité de courant de la biopile (proche de 550 μA/cm<sup>2</sup>) car l'électrode limitante est la biocathode. La densité de puissance maximale fournie est 300 μW/cm<sup>2</sup> à 0,62V.

Pour résumé, la biopile bioanode KS6 / biocathode Super P<sup>®</sup> atteint ses meilleures performances pour un pH de 5 dans le compartiment cathodique et un pH de 9 dans le compartiment anodique.

### I-2-1-2-Biopile avec une bioanode et une biocathode Super P<sup>®</sup>

La deuxième biopile étudiée a été fabriquée en incorporant la poudre de carbone Super P<sup>®</sup> à la bioanode et à la biocathode. Pour rappel, la bioanode Super P<sup>®</sup> avait donné des meilleures performances due à la grande surface spécifique du Super P<sup>®</sup>. La caractérisation de cette biopile fonctionnant à pH 5 pour le compartiment cathodique et pH 9 pour le compartiment anodique à donner les courbes de polarisation et de puissance présentées sur la figure 9.



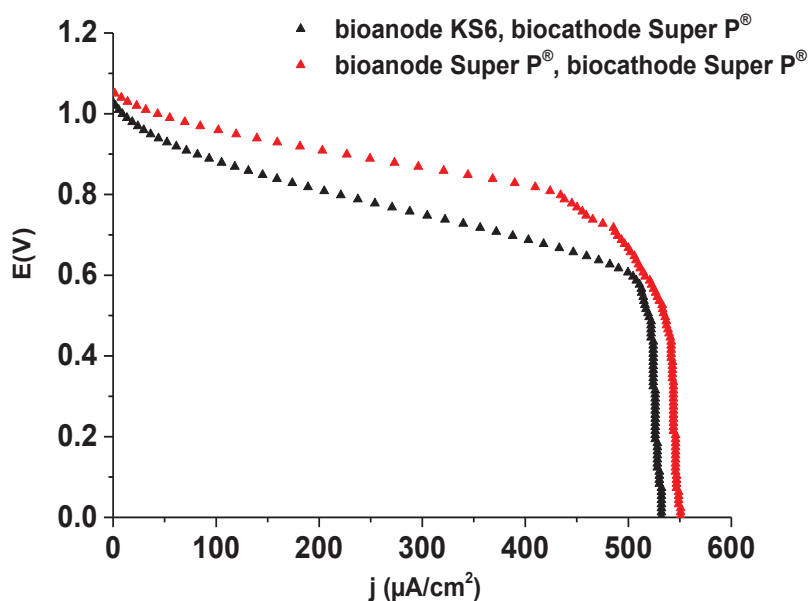
**Figure 9 :** Courbes de polarisation ( $\Delta$ ) et de puissance ( $\square$ ) bioanode Super P<sup>®</sup> et biocathode Super P<sup>®</sup>, séparées par une membrane de Nafion<sup>®</sup> (anolyte pH 9 et 70 mM éthanol /catholyte pH 5 avec barbotage d'O<sub>2</sub>), tampon phosphate 0,1M.  $v = 3.33 \text{ mV/s}$ .

**Tableau 2 :** comparaison des performances entre les deux biopiles : (1) bioanode KS6 et biocathode Super P<sup>®</sup> (2) bioanode et biocathode Super P<sup>®</sup>

Biopiles	ddp à J=0 (V)	ddp à P <sub>max</sub> (V)	Densité de puissance (μW/cm <sup>2</sup> ) max	Densité de courant (μA/cm <sup>2</sup> ) max
(1) bioanode KS6, biocathode Super P <sup>®</sup>	1,02	0,62	300	540
(2) bioanode Super P <sup>®</sup> , biocathode Super P <sup>®</sup>	1,04	0,78	350	550

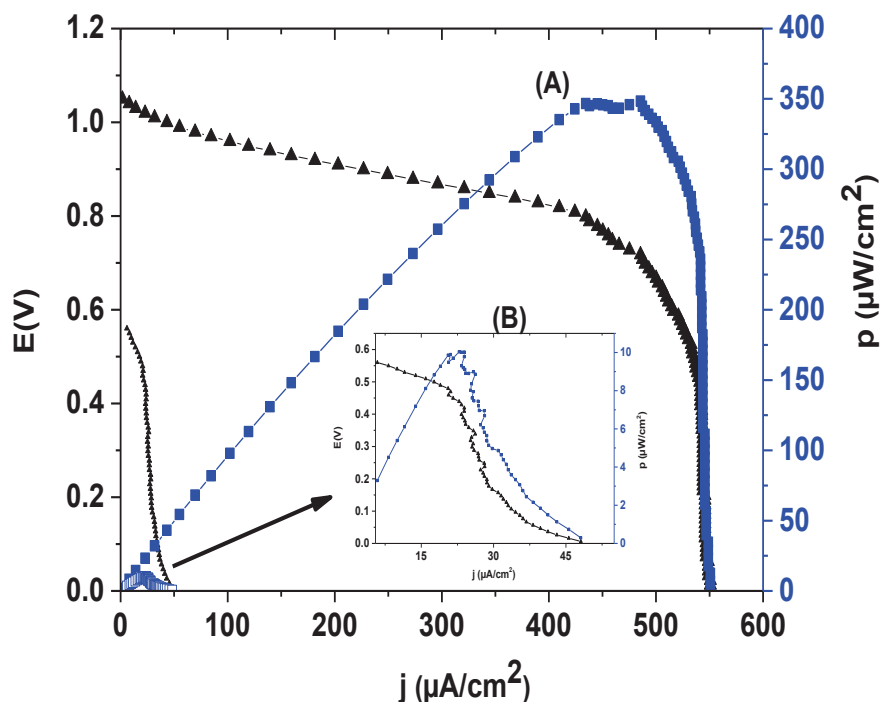
D'après la figure 10 et le tableau 2, nous remarquons que l'utilisation de Super P<sup>®</sup> à la bioanode améliore les performances de la biopile avec un gain de 15% de la densité de puissance (350 μW/cm<sup>2</sup> à 0,78 V).

En comparant l'allure des courbes de polarisation (figure 10) on constate que la chute ohmique est plus faible en présence de Super P<sup>®</sup> aux 2 bioélectrodes. La structure poreuse plus importante du Super P<sup>®</sup> par rapport au KS6 améliore le contact avec les espèces réactives. Le Super P<sup>®</sup> semble donc améliorer la conduction électrique et diminuer les pertes ohmiques liées à la bioanode.



**Figure 10 :** Courbes de polarisation des biopiles (1) bioanode KS6 et biocathode Super P<sup>®</sup> (2) bioanode et biocathode Super P<sup>®</sup>

La biopile bioanode Super P<sup>®</sup>, biocathode Super P<sup>®</sup> a été testée sans utiliser une membrane de Nafion<sup>®</sup>, avec un pH 5 pour l'anolyte et le catholyte, puisque l'enzyme laccase ne fonctionne pas à pH > 5. Les courbes de polarisation et de puissance sont montrées sur la figure 11.

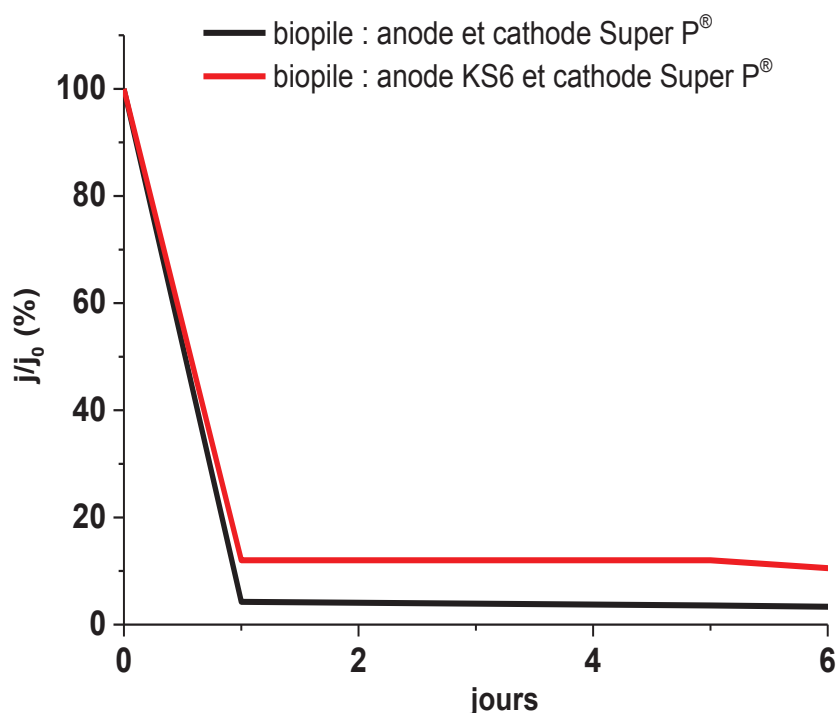


**Figure 11 :** Courbes de polarisation ( $\Delta$ ) et de puissance ( $\square$ ) d'une biopile (bioanode Super P<sup>®</sup> et biocathode Super P<sup>®</sup>): (A) avec une membrane de Nafion<sup>®</sup> (anolyte pH 9 et 70 mM éthanol / catholyte pH 5 avec barbotage d'O<sub>2</sub>) (B) sans membrane (anolyte et catholyte pH 5), tampon phosphate 0,1M.  $v = 3.33 \text{ mV/s}$ .

Sur la figure 11, des pertes de 90% de la densité de courant et de 97% de la densité de puissance sont observées pour la biopile sans membrane. Cette énorme diminution des performances est due à la faible performance de la bioanode à pH 5 comme il a été montré dans la partie bioanode du chapitre I. Nous pouvons conclure que la construction d'une biopile à un seul compartiment (pH5) donne de très faibles performances avec les enzymes laccase et ADH et ne peut pas être envisagée. Nous avons donc choisi de garder la membrane pour la continuité de notre travail.

### I-2-1-3-Stabilité de la biopile

La stabilité des biopiles construites avec une anode KS6 et une cathode Super P<sup>®</sup> et avec une anode Super P<sup>®</sup> et cathode Super P<sup>®</sup> a été testée avec stockage des électrodes à 5C<sup>0</sup> sous atmosphère humide. Les résultats sont montrés sur la figure 12.



**Figure 12:** Évolution du rapport ( $j/j_0$ ) (avec  $j_0$  densité de courant initial) en fonction du temps pour les biopiles KS6/Super P® (courbe rouge) et Super P®/Super P® (courbe noire), après 6 jours de fonctionnement.

La figure 12 indique une chute de performances après un jour. Les biopiles KS6/Super P® et Super P®/Super P® ne délivrent que 12 et 4% respectivement des densités de courant initiales jusqu'à 6 jours. L'ajout d'espèces (enzymes) en solution n'a pas permis de récupérer leurs performances initiales.

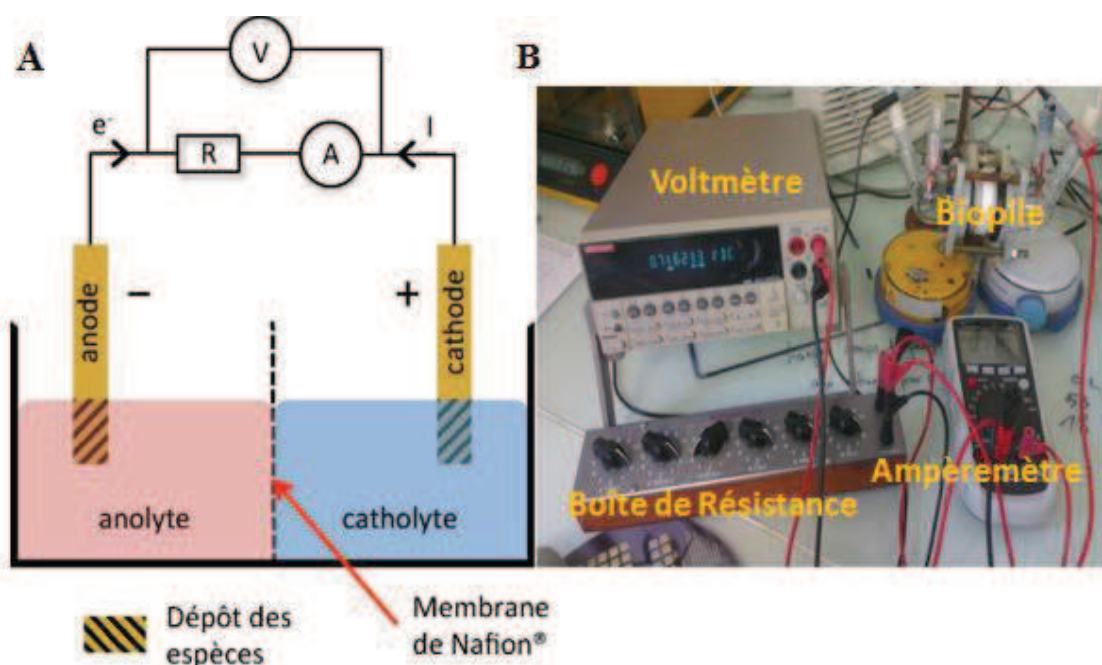
Les biopiles présentent de très faibles performances dans le temps, à cause de la diminution très importante des performances de la bioanode en stockage, qui est probablement due à l'inactivation ou à la dégradation des enzymes comme nous l'avons montré dans le chapitre I. Puisque la biopile KS6/Super P® est plus stable dans le temps nous l'avons envisagée pour le reste du travail.



### I-2-2-Caractérisation des biopiles par résistance imposée

#### I-2-2-1-Montage de caractérisation

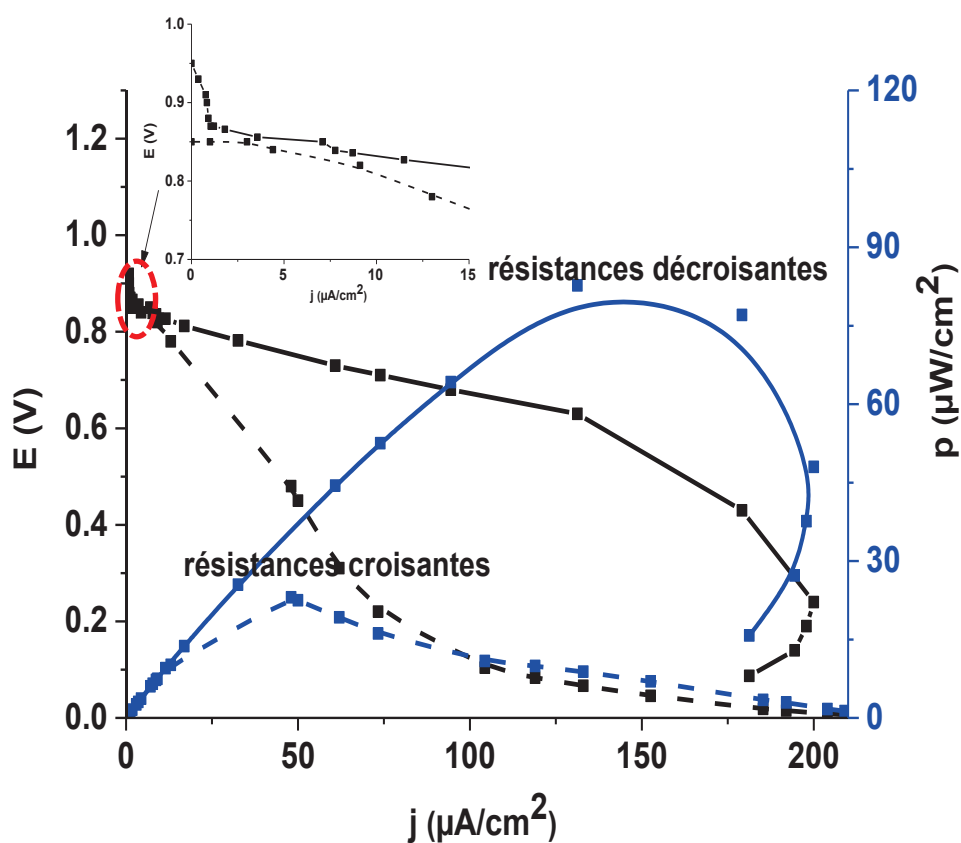
La biopile a été caractérisée par une deuxième méthode de caractérisation qui consiste à imposer au système des résistances variant de  $10\ \Omega$  à  $60\ M\Omega$  et à mesurer la densité de courant et le potentiel de la biopile délivrés pour tracer la courbe  $[E=f(j)]$ . A partir de cette courbe il est possible de déterminer la densité de puissance fournie par la biopile ( $P=E \times j$ ). Nous avons étudié une biopile fonctionnant avec une bioanode KS6 à pH 9 et une biocathode Super P<sup>®</sup> à pH 5 afin de voir l'effet de la méthode de caractérisation sur leurs performances. Le montage utilisé est présenté sur la figure 13.



**Figure 13 :** Schéma (A) et photographie (B) du montage utilisé pour la 2<sup>ème</sup> méthode de caractérisation de la biopile ( $R$  imposées), avec mesure de potentiel ( $V$ ) et de la densité de courant ( $A$ )

#### I-2-2-2-Imposition de résistances croissantes et décroissantes

Nous avons choisi d'évaluer l'influence du sens de variation des résistances imposées ( $R = 10\ \Omega$  à  $60\ M\Omega$  ou  $60\ M\Omega$  à  $10\ \Omega$ ) sur les performances de la biopile. Les résultats sont montrés sur la figure 14.



**Figure 14 :** Courbes de polarisation (courbes noires) et de puissance (courbes bleues) de la biopile biocathode Super P<sup>®</sup>, bioanode KS6 avec une membrane de Nafion<sup>®</sup>, obtenues par variation de résistances imposées de façon décroissante (ligne continue) ou croissante (ligne discontinue). Anolyte pH 9 et 70mM éthanol /catholyte pH 5 avec barbotage d'O<sub>2</sub>, tampon phosphate 0,1M.

**Tableau 3 :** Performances électrochimiques de la biopile KS6/Super P<sup>®</sup>, testée par : polarisation,  $R_{imposées}$  croissantes, et  $R_{imposées}$  décroissantes

Méthodes de caractérisation	ddp à J=0 (V)	ddp à P <sub>max</sub> (V)	Densité de puissance max (μW/cm <sup>2</sup> )	Densité de courant max (μA/cm <sup>2</sup> )
<b>R<sub>imposées</sub> croissantes</b>	0,85	0,48	21	200
<b>R<sub>imposées</sub> décroissantes</b>	0,95	0,57	80	200
<b>Polarisation</b>	1,02	0,62	300	540

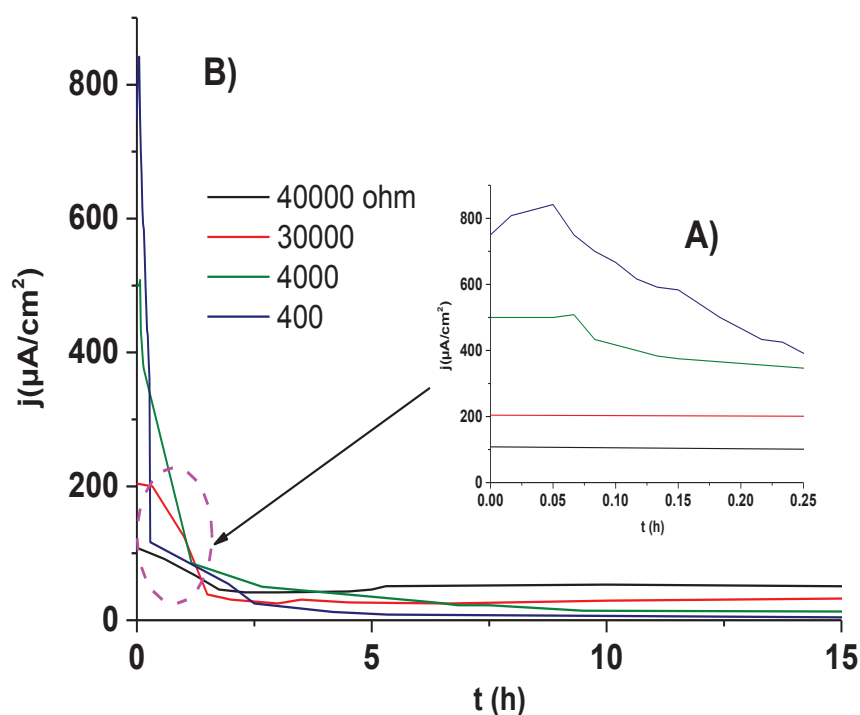
D'après la figure 14 et le tableau 3, nous remarquons que le sens de variation des résistances a une grande influence sur les valeurs de densités de courant et de puissance de la biopile. La densité de puissance obtenue avec des résistances décroissantes imposées est 75% plus élevée que celle obtenue avec des résistances croissantes ( $80 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  par rapport à  $21 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) avec une faible variation de la  $\text{ddp}_{i=0}$  (entre 0,9 et 0,92). En effet, l'imposition de résistances élevées appliquées au système conduit à des courants délivrés faibles (d'après la loi d'ohm  $I = E/R$ ) ce qui conduit à une détérioration ou usure faible du système enzymatique et donc à des performances électriques plus élevées. Par contre, l'application de résistances imposées faibles au début de la décharge de la biopile entraîne un courant délivré élevé, ce qui peut conduire à détériorer l'activité des enzymes (confirmation par l'allure de la courbe de polarisation limitée par le transfert de charges), et donc à une baisse importante des densités de puissance.

En comparant cette méthode de caractérisation à celle obtenue par polarisation, on peut conclure deux choses (tableau 3) : (1) l'allure des courbes avec des résistances imposées (surtout avec des  $R$  croissantes) est différente car cette méthode de mesure est discontinue, et chaque point mesuré est obtenu pour une réponse stable permettant de déterminer le courant et le potentiel. Cet état d'équilibre du système à chaque point mesuré n'est jamais atteint dans la première méthode par polarisation lors du balayage du potentiel, (2) la densité de puissance avec résistances imposées est 70% plus faible comparée avec la méthode de polarisation. Nous pouvons expliquer ces différences de performances de plusieurs façons :

- Le temps de caractérisation des deux méthodes est différent. La méthode avec  $R_{\text{imposée}}$  peut durer des dizaines de minutes, lié au temps d'attente de stabilisation du système, alors que le tracé d'une courbe de polarisation par un potentiostat (balayage du potentiel) dure en moyenne entre 2 et 4 minutes.
- Avec la méthode de caractérisation par  $R_{\text{imposée}}$ , différentes résistances au système sont imposées alors que par polarisation c'est la  $\text{ddp}$  entre les deux bioélectrodes qui est variée.

### **I-2-2-3-Stabilité de la biopile évaluée avec des résistances fixes imposées**

Afin de se situer dans des conditions réelles d'alimentation d'un appareil électrique possédant une résistance donnée, l'efficacité de la biopile a été évaluée en imposant différentes résistances fixes au système (400, 4000, 30000 et 40000  $\Omega$ ). Les résultats sont présentés sur la figure 15.



**Figure 15 :** courbes de la densité de courant en fonction du temps obtenues pour une biopile bioanode KS6 et biocathode Super P<sup>®</sup>, séparées par une membrane de Nafion<sup>®</sup> après : (A) 15min et (B) 15h de fonctionnement. Avec différentes résistances fixes imposées. Anolyte pH 9 et 70 mM éthanol / catholyte pH 5 avec barbotage d'O<sub>2</sub>, tampon phosphate 0,1M.

**Tableau 4 :** Évolution de la densité de courant des biopiles KS6/Super P<sup>®</sup> pour différentes résistances, après 15 min, 3h et 15h de fonctionnement.

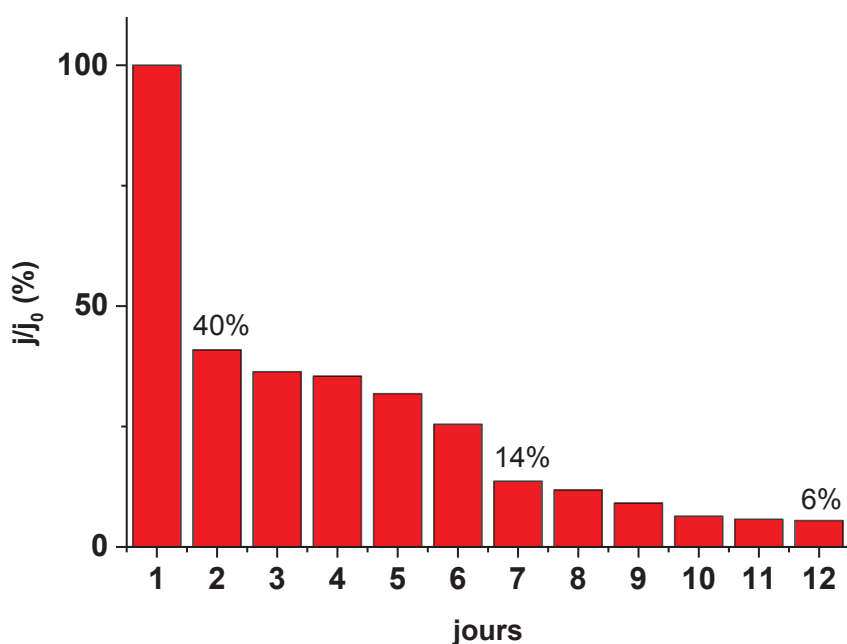
Résistances imposées (Ω)	Densité de courant (μA/cm <sup>2</sup> )			Perte de densité de courant
	t = 15min	t = 5h	t = 15h	
400	500	18	10	98%
4000	400	46	25	93%
30000	200	40	40	80%
40000	100	60	60	40%

D'une manière générale, pendant les 15 premières minutes, plus la résistance appliquée est élevée, plus la densité de courant délivrée est faible (figure 15-A, tableau 4), car d'après la loi d'ohm le courant est inversement proportionnel à la résistance ( $I=E/R$ ).

