

Université de Montréal

**Fabrication, caractérisation et étude électrochimique de
microcapsules conductrices à base de dérivés carbazole
aminés pour la conception de biopiles enzymatiques**

par

Mathieu Hébert

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophæ Doctor (PhD)
en chimie

Janvier 2012

© Mathieu Hébert, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Fabrication, caractérisation et étude électrochimique de microcapsules conductrices à base de dérivés carbazole aminés pour la conception de biopiles enzymatiques

Présentée par :
Mathieu Hébert

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Antonella Badia, président-rapporteur
Dominic Rochefort, directeur de recherche
Jean-François Masson, membre du jury
Dónal Leech, examinateur externe
Jean-Yves Lapointe, représentant du doyen de la FAS

Résumé

L'objectif général de cette thèse est de développer une plateforme d'immobilisation d'enzymes efficace pour application en biopile. Grâce à la microencapsulation ainsi qu'au choix judicieux des matériaux polymériques pour la fabrication de la plateforme d'immobilisation, l'efficacité du transfert électronique entre l'enzyme encapsulée et l'électrode serait améliorée. Du même coup, les biopiles employant cette plateforme d'immobilisation d'enzymes pourrait voir leur puissance délivrée être grandement augmentée et atteindre les niveaux nécessaires à l'alimentation d'implants artificiels pouvant remplacer des organes telque le pancréas, les reins, le sphincter urinaire et le coeur.

Dans un premier temps, le *p*-phénylènediamine a été employé comme substrat pour la caractérisation de la laccase encapsulée dans des microcapsules de poly(éthylèneimine). La diffusion de ce substrat à travers les microcapsules a été étudiée sous diverses conditions par l'entremise de son oxidation électrochimique et enzymatique afin d'en évaluer sa réversibilité et sa stabilité. La voltampérométrie cyclique, l'électrode à disque tournante (*rotating disk electrode* - RDE) et l'électrode à O₂ ont été les techniques employées pour cette étude.

Par la suite, la famille des poly(aminocarbazoles) et leurs dérivés a été identifiée pour remplacer le poly(éthylèneimine) dans la conception de microcapsules. Ces polymères possèdent sur leurs unités de répétition (mono- ou diamino) des amines primaires qui seraient disponibles lors de la polymérisation interfaciale avec un agent réticulant tel qu'un chlorure de diacide. De plus, le 1,8-diaminocarbazole (unité de répétition) possède, une fois polymérisé, les propriétés électrochimiques recherchées pour un transfert d'électrons efficace entre l'enzyme et l'électrode. Il a toutefois été nécessaire de développer une route de synthèse afin d'obtenir le 1,8-diaminocarbazole puisque le protocole de synthèse disponible dans la littérature a été jugé non viable pour être utilisé à grande échelle. De

plus, aucun protocole de synthèse pour obtenir du poly(1,8-diaminocarbazole) directement n'a été trouvé. Ainsi, deux isomères de structure (1,6 et 1,8-diaminocarbazole) ont pu être synthétisés en deux étapes. La première étape consistait en une substitution électrophile du 3,6-dibromocarbazole en positions 1,8 et/ou 1,6 par des groupements nitro. Par la suite, une réaction de déhalogénéation réductive a été réalisée en utilisant le Et₃N et 10% Pd/C comme catalyseur dans le méthanol sous atmosphère d'hydrogène. De plus, lors de la première étape de synthèse, le composé 3,6-dibromo-1-nitro-carbazole a été obtenu; un monomère clé pour la synthèse du copolymère conducteur employé.

Finalement, la fabrication de microcapsules conductrices a été réalisée en incorporant le copolymère poly[(9H-octylcarbazol-3,6-diyl)-alt-co-(2-amino-9H-carbazol-3,6-diyl)] au PEI. Ce copolymère a pu être synthétisé en grande quantité pour en permettre son utilisation lors de la fabrication de microcapsules. Son comportement électrochimique s'apparentait à celui du poly(1,8-diaminocarbazole). Ces microcapsules, avec laccase encapsulée, sont suffisamment perméables au PPD pour permettre une activité enzymatique détectable par électrode à O₂. Par la suite, la modification de la surface d'une électrode de platine a pu être réalisée en utilisant ces microcapsules pour l'obtention d'une bioélectrode. Ainsi, la validité de cette plateforme d'immobilisation d'enzymes développée, au cours de cette thèse, a été démontrée par le biais de l'augmentation de l'efficacité du transfert électronique entre l'enzyme encapsulée et l'électrode.

Mots-clés : laccase, *p*-phénylènediamine, poly(éthylèneimine), voltampérométrie cyclique, microcapsules, cellule à oxygène, bioélectrode, 1,8-diaminocarbazole, 3,6-dibromo-1-nitro-carbazole, poly[(9H-octylcarbazol-3,6-diyl)-alt-co-(2-amino-9H-carbazol-3,6-diyl)]

Abstract

The main objective of this thesis is the development of a conductive enzyme immobilisation template for laccase through microencapsulation allowing an efficient electron transfer between the enzyme and the electrode for application in biofuel cells. First, *p*-phenylenediamine was used as substrate for the characterisation of the microencapsulated laccase. The diffusion of this substrate through the microcapsules was studied under various conditions by means of its electrochemical and enzymatic oxidation processes in order to assess its reversibility and stability. Cyclic voltammetry, rotating disk electrode and Clark electrode were the techniques used in this study.

Moreover, poly(aminocarbazole) compounds and their derivatives were identified to replace poly(ethyleneimine) in the fabrication of the microcapsules. These polymers exhibit primary amines (mono- or di-amino) that could be available for an interfacial polymerisation using a cross-linker agent. Also, the monomer 1,8-diaminocarbazole presents the desired electrochemical properties for an efficient electron transfer between the enzyme and the electrode. Therefore, a synthetic pathway was developed in order to synthesise this monomer since the available literature protocol was considered inappropriate for large scale synthesis. As for the direct synthesis of the poly(1,8-diaminocarbazole), to our knowledge, there is no protocol currently available. Two structural isomers (1,6 and 1,8-diaminocarbazole) were thus synthesised in two steps. The first step consists in the electrophilic substitution of 3,6-dibromocarbazole in 1,8 and/or 1,6 positions by nitro groups. This step was followed by a dehydrodehalogenation reaction that comes along with reduction of nitro to amino functions using Et₃N and 10% Pd/C as the catalyst in methanol under H₂ flux. During the first step, the 3,6-dibromo-1-nitro-carbazole was also obtained and appeared to be an efficient monomer in the synthesis of the desired conductive copolymer.

Finally, the fabrication of the conductive microcapsules was realised by adding the copolymer poly[(9H-octylcarbazol-3,6-diyl)-alt-co-(2-amino-9H-carbazol-3,6-diyl)] to the PEI. This copolymer was synthesised in large quantities, which allowed its use in the design of microcapsules. Its electrochemical behaviour was similar in many ways to the one of poly(1,8-diaminocarbazole). These conductive microcapsules were then used to modify the surface of a platinum electrode to fabricate the bioelectrode. The main objective of this project was achieved through this final step.

Keywords : laccase, *p*-phenylenediamine, poly(ethyleneimine), cyclic voltammetry, microcapsules, Clark electrode, bioelectrode, 1,8-diaminocarbazole, 3,6-dibromo-1-nitro-carbazole, poly[(9H-octylcarbazol-3,6-diyl)-alt-co-(2-amino-9H-carbazol-3,6-diyl)]

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des schémas	xvi
Liste des sigles et des abréviations	xvii
1 INTRODUCTION	1
1.1 Les biopiles et piles à combustible	1
1.1.1 Description	1
1.1.2 La laccase comme catalyseur dans une biopile	5
1.1.3 Classification et principes de fonctionnement	7
1.2 Le diabète	12
1.2.1 Le glucomètre et la pompe à insuline	14
1.2.2 Le contrôle de la glycémie	18
1.3 Problématique	21
1.4 La microencapsulation d'enzymes	23
1.5 Électrodes polymériques	27
1.5.1 Polymères rédox	28
1.5.2 Polymères ioniques	28
1.5.3 Polymères conducteurs	29
1.5.4 Les carbazoles	31
1.6 Objectifs de l'étude et approche proposée	33
1.7 Références	37
2 THÉORIE ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	49
2.1 Electrochimie : Les grandes équations	49
2.1.1 Historique	49
2.1.2 L'équation de Nernst	50

2.1.3	L'équation de Nernst-Planck.....	52
2.1.4	Modèles de la double couche électrique	55
2.1.5	Les lois de Fick sur la diffusion des espèces.....	57
2.1.6	La formulation de Butler-Volmer.....	60
2.2	Les techniques de caractérisations électrochimiques	69
2.2.1	La voltampérométrie cyclique.....	69
2.2.2	Électrodes à disque et à anneau-disque tournantes.....	80
2.2.3	La détermination de l'activité enzymatique par l'électrode de Clark	87
2.3	Références.....	92
3	ELECTRODE PASSIVATION BY REACTION PRODUCTS OF THE ELECTROCHEMICAL AND ENZYMATIC OXIDATION OF <i>p</i> - PHENYLENEDIAMINE.....	98
3.1	Abstract.....	98
3.2	Introduction.....	100
3.3	Experimental Section.....	102
3.3.1	Materials	102
3.3.2	Apparatus and methods.....	103
3.4	Results and Discussion	105
3.4.1	Laccase activity measurements by oxygen consumption	105
3.4.2	Study of PPD in acetate and McIlvaine buffer by voltammetric experiments.....	108
3.4.3	Study of Laccase with PPD in acetate buffer by voltammetric experiments.....	116
3.4.4	Study of PPD in acetate buffer by RRDE and μ Caps-GC-RDE.....	119
3.5	Conclusions	122
3.6	Acknowledgements	123
3.7	References.....	124
4	STUDY OF $\text{Et}_3\text{N-HCO}_2\text{H/Pd(OAc)}_2(\text{PPh}_3)_2$ AND $\text{Pd/C-Et}_3\text{N}$ CATALYSTS FOR THE REDUCTIVE DEHALOGENATION OF MONO- AND DI- HALODINITROCARBAZOLE TO 1,6- AND 1,8-DIAMINOCARBAZOLE.....	128
4.1	Abstract.....	128

4.2	Introduction.....	129
4.3	Results and Discussion.....	129
4.4	Conclusions.....	139
4.5	Supporting Information.....	139
4.6	Acknowledgements.....	139
4.7	References.....	140
5	ELECTROCHEMICAL STUDY OF AMINATED CARBAZOLE POLYMER DERIVATIVES FOR LACCASE MICROENCAPSULATION IN A PERMEABLE CONDUCTIVE CAGE.....	142
5.1	Abstract.....	142
5.2	Introduction.....	143
5.3	Methods.....	145
5.3.1	General methods.....	145
5.3.2	Synthesis of copolymers.....	146
5.3.3	Microcapsule design.....	148
5.3.4	Enzymatic activity measurements.....	149
5.3.5	Electrochemical characterisations.....	150
5.4	Results and discussion.....	151
5.4.1	Electrochemical investigation of copolymers, 3,4-(NH_3^+) ₂ CBZ, 1,8/1,6-(NH_2) ₂ CBZ and 3,6-Br ₂ -1-(NH_2)CBZ.....	151
5.4.2	Lcc and microencapsulated Lcc activity measurements by oxygen consumption 159	
5.4.3	Bioelectrode characterisation by cyclic voltammetry.....	161
5.5	Conclusions.....	162
5.6	Acknowledgements.....	164
5.7	References.....	164
6	CONCLUSIONS.....	168
6.1	Perspectives futures.....	173
	ANNEXE 1.....	i

ANNEXE 2.....xxv
ANNEXE 3.....xxxv

Liste des tableaux

Table 3. 1 :	Peak potential parameters determined from cyclic voltammograms in Figure 3.3 for 5 mM PPD solutions at different pH (see caption for others conditions).	109
Table 3. 2 :	Comparison of peak potential parameters for the cyclic voltammograms of 1 mM PPD solutions under different conditions.....	114
Table 4. 1 :	Nitration reactions of 3,6-protected CBZ derivatives.....	133
Table 4. 2 :	Summary data for reductive dehalogenation reaction with Pd(OAc) ₂ (PPh ₃) ₂	135
Table 4. 3 :	Summary data for reductive dehalogenation reaction with Pd/C under H ₂ atmosphere (balloon).....	138
Table 5. 1 :	Thermodynamic parameters extracted from Figure 5.2.....	152
Table 5. 2 :	Enzymatic parameters extracted from PPD enzymatic oxydation by free and microencapsulated Lcc in an 0.1 M acetate buffer pH = 4.3.....	161

Liste des figures

- Figure 1. 1 : Schéma d'une pile à combustible utilisant l'hydrogène comme combustible et l'oxygène comme comburant. Illustration tirée de la référence 2..... 2
- Figure 1. 2 : Schéma d'une biopile montrant l'oxydation enzymatique du glucose par la glucose oxidase où les électrons libérés sont transférés directement à l'anode pour ensuite traverser le circuit externe et atteindre la cathode. À cette dernière, une réaction de réduction a lieu en combinant l'oxygène moléculaire à des protons grâce à la laccase pour donner de l'eau. Illustration tirée de la référence 14..... 5
- Figure 1. 3 : a) Structure cristalline de la Lcc *Trametes versicolor* sous sa forme oxydée déterminée à T.P.;³¹ b) structure d'une portion du site actif de l'enzyme montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique.²⁹ 6
- Figure 1. 4 : Schéma démontrant trois groupes d'enzymes selon la position du centre actif de l'enzyme a) pouvant diffuser, b) situé en périphérie de la structure enzymatique et c) fortement lié et enfouit à l'intérieur de la structure de l'enzyme.^{22,37-38} Illustration tirée de la référence 22. 8
- Figure 1. 5 : Variation de la tension de cellule et de la densité de puissance d'une biopile en fonctionnement. Les pertes majeures de tension ainsi que l'approximation de la plage de densité de courant sont indiquées. Illustration tirée de la référence 13..... 11
- Figure 1. 6 : Atlas mondial sur l'estimation de la prévalence rapportée par la Fédération Internationale du Diabète pour l'année 2010.⁵¹ 13

- Figure 1. 7 : a) Coupe d'un îlot pancréatique (ou îlot de Langerhans), coloré à l'éosine, visualisée au microscope optique⁵³ ainsi qu'une b) représentation schématique de ce dernier.⁵² 14
- Figure 1. 8 : a) Glucomètre modèle *FreeStyle-FREEDOM Lite* et b) bandelette-test *FreeStyle*.⁴ 16
- Figure 1. 9 : a) Schéma de la pompe à insuline modèle OmniPod b) glucomètre modèle *FreeStyle Navigator* c) schéma montrant l'injection de l'insuline sous-cutanée.⁵⁶..... 16
- Figure 1. 10 : Photos a) d'une pompe à insuline modèle Accu-Chek Spirit Combo ayant un réservoir d'une capacité de 3,15 mL ainsi que b) de la télécommande de cette pompe et glucomètre modèle Accu-Chek Performa Combo.⁵⁷ 17
- Figure 1. 11 : Schéma de la production de l'insuline selon la variation de la glycémie.⁵¹.
..... 19
- Figure 1. 12 : Schéma adapté présentant différentes techniques d'immobilisation d'enzymes en surface d'électrodes, soit par a) adsorption, b) confinement en utilisant une matrice polymérique ou une membrane et c) microencapsulation.⁶¹ 25
- Figure 1. 13 : Représentation schématique du processus d'échange électronique à l'intérieur d'un film a) polymère rédox et b) polymère ionique contenant des molécules rédox pouvant diffuser dans ce dernier. Les \circ représentent la forme oxydée tandis que les \bullet sont la forme réduite du couple rédox. Les flèches courbées représentent le transfert électronique entre les deux formes du couple rédox tandis que les flèches ondulées représentent les processus diffusionnels. Image tirée de la référence 105. 29

Figure 1. 14 : Structures de différents polymères conducteurs. Image tirée de la référence 114.....	30
Figure 2. 1 : Schéma représentant les phénomènes de a) diffusion b) migration et c) convection.	52
Figure 2. 2 : Représentation schématique de la double couche électrique selon le modèle GCS. Illustration inspirée de la référence 14.....	56
Figure 2. 3 : Comportement attendu de C_d selon le modèle de CGS. Illustration tirée de la référence 7.	57
Figure 2. 4 : Représentation schématique des processus impliqués en surface d'une électrode lors d'une réaction électrochimique. Illustration tirée de la référence 1.	62
Figure 2. 5 : a) Profil des énergies libres de Gibbs standards présentant les effets d'un changement de potentiel. b) Agrandissement de la section grise. Illustration tirée de la référence 14.	64
Figure 2. 6 : Courbe potentiodynamique décrivant le balayage effectué durant une expérience de voltampérométrie cyclique. Figure tirée de la référence 41.....	70
Figure 2. 7 : Voltampérogramme cyclique obtenu à une électrode de Pt pour le système réversible $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ dissous dans une solution aqueuse de KCl à 1,0 M. Vitesse de balayage = 100 mV s^{-1} . Figure tirée de la référence 6.....	72
Figure 2. 8 : Concentration des espèces $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ à la surface d'une électrode de Pt en fonction de la distance de séparation de l'électrode lors d'un voltampérogramme cyclique semblable à celui de la Figure 2.7. Figure tirée de la référence 41.	73

- Figure 2. 9 : Effet d'un sel support (KCl 1,0 M) sur la réversibilité du couple rédox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ à 5 mM en milieu aqueux à une vitesse de balayage de 100 mV s^{-1} . Figure tirée de la référence 6. 78
- Figure 2. 10 : a) Photo d'une RDE de GC. b) Représentation du fonctionnement d'une RDE. Figure tirée de la référence 58. 81
- Figure 2. 11 : Représentation du profil du modèle de diffusion de Nernst. Figure tirée de la référence 59. 82
- Figure 2. 12 : Exemple d'un voltampérogramme d'une solution de 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dans 1 M KCl obtenue à une RDE de Pt. 84
- Figure 2. 13 : Schéma technique d'une RRDE. Figure tirée de la référence 7. 85
- Figure 2. 14 : Schéma représentant le chemin parcouru par convection d'un analyte généré au disque jusqu'à l'anneau d'une RRDE. Figure tirée de la référence 7. 86
- Figure 2. 15 : Exemple d'une courbe de Michaelis-Menten pouvant être exprimée par une fonction hyperbolique. Figure tirée de la référence 63. 89
- Figure 2. 16 : Schéma de la cellule à oxygène.⁶⁴ La membrane semi-perméable en Téflon sépare la cellule de l'électrode et permet le passage de l'oxygène qui est réduit à l'électrode travail. 91
- Figure 3. 1 : Determination of the optimum enzymatic activity of Lcc with 1 mM ABTS (diamonds) or 1.6 mM PPD (triangles) in 0.1 M acetate buffer. The errors bars represent the incertitude calculated on 3 experiments with a $t_{95} = 4.3$ 106

Figure 3. 2 : Determination of the Michaelis-Menten curves for the Lcc with ABTS (diamond) or PPD (triangles) using the oxygen cell method in 0.1 M acetate buffer, pH = 4.5.	108
Figure 3. 3 : CVs (first cycles) of a 5 mM PPD solution in 0.1 M acetate buffer GC, using $v = 40 \text{ mVs}^{-1}$ and various pH values.	110
Figure 3. 4 : CVs (first cycles) of a 5 mM PPD solution in 0.1 M acetate buffer GC, using $v = 40 \text{ mVs}^{-1}$ and various pH values.	111
Figure 3. 5 : GC electrode passivation in 0.1M McIlvaine buffer pH 6.2 upon potential cycling at $v = 40 \text{ mVs}^{-1}$. PPD concentration was 5 mM (A) and 1 mM (B).	112
Figure 3. 6 : pH equilibrium of the diimine oxidation product.	113
Figure 3. 7 : Electrode passivation observed at higher scan rate ($v = 500 \text{ mVs}^{-1}$) in a 1 mM PPD solution (0.1 M McIlvaine buffer at pH 6.2).	115
Figure 3. 8 : CVs obtained in a freshly made solution of PPD (1 mM). In (A) no laccase was added, while (B) contained an amount of 70U of laccase. CVs were recorded in 0.1M acetate buffer pH 4.7 on GC at $v = 20 \text{ mVs}^{-1}$	117
Figure 3. 9 : Influence of scan rate on the oxidation and reduction currents of the PPD oligomers formed in solution in presence of laccase. The solid line is representative of the curves obtained after cycling at potential higher than 500 mV vs. Ag/AgCl and demonstrate electrode passivation. See Figure 3.8 for conditions.	119
Figure 3. 10 : PPD oxidation under hydrodynamic conditions (100-500 rpm). Oxidation currents (at disk) were taken at $E = 590 \text{ mV}$ while the ring electrode was poised at 100 mV. See Figure 3.8 for other conditions.	120

- Figure 3. 11 : Cyclic voltammograms of a rotating GC electrode modified with polymer microcapsules in a 1 mM PPD solution (0.1 M acetate buffer, pH 4.7) at $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$ and 50 rpm.122
- Figure 5. 1 : Scheme of microencapsulated enzyme as a conductive template for biofuel cell technology.144
- Figure 5. 2 : Cyclic voltammograms of 1mM of a) 1,8-(NH₂)₂CBZ and b) mixture of 1,6/1,8-(NH₂)₂CBZ at $v = 40 \text{ mVs}^{-1}$ in 0.1 M HClO₄.152
- Figure 5. 3 : Cyclic voltammograms of a) 1-NH₂-3,6-Br₂-CBZ at $v = 40 \text{ mVs}^{-1}$ and b) 3,4-(⁺NH₃)₂TPH at $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$ respectively in 0.1 M HClO₄.155
- Figure 5. 4 : Cyclic voltammograms after 10 cycles of a) CoPolyA and B at $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$ in 1.0 M HCl; b) CoPolyC and D at $v = 200$ and 100 mVs^{-1} respectively in 0.1 M HClO₄. Inset graph show closer look of CoPolyC between 0 and 1 V.....157
- Figure 5. 5 : Cyclic voltammograms of bioelectrode at $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$ in 0.1 M acetate buffer pH = 4.3.....162

Liste des schémas

Scheme 4. 1 :	Mechanism for 1,8-nitration of 3,6-protected CBZ.....	131
Scheme 4. 2 :	Proposed electrophilic substitution mechanism of 3,6-protected-1-nitro CBZ intermediates.	131
Scheme 5. 1 :	Structure of copolymers studied.	148
Scheme 5. 2 :	General scheme for microcapsule fabrication.	149

Liste des sigles et des abréviations

Sigles/abréviations	Signification
α	Coefficient de transfert de vitesse hétérogène standard
γ_{Ox}	Coefficient d'activité de l'espèce oxydée
γ_{Red}	Coefficient d'activité de l'espèce réduite
ΔE_p	Différence de potentiel entre les pics d'oxydation et de réduction
ΔG	Énergie libre de Gibbs
ΔG°	Énergie libre de Gibbs standard
ΔG^\ddagger	Énergie libre de Gibbs standard impliquée au complexe activé
ε	Coefficient d'absorptivité molaire
$\bar{\mu}$	Potentiel électrochimique
$\mu_j^{\circ\alpha}$	Potentiel chimique standard de l'espèce j dans la phase α
v	Vitesse de balayage
κ	Coefficient de transmission
$^\circ\text{C}$	Degré Celsius
A	Ampère
a_j^α	Activité de l'espèce j dans la phase α

ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbénzothiazoline-6-sulphonique)
ABTS ^{•-}	Forme oxydée de l'ABTS
ABTS ²⁻	Forme dianionique de l'ABTS
CBZ	Carbazole
¹³ C NMR	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du carbone
C _O	Concentrations à la surface de l'électrode de la forme oxydée
C _R	Concentrations à la surface de l'électrode de la forme réduite
Cu _{T1}	Ion cuivrique de type 1
Cu _{T2/T3}	Ion cuivrique de types 2 et 3
D _O	Coefficients de diffusion de l'espèce oxydée
D _R	Coefficients de diffusion de l'espèce réduite
<i>E</i>	Champ électrique (voltage)
E	Potentiel appliqué à l'électrode de travail
E ^{o'}	Potentiel normal apparent
E _{1/2}	Potentiel de demi-vague
E _{p,a}	Potentiel du pic anodique (oxydation)
E _{p,c}	Potentiel du pic cathodique (réduction)
E _{p/2}	Potentiel de demi-pic
F	Constante de Faraday (96485 C.mol ⁻¹)

GC	Électrode de carbone vitreux (glassy carbone)
h	Constante de Planck
$^1\text{H NMR}$	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton
HOMO	«Highest Occupied Molecular Orbital»
i	Courant
$i_{p,c}$	Courant de pic cathodique
$i_{p,a}$	Courant de pic anodique
$i_{p/2}$	Courant de demi-pic observé à $E_{p/2}$
J_L	Densité de courant limite
K	Kelvin
k	Constante de Boltzmann
k^o	Constante de vitesse hétérogène standard
$k_{a,c}$	Constante de vitesse de réaction anodique ou cathodique
Lcc	laccase
LUMO	«Lowest Unoccupied Molecular Orbital»
n	Nombre d'électron(s) échangé(s)
PEI	Poly(éthylèneimine)
pH	Potentiel d'hydrogène
PPD	<i>p</i> -phénylènediamine

Pt	Électrode de platine lorsque Pt n'est pas l'élément chimique
R	Constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)
RDE	Électrode à disque tournante (Rotating Disk Electrode)
RRDE	Électrode disque-anneau tournante (Rotating Ring-disk Electrode)
Span [®] 85	Trioléate de sorbitan
T.P.	Température pièce
U	Unité d'activité enzymatique
V	Volt
VC	Voltampérométrie cyclique
vs Ag/AgCl	Potentiel mesuré rapporté à l'électrode au chlorure d'argent
vs SCE	Potentiel mesuré rapporté à l'électrode de Calomel saturée

*If you make yourself more than just a man.
If you devote yourself to an ideal,
and if no one can stop you.
Then you become something else.
A legend...*

Inspiré de Ra's Al Ghul, Batman Begins.