Sur la figure 15-B, la résistance imposée 400  $\Omega$  conduit à une densité de courant de 820  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (courbe bleue) qui est supérieure à ce que nous avons obtenu par la méthode de polarisation avec la même biopile, mais cette densité de courant diminue très rapidement à 18  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  au bout de 5 heures.

A partir de 5h de fonctionnement et jusqu'au 15h (figure 15-B, tableau 4), on constate que plus la résistance appliquée est élevée, plus la densité de courant augmente (inversement au cas précédent). On constate aussi une perte de 98% de la densité de courant pour la résistance imposée 400  $\Omega$ , alors que cette perte ne diminue que de 40% avec une résistance de 40000  $\Omega$ . Cela peut s'expliquer par une usure du système enzymatique plus importante et plus rapide avec des résistances plus faibles (400 et 4000  $\Omega$ ).

La densité de courant délivrée par la biopile alimentée par une résistance de 40000  $\Omega$  a été évaluée sur 12 jours de fonctionnement continu (figure 16). Cette biopile maintient 40, 14 et 6% de sa densité de courant initial après 2, 7 et 12 jours respectivement, alors que la même biopile testée avec la méthode de polarisation ne garde que 10% de sa densité de courant après 3 jours. Ces faibles densités de courant délivrées par la biopile sont stables sur une période assez longue, et sont probablement significatifs de leur performance réelle, contrairement aux densités de courant importantes délivrées dans la première heure de fonctionnement.



**Figure 16 :** histogramme de l'évolution du rapport ( $j/j_0$ ) (avec  $j_0$  : densité de courant initial) en fonctionnement continu dans le temps pour la biopile KS6/Super P<sup>®</sup> séparée par une membrane de Nafion<sup>®</sup> (anolyte pH 9 + éthanol 70 mM /catholyte pH 5 avec barbotage O<sub>2</sub>) tampon phosphate 0.1M. Alimentée par une résistance fixe de 40000Ω.

Dans cette partie du chapitre II, nous avons développé une biopile alcool/O<sub>2</sub> par assemblage d'une bioanode à éthanol et d'une biocathode à oxygène sur un substrat Au. Ce système délivre une densité de puissance de 350 μW/cm<sup>2</sup> par la méthode de polarisation, et de 80 μW/cm<sup>2</sup> par la méthode de résistance imposée. Les conditions expérimentales optimisées sont :

- Biopile anode KS6, cathode Super P<sup>®</sup> qui donne presque les mêmes performances qu'une biopile anode Super P<sup>®</sup>, cathode Super P<sup>®</sup> mais avec une stabilité un peu meilleure.
- Utilisation d'une membrane de Nafion<sup>®</sup> pour séparer le compartiment anodique et le compartiment cathodique : anolyte pH 9, catholyte pH 5.

Cependant la biopile est caractérisée par des pertes importantes de la densité de puissance au cours du temps qui sont probablement dues à la désorption ou à la détérioration des enzymes. Dans la partie suivante, le substrat Au a été remplacé par le matériau Au/NFsPAN/Si pour développer et optimiser la biopile à partir d'un matériau tridimensionnel.

### **Partie II : Biopile à éthanol/O<sub>2</sub> à base d'électrodes Au/NFsPAN/Si**

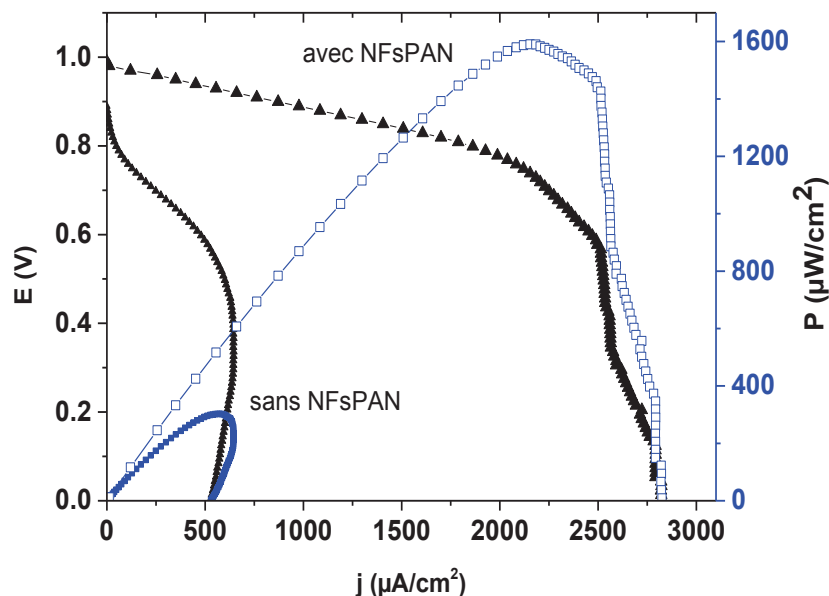
Dans le chapitre I, nous avons présenté les bioélectrodes à base de nanofibres de PAN préparées par la technique d'électrospinning sur un support de silicium puis modifiées par une couche Au de 142 nm d'épaisseur. Leur structure tridimensionnelle permet d'augmenter les densités de courant. Dans cette étude une biopile constituée d'une bioanode et d'une biocathode à base de Au/NFsPAN a été construite.

Le montage utilisé est le même que celui présenté dans la figure 5 de la partie précédente. La biopile a été testée en présence d'une membrane pour séparer les deux bioélectrodes, avec une bioanode KS6 et une biocathode Super P<sup>®</sup>, avec un catholyte pH 5 et anolyte pH 9 et en utilisant les deux méthodes de caractérisation présentées avant (polarisation et résistance imposée).

#### **II-1- Caractérisation de la biopile Au/NFsPAN**

##### **II-1-1- Caractérisation par polarisation**

Dans un premier temps, les performances électriques de la biopile éthanol/O<sub>2</sub> ont été évaluées à partir des courbes de polarisation présentées sur la figure 17.



**Figure 17 :** Courbes de polarisation ( $\Delta$ ) et de puissance ( $\square$ ) d'une biopile avec une bioanode KS6 et une biocathode Super P<sup>®</sup> séparées par une membrane de Nafion<sup>®</sup>, construite avec et sans NFsPAN, anolyte pH 9 + éthanol 70mM / catholyte pH 5 avec barbotage O<sub>2</sub>, tampon phosphate 0,1M.  $v = 3.33 \text{ mV/s}$

La figure 17 montre la tension de la cellule et la densité de puissance délivrées en fonction de la densité de courant. En absence de Au/NFsPAN, le potentiel à courant nul de la biopile est 0,90V et la courbe de polarisation montre une chute de potentiel correspondant aux pertes d'activation qui sont la conséquence de la cinétique d'électrodes atone. Par contre, la biopile construite à base de Au/NFsPAN présente un potentiel à courant nul de 1 V, et surtout une région de polarisation ohmique considérablement étendue de 1 à 0,7 V, suivie d'une chute de potentiel correspond à la limitation du transport de masse d'éthanol et d'O<sub>2</sub> à travers la matrice pour des densités de courant d'environ 2,2 mA/cm<sup>2</sup>. La densité de puissance maximale délivrée par la biopile à base de Au/NFsPAN est de 1.6 mW/cm<sup>2</sup> à 0,75 V, ce qui est cinq fois supérieur à la densité de puissance délivrée par la biopile construite à partir des bioélectrodes sans NFsPAN. Les densités de courant élevées mesurées pour les électrodes modifiées par des nanofibres peuvent être attribuées à la structure poreuse du PAN qui contribue à des charges élevées d'enzymes immobilisées et à un transport plus efficace des espèces à travers la matrice.

La stabilité de cette biopile a été testée pendant 5 jours avec stockage des électrodes sous atmosphère humide. Les résultats de la densité de puissance délivrée en fonction du temps sont montrés sur le tableau 5.



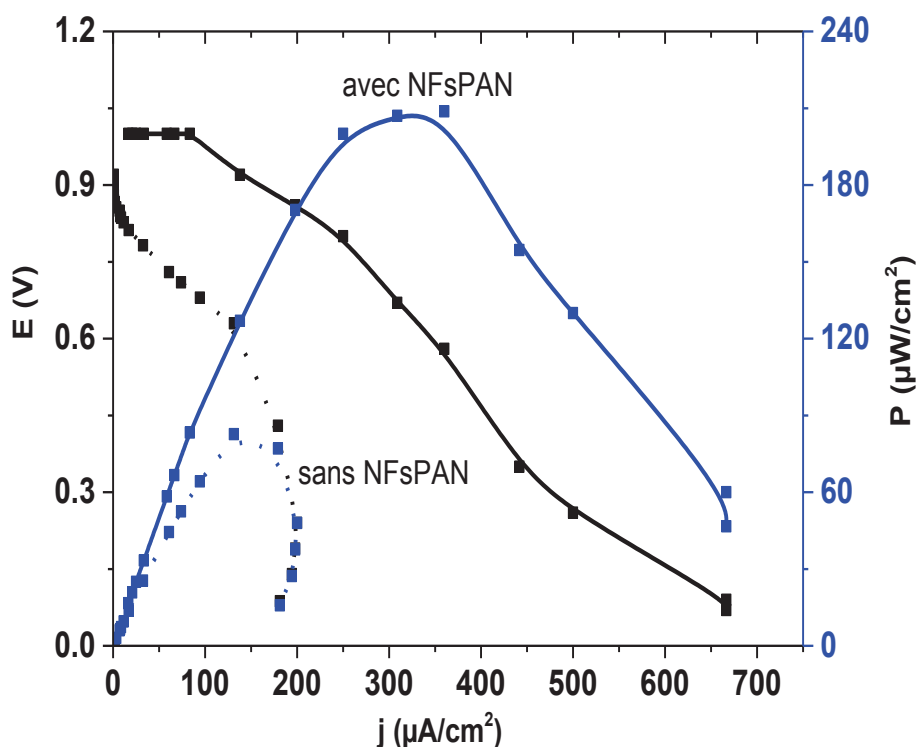
**Tableau 5 :** densité de puissance délivrée par la biopile avec une bioanode KS6 et une biocathode Super P<sup>®</sup> construite avec et sans Au/NFsPAN, après 1, 3 et 5 jours de stockage.

Densité de puissance en fonction du temps	P à T <sub>0</sub> (μW/cm <sup>2</sup> )	P à T <sub>3j</sub> (μW/cm <sup>2</sup> )	P à T <sub>5j</sub> (μW/cm <sup>2</sup> )
<b>Biopile à base de Au/NFsPAN</b>	1600	400	300
<b>Biopile à base de Au</b>	350	30	20

D'après le tableau 5, nous constatons une perte importante de la densité de puissance de 81 et 95% pour la biopile construite avec et sans NFsPAN respectivement après 5 jours de stockage, due à la désactivation de l'anode comme nous l'avons expliqué précédemment. Malgré ces pertes de performances, la biopile en présence de PAN a fourni après 5 jours une densité de puissance de 300 μW/cm<sup>2</sup> équivalent à la performance initiale de la biopile sans PAN, ce qui montre l'influence importante des Au/NFsPAN pour améliorer les performances de la biopile.

### II-1-2- Caractérisation par résistance imposée

Dans un deuxième temps, afin d'évaluer l'efficacité de la biopile en vue d'une application réelle, nous avons caractérisé ses performances électriques par résistances imposées. Nous avons imposé des résistances décroissantes (de 6 MΩ à 10 Ω) afin de ne pas détériorer rapidement la biopile. Le montage utilisé est le même que celui présenté sur la figure 14. Les courbes tension de cellule et densité de puissance en fonction de la densité de courant sont présentées sur la figure 18, et comparées à la biopile sans PAN.

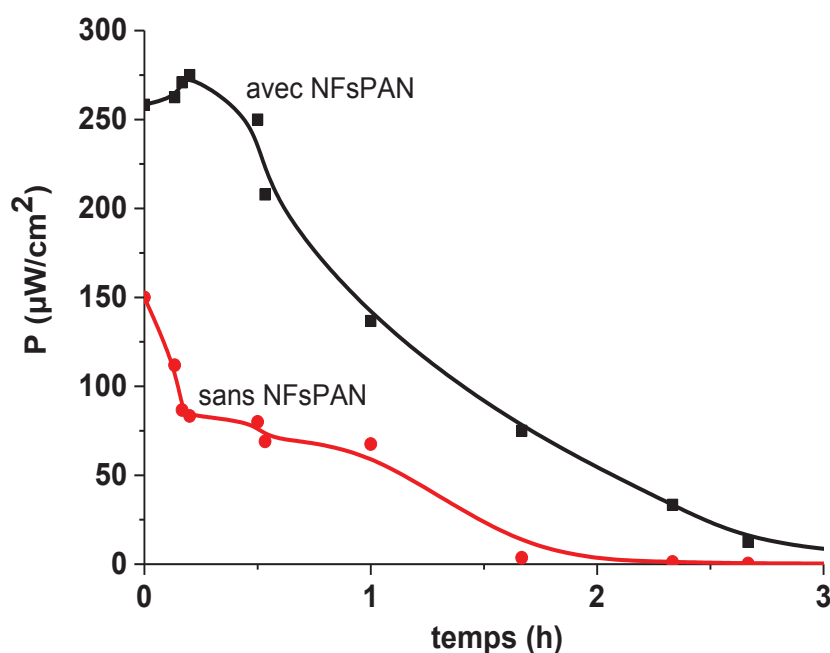


**Figure 18 :** Courbes de polarisation (courbes noires) et de puissance (courbes bleues) de la biopile : Super P<sup>®</sup> cathode, KS6 anode séparées par une membrane de Nafion<sup>®</sup>, obtenues par variation de résistances imposées de 6 MΩ à 10 Ω, avec NFsPAN (ligne continue) et sans NFsPAN (ligne discontinue). Anolyte pH 9 et 70 mM éthanol / catholyte pH 5 avec barbotage d'O<sub>2</sub>, tampon phosphate 0,1M.

Une différence remarquable entre les deux biopiles construites avec et sans NFsPAN est la densité de puissance maximale délivrée de 210 et 80 μW/cm<sup>2</sup> respectivement (figure 18). Cela confirme l'effet des Au/NFsPAN pour améliorer les performances de la biopile à éthanol/O<sub>2</sub>.

Nous remarquons également une baisse de densité de puissance de 80% par rapport à la biopile testée avec la méthode de polarisation qui peut être due soit à la différence de temps de caractérisation des deux méthodes, ou à la nature de la méthode elle-même.

La densité de puissance délivrée par la biopile en fonction du temps (avec et sans PAN) a été testée avec une résistance imposée de 4000 Ω (figure 19). La résistance de 4000 Ω correspond au point de fonctionnement à E = 0,7 V/ECS et j = 170 μA/cm<sup>2</sup> (figure 19 avec PAN) qui a été choisi de manière à ne pas atteindre la densité de puissance maximale afin de ne pas décharger très vite la biopile.



**Figure 19 :** Évolution de la densité de puissance en fonction du temps pour des biopiles KS6/Super P<sup>®</sup> séparées par une membrane de Nafion<sup>®</sup>, avec et sans NFsPAN, avec résistance imposé 4000 Ω pendant 3h de fonctionnement continu. Anolyte pH 9 et 70 mM éthanol / catholyte pH 5 avec barbotage d'O<sub>2</sub>, tampon phosphate 0,1M.

La figure 19 indique des différences importantes de performances entre les deux biopile construites avec et sans PAN :

- Entre 0 et 30 minutes : en présence de PAN, la densité de puissance initiale est 255  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  et se stabilise, alors qu'en absence de PAN la densité de puissance initiale est 150  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  et diminue rapidement (12 minutes) à 80  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .
- Entre 30 minutes et 3 heures : en présence de PAN la densité de puissance diminue progressivement avec le temps jusqu'à 20  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  (soit 8% de la densité de puissance initiale), alors qu'en absence de PAN elle se stabilise à 50  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  jusqu'à 1h puis diminue à 2  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  (soit 1% de la densité de puissance initiale) après 3h de fonctionnement.

Ce résultat montre encore la capacité du matériau de polyacrylonitrile tridimensionnelle en tant que nouveau matériau nanostructuré avec une grande surface spécifique pour fournir des charges élevées d'enzymes et améliorer les performances électrochimiques d'une biopile à éthanol/O<sub>2</sub> présentée dans ce travail.

La comparaison de ces résultats avec la littérature n'est pas simple par la grande variété des paramètres caractérisant les biopiles comme la nature du substrat, la méthode d'immobilisation des espèces réactives, le design du système.... Comme il a été cité dans la partie bibliographique, il y a dans la littérature quelques travaux sur les biopiles à éthanol/O<sub>2</sub>. Topcagic et al. [1] ont développé une biopile à base de carbone vitreux / ADH, AldDH à l'anode et du tissu de carbone/BOD à la cathode capable de délivrer une puissance de 300  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . L. Nick et al. [8] ont construit une biopile hybride à éthanol/O<sub>2</sub> avec du feutre de carbone/ADH-NAD<sup>+</sup> à l'anode et du Pt à la cathode. Cette biopile a fourni une densité de puissance de 1,55  $\text{mW}/\text{cm}^2$  qui est proche de notre résultat, mais avec une cathode abiotique (Pt). Deng et al. [5] ont construit une biopile à éthanol/O<sub>2</sub> à base d'un substrat de feutre de carbone modifié par des nanoparticules d'or comme matériau d'électrode, avec les enzymes ADH, NAD<sup>+</sup> et le médiateur MDB (Meldola blue) à l'anode et la laccase à la cathode. Cette biopile a fourni une densité de puissance de 1,5  $\text{mW}/\text{cm}^2$  grâce à la grande surface spécifique de feutre de carbone et à l'incorporation de MDB et des NPs-Au qui améliorent le contact entre l'ADH et le substrat. Cette biopile a été testée aussi en stabilité avec une résistance imposée de 400  $\Omega$  et elle a délivré une densité de puissance de 2  $\text{mA}/\text{cm}^2$  stable pendant 10 heures. La biopile développée dans ce travail a fourni des courants élevés mais pas suffisamment stable à cause de la perte d'activité enzymatique à l'anode. Cette biopile à éthanol/O<sub>2</sub> présente cependant une haute efficacité et compétitivité avec les biopiles éthanol/O<sub>2</sub> basées sur la modification de matériaux conducteurs commerciaux comme des fibres de carbone [16,17,21-23].

Pour résumer cette partie, une biopile à éthanol/O<sub>2</sub> a été développée par assemblage d'une bioanode (oxydation de l'éthanol par l'enzyme ADH) et d'une biocathode (réduction de l'oxygène par l'enzyme laccase), sur des électrodes Au/NFsPAN/Si, avec les meilleures conditions expérimentales optimisées dans la première partie (pH, nature de la poudre de carbone...). Cette biopile a fourni une densité de puissance de 1600  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  obtenue par la méthode de polarisation et 210  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  obtenue par résistance imposée.

L'incorporation de nanofibres de PAN/Au comparée à une électrode Au nue améliore de façon majeure les performances électriques de la biopile (75%), ce qui démontre l'importance de ce matériau d'électrode pour une utilisation dans les biopiles à combustible.

### Conclusion

Les biopiles à éthanol/O<sub>2</sub> ont récemment attiré une attention considérable pour la conversion de l'énergie chimique en électricité grâce à des catalyseurs enzymatiques immobilisés sur des électrodes. Ces dispositifs sont construits à partir de l'assemblage d'une bioanode, où s'oxyde le carburant, et d'une biocathode qui réduit le comburant.

Dans ce travail, nous avons exploré la synthèse et la capacité du matériau de polyacrylonitrile tridimensionnel, préparé par électrospinning combinée avec la pulvérisation cathodique, en tant que nouveau matériau nanostructuré avec une grande surface spécifique pour fournir des charges élevées d'enzymes et améliorer les performances électrochimiques des électrodes enzymatiques dans une biopile à éthanol/O<sub>2</sub>. L'électrospinning est un processus unique qui produit efficacement un tapis de fibres (diamètre  $\mu\text{m}$ ) avec des compositions et des tailles contrôlables en quelques minutes à partir d'une variété de précurseurs de polymère. Cette structure fibreuse permet une manipulation facile et une surface spécifique élevée.

La biopile éthanol/O<sub>2</sub> à base de Au/NFsPAN a délivré des densités de puissance de  $1600 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , soit presque 5 fois supérieures à celles délivrées par une biopile en absence de NFsPAN. Cependant ce système subit des pertes importantes de la densité de puissance au cours de temps, qui ont été attribuées à la désorption et/ou à la détérioration des enzymes.

Dans ce travail nous avons utilisé deux méthodes de caractérisation, la méthode de polarisation et celle par résistance imposée, qui ont conduit à des performances électriques très différentes. Il semble que la caractérisation du système par résistance imposée se rapproche mieux du fonctionnement réel d'une biopile alimentant un appareil électrique contenant une résistance. Pour les deux méthodes de caractérisation les performances des biopiles sont améliorées par l'efficacité des nanofibres.

Une autre piste intéressante est la miniaturisation de la biopile à éthanol/O<sub>2</sub> développée à partir d'électrodes Au en vue d'alimenter des petits appareils électroniques portables. Nous allons présenter dans le chapitre suivant, la miniaturisation de la macrobiopile éthanol/O<sub>2</sub> construite dans ce travail sur des électrodes Au à partir des techniques de microfabrication.

### Références

- [1] S. Topcagic, S. D. Minter, *Electrochimica Acta* 51 (2006) 2168-2172.
- [2] R. L. Arechederra, B. L. Treu, S. D. Minter, *Journal of Power Sources* 173 (2007) 156-161
- [3] A. Ramanavicius, A. Kausaitea, A. Ramanaviciene, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 761-766.
- [4] P. K. Addo, R. L. Arechederra, S. D. Minter, *Electroanalysis* 22 (2010) 807-812.
- [5] L. Deng, L. Shang, D. Wen, J. Zhai, S. Dong, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2010) 70-73.
- [6] F.P. Cardoso, S. A Neto, P.G. Fenga, P. Ciancaglini, A.R. De andrade, *Electrochimica Acta* 90 (2013) 90-94.
- [7] G. Tayhas, R. Palmore, H Bertschy, S. H. Bergens, G. M. Whitesides, *Electroanalytical Chemistry* 443 (1998) 155-161.
- [8] N. L. Akers, C. M. Moore, S. D. Minter, *Electrochimica Acta* 50 (2005) 2521-2525
- [9] E. V. Plotkin, I. J. Higgins, H.A.O. Hill, *Biotech. Lett.* 3 (1981). 187-192.
- [10] P. L. Yue, K. Lowther, *Chem. Eng. J.* 33 (1986) 69-77.
- [11] M. H. Osman, A. A. Shah, F. C. Walsh, *Biosensors & Bioelectronics* 26 (2011) 3087-3102.
- [12] S. D. Minter, P. Atanassov, H. R. Luckarift, G. R Johnson. *Materials Today* 15 (2012) 166-173.
- [13] J. Y. Lee, H. Y. Shin, S. W. Kang, C. Park, S. W. Kim, *Power Sources* 195 (2010) 750-755.
- [14] D. Ivnitski, B. Branch, P. Atanassov, C. Apblett, *Electrochemistry Communications* 8 (2006) 1204-1210.
- [15] A. F Che, V. Germain, M. Cretin, D. Cornu, C. Innocent, S. Tingry, *New Journal of Chemistry* 35 (2011) 2848-2853.
- [16] S. Topcagic, S. D. Minter, *Electrochimica Acta* 51 (2006) 2168-2172.

- [17] L. Deng, F. Wang, H. Chen, L. Shang, L. Wang, T. Wang, S. Dong, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 329-333.
- [18] K. Murata, K. Kajiya, N. Nakamura, H. Ohno, *Energy & Environmental Science* 2 (2009) 1280-1285.
- [19] A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin, S. Cosnier, *Nat Commun* 2 (2011) 370-376.
- [20] J. Kim, K. H Yoo, *Physical Chemistry Chemical Physics* 15 (2013) 3510-3517.
- [21] N. L. Akers, C. M Moore, S. D. Minteer, *Electrochimica Acta* 50 (2005) 2521-2525.
- [22] G. Li, J. Hao, *Electrochemical Society*, 156 (2009) 134-138.
- [23] S. N. Aquino, J. C. Forti, V. Zucolotto, P. Ciancaglini, A. R. de Andrade, *Biosensors & Bioelectronics* 26 (2011) 2922-2926.

## **Chapitre III : miniaturisation des biopiles**



### Introduction

Les biopiles miniaturisées ont fait leur apparition pour permettre aux petits appareils autonomes et portables de répondre aux défis techniques importants, comme (1) le développement d'électrodes de petite taille avec une géométrie optimisée pour maximiser l'utilisation du carburant, la densité de courant, et minimiser la résistance ohmique, et (2) le couplage efficace des enzymes avec les surfaces des électrodes pour assurer une densité élevée de biocatalyseurs dans leur conformation active. L'objectif de ces dispositifs est de fournir des performances similaires aux biopiles à combustible classiques en termes d'efficacité et de densité de puissance tout en utilisant moins de réactifs et moins de consommation dans le temps.

Le nombre de biopiles glucose/O<sub>2</sub> miniaturisées mentionnées dans la littérature est seulement limité à quelques dispositifs qui ont principalement été conçus par diminution de l'échelle des composants fonctionnels tels que les électrodes [1-3]. Heller et al. [1-2] ont développés des fibres de carbone de diamètre 7 µm et de longueur 2 cm, modifiées par des bioélectrocatalyseurs pour augmenter le flux de diffusion des réactifs. Un autre type de biopile miniaturisée a été également construit à partir d'électrodes en platine modifiées par des capillaires en céramique de 3 mm de diamètre intérieur et contenant des enzymes mélangées avec de la pâte de carbone [3]. Actuellement, dans ces dispositifs, la densité de courant et la puissance délivrée est principalement limitée par la diffusion du carburant jusqu'à la surface des électrodes.

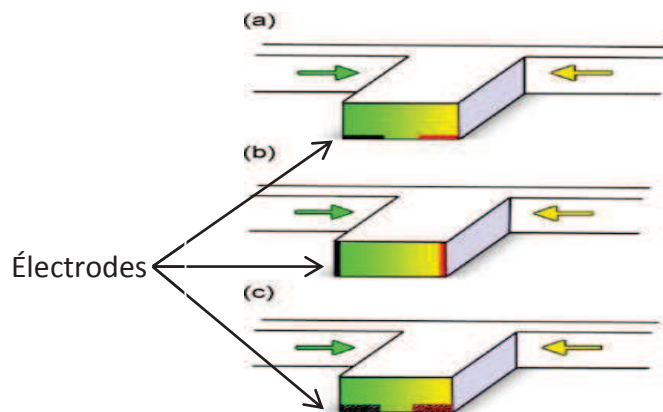
Une autre alternative pour miniaturiser une biopile consiste à fabriquer des systèmes à l'aide des techniques de microfabrication pour inclure les composants fondamentaux de la biopile (solutions et électrodes) dans un réseau unique microstructuré. La microfluidique s'est mis au service de l'électrocatalyse pour la fabrication de piles à combustibles, voire de biopiles miniatures [4-6].

Ce chapitre présente la description de cette technologie et son application aux biopiles enzymatiques. Dans la première partie, des généralités sur la microfluidique et les piles à combustible microfluidiques sont présentées. La deuxième partie est consacrée au développement et à la caractérisation électrochimique d'une biopile microfluidique à éthanol/O<sub>2</sub>, inspirée de la fabrication des électrodes macroscopiques étudiées précédemment. Dans une troisième partie, une première biopile microfluidique 3D à glucose/O<sub>2</sub> est présentée avec assemblage des électrodes en série ou parallèle et fonctionnant avec des enzymes (Glucose oxydase et Laccase) en solution.

### Partie I : Généralités sur les piles à combustible microfluidiques

Les dispositifs microfluidiques pour la conversion d'énergie ont été récemment présentés par Pennathur et al. [7], en mettant l'accent sur la miniaturisation des machines de conversion d'énergie conventionnelles et de dispositifs microfluidiques. Des piles à combustible microfluidiques, parfois appelé piles à combustible à base d'écoulement laminaire ou piles à combustible sans membrane, décrivent un groupe de piles à combustible pouvant fonctionner dans le cadre d'une puce microfluidique. Une pile à combustible microfluidique est définie comme étant une pile à combustible avec un fluide en mouvement, les sites de réaction et l'ensemble des structures d'électrodes étant confinés dans un canal microfluidique. Ce type de pile fonctionne sans barrière physique, comme une membrane, pour séparer l'anode et la cathode, et peut utiliser des catalyseurs métalliques [8].

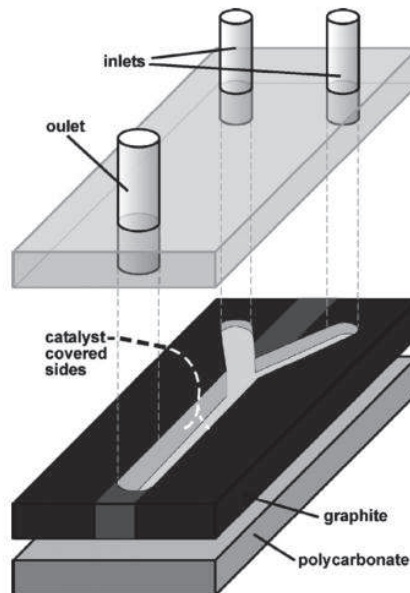
La figure 1 montre les différentes architectures de piles à combustible microfluidiques présentées à ce jour. Ces architectures comprennent les configurations communes où deux flux sont combinés horizontalement dans un canal de forme T ou Y avec : des électrodes en bas (Figure 1-a), des électrodes sur les côtés (figure 1-b), et des électrodes poreuses en bas (Figure 1-c) [8].



**Figure 1 :** Représentation d'architectures de piles à combustible microfluidiques avec différents positionnements des électrodes dans le micro-canal. Chaque architecture est représentée avec le carburant en vert, le comburant en jaune, les cathodes en rouge et les anodes en noir [8].

On peut définir la microfluidique comme la science et la technologie des systèmes d'écoulement possédant au moins l'une des dimensions caractéristiques de l'ordre de quelques micromètres.

Une puce microfluidique est un système contenant un ou plusieurs microcanaux gravés dans un matériau qui peut être de différentes natures (polymère, verre, ou silicium). Les microcanaux constituant la puce microfluidique sont connectés entre eux de manière à réaliser une fonction voulue. Ce réseau de microcanaux enfermé dans la puce microfluidique est relié à l'extérieur par des entrées et des sorties percées à travers la puce. Ce sont par ces trous que les liquides (ou les gaz) sont injectés et évacués de la puce microfluidique (Figure 2).



*Figure 2 : puce microfluidique [8]*

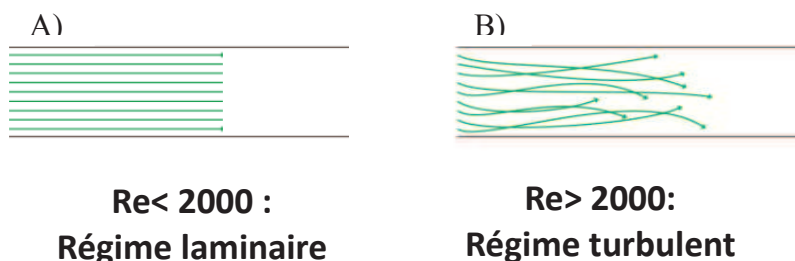
Dans les configurations les plus courantes, les piles à combustible microfluidiques utilisent un flux microfluidique avec un écoulement laminaire pour éviter le mélange convectif du combustible et du comburant. Ce régime d'écoulement est caractérisé par un faible nombre de Reynolds (eq1):

$$Re = \frac{\rho \langle V \rangle d}{\eta} \quad (\text{eq1})$$

où  $\rho$  : la densité du fluide,  $\langle V \rangle$  : la vitesse moyenne,  $D$  : le diamètre hydraulique et  $\eta$  : la viscosité dynamique.

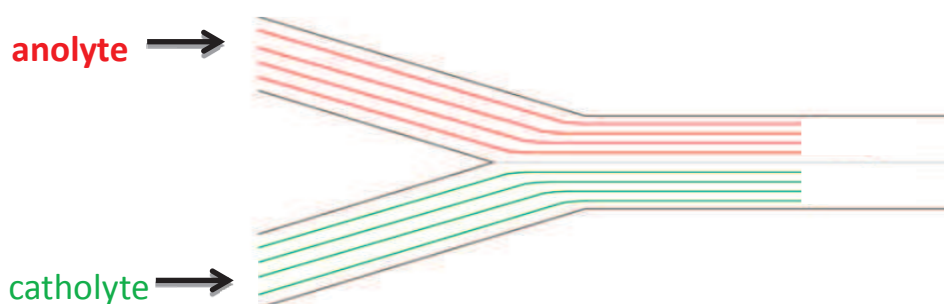
## Chapitre III

Ce nombre de Reynolds permet de déterminer le régime d'écoulement des solutions traversant un microcanal (figure 3) :



**Figure 3** : régimes d'écoulement d'un fluide dans un microcanal

Pour un nombre de Reynolds  $> 2000$  le régime est turbulent, les deux solutions se mélangent dans le microcanal (figure 3-B). Par contre, dans le cas où le nombre de Reynolds est faible ( $< 2000$ ), le régime est laminaire (figure 3-A) et les deux flux coulent côte à côte dans le canal microfluidique, l'un contenant le carburant (anolyte) et l'autre contenant le combustible (catholyte), comme indiqué dans la Figure 4.



**Figure 4** : schéma d'un canal microfluidique contenant deux solutions (anolyte et catholyte) en régime laminaire

L'intérêt principal de la microfluidique réside dans les dimensions du microcanal où les fluides s'écoulent. Dans un microcanal, généralement la hauteur est plus petite par rapport

à la largeur et la longueur, ce qui donne un nombre de Reynolds très faible dans les biopiles microfluidiques d'où le régime d'écoulement est laminaire.

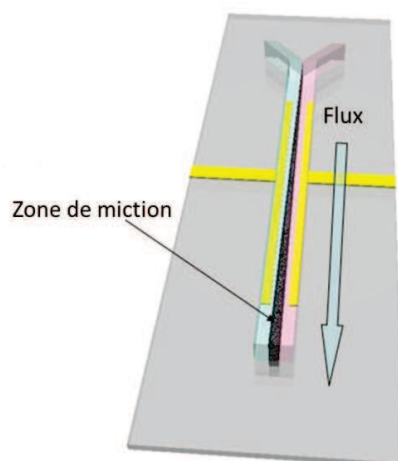
La conception des piles à combustible microfluidiques permet d'éviter de nombreux problèmes rencontrés dans les piles à combustible classique avec membrane, comme l'humidification et la dégradation de la membrane, et le croisement de carburant. Cette configuration de pile à combustible microfluidique permet également de choisir la composition des flux d'anolyte et de catholyte de façon indépendante, d'éviter le croisement de réactifs entre l'anolyte et le catholyte ce qui permet d'améliorer les vitesses de réaction et la tension de la cellule [8-10]. Tous ces avantages sont obtenus à la condition nécessaire que le design de la puce soit adapté précisément aux conditions expérimentales : viscosités des solutions, débits des fluides, coefficients de diffusion, etc... L'avantage le plus important lié aux piles à combustible microfluidiques est l'aspect économique (fonctionnent sans membrane, température ambiante...) [8].

Dans les piles microfluidiques il y a deux principaux facteurs qui limitent leurs performances:

- La zone de miction: c'est une zone localisée au milieu du microcanal où les 2 solutions peuvent diffuser comme montré sur la figure 5. C'est un paramètre qu'il faut prendre en considération lors du design des électrodes. La dimension de cette zone de diffusion est calculée par l'équation suivante [11] :

$$\delta_{mix} = \left(\frac{Dhx}{Q}\right)^{1/3} \text{ (eq 2)}$$

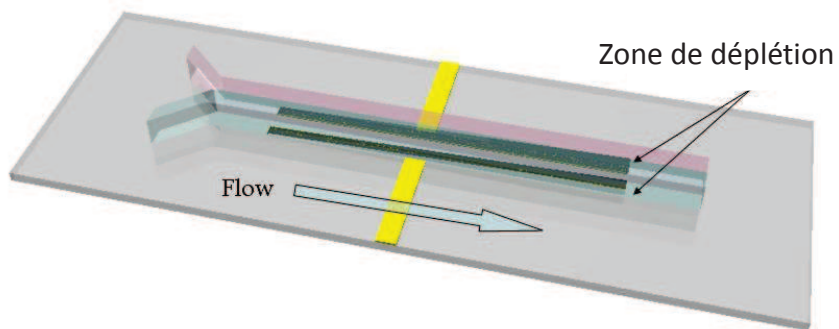
avec  $\delta_{mix}$  : largeur de la zone de miction, D : coefficient de diffusion, h : hauteur du canal, x : position dans le canal et Q : le débit d'écoulement du flux.



**Figure 5 :** Schéma d'un écoulement laminaire dans un microcanal avec la formation de la zone de diffusion

Il est de plus possible de limiter ce phénomène en augmentant la vitesse de débit d'écoulement du flux ( $Q$ ). Il a été démontré par Zebda et ses collaborateurs que cette zone de diffusion mesure  $46\text{ }\mu\text{m}$  de large et n'affecte pas les performances d'une biopile avec des électrodes de  $1\text{ cm}$  de longueur espacées d'un millimètre et pour un flux de  $100\text{ }\mu\text{L/min}$  [11].

- La zone de déplétion : la consommation des réactifs à la surface des électrodes est un autre paramètre important lors du fonctionnement d'une pile microfluidique. Dans un système microfluidique, le transfert de masse est assuré à la fois par convection et diffusion. Cependant, le phénomène convectif domine et conduit à l'appauvrissement de la solution en espèces réactives localisé à la surface de l'électrode, appelée zone de déplétion (figure 6).



*Figure 6 : Schéma d'un écoulement laminaire dans un microcanal avec la formation de la zone de déplétion à la surface des électrodes*

### Partie II : Biopiles microfluidiques à éthanol/O<sub>2</sub> avec enzymes immobilisées

Bien que les piles à combustible microfluidiques enzymatiques soient une technologie jeune, des progrès importants ont été accomplis dans le domaine [11, 14-16]. Deux types de biopiles microfluidiques ont été développées (tableau 1), à savoir : les biopiles à base d'électrodes nues avec des enzymes en solution [12-13] et les biopiles constituées de bioélectrodes avec les enzymes immobilisées sur les électrodes [14, 17, 18].

Les biopiles à combustible microfluidiques avec des enzymes en solution délivrent des densités de puissance significativement plus élevées que celles avec des bioélectrodes (enzymes immobilisées). La plus grande puissance rapportée à ce jour pour une pile à combustible enzymatique microfluidique est 0,5 mW.cm<sup>-2</sup> à 0,22 V avec un débit des solutions 0,3 ml/min [13]. En revanche, les biopiles à combustible avec des enzymes immobilisées, fournissent de plus faibles densités de puissance, mais elles sont plus rentables car elles fonctionnent à partir de quantités en enzyme beaucoup plus faibles. Peu de travaux sur les biopiles microfluidiques avec des enzymes immobilisées [14, 17, 18] sont décrites dans la littérature. Les densités de puissance les plus élevées obtenues à ce jour pour des biopiles à combustible microfluidiques en utilisant des bioélectrodes ont été récemment rapportées, générant 30 μW/cm<sup>2</sup> [17], 2 μW/cm<sup>2</sup> [14] et 64 μW/cm<sup>2</sup> [18]. Beneyton et al. ont rapporté la première biopile à combustible microfluidique avec des enzymes liées de façon covalente à l'électrode [14] fonctionnant avec l'oxydation du glucose à l'anode et avec la réduction de l'oxygène par la laccase à la cathode. Très récemment, J. Maria et al. ont développé une biopile microfluidique glucose/O<sub>2</sub>. Un polymère de polyéthylénimine à base de ferrocène lié à la glucose oxydase (GOx/Fc-C<sub>6</sub>-LPEI) a été utilisé à l'anode, tandis que la cathode a été modifiée par un mélange de laccase et de nanotubes de carbone multi-parois piégés dans une matrice de Nafion<sup>®</sup> modifié au préalable par le tétrabutylammonium bromure (MWCNTs/laccase/TBAB-Nafion<sup>®</sup>) [18].

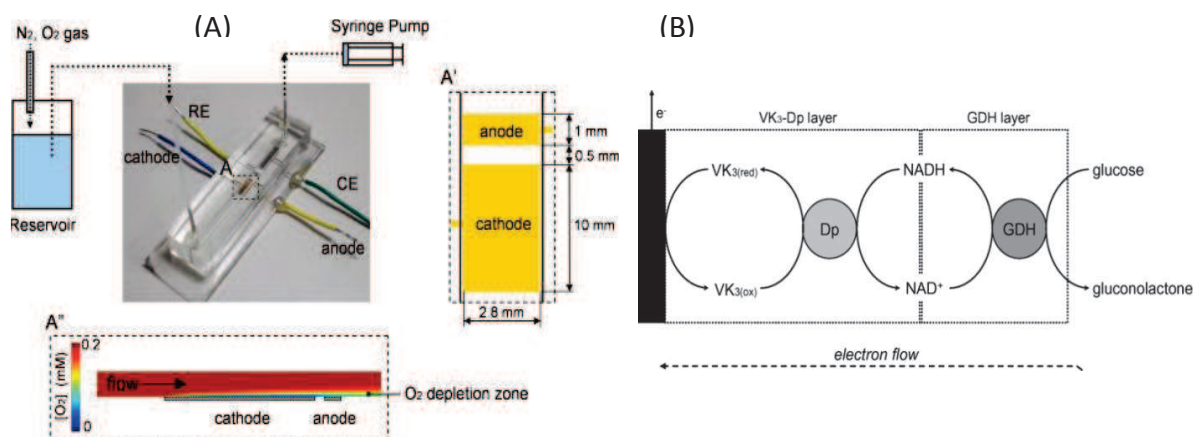


## Chapitre III

**Tableau 1 :** Caractéristiques des biopiles microfluidiques en présence d'enzymes en solution ou immobilisées à la surface des électrodes.

Matériau d'anode	Anolyte	Matériau de cathode	Catholyte	P ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )	Ref
Enzymes en solution					
Au	Acétate/ABTS	Au	Laccase/ABTS/ $\text{O}_2$	25	Lim et al [19]
Au	Glucose/ Glucose oxydase	Au	Laccase/ $\text{O}_2$	110	Zebda et al [12]
Enzymes immobilisées					
Dp/VK3-poly-1-lysine et GDH avec noir de carbone sur Au	Glucose/ $\text{NAD}^+$	PDMS modifié par Pt	$\text{O}_2$	20	Togo et al [17]
GOD /SWCNT sur le verre	Glucose FEMOL	Laccase SWCNT sur le verre	$\text{O}_2$ /ABTS	1,57	Beneyton et al [14]
GOX/FcC6-LPEI sur résine photosensible pyrolysée (PPF)	Glucose	MWCNT / Laccase /TBAB-Nafion sur résine photosensible pyrolysée (PPF)	$\text{O}_2$	64	Maria-J et al [18]

Nous pouvons également citer le travail de Togo et al. qui ont développé une biopile microfluidique à glucose/ $O_2$ . L'anode a été préparée par immobilisation de la glucose déshydrogénase (GDH) dans un mélange de poly-L-lysine (PLL), déposé sur Au et modifié par un mélange de poudre de carbone, de diaphorase et de  $VK_3$  dans le polymère PLL (figure 7-B). A la cathode, la bilirubine oxydase (BOD) a été déposée sur Au en présence de poudre de carbone et de poly(tetrafluoroéthylène) [17]. Les électrodes ont été placées dans un microcanal contenant les solutions de glucose et d'oxygène (figure 7-A). Pour empêcher l' $O_2$  d'atteindre l'anode où il y a l'oxydation du glucose, la cathode a été placée en amont avec une taille supérieure à l'anode (figure 7-A'). Afin de confirmer l'absence d' $O_2$  à l'anode, une simulation a été effectuée le long du canal pour évaluer la formation de la couche de déplétion d' $O_2$  (figure 7-A").



**Figure 7 :** cellule microfluidique développée par Togo et al (A), avec schéma de configuration des électrodes (A') et de simulation de la couche de déplétion d' $O_2$  (A''). Mécanisme d'oxydation du glucose catalysé par l'électrode PLL- $VK_3$ /Dp/ $NAD^+$ /GDH (B) [17].

La densité de puissance maximale délivrée par cette biopile a été de  $20 \mu W/cm^2$  à 0,29V avec un débit de 1 ml/min [17], avec la cathode disposée en aval de l'anode, démontrant l'effet de la configuration des électrodes sur la diminution de la couche de déplétion du carburant et de l'oxydant.

Dans ce travail, nous présentons le développement de la première biopile microfluidique à éthanol à base de bioélectrodes (enzymes immobilisées) opérant dans un canal microfluidique en forme de Y pour générer des densités de puissance maximales. Les

électrodes et le microcanal ont été fabriqués en collaboration avec l'Institut des Nanotechnologies de Lyon. A l'anode, l'éthanol est oxydé par l'alcool déshydrogénase, tandis qu'à la cathode, l'oxygène est réduit par la laccase. Les caractérisations électrochimiques du dispositif ont été effectuées en faisant varier la configuration de l'électrode et la vitesse de débit d'écoulement des solutions à travers le microcanal. En particulier, le travail porte sur l'influence des poudres de carbone, utilisées en mélange avec les enzymes, sur le transfert d'électrons dans le but d'améliorer l'efficacité du processus bioélectrocatalytique.

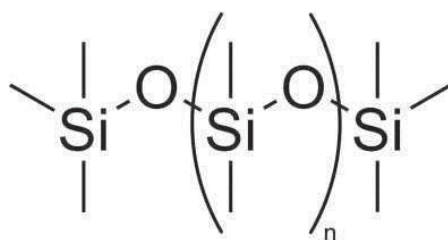
### II-1 Construction d'une biopile microfluidique à éthanol/O<sub>2</sub> avec enzymes immobilisées

Nous allons présenter dans le travail suivant, la préparation des bioélectrodes inspirée des bioélectrodes de la macrobiopile construite dans le chapitre 2 sur des électrodes Au, pour faire une biopile microfluidique. La différence majeure entre les deux systèmes est la présence d'une membrane de Nafion<sup>®</sup> pour séparer l'anolyte et le catholyte, alors que le système microfluidique permet d'éliminer cette membrane tout en conservant la possibilité de varier le pH et la concentration des électrolytes.

La puce microfluidique est composée d'un microcanal en polymère PDMS (poly(diméthylsiloxane)) et d'électrodes Au, selon deux différents design, déposées sur une plaque de résine époxy.

#### II-1-1 fabrication du microcanal

Le microcanal utilisé dans notre système microfluidique est fabriqué à base du PDMS dont la formule est présentée dans la figure 8.