Remerciements

Je veux remercier le Pr. Dominic Rochefort de l'Université de Montréal (UdeM) et superviseur de cette thèse, de m'avoir accepté au sein de son groupe de recherche à l'hiver 2007. J'ai été privilégié durant mon doctorat d'avoir été appuyé inconditionnellement dans toutes mes démarches entreprises tant au niveau professionnel que personnel. Mes années à côtoyer cet homme m'ont appris à déceler chez autrui leur potentiel et de les amener à croire en eux, tout comme il a fait pour moi. Par-dessous tout, mon passage dans son groupe de recherche m'aura permis de trouver réponse à une question fondamentale de la vie : Pourquoi tombons-nous? Pour mieux apprendre à se relever...

Je tiens à remercier tous mes collègues du laboratoire Rochefort : Laurence, Fadil, Karine, Yufen, Marco-Polo, Fatma, Carlos et John avec qui j'ai apprécié la vie de doctorant. Chaque occasion de décompresser aux différents rendez-vous tels que les «bière et pizza», «beignes et café» ainsi que les «5 à 7 de la Maisonné» ont été bénéfiques.

J'exprime ma gratitude envers toute l'équipe de techniciens et techniciennes du département de chimie. Leur gentillesse ainsi que leur serviabilité ont été très appréciés durant mes tâches d'enseignement en laboratoire ainsi qu'à maintes autres occasions.

J'aimerais remercier tous les techniciens des ateliers de mécanique et de soufflage de verre pour leur aide apporté lors de la fabrication de différentes composantes nécessaires à l'exécution de mes travaux de recherche.

Je remercie mes coéquipiers de SOLARIS avec qui notre rendez-vous hebdomadaire nous permet de mettre en perspective les priorités de nos vies et de pratiquer notre religion, le HOCKEY.

Je veux remercier ma famille ainsi que mes amis proches pour leur soutien moral tout au long de ces années. Leur compréhension lors de mes absences à plusieurs réunions de famille a été à chaque fois un coup de pouce pour ne pas abandonner en cours de route.

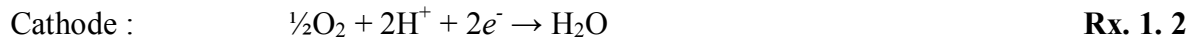
Enfin, je veux remercier du plus profond de mon cœur ma compagne de vie, Debby. Tu as toujours été là quand j'en avais besoin. Depuis plusieurs années maintenant nous avons surmonté toutes sortes d'obstacles. À chaque fois, mes forces se sont renouvelées en ta présence. Mon amour, aucune chimie ne saura expliquer ce que j'éprouve pour toi. Je t'aime tout simplement...

1 INTRODUCTION

1.1 Les biopiles et piles à combustible

1.1.1 Description

La combustion n'est pas la seule voie pour extraire de l'énergie utilisable des carburants chimiques ; de l'électricité peut être obtenue directement à l'aide d'une pile à combustible (PAC). L'origine de la première PAC date du milieu du 19^e siècle et son principe fut décrit pour la première fois par William Grove en 1839.¹ De l'acide sulfurique dilué comme électrolyte, de l'oxygène à la cathode et de l'hydrogène à l'anode furent employés à température ambiante. À ce moment, aucune batterie conventionnelle de type «plomb - acide» ou «Leclanché» n'était disponible.² La pile à combustible fut définie comme étant «... un dispositif qui convertit l'énergie chimique contenue dans les réactifs (un carburant et un oxydant) en électricité de bas voltage en courant continu.»³ Tout comme les piles primaires (ex : piles alcalines Zn | MnO₂) et les piles rechargeables ou secondaires (ex : Pb | PbO₂), les PACs convertissent l'énergie chimique en électricité par des réactions d'oxydo-réduction. Par contre, à la différence des piles conventionnelles, les PAC ne consomment pas les matériaux d'électrodes, ce qui leur permet de fonctionner tant et aussi longtemps que l'alimentation en combustible et en comburant est assurée. La Figure 1.1 illustre le fonctionnement d'une pile H₂/O₂ où l'hydrogène est oxydé à l'anode, libérant des électrons qui passent à travers le circuit externe pour ensuite réduire l'oxygène à la cathode en présence des protons :



La réaction [Rx. 1.3] est la même que la réaction de combustion de l'hydrogène sauf qu'ici l'énergie se retrouve majoritairement sous forme d'électricité au lieu de chaleur. Cette réaction est tout simplement l'inverse de la réaction d'électrolyse de l'eau où de l'hydrogène et de l'oxygène sont produits aux électrodes.²

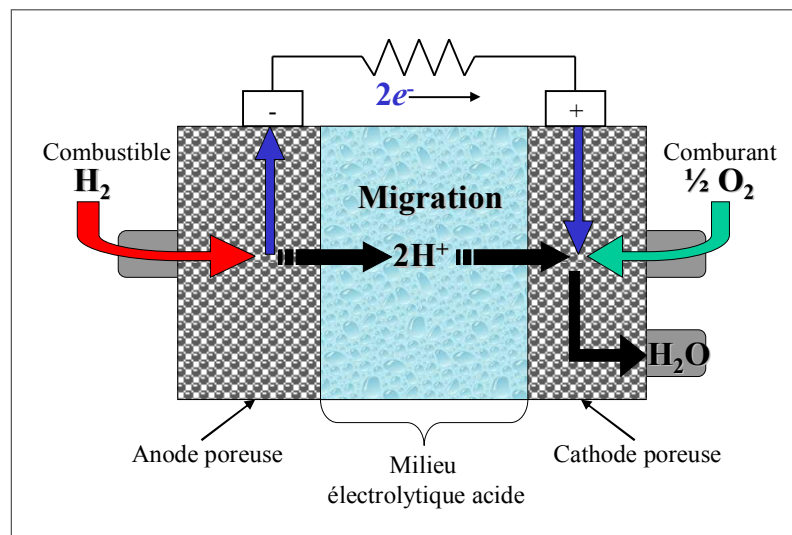


Figure 1.1 : Schéma d'une pile à combustible utilisant l'hydrogène comme combustible et l'oxygène comme comburant. Illustration tirée de la référence 2.

Puisqu'une grande partie de l'énergie produite est sous forme d'électricité, l'efficacité de la pile n'est pas limitée par la quantité de chaleur générée, comme dans le cas d'un moteur à combustion interne limité par le cycle de Carnot. Cependant, l'efficacité

théorique n'est atteinte que si aucun courant n'est soutiré du système. Dans ces conditions d'équilibre, la force électromotrice standard de la pile est de 1,23 V. L'utilisation de l'électricité produite dans un circuit externe a pour conséquence de diminuer cette valeur en raison des pertes associées aux phénomènes suivants :

- La lenteur de la cinétique des réactions aux électrodes (surtension d'activation).
- La résistance causée par le mouvement des ions dans le milieu électrolytique situé entre les deux électrodes (chute ohmique).
- Les problèmes de transfert des espèces réactives vers les électrodes (surtension de concentration).

L'intérêt dans le développement des systèmes bioélectroniques a augmenté depuis la multiplication d'appareils médicaux implantables. L'application ayant le plus grand succès commercial est sans contredit le glucomètre pour les patients atteints de diabète et ce depuis maintenant plus d'une décennie.⁴⁻⁵ D'autres types de systèmes ont été fabriqués pour suivre la concentration de polluants dans l'environnement⁶⁻⁸ ou même d'armes biochimiques.⁹ Le domaine des appareils électroniques portatifs tel que les téléphones mobiles, les tablettes électroniques et les ordinateurs portables est très convoité par des compagnies de renom mondial comme Sony[®]. D'ailleurs, un projet de biopile utilisant le sucre et des enzymes comme catalyseurs pour alimenter un Walkman[®] a vu le jour en 2007.¹⁰ L'avenir est aussi prometteur pour le domaine médical. En effet, on prévoit l'utilisation de biopiles telque montré à la figure 1.2 comme source d'énergie aux implants artificiels pouvant remplacer des organes telque le pancréas, les reins, le sphincter urinaire et le coeur.¹¹ Cependant, le développement des biopiles utilisant des enzymes n'en est qu'à ses débuts et cela, même si les premiers travaux publiés remontent aux années 1960.¹²

Les biopiles peuvent être définies au sens large comme étant des systèmes pouvant convertir l'énergie chimique en électricité via des processus biochimiques.¹³ Cette conversion électrochimique de l'énergie est très recherchée puisqu'elle permet d'éviter les limitations thermodynamiques reliées aux réactions de combustion. Le tout est possible en couplant une réaction d'oxydation se faisant à une anode qui envoie les électrons à travers un circuit externe. Ces derniers alimentent la cathode où une réaction de réduction permet de convertir les électrons en énergie chimique. Le flux d'ions entre les deux électrodes permet de garder l'équilibre des charges tout en fermant le circuit électrique (Figure 1.1). Une des caractéristiques des biopiles est l'utilisation de biocatalyseurs, notamment les enzymes, pour effectuer les réactions électrochimiques au lieu de matériaux constitués en majeure partie de métaux et/ou de polymères conducteurs comme ceux utilisés dans les PAC. En effet, les enzymes sont des catalyseurs extraordinairement efficaces et spécifiques qui peuvent augmenter la vitesse de certaines réactions d'un facteur de 10^3 à 10^{17} .¹² Certaines peuvent être immobilisées en surface d'électrodes pour la réalisation de systèmes bioélectrochimiques tels que des biocapteurs ou des biopiles. D'ailleurs, certaines biopiles utilisent des enzymes redox pour produire un courant électrique à partir de l'oxydation d'un combustible tel que le glucose et la réduction de l'oxygène comme comburant (Figure 1.2).

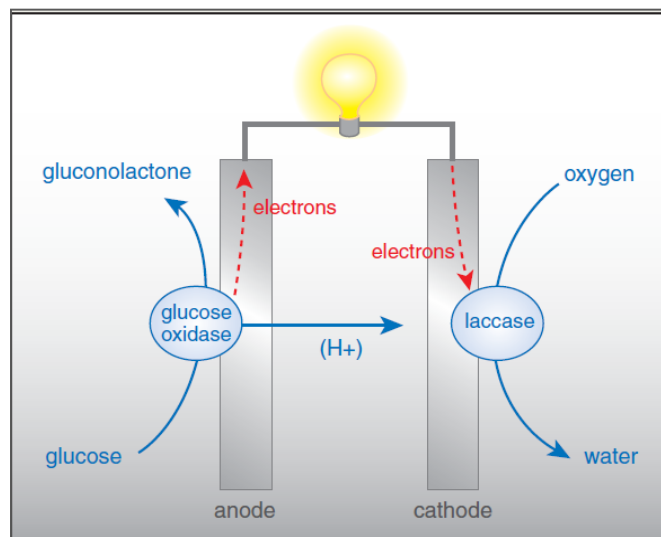


Figure 1. 2 : Schéma d'une biopile montrant l'oxydation enzymatique du glucose par la glucose oxidase où les électrons libérés sont transférés directement à l'anode pour ensuite traverser le circuit externe et atteindre la cathode. À cette dernière, une réaction de réduction a lieu en combinant l'oxygène moléculaire à des protons grâce à la laccase pour donner de l'eau. Illustration tirée de la référence 14.

1.1.2 La laccase comme catalyseur dans une biopile

La laccase (Lcc) est une des enzymes des plus utilisées à la conception de biopile.^{11,14-22} La première publication relatant la découverte de la Lcc date de 1883 et décrit comment cette enzyme est responsable de la coagulation de la laque produite par certains arbres.²³ La Lcc (Figure 1.8) est une enzyme oxydoréductase qui se retrouve dans diverses plantes et champignons,²⁴ mais également chez certaines bactéries et insectes.²⁵ Le site actif de l'enzyme comporte quatre ions cuivriques classifiés en trois types (T1, T2 et T3) selon la nature des ligands qui y sont attachés. Chacun de ces types de cuivre est

impliqué dans un processus différent de la conversion du substrat²⁶ et peut être distingué selon son spectre de résonance paramagnétique électronique (EPR).²⁷ Le cuivre de type 1 (Cu_{T1}) est lié à une fonction thiol et présente une forte bande d'absorption à 600 nm, dont le coefficient d'absorptivité molaire (ϵ) est de $4900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,²⁸ donnant à l'enzyme en solution une couleur bleue d'où la désignation de type cuivre bleu.²⁹ Il y a également le cuivre de type 2 (Cu_{T2}) et le cuivre de type 3 (Cu_{T3}) dont le dernier est étroitement formé un centre diamagnétique par un pont métallique de type $\text{Cu}(\text{OH})\text{-Cu}$. L'oxydation du substrat a lieu à l'emplacement du Cu_{T1} et le transfert électronique se fait via l'enzyme jusqu'au site des Cu_{T2} et Cu_{T3} où la réduction de l'oxygène a lieu pour donner de l'eau (Figure 1.8b).^{25,30}

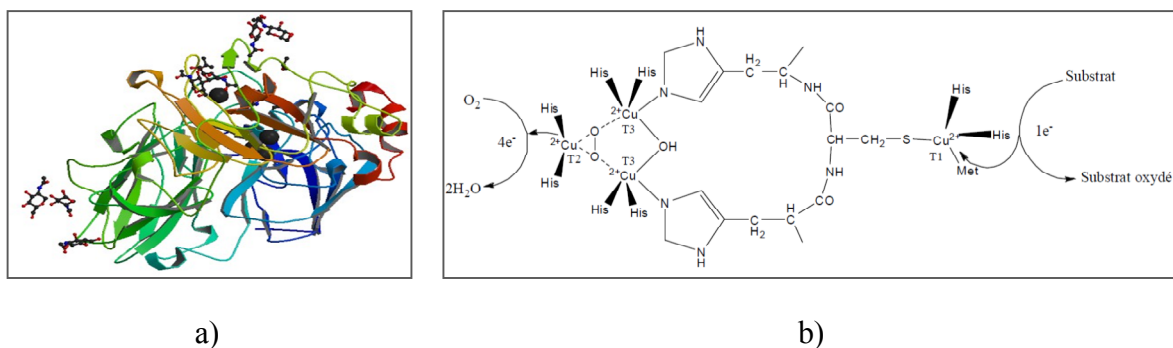


Figure 1. 3 : a) Structure cristalline de la Lcc *Trametes versicolor* sous sa forme oxydée déterminée à T.P.;³¹ b) structure d'une portion du site actif de l'enzyme montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique.²⁹

La Lcc catalyse l'oxydation d'une vaste gamme de substrats tels que les diphénols, polyphénols, phénols substitués, *o*- et *p*-quinones, aminophénols et phénylènediamines. La Lcc est connue pour le rôle important qu'elle joue dans la dégradation des phénols ce qui la rend très utile dans la décontamination des eaux industrielles.³² Elle dégrade aussi les dérivés polymériques polyphénoliques ce qui les rend insolubles et facilement séparables par filtration ou sédimentation. Sa capacité à dégrader les composés phénoliques est aussi utilisée dans l'industrie alimentaire, pour, entre autre chose, stabiliser divers breuvages

comme les jus de fruits, les vins et les bières.³³ Les industries du textile, des colorants³⁴ et du papier utilisent également les propriétés de la Lcc, surtout dans le processus de blanchiment.³⁵⁻³⁶ Ainsi, comme vu à la Figure 1.8b, la capacité de la la Lcc de réduire l'oxygène moléculaire en eau lui permet d'être une bonne candidate pour la conception d'une biopile enzymatique pour le domaine médical.

1.1.3 Classification et principes de fonctionnement

Il est possible de classer en deux catégories les biopiles enzymatiques selon la fonction du biocatalyseur :²²

1. Production de combustible : Dans ce type, les enzymes ne sont pas impliqués dans la production directe d'énergie, mais plutôt dans la formation du substrat nécessaire à une pile à combustible conventionnelle.
2. Production directe d'énergie : Les enzymes sont impliqués directement dans la production d'énergie par l'entremise d'une chaîne de réactions enzymatiques qui participent au transfert électronique entre le substrat combustible et l'anode (Figure 1.2).

Les enzymes rédox employées dans ces dispositifs électroniques peuvent être divisées en trois catégories selon la localisation du centre rédox nécessaire au transfert des électrons entre les différents substrats aux électrodes (Figure 1.4) :²²

1. Le centre redox est faiblement lié à la protéine de l'enzyme lui permettant de diffuser sur une certaine distance comme la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH/NAD⁺) ou la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

(NADPH/NADP⁺). La glucose déshydrogénase et l'alcool déshydrogénase en sont des exemples.

2. Une partie du centre rédox est située en périphérie de la structure de l'enzyme. La laccase, horseradish peroxidases, cytochrome C peroxidase ainsi que d'autres enzymes ayant plus d'un atome de cuivre en leur site actif en sont des exemples.
3. Le centre redox est fortement lié à la protéine de l'enzyme qui elle-même est située profondément à l'intérieure de la structure de l'enzyme. La glucose oxidase est la plus étudiée de ce type.²²

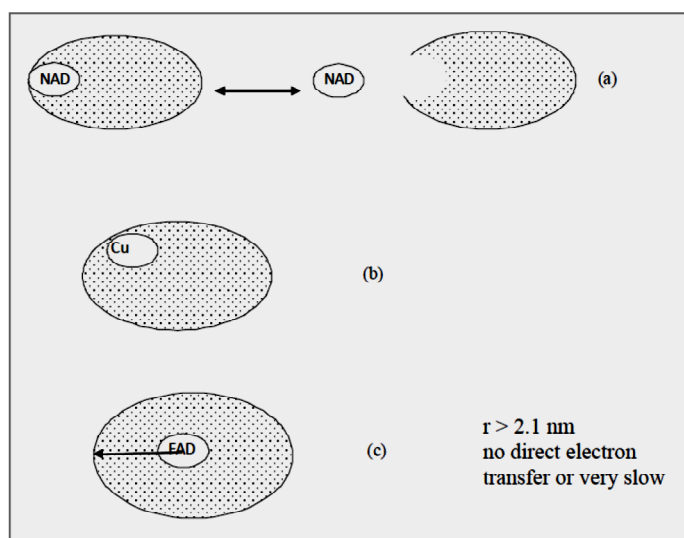


Figure 1. 4 : Schéma démontrant trois groupes d'enzymes selon la position du centre actif de l'enzyme a) pouvant diffuser, b) situé en périphérie de la structure enzymatique et c) fortement lié et enfoui à l'intérieure de la structure de l'enzyme.^{22,37-38} Illustration tirée de la référence 22.