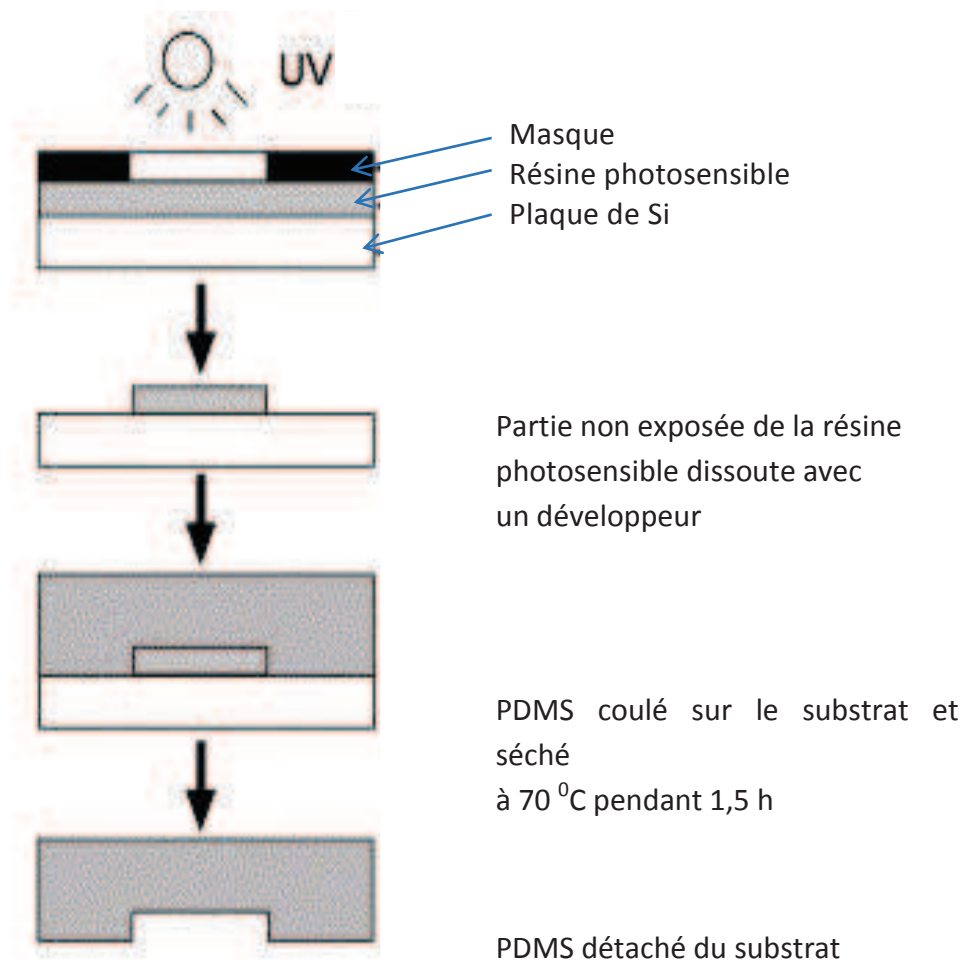


**Figure 8 :** Formule du PDMS

Ce matériau est largement utilisé dans le domaine de la microfluidique en raison du faible coût de fabrication par rapport aux autres matériaux comme le silicium. Il présente d'autres avantages comme sa couleur transparente qui permet l'observation de l'écoulement des solutions dans le microcanal et la facilité de le mettre dans tous types de moules avec une grande précision [11]. Le canal a été fabriqué à l'Institut des Nanotechnologies de Lyon

(INL), par la technique de lithographie molle (soft lithography), souvent utilisée pour la réalisation des microcanaux [11-13]. Les étapes nécessaires pour fabriquer ce microcanal sont schématisées sur la figure 9.

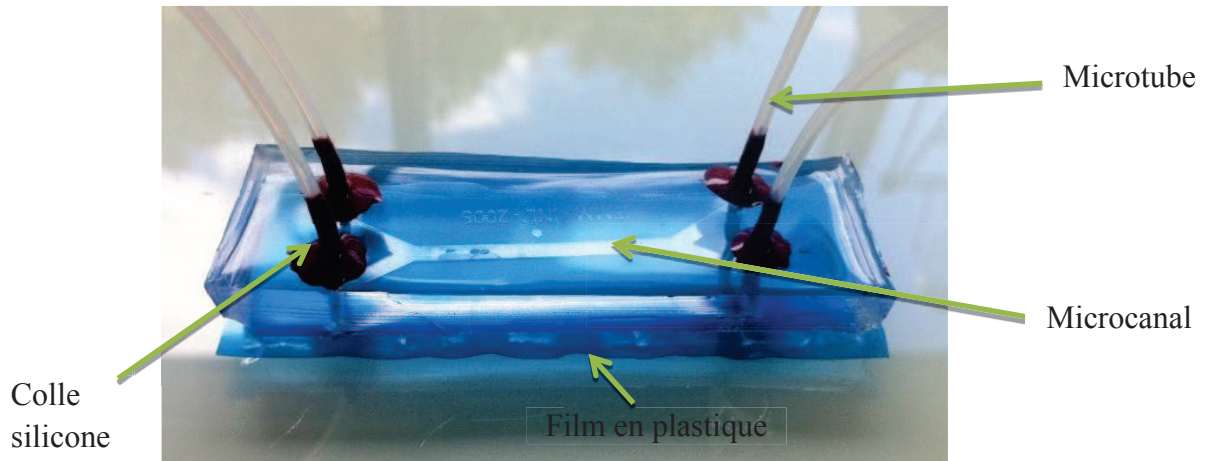
Une résine sous forme de film sec d'épaisseur donnée est étalée sur un support plat (souvent  $\text{SiO}_2$ ) d'épaisseur voulue (qui déterminera la hauteur du canal). La résine protégée par un masque transparent ou opaque suivant un dessin 2D préalablement réalisé, est partiellement exposée aux UV, puis la partie non exposée est éliminée (on parle de « résine photosensible négative ») par un développeur (carbonate de sodium) pour former le moule. Un mélange de PDMS (liquide) et d'agent réticulant (permettant de durcir le PDMS) est versé sur ce moule et placé dans un four pendant une heure et demie. Une fois le PDMS durci, il peut être décollé du moule, nettoyé et protégé par un film en plastique (figure 9). Des microtubes en téflon sont ensuite percés dans les entrées et les sorties du microcanal puis collés. Le microcanal fabriqué dans notre cas présente les dimensions suivantes : hauteur =  $120\text{ }\mu\text{m}$ , largeur =  $2\text{ mm}$  et longueur =  $3\text{ cm}$ .



**Figure 9 :** étapes nécessaires pour la fabrication d'un microcanal en PDMS par la technologie de lithographie

## Chapitre III

Ce microcanal en forme «Y», présenté sur la figure 10, permet un écoulement des deux solutions sans mélange et à différents pH pour obtenir un fonctionnement optimal des électrodes. La nature de l'écoulement des solutions dans ce système est caractérisé par le nombre de Reynolds (voir eq1).



**Figure 10 : Microcanal en PDMS**

Dans le cas précis de notre étude, ce nombre a été déterminé en fixant le débit des solution à 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Eq1):

$$Re = \frac{\rho \langle V \rangle d}{\eta} = \frac{\rho Q d}{\eta S} \quad (\text{eq1})$$

Avec S : la surface du canal, Q : le débit,  $\langle V \rangle$  : la vitesse moyenne de l'écoulement, d : le diamètre de microcanal,  $\eta$  : viscosité cinématique de l'eau et  $\rho$  : la masse volumique de l'eau.

Sachant que :

$$\text{Débit} = 300 \mu\text{l}/\text{min} = 5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$$

$$\text{Puisque deux solutions s'écoulent, le débit} = 10^{-8} \text{ m}^3/\text{s}$$

$$S = h \times l = 120 \cdot 10^{-6} \times 2 \cdot 10^{-3} = 2,4 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2$$

$$\eta = 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}, \quad \rho = 1000 \text{ Kg}/\text{m}^3$$

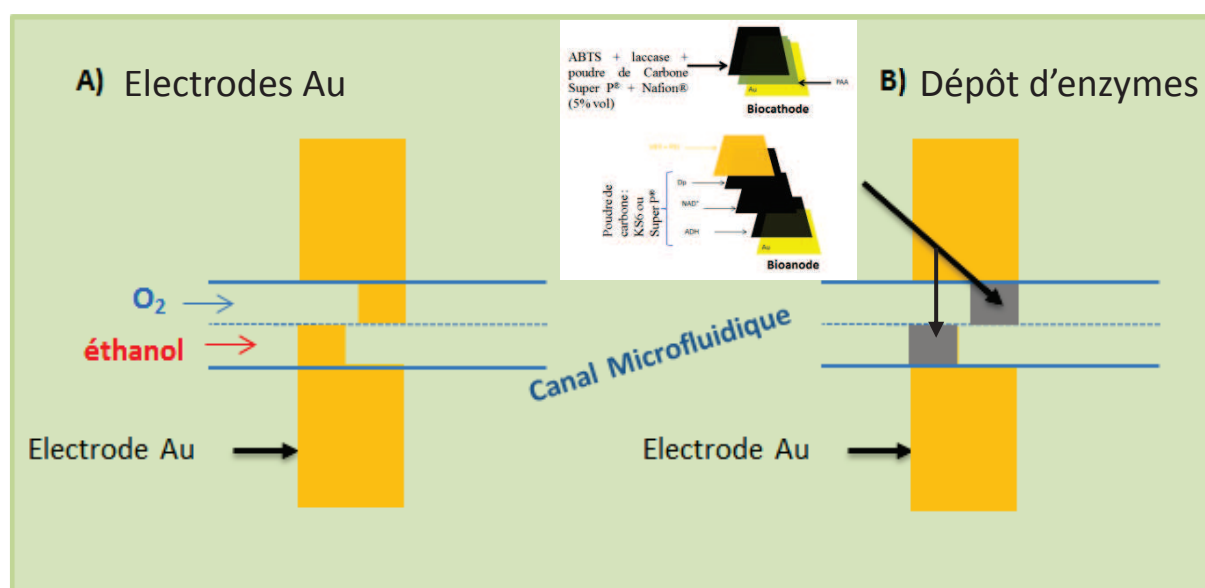
$$Re = \frac{1000 \cdot 10^{-8} \cdot 120 \cdot 10^{-6}}{10^{-3} \cdot 2,4 \cdot 10^{-7}} = 5$$

La valeur  $Re \ll 2000$  traduit un régime laminaire de l'écoulement des solutions dans le microcanal.

### II-1-2- Fabrication des bioélectrodes

#### II-1-2-a-Dépôt Au sur résine époxy

Des électrodes Au ont été fabriquées dans notre laboratoire par la méthode de pulvérisation cathodique (décrite dans le chapitre précédent) par dépôt en couche mince sur une résine époxy (figure 11-A).



**Figure 11 :** (A) Schéma des électrodes Au déposer par pulvérisation cathodique sur une résine époxy (B) électrodes Au, anode et cathode, modifiées par un dépôt d'enzymes dans un microcanal contenant deux solutions: éthanol et oxygène, sans membrane.

#### II-1-2-b-Dépôt d'enzymes anodiques et cathodiques

Dans cette partie nous avons effectué l'immobilisation des enzymes sur une surface de  $0,05 \text{ cm}^2$  sur les parties situées à l'intérieur du microcanal, en suivant le même protocole utilisé pour les dépôts des électrodes macroscopiques (figure 11-B).

Nous avons choisi d'immobiliser les enzymes sur une surface géométrique de 0,05 cm<sup>2</sup>, la même utilisée par Zebda et ses collaborateurs [11] mais avec un motif différent.

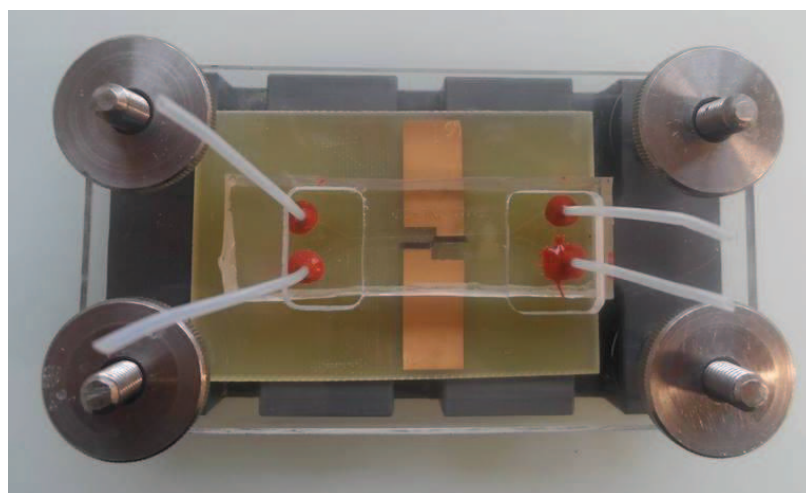
La composition retenue pour faire ces dépôts est la même que celle optimisée utilisée lors des caractérisations des biopiles macroscopiques construites dans le chapitre 1.

**Anode :** Dépôt sur Au de couches successives de ADH, NAD<sup>+</sup> et Diaphorase mélangés avec les poudres de carbone Super P<sup>®</sup> ou KS6, puis une dernière couche de VK<sub>3</sub> et PEI.

**Cathode :** Dépôt sur Au d'un mélange de laccase, ABTS, Nafion<sup>®</sup> avec la poudre de carbone Super P<sup>®</sup> sur un substrat Au modifié par une couche préalable de PAA.

### II-1-2-c-Assemblage du système microfluidique

Nous avons assemblé les deux parties décrites précédemment (microcanal en PDMS et plaques époxy modifiées par les bioélectrodes), par accolement des deux éléments en prenant soin de positionner les électrodes à l'intérieur du microcanal. Le tout est maintenu entre une plaque de plexiglass et un support comme montré sur la figure 12, pour éviter les fuites. Il est tout à fait possible de coller le PDMS sur de nombreux supports après un traitement plasma.



*Figure 12 : cellule microfluidique*

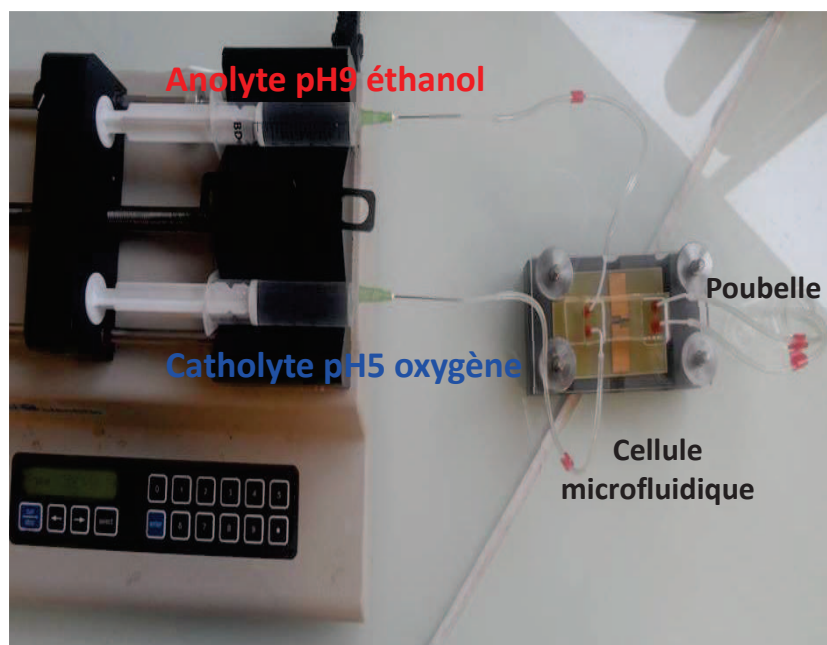


### II-1-3-Caractérisations électrochimiques des biopiles microfluidiques alcool/O<sub>2</sub>

#### II-1-3-1-biopile avec bioanode KS6 et biocathode Super P<sup>®</sup>

Nous avons construit une première biopile microfluidique constituée d'une bioanode à base de KS6 et d'une biocathode à base de Super P<sup>®</sup>, présentant les meilleures performances dans le cas de la biopile macroscopique (voir chapitre 2). Puisque les deux principaux phénomènes limitant les biopiles microfluidiques sont la couche de déplétion et la zone de miction, nous avons choisi d'étudier quelques paramètres comme le design des électrodes, le débit d'écoulement, la nature de poudre de carbone, afin de limiter ces deux phénomènes et augmenter les performances des biopiles microfluidiques.

Les deux solutions (anolyte pH 9 et catholyte pH 5) ont été introduites à l'intérieur du microcanal à l'aide de deux seringues connectées aux tubes en Teflon. Les deux seringues sont installées sur un pousse-seringue pour alimenter en continue la biopile microfluidique avec un débit fixe (figure 13).

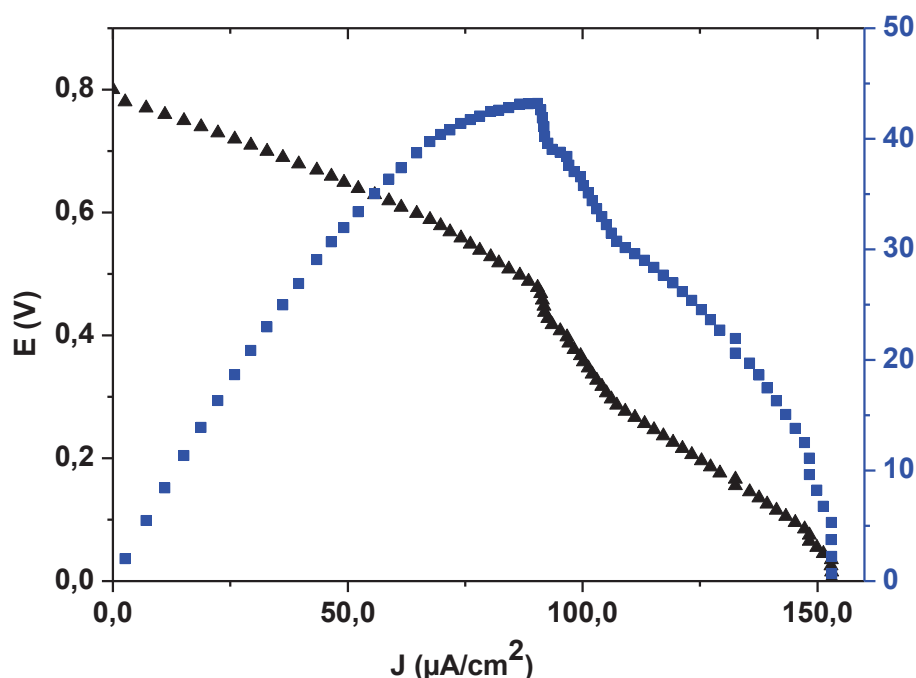


*Figure 13 : montage du système microfluidique*

Les mesures électrochimiques ont été effectuées à 25° C en utilisant un potentiostat Autolab relié à un ordinateur. La cathode est reliée à l'électrode de travail et la contre-électrode et l'électrode de référence sont toutes les deux connectées à l'anode. Les courbes de polarisation ont été obtenues en mesurant le courant délivré en faisant varier le potentiel entre  $E_{i=0}$  et 0 V. Nous avons choisi un débit d'écoulement de 16  $\mu\text{L}/\text{min}$  (en référence avec le



travail de Beneyton et al. [14]) pour diminuer le risque d'élimination des dépôts par passage des solutions dans le microcanal. Les courbes obtenues sont présentées dans la figure 14.



**Figure 14 :** Courbes de polarisation ( $\Delta$ ) et de puissance ( $\square$ ) d'une biopile microfluidique avec bioanode KS6 et biocathode Super P<sup>®</sup> (anolyte pH 9 et 70 mM éthanol /catholyte pH 5 avec barbotage d'O<sub>2</sub>), tampon phosphate 0,1M, débit = 16  $\mu$ L/min,  $v = 3.33$  mV/s.

La différence de potentiel (ddp) de la biopile microfluidique à  $J=0$  estimée à 0,8V, est inférieure à celle obtenue avec la biopile macroscopique analogue (1V). L'allure de la courbe de polarisation montre un semi-plateau et une chute de potentiel pour des densités de courant élevées dû aux limitations de transfert de masse. Cette biopile a délivrée une densité de courant de 150  $\mu$ A/cm<sup>2</sup> et une densité de puissance de 45  $\mu$ W/cm<sup>2</sup> à 0,5 mV.

### II-1-3-1-a-Influence du débit d'écoulement

Le transport rapide des réactifs aux électrodes est essentiel pour fournir des densités de puissance élevées. Pendant le fonctionnement, des zones de déplétion se forment à proximité des électrodes et le transport rapide du combustible et de l'oxydant aux électrodes est essentiel pour délivrer des hautes densités de puissance [20,21,12]. L'épaisseur de la zone de déplétion augmente dans la direction du flux et peut être régulée par le débit d'écoulement

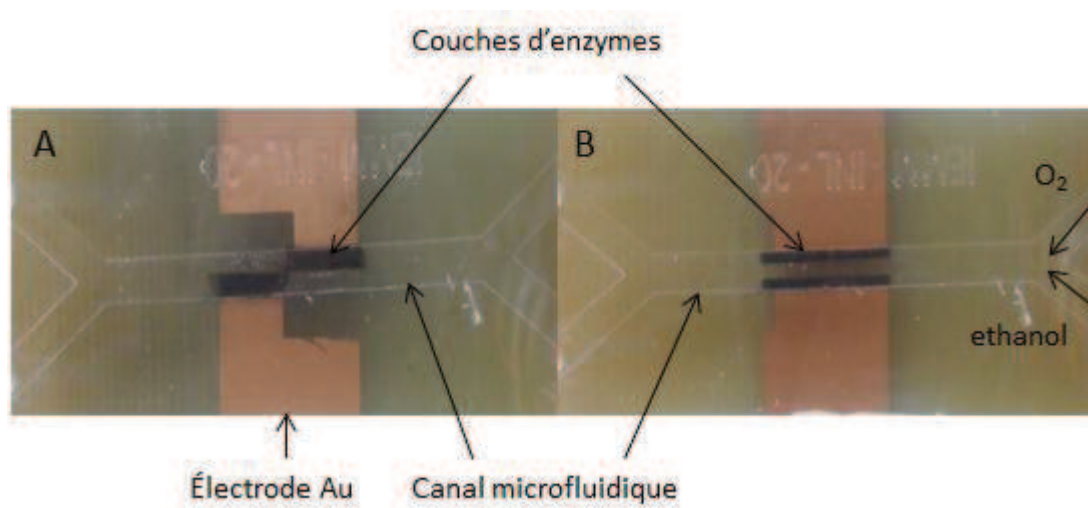
des solutions. Différents débits d'écoulement ont été testés: 16, 150 et 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . D'après le tableau 2 nous constatons que la densité de puissance maximale délivrée n'a pas varié de façon significative avec l'augmentation du débit, ce qui indique que le transport de masse des espèces n'est pas la principale limitation dans notre système. Nous n'avons donc dans ce cas aucun intérêt à augmenter le débit, contrairement à ce que pourrait indiquer une lecture mal avisée de la formule de Levich ( $I_{\text{max}} = 0.925n\text{FLC}^\circ(\text{wD})^{2/3} (4\text{Uav/h})^{1/3}$ ). Dans notre cas, nous avons plutôt supposé que le comportement de la densité de puissance est principalement dû à la vitesse de réaction limitée dans le film, couplée à la diffusion du substrat à travers les couches d'enzymes. En particulier, la construction de la bioanode avec un dépôt de plusieurs couches enzymes/médiateur peut entraver le transfert d'électrons et la cinétique d'oxydation de l'éthanol. Nous avons choisi le débit le plus faible (16  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) afin d'éviter le lavage (washed-off) des couches d'enzymes adsorbées sur les électrodes.

**Tableau 2 :** Densités de puissance maximale en fonction de débit d'écoulement des biopiles microfluidiques à base d'une bioanode KS6 et une biocathode Super P<sup>®</sup> (anolyte pH 9 et 70 mM éthanol /catholyte pH 5 avec barbotage d'O<sub>2</sub>), tampon phosphate 0,1M.  $v = 3.33 \text{ mV/s}$ .

Debit d'écoulement ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	16	150	300
Densité de puissance maximale ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )	43	43	49

### II-1-3-1-b- Influence de la configuration des électrodes

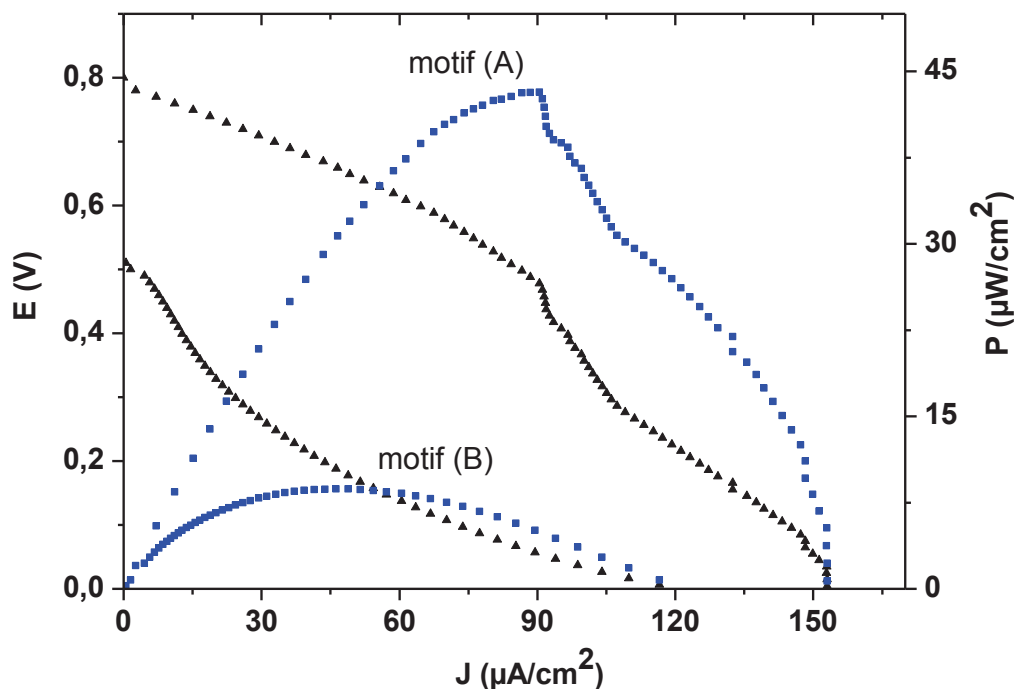
Une limitation importante pour obtenir des densités de courant élevées dans des dispositifs microfluidiques est la déplétion du combustible et de l'oxydant le long de la surface de l'électrode, ce qui entrave la cinétique de la réaction et augmente considérablement les limitations de transport de masse [22]. La réduction de la longueur de l'électrode peut diminuer l'influence de la couche limite de déplétion et améliorer ainsi les densités de courant et de puissance [23-26]. Comme la conception des électrodes confinées dans le microcanal est un élément important dans la fabrication des biopiles à combustible microfluidique, deux motifs d'électrodes avec des designs différents (Figure 15) ont été testés pour évaluer leur influence sur les performances de la biopile microfluidique. Sachant que la surface des électrodes (0,05  $\text{cm}^2$ ), la quantité de dépôt d'espèces (6  $\mu\text{l}$ ) et le débit d'écoulement 16  $\mu\text{L}/\text{min}$  sont identiques pour les deux motifs.