Les deux premières catégories peuvent effectuer un transfert électronique direct (TED) entre le site actif de l'enzyme et la surface de l'électrode. Les enzymes se retrouvant dans la deuxième catégorie sont affectés par l'orientation spatiale de l'enzyme en surface de

l'électrode, se trouvant par le fait même un facteur clé affectant l'activité enzymatique. Pour la troisième catégorie, il a été démontré par plusieurs travaux³⁷⁻³⁸ qu'aucun TED n'est observé en raison d'une distance supérieure à 21 Å entre le centre redox et l'électrode. Dans un tel cas, l'utilisation de molécules artificielles, ayant des propriétés chimiques semblables aux substrats naturels de ces enzymes, permet un transfert électronique assisté par un médiateur rédox (TEM) entre l'enzyme et l'électrode. Il existe une vaste gamme de médiateur rédox dont les multiples structures amènent une vaste couverture de potentiel oxydo-réductif approprié au système.³⁹⁻⁴³

Idéalement, la tension aux bornes d'une biopile est indépendante du courant soutiré de cette dernière. Cependant, dans la réalité, le voltage fluctue en raison de pertes lors du fonctionnement de la pile. En effet, la différence entre le potentiel observée (V_{cell}) et le potentiel d'équilibre thermodynamique de la réaction globale de la biopile (E_{cell}) est due à trois phénomènes thermodynamiques majeurs : (1) la chute ohmique, (2) le transport de masse (η_{conc}) et enfin (3) la surtension d'activation aux électrodes (η_{act}). À l'état d'équilibre et en assumant que les réactifs sont spatialement dispersés de façon homogène, la tension de la biopile peut être approximée selon l'équation suivante :^{13,44}

$$V_{cell} = E_{cell} - j \sum_i \rho_i l_i - \eta_{act} - \eta_{conc} \quad \text{Éq. 1. 1}$$

où le deuxième terme représente la chute ohmique qui est la sommation de toutes les composantes résistives (ayant une résistivité (ρ) et une épaisseur (l) caractéristique) i du système multiplié par la densité de courant j généré. Ce terme peut d'ailleurs être approximé par la loi d'Ohm.⁴⁵⁻⁴⁷ Plusieurs phénomènes contribuent à la chute ohmique dont la résistance de contact et au transport de charges à travers les différentes composantes de la biopile. Ceci inclut les résistances de nature ionique et électronique provenant des collecteurs de courant (fils, soudure, etc), de l'électrolyte, de la membrane séparant les cathodes et anodes, sans oublier les interfaces de toutes ces composantes. Il est primordial

que l'optimisation de chacune de ces composantes n'affectent pas négativement l'enzyme, i.e. par une diminution de l'activité enzymatique observée.¹³ La résistance due au transport de masse, η_{conc} , du combustible et/ou du médiateur redox fait naître un gradient de concentration important observable dans le voisinage des électrodes lorsque la biopile fonctionne à courant élevé. Ce type de perte peut être minimisé si le système a un apport en combustible, comburant et médiateur redox élevé et constant pouvant être assuré par une convection du milieu électrolytique ou système fluide répondant à cette exigence. À de faibles courants, la barrière d'énergie au transfert de charge est suffisamment élevée pour empêcher un transfert efficace d'électrons provenant du médiateur redox ou de l'enzyme à l'électrode. Ainsi un phénomène η_{act} est observé, et ce pour chaque électrode de la biopile. La minimisation de cette surtension peut être réalisée notamment en augmentant la surface des électrodes et en modifiant les conditions d'opération telle que le pH et la température. Les relations de Tafel ou de Butler-Volmer (c.f. Éq. 2.41 et 2.49) peuvent approximer ces valeurs de surtension tandis que la valeur de E_{cell} peut être calculée à partir de la détermination de la variation de l'énergie libre de Gibbs pour les réactions à l'anode et à la cathode.^{45,47} La Figure 1.5 illustre la variation de la tension ainsi que la densité de puissance délivrée de la biopile. Cette puissance (P_{cell}) peut être exprimée selon l'équation suivante :

$$P_{cell} = jV_{cell} = V_{cell}^2/R_{ext} \quad \text{Éq. 1. 2}$$

où R_{ext} est une résistance externe dont la valeur est connue. Un autre paramètre servant à évaluer la performance d'une biopile est l'efficacité coulombique qui se définit comme étant le ratio de coulomb transféré du substrat combustible vers l'anode, sur le maximum théorique oxydé ramené en percentile.⁴⁸ Il existe trois causes majeures pouvant réduire cette efficacité : 1) l'existence de réactions alternatives ne donnant pas de courant ; 2) la formation d'une biomasse ; et 3) le mélange non-voulu des réactifs aux deux électrodes, un problème particulièrement observé dans les systèmes n'ayant pas de membrane pour séparer les compartiments anodiques et cathodiques.¹³

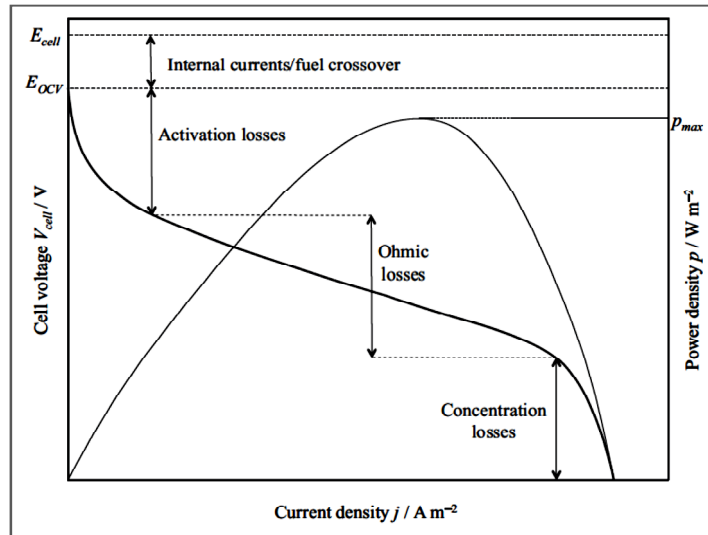


Figure 1. 5 : Variation de la tension de cellule et de la densité de puissance d’une biopile en fonctionnement. Les pertes majeures de tension ainsi que l’approximation de la plage de densité de courant sont indiquées. Illustration tirée de la référence 13.

Enfin, la puissance recherchée pour une biopile qui servirait à alimenter des implants artificiels varie. L’estimation de la puissance nécessaire pour un sphincter urinaire par exemple est de $200 \mu\text{W}$ tandis que pour le cas de reins artificiels est de 20mW .¹¹ Il est intéressant de souligner que la compagnie Sony[©] a mis au point une biopile pouvant délivrer une puissance de 50mW .¹⁰ Cependant, les concentrations du sucre et de l’oxygène dans le sang sont de 5mM et $45 \mu\text{M}$ ¹¹ comparativement à 400mM et $200 \mu\text{M}$ pour la solution de glucose employée pour la biopile de Sony[©]. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux matériaux d’électrodes, de nouvelles techniques d’immobilisation d’enzymes, de médiateurs rédox afin de permettre une amélioration de la performance des biopiles pour le domaine médical.

1.2 Le diabète

Le diabète est un trouble métabolique caractérisé par la présence d'une hyperglycémie attribuable à un défaut de sécrétion et / ou d'action de l'insuline. Il est associé à d'importantes séquelles à long terme affectant divers organes.⁴⁹ On distingue trois principaux types de diabète par leur cause.⁵⁰ Le diabète de type 1 résulte d'un processus de destruction des cellules bêta (β) du pancréas d'origine immunitaire ou idiopathique et entraîne habituellement une insuffisance absolue en insuline. Le diabète de type 2 se distingue par une insulino-résistance accompagnée d'une carence insulinique relative ou par une anomalie de la sécrétion accompagnée d'insulino-résistance et est lié à l'obésité conjugué ou non à l'inactivité physique. Enfin, le troisième type de diabète est dit gestationnel puisqu'il se manifeste pendant la grossesse, mais disparaît après l'accouchement dans la majorité des cas.⁴⁹

Selon les statistiques disponibles sur le site de la Fédération Internationale du Diabète,⁵¹ 285 millions de personnes ont été touchées mondialement par le diabète en 2010 et il est prévu que ce nombre augmentera jusqu'à 438 millions en 2030. Au Canada seulement, il a été dénombré 2 866 100 cas de diabète pour un pays estimé à 34 238 000 habitants en date du 1^{er} octobre 2010.⁵¹ Avec une proportion d'un peu plus de 8% de sa population nationale affligée par cette maladie, le Canada se retrouve au 5^{ième} rang des pays ayant la plus grande prévalence partageant sa place entre autres avec les États-Unis et le Mexique (Figure 1.6).

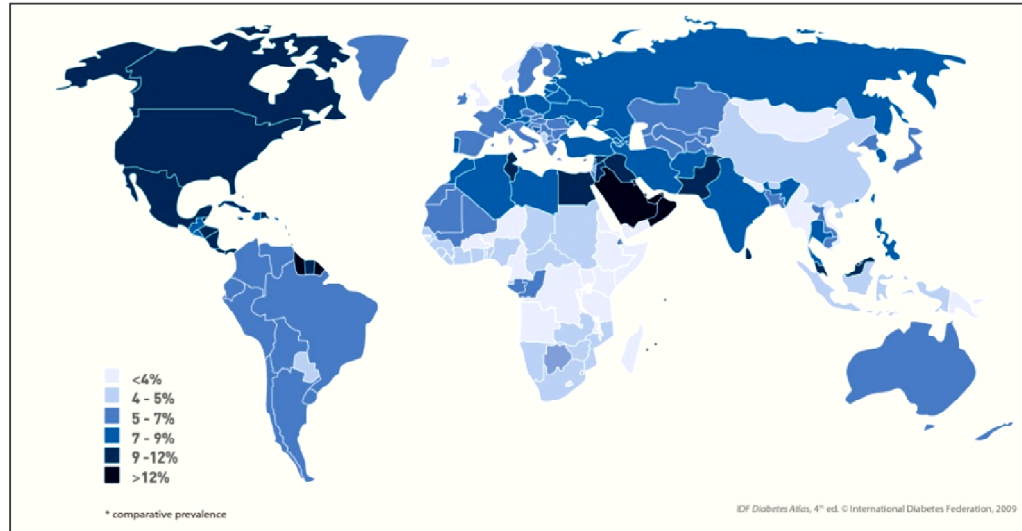


Figure 1. 6 : Atlas mondial sur l'estimation de la prévalence rapportée par la Fédération Internationale du Diabète pour l'année 2010.⁵¹

Environ 10 à 15% des cas dénombrés de diabète s'avèrent de type I, aussi appelé diabète insulino-dépendant, qui atteint principalement la population juvénile. Le diabète de type I est une maladie dite auto-immune puisque les cellules β , responsables de la sécrétion d'insuline, sont détruites par les cellules immunitaires suite à un dérèglement du système immunitaire du patient.⁵² Ces cellules β constituent entre 70 et 80% des îlots de Langerhans qui se situent dans la partie endocrine du pancréas. Ces îlots ne représentent que 1% du pancréas et sont principalement composés de cinq types de cellules endocrines (Figure 1.7). Les causes de ce dérèglement du système immunitaire ne sont pas encore totalement élucidées, mais il semblerait que des facteurs environnementaux comme l'infection virale, l'exposition à des agents toxiques et finalement l'aseptisation de l'environnement, ainsi que des facteurs de prédispositions génétiques seraient à l'origine de ce dérèglement.⁵²

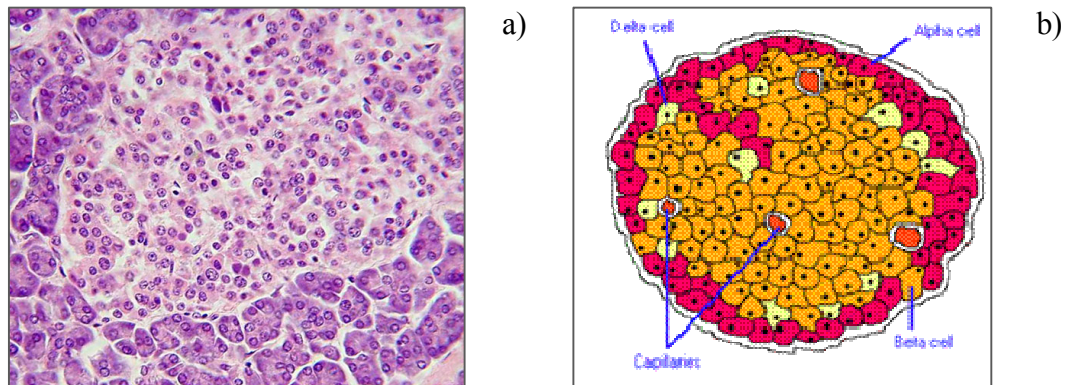


Figure 1. 7 : a) Coupe d'un îlot pancréatique (ou îlot de Langerhans), coloré à l'éosine, visualisée au microscope optique⁵³ ainsi qu'une b) représentation schématique de ce dernier.⁵²

1.2.1 Le glucomètre et la pompe à insuline

Plus de 10 milliards de test de glycémie sont annuellement faits par des patients diabétiques. Ce nombre excède largement la combinaison de tout autre types d'analyses électrochimiques et biochimiques dans le monde.⁴ Le 28 juin 1982, Anthony E. Cass, Graham Davis et H. Allen O. Hill dédectèrent efficacement pour la toute première fois du glucose de façon électrochimique et non photométrique.⁵⁴ L'utilisation d'une électrode modifiée par de la glucose oxydase (enzyme sélective au glucose) et avec l'aide du ferrocène comme médiateur rédox, sont à l'origine de cette détection électrochimique. Par la suite, ces mêmes auteurs associés à d'autres collaborateurs publièrent en 1984 les premiers résultats provenant d'échantillons sanguins,⁵⁵ ce qui s'avèrera être la pierre angulaire de tous autres travaux reliés au développement du glucomètre dans l'avenir. Suite à ces travaux, la compagnie «Genetics International» fondé en 1984 et devenue «MediSense» en 1988,⁴ a financée les recherches de H. Allen O. Hill et ses collaborateurs pour éventuellement offrir un biocapteur électrochimique pour le glucose à la fin de cette

décennie.⁵⁴ La révolution de la lecture de la glycémie de façon photométrique vers électrochimique était née.⁴ En 1994, Ephraïm et Adam Heller ont fondé la compagnie «E. Heller and Company» dans les locaux incubatoires de l'Université du Texas à Austin, USA, et dont l'objectif principal était de développer un système de lecture de glycémie en continu qui utiliserait un nouveau système d'enzyme incorporé dans un réseau polymérique. Cependant, le coût de développement de ce dernier système était nettement au-dessus des moyens financiers de la compagnie. Les premiers essais cliniques virent le jour quelques années plus tard, soit en 2001, suite à l'association de la compagnie «TheraSense» avec «E. Heller and Company». En plus d'apporter une aide financière importante, «TheraSense» a pu améliorer leur technologie existante, un biocapteur de glucose requérant seulement 300 nL de sang, soit le huitième d'un repas moyen d'un moustique.⁴ En 2004, «TheraSense» est devenue une filiale de «Abbott Diabetes Cares» (ADC), qui déjà avait acquis en 1996 «MediSense», pour donner naissance au lecteur de glycémie en continu appelé *FreeStyle Navigator*. Ce lecteur de glycémie fut introduit sur le marché Européen en 2007 et aux USA en 2008. La Figure 1.8 montre le glucomètre commercial ainsi que le schéma technique du biocapteur de glucose (électrode enzymatique) de la compagnie ADC. La Figure 1.9 présente un ensemble de pompe à insuline et glucomètre ne nécessitant aucune tubulure comparativement au système de la Figure 1.10. Il est possible de voir en a) que la majeure partie du volume de la pompe est occupé par le réservoir ainsi que les piles boutons nécessaires au fonctionnement de la pompe à insuline. En b) un exemple du glucomètre utilisant une bandelette-test de type *FreeStyle* est présenté. L'avantage de ce système est que l'aiguille est automatiquement insérée de façon sous-cutanée lorsqu'une injection d'insuline est nécessaire (Figure 1.9c). Cependant, le désavantage majeur pour le patient est que la pompe en soit est une composante consommable puisqu'elle doit être changée après une période de 72 heures de fonctionnement.

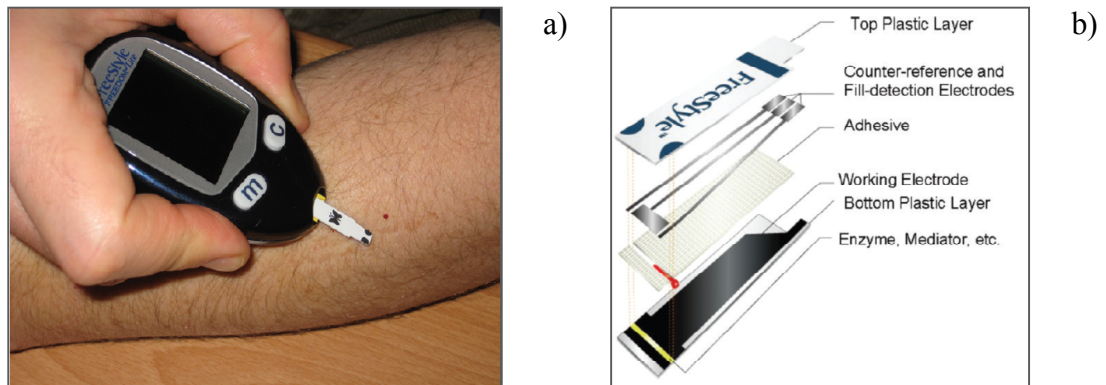


Figure 1. 8 : a) Glucomètre modèle *FreeStyle-FREEDOM Lite* et b) bandelette-test *FreeStyle*.⁴

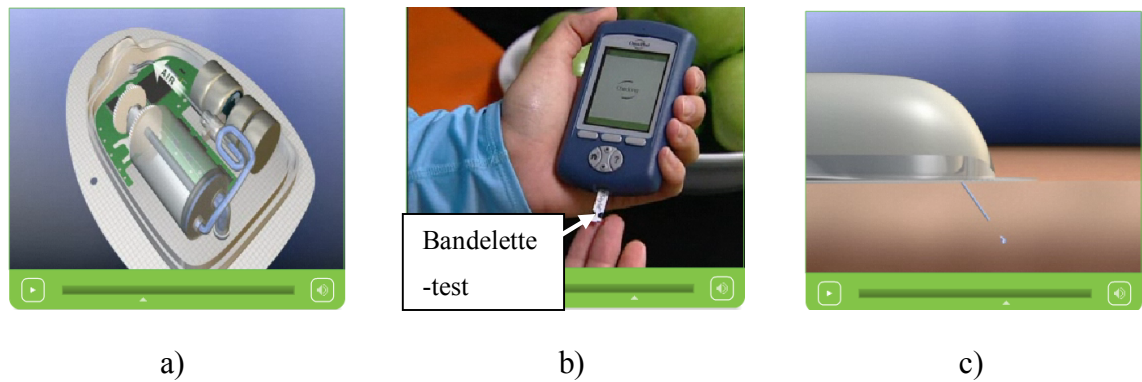


Figure 1. 9 : a) Schéma de la pompe à insuline modèle *OmniPod* b) glucomètre modèle *FreeStyle Navigator* c) schéma montrant l'injection de l'insuline sous-cutanée.⁵⁶

La thérapie par pompe à insuline est techniquement appelée perfusion continue d'insuline par voie sous-cutanée. Il s'agit d'une méthode d'administration sous-cutanée d'insuline à action rapide perfusée par l'entremise d'une pompe alimentée avec des piles

alcalines ou lithium-ion rechargeables. L'insuline est placée dans un réservoir à l'intérieur de la pompe et le taux de perfusion est contrôlé par cette dernière à l'aide d'une tubulure et d'une canule en téflon ou en métal conçues expressément à cet usage.⁴⁹ L'utilisateur a continuellement sur lui la canule insérée sous la peau, habituellement dans la zone de l'abdomen. En règle générale, le taux de perfusion de base est maintenu en tout temps, mais l'appareil peut être programmé pour faire varier le taux de perfusion au cours de la journée, et le patient peut s'administrer des bolus supplémentaires avant les repas. La Figure 1.10 montre un ensemble d'une pompe à insuline accompagné d'un glucomètre. Les dimensions de la pompe sont semblables à celle d'un téléphone intelligent Blackberry[®] i.e 82,5 mm x 56 mm x 21 mm. Il est à noter que ce système n'est pas en circuit fermé avec un biocapteur en ligne mesurant le taux de glycémie en temps réel. Cette mesure se fait grâce à une mesure électrochimique suite à l'insertion d'une bandelette (constituée de microélectrodes), sur laquelle un échantillon de sang (0,6 µL) a été déposé préalablement dans le glucomètre. Par la suite, selon la programmation établie, la pompe ajuste la quantité d'insuline injectée.

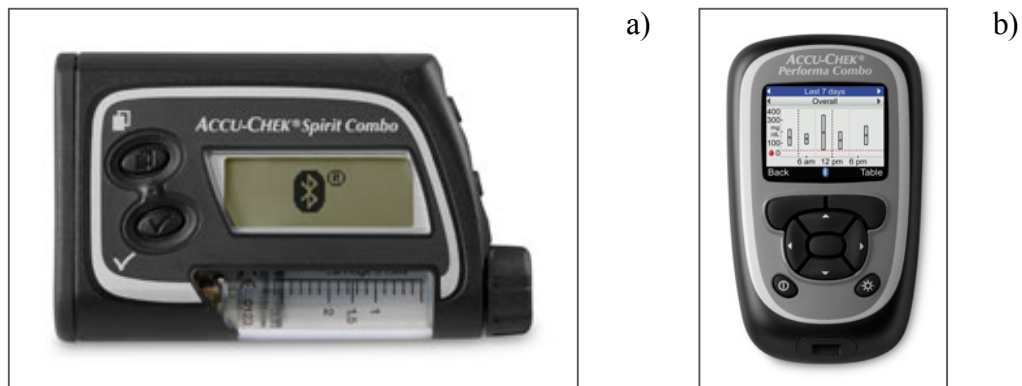


Figure 1. 10 : Photos a) d'une pompe à insuline modèle Accu-Chek Spirit Combo ayant un réservoir d'une capacité de 3,15 mL ainsi que b) de la télécommande de cette pompe et glucomètre modèle Accu-Chek Performa Combo.⁵⁷

Les systèmes actuels de traitement par perfusion continue d'insuline par voie sous-cutanée souffrent de plusieurs limitations notamment en ce qui à trait à la miniaturisation de

la pompe à insuline. En effet, l'utilisation d'insuline nécessite un réservoir que le patient puisse manipuler aisément lors de son remplacement. L'autonomie des piles utilisées, quant à elle, peut varier d'un à deux mois dépendamment de l'activité des radio-fréquences de la pompe. Quant au glucomètre, ce dernier est alimenté par deux batteries de type AAA. De plus, étant donné que le patient doit effectuer plusieurs lectures de glycémie quotidiennement (jusqu'à dix par jour), la consommation de bandelettes-test ou pompe jetable peut s'avérer onéreuse à long terme. Ainsi, l'énergie requise pour le fonctionnement de ces deux appareils s'avère un inconvénient dans l'optique où l'utilisateur doit constamment s'assurer de l'état des batteries et les remplacer. L'usage d'une biopile enzymatique comme solution de remplacement aux batteries actuellement utilisées serait un gain économique à long terme ainsi qu'une tranquillité d'esprit pour le patient sans doute appréciée.

1.2.2 Le contrôle de la glycémie

La glycémie dans le corps humain fluctue à chaque minute de la journée en fonction notamment des repas et des activités physiques. Un schéma de base du mécanisme de cette régulation se retrouve à la Figure 1.11. De façon plus précise, lors d'un repas, le taux de glucose sanguin circulant augmente et est capté par les transporteurs de glucose (GLUT2) présents à la surface des cellules β . Ces transporteurs de glucose font pénétrer le glucose à l'intérieur des cellules β où il est par la suite dégradé en pyruvate par une série d'enzymes spécialisées (glucokinase ou GK, phosphoglucose isomérase, phosphofructokinase ou PFK et glycérol-3-phosphate déshydrogénase ou GPDH). Ce pyruvate est ensuite acheminé aux mitochondries où il est converti en adénosine triphosphate (ATP). L'augmentation du niveau d'ATP dans la cellule induit l'activation des canaux potassiques ATP-dépendants qui font sortir le potassium de la cellule, ayant pour effet l'ouverture des canaux calciques qui eux, laisse pénétrer le calcium. Cette augmentation de calcium intracellulaire induit le

relarguage de l'insuline préalablement emmagasinée dans des granules de sécrétion. L'insuline a trois principales fonctions qui ont chacune pour but de diminuer la glycémie et qui sont largement élaborées dans la littérature.⁵² Chez un patient diabétique, ce processus de régulation est dysfonctionnel et cause des complications à long terme telles que la rétinopathie, la néphropathie, la neuropathie ainsi que des maladies cardiovasculaires.^{49-50,52}

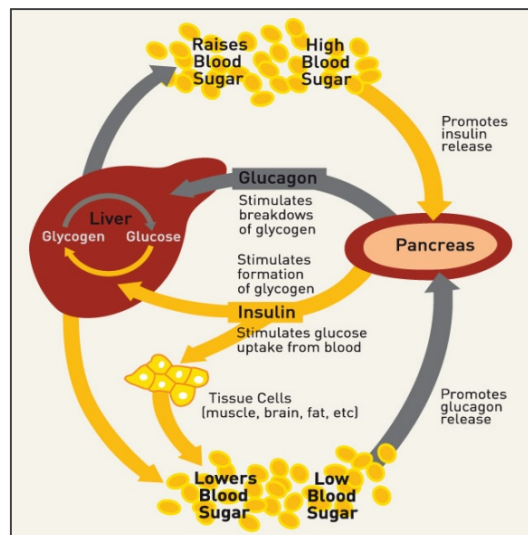


Figure 1. 11 : Schéma de la production de l'insuline selon la variation de la glycémie.⁵¹

Le *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) constitue la base des connaissances sur la relation entre la maîtrise de la glycémie et la diminution des complications du diabète de type 1. Sa mise en place fait suite à une étude clinique internationale et multicentrique sur un échantillon de 1 441 patients diabétiques âgés de 13 à 39 ans réalisée entre 1983 et 1993. Les patients ont été répartis aléatoirement entre deux groupes recevant soit le traitement classique (deux injections par jour), soit le traitement intensif (quatre injections ou plus par jour, ou la pompe à insuline). Cette étude a démontré qu'un meilleur contrôle de la glycémie permet une meilleure prévention du développement des complications mentionnées ci-haut.^{49,58}

Même si l'insulinothérapie a permis d'améliorer grandement la qualité de vie des patients, ce traitement possède néanmoins ses limites et ne fait que retarder le développement des nombreuses complications reliées au diabète. Suite à ces observations, plusieurs chercheurs effectuèrent des recherches sur le développement d'un traitement plus efficace en temps réel de la glycémie. Deux alternatives font présentement l'objet de recherches : 1) l'utilisation d'une pompe à insuline en circuit fermé avec un biocapteur glycémique et 2) le remplacement des cellules β détruites par la transplantation de pancréas ou d'îlots de Langerhans. Cette dernière approche a connu une popularité croissante depuis l'an 2000 suite à la publication du protocole d'Edmonton qui a permis l'atteinte d'un taux de succès de 100%, c'est-à-dire que tous les patients transplantés sont devenus insulino-indépendants suite à une transplantation d'îlots de Langerhans.⁵⁹ Malgré ce succès, une étude sur le suivi de tous ces mêmes patients greffés a démontré que la durée moyenne de l'insulino-indépendance était d'environ quinze mois et que seulement 10% des patients n'ont pas eu à recommencer à s'injecter de l'insuline cinq ans suite à leur greffe.⁶⁰ Même si la qualité de vie des patients greffés ainsi que le contrôle général de leur diabète sont restés supérieurs à ce qu'ils étaient avant la greffe d'îlots, cette approche partage quelques inconvénients avec la transplantation de pancréas total. En effet, excluant le fait qu'une opération est nécessaire, les patients ayant subis une greffe d'îlots doivent également prendre des immunosuppresseurs afin d'éviter le rejet de la greffe et de la récurrence de la maladie auto-immune. De plus, comme le nombre de donneurs de pancréas cadavériques est faible, l'accessibilité à une greffe d'îlots est réservée aux patients présentant des conditions particulières et un mauvais contrôle de leur glycémie malgré les injections quotidiennes d'insuline. En fait, seulement 1% des receveurs potentiels atteints du diabète de type I pourraient bénéficier d'une greffe d'îlots.⁵² Ainsi, il y a un besoin urgent parmi les patients diabétiques nécessitant une solution alternative à la greffe d'îlots de Langerhans nécessitant une opération chirurgicale. L'usage d'un implant artificiel

1.3 Problématique

Il a été vu précédemment que l'insulinothérapie ne permet pas d'éviter les complications de santé dues au diabète, mais seulement les retarder. Les deux approches actuellement à l'étude, soit 1) l'utilisation d'une pompe à insuline en circuit fermé avec un biocapteur glycémique et 2) le remplacement des cellules β détruites par la transplantation de pancréas ou d'îlots de Langerhans, souffrent de limitations majeures. Dans le premier cas, l'autonomie des piles utilisées pour le fonctionnement de la pompe, la consommation des bandelettes-test jetables et l'utilisation de réservoir d'insuline empêchant la miniaturisation du système dans son ensemble, en sont quelques exemples. Pour le 2^e cas, la disponibilité de pancréas cadavériques, le fait que le patient doit subir une greffe et sans compter le rejet possible par le patient des îlots de Langerhans, démontrent bien que seulement un faible pourcentage de patients aura recours à ce moyen.

Des travaux de recherche antérieurs et d'autres en cours portent sur la détection du glucose de façon électrochimique.^{5,17,55,61-62} Les capteurs électrochimiques enzymatiques souffrent d'une longévité et/ou stabilité restreinte dépendamment de la technique d'immobilisation d'enzyme employée. À titre d'exemple, une simple adsorption d'une enzyme en surface d'une électrode affecte la structure quaternaire de l'enzyme. Par le fait même, la vulnérabilité de l'enzyme envers une dénaturation irréversible induite par une élévation de température et la modification de l'ionisation de l'enzyme selon le pH, peuvent se voir accentuées par la présence d'agents chaotrope (qui induisent le chaos) et les détergents.⁶³ En d'autres mots, l'activité enzymatique se voit conséquemment affectée. La microencapsulation est une des techniques les plus prometteuses pour l'amélioration de ces systèmes notamment grâce à une stabilisation de l'activité enzymatique.⁶⁴⁻⁶⁹ Parallèlement, la microencapsulation a aussi été utilisée comme moyen d'immuno-isolation (protection des cellules contre le système immunitaire du receveur).⁷⁰⁻⁷¹ Plus spécifiquement, Kobayashi *et al.*⁷⁰ ont démontré en 2003 qu'il était possible de transplanter des îlots de Langerhans microencapsulés comme moyen d'immuno-isolation dans des modèles

animaux, s'avérant par le fait même être un succès.⁷⁰ Ces travaux ont amenés le groupe de recherche du professeur Jean-Pierre Hallé à l'Université de Montréal à se pencher quant à eux sur la biocompatibilité des microcapsules, leur interactions de surface avec le système immunitaire, la stabilité ainsi que leurs résistances mécaniques.^{52,72-73}

Le but ultime de cette thèse est d'utiliser la microencapsulation pour concevoir une plateforme d'immobilisation d'enzyme aux propriétés conductrices élevées permettant aux biopiles actuelles d'augmenter la puissance délivrée pour répondre à la demande énergétique de différents implants artificiels dans le domaine médical. Dans le cas du diagnostique et du traitement au quotidien de la glycémie pour des patients diabétiques, l'utilisation d'une biopile utilisant un système glucose oxidase/laccase microencapsulés comme biocatalyseurs serait une solution au remplacement des piles actuellement utilisées pour les pompes à insuline en générant de l'électricité in situ et en continue. De plus, la technique de la microencapsulation d'enzymes permettrait non-seulement d'avoir une large quantité de biocatalyseurs pour répondre à la demande énergétique d'un tel système, mais aussi à sa miniaturisation. Un autre aspect très intéressant est que la démonstration de la transplantation d'îlots de Langerhans microencapsulés dans des modèles animaux de diabète auto-immune a été faite avec succès.^{52,73-75} L'idée de répondre aux limitations de la pompe à insuline et à la transplantation d'îlots de Langerhans simultanément devient donc envisageable. En effet, la conception d'un implant artificiel énergétiquement autonome envers une source d'énergie électrique extérieure (batterie au lithium) agissant à titre de biopile et de système de diagnostique (lecture de la glycémie) serait un système idéal. Ce dernier pourrait être constitué de deux compartiments. Le premier contiendrait le système enzymatique microencapsulé servant à la production de l'énergie nécessaire au fonctionnement de la lecture de la glycémie en temps réel. Une programmation adéquate du lecteur de la glycémie (glucomètre) permettrait le relargage d'insuline produite par des îlots de Langerhans microencapsulés qui seraient situés dans un compartiment secondaire accessible par le flux sanguin lorsque nécessaire. Ceci permettrait d'éviter aux patients souffrants de diabète 1, par exemple, d'avoir recours à une greffe d'îlots de

Langerhans en salle d'opération. Cela constituerait un bénéfice majeur pour notre société ainsi qu'une percée majeure dans le domaine des implants artificiels. Cependant, il reste beaucoup de travail avant de se rendre à un tel prototype notamment en travaillant à appliquer la microencapsulation aux biopiles actuelles pour en augmenter la puissance. C'est pour cette raison que notre groupe de recherche s'est penché sur la viabilité de l'utilisation de la microencapsulation d'enzyme pour application dans le domaine des biocapteurs et des biopiles.⁴¹⁻⁴²

1.4 La microencapsulation d'enzymes

Il existe plusieurs techniques utilisées pour l'immobilisation d'enzymes en surface d'électrodes. La Figure 1.12 montre les trois principales façons de modifier les électrodes permettant aux biocapteurs et biopiles d'être sélectifs à certains substrats. La plus simple consiste à adsorber le biocatalyseur sur l'électrode (Figure 1.12a). Évidemment, la surface de l'électrode limite la quantité de catalyseur pouvant transformer l'énergie chimique en électricité et par le fait même la puissance possible à être délivrer par une biopile par exemple. Afin d'augmenter la concentration de biocatalyseur en surface d'électrodes (Figure 1.12b), des matrices polymériques et des membranes perméables ont été développées permettant d'améliorer grandement les performances des systèmes bioélectroniques.^{37,40,76-80} Par contre, ces deux méthodes modifient la structure quaternaire des enzymes affectant par le fait même l'activité enzymatique à la baisse. Enfin, la microencapsulation est probablement la technique mimant le mieux mère Nature (Figure 1.16c). Le concept d'encapsulation a vu le jour il y a 2 à 3 milliard d'années comme point de départ de l'évolution cellulaire et de la vie sur Terre. En effet, un microenvironnement unique a pu exister en isolant ou protégeant plutôt le noyau cellulaire du monde extérieur. À ce jour, les détails liés aux premiers biomatériaux encapsulés (la cellule) nous sont toujours inconnus, mais la nature nous a appris qu'elle peut favoriser les conditions

nécessaires au développement de la vie (concentration, protection, sélectivité) à l'intérieur d'un volume défini grâce à l'encapsulation.⁶¹ De façon générale, il est possible de classifier la microencapsulation comme suit:⁸¹

- Séparation à partir d'une solution aqueuse
- Formation causée par incompatibilité polymère-polymère
- Polymérisation interfaciale
- Polymérisation *in situ*
- Séchage à partir de l'état liquide
- Évaporation d'un solvant à partir d'une émulsion
- Gélation en milieu liquide
- Désolvation

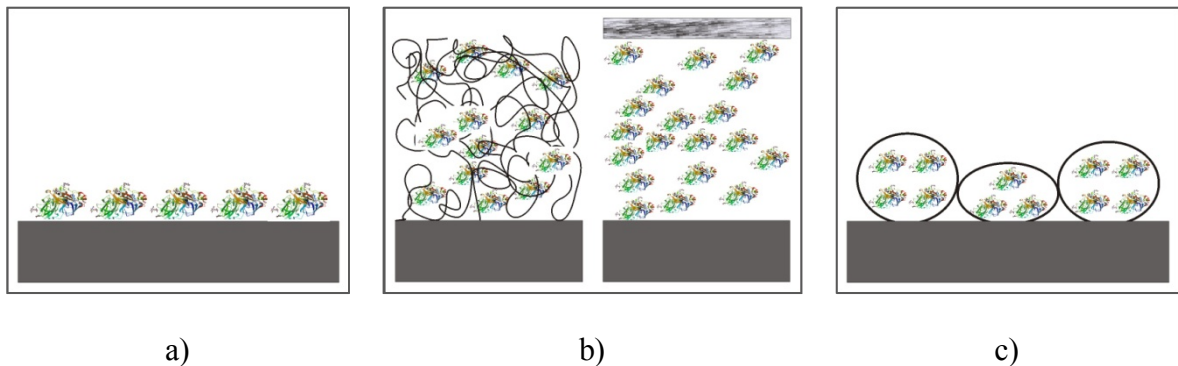


Figure 1. 12 : Schéma adapté présentant différentes techniques d'immobilisation d'enzymes en surface d'électrodes, soit par a) adsorption, b) confinement en utilisant une matrice polymérique ou une membrane et c) microencapsulation.⁶¹

Il est par contre, à toute fin pratique, plus commun d'employer le terme microencapsulation pour désigner tout type de confinement d'agents cibles (molécules organiques, enzymes, cellules, nanotubes de carbone, etc) à l'intérieur d'une sphère creuse ou poreuse dont la paroi a la fonction d'une membrane semi-perméable. Le tout premier travail publié sur la microencapsulation remonte en 1964 lorsque Thomas M. S. Chang a démontré qu'il était possible d'encapsuler des solutions aqueuses contenant des protéines à l'intérieure d'une membrane constituée d'un polymère suite à une polycondensation ou coacervation interfaciale.⁶⁹ Depuis, plusieurs travaux ont été publiés sur l'obtention de microcapsules^{67-68,82-95} ainsi que sur la viabilité de la microencapsulation comme méthode d'immobilisation d'enzymes.^{52,61,66,73,96-102}

La technique de la polymérisation interfaciale possède un avantage au niveau de sa réalisation en laboratoire comparativement aux autres techniques. Sa simplicité ainsi que le coût minimum en réactifs en sont les principales raisons. Il est possible de diviser cette technique en deux étapes. Dans un premier temps, une phase liquide (aqueuse ou huile) contenant l'agent cible à encapsuler est dispersée mécaniquement à haute vitesse

d'agitation afin d'obtenir une émulsion dans une autre phase liquide non miscible à la première contenant des agents émulsifiants et stabilisants. La deuxième étape consiste à ajouter à la phase continue l'initiateur pour effectuer la réaction de polymérisation (polycondensation ou réticulation) à la surface de la phase dispersée (gouttelettes stabilisées contenant l'agent cible) et ainsi obtenir les microcapsules se retrouvant dans une suspension pouvant être lavées et séchées une fois séparées.⁸¹ Plusieurs facteurs peuvent affecter la performance des microcapsules en tant que cage hôte pour l'agent cible dont les principaux sont énumérés ci-dessous :

- Composition de la membrane polymérique : Il est possible d'utiliser différents monomères ou polymères ayant des propriétés appropriées (désintoxication d'eaux usées, conductivité électronique, rigidité) pour différentes applications (biopiles, biocapteurs, transport d'agent thérapeutique).
- Degré de la réticulation : Cet aspect affecte la rigidité et la perméabilité (diffusion à travers la membrane) de l'agent cible vers le milieu extérieur.
- Épaisseur de la membrane : *Idem* à 2.
- Dimensions des microcapsules : La vitesse d'agitation mécanique combinée avec le choix de l'agent émulsifiant vont grandement influencer la dimension ainsi que la distribution de celle-ci. Évidemment, la quantité théorique d'agent cible à encapsuler est directement liée à ce facteur.

Le groupe de recherche du professeur Rochefort, du département de chimie à l'Université de Montréal, s'intéresse entre autres à l'utilisation des microcapsules comme plateforme d'immobilisation d'enzyme dans des biocapteurs et des biopiles. Récemment, des travaux sur l'activité enzymatique de biocatalyseurs, l'efficacité d'encapsulation et l'étude de la diffusion de couples rédox organiques à l'intérieur de microcapsules

constituées de poly(éthylèneimine) ont été réalisés.^{41-42,64,103-104} Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de la microencapsulation comme plateforme d'immobilisation d'enzyme dans la conception d'une biopile pouvant outre-passer les limitations identifiées dans la section 1.1.

1.5 Électrodes polymériques

La définition d'une électrode modifiée chimiquement peut être définie comme étant la fonctionalisation d'un matériau conducteur ou semi-conducteur par un film ionique, polymérique ou bien constitué d'une monocouche/multi-couches moléculaire, altérant les propriétés optiques, électrochimiques ou autres en surface de l'électrode.¹⁰⁵

Les surfaces d'électrodes sont modifiées afin de réaliser, à priori, la détection d'une fonction active électrochimiquement qui n'était pas possible ou énergétiquement trop difficile à effectuer avec des électrodes conventionnelles.¹⁰⁵ Les améliorations ciblées peuvent être l'augmentation de leur sélectivité, leur sensibilité, leur stabilité chimique et électrochimique. Il est possible de classer la modification d'électrode en deux catégories : attachement film-substrat (physisorption, chimisorption, attachement par liens covalents) et film à composition (argile, zéolites, sol-gel, polymères et ADN).¹⁰⁵ Le choix du type de modification est relié à l'application recherchée. Il a été vu précédemment que l'immobilisation d'enzyme peut être effectuée en utilisant des matrices polymériques via la microencapsulation (c.f. Section 1.4). Ainsi, la nature d'un réseau polymérique peut influencer la réponse électroanalytique d'une réaction enzymatique à l'interface électrode/polymères causé par la surtension, η , de l'électrode (c.f. Sections 1.1.3 et 2.1.6).

1.5.1 Polymères rédox

Les polymères et co-polymères rédox contiennent des molécules électroactives attachées de façon covalente à une chaîne de polymère non-conjugée.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ Ces molécules rédox gouvernent le comportement électroactif du polymère en question. Chaque molécule rédox (site) est capable d'échanger des électrons avec d'autres molécules voisines, comme illustré à la Figure 1.13a, si la différence d'énergie libre de Gibbs le permet. Cependant, la formation de nouvel état d'oxydation de la molécule rédox (suite à une réaction de réduction ou d'oxydation) apporte une réorganisation de son environnement dont les contre-ions servant à garder l'électroneutralité du film polymérique. Ce phénomène est limité par le transport de masse (c.f. Section 2.1.3). Ainsi, le transfert électronique entre molécules rédox se retrouve limité par ce dernier phénomène. De plus, le contrôle de la concentration ainsi que l'organisation spatiale des unités rédox dans le polymère sont problématiques.¹⁰⁸ Par conséquent, l'utilisation de ce type de polymère est souvent limitée à l'étude mécanistique d'un système chimique.

1.5.2 Polymères ioniques

Les polymères ioniques permettent la diffusion de molécules électroactives entre les sites d'échanges ioniques du polymère, permettant ainsi de palier à la limitation induite par le transport de masse dans un polymère rédox. Le Nafion[®] est un bon exemple de polymère ionique ainsi que la majorité des polyélectrolytes comme le poly(styrène sulfonate) (PSS) et le poly(allylamine hydrochloré) (PAH) employés dans la technique d'encapsulation *layer-by-layer* (L-b-L).¹⁰⁹⁻¹¹⁰ La Figure 1.13b montre la mobilité des molécules rédox à l'intérieur du polymère dont l'attraction électrostatique entre les sites chargés du polymère et les molécules rédox contribue grandement à cette mobilité. Ainsi en variant les contre-ions de ces polymères (molécules rédox cationiques ou anioniques), il est possible d'effectuer des

étapes de préconcentration et d'étudier les mécanismes de transfert de charge du système. Cependant, il est reconnu qu'une baisse de conductivité de la matrice polymérique est observée suite à des problèmes de fuite du couple rédox (abaissement de la concentration) avec le temps.¹⁰⁵

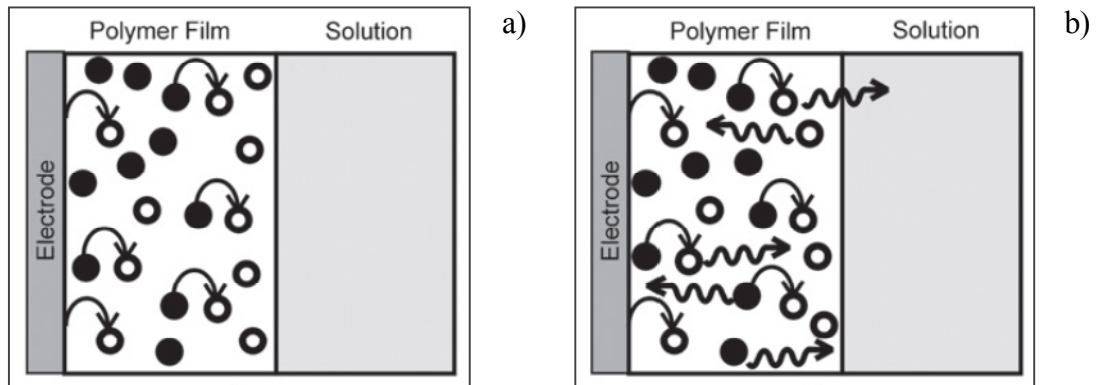


Figure 1.13 : Représentation schématique du processus d'échange électronique à l'intérieur d'un film a) polymère rédox et b) polymère ionique contenant des molécules rédox pouvant diffuser dans ce dernier. Les \circ représentent la forme oxydée tandis que les \bullet sont la forme réduite du couple rédox. Les flèches courbées représentent le transfert électronique entre les deux formes du couple rédox tandis que les flèches ondulées représentent les processus diffusionnels. Image tirée de la référence 105.

1.5.3 Polymères conducteurs

Il y a tout près de cent ans maintenant, il était prédit qu'une conductivité comparable à un métal pouvait être atteinte par des matériaux organiques, mais c'est seulement une soixantaine d'années plus tard qu'on a pu en faire la preuve.¹¹¹ Une étape importante dans le domaine des polymères conducteurs a été réalisée par Shirakawa,

MacDiarmid et Hegger qui ont découvert que le poly(acétylène) pouvait être conducteur lorsqu'oxydé par des vapeurs d'iode.¹¹² Cette découverte a d'ailleurs valu à ces derniers le Prix Nobel de chimie en 2000.¹¹³

Les polymères conducteurs possèdent une conductivité électronique se situant dans la classe des semi-conducteurs pour la plupart (10^{-14} à $10^2 \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$).¹⁰⁵ Cette conductivité s'explique grâce à la migration des porteurs de charge à travers la matrice polymérique due à la présence d'un système d'électrons π -délocalisés ou π -conjugués (polymères conjugués). Il s'agit de polymères comportant une alternance de simples et doubles liaisons permettant une délocalisation des électrons à travers la chaîne de polymère.^{105,114} Des exemples de polymère sont illustrés à la Figure 1.14.

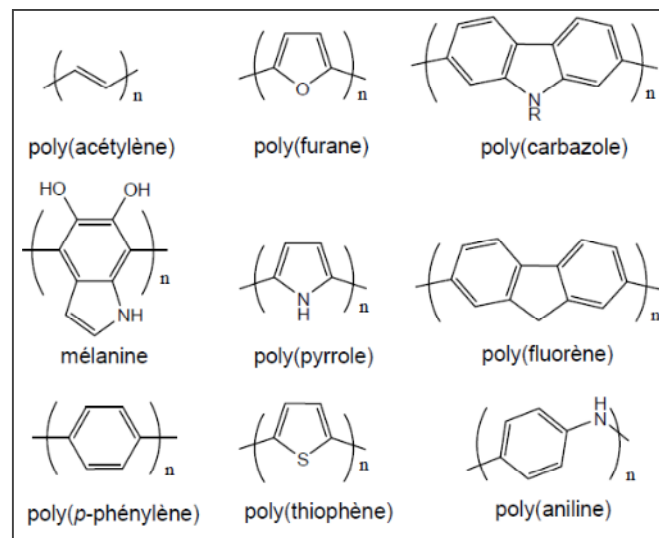


Figure 1. 14 : Structures de différents polymères conducteurs. Image tirée de la référence 114.