**Figure 15:** Schéma des deux designs d'électrodes étudiés pour caractériser la biopile microfluidique

Le motif (A) est celui utilisé dans l'étude précédente, avec des électrodes de largeur 1 mm qui s'étendent sur la moitié du microcanal, et de longueur 0,5 cm. Nous avons aussi testé un deuxième motif avec des électrodes en longueur (motif B), de 1 cm de long pour 0,5 mm de large espacées de 1 mm. Dans la première configuration (motif A), toute la solution (anolyte et catholyte) est en contact avec le dépôt d'enzymes alors que dans la deuxième (motif B), il y a qu'une seule partie de la solution qui réagit avec le dépôt d'enzymes. Une autre différence est que les électrodes du motif (A) ne se sont pas face-à-face, contrairement au motif (B), pour éviter leur contact.

La caractérisation par polarisation de la biopile microfluidique avec une bioanode KS6 et une biocathode Super P<sup>®</sup> a été faite avec le deuxième motif (B), puis comparée à celle testée précédemment avec le motif (A).



**Figure 16 :** Courbes de polarisation ( $\Delta$ ) et de puissance ( $\square$ ) des biopiles microfluidiques avec une bioanode KS6 et une biocathode Super P<sup>®</sup> testées avec les motifs (A) et (B). (anolyte pH 9 et 70 mM éthanol /catholyte pH 5 avec barbotage d'O<sub>2</sub>), tampon phosphate 0,1M, débit = 16  $\mu$ L/min,  $v = 3.33$  mV/s.

**Tableau 3 :** Performances des biopiles microfluidiques avec une bioanode KS6 et une biocathode Super P<sup>®</sup>

Biopile Microfluidique, bioanode KS6, biocathode Super P <sup>®</sup>	Densité de courant max ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	Densité de puissance Max ( $\mu$ W/cm <sup>2</sup> )	ddp à J=0 (V)
Motif (A)	150	45	0.8
Motif (B)	120	10	0.5

D'après la figure 16 et le tableau 3, les performances de la biopile microfluidique sont très différentes avec les deux motifs. La densité de puissance délivrée avec le motif (A) est presque 5 fois plus grande que celle délivrée avec le motif (B). La ddp à J=0 délivrée avec le

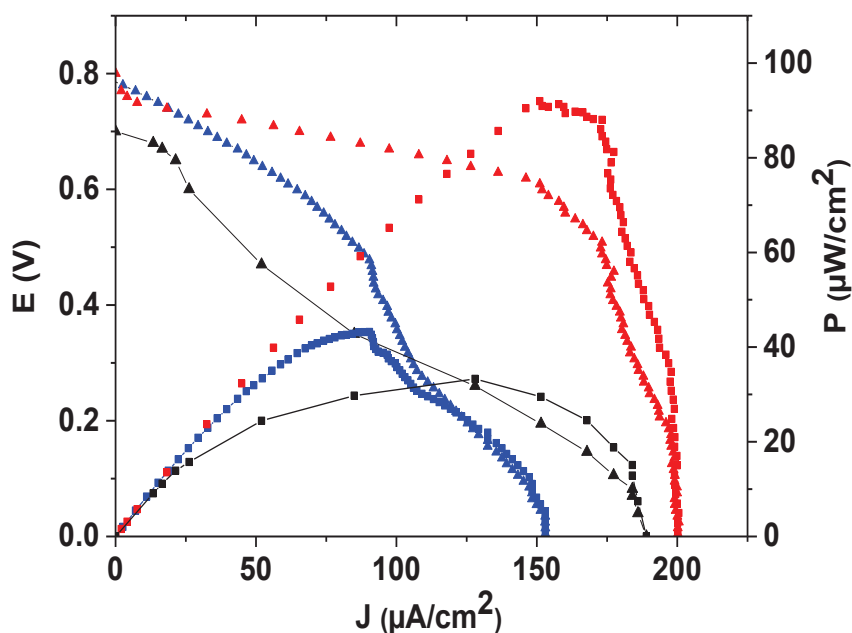
motif (A) est 0.8V et 0.5V avec le motif (B).

Avec le motif (A), l'allure de la courbe de polarisation montre un semi-plateau et une chute de potentiel pour les densités de courant élevées correspondant aux limitations de transfert de masse, alors qu'avec le motif (B) l'allure de la courbe montre une perte ohmique importante et des cinétiques lentes qui diminuent la ddp à  $J=0$ . La position des électrodes influence la résistance ohmique dans le microcanal. En effet, les électrodes moins espacées (motif A) permettent une plus faible résistance interne, alors que l'intervalle plus long entre les bioélectrodes dans le motif (B) augmente la distance que les protons doivent parcourir entre la bioanode et la biocathode [27].

Les électrodes plus courtes et plus larges donnent lieu à des couches de délimitation plus fines et d'une consommation catalytique plus efficace du combustible et de l'oxydant à la surface des électrodes et ainsi des performances plus élevées des bioélectrodes. Ce comportement a également été décrit dans les travaux de Thorson et al. [22] qui ont montré que les deux électrodes courtes et larges améliorent de manière significative la performance d'une pile à combustible, et par Zebda et al. qui ont montré que la diminution de la longueur des électrodes augmente la densité de courant délivrée, en diminuant la zone de déplétion (qui augmente le long de l'électrode) [13]. Nous avons retenu donc le motif (A) pour la suite du travail.

### II-1-3-2- Biopile microfluidique avec une bioanode et une biocathode Super P<sup>®</sup>

Nous avons démontré dans les chapitres précédents que les caractéristiques des poudres de carbone jouent un rôle sur les performances des bioélectrodes. Nous avons donc testé une biopile microfluidique construite à partir de poudre de carbone Super P<sup>®</sup> mélangée avec les enzymes à la bioanode et à la biocathode, et comparer ses performances électriques avec la biopile microfluidique précédente (bioanode KS6 et biocathode Super P<sup>®</sup>) (Figure 17). La biopile microfluidique contenant la poudre de carbone Super P<sup>®</sup> à l'anode et à la cathode présente les performances les plus élevées ( $90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  à 0,6 V), dues à l'amélioration de la cinétique d'oxydation de l'éthanol. Ce résultat peut être attribué à l'augmentation de la surface spécifique de l'anode en changeant le KS6 par Super P<sup>®</sup> et donc à une quantité plus élevée d'espèces réactives immobilisée sur l'anode. En outre, la structure poreuse des nanoparticules de Super P<sup>®</sup> peut favoriser la proximité des nanoparticules conductrices à proximité du site actif des espèces actives ce qui réduit éventuellement la distance de transfert d'électrons et accélère le processus bioelectrocatalytique, et donc la densité de puissance de la biopile microfluidique [28-30].



**Figure 17 :** Courbes de polarisation ( $\Delta$ ) et de puissance ( $\square$ ) des biopiles microfluidiques avec motif (A), (anolyte pH 9 et 70 mM éthanol /catholyte pH 5 avec barbotage d' $O_2$ ), tampon phosphate 0,1M.  $v = 3.33$  mV/s. débit = 16 $\mu$ L/min. courbe rouge : avec une anode Super P<sup>®</sup>, une cathode Super P<sup>®</sup>, courbe bleue : avec une anode KS6, une cathode Super P<sup>®</sup>, courbe noire : biopile microfluidique Super P<sup>®</sup>/Super P<sup>®</sup> testée par variation de résistances imposées.

La biopile microfluidique a également été évaluée à partir de la courbe de puissance obtenue en appliquant une série de résistances constantes entre 100 et 1M  $\Omega$  (Figure 17, tableau 4). Dans ce cas, la performance de la biopile microfluidique est plus faible en raison du temps pour atteindre l'état d'équilibre qui contribue à l'instabilité de la bioanode. Toutefois, la mesure des courbes courant-tension sous des résistances variables évalue la performance d'une biopile microfluidique dans des opérations réelles.

**Tableau 4 :** Performances d'une biopile microfluidique anode Super P<sup>®</sup> cathode Super P<sup>®</sup> testée par: polarisation, ou par résistances fixes imposées.

Biopile Microfluidique, bioanode (Super P <sup>®</sup> ), biocathode (Super P <sup>®</sup> )	Densité de courant Max ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	Densité de puissance Max ( $\mu$ W/cm <sup>2</sup> )	ddp (V) à J=0
Test par polarisation	200	90	0.78
Test par résistances imposées	180	30	0,7

### • Stabilité de la biopile microfluidique

La stabilité de cette biopile à alcool/oxygène a été étudiée en évaluant les performances obtenues par courbe de polarisation au cours de balayages successifs (3 balayages) et après stockage de 24h en milieu humide. Les résultats les plus significatifs sont rassemblés dans le tableau 5.

**Tableau 5 :** Stabilité de la biopile (anode et cathode Super P<sup>®</sup>) caractérisée par courbe de polarisation (3 balayages successifs) et après stockage de 24h (anolyte pH 9 et 70 mM éthanol /catholyte pH 5 avec barbotage d'O<sub>2</sub>, tampon phosphate (0,1M), débit 16  $\mu$ L/min.

Stabilité	Densité de puissance Max ( $\mu$ W/cm <sup>2</sup> )	Densité de courant Max ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	ddp (V) à J=0
1 <sup>er</sup> balayage	90	200	0,78
2 <sup>ème</sup> balayage	25	80	0,7
3 <sup>ème</sup> balayage	12	60	0,62
Après stockage de 24h	6	45	0,6

D'après le tableau 5, on constate une baisse importante des densités de courant et de puissance au cours des balayages successifs. A titre d'exemple, la densité de puissance au premier balayage atteint 90  $\mu$ W/cm<sup>2</sup>. Elle n'est que de 12  $\mu$ W/cm<sup>2</sup> après le troisième balayage, soit une diminution de 85%. Après stockage de 24 heures, la densité de puissance baisse à 6  $\mu$ W/cm<sup>2</sup>. Cette chute importante des performances est similaire à ce que nous avons observé dans le cas des biopile macroscopique à cause de l'instabilité de la bioanode (diminution locale du pH affectant le fonctionnement des enzymes ou formation d'une couche de carbone moins perméable à la diffusion des espèces vers l'électrode).

En comparant les performances aux autres systèmes décrits dans la littérature, Beneyton et al. ont fabriqué une biopile microfluidique à glucose/O<sub>2</sub> fonctionnant avec l'oxydation de glucose à l'anode et avec la réduction de l'oxygène par la laccase à la cathode, avec une configuration similaire à notre design d'électrodes (motif B) pour un débit d'écoulement de 16  $\mu$ L/min. La densité de puissance délivrée par cette biopile microfluidique a été de 1,65  $\mu$ W/cm<sup>2</sup> [14]. Très récemment, J. Maria et ses collaborateurs ont développé une biopile microfluidique glucose/O<sub>2</sub>. Un polymère de polyéthylénimine à base de ferrocène lié à la glucose oxydase (GOx/Fc-C<sub>6</sub>-LPEI) a été utilisé à l'anode, tandis que la cathode contient

un mélange de laccase, modifiée par des nanotubes de carbone multi-parois, et le Nafion<sup>®</sup> modifié par le tétrabutylammonium bromure (MWCNTs/laccase/TBAB-Nafion<sup>®</sup>) [18]. Cette biopile microfluidique a délivré une puissance de  $64 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  [18].

Dans cette partie, nous avons décrit la fabrication de la première biopile microfluidique à éthanol/oxygène avec des enzymes immobilisées sur une électrode Au, par miniaturisation des électrodes de la biopile macroscopique. Différents paramètres ont été étudiés à savoir : la nature de poudre de carbone (KS6 ou Super P<sup>®</sup>), le design des électrodes Au et le débit d'écoulement.

La biopile microfluidique la plus performante est celle qui a délivré une densité de puissance de  $90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  avec des électrodes (courtes et larges), la bioanode et la biocathode à base de Super P<sup>®</sup> et un débit d'écoulement des solution de  $16 \mu\text{L}/\text{min}$ . Néanmoins, une perte de 85% de sa densité de puissance est observée après un jour à cause de l'instabilité de la bioanode.



### **Partie III : Biopile microfluidique glucose/O<sub>2</sub> avec enzymes en solution**

Dans cette partie, nous avons fabriqué une biopile microfluidique basé sur l'assemblage en série ou en parallèle de trois microcanaux afin d'augmenter la production d'énergie électrique (la puissance). Pour cela nous avons développé une biopile microfluidique à glucose/O<sub>2</sub> fonctionnant avec des enzymes en solution.

#### **III-1 Biopiles microfluidiques à glucose/O<sub>2</sub> avec enzymes en solution**

Le glucose est une source d'énergie commune pour tous les organismes vivants, ce qui permet d'intégrer des dispositifs à base de glucose pour des applications in vivo, sans la nécessité d'un carburant externe pour l'alimentation de système [31]. Cette capacité à travailler dans des conditions physiologiques compense leur faible puissance par rapport aux piles à combustible utilisant des catalyseurs inorganiques, et fait l'objet de recherches actives dans le domaine des dispositifs implantables comme le rôle du débit d'écoulement, la géométrie des microcanaux, l'emplacement des électrodes et les systèmes microfluidiques [32-37].

Il existe principalement deux méthodes de fabrication pour construire les biopiles à combustible microfluidiques. La première approche "soft lithography" est celle utilisée dans la première partie du chapitre pour fabriquer le microcanal en PDMS [39]. La seconde approche est plus récente, appelée "xurography", basée sur la combinaison de films minces et flexibles modelés à l'aide d'un traceur de découpe, permettant la production de masse. Le procédé de formation du motif définit la largeur et la longueur du canal microfluidique, et la hauteur du canal est définie par l'épaisseur du film. Cette technique est beaucoup moins coûteuse que les méthodes classiques de photolithographie (absence de solvants et de produits organiques) et s'applique à une large gamme de matériaux laminés permettant une plus grande fonctionnalité et application que le PDMS [40-43]. Elle est extrêmement rentable et rapide.

Le travail de Zebda et al., réalisé à l'IEM, a concerné le développement d'une biopile à combustible microfluidique glucose/O<sub>2</sub> fonctionnant avec des enzymes circulant dans un microcanal en PDMS construit par "soft lithography" [13]. Dans ce système le glucose est

oxydé par l'enzyme glucose oxydase à l'anode tandis qu'à la cathode, l'oxygène est réduit par la laccase, en présence de médiateurs redox spécifiques.

Dans le but d'augmenter la production de l'énergie à partir d'un seul microcanal, nous avons fabriqué une biopile microfluidique à glucose/O<sub>2</sub> basé sur l'assemblage de trois microcanaux, avec des enzymes en solution.

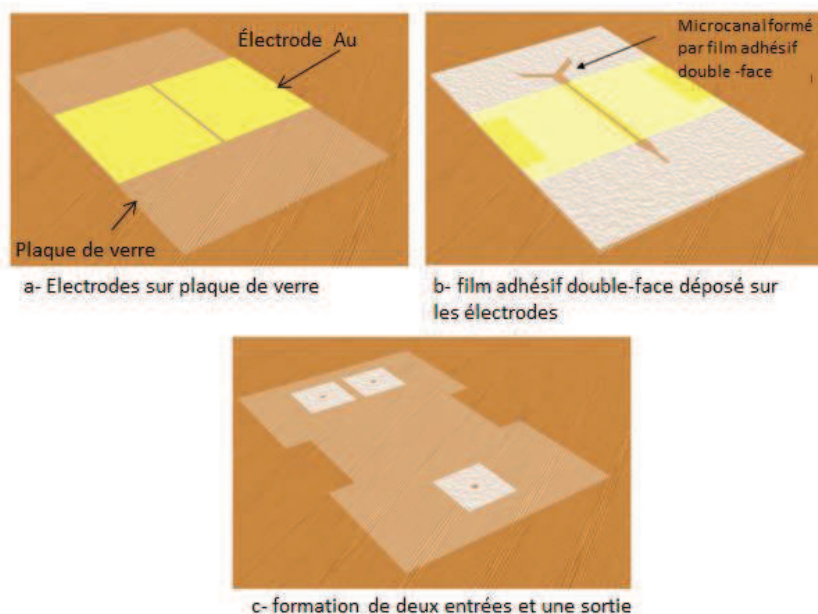
Pour concevoir un dispositif sur un minimum d'espace et alimenté simultanément par les mêmes entrées, la technique de "xurography" a été combinée à une distribution de canaux à plusieurs niveaux. Le dispositif microfluidique 3D qui en résulte peut être facilement fabriqué par empilement de couches alternées de films à motifs et ruban adhésif double-face modélisés avec des trous pour fournir des connexions entre les canaux. Les électrodes ont été configurées pour un fonctionnement en série ou en parallèle.

### **III-1-1- fabrication des puces microfluidiques 2D et 3D**

#### **III-1-1-a puces microfluidiques 2D**

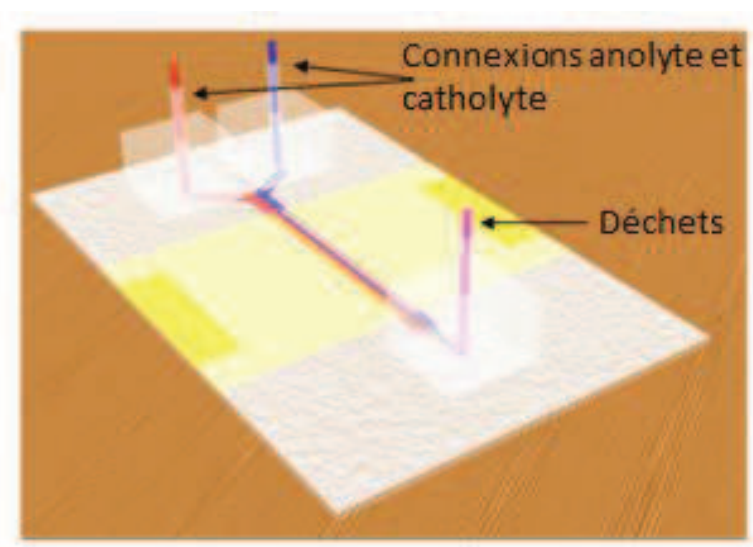
L'ensemble des procédés de fabrication (pour les électrodes et les canaux microfluidiques) utilisés dans ce travail est basé sur la technique de « xurography », qui emploie une découpe au traceur et des films adhésifs de polymère. Cette méthode économique évite l'utilisation des photomasques (masques de lithographie) et des résines photosensibles coûteuses comme dans le cas de la biopile microfluidique à éthanol/O<sub>2</sub> présentée dans la première partie.

Nous avons utilisé dans cette partie des électrodes Au de 3 cm de longueur et 1 mm de largeur espacée de 1 mm déposée par pulvérisation cathodique sur une plaque de verre (figure 18-a).



**Figure 18 :** Schéma des différentes étapes de fabrication d'une puce microfluidique 2D avec un microcanal de 3 mm de large, 100  $\mu\text{m}$  de profondeur et 40 mm de longueur, fabriqué par la technique de « xurography ».

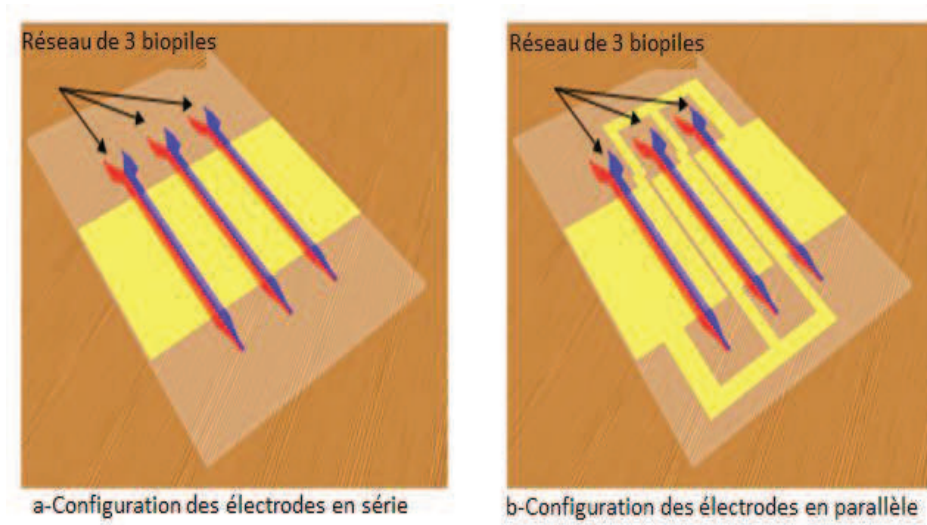
La construction du système microfluidique 2D basé sur plusieurs couches de différents matériaux stratifiés est décrite sur la figure 18. Un adhésif double-face de 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur est déposé sur une lame de verre modifiée au préalable par des électrodes Au (déposées par pulvérisation cathodique Figure 18-a). Ce film adhésif est préalablement modelé par xurography afin de former le canal microfluidique (en forme Y) avec la géométrie suivante : hauteur 100  $\mu\text{m}$ , largeur 3 mm et longueur 40 mm (Figure 18-b). Un film transparent semi-rigide en PVC de 150  $\mu\text{m}$  d'épaisseur contenant trois trous de 2 mm de diamètre a été ajouté pour créer deux entrées et une sortie comme montré sur la figure 18-c. Les connexions microfluidiques sont obtenues en utilisant des cubes en plexiglas forés et des tubes en téflon. La taille des trous dans les cubes en Plexiglass est de 1,5 mm, et le diamètre externe des tubes en Téflon, fortement insérés dans les cubes, est 1,6 mm. Ces derniers sont connectés à la puce en utilisant le même film adhésif double-face tel qu'il est utilisé pour le microcanal (figure 19). Il a été vérifié au préalable que cette configuration ne conduit à aucune fuite de liquide pendant une longue période (plus d'une heure) pour un débit supérieur à 3 mL/min.



**Figure 19 :** Puce microfluidique 2D avec un microcanal de 3 mm de large, 100  $\mu\text{m}$  de profondeur et 40 mm de longueur, fabriqué par la technique de « xurography ».

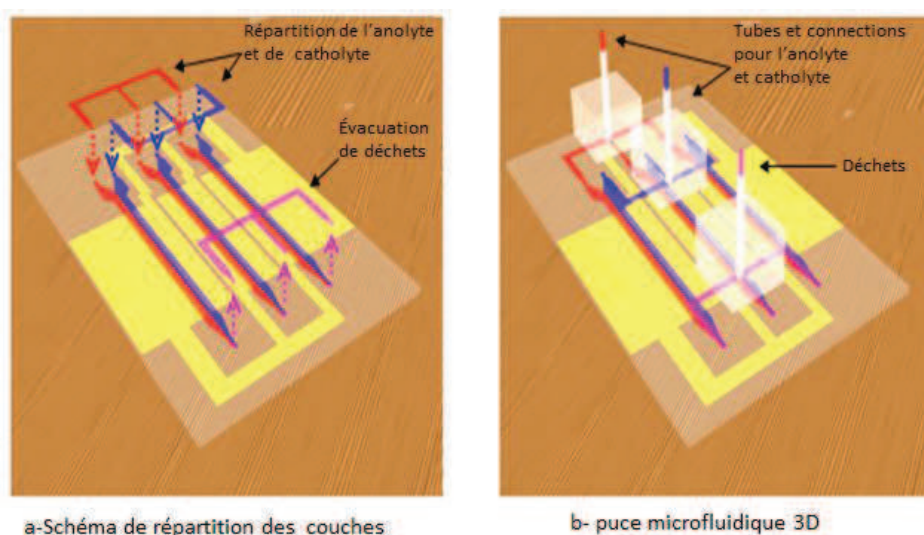
### III-1-1-b puces microfluidiques 3D

Afin d'augmenter les performances du dispositif, nous avons construit un réseau de microcanaux assemblés dans un minimum d'espace et alimentés simultanément par les mêmes entrées. La biopile microfluidique résultante est constituée de multicouches. La première couche est constituée des électrodes Au (pour les réactions électrochimiques), la seconde couche contient un réseau de trois microcanaux et la dernière couche est conçue pour assurer la distribution de fluide dans les canaux. Les électrodes en Au ont été déposées sur lame de verre et reliées entre elles, soit en série (figure 20-a), soit en parallèle (Figure 20-b). La "configuration série" conduit à l'augmentation du potentiel total de l'ensemble du système alors que la "configuration parallèle" conduit à l'augmentation du courant total délivré.