Cette habilité à délocaliser les électrons donne lieu à la création d'un hiatus d'énergie, ou communément appelé bande interdite (E_g), tout comme un semi-conducteur. Les paramètres affectant la valeur de E_g se retrouvent expliqués dans la littérature.¹¹¹ Il est aussi

possible d'augmenter la conductivité par phénomène de dopage des polymères les permettant de rejoindre celles des métaux ($1-10^5 \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$).¹¹⁵⁻¹¹⁷

La méthode la plus conventionnelle pour modifier une électrode avec un polymère conducteur est sans contre dit l'électropolymérisation. Les pics de courant anodique et cathodique, I_{pa} et I_{pc} , des courbes de potentiel-courant obtenues peuvent augmenter ou diminuer selon la nature du polymère, le taux de déposition des différentes couches ainsi que des caractéristiques du transfert de charge.¹⁰⁵ De plus, l'avantage de l'électropolymérisation est qu'il est facile d'obtenir le polymère conducteur en faisant réagir le monomère à la surface de l'électrode. Cette même technique permet aussi de contrôler le phénomène de dopage par injection de charge ainsi que la reproductibilité de l'épaisseur du film obtenu et cela même en utilisant des électrodes dont la géométrie diffère d'une surface plane.¹¹⁷ La création de senseurs électrochimiques^{61,79,118-119} et d'électrodes organiques pour des PLED^{111,114,120-123} sont sans doute les applications les plus populaires utilisant différents polymères conducteurs.

1.5.4 Les carbazoles

Le carbazole (CBZ) est un composé aromatique pouvant être extrait du charbon et synthétisé en faisant réagir le 2-nitrobiaryl avec du triphénylphosphite selon un rendement moyen à excellent (35-83%).¹²⁴ Depuis la découverte des polymères conducteurs en 1977,¹²⁵ la chimie du carbazole a été revisitée et orientée vers la synthèse de polymères conjugués dans lesquels les monomères de carbazole sont insérés de façon covalente dans la chaîne principale du polymère. Il est bien connu que le carbazole *N*-substitué et ses dérivés polymérisent à deux positions donnant des poly(3,6- et 2,7-carbazole).¹²⁶ La première classe possède la plus haute densité électronique lorsqu'ils sont reliés directement ou par espacements π (π -spacers).^{124,169} Il a aussi été rapporté que leur

propriétés électriques et électrophosphorescentes ont suscité l'intérêt pour application dans les batteries¹⁰⁷ et les diodes organiques émettrices de lumière (DOEL).¹²² La deuxième classe (c.f. Figure 1.14) montre aussi des propriétés optiques prometteuses dans la région du visible pour des diodes émettrices de lumière (DEL).^{120,126}

Depuis la dernière décennie, des efforts pour développer des méthodes efficaces à la fonctionnalisation du carbazole aux positions 3,6 et 2,7 ont été déployés pour l'obtention de polymères conducteurs.¹²⁶ Il a été démontré que le 1,8-diaminocarbazole (1,8-(NH₂)₂CBZ) possède une plus grande densité électronique aux positions 3,6 ainsi que des propriétés rédox intéressantes en milieux aqueux et organique une fois polymérisé.^{118,127-128} Aussi, la disponibilité des fonctions amines primaires permettrait une réaction de polycondensation avec un agent réticulant menant à la formation de microcapsules (c.f. Section 1.4). Cependant, le poly(1,8-diaminocarbazole) ainsi que le monomère ne sont pas disponibles commercialement et les protocoles de synthèses à l'obtention du monomère clé sont peu nombreux avec un rendement peu approprié à l'échelle du kilogramme.¹²⁹ Depuis peu, on retrouve dans la littérature¹³⁰ un protocole permettant, à partir du CBZ commercial, d'obtenir le 1,8-(NH₂)₂CBZ en trois étapes dont la dernière étape est la réduction des groupements nitro (-NO₂) et la déhydrodéchlorination du 3,6-dichloro-1,8-dinitrocarbazole (3,6-Cl₂-1,8-(NO₂)₂CBZ) obtenu préalablement.¹³¹ Ce travail est inspiré des conditions catalytiques identifiées par Cortese et Heck¹³² qui ont rapporté que des composés aromatiques halogénés ou nitrés peuvent aisément être réduits en présence de triéthylammonium formate et Pd/C ou bien d'un catalyseur triarylphosphine de palladium acétate dans une gamme de température de 50-100°C, pour donner un produit hydrocarboné ou aminé respectivement. Plus récemment, Monguchi *et al.* ont démontré qu'il est possible de faire une réaction de déhydrodéchlorination de différents composés aromatiques chlorés contenant des groupements désactivateurs (ex: -CO₂H, -NO₂).¹³³

Considérant l'ensemble des travaux mentionnés dans cette section, nous proposons ici l'utilisation du 1,8-diaminocarbazole tout au long de cette thèse, comme monomère clé

pour la synthèse de polymères conducteurs servant à la conception de microcapsules conductrices. Ces dernières serviront seront étudiées par différentes techniques électrochimiques. Il est à noter que le 1,8-diaminocarbazole a été préféré à son homologue 2,5-diaminothiophène puisqu'il a été démontré que ce dernier s'oxyde facilement à l'air libre.¹³⁴

1.6 Objectifs de l'étude et approche proposée

Les sections 1.1.3 et 1.3 permettent de comprendre pourquoi il est important de travailler à rendre les microcapsules conductrices. L'exemple choisi sur la conception d'un implant artificiel pouvant être à la fois le lecteur glycémique, la pompe à insuline et une biopile serait une conséquence directe découlant des travaux de recherche sur l'utilisation de la microencapsulation comme plateforme d'immobilisation d'enzyme. Évidemment, la conception d'un tel système montre le bénéfice que pourrait apporter une telle percée dans le domaine médical. Malgré les avancées récentes dans le domaine de la microencapsulation (voir section 1.4), le maintien de l'activité enzymatique reste toujours un problème majeur observé avec les méthodes actuelles. Il est d'une importance capitale d'améliorer l'immobilisation d'enzymes afin non seulement de prolonger le maintien de l'activité de l'enzyme, mais aussi de stimuler leur utilisation dans des systèmes bioélectroniques. Pour ce faire, il importe de tenir compte de trois critères :

1. Maximiser l'efficacité d'encapsulation de ces enzymes.
2. Maintenir la durée de vie de l'enzyme ainsi que son activité enzymatique sur une longue période de temps (longévité).

3. Développer une plateforme conductrice qui permet le transfert d'électrons entre l'agent bioactif (enzyme), la plateforme elle-même et l'électrode.

Dans le cas du premier critère, cette limitation a déjà fait l'objet d'études dans le groupe de recherche Rochefort (Université de Montréal) démontrant que la fabrication de microcapsules par la technique de polymérisation interfaciale s'avère très efficace pour emmagasiner une quantité importante d'enzyme. L'activité enzymatique, la conformation et la stabilité thermique de la laccase ainsi que de la glucose oxidase (deuxième critère) ont aussi fait l'objet d'études. Toutefois, les résultats récents ont démontré que la laccase subit une dénaturation lorsqu'encapsulée dans une microcapsule à base de PEI. Seule la stabilité thermique de la glucose oxidase a été maintenue une fois sous forme de microcapsules.⁶⁴ Cependant, les microcapsules actuellement utilisées sont inadéquates pour être utilisées comme plateforme d'immobilisation d'enzyme à être incorporée dans les systèmes bioélectrochimiques. En effet, le polymère utilisé dans la fabrication de ces microcapsules est le PEI dont les propriétés conductrices électroniques sont nettement insuffisantes pour permettre un transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode. Ainsi donc, l'utilisation d'un polymère conducteur devient essentielle pour palier à ce problème.

L'objectif général de cette thèse est de tenter de trouver une solution à la problématique présentée dans la section 1.3. Il est possible de diviser en trois sous-objectifs le travail présenté dans cette thèse. Dans un premier temps, il a été nécessaire d'identifier quel substrat enzymatique ayant des propriétés rédox pouvait diffuser à travers ces microcapsules pour atteindre l'enzyme. En deuxième lieu, il a fallu développer et optimiser une route de synthèse du monomère clé identifié pour la fabrication de différents polymères conducteurs. Enfin, la microencapsulation de l'enzyme avec les polymères conducteurs choisis pour fabriquer une bioélectrode et la caractériser par les différentes techniques électrochimiques mentionnées à la section 2.2.

Le premier sous-objectif a été d'étudier l'oxydation électrochimique et enzymatique du PPD sous diverses conditions afin d'évaluer sa réversibilité lorsqu'il est utilisé comme substrat de la laccase. La voltampérométrie cyclique ainsi que l'électrode à disque et anneau-disque tournantes sont les techniques qui ont été utilisées pour cette étude. Les résultats obtenus revêtent une importance particulière pour la conception efficace d'une bioélectrode, partie intégrante d'une biopile, dont la surface a été modifiée par des enzymes microencapsulées. La diffusion du PPD à travers la microcapsule à base de PEI est un processus suffisamment lent qui permettrait l'oxydation du substrat qui réagirait par la suite à la surface de l'électrode. Ces résultats et conclusions sont présentés au Chapitre 3 qui reproduit intégralement un article publié dans le *Electrochimica Acta* en 2008 (Mathieu Hébert et Dominic Rochefort, *Electrochimica Acta*, **53**(16), 5272-5279 (**2008**)). Il ne comporte que deux auteurs, soit Mathieu Hébert et Dominic Rochefort qui sont les deux seules personnes à avoir contribué à la rédaction de l'article. Les expériences menant à cet article ont été entièrement réalisées par Mathieu Hébert.

Le second sous-objectif a été d'identifier et synthétiser une famille de polymères conducteurs pour remplacer le PEI dans la conception de microcapsules conductrices. Suite à l'identification du PPD comme médiateur rédox à être utilisé, le choix s'est arrêté sur les poly(aminocarbazole) et leurs dérivés pour les propriétés énumérées à la section 1.3.4. Toutefois, au meilleur de notre connaissance, il n'existe aucun protocole de synthèse du poly(1,8-diaminocarbazole) présenté dans la littérature. Seuls des films électroactifs de ce polymère suite à une électropolymérisation à partir de solutions monomériques sont connus.^{118,127-128} Un protocole de synthèse du 1,8-diaminocarbazole était disponible dans la littérature,¹²⁹ mais il a été jugé non viable pour être utilisée à grande échelle (kilogramme). Par conséquent, une route de synthèse a dû être développée afin d'obtenir le 1,8-diaminocarbazole en quantité importante. Il importe toutefois de mentionner que vers la fin de ces travaux de recherche, un protocole de synthèse de ce monomère fut disponible dans la littérature.¹³⁰ Par contre, il a été impossible de reproduire ce protocole avec succès ce qui confirmait la nécessité de développer une route de synthèse simple et efficace. Ainsi, deux

isomères de structure (1,6 et 1,8-diaminocarbazole) ont été synthétisés en deux étapes. La première étape consistait en une substitution électrophile du 3,6-dibromocarbazole en positions 1,8 ou 1,6 par des groupements nitros. Par la suite, une réaction de déhalogénéation réductive a été réalisée en utilisant la Et_3N et 10% Pd/C comme catalyseur dans le méthanol sous atmosphère H_2 . Toutefois, il est à noter qu'il n'était pas aisé d'utiliser le 1,8-diaminocarbazole pour la conception des polymères conducteurs initialement ciblés. L'instabilité à long terme du composé, quelques jours, ainsi que le temps requis pour obtenir une grande quantité de ce monomère ont été les raisons majeures pour rejeter le choix initial de ce monomère comme candidat à la fabrication d'un polymère conducteur uniquement constitué de ce dernier. Par contre, le composé 3,6-dibromo-1-nitro-carbazole s'est révélé être la solution alternative comme monomère clé pour la synthèse du copolymère employé dans la fabrication des microcapsules conductrices (Voir Chapitre 5). La présentation de cette route de synthèse se retrouve au Chapitre 4 qui reproduit intégralement un article soumis récemment à *Synlett* (Mathieu Hébert et Dominic Rochefort, *Synlett*, [Soumis #S86-09-11](#)). Il ne comporte que deux auteurs, soit Mathieu Hébert et Dominic Rochefort qui sont les deux seules personnes à avoir contribué à la rédaction de l'article et les routes de synthèse ont été proposées et élaborées uniquement par le premier auteur.

Finalement, la fabrication de microcapsules conductrices a été réalisée en incorporant du copolymère poly[(9H-octylcarbazol-3,6-diyl)-alt-co-(2-amino-9H-carbazol-3,6-diyl)] à du PEI. Ce copolymère a été choisi puisqu'il était possible de le synthétiser en grandes quantités, que son comportement électrochimique s'apparentait à celui du poly(1,8-diaminocarbazole) et que ses propriétés physiques étaient adaptées à une polymérisation interfaciale. Une bioélectrode a été ainsi conçue en encapsulant la laccase dans ces nouvelles microcapsules et en les immobilisant à la surface d'une électrode de platine. Les propriétés électrochimiques de cette bioélectrode tout comme celles du copolymère ont été étudiées par voltampérométrie cyclique tandis que l'activité enzymatique a été vérifiée par des mesures avec une cellule à oxygène et comparée à celle de la laccase non encapsulée.

Ces résultats sont présentés au Chapitre 5 qui reproduit intégralement un article soumis récemment à Physical Chemistry Chemical Physics (Mathieu Hébert, Pierre-Louis Brunner, Dominic Laliberté et Dominic Rochefort, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Soumis #CP-ART-09-2011-022877). Toutes les expériences à l'exception de la synthèse des copolymères, élaborées par Pierre-Louis Brunner et Dominic Laliberté, ont été réalisées uniquement par Mathieu Hébert.

1.7 Références

1. W. R. Grove, *Philos. Mag.*, **1839**, *14*, 127.
2. M. Hébert, Université du Québec à Montréal, *Étude de nouveaux mélanges électrolytiques à base d'ylures de phosphore ou de phosphine avec leurs sels de phosphonium pour application en pile solaire*, **2007**, 162 p.
3. A. J. Appleby; F. R. Foulkes; *Fuel Cell Handbook*; Van Nostrand Reinhold: New York, **1989**, 762 p.
4. A. H. B. Feldman, *Acc. Chem. Res.*, **2010**, *43* (7), 963.
5. A. Heller, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, **1999**, *01*, 153.
6. S. Suwansa-Ard; P. Kanatharana; P. Asawatreratanakul; C. Limsakul; B. Wongkittisuksa; P. Thavarungkul, *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, *21*, 445.
7. A. C. Tizzard; G. Lloyd-Jones, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, *22*, 2400.

8. L. J. Liu; Z. C. Chen; S. N. Yang; X. Jin; X. F. Lin, *Sens. Actuators B*, **2008**, *129*, 218.
9. J. Shah; E. Wilkins, *Electroanalysis*, **2003**, *15* (3), 157.
10. <http://www.sony.net/SonyInfo/News/Press/200708/07-074E/index.html>, consulté le 28 mars 2011.
11. 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, *PLoS ONE*, **2010**, *5* (5), : e10476.
12. A. T. Yahiro; S. M. Lee; D. O. Kimble, *Biochim. Biophys. Acta*, **1964**, *88* (2), 375.
13. M. H. Osman; A. A. Shah; F. C. Walsh, *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, *26*, 3087.
14. A. Heller, *Science*, **2002**, 296.
15. <http://www.nature.com/news/cyborg-snails-power-up-1.10210>, consulté le 4 mai 2012
16. N. Mano; A. Heller, *J. Electrochem. Soc.*, **2003**, *150* (8), A1136.
17. F. Gao; Y. Yan; L. Su; L. Wang; L. Mao, *Electrochem. Commun.*, **2007**, *9*, 989.
18. J. Kim; H. Jia; P. Wang, *Biotechnology Advances*, **2006**, *24*, 296.
19. S. C. Barton; J. Gallaway; P. Atanassov, *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 4867.

20. Z. Khani; C. Jolival; M. Cretin; S. Tingry; C. Innocent, *Biotechnol. Lett.*, **2006**, *28*, 1779.
21. E. Nazaruk; K. Sadowska; J. F. Biernat; J. Rogalski; G. Ginalska; R. Bilewicz, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, *398*, 1651.
22. E. H. Yu; K. Scott, *Energies*, **2010**, *3*, 23.
23. H. Yoshida, *J. Chem. Soc.*, **1883**, *43*, 472.
24. D. Rochefort; R. Bourbonnais; D. Leech; M. G. Paice, *Chem. Commun.*, **2002**, 1182.
25. L. Gianfreda; F. Xu; J.-M. Bollag, *Bioremediation J.*, **1999**, *3*, 1.
26. J. Pelmont; *Enzymes : catalyseurs du monde vivant.*; Presses universitaires de Grenoble: Grenoble, **1995**p.
27. E. I. Solomon; U. M. Sundaram; T. E. Machonkin, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 2577.
28. D. M. Dooley; J. Rawlings; J. H. Dawson; P. J. Stephens; L.-E. Andréasson; B. G. Malmström; H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, *101*, 5038.
29. D. Rochefort, Université de Montréal, *Étude des réactions enzymatiques et électrochimiques impliquées dans le bioblanchiment de la pâte à papier*, **2001**, 175 p.
30. M. H. Thuesen; O. Farver; B. Reinhammer; J. Ulstrup, *Acta Chem. Scand.*, **1998**, *52*, 555.
31. K. Piontek; M. Antorini; T. Choinowski, *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277* (40), 37663.

32. S. Riva, *Trends In Biotechnology*, **2006**, 24 (5), 249.
33. R. C. Minussi; G. M. Pastore; N. Durán, *Trends in Food Science & Technology*, **2002**, 13 (6-7), 205.
34. H. Claus; G. Faber; H. König, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, 59 (6), 672.
35. A. Leonowicz; N. Cho; J. Luterek; A. Wilkolazka; M. Wojtas-Wasilewska; A. Matuszewska; M. Hofrichter; D. Wesenberg; J. Rogalski, *Journal of Basic Microbiology*, **2001**, 14, 145.
36. P. Bajpai, *Biotechnol. Prog.*, **1999**, 15 (2), 147.
37. A. Heller, *J. Phys. Chem.*, **1992**, 96, 3579.
38. R. A. Bullen; T. C. Arnot; J. B. Lakeman; F. C. Walsh, *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 21, 2015.
39. B. Palys; A. Bokuna; J. Rogalski, *Electrochim. Acta*, **2007**, 52, 7075.
40. Christine Mousty; Laetitia Vieille; S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, 22 (8), 1733.
41. M. Hébert; D. Rochefort, *ECS Transactions*, **2008**, 16 (11), 85.
42. M. Hébert; D. Rochefort, *Electrochim. Acta*, **2008**, 53, 5272.
43. D. Rochefort; D. Leech; R. Bourbonnais, *Green Chem.*, **2004**, 6, 14.

44. P. Clauwaert; P. Aelterman; T. H. Pham; L. De Schampelaire; M. Carballa; K. Rabaey; W. Verstraete, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2008**, 79, 901.
45. A. J. Bard; L. R. Faulkner; *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*; 2 ed.; John Wiley & Sons inc.: Hoboken, NJ, **2001**, 833 p.
46. J. Wang; *Analytical Electrochemistry*; Second ed.; John Wiley & Sons inc.: New York/Chichester/Weinheim/Brisbane/Singapore/Toronto, **2000**, 209 p.
47. M. Ciobanu; J. P. Wilburn; M. L. Krim; D. E. Cliffel In Handbook of Electrochemistry; *Fundamentals*; 1st ed.; Zoski, C. G., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **2007**, 1-29.
48. H. Liu; S. Cheng; B. E. Logan, *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 5488.
49. Gouvernement du Québec: Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (AETMIS), *Comparaison entre la pompe à insuline et les multi-injections quotidiennes d'insuline pour le traitement intensif du diabète de type 1*, **2004**, B. Côté; C. St-Hilaire, 90 p.
50. S. B. Harris; C. N. Lank, *Canadian Family Physician • Le Médecin de famille canadien*, **2004**, 50, 425.
51. <http://www.diabetesatlas.org/>, consulté le 22 février 2011.
52. J. Dusseault, Université de Montréal, *Biocompatibilité des Microcapsules d'Alginate: Purification d'Alginate, Réaction Immunitaire de l'Hôte et Protection du Receveur*, **2009**, 232 p.

53. http://www.futura-sciences.com/fr/definition/t/medecine-2/d/ilot-pancreatique_6350/, consulté le 22 février 2011.
54. ISIS_innovation, *NEWS REVIEWING THE LATEST INNOVATIONS, COLLABORATIONS AND TECHNOLOGY TRANSFER*, **2006**, Edition 47 (spring), 4.
55. A. E. Cass; G. Davis; G. D. Francis; H. A. Hill; W. J. Aston; I. J. Higgins; E. V. Plotkin; L. D. Scott; A. P. Turner, *Anal. Chem.*, **1984**, 56 (4), 667.
56. <http://www.myomnipod.com/about-omnipod/see-how-it-works/>, consulté le 24 mars 2011.
57. <http://www.accu-chek.fr/fr/>, consulté le 7 mars 2011.
58. DCCT, *The New England Journal of Medicine*, **1993**, 329 (14), 977.
59. A. M. Shapiro; e. al, *The New England Journal of Medicine*, **2000**, 343 (4), 230.
60. E. A. Ryan; e. al, *Diabetes*, **2005**, 54 (7), 2060.
61. D. Trau; R. Renneberg, *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, 18, 1491.
62. Y. Lin; F. Lu; Y. Tu; Z. Ren, *Nano Letters*, **2004**, 4 (2), 191.
63. H. R. Horton; L. A. Moran; R. S. Ochs; J. D. Rawn; K. G. Scrimgeour; *Principes de Biochimie*; 1st ed.; De Boeck-Wesmael Press: Bruxelles, **1994**, 720 p.
64. Y. Zhang; D. Rochefort, *Process Biochem.*, **2011**, 46, 993.
65. D. Quong; R. J. Neufeld, *Biotechnol. Bioeng.*, **1998**, 60 (1), 124.