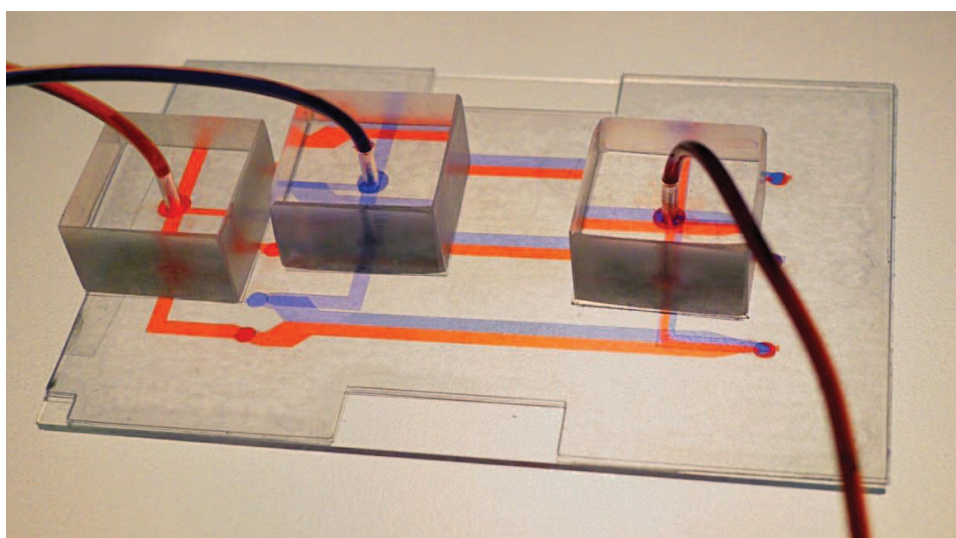
**Figure 20 :** schéma des électrodes Au déposées sur lame de verre, en contact avec un réseau de trois microcanaux, connectées soit en série (a), soit en parallèle (b).

La biopile microfluidique 3D a été construite en ajoutant deux couches de film adhésif double-face déposées successivement, l'une pour construire les trois microcanaux en contact avec les électrodes (Figure 20-a et 20-b) et une autre consacrée à la distribution de fluides à partir de deux entrées et une sortie (Figure 21-a). Les films adhésifs double-face sont séparés et scellés par deux films transparents semi-rigides. Les connexions fluidiques sont les mêmes que celles décrites pour la biopile microfluidique 2D (Figure 21-b).



**Figure 21** : schéma d'une puce microfluidique 3D en parallèle fabriquée par la technique de « xurography », montrant les différentes couches de répartition.

Un test de la puce microfluidique 3D a été effectué par pompage en continu d'encre de différentes couleurs (bleu et rouge) (Figure 22). La répartition des fluides dans les trois microcanaux présente un écoulement laminaire parallèle sans mélange et sans fuite.



**Figure 22** : Photo de la biopile microfluidique 3D avec un carburant (en bleu) et un comburant (en rouge) présentant la répartition des solutions dans les microcanaux connectés en parallèle.



### III-1-2- Caractérisation des biopiles microfluidiques

Lors de caractérisation des biopiles microfluidiques, les réactions électrochimiques ont lieu à l'anode et la cathode situées dans le flux des solutions, avec une surface de contact de  $40 \text{ mm}^2$  (1 mm de large x 40 mm de long). La solution de catholyte est composée de laccase (1 mg/ml) et d'ABTS (10 mM) dans le tampon phosphate 0,1 M pH 5, saturé avec de l'oxygène. L'anolyte est composée de GOD (1 mg/ml) et  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  (10 mM) dans 0,1 M de tampon phosphate pH 7, saturé en azote gazeux. Les solutions sont pompées dans le microcanal avec le pousse-seringue à des débits variables.

A l'anode, l'enzyme GOD (glucose oxydase) oxyde le glucose en gluconolactone en présence du médiateur redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ . A la cathode, l' $\text{O}_2$  est réduit en eau par la laccase en présence du médiateur redox ABTS. Les protons diffusent à travers l'interface liquide-liquide créée par le flux des solutions de l'anode à la cathode.

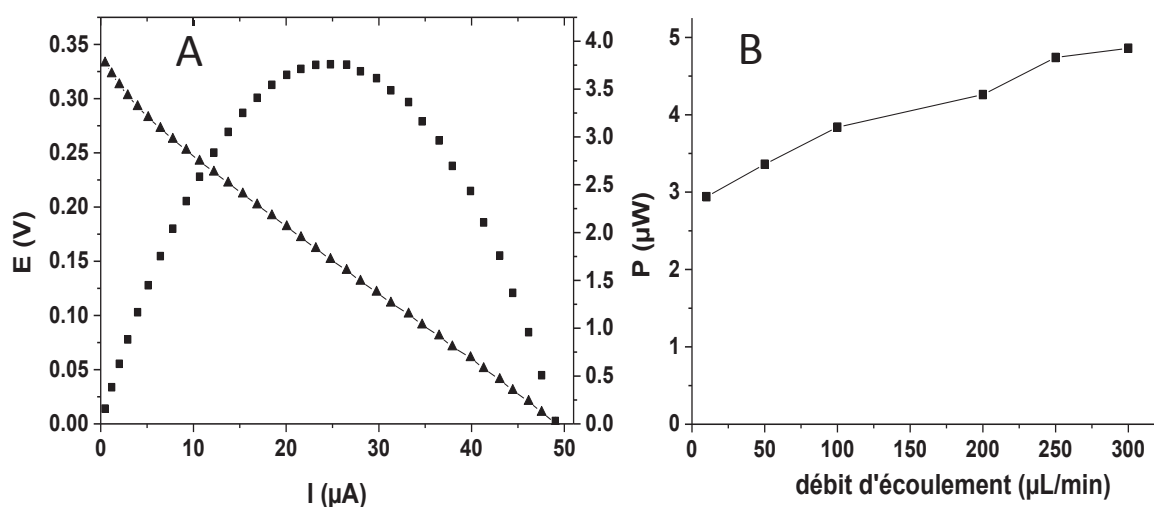
#### III-1-2-a- Performances électrochimiques du dispositif 2D

Le dispositif microfluidique 2D a été étudié à température ambiante, en mesurant la puissance délivrée par la biopile microfluidique glucose/ $\text{O}_2$  à  $100 \mu\text{L}/\text{min}$ . La figure 23-A montre la courbe de polarisation obtenue par la biopile microfluidique 2D, avec un potentiel à courant nul de 0,33V. Lorsque le potentiel diminue à 0V, la forme de la courbe ( $E=f(I)$ ) est pratiquement linéaire, ce qui indique que les performances du dispositif sont limitées majoritairement par la résistance ohmique dues aux contacts électriques (électrodes Au) et à la distance entre les électrodes [44]. La puissance maximale délivrée par cette biopile microfluidique 2D est de  $3,8 \mu\text{W}$  à 0.15 V.

La figure 23-B présente l'effet de la vitesse d'écoulement des solutions (variation de 5 à  $300 \mu\text{L}/\text{min}$ ) sur la puissance maximale. La puissance augmente lentement, de 3 à  $4,7 \mu\text{W}$  lorsque le débit d'écoulement est augmenté par un facteur de 60. Ce comportement indique que le régime de la biopile microfluidique n'est pas clairement contrôlé par la diffusion des espèces aux électrodes, et la formule de Levich (eq3) qui exprime la variation linéaire de la densité de courant en fonction de la racine cubique de la vitesse d'écoulement n'est pas vérifiée dans ce cas [45].

$$I_{\text{max}} = 0.925n\text{FLC}(wD)^{2/3}(4U_{\text{av}}/h)^{1/3} \quad (\text{eq3})$$

Où  $n$  : est le nombre d'électrons échangés,  $F$  : est la constante de Faraday,  $C$  : est la concentration des espèces,  $w$  : la largeur du canal,  $h$  : la hauteur du canal,  $U_{\text{av}}$  : est le rapport entre de la vitesse d'écoulement et la section de microcanal.



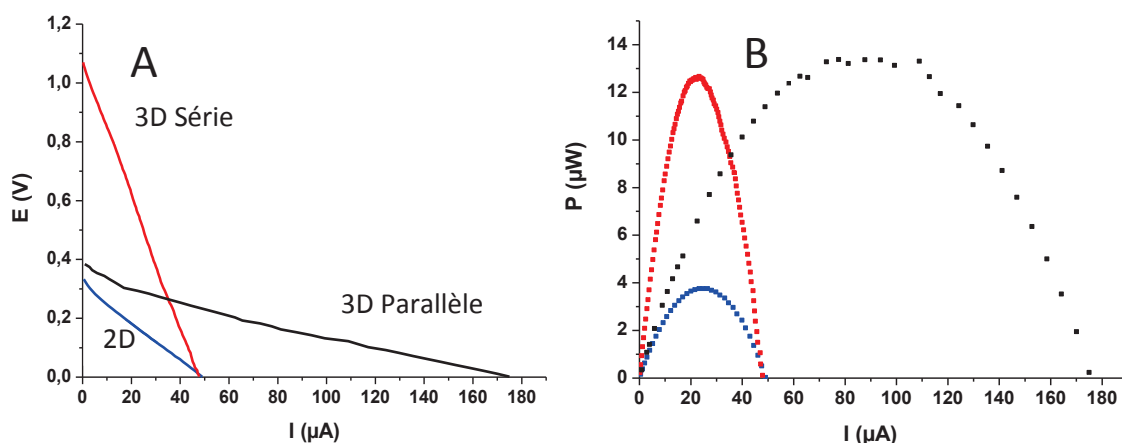
**Figure 23 :** A) Courbes de polarisation ( $\Delta$ ) et de puissance ( $\square$ ) obtenues à partir d'une biopile microfluidique 2D à glucose/ $\text{O}_2$  avec un débit d'écoulement de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . B) Puissance maximale de la biopile microfluidique en fonction du débit d'écoulement des solutions d'anolyte et de catholyte.

A partir de ces constatations, nous avons pensé que l'optimisation de l'énergie du microsystème devrait être plus efficace si la distribution de l'énergie chimique dans la puce microfluidique est optimisée au lieu d'augmenter le débit d'écoulement de la biopile microfluidique 2D.

### III-1-2-b- Performances électrochimiques du dispositif 3D

Les trois microcanaux sont alimentés simultanément par les mêmes entrées avec une seule pompe à seringue. Les électrodes ont été disposées en série pour augmenter la tension totale du système, ou en parallèle pour augmenter le courant total délivré. Les performances de la biopile microfluidique 3D ont été comparées à celle d'une biopile microfluidique 2D. Nous avons utilisé deux débits d'écoulement (100 et 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ ).



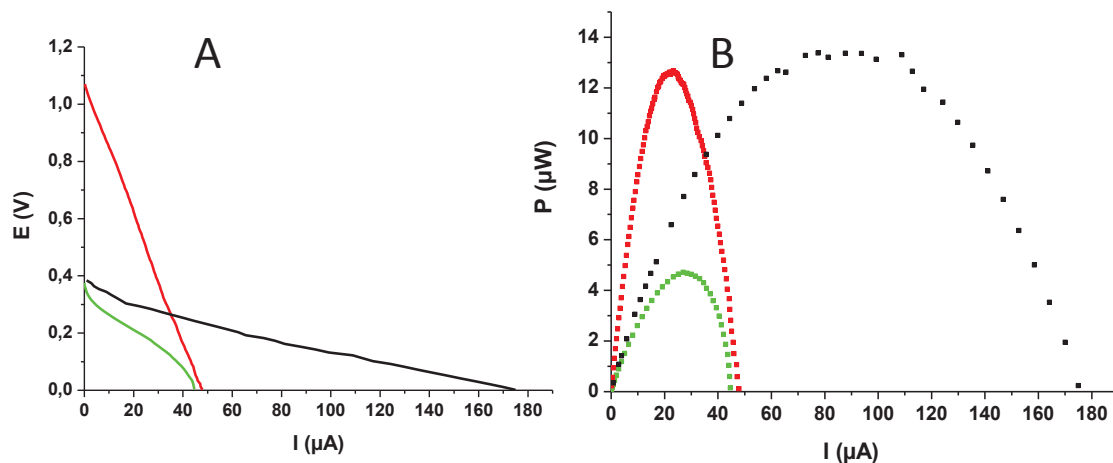


**Figure 24 :** Courbes de polarisation (A) et de puissance (B) montrant les différences de performances entre les biopiles : 2D (100  $\mu L/min$ , courbes bleues), 3D-série (3\*100  $\mu L/min$ , courbes rouges), et 3D-parallèle (3\*100  $\mu L/min$ , courbes noires)

Les courbes de polarisation (figure 24-A) montrent que la biopile avec la configuration 2D (100  $\mu L/min$ ) délivre un potentiel à courant nul de 0.33V et un courant max de 50  $\mu A$ . Comme prévu, la configuration 3D-série (3\*100  $\mu L/min$ ) conduit à une augmentation de  $E_{I=0}$  par un facteur d'environ trois ( $E_{I=0} = 1,07$  V) sans changer la valeur de la densité du courant. Comparé à la configuration 2D (100  $\mu L/min$ ), la pente de la courbe indique que l'ensemble des résistances ohmiques du système est environ trois fois plus élevée pour la biopile avec la configuration 3D-série (3\*100  $\mu L/min$ ), et que la distance entre les électrodes représente les principales pertes ohmiques dans le dispositif. Dans le cas de la configuration 3D-parallèle (3\*100  $\mu L/min$ ), le  $E_{I=0}$  est 0.38V et le courant max est  $I = 176$   $\mu A$ , soit augmenté de 3.8 fois. Comparé à la configuration 2D (100  $\mu L/min$ ), la pente de la courbe est diminuée par un facteur de trois, en raison de la parallélisation des trois résistances de la biopile microfluidique 3D-parallèle. Ce résultat confirme que les valeurs des résistances électriques des électrodes Au sont négligeables par rapport à celles résultantes de la distance entre les électrodes.

En termes de conversion d'énergie, la puissance maximale délivrée par les biopiles microfluidiques doit être comparée à la même énergie chimique initiale qui alimente le système (mêmes concentrations de catholyte et anolyte, débit d'écoulement global de 300  $\mu L/min$ ). La Figure 25-B montre la puissance des trois biopiles microfluidiques cette fois-ci au débit 300  $\mu L/min$ . La comparaison des trois biopiles (configuration 2D (300  $\mu L/min$ ), 3D-série (3\*100  $\mu L/min$ ) et 3D-parallèle (3\*100  $\mu L/min$ )), permet de montrer que l'assemblage de trois dispositifs produit 13  $\mu W$  et 14  $\mu W$  pour les configurations en série et parallèle

respectivement, alors qu'elle n'est de  $4,7 \mu\text{W}$  pour un seul microcanal. Dans le cas de la biopile 3D, la puissance délivrée est augmentée de 2,85 fois, soit 185 %.



**Figure 25 :** Courbes de polarisation (A) et de puissance (B) montrant les différences de performances entre les biopiles : 2D ( $300 \mu\text{L}/\text{min}$ , courbes vertes), 3D-série ( $3 \times 100 \mu\text{L}/\text{min}$ , courbes rouges), et 3D-parallèle ( $3 \times 100 \mu\text{L}/\text{min}$ , courbes noires)

Dans cette partie, nous avons fabriqué une biopile microfluidique à glucose/ $\text{O}_2$  basée sur l'empilement de trois microcanaux et fonctionnant avec des enzymes en solution. Pour concevoir un dispositif dans une quantité minimale d'espace et alimenté simultanément par les mêmes trous d'entrée, la technique de "xurography" a été combinée à une distribution de canaux à plusieurs niveaux.

Le dispositif microfluidique 3D qui en résulte peut être facilement fabriqué par empilement de couches alternées de films à motifs et de rubans adhésif double-face modelés avec des trous pour fournir des connexions entre les canaux. Les résultats obtenus montrent que les microcanaux plans peuvent être empilés afin d'augmenter la production d'énergie. Le choix entre les deux configurations (série ou parallèle) peut être effectué en fonction de l'application ciblée.

Enfin, une modification de la géométrie et le nombre des microcanaux par la combinaison des meilleurs moyens d'empilement des électrodes en parallèle et en série est à envisager.

### Conclusion

Nous avons construit et étudié et dans cette partie des biopiles microfluidiques de deux différents types :

(1) Une biopile microfluidique à éthanol/O<sub>2</sub> avec des enzymes immobilisées sur des électrodes Au en se basant sur les bioélectrodes macroscopiques préalablement optimisées. La caractérisation des biopiles microfluidiques montre une amélioration modérée de leurs performances en fonction de certains paramètres comme le débit d'écoulement et la nature de carbone. En revanche, nous avons remarqué une amélioration importante des performances (80%) en fonction du design des électrodes dans le microcanal. La meilleure biopile microfluidique est celle qui fonctionne avec du Super P<sup>®</sup> comme poudre de carbone à l'anode (pH 9) et à la cathode (pH 5) et avec un débit d'écoulement de 16μL/min. Néanmoins, nous avons remarqué une chute de performances au cours de temps.

(2) Une biopile microfluidique à glucose/O<sub>2</sub> avec des enzymes en solution. Nous avons constaté que la simplicité du procédé de fabrication et le faible coût de la technologie sont des facteurs clés dans cette partie. Nous avons démontré l'intérêt des techniques de xurography pour la fabrication et l'optimisation des puces microfluidiques 2D et 3D à très faible coût pour des applications en biopile microfluidique. La conception 3D permet l'empilage des microcanaux afin d'augmenter la production d'énergie à partir d'un seul microcanal. En effet, la puissance délivrée augmente de 185% en passant d'une biopile microfluidique 2D à 3D.

### Références

- [1] T. Chen, S. C. Barton, G. Binyamin, Z. Gao, Y. Zhang, H. Kim, A. Heller, *Chem. Soc.* 123 (2001) 8630-8631.
- [2] N. Mano, F. Mao, A. Heller, *Chem. Soc.* 125 (2003) 6588-6594.
- [3] M.B. Fischback, J.K. Youn, X. Zhao, P. Wang, H.G. Park, H.N. Chang, J. Kim, S. Haa, *Electroanalysis* 18 (2008) 2016-2022.
- [4] M. H. Sun, G.V. Casquillas, S. S. Guo, J. Shi, H. Ji, Q. Ouyang, Y. Chen, *Microelectron. Eng.* 84 (2007) 1182-1188.
- [5] F. Chen, M.H. Chang, M.K. Lin, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 2506-2514.
- [6] E. R. Choban, P. Waszczuk, P.J.A. Kenis, *Electrochem. Solid-State Lett.* 8 (2005) 348-352.
- [7] S. Pennathur, J. C. T. Eijkel, A. van den Berg, *Lab on a Chip* 7 (2007) 1234-1237.
- [8] E. Kjeang, N. Djilali and D. Sinton, *Journal of Power Sources* 186 (2009) 353-369.
- [9] R. S. Jayashree, S. K. Yoon, F. R. Brushett, P. O. Lopez-Montesinos, D. Natarajan, L. J. Markoski and P. J. A. Kenis, *Journal of Power Sources* 195 (2010) 3569-3578.
- [10] E. R. Choban, J. S. Spendelow, L. Gancs, A. Wieckowski and P. J. A. Kenis, *Electrochimica Acta* 50 (2005) 5390-5398.
- [11] A. Zebda, J. Renaud, M. Cretin, F. Pichot, C. Innocent, R. Ferrigno and S. Tingry, *Electrochemistry Communications* 11 (2009) 592-595.
- [12] A. Zebda, L. Renaud, M. Cretin, C. Innocent, F. Pichot, R. Ferrigno and S. Tingry, *Journal of Power Sources* 193 (2009) 602-606.
- [13] A. Zebda, L. Renaud, M. Cretin, C. Innocent, R. Ferrigno and S. Tingry, *Sensors and Actuators B: Chemical* 149 (2010) 44-50.
- [14] T. Beneyton, I. P. M. Wijaya, C. Ben Salem, A. D. Griffiths and V. Taly, *Chemical Communications* 49 (2013) 1094-1096.
- [15] J. Lee, K. G. Lim, G. T. R. Palmore and A. Tripathi, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 7301-7307.

- [16] M. Togo, A. Takamura, T. Asai, H. Kaji and M. Nishizawa, *Journal of Power Sources* 178 (2008) 53-58.
- [17] M. Togo, A. Takamura, T. Asai, H. Kaji and M. Nishizawa, *Electrochimica Acta* 52(2007) 4669-4674.
- [18] Maria José González-Guerrero, Juan Pablo Esquivel, David Sánchez-Molas, Philippe Godignon, Francesc Xavier Muñoz, F. Javier del Campo, Fabien Giroud, Shelley D. Minter and Neus Sabaté, *Lab on a Chip*. 13 (2013) 2972-2979
- [19] K. G. Lim and G. T. R. Palmore, *Biosensors & Bioelectronics* 22 (2007) 941-947.
- [20] J. Yang, S. Ghobadian, P. J. Goodrich, R. Montazami, N. Hashemi, *J. Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 14147-141461.
- [21] M. J. González-Guerrero, J. P. Esquivel, D. Sánchez-Molas, P. Godignon, F. X. Muñoz, F. Javier del Campo, F. Giroud, S. D. Minter, N. Sabaté, *J. Lab on Chip* 13 (2013) 2972-2979.
- [22] M. R. Thorson, F. R. Brushett, C. J. Timberg, P. J. A. Kenis, *J. Power Sources* 218 (2012) 28-33.
- [23] S. K. Yoon, G. W. Fichtl, P. J. A. Kenis, *J. Lab Chip* 6 (2006) 1516-1524.
- [24] A. Bazylak, D. Sinton, N. Djilali, *J. Power Sources* 143 (2005) 57-66.
- [25] A. E. Khabbazi, A. J. Richards, M. Hoorfar, *J. Power Sources* 195 (2010) 8141-8151.
- [26] S. Topcagic, S. D. Minter, *J. Electrochimica Acta* 51(2006) 2168-2172.
- [27] X. Luo, A. Morrin, A. J. Killard, M. R. Smyth, *J. Electroanalysis* 19 (2007) 244-252.
- [28] S. D. Minter, P. Atanassov, H. R. Luckarift and G. R. Johnson, *Mater. Today* 15 (2012) 166-173.
- [29] S. Ha, Y. Wee, J. Kim, *J. Top. Catal.* 55 (2012) 1181-1200.
- [30] M. Opallo, R. Bilewicz, *J. Advances in Physical Chemistry* (2011) 1-21.
- [31] F. M. Cuevas-Muniz, M. Guerra-Balcazar, J. P. Esquivel, N. Sabate, L. G. Arriaga and J. Ledesma-Garcia, *Journal of Power Sources* 216 (2012) 297-303.
- [32] T. J. M. Luo, J. F. Fei, K. G. Lim, G. T. M. Palmore, *ACS Symposium Series* 890 (2005) 268-271.
- [33] E. R. Choban, L.J. Markoski, A. Wieckowski, P.J.A. Kenis, *J. Power Sources* 128 (2004) 54-60.
- [34] M.H. Sun, G.V. Casquillas, S.S. Guo, J. Shi, H. Ji, Q. Ouyang, Y. Chen, *Microelectron. Eng.* 84 (2007) 1182-1185.

- [35] C. Amatore, N. Da Mota, C. Della, L. Thouin, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8502-8510.
- [36] F. Chen, M.H. Chang, M.K. Lin, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 2506-2514.
- [37] E.R. Choban, P. Waszczuk, P.J.A. Kenis, *Electrochem. Solid-State Lett.* 8 (2005) 348-352.
- [38] K.G. Lim, G. Tayhas, R. Palmore, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 941-947.
- [39] G.M. Whitesides, *Nature*, 442 (2006) 368-373.
- [40] Renaud, C. Malhaire, P. Kleimann, D. Barbier and P. Morin, *Materials Science and Engineering* : 28(1988) 910-917.
- [41] F.G. Bessoth, A. J. de Mello and A. Manz, *Analytical Communications*, 36 (1999) 213-215.
- [42] M. A. Hunger, H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer and S. R. Quake, *Science*, 288 (2000) 113-116.
- [43] I. E. Araci and S. R. Quake, *Lab-On-A-Chip*, 12 (2012) 2803-2806.
- [44] PJA Kenis , *J. Power Sources* , 195 (2010) 3569-3578
- [45] SM Matthews, GQ Du et AC Fischer , *J. Solid State Electrochem.* 10 (2006) 817-825.