66. T. M. S. Chang, *Journal of Dental Research*, **1972**, 51, 317.
67. T. M. S. Chang; M. J. Poznansky, *Nature*, **1968**, 218, 243.
68. T. M. S. Chang; F. C. MaCintosh; S. G. Mason, *Canad J Physiol Pharmacol*, **1966**, 44, 115.
69. T. M. S. Chang, *Science*, **1964**, 146 (3643), 524.
70. T. Kobayashi; Y. Aomatsu; H. Iwata; T. Kin; H. Kanehiro; M. Hisanaga; S. Ko; M. Nagao; Y. Nakajima, *Transplantation*, **2003**, 75 (5), 619.
71. T. Kobayashi; Y. Aomatsu; H. Iwata; T. Kin; H. Kanehiro; M. Hisanaga; S. Ko; M. Nagao; G. Harb; Y. Nakajima, *Cell transplantation*, **2006**, 15 (4), 359.
72. S. Bilodeau, Université de Montréal, *Amélioration de la résistance à l'hypoxie des îlots de Langerhans microencapsulés par l'utilisation d'agrégats de cellules dispersées*, **2010**, 168 p.
73. J. Dusseault; F. A. Leblond; R. Robitaille; G. Jourdan; J. Tessier; M. Ménard; N. Henley; J.-P. Hallé, *Biomaterials*, **2005**, 26, 1515.
74. O. Berteau; B. Mulloy, *Glycobiology*, **2003**, 13 (6), 29R.
75. C. Wandrey; D. Vidal, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2001**, 944, 187.
76. J.-A. Ni; H.-X. Ju; H.-Y. Chen; D. Leech, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 378, 151.
77. D. Leech; K. O. Feerick, *Electroanalysis*, **2000**, 12 (16), 1339.

78. S. Cosnier; S. Szunerits; R. S. Marks; A. Novoa; L. Puech; E. Perez; I. Rico-Lattes, *Talanta*, **2001**, *55*, 889.
79. X. Jing-Juan; C. Hong-Yuan, *Anal. Biochem.*, **2000**, *280* (2), 221.
80. F. Davis; S. P. J. Higson, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, *22*, 1224.
81. A. Markus; C. Linder In *Microencapsulation Methods and Industrial Applications; Advances in the Technology for Controlled-Release Pesticide Formulations*; Second ed.; Benita, S., Ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, **2006**; Vol. 158, 55-77.
82. A. C. Povey; J. R. Nixons; I. K. O'Neill, *J. Microencapsulation*, **1987**, *4* (4), 299.
83. C. A. Mcknight; A. Ku; M. F. A. Goosen; D. Sun; C. Penney, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **1988**, *3*, 334.
84. D. Poncelet; T. Alexakis; B. P. D. Smet; R. J. Neufeld, *J. Microencapsulation*, **1994**, *11* (1), 31.
85. F. Caruso; W. Yang; D. Trau; R. Renneberg, *Langmuir*, **2000**, *16*, 8932.
86. J.-W. Kim; S.-A. Cho; H.-H. Kang; S.-H. Han; I.-S. Chang; O.-S. Lee; K.-D. Suh, *Langmuir*, **2001**, *17*, 5435.
87. S. M. Marinakos; M. F. Anderson; J. A. Ryan; L. D. Martin; D. L. Feldheim, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105*, 8872.
88. L. W. Chan; H. Y. Lee; P. W. S. Heng, *Int. J. Pharm.*, **2002**, *242* (1-2), 259.
89. R. Atkin; P. Davies; J. Hardy; B. Vincent, *Macromolecules*, **2004**, *37*, 7979.

90. N. Gaponik; I. L. Radtchenko; G. B. Sukhorukov; A. L. Rogach, *Langmuir*, **2004**, *20*, 1449.
91. V. Breguet; R. Gugerli; M. Perneti; U. v. Stockar; I. W. Marison, *Langmuir*, **2005**, *21*, 9764.
92. N. Ren; B. Wang; Y.-h. Yang; Y.-h. Zhang; W.-l. Yang; Y.-h. Yue; Z. Gao; Y. Tang, *Chem. Mater.*, **2005**, *17*, 2582.
93. H. Zhu; E. W. Stein; Z. Lu; Y. M. Lvov; M. J. McShane, *Chem. Mater.*, **2005**, *17*, 2323.
94. M. Outokesh; H. Mimura; Y. Niibori; K. Tanaka, *J. Microencapsulation*, **2006**, *23* (3), 291.
95. D. Patra; N. Malvankar; E. Chin; M. Tuominen; Z. Gu; V. M. Rotello, *Small*, **2010**, *6* (13), 1402.
96. M. Monshipouri; R. J. Neufeld, *Enzyme Microb. Technol.*, **1991**, *13* (4), 309.
97. T. Yoshimaru; K. Matsumoto; Y. Kuramoto; K. Yamada; M. Sugano, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 4178.
98. A. Ramanavicius; K. Habermuller; E. Csoregi; V. Laurinavicius; W. Schuhmann, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 3581.
99. R. J. Russell; M. V. Pishko, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 3126.
100. S. Cosnier; S. Szunerits; R. S. Marks; A. Novoa; L. Puech; E. Perez; I. Rico-Lattes, *Electrochem. Commun.*, **2000**, *2*, 851.

101. A. Blandino; M. Macías; D. Cantero, *Process Biochem.*, **2001**, *36*, 601.
102. H. Zhu; R. Srivastava; J. Q. Brown; M. J. McShane, *Bioconjugate Chem.*, **2005**, *16*, 1451.
103. Y. Zhang; D. Rochefort, *J. Microencapsulation*, **2010**, *27* (8), 703.
104. L. Kouisni; D. Rochefort, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2009**, *111*, 1.
105. G. A. Edwards; A. J. Bergren; M. D. Porter In Handbook of Electrochemistry; *Chemically Modified Electrode*; 1st ed.; Zoski, C. G., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **2007**, 295-327.
106. B. A. Gregg; A. Heller, *J. Phys. Chem.*, **1991**, *95*, 5970.
107. P. Novák; K. Müller; K. S. V. Santhanam; O. Haas, *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 207.
108. R. W. Murray In Techniques of Chemistry; *Molecular Design of electrodes Surfaces*; Sauders, J. W. H., Weissberger, A., Eds.; John Wiley and Sons, Inc.: New York, **1992**; Vol. 22.
109. G. Decher; J. D. Hong; J. Schmitt, *Thin Solid Films*, **1992**, *210*, 831.
110. G. B. Sukhorukov; E. Donath; S. Davis; H. Lichtenfeld; F. Caruso; V. I. Popov; H. Mohwald, *Polym. Adv. Technol.*, **1998**, *9*, 759.
111. J. Forgie, University of Strathclyde, *The Study of Organic Semiconductors Towards Device Applications*, **2010**, 287 p.

112. C. K. Chiang; C. R. Fincher; Y. W. Park; A. J. Heeger; H. Shirakawa; E. J. Louis; S. C. Gau; A. G. Macdiarmid, *Physical Review Letters*, **1977**, *39*, 1098.
113. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2000/, consulté le 16 décembre 2011.
114. S. Dufresne, Université de Montréal, *Synthèse de nouveaux matériaux conducteurs comportant des unités aromatiques conjuguées et analyse de leurs propriétés physico-chimiques*, **2010**, 423 p.
115. N. Giuseppone; J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 1723.
116. N. Giuseppone; J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 1715.
117. J.-C. Vidal; E. Garcia-Ruiz; J.-R. Castillo, *Microchim. Acta*, **2003**, *143*, 93.
118. M. Skompska; M. J. Chmielewski; A. Tarajko, *Electrochem. Commun.*, **2007**, *9*, 540.
119. A. Ramanavicius; A. Kausaite; A. Ramanavicien, *Sens. Actuators B*, **2005**, *111-112*, 532.
120. N. Blouin; M. Leclerc, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41* (9), 1110.
121. L. Groenendaal; F. Jonas; D. Freitag; H. Pielartzik; J. R. Reynolds, *Advanced materials*, **2000**, *12* (7), 481.
122. D. B. Romero; M. Schaer; M. Leclerc; D. Adès; A. Siove; L. Zuppiroli, *Synth. Met.*, **1996**, *80*, 271.

123. S. A. Patil, Bergische Universität Wuppertal, *Ladder Polymers for Photonic Applications*, **2004**, 116 p.
124. J. I. G. Cadogan, *Synthesis*, **1969**, 1969 (01), 11.
125. H. Shirakawa; E. J. Louis; A. G. MacDiarmid; C. K. Chiang; A. J. Heeger, *J. Chem. Soc. D*, **1977**, 1977, 578.
126. J.-F. Morin; M. Leclerc; D. Adès; A. Siove, *Macromol. Rapid Commun.*, **2005**, 26, 761.
127. A. Tarajko; H. Cybulski; M. J. Chmielewski; J. Bukowska; M. Skompska, *Electrochim. Acta*, **2009**, 54, 4743.
128. A. Tarajko; A. Michota-Kaminska; M. J. Chmielewski; J. Bukowska; M. Skompska, *Electrochim. Acta*, **2009**, 54, 4751.
129. K. Takahashi; H. Eguchi; S. Shiwaku; T. Hatta; E. Kyoya; T. Yonemitsu; S. Mataka; M. Tashiro, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1988**, 1869.
130. M. J. Chmielewski, *Synthesis*, **2010**, 18, 3067.
131. M. J. Chmielewski; M. Charon; J. Jurczak, *Org. Lett.*, **2004**, 6 (20), 3501.
132. N. A. Cortese; R. F. Heck, *J. Org. Chem.*, **1977**, 42 (22), 3491.
133. Y. Monguchi; A. Kume; K. Hattori; T. Maegawa; H. Sajiki, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 7926.
134. M. Bourgeaux; S. Vomscheid; W. G. Skene, *Synth. Commun.*, **2007**, 37 (20), 3551.

2 THÉORIE ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1 Électrochimie : Les grandes équations

2.1.1 Historique

L'électrochimie est un domaine de la science qui étudie l'interconversion entre l'énergie électrique et l'énergie chimique par le biais des processus de transfert d'électrons principalement à l'interface de deux milieux. L'un de ces milieux est une électrode, la plupart du temps de nature métallique soit solide ou liquide, tandis que l'autre peut varier de par sa nature (gaz, liquide ou solide). La plupart des principes de bases et des relations ont cependant été énoncés avant la découverte même de l'électron par J. J. Thompson en 1893.¹ Alessandro Volta a inventé la première batterie ou pile voltaïque qui consistait à un montage de plaques de cuivre et de disques de zinc en alternance séparés par du papier imbibé de solution acide au début des années 1800.¹ Les concepts d'anode, cathode, électrode, électrolyte et ion ont été définis quant à eux par Michael Faraday¹ en 1835 suite à la formulation de deux lois qu'il a développé reliant le courant généré durant une réaction d'électrolyse à la quantité d'espèces générées. L'évolution des différentes techniques utilisées en électrochimie a permis en outre à la chimie organique de profiter de cet essor. À titre d'exemple, l'étude mécanistique de la formation de réactifs de Grignard a été rapportée en utilisant comme principale technique d'analyse la polarographie.² Cette dernière technique est l'œuvre de J. Heyrovský en 1922³ et a été la technique pionnière de l'électroanalyse. L'ensemble de la carrière de Heyrovský a été d'ailleurs récompensé en 1959 par le Prix Nobel de chimie.⁴⁻⁵

2.1.2 L'équation de Nernst

Même si le travail de Faraday a permis d'établir une relation entre le courant généré durant une électrolyse et la quantité d'espèces transformées, la compréhension de la dépendance du potentiel électrique développé à une cellule ainsi que de la concentration des espèces électroactives est resté nébuleuse jusqu'à la venue de la thermodynamique.¹ Considérons la réaction ci-dessous se passant à la surface d'une électrode :



où *Ox* représente l'espèce oxydée, *Red* l'espèce réduite et *n* le nombre d'électrons échangés entre les deux espèces. La relation entre la concentration de l'espèce oxydée [*Ox*], la concentration de l'espèce réduite [*Red*] et l'énergie libre ΔG est décrite par l'équation 2.1

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{\gamma_{Red}[Red]}{\gamma_{Ox}[Ox]} \quad \text{Éq. 2.1}$$

où ΔG^0 est l'énergie libre de Gibbs standard en $J \text{ mol}^{-1}$, *R* est la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), *T* est la température en *K* et γ est le coefficient d'activité des deux espèces respectives. Ces différences d'énergie peuvent être réexprimées sous forme de potentiel électrique *E* selon les équations suivantes :

$$\Delta G = -nFE \quad \text{Éq. 2.2}$$

$$\Delta G^0 = -nFE^0 \quad \text{Éq. 2.3}$$

où E^0 est le potentiel standard en V, F est la constante de Faraday (96485 C mol^{-1}). Ainsi, en combinant les équations 2.1 à 2.3, il est possible d'obtenir une expression mathématique décrivant la relation entre les concentrations des espèces oxydées et réduites dans le milieu à une valeur de potentiel E selon l'équation suivante :⁶

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_{Ox}[Ox]}{\gamma_{Red}[Red]} \quad \text{Éq. 2.4}$$

Cette équation est connue sous le nom d'équation de Nernst qui est une des plus importantes en électrochimie.^{1,5,7} Dans un contexte pratique (laboratoire), il est plus approprié de travailler avec le potentiel standard apparent $E^{0'}$ qui permet de réexprimer l'équation de Nernst de façon suivante :

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad \text{Éq. 2.5}$$

où

$$E^{0'} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_{Ox}}{\gamma_{Red}} \quad \text{Éq. 2.6}$$

Le potentiel d'une cellule voltaïque peut ainsi donc être calculé à partir des demi-réactions se déroulant à la cathode et à l'anode selon l'équation suivante :

$$E_{\text{cell}} = E_{\text{cathode}} - E_{\text{anode}} \quad \text{Éq. 2.7}$$

2.1.3 L'équation de Nernst-Planck

L'objectif des expériences employant des techniques électroanalytiques basées sur le contrôle du potentiel est d'étudier la réponse faradique qui est reliée à la concentration des espèces dans le milieu selon l'équation de Nernst vue précédemment. Évidemment, ces espèces doivent se rendre aux électrodes afin d'y subir une réaction électrochimique pour ainsi être détectées. Ce transport est effectué grâce au transport de masse selon trois façons illustrées à la Figure 2.1 :^{5,7}

- Diffusion : Mouvement spontané induit par un gradient de concentration cherchant à diminuer les différences de concentration.
- Convection : Mouvement induit par une force physique forcée telle qu'une agitation (circulation fluidique, vibration ou agitation mécanique) ou par une force physique naturelle telle qu'un gradient de densité.
- Migration : Mouvement effectué par des espèces chargées sous l'influence d'un champ électrique.

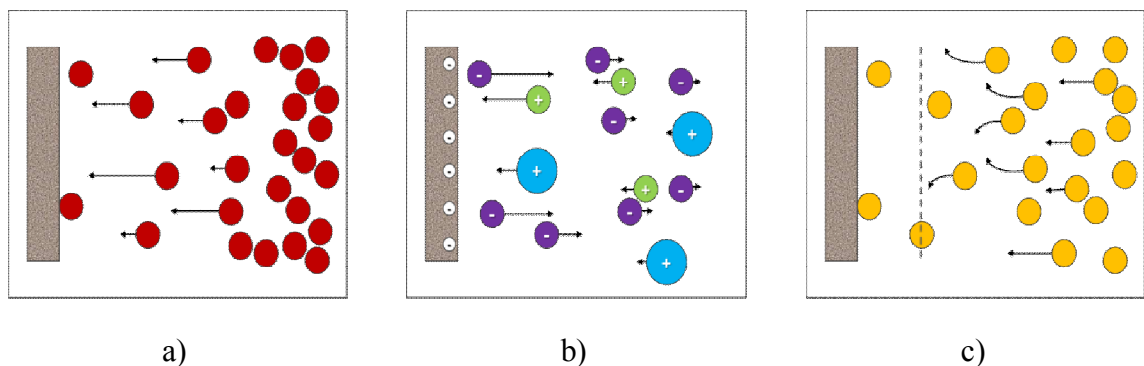


Figure 2. 1 : Schéma représentant les phénomènes de a) diffusion b) migration et c) convection.

La diffusion et la migration d'une espèce dans un milieu est le résultat d'un gradient du potentiel électrochimique, $\bar{\mu}$, tandis que la convection est le résultat d'un débalancement des forces dans le milieu. Le potentiel électrochimique d'une espèce j dans la phase α , $\bar{\mu}_j^\alpha$, est exprimé selon l'équation suivante :⁷

$$\bar{\mu}_j^\alpha = \mu_j^\alpha + z_j F \phi^\alpha \quad \text{Éq. 2. 8}$$

où ϕ^α est le potentiel électrostatique en V dans la phase α , z_j est la charge de l'espèce j . Le potentiel chimique de l'espèce j dans la phase α , μ_j^α , est défini par l'équation ci-dessous :⁷

$$\mu_j^\alpha = \mu_j^{\circ\alpha} + RT \ln a_j^\alpha \quad \text{Éq. 2. 9}$$

où $\mu_j^{\circ\alpha}$ est le potentiel chimique standard de l'espèce j dans la phase α en kJ mol^{-1} et a_j^α est l'activité de l'espèce j dans la phase α en mol L^{-1} . Si l'on considère un élément infinitésimal connectant deux points, a et b , dans un milieu, où pour une espèce j le potentiel électrochimique en a , $\bar{\mu}_j(a)$, est différent de celui en b , $\bar{\mu}_j(b)$, une différence dans la mesure du flux, \mathbf{J} , de cette même espèce j sera alors observée proportionnellement au gradient du potentiel électrochimique, $\nabla \bar{\mu}_j$, de l'espèce en question et peut être exprimée selon l'équation suivante :

$$\mathbf{J}_j = - \left(\frac{C_j D_j}{RT} \right) \nabla \bar{\mu}_j \quad \text{Éq. 2. 10}$$

où C_j est la concentration en mol cm⁻³ et D_j est le coefficient de diffusion en cm² s⁻¹ de l'espèce j . Ainsi donc, l'équation 2.10 représente le flux de l'espèce j dans un milieu où il y a absence de convection. En ajoutant cette dernière composante, l'équation 2.11 est obtenue :

$$\mathbf{J}_j = -\left(\frac{C_j D_j}{RT}\right) \nabla \bar{\mu}_j + C_j \mathbf{v} \quad \text{Éq. 2. 11}$$

où \mathbf{v} est la vitesse à laquelle se déplace un élément du milieu en cm s⁻¹. Ainsi en combinant les équations 2.8, 2.9 et 2.11 tout en considérant que $a_j^\alpha \approx C_j$, l'équation de Nernst-Planck ci-dessous est obtenue :^{1,7}

$$\mathbf{J}_j = -D_j \nabla C_j - \frac{z_j F}{RT} D_j C_j \nabla \phi + C_j \mathbf{v} \quad \text{Éq. 2. 12}$$

où le premier terme représente la diffusion (c.f. Figure 2.1 a), le deuxième est la migration ionique (c.f. Figure 2.1 b) et le troisième terme est la convection (c.f. Figure 2.1 c). Il sera vu plus tard comment cette dernière équation sera à la base d'autres développements mathématiques pour permettre d'utiliser des équations électroanalytiques (voir section 2.2.2). Pour la diffusion des espèces, il convient d'abord de revoir les modèles de double couche électrique pour mieux comprendre les processus d'échange électronique à l'interface électrode/milieu électrolytique.

2.1.4 Modèles de la double couche électrique

Lorsqu'une électrode est plongée dans une solution, une double couche électrique est formée à sa surface de façon quasi-instantanée. Le tout premier modèle à interpréter ce phénomène fut celui de Helmholtz. Ce dernier suppose que les ions solvatés s'alignent dans un plan parallèle à la surface de l'électrode chargée, dont la charge est opposée à celle des ions qui sont tenus à distance grâce à leur sphère de solvatation.⁸⁻⁹ Le plan ainsi créé par ces charges ioniques est appelé *plan externe de Helmholtz* qui agit tel les plaques d'un condensateur.⁷ Par contre, ce modèle ne tient pas compte des effets de perturbations qui existent dans le milieu électrolytique tel que l'agitation thermique qui tend à rompre et à disperser les charges par rapport à un plan rigide appelé *plan interne de Helmholtz*. Le modèle de Gouy-Chapman¹⁰⁻¹² propose une couche diffuse décrite par distribution statistique des ions, basée sur l'équation de *Poisson-Boltzmann*,⁷ qui varient selon la distance de ceux-ci par rapport à l'électrode et qui dépend de plusieurs facteurs comme la concentration des ions, leur charge et la température de la solution. Cependant, ce dernier modèle considère qu'un ion peut s'approcher de l'électrode sans restriction quant à sa position permettant d'atteindre une capacitance nulle lorsque l'électrode est fortement polarisée.⁷ En réalité, un ion ne peut s'approcher d'avantage de l'électrode que son propre rayon ionique ne le permet indiquant par le fait même la faiblesse du modèle de Gouy-Chapman. Pour palier à cet inconvénient, Stern apporta des modifications aux deux premiers modèles en les combinant pour donner le modèle de Stern ou Gouy-Chapman-Stern (GCS).¹³ Une représentation de ce modèle se trouve à la Figure 2.2.

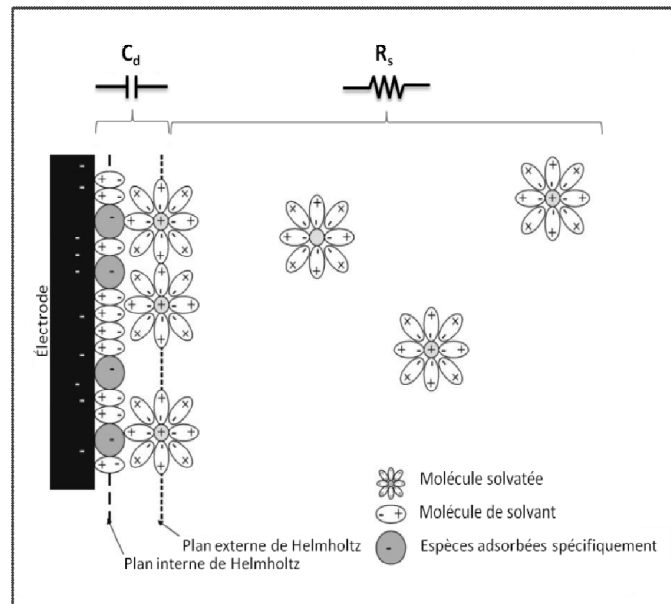


Figure 2. 2 : Représentation schématique de la double couche électrique selon le modèle GCS. Illustration inspirée de la référence 14.

Ce modèle permet d'identifier deux composantes à la valeur de la capacitance de la double couche électrique (C_d) présente à la surface d'une électrode, soit celle appartenant au *plan externe de Helmholtz* (C_H) et celle de la couche de diffusion (C_D) pouvant être exprimées par l'équation suivante :⁷

$$\frac{1}{C_d} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_D} \quad \text{Éq. 2. 13}$$

Selon la Figure 2.3, la variation de la valeur de C_d devient nulle lorsqu'une concentration d'électrolyte support est suffisamment élevée pendant la variation de la polarisation de l'électrode éliminant ainsi une variable lors de la détermination du courant attribuable à la diffusion de l'espèce électroactive vers la surface de l'électrode.

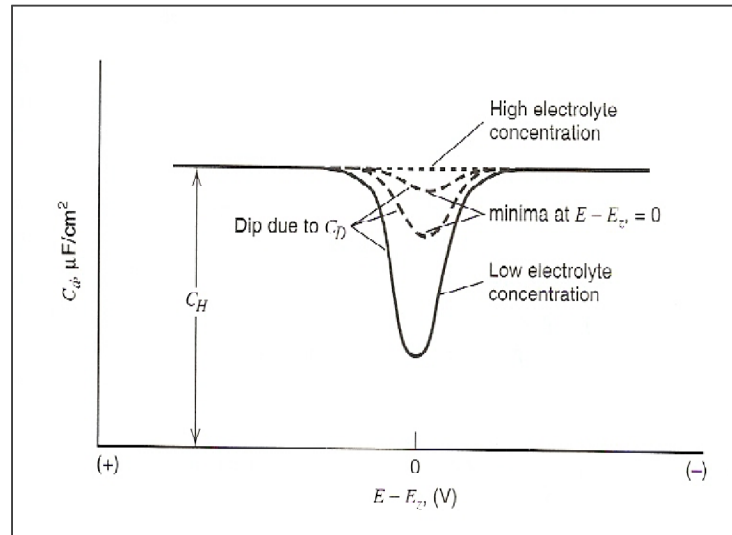


Figure 2. 3 : Comportement attendu de C_d selon le modèle de CGS. Illustration tirée de la référence 7.

2.1.5 Les lois de Fick sur la diffusion des espèces

Il a été démontré précédemment que lorsqu'une électrode est plongée dans une solution, une double couche électrique est formée à sa surface de façon quasi-instantanée (voir section 2.1.4). Puisque le modèle CGS démontre qu'une couche diffuse des espèces ioniques existe, il est tout à fait raisonnable de penser que cela va affecter la concentration des espèces *Ox* et *Red* se retrouvant en surface de l'électrode et par conséquent, la réponse Nerstienne (c.f. Éq. 2.5). De plus, si on prend un cas où le milieu électrolytique contient suffisamment de sel support, la valeur de C_d devrait être constante pour une électrode idéalement polarisable (c.f. Éq. 2.13). Dans le même ordre d'idée, il devient possible d'éliminer le terme responsable de la migration ionique dans l'équation de Nernst-Planck (c.f. Éq. 2.12). Si ce même milieu ne présente aucune forme de convection, l'expression du flux d'une espèce j peut donc être réexprimée par l'équation suivante :

$$\mathbf{J}_j = -D_j \nabla C_j \quad \text{Éq. 2. 14}$$

Cette équation est en réalité la première loi de Fick qui représente le flux d'une espèce en un point fixe à un temps donné. À partir de cette loi, il est possible de considérer que la variation de concentration de l'espèce j avec le temps. Pour ce faire, il est plus facile de se représenter la situation en une dimension. Ainsi, en considérant un élément infinitésimal connectant deux points soient x et $x+dx$, l'équation 2.14 devient :^{1,5,7}

$$\mathbf{J}_j(x,t) = -D_j \frac{\partial C_j(x,t)}{\partial x} \quad \text{Éq. 2. 15}$$

En dérivant cette équation par rapport au temps, la variation de la concentration de l'espèce j s'exprime de la façon suivante :⁷

$$\frac{\partial C_j(x,t)}{\partial t} = \frac{\mathbf{J}_j(x,t) - \mathbf{J}_j(x+dx,t)}{dx} \quad \text{Éq. 2. 16}$$

où

$$\mathbf{J}_j(x+dx,t) = \mathbf{J}_j(x,t) + \frac{\partial \mathbf{J}_j(x,t)}{\partial x} dx \quad \text{Éq. 2. 17}$$

L'équation 1.15 peut donc être réexprimée sous la forme suivante :

$$\frac{\mathbf{J}_j(x,t)}{\partial x} = -\frac{\partial}{\partial x} D_j \frac{\partial C_j(x,t)}{\partial x} \quad \text{Éq. 2. 18}$$

En combinant les éq. 2.16 à 2.18, l'expression suivante est obtenue :^{1,5,7}

$$\frac{\partial C_j(x,t)}{\partial t} = \left(\frac{\partial}{\partial x} \right) \left[D_j \left(\frac{\partial C_j(x,t)}{\partial x} \right) \right] \quad \text{Éq. 2. 19}$$

d'où l'expression générale de la deuxième loi de Fick est obtenue :

$$\frac{\partial C_j(x,t)}{\partial t} = D_j \nabla^2 C_j \quad \text{Éq. 2. 20}$$

En combinant la première loi de Fick avec l'équation de Faraday suivante :⁵

$$\mathbf{i}_j = -nFA \mathbf{J}_j \quad \text{Éq. 2. 21}$$

où A est l'aire de l'électrode en cm², l'expression générale d'un courant pour une réaction électrochimique d'une espèce j en surface d'une électrode est obtenue :

$$\mathbf{i}_j = nFAD_j \nabla C_j \quad \text{Éq. 2. 22}$$

En conclusion, le courant obtenu suite à une réaction à une électrode respecte dans la majorité des cas la loi de Fick.

2.1.6 La formulation de Butler-Volmer

Il a été vu dans les sections précédentes que l'expression du courant est reliée à loi de Fick tandis que celle du potentiel d'un système à l'équilibre est exprimée par la relation de Nernst. Cependant, ces situations considèrent que le transport de masse est le facteur limitant du système électrochimique. Or, les électrodes qui constituent des biocapteurs, des biopiles ou des piles à combustible sont souvent fabriquées à partir de matériaux ou de structures de matériaux possédant des conductivités électroniques moindres que des films continus de métaux nobles comme l'or ou le platine par exemple. En d'autres mots, leur résistance au transfert de charge lors d'une réaction électrochimique peut s'avérer plus difficile, impliquant par le fait même une demande énergétique plus grande pour que la réaction se produise. L'étiquette de matériaux «moins catalytiques» est souvent employée pour expliquer ce phénomène.

Puisqu'une réaction électrochimique, en surface d'une électrode, d'une espèce provenant d'une solution électrolytique peut être considérée comme étant une réaction hétérogène, il est normale d'exprimer sa densité de courant par rapport à sa constante de vitesse selon la forme suivante :¹⁵

$$\mathbf{J}_j = kC_j \quad \text{Éq. 2. 23}$$

où C_j représente la concentration molaire de l'espèce j à proximité de la surface de l'électrode en dehors de la double couche électrique. Puisque le flux d'une espèce est exprimé par unité de surface et par unité de temps, il est possible d'exprimer les vitesses de réaction pour les espèces Ox et Red selon les équations suivantes :

$$v_{Ox} = k_a [Red] \quad \text{Éq. 2. 24}$$

$$v_{Red} = k_c [Ox] \quad \text{Éq. 2. 25}$$

où v_{Ox} , v_{Red} sont les vitesses de réaction d'oxydation et de réduction respectivement tandis que k_c et k_a sont les constantes de vitesse des réactions cathodiques et anodiques respectivement. La densité de courant nette à une électrode est égale à la différence entre les densités de courant des deux réactions impliquées, qui correspond aux vitesses des deux réactions multipliées par la constante de Faraday :¹⁵

$$\mathbf{J}_{net,j} = \mathbf{J}_{a,j} - \mathbf{J}_{c,j} \quad \text{Éq. 2. 26}$$

où

$$\mathbf{J}_{a,j} = nFk_a [Red] \quad \text{Éq. 2. 27}$$

$$\mathbf{J}_{c,j} = nFk_c [Ox] \quad \text{Éq. 2. 28}$$

Il est possible de constater avec l'équation 2.26 que lorsque $\mathbf{J}_{a,j} > \mathbf{J}_{c,j}$, une densité de courant anodique positive est obtenue tandis que lorsque $\mathbf{J}_{a,j} < \mathbf{J}_{c,j}$, une densité de courant cathodique négative est obtenue.

Cependant, afin qu'un ion participe à une réaction de réduction ou d'oxydation à une électrode, pour générer une densité de courant, il doit se départir de sa sphère de solvation, se déplacer à travers la double couche électrique et réajuster sa sphère de solvation suite au transfert électronique associé à la réaction électrochimique. Par la suite, cette nouvelle espèce doit se détacher de la surface de l'électrode et effectuer le chemin

inverse pour retourner vers le cœur de la solution.¹⁵ Il est aussi possible d'observer dans certains cas des réactions chimiques intermédiaires précédant ces réactions électrochimiques. La Figure 2.4 montre le chemin parcouru par un ion provenant du cœur de la solution électrolytique jusqu'en surface de l'électrode avant d'y subir une réaction électrochimique.

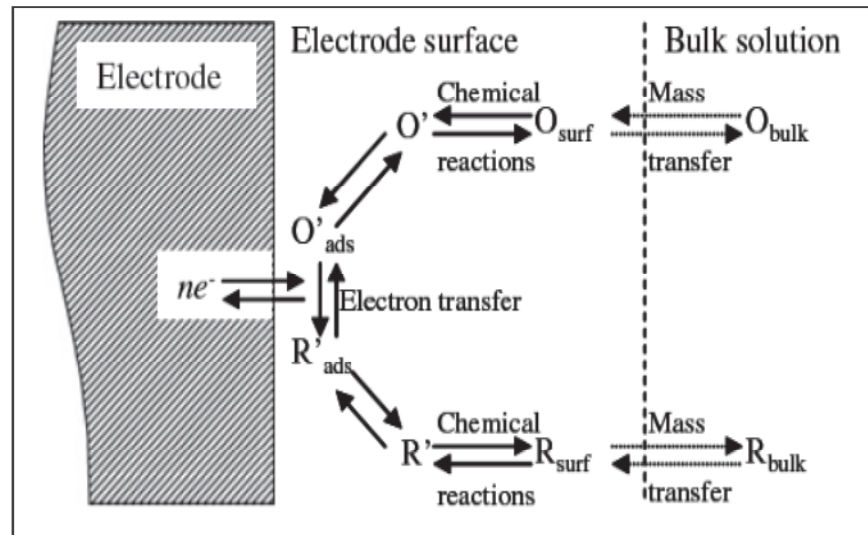


Figure 2. 4 : Représentation schématique des processus impliqués en surface d'une électrode lors d'une réaction électrochimique. Illustration tirée de la référence 1.

Évidemment, les processus décrits plus haut nécessitent des énergies d'activation, d'où les constantes de vitesse, pour des cas simples, peuvent être exprimées à partir de la *théorie du complexe activé* :^{7,15}

$$k_{a,c} = \kappa \frac{kT}{h} e^{-\Delta G^\ddagger/RT} \quad \text{Éq. 2. 29}$$

où k est la constante de Boltzmann ($1,38066 \times 10^{-23}$) en J K^{-1} , h est la constante de Planck ($6,62608 \times 10^{-34}$) en J s , ΔG^\ddagger est l'énergie libre de Gibbs impliquée dans la formation du complexe activé et κ est le coefficient de transmission pouvant prendre une valeur de zéro à l'unité. Ainsi en combinant 2.29 aux équations 2.27 et 2.28, 2.26 devient :

$$\mathbf{J}_{net,j} = F\kappa \frac{kT}{h} \left[[Red] e^{-\Delta G_a^\ddagger/RT} - [Ox] e^{-\Delta G_c^\ddagger/RT} \right] \quad \text{Éq. 2. 30}$$

Cette dernière équation admet implicitement que les énergies de Gibbs d'activation des processus cathodiques et anodiques peuvent être différentes.

La polarisation, imposée ou naturelle, d'une électrode affecte fortement la cinétique des réactions se produisant à sa surface. En effet, de l'hydrogène peut être formé facilement à certaines valeurs de potentiel et non à d'autres. Le dégagement de l'hydrogène en milieu H_2SO_4 à la surface d'une électrode est probablement le meilleur exemple.¹⁶ Une électrode de zinc peut se dissoudre dans une zone de potentiel précise et être parfaitement stable dans une autre zone selon le pH de la solution électrolytique, affectant ainsi sa vitesse de corrosion. La consultation d'un diagramme de Pourbaix¹⁷ facilite d'ailleurs la détermination de la plage de stabilité de métaux pouvant être utilisés comme électrode. Il a été vu précédemment (voir Figure 2.4) qu'une espèce électroactive doit traverser la double couche électrique pour atteindre la surface de l'électrode. Cette zone possède une différence de potentiel appelée potentiel de Galvani, $\Delta\phi$, égale au potentiel de la surface de l'électrode (ϕ_e) moins celle du plan externe de Helmholtz où la couche diffuse de la solution électrolytique commence (ϕ_s).¹⁵ L'équation 2.2 démontre que l'énergie libre de Gibbs est liée au potentiel électrique. Si pour un système donné, le potentiel est changé de ΔE à une nouvelle valeur, l'énergie liée à ce changement sera égale $-nF\Delta E$ ou $-nF(E - E^0)$. La Figure 2.5 permet de mieux visualiser l'influence du potentiel sur la cinétique d'une réaction impliquant une seule étape réactionnelle et à un électron échangé. La

réaction de réduction (courbe supérieure) est obtenue lorsque que le potentiel E appliqué est égal à celui $E^{0'}$ (potentiel normal apparent).

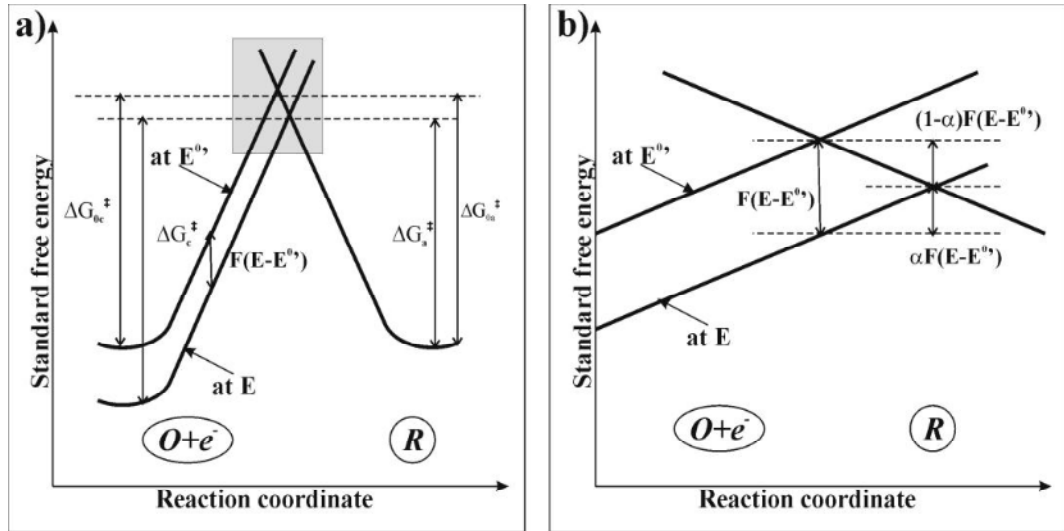


Figure 2. 5 : a) Profil des énergies libres de Gibbs standards présentant les effets d'un changement de potentiel. b) Agrandissement de la section grise. Illustration tirée de la référence 14.

Suite à un changement ΔE , la courbe de réduction, $Ox + e^-$, augmente par un facteur égal à $-F(E-E^{0'})$, qui correspond à l'énergie relative d'un électron résidant parmi les charges de l'électrode.^{7,14} Par conséquent, la barrière énergétique du processus d'oxydation, ΔG_a^\ddagger , va décroître par rapport à sa valeur initiale, ΔG_{oa}^\ddagger , d'un facteur $(1-\alpha)$ où α est le coefficient de transfert. À l'opposé, la barrière énergétique du processus de réduction, ΔG_c^\ddagger , est plus élevée par rapport à sa valeur initiale, ΔG_{oc}^\ddagger , d'un facteur $\alpha F(E-E^{0'})$.^{20,27} Ainsi donc, l'Éq. 2.30 peut être réexprimée selon l'équation ci-dessous :

$$\mathbf{J}_{net,j} = F\kappa \frac{kT}{h} \left[[Red] e^{-\left(\Delta G_{oa}^{\ddagger} - (1-\alpha)(E-E^o)\right)f} - [Ox] e^{-\left(\Delta G_{oc}^{\ddagger} - \alpha(E-E^o)\right)f} \right] \quad \text{Éq. 2. 31}$$

où $f = F/RT$. Cette dernière équation exprime donc la densité de courant à l'électrode par rapport aux valeurs de potentiel des réactions anodique et cathodique. En assumant que l'équation 2.29 peut être exprimée sous la forme d'une équation d'Arrhenius, les constantes de vitesse k_a et k_c sont obtenues ci-dessous :^{5,7,14}

$$k_a = A_a e^{-\Delta G_a^{\ddagger}/RT} \quad \text{Éq. 2. 32}$$

$$k_a = A_a e^{-\left(\Delta G_{oa}^{\ddagger} - (1-\alpha)(E-E^o)\right)f} \quad \text{Éq. 2. 33}$$

$$k_a = A_a e^{-\left(\Delta G_{oa}^{\ddagger}/RT\right)} e^{(1-\alpha)(E-E^o)f} \quad \text{Éq. 2. 34}$$

et

$$k_c = A_c e^{-\Delta G_c^{\ddagger}/RT} \quad \text{Éq. 2. 35}$$

$$k_c = A_c e^{-\left(\Delta G_{oc}^{\ddagger} + \alpha(E-E^o)\right)f} \quad \text{Éq. 2. 36}$$

$$k_c = A_c e^{-\left(\Delta G_{oc}^{\ddagger}/RT\right)} e^{-\alpha(E-E^o)f} \quad \text{Éq. 2. 37}$$

L'équation 2.31 peut être laissée de côté pour réexprimer la densité de courant net d'une réaction à une seule étape à un électron échangé de la façon suivante :

$$\mathbf{J}_{net,j} = F[Red]A_a e^{-\left(\frac{\Delta G_{oa}^\ddagger}{RT}\right)} e^{(1-\alpha)(E-E^o)f} - F[Ox]A_c e^{-\left(\frac{\Delta G_{oc}^\ddagger}{RT}\right)} e^{-\alpha(E-E^o)f} \quad \text{Éq. 2. 38}$$

En considérant le cas à l'équilibre où $E = E^o$ et que $v_{Ox} = v_{Red}$ (c.f. Éq. 2.24 et 2.25), alors $k_a = k_c$ dont cette valeur est appelée constante de vitesse hétérogène standard k^o . Ainsi donc, k_a et k_c peuvent être exprimées de la façon suivante :⁷

$$k_a = k^o e^{(1-\alpha)(E-E^o)f} \quad \text{Éq. 2. 39}$$

$$k_c = k^o e^{-\alpha(E-E^o)f} \quad \text{Éq. 2. 40}$$

Ainsi l'équation 2.38 devient :^{5,7}

$$\mathbf{J}_{net,j} = Fk^o \left[[Red] e^{(1-\alpha)(E-E^o)f} - [Ox] e^{-\alpha(E-E^o)f} \right] \quad \text{Éq. 2. 41}$$

Cette relation est très importante. Cette dernière ou toutes variations de cette équation peuvent traiter pratiquement tous les cas de cinétiques hétérogènes. C'est l'expression générale de la formulation de Butler-Volmer des cinétiques aux électrodes en l'honneur des pionniers dans le domaine.¹⁸⁻¹⁹ Encore là, il est peu pratique de travailler avec k^o , surtout lorsque la densité de courant net est non nulle comme dans le cas d'une biopile à combustible où une force électromotrice est présente entre deux électrodes reliées entre elles grâce à une réaction d'oxydation à l'anode et une de réduction à la cathode. Puisque $J_a = J_c$ à l'équilibre ($E = E_{eq}$) et que la relation de Nernst stipule que le potentiel à l'électrode

est basé sur la concentration des espèces *Ox* et *Red* provenant du cœur de la solution, la relation suivante est déterminée :⁷

$$e^{(E_{eq}-E^o)f} = \frac{C_{Ox}^*}{C_{Red}^*} \quad \text{Éq. 2. 42}$$

La densité de courant dans ce cas est appelée densité de courant d'échange \mathbf{J}_o et s'exprime par la relation suivante :⁷

$$\mathbf{J}_o = Fk^o C_o^* e^{-\alpha(E_{eq}-E^o)f} \quad \text{Éq. 2. 43}$$

En élevant à la puissance $-\alpha$ l'équation 2.42 et en la substituant dans l'équation 2.43, \mathbf{J}_o peut être réexprimé par la façon suivante :⁷

$$\mathbf{J}_o = Fk^o C_{Ox}^{*(1-\alpha)} C_{Red}^{*\alpha} \quad \text{Éq. 2. 44}$$

L'avantage de travailler avec \mathbf{J}_o est que l'on peut exprimer \mathbf{J}_{net} selon une déviation par rapport au potentiel d'équilibre, exprimée comme étant une surtension η au lieu d'utiliser E^o . Ainsi en divisant l'équation 2.41 (\mathbf{J}_{net}) par 2.44 (\mathbf{J}_o), l'expression suivante est obtenue :

$$\frac{\mathbf{J}_{net}}{\mathbf{J}_o} = \frac{[Red] e^{(1-\alpha)(E-E^o)f}}{C_{Ox}^{*(1-\alpha)} C_{Red}^{*\alpha}} - \frac{[Ox] e^{-\alpha(E-E^o)f}}{C_{Ox}^{*(1-\alpha)} C_{Red}^{*\alpha}} \quad \text{Éq. 2. 45}$$

puisque α est équivalent à $1-(1-\alpha)$, alors :

$$\frac{\mathbf{J}_{net}}{\mathbf{J}_o} = \frac{[Red]e^{(1-\alpha)(E-E^o)f}}{C_{Red}^*} \left(\frac{C_{Ox}^*}{C_{Red}^*} \right)^{-(1-\alpha)} - \frac{[Ox]e^{-\alpha(E-E^o)f}}{C_{Ox}^*} \left(\frac{C_{Ox}^*}{C_{Red}^*} \right)^\alpha \quad \text{Éq. 2. 46}$$

En se basant sur l'équation 2.42, l'expression suivante est obtenue :

$$\frac{\mathbf{J}_{net}}{\mathbf{J}_o} = \frac{[Red]e^{(1-\alpha)(E-E^o)f}}{C_{Red}^*} \left(e^{(E_{eq}-E^o)f} \right)^{-(1-\alpha)} - \frac{[Ox]e^{-\alpha(E-E^o)f}}{C_{Ox}^*} \left(e^{(E_{eq}-E^o)f} \right)^\alpha \quad \text{Éq. 2. 47}$$

Après réarrangement :

$$\mathbf{J}_{net} = \mathbf{J}_o \left[\frac{[Red]e^{(1-\alpha)(E-E_{eq})f}}{C_{Red}^*} - \frac{[Ox]e^{-\alpha(E-E_{eq})f}}{C_{Ox}^*} \right] \quad \text{Éq. 2. 48}$$

$$\mathbf{J}_{net} = \mathbf{J}_o \left[\frac{[Red]e^{(1-\alpha)\eta f}}{C_{Red}^*} - \frac{[Ox]e^{-\alpha\eta f}}{C_{Ox}^*} \right] \quad \text{Éq. 2. 49}$$

Cette dernière équation peut donc être employée pour caractériser une biopile en fonctionnement par exemple (voir Éq. 1.2).