### Conclusion générale

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé en cotutelle entre l'Institut Européen des Membranes (IEM) de Montpellier et l'université de Sétif et a porté sur la fabrication d'électrodes enzymatiques pour le développement de biopiles alcool/oxygène. Ces systèmes fonctionnent à partir de l'oxydation de l'éthanol par l'enzyme alcool déshydrogénase à l'anode, et de la réduction de l'oxygène par l'enzyme laccase à la cathode.

Dans le but d'améliorer les performances électriques et électrochimiques des biopiles à alcool, notre stratégie a concerné la construction de nouveaux matériaux d'électrodes conducteurs avec une grande surface spécifique capables d'immobiliser des charges élevées d'enzymes. Nous nous sommes orientés vers :

- la synthèse d'un matériau tridimensionnel à base de nanofibres de polyacrylonitrile obtenus par la technique d'électrospinning, et rendu conducteur par dépôt d'une couche mince d'or par pulvérisation cathodique (Au/NFsPAN).
- l'addition de différentes poudres de carbone (graphite ou amorphe) afin d'augmenter la surface disponible pour le confinement des espèces rédox et les échanges électroniques. Les propriétés intrinsèques de ces poudres (surface spécifique, conductivité électrique) jouent un rôle dans l'augmentation des performances des bioélectrodes.

Les bioélectrodes ont été réalisées et optimisées sur substrats Au et sur Au/NFsPAN. Les bioélectrodes ont été assemblées dans une cellule à deux compartiments afin de constituer une biopile macroscopique éthanol/oxygène. Il a été constaté que l'incorporation des nanofibres de PAN/Au conduit à augmenter les performances électriques de la biopile de 75%, ce qui démontre l'importance de ce matériau d'électrode à grande surface spécifique pour une utilisation dans les biopiles à combustible. Nous avons également démontré que la capacité d'adsorption des poudres de carbone joue un rôle important dans l'augmentation des performances de la biopile. La biopile à éthanol la plus performante a fourni une densité de puissance max de  $1600 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  à 0,7 V obtenue par la méthode de polarisation et de  $210 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  à 0,6 V obtenue par résistance imposée. Cependant ce système subit des pertes importantes de la densité de puissance au cours de temps, qui ont été attribuées à la désorption et/ou à la détérioration des enzymes.

## Conclusion générale

---

Enfin la continuité de ce travail a mené à la réalisation d'une biopile microfluidique en confinant des bioélectrodes à l'intérieur d'un microcanal fabriqué en PDMS. IL a été mis en évidence le rôle important du design des électrodes qui influe sur l'épaisseur de la couche de déplétion qui se forme le long des électrodes lors de l'écoulement des solutions dans le micro canal. La biopile microfluidique a délivré une densité de puissance de  $90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  à 0,78 V, ce qui démontre la faisabilité d'un tel système pour l'oxydation de l'éthanol.

Dans le but d'augmenter la production de l'énergie obtenue avec un seul microcanal, une biopile microfluidique basée sur l'empilement de trois microcanaux a été réalisée avec des enzymes en solution. Cette étude préliminaire a été appliquée au fonctionnement d'une biopile utilisant du glucose et de l'oxygène en solution. Nous avons constaté que la simplicité du procédé de fabrication et le faible coût de la technologie sont des facteurs clés dans cette partie. Nous avons démontré l'intérêt des techniques de xurography pour la fabrication et l'optimisation de puces microfluidiques 2D et 3D à très faible coût pour des applications en biopile microfluidique. La conception 3D a permis l'empilage des microcanaux dans un minimum d'espace et d'augmenter la puissance délivrée de 185% par rapport à une biopile microfluidique 2D.

Dans ce travail, nous avons réussi à développer des biopiles macroscopique et microfluidique dont les performances sont comparables aux travaux de la littérature. En revanche, ces performances élevées observées ne sont valables que pour des temps de fonctionnement relativement courts. La stabilité des biopiles est donc un paramètre important à améliorer. Cela passe peut être par le développement de nouvelles méthodes d'immobilisation et d'autres types de matériaux permettant un confinement des espèces actives et un transfert électronique efficaces à l'électrode.



**Perspective : vers les biopiles  
microfluidiques hybrides**

### I-Introduction

Les résultats obtenus dans ce manuscrit présentent le développement et l'optimisation d'une biopile microfluidique à éthanol/O<sub>2</sub> avec des performances électrochimiques supérieures aux résultats décrits dans la littérature. Cependant ce dispositif présente une très faible stabilité, causé principalement par une perte d'électroactivité de la bioanode. Afin de remédier à ce problème d'instabilité, nous présentons dans cette partie une étude préliminaire sur la construction d'une biopile microfluidique hybride à glucose/O<sub>2</sub>, en associant une électrode abiotique constituée d'un catalyseur métallique à base de np-Au et d'une électrode enzymatique modifiée par la laccase en présence de Super P<sup>®</sup>.

L'intérêt des biopiles hybrides est, d'une part, la sélectivité des enzymes à la cathode vis-à-vis de la réduction électrochimique d'O<sub>2</sub>, et d'autre part, la présence de nanoparticules métalliques à l'anode qui augmentent la cinétique d'oxydation des carbohydrates et améliorent la stabilité du système, par comparaison avec les biopiles fonctionnant avec des enzymes à l'anode et à la cathode. Actuellement, le développement de biopiles hybrides, à base de nano particules métalliques comme catalyseurs de l'oxydation du glucose, est une nouvelle piste exploratoire, limitée à très peu de systèmes [1-3].

La synthèse de nanoparticules Au (np-Au) a attiré une attention considérable au cours des dernières décennies en raison de leurs potentielles applications dans la biologie, la catalyse et l'électronique. [4-11] Récemment l'immobilisation des np-Au sur des substrats solides a suscité beaucoup d'intérêt en raison de leur grande dispersion, leur bonne stabilité et leurs propriétés catalytiques efficaces [12-15].

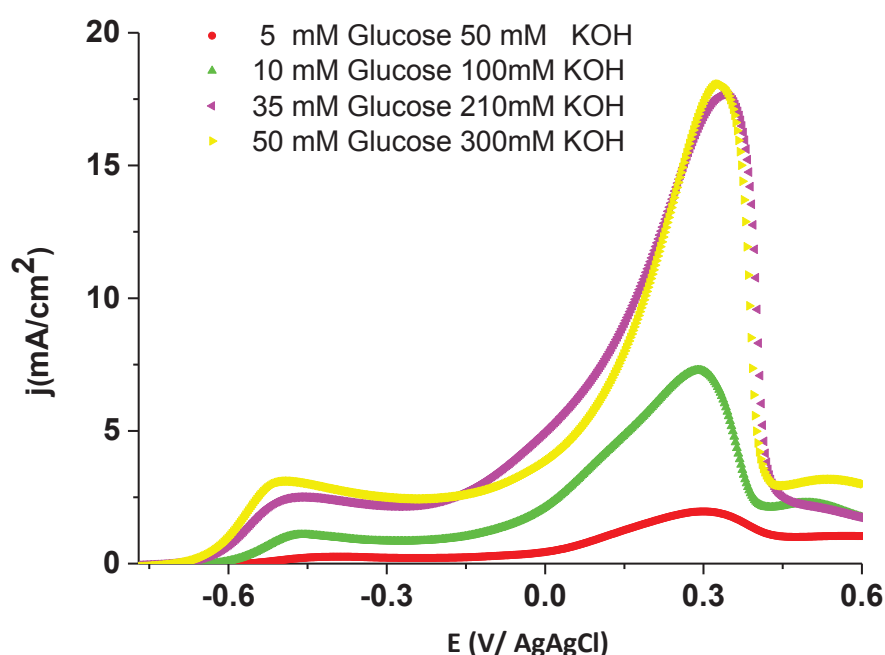
L'or est un métal attractif pour l'oxydation du glucose à la fois en solution alcaline et neutre [19-21]. En particulier, les np-Au ont été largement étudiées pour la conception et la fabrication de catalyseurs métalliques pour des applications possible dans les piles à combustible ou les capteurs [19-26]. Les propriétés catalytiques de l'or changent lorsque la taille des particules de base diminue de quelques nanomètres en raison des transitions de phase des particules. Les propriétés catalytiques des np-Au pour l'oxydation du glucose ont connu un intérêt important non seulement dans le développement des capteurs à glucose, mais aussi pour des applications dans les biopiles à combustible glucose/oxygène [19-25].

## II- Synthèse et caractérisation d'une électrode anodique à base de np-Au

### II-1-Macroanode à base de np-Au

Les np-Au ont été déposées sur une électrode Au ( $S=0,12 \text{ cm}^2$ ) à partir d'un mélange de  $\text{HAuCl}_4$  (Au (III) chlorure trihydrate) (1,57 g/l) et d'acide perchlorique ( $\text{HClO}_4$ ) (14,39 g/l) dans l'eau. Le dépôt a été réalisé par la méthode d'ampérométrie impulsionnelle pendant 10 minutes. Cette technique consiste à évaluer la variation de courant en fonction du temps après imposition d'impulsions en tension appliquées à l'électrode.

Nous avons testé le comportement électrochimique de cette électrode par voltammétrie cyclique dans une solution de glucose en présence de KOH à différentes concentrations. Les courbes obtenues présentent l'oxydation électrocatalytique du glucose (figure 1).



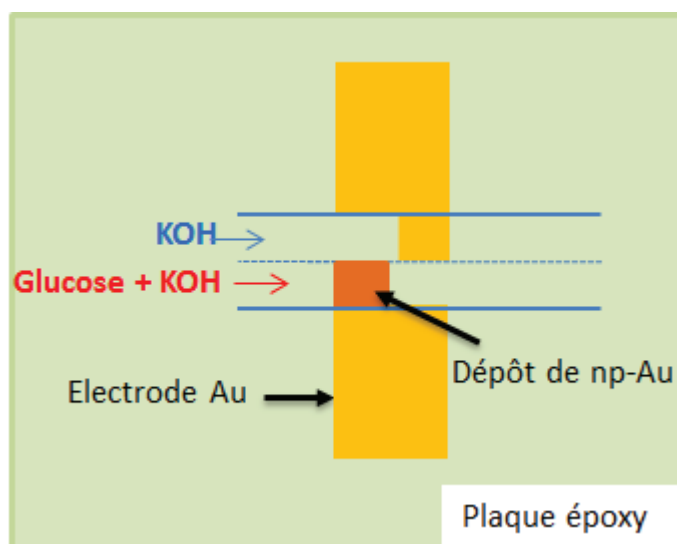
**Figure 1 :** courbes de voltammétrie cyclique du glucose à différentes concentrations sur une électrode de np-Au ( $S=0,12 \text{ cm}^2$ ) dans une solution de KOH à différentes concentrations,  $v=3,33 \text{ mV/s}$ .

Le premier pic vers  $-0,5 \text{ V/Ag/AgCl}$  correspond à l'oxydation du glucose en gluconolactone par les np-Au et le deuxième (le plus grand en densité de courant) vers  $0,3 \text{ V}$  correspond à l'oxydation du gluconolactone qui se transforme facilement en acide gluconique. On observe aussi une forte augmentation des densités de courant des deux pics en fonction de

l'augmentation de la concentration de glucose et de KOH, qui se stabilisent quand la concentration de glucose et de KOH atteint 35 mM et 210 mM respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus par Tominaga et ses collaborateurs qui ont étudié l'oxydation du glucose sur une électrode de carbone modifiée par des np-Au dans un milieu alcalin. Ils ont trouvé que la densité de courant fournie par des électrodes modifiées par des nanoparticules Au dans des solutions alcalines et neutres est beaucoup plus faible que celle fournie par une électrode de plaque d'or. Ces résultats indiquent que les électrodes modifiées par des nanoparticules Au sont utiles pour l'étude de l'oxydation du glucose [1-2].

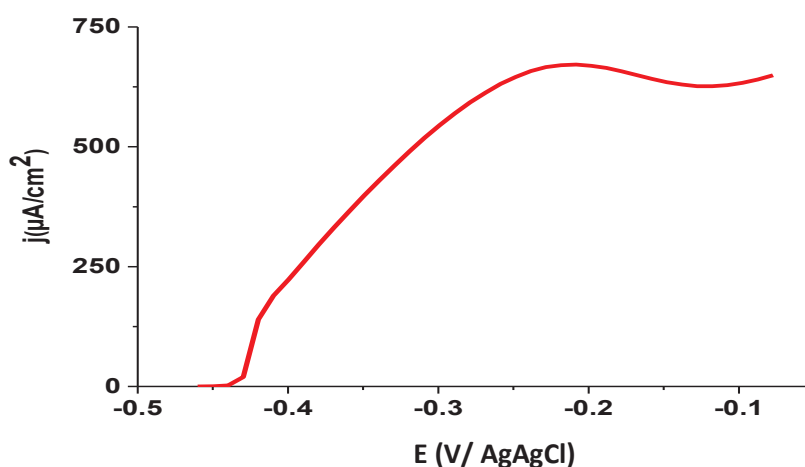
### II-2- Microanode à base de np-Au

Nous avons par la suite préparé et caractérisé une électrode en configuration microfluidique, en utilisant le motif A, avec dépôt de np-Au sur une électrode Au d'une surface de  $0,05 \text{ cm}^2$  (figure 2).



**Figure 2 :** schéma de la microanode à base de np-Au avec le motif (A)

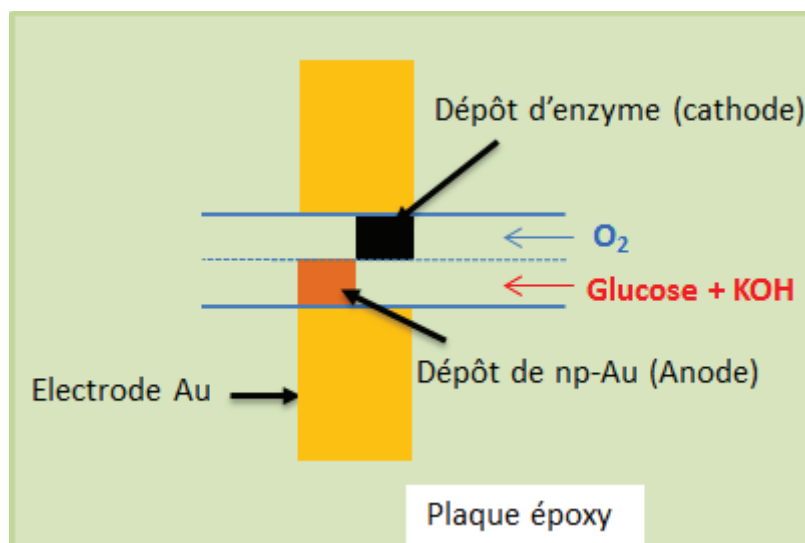
Le comportement électrochimique de l'électrode a été testé en utilisant le même système microfluidique présenté dans le chapitre précédent. Les concentrations de glucose et de KOH ont été fixées respectivement à 35 mM et 210 mM. La courbe de polarisation caractéristique de l'oxydation du glucose a été obtenue pour un débit d'écoulement des solutions de  $16 \mu\text{L}/\text{min}$  (figure 3). L'électrode délivre une densité de courant d'environ  $600 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  correspond à l'oxydation catalytique du glucose en gluconolactone. Le potentiel à courant nul est  $-0,45 \text{ V}/\text{ECS}$ .



**Figure 3 :** Courbe de polarisation d'une microanode à base de np-Au, testée en microfluidique avec le motif (A). glucose : 35 mM et KOH : 210 mM,  $v = 3.33 \text{ mV/s}$ , débit des solutions = 16  $\mu\text{L/min}$ .

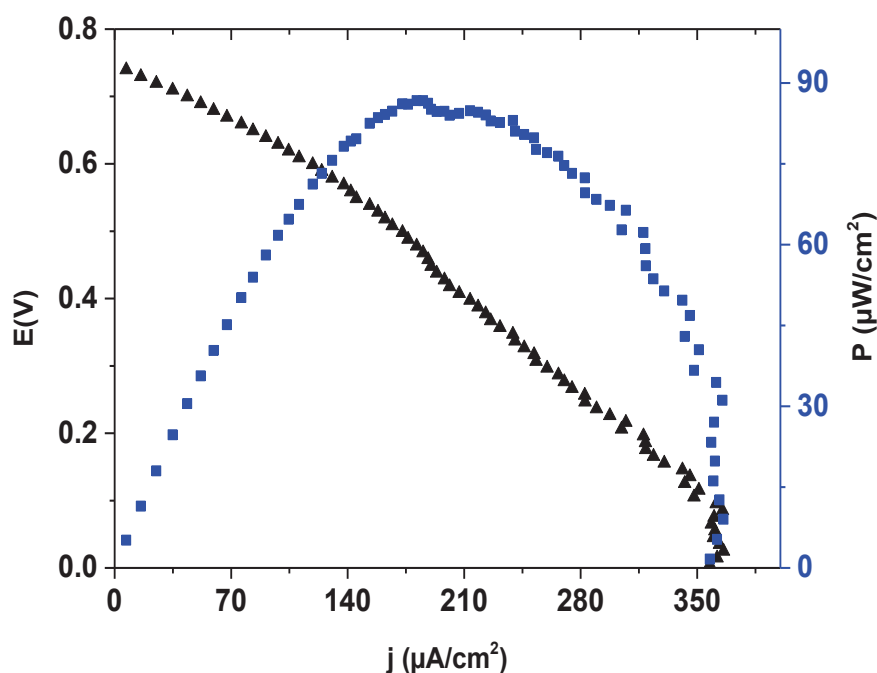
### III- Synthèse et caractérisation de la biopile hybride avec une anode de np-Au et une biocathode à base de laccase

Une pile microfluidique hybride à glucose/ $\text{O}_2$  a été réalisée avec une anode à base de np-Au pour catalyser l'oxydation du glucose et une biocathode modifiée par la laccase pour réduire l' $\text{O}_2$ . Nous avons utilisé le motif A schématisé en figure 4 pour configurer les électrodes dans le micro canal, et utilisé un débit d'écoulement des solutions de 16  $\mu\text{L/min}$ . La courbe de polarisation enregistrée est présentée sur la figure 5.



**Figure 4 :** schéma des bioélectrodes de la pile microfluidique hybride avec une anode à base de np-Au pour l'oxydation du glucose et une cathode à base de laccase pour la réduction de l'O<sub>2</sub>. Les électrodes modifiées sont placées dans le microcanal caractérisé par l'écoulement laminaire des deux solutions: tampon phosphate 0,1M saturé par O<sub>2</sub> et mélange de glucose (35 mM) et de KOH (210 mM).

La pile microfluidique hybride fournit une ddp de 0,75V. Les densités de puissance et de courant maximales obtenues sont de 90  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  et 350  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  respectivement (figure 5). Ce dispositif délivre la même densité de puissance que la biopile microfluidique à base d'enzymes à l'anode et à la cathode présentée dans le chapitre 3. Néanmoins le carburant utilisé n'est pas le même donc on ne peut pas comparer directement la valeur de la densité de puissance. Cependant, la pile hybride est plus stable au cours des différents balayages successifs comme observé dans le tableau 1.



**Figure 5:** Courbes de polarisation ( $\Delta$ ) et de puissance ( $\square$ ) de la pile microfluidique hybride Glucose/ $O_2$  avec une anode à base de np-Au et une cathode à base de laccase et Super P<sup>®</sup>. Anolyte (Glucose 35mM, KOH 210 mM, pH 13,6), catholyte (pH 5, tampon phosphate 0,1M),  $v = 3.33$  mV/s, débit = 16  $\mu$ L/min.

**Tableau 1:** Stabilité de la pile microfluidique hybride et de la biopile microfluidique à base d'enzymes à l'anode et à la cathode, au cours de balayages successifs.

pile	Densité de puissance max ( $\mu$ W/cm <sup>2</sup> )	Densité de puissance max ( $\mu$ W/cm <sup>2</sup> )	Densité de puissance max ( $\mu$ W/cm <sup>2</sup> )
	1 <sup>er</sup> balayage	2 <sup>ème</sup> balayage	3 <sup>ème</sup> balayage
Pile hybride (np-Au /laccase)	90	55	50
Biopile (bioanode et biocathode Super P <sup>®</sup> )	90	25	12

## Perspectives

---

D'après le tableau 1, la densité de puissance de la pile hybride microfluidique diminue de 44% après le 3<sup>ème</sup> balayage comparée à la perte de 85% de la biopile microfluidique enzymatique. Ce résultat montre bien l'influence de l'anode à base de np-Au pour améliorer la stabilité de la biopile microfluidique.

La diminution des performances au cours de balayages successifs est probablement due à un faible mélange des deux solutions (anolyte et catholyte) à cause de la viscosité élevée de la glucose + KOH. Ce phénomène conduit à une augmentation de pH du catholyte qui diminue, voire inhibe l'activité de l'enzyme laccase. Après arrêt complet des pompes, les deux solutions se mélangent dans le microcannal et l'enzyme est alors en contact avec la solution basique de KOH (pH 13,6). Cette situation conduit à la perte quasi-totale des performances de la pile microfluidique hybride due à la dénaturation de l'enzyme à des pH basiques.

En conclusion, la fabrication d'une pile hybride constitue une piste intéressante à exploiter par la suite car elle pourrait améliorer la stabilité du dispositif. Il serait intéressant de poursuivre cette étude préliminaire en optimisant d'autres paramètres dans le but d'augmenter la densité de puissance.



### Références

- [1] M. Tominaga, T. Shimazoe, M. Nagashima, I. Taniguchi, *Electrochemistry Communications* 7 (2005) 189–193.
- [2] Z. Liu , C. Zhou , B. Zheng, L. Qian , Y. Mo, F. Luo, Y. Shi, M. M. F. Choi, D. Xiao, *Analyst*. 136 (2011) 4545-4551.
- [3] A. Habrioux, K. Servat, S. Tingry, K.B. Kokoh, *Electrochemistry Communications* 11 (2009) 111-113.
- [4] G. Schmid, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 111(1998) 52–57.
- [5] G. Hutchings, *Catalysis by gold*, *Catal. Today*. 100 (2005) 55–61.
- [6] A. N. Shipway, E. Katz and I. Willner, *ChemPhysChem*. 1 (2000) 18–52.
- [7] X. Shi, S. Wang, S. Meshinchi, M. E. van Antwerp, X. Bi, I. Lee and J. R. Baker, *Small* 3 (2007) 1245–1252.
- [8] G. Bond and D. Thompson, *Catal. Rev. Sci. Eng.* 41 (1999) 319–388.
- [9] J. Turkevich, P. C. Stevenson and J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* 11 (1951) 55-75.
- [10] J. P. Xie, Y. G. Zheng and J. Y. Ying, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 888–889.
- [11] S. K. Balasubramanian, L. Yang, L. Y. L. Yung, C. N. Ong, W. Y. Ong and L. E. Yu, *Biomaterials* 31 (2010) 9023–9030.
- [12] M. Haruta, S. Tsubota, T. Kobayashi, H. Kageyama, M. J. Genet and B. Delmon, *J. Catal.* 144 (1993) 175–192.
- [13] M. Haruta, *Catalysis: Gold rush*, *Nature*, 437 (2005) 1098–1099.
- [14] B. Guo, S. Z. Zhao, G. Y. Han and L. W. Zhang, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 5174–5179.
- [15] C. R. Henry, *Appl. Surf. Sci.* 164 (2000) 252–259.
- [16] Y.B. Vassilyev, O.A. Khazova, N.N. Nikolaeva *J. Electroanal. Chem.* 196 (1985) 127-144.
- [17] L. A. Larew, D.C. Johnson *J. Electroanal. Chem.* 262 (1989) 167-182.
- [18] R. R. Adzic, M.W. Hsiao, E.B. Yeager *J. Electroanal. Chem.*, 260 (1989) 475-485.
- [19] M. Haruta, *Chem. Rec.* 3 (2003) 75-87.

- [20] A. Wieckowski, E.R. Savinova, C.G. Vayenas (Eds.), *Catalysis and Electrocatalysis at Nanoparticle Surfaces*, Marcel Dekker, New York (2003).
- [21] B. Zhou, S. Hermans, G.A. Somorjai (Eds.), *Nanotechnology in Catalysis*, Kluwer Academic/Plenum, New York (2004).
- [22] M. M. Maye, J. Luo, L. Han, N.N. Kariuki, C.J. Zhong *Gold Bull.* 36 (2003) 75-83.
- [23] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R.J. Whyman *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1994) 801-802.
- [24] M. J. Hostetler, J.E. Wingate, C.J. Zhong, J.E. Harris, R.W. Vachet, M.R. Clark, J.D. Londono, S.J. Green, J.J. Stokes, G.D. Wignall, G.L. Glish, M.D. Porter, N.D. Evans, R.W. Murray *Langmuir* 14 (1998) 17-30.
- [25] M. M. Maye, W. Zheng, F.L. Leibowitz, N.K. Ly, C.J. Zhong *Langmuir* 16 (2000) 490-497.
- [26] A.C. Templeton, W.P. Wuelfing, R.W. Murray *Acc. Chem. Res.*, 33 (2000) 27-36.

# **Matériels et Méthodes**

### 1-Produits chimiques

#### 1-1-Solvants et électrolytes

Le solvant utilisé est l'eau distillée.

l'hydrogénophosphate disodique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ) et le dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ) sont des produits Sigma-Aldrich.

Les tampons phosphates ont été préparés à partir de ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ) et ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ) (pH 5, 7 ou 9. 0,1M).

Le pH des solutions a été mesuré avec un pH mètre Tacussel électronique PHN 81

#### 1-2-Réactifs

Le Polyacrylonitrile (PAN) ( $M_w = 150\,000$ ), la poly-L-lysine(PLL) (0,1% w/v dans l' $\text{H}_2\text{O}$ ), le Nafion<sup>®</sup> 117, acétone (99,5%), l'hexacyanoferrate de potassium (III) ( $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ ) sont des produits Sigma-Aldrich.

L'acide poly(acrylique) [PAA] est un produit Sigma-Aldrich, préparé dans de l'eau distillée à 3,4mg/mL.

Le poly(éthylèneimine) [PEI] sous forme d'un gel (50% en eau) est un produit Sigma-Aldrich. Sa solution est préparée par dilution de 0,11g de PEI dans 4mL d'une solution de NaCl (0,5M) avec une concentration de 2,75%.

Alcohol dehydrogenase (ADH) de *Saccharomyces cerevisiae* (300  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), Laccase de *Trametes versicolor* (10  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), glucose oxidase (GOD) de *Aspergillus niger* (198,000  $\text{U} / \text{mg}$  solid), Diaphorase de *Clostridium kluyveri* (3-20  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), Vitamine K3 (ménadione ou VK3), sel diammonium d'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) [ABTS], sel sodique de  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide ( $\text{NAD}^+$ ) sont des produits Sigma-Aldrich.

le diméthylformamide (DMF), et l'hydroxyde de sodium (NaOH) sont des produits Sigma-Aldrich.

Acide perchlorique ( $\text{HClO}_4$ ) et Or (III) chlorure trihydrate ( $\text{HAuCl}_4$ ) (99%), sont des produits Sigma-Aldrich.

L'éthanol (99,8%) est un produit Sigma-Aldrich.  $\beta$ -D-glucose (produit Prolabo) a été préparée dans un tampon phosphate 0,1 M de pH 7 au moins 24h avant l'utilisation.

Les poudres de carbone KS6 et Super P<sup>®</sup> sont des produits Timcal. Le carbone Vulcan<sup>®</sup> est un produit Cabot (USA).

Les plaques de Silicium (100) de type-p sont des produits MEMC Korea company

Les plaques de résine époxy sont des produits Farnell.

### 2- Electrochimie

#### 2-1- Appareillage

Les mesures électrochimiques sont effectuées à l'aide d'un potentiostat Autolab (PGSTAT 302N) relié à un ordinateur, et avec une cellule à trois électrodes. Pour les essais en demi-pile, une plaque d'acier a été utilisée comme contre électrode. L'électrode de référence est une électrode de Calomel saturée en KCl.

#### 2-2- Protocole

Toutes les manipulations électrochimiques ont été faites dans une cellule d'électrolyse comportant trois électrodes, pour pouvoir imposer le potentiel à l'électrode, le faire varier et produire ainsi des réactions électrochimiques. L'intensité est mesurée entre l'électrode auxiliaire (contre-électrode) et l'électrode de travail. Le potentiel de l'électrode de travail est contrôlé grâce à une électrode de référence.

Pour imposer à l'électrode de travail un potentiel bien contrôlé, on utilise un appareil électronique d'asservissement appelé potentiostat, aux bornes duquel les trois électrodes sont connectées. Cet appareil fournit automatiquement la tension électrique entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire, nécessaire pour que la tension entre l'électrode de référence et l'électrode de travail soit maintenue égale à une valeur de consigne affichée à l'appareil.

#### 2-3- Méthodes de caractérisation électrochimique

##### ❖ Courbes de polarisation Intensité-Tension :

Cette technique consiste à varier le potentiel de l'électrode de travail, à une vitesse de balayage constante et à enregistrer l'intensité du courant généré.

##### ❖ Voltammétrie cyclique :

C'est une technique qui consiste à effectuer un balayage cyclique des potentiels et à enregistrer l'intensité du signal correspondant. Le spectre (voltampérogramme) obtenu présente un pic de réduction (courant négatif) et un pic d'oxydation (courant positif) caractéristique du comportement électrochimique de l'espèce présente en solution.

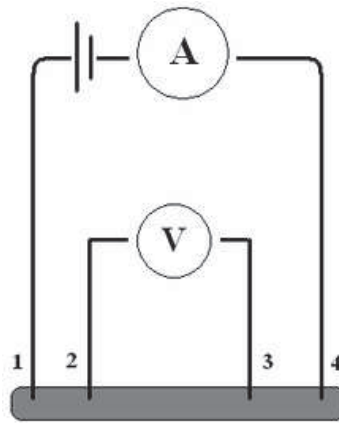
❖ Détermination de la densité de puissance délivrée par la biopile :

Elle a été déterminée en faisant le produit de la densité de courant par la ddp de la pile ( $AE \times I$ ).

### 2-4 Analyse physique

#### La méthode des 4 pointes :

La méthode 4 pointes (à bien distinguer de la méthode de Van der Pauw) est utilisable pour mesurer la conductivité d'un substrat. Il faut placer les 4 pointes loin des bords du substrat à caractériser, et les aligner. Le courant est envoyé par un générateur de courant entre les pointes 1 et 4, tandis que la tension est mesurée entre les pointes 2 et 3.



*Figure 1: schéma d'une mesure 4 pointes*

Les compositions chimiques et structurales des électrodes NFsPAN/Or ont été analysées par microscopie électronique à balayage (MEB, S-4800, Hitachi), spectroscopie de rayons X (MEB, S-4500, couplée avec un détecteur EDX Thermo Sher), diffraction rayons-X (diffractomètre PAN Alytical Xpert-PRO équipé d'un détecteur X'celerator utilisant Ni-filtered, Cu-radiation).

Les épaisseurs des couches Au ont été mesurées sur des substrats de Si en utilisant un ellipsomètre spectroscopique Semilab GES5E (entre 1,23 et 5eV). Les mesures ellipsométriques sont effectuées à un angle d'incidence fixé à  $75^0$ , à proximité de l'angle de Brewster pour le substrat de silicium, et une longueur d'onde variable entre 300 nm et 1  $\mu\text{m}$ .

Les mesures de conductivité électrique ont été réalisées par la méthode «deux points de contacts» dans lequel deux contacts sont reliés à la surface de l'échantillon. Un courant constant a été appliqué par les sondes de courant externes en utilisant un instrument EG&G (Princeton Applied Research). La chute de tension aux bornes des deux sondes de tension interne est mesurée. La résistivité électrique  $R$  a été calculée à partir de la pente de la courbe  $I$ - $E$ , puis la conductance ( $G = 1/R$ ) a été extraite.

La surface spécifique a été déterminée après 2h de dégazage à 200 °C, en appliquant la BET (Brunauer, Emmett et Teller).

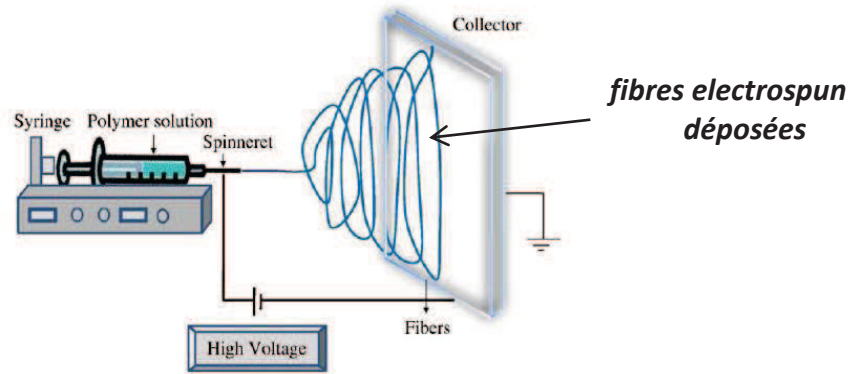
### 3- Partie expérimentale du chapitre 1

Les supports utilisés pour réaliser les électrodes sont :

- Des résines époxy recouvertes Au (300nm) par pulvérisation cathodique (Edwards Scancoat Six) dans une décharge plasma d'argon.
- Des plaques de silicium modifiées par une couche de polymère (polyacrylonitrile) déposé par la méthode d'électrospinning, avec un dépôt Au déposé par la méthode de pulvérisation cathodique.

#### 3-1- Conception des électrodes (Au/NFsPAN/Si)

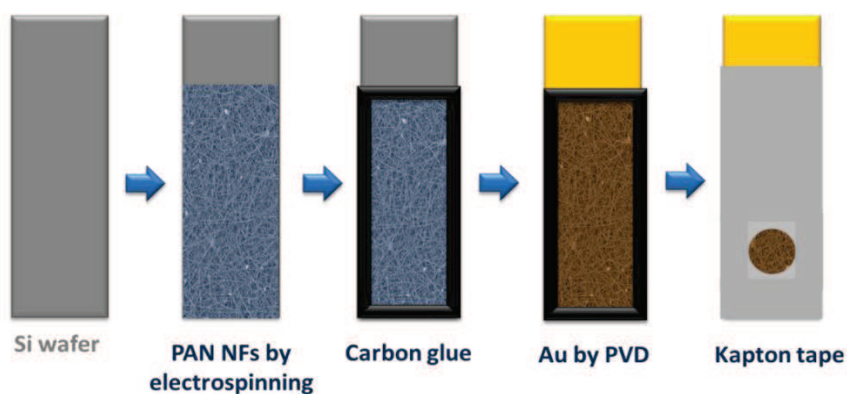
La solution d'électrospinning a été préparée par dissolution de 10% (rapport en poids) de PAN dans le diméthylformamide. La solution a été maintenue sous agitation pendant 1 heure et ensuite chauffée dans un bain d'huile à 80°C pendant 10 min. La solution de polymère était électrofilée à température ambiante sous une tension appliquée de 25 kV, avec débit d'écoulement de 3 ml/h, en utilisant une seringue de 0,7 mm de diamètre reliée à la sortie positive du générateur. Un disque d'aluminium placé à 25 cm du bout de la seringue est relié à la sortie négative du générateur. Le champ électrostatique appliqué entre la seringue et le collecteur de disque fournit la transformation de la gouttelette à un cône de Taylor. La goutte est ensuite étirée dans le champ électrostatique afin de former une fibre submicronique après l'évaporation du solvant. La machine d'électrospinning utilise un générateur HPx 600 605 (instruments physiques) et une pompe à seringue KDS 100 (figure 2).



**Figure 2:** schéma du dispositif d'électrospinning

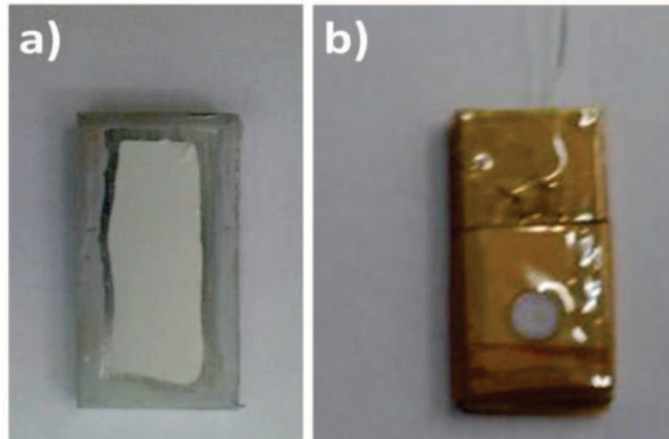
Le schéma de processus pour la conception de l'électrode est présenté dans la figure 3. La plaque de silicium a été découpée en morceaux de  $10 \times 20 \text{ mm}^2$  et a été fixée sur le disque d'aluminium avec la colle de carbone. L'électrospinning a été fait pendant 5 minutes afin de couvrir le substrat de Si par des couches de nanofibres homogènes. Après l'électrospinning, les nanofibres de PAN ont été bien fixées sur le substrat de Si avec la colle de carbone afin d'assurer l'adhérence mécanique et la connexion électrique entre les nanofibres de PAN et le substrat (figure 3). Le dépôt Au a été fait par pulvérisation cathodique (Edwards Scancoat Six) dans une décharge plasma d'argon.

Les conditions opératoires sont : pression de travail  $10^{-1} \text{ Pa}$ , tension 1,7 kV, la température du substrat près de  $20^\circ\text{C}$ , et courant 10 mA. Le temps de déposition a été ajusté pour obtenir l'épaisseur Au désirée. Après pulvérisation Au, une fenêtre de fonctionnement a été définie sur le substrat en utilisant un film de Kapton (figure 4).



**Figure 3:** Schéma des électrodes NFsPAN/Or





**Figure 4:** *micrographie numérique des électrodes Au/NFsPAN/Si.*

### 3-2- Bioanode

La procédure pour faire les dépôts d'enzymes sur des électrodes Au nues ou modifiées par des Au/NFsPAN/Si est la suivante :

-Les dépôts anodiques sont effectués en 4 couches, les 3 premières sont composées par un mélange de poudre de carbone et d'enzymes.

-Un mélange de 15 mg de carbone (KS6 ou Super P<sup>®</sup>) et 1 mL de tampon pH 5 est placé dans un microtube, puis dispersé dans un agitateur à ultrasons pendant 15min. Cette solution a été utilisée pour préparer les 3 solutions servant aux dépôts successifs:

- 167 $\mu$ L de carbone + 5mg d'ADH
- 167 $\mu$ L de carbone + 5mg de NAD<sup>+</sup>
- 167 $\mu$ L de carbone + 3,4mg de diaphorase

-Chacune de ces solutions est mélangée au vortex pendant 20 minutes puis déposée successivement sur l'électrode (10 $\mu$ L soit 84 $\mu$ L/cm<sup>2</sup>) et séchée sous air.

-A la fin, une solution de VK3 (60mg/mL) préparée dans l'acétone en présence de PEI est déposée en dernière couche.

### 3-3- Biocathode

La procédure de préparation des biocathodes est la suivante :

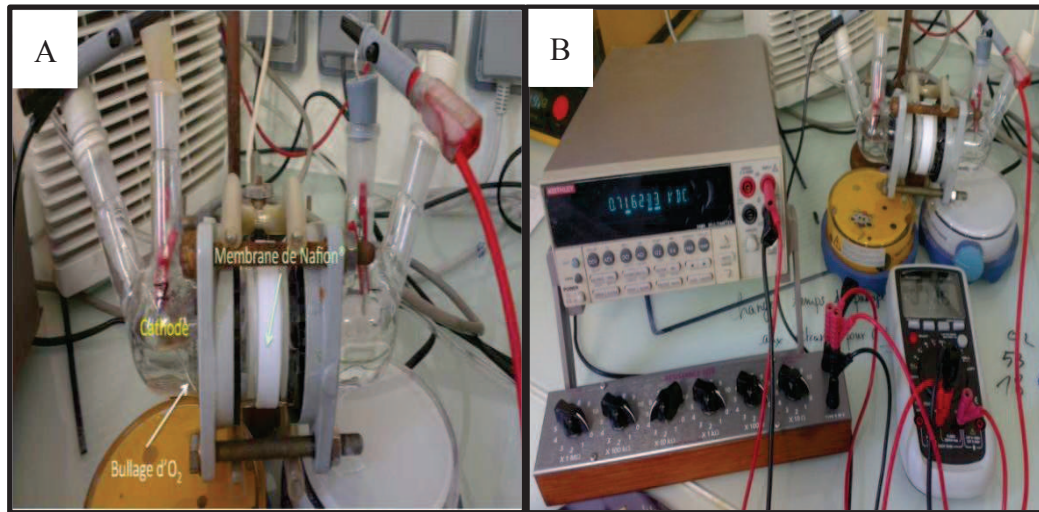
- Une solution de PAA (3,4mg/mL) est préalablement déposée par micropipette sur une électrode Au ( $12 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ ) puis séchée à l'air.
- Un mélange de 7,5 mg de carbone (KS6 ou Super P<sup>®</sup>) et 1 mL de tampon pH 5 est placé dans un microtube, puis dispersé dans un agitateur à ultrasons pendant 15min (solution A).
- 333 $\mu\text{L}$  de la solution A est prélevé et ajouté à 2,5mg de laccase puis le tout est mélangé au vortex (solution B).
- Dans un autre microtube, une solution d'ABTS (2,7mg) est dissoute dans 500 $\mu\text{L}$  de tampon pH 5 (solution C).
- Dans un autre microtube on mélange 100 $\mu\text{L}$  de la solution B, 90 $\mu\text{L}$  de la solution C et 10 $\mu\text{L}$  d'une solution de Nafion<sup>®</sup>. 10 $\mu\text{L}$  de ce mélange est déposé sur l'électrode modifiée par du PAA puis séché à l'air.

### 4- Partie expérimentale du chapitre 2

La biopile macroscopique (figure 5) est composée de deux compartiments de 40mL, chacun contenant les solutions d'anolyte (tampon phosphate pH 7 ou 9, 70mM d'éthanol) et de catholyte (tampon phosphate pH 5, sous O<sub>2</sub>) et séparés par une membrane de Nafion<sup>®</sup>.

La biopile a été testée par deux méthodes :

- à partir des courbes de polarisation en configuration biopile (figure 5-A).
- à partir des courbes intensité-potentiel obtenues par débit sur résistances (figure 5-B).



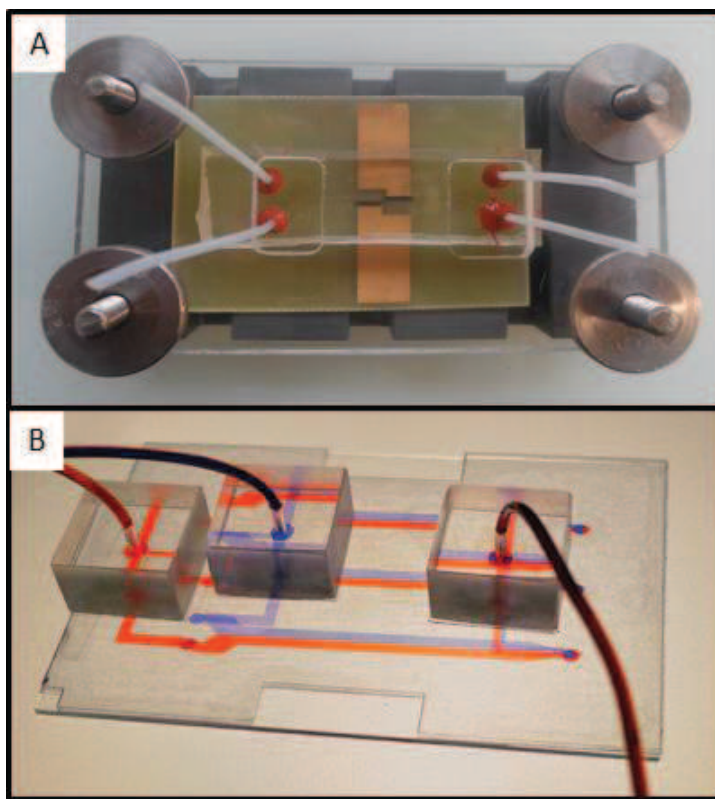
**Figure 5:** Photographies des biopiles à éthanol/oxygène testées par polarisation (A) et par résistances imposées (B).

### 5- Partie expérimentale du chapitre 3

La cellule du système microfluidique est constituée par le microcanal en PDMS construit à partir de la technique de lithographie douce « soft lithography » ou par la technique de « xurography » qui a été combinée à une distribution de canaux à plusieurs niveaux. Les solutions anolyte et catholyte (décrites précédemment) vont s'écouler en parallèle dans ces microcanaux. Les solutions sont introduites par deux microtubes de PTFE grâce à un pousse-seringues KDS (débits entre 16 et 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) et récupérées en sortie dans un bécher.

Les électrodes Au sont préparées de la même manière que les électrodes du système macroscopique.

Les cellules microfluidiques utilisées dans cette partie sont présentées sur la figure 6.



**Figure 6:** cellules microfluidiques pour la biopile (A) éthanol/ $O_2$  et (B) glucose/ $O_2$

## Résumé

Les biopiles représentent une solution attractive et ambitieuse pour développer des systèmes alternatifs de conversion d'énergie. Ce travail décrit la construction d'une biopile à éthanol/O<sub>2</sub> (oxydation de l'éthanol à l'anode et réduction de l'oxygène à la cathode) avec des électrodes tridimensionnelles possédant une surface spécifique élevée. Le point de départ a été la fabrication et l'optimisation de bioélectrodes enzymatiques par immobilisation d'enzymes et de médiateurs sur des nanofibres de polyacrylonitrile, préparées par la méthode d'électrospinning, et recouvertes d'or. Ces bioélectrodes à base de nanofibres (biocathode et bioanode) ont été assemblées pour construire et caractériser une biopile à éthanol/O<sub>2</sub> qui a fourni une densité de puissance de 1600  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  par la méthode de polarisation et 210  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  par imposition de résistances au système. Enfin, nous avons décrit la fabrication de la première biopile miniaturisée à éthanol/oxygène avec des enzymes immobilisées sur électrodes Au en s'appuyant sur les concepts de la microfluidique. La biopile microfluidique la plus performante a délivré 90  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Afin d'augmenter la puissance délivrée par ces systèmes miniaturisés, des résultats préliminaires ont été obtenus sur l'empilement en série ou en parallèle de biopiles fonctionnant avec des enzymes en solution.

**Mots clés :** biopiles à combustible enzymatique, microfluidiques, nanoparticules de carbones, bioélectrodes, cinétique de l'enzyme.

## Abstract

Biofuel cells represent an attractive and ambitious option for developing alternative systems of energy conversion. This work describes the construction of an ethanol/O<sub>2</sub> biofuel cell (ethanol oxidation at the anode and oxygen reduction oxygen at the cathode) from tridimensional electrodes with high specific surface area. The starting point was the synthesis and the optimization of the enzymatic bioelectrodes on gold electrodes by immobilizing enzymes and mediator on polyacrylonitrile nanofibers, obtained by electrospinning method, and recovered by gold nanoparticles. The bioelectrodes (bioanode and biocathode) based on nanofibers have been assembled to build and to characterize an ethanol/O<sub>2</sub> biofuel cell that has delivered a power density of 1600  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  by the polarization method, and 210  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  by imposing resistances to the system. Finally, we have described the production of the first miniaturized ethanol/O<sub>2</sub> biofuel cell with immobilized enzymes at Au electrodes based on microfluidic concepts. The best microfluidic biofuel cell has delivered 90  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . In order to increase the power delivered by these miniaturized systems, preliminary results have been obtained by stacking biofuel cells, working with enzymes in solution, in series or parallel.

**Keywords:** Enzymatic biofuel cell, Microfluidics, Carbon nanoparticles, Bioelectrodes, Enzyme kinetics.

## ملخص

البطارية البيولوجية هي خلية تطور نظام تحويل الطاقة البديلة (أكسدة الإيثانول في الأنود وإرجاع الأوكسجين عند الكاثود). الهدف من العمل هو صنع ألكدودات بيولوجية انزيمية تشكل أقطاب البطارية البيولوجية على إلكترود ذهب بواسطة تجميد الأنزيمات و الوسائط (طبيعة مساحيق الكربون ، ودرجة الحموضة ، ودرجة الحرارة...) ثم تطبيقها لصنع ألكدودات بيولوجية استنادا على نانو الألياف البولي أكريلونيتريال (AU/NFsPAN) باستعمال طريقة الألكتروليت. وقد تم تجميع ألكدودات البيولوجية لتكوين البطارية البيولوجية إيثانول/أوكسجين من أجل تكبير المساحة الفعالة للتفاعل. الطاقة الناتجة من التفاعل تفوق 1600  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . أخيرا طورنا أول بطارية بيولوجية إيثانول/أوكسجين مصغرة مع تجميد الإنزيمات على ألكدودات المصغرة على أساس مفاهيم الميكروفلويديك. أصدرت هذه البطارية البيولوجية المصغرة طاقة قدرها 90  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  حصل عليها بطريقة الاستقطاب و 210  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  التي حصلت عليها بطريقة المقاومة المفروضة. لزيادة إنتاج الطاقة من هذه الأنظمة المصغرة , قد تم الحصول على نتائج أولية في تجميع بطارية بيولوجية مصغرة على التسلسل أو التفرع مع استعمال إنزيمات في المحلول.

**كلمات مفتاحية :** بطاريات بيولوجية, الميكروفلويديك, نانو جزيئات الكربون, ألكدودات بيولوجية