2.2 Les techniques de caractérisations électrochimiques

2.2.1 La voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie cyclique (VC) est une technique qui est très populaire en électroanalytique, notamment pour l'étude d'espèces électroactives. De nos jours, cette technique est aussi employée dans d'autres sphères de la chimie pour étudier l'effet du ligand sur le potentiel d'oxydo-réduction du centre métallique de complexes synthétisés,^{14,20-21} la formation de radicaux libres générés électrochimiquement,^{6,22-24} la détection de radicaux libres générés chimiquement,^{6,25} l'activité électrochimique et la plage de stabilité de liquides ioniques,^{6,26-29} l'étude de polymères conducteurs³⁰⁻³⁹ ainsi que la catalyse enzymatique.⁴⁰⁻⁴⁴

La technique a vu le jour en 1938 lorsque Matheson et Nichols ont étudié des mécanismes d'électrolyse à une électrode stationnaire en y faisant varier le potentiel appliqué à cette dernière de façon linéaire ou cyclique.⁴⁵ Par la suite, Randles⁴⁶ et Sevcik⁴⁷ ont étudiés des réactions réversibles tandis que Delahay⁴⁸ s'est intéressé aux réactions totalement irréversibles en utilisant un balayage de potentiel linéaire toujours à une électrode stationnaire plane. Plus tard, Matsuda et Ayabe⁴⁹ ont repris les théories de Randles-Sevcik et celle de Delahay pour les appliquer à des systèmes quasi-réversibles. La complexité mathématique de ces relations a empêché des études plus poussées jadis. De plus, seuls les premiers balayages étaient considérés dans la plupart des analyses ne permettant pas d'atteindre l'état stationnaire (état d'équilibre) que procure le multicyclage. C'est suite aux travaux de Nicholson et Shain⁵⁰ en 1964 qui ont permis de mettre en évidence les valeurs de potentiels de pic et de courants (anodique et cathodique) servant à l'analyse de tous systèmes dans différentes conditions que la voltampérométrie cyclique est devenue une puissante technique pour diagnostiquer la réponse de systèmes électroactifs.

La voltampérométrie cyclique peut être définie comme étant la mesure du courant (i) résultant du balayage de potentiel (E) à une électrode de travail immergée dans un milieu électrolytique sans agitation.⁴¹ Ce même potentiel est contrôlé à l'électrode de travail par rapport à une électrode de référence. Quant au courant, celui-ci est mesuré entre l'électrode de travail et une électrode dite auxiliaire ou contre électrode. Le fonctionnement ainsi que le rôle d'une électrode de référence dans un montage à trois électrodes se trouve expliquer dans la littérature.⁵¹ Ainsi, au lieu d'obtenir un graphique tridimensionnel de courant-temps-potentiel, c'est plutôt une courbe i-E qui est tracée ; cette dernière est beaucoup plus simple à analyser. Le potentiel est balayé linéairement à une vitesse allant de 5 mV/s à 1000 mV/s, la plupart du temps, entre deux bornes de potentiel.^{5,7,52} La Figure 2.6 présente la variation du potentiel en fonction du temps, une courbe de forme triangulaire qui est caractéristique de cette technique.⁶

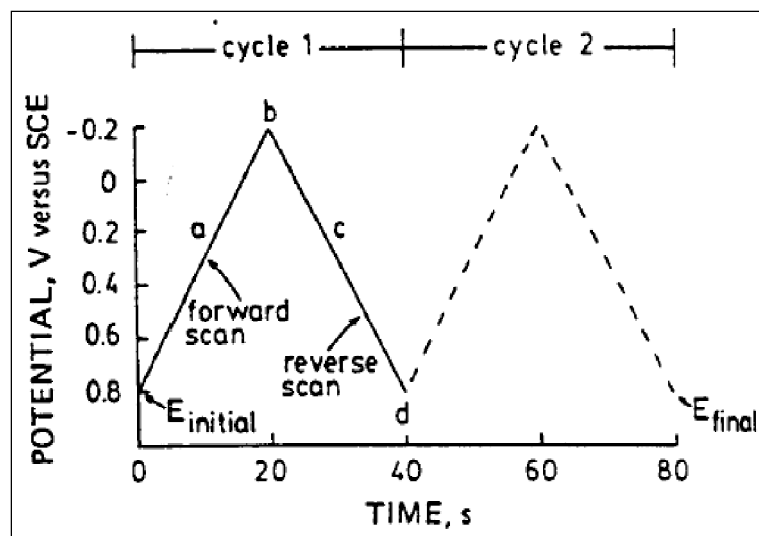
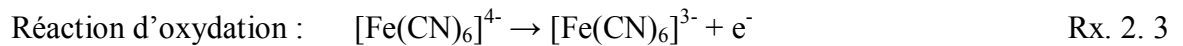
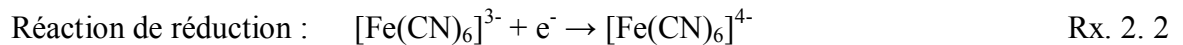


Figure 2. 6 : Courbe potentiodynamique décrivant le balayage effectué durant une expérience de voltampérométrie cyclique. Figure tirée de la référence 41.

Dans cet exemple, le potentiel est, dans un premier temps, balayé vers des potentiels négatifs (« forward scan »). Au sommet de la courbe triangulaire, le sens du balayage est

renversé et le potentiel est balayé vers des potentiels positifs (« reverse scan »). La pente de ce graphique indique la vitesse de balayage. Un exemple de voltampérogramme cyclique est présenté à la Figure 2.7 qui illustre le système électrolytique $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Ce système est dit réversible dans des conditions expérimentales déterminées et se comporte donc comme le prédisent les relations vues à la Section 2.1.2. Le balayage du potentiel débute en (a) et atteint (b) où le potentiel est suffisamment négatif pour commencer à réduire les espèces $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$; un faible courant cathodique est alors mesuré. Ce dernier croît rapidement de (b) à (d), et ce, jusqu'à ce que la concentration en espèces $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ à la surface de l'électrode soit suffisamment faible. Un courant maximal cathodique, i_{pc} , est alors mesuré à E_{pc} . Par la suite, le courant diminue rapidement puisqu'il y a diminution importante des espèces $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ en solution à la surface de l'électrode, de (d) à (f). Lorsque le potentiel est balayé en sens inverse, les mêmes observations s'appliquent, mais cette fois-ci pour les espèces réduites $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ qui s'oxydent. En effet, ces dernières subiront une oxydation et un courant maximal d'oxydation i_{pa} , est mesuré à E_{pa} . Les deux réactions impliquées à l'électrode de travail sont données ci-dessous :



En supposant que le transfert d'électrons soit suffisamment rapide à la surface de l'électrode pour que les espèces oxydées (*Ox*) et réduites (*Red*) s'ajustent immédiatement au rapport dicté par l'équation de Nernst (c.f. Éq 2.5), et que le tout se trouve dans une zone contrôlée par une diffusion semi-infinie linéaire, il est alors possible de poser une expression décrivant la concentration de ces espèces⁷ :

$$C_{Ox}(0, t) = C_{Ox}^* - (\pi D_{Ox})^{-1/2} \int_0^t f(\tau)(t - \tau)^{-1/2} d\tau \quad f(\tau) = \frac{I(\tau)}{nFA} \quad \text{Éq. 2. 50}$$

$$C_{Red}(0, t) = (\pi D_{Red})^{-1/2} \int_0^t f(\tau)(t - \tau)^{-1/2} d\tau \quad C_R^* = 0 \text{ initialement} \quad \text{Éq. 2. 51}$$

où C_O^* , C_R^* , D_O et D_R sont les concentrations des espèces oxydées et réduites dans le cœur de la solution ainsi que les coefficients de diffusion de ces espèces, respectivement. τ est une caractéristique de temps définie par l'expérience et la surface électrochimiquement active (électrode). Les équations 2.50 et 2.51 sont évidemment des équations générales. Des relations mathématiques pour des situations plus précises sont présentées dans la littérature.⁷

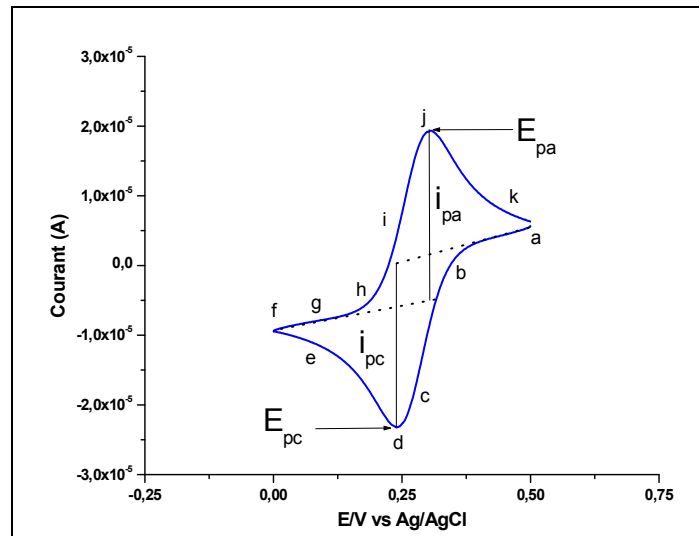


Figure 2. 7 : Voltampérogramme cyclique obtenu à une électrode de Pt pour le système réversible $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ dissous dans une solution aqueuse de KCl à 1,0 M. Vitesse de balayage = 100 mV s^{-1} . Figure tirée de la référence 6.

La concentration des espèces oxydées, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, et réduites, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, en fonction de la distance de séparation de l'électrode, lors d'un voltampérogramme cyclique semblable à celui présenté à la Figure 2.7, peut être représentée par la Figure 2.8. Cette

dernière figure permet également de comprendre comment le courant évolue lors du balayage de potentiel illustré à la Figure 2.6. En effet, le courant est proportionnel à la pente des courbes présentées à la Figure 2.8, soit celles de la concentration des espèces électroactives en fonction de la distance. Ainsi, à la Figure 2.8a, la pente est nulle et le courant observé devrait être nul. Cependant, le courant n'est pas nul comme il est possible de le constater à la Figure 2.7a.⁶

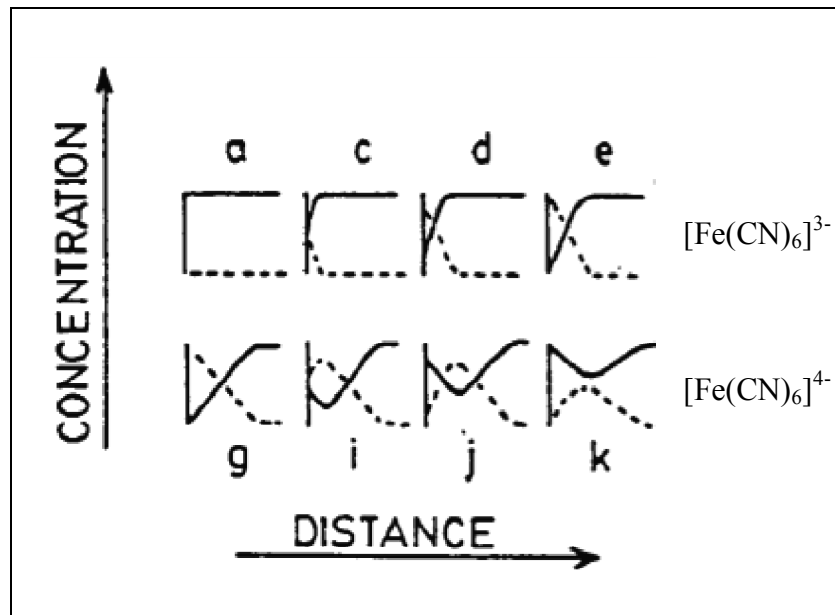


Figure 2. 8 : Concentration des espèces $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ à la surface d'une électrode de Pt en fonction de la distance de séparation de l'électrode lors d'un voltampérogramme cyclique semblable à celui de la Figure 2.7. Figure tirée de la référence 41.

Il faut comprendre que lors de l'expérience, le potentiel de départ était suffisamment positif pour que l'on puisse observer un phénomène d'oxydation des espèces $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ présentes en solution, et par conséquent, un faible courant est mesuré. Une fois rendu en d), la concentration en espèces $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ est suffisamment basse pour que l'on assiste à un plafonnement du courant cathodique enregistré, i_{pc} ; ce courant maximal correspond à une pente accentuée sur le graphique de la Figure 2.8.⁶ Le sens du balayage est inversé au

potentiel donné en f) pour alors assister à une augmentation des espèces $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (provenant de l'oxydation des espèces réduites) jusqu'au potentiel donné en j) correspondant au courant anodique maximal, i_{pa} . En raison des courants possiblement capacitifs observés à la Figure 2.7 a et f (associés à la charge de la double couche électrique à l'interface électrode / électrolyte), des lignes de base doivent être tirées à partir des courants de plateau afin de déterminer les valeurs réelles de courants de pics, soit i_{pa} et i_{pc} (voir Figure 2.7). Ceci est facile à réaliser lorsque le système redox est dit réversible, mais peut devenir plus complexe lorsqu'il s'agit de systèmes redox quasi-réversibles ou irréversibles, ou bien que plusieurs processus redox se manifestent dans une plage de potentiel restreinte.

D'autres paramètres tels que les potentiels de pics anodique, E_{pa} , et cathodique, E_{pc} , sont très importants.⁶ Dans le cas d'un système réversible, le potentiel standard apparent, E° , correspond au potentiel qui se situe à mi-chemin entre E_{pa} et E_{pc} ⁴¹ :

$$E^{\circ} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad \text{Éq. 2. 52}$$

Les potentiels de pic peuvent être déterminés directement sur le graphique ou calculés mathématiquement selon la relation suivante⁷ :

$$E_p = E_{1/2} - 1,109 \frac{RT}{nF} = E_{1/2} - \frac{28,5}{n} \text{mV} \quad \text{à } 25^{\circ}\text{C} \quad \text{Éq. 2. 53}$$

où $E_{1/2}$ représente le potentiel de demi-vague donné par :

$$E_{1/2} = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{D_R^{1/2}}{D_O^{1/2}} \quad \text{Éq. 2. 54}$$

Lorsque le pic est un peu trop large, pour bien déterminer le potentiel de pic, il est préférable de déterminer le potentiel de demi-pic, $E_{p/2}$, correspondant au potentiel à $i_{p/2}$, et de poser⁷ :

$$\left| E_p - E_{p/2} \right| = 2,20 \frac{RT}{nF} = \frac{56,5}{n} \text{ mV} \quad \text{à } 25^\circ\text{C} \quad \text{Éq. 2. 55}$$

Le nombre d'électrons échangés, n , à l'électrode est un autre paramètre important à considérer en VC. Ce dernier peut être déterminé par la relation suivante⁴¹ :

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \approx \frac{59}{n} \text{ mV} \quad \text{à } 25^\circ\text{C} \quad \text{Éq. 2. 56}$$

Ainsi, pour un système réversible à un électron comme $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, la séparation des pics est d'environ 59 mV, mais celle-ci devient plus importante lorsque le transfert d'électrons à la surface de l'électrode se fait très lentement ; un système alors dit irréversible est observé. Finalement, mentionnons que l'équation de Randles-Sevcik est très importante pour déterminer le coefficient de diffusion (D) de l'espèce réduite et / ou oxydée d'un système réversible^{5,7,41,52-53} :

$$i_p = \left(2,69 \times 10^5 \right) n^{3/2} A D^{1/2} C^* v^{1/2} \quad \text{à } 25^\circ\text{C} \quad \text{Éq. 2. 57}$$

où i_p est le courant de pic en ampère, n est le nombre d'électrons échangés, A est la surface de l'électrode en cm^2 , D est le coefficient de diffusion de l'espèce électroactive en cm^2/s , C^* est la concentration en $\text{mole} \cdot \text{cm}^{-3}$ et v est la vitesse de balayage en V/s . À partir de la pente de la courbe de i_p vs $v^{1/2}$, il est possible de déterminer le coefficient de diffusion de l'espèce réduite ou oxydée si la surface de l'électrode est connue. Il est également possible

d'observer que selon cette équation, le courant varie proportionnellement à la racine carrée de la vitesse de balayage.^{5,7,41-42,52-53} Cette propriété indique un contrôle par la diffusion. Enfin, le courant de pic anodique doit être identique au courant de pic cathodique pour un système réversible ($i_{pa}/i_{pc}=1$).⁶

Les diverses relations présentées plus haut sont valables seulement pour les systèmes électrochimiques réversibles. Il existe des cas où ces relations ne sont plus respectées. Un système est dit irréversible lorsque le transfert d'électrons à la surface de l'électrode est très lent. Les limites imposées précédemment par la relation de Nernst doivent donc être modifiées afin de mieux définir ce type de système.⁶ Dans le cas d'un système à un électron échangé et à une seule étape de réaction, ($Ox + e^- \xrightarrow{k_f} Red$), le courant de pic est déterminé à l'aide de la relation suivante qui ressemble à la relation de Randles-Sevcik^{7,53} :

$$i_p = (2,99 \times 10^5) \alpha^{1/2} A D^{1/2} C^* v^{1/2} \quad \text{Éq. 2. 58}$$

où α est le coefficient de transfert qui est relié à k^0 tel que vu à la section 2.1.6. Il est également possible de déterminer le potentiel de pic en modifiant les équations 2.53 et 2.55 afin de répondre à un système totalement irréversible⁷ :

$$E_p = E^{o'} - \frac{RT}{\alpha F} \left[0,780 + \ln \left(\frac{D^{1/2}}{k^0} \right) + \ln \left(\frac{\alpha F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad \text{Éq. 2. 59}$$

$$\left| E_p - E_{p/2} \right| = 1,857 \frac{RT}{\alpha F} = \frac{47,7}{\alpha} \text{ mV} \quad \text{à } 25^\circ\text{C} \quad \text{Éq. 2. 60}$$

Pour un système totalement irréversible, l'équation 2.59 démontre que E_p est fonction de la vitesse de balayage, ce qui n'est pas le cas pour un système réversible. Il est à noter que E_p se trouve à des potentiels plus négatifs que E^0 dans le cas d'une réduction. La différence entre ces deux valeurs correspond à une surtension d'activation qui est reliée, elle aussi, à k^0 . Cette dernière constante peut être déterminée à l'aide de la relation suivante⁷ :

$$i_p = 0,227 F A C^* k^0 \exp \left[-\alpha f (E_p - E^0) \right] \quad \text{Éq. 2. 61}$$

où f est égal à F/RT . Ainsi, en traçant la courbe de $\ln i_p$ vs $(E_p - E^0)$, il est possible de déterminer k^0 à l'aide de l'ordonnée à l'origine, tandis que la pente est donnée par $-\alpha f$. Lorsque cela devient plus complexe (système à plus d'un électron et plus d'une étape), il devient alors plus difficile de décrire la relation courant-potentiel.⁶

Il existe également le cas d'un système redox quasi-réversible. Ce système implique une réaction où la cinétique de transfert d'électron est limitée. Il faut alors considérer la relation inverse. Ainsi, pour un système à un électron et à une étape, soit $Ox + e^- \xrightleftharpoons[k_b]{k_f} Red$ le courant peut être déterminé comme suit⁷ :

$$i = F A D^{1/2} C^* f^{1/2} v^{1/2} \Psi(E) \quad \text{Éq. 2. 62}$$

où Ψ représente la fonction du courant quasi-réversible qui dépend du potentiel, de α et du paramètre Λ donné par la relation $k^0 / (D f v)^{1/2}$ si $D_O = D_R = D$. Il suffit alors d'isoler k^0 lorsque D_O et D_R sont connus.⁷

La réversibilité d'un couple redox varie non seulement selon la cinétique des réactions électrochimiques impliquées, mais aussi selon d'autres paramètres tels que la

conductivité de la solution ou bien sa résistivité. En effet, plus il sera difficile aux ions de se déplacer dans le milieu électrolytique, plus grande sera la valeur de ΔE_p .⁶ La Figure 2.9 illustre le comportement électrochimique du couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, avec et sans électrolyte support, à deux électrodes de travail, soit platine et carbone vitreux, de surfaces différentes. Les potentiels de pics anodique et cathodique, E_{pa} et E_{pc} , sont affectés ici par deux phénomènes. Premièrement, l'ajout d'un sel support en concentration suffisante permet de réduire la résistance de la solution afin que la chute ohmique soit négligeable.⁶

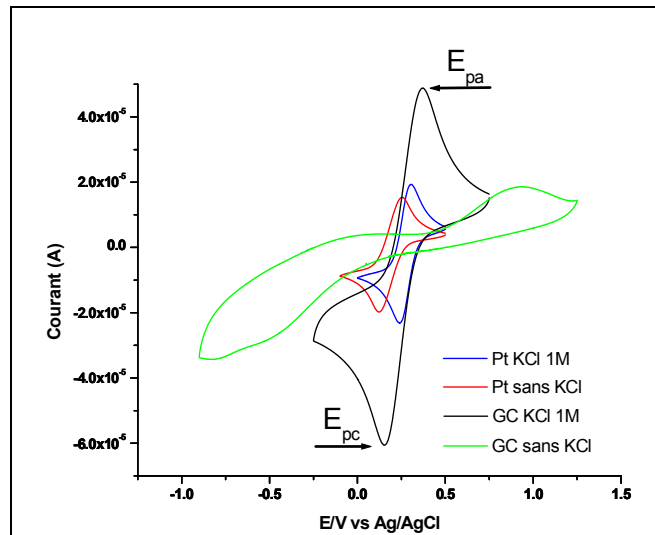


Figure 2. 9 : Effet d'un sel support (KCl 1,0 M) sur la réversibilité du couple rédox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ à 5 mM en milieu aqueux à une vitesse de balayage de 100 mV s^{-1} . Figure tirée de la référence 6.

Tableau 2. 1 : Paramètres électrochimiques tirés des voltampérogrammes cycliques de la Figure 2.9 pour le système $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ à une électrode de Pt et de GC.⁶

Sel support (mol/L)	J_{pa} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	J_{pc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	J_{pa}/J_{pc}	E_{pa} (V)*	E_{pc} (V)*	ΔE_p (mV)
<u>Électrode de Pt: 0,0249 cm²</u>						
<i>1 M KCl</i>	1247	-1187	1,05	0,306	0,240	66
<i>H₂O</i>	966	-969	1,00	0,254	0,123	131
<u>Électrode de GC: 0,0707 cm²</u>						
<i>1 M KCl</i>	813	-866	0,94	0,371	0,153	218
<i>H₂O</i>	218	-302	0,72	0,935	-0,569	1504

* V vs Ag/AgCl

L'électrolyte support le plus souvent employé dans les systèmes aqueux est le KCl de concentration allant de 0,01 M à 0,1 M (ΔE_p diminue).^{7,54-55} La Figure 2.9 montre clairement que la présence de ce sel améliore la réversibilité du couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ et augmente la valeur des courants de pics anodique et cathodique. De plus, la nature du matériau d'électrode joue évidemment un rôle important sur la réponse faradique observée. Le Tableau 2.1 donne les paramètres électrochimiques tirés des voltampérogrammes cycliques de la Figure 2.9. On note que sans sel support, la réversibilité du couple redox est moins Nernstienne : $\Delta E_p = 59$ mV pour un processus réversible impliquant le transfert d'un électron. De plus, on remarque que le carbone vitreux est moins catalytique que le platine avec des valeurs de ΔE_p plus grandes et des densités de courant anodiques et cathodiques plus petites dans les mêmes conditions.⁶

En résumé, il existe des différences majeures entre un système redox réversible, totalement irréversible et quasi-réversible. Il est possible de caractériser le type de système à l'étude en se basant sur le paramètre Λ , décrit précédemment, et sur la constante de

vitesse hétérogène standard (k^0). Pour un système réversible, $\Lambda \geq 15$ et $k^0 \geq 0,3v^{1/2}$ cm.s⁻¹. Pour un système quasi-réversible, $15 \geq \Lambda \geq 10^{-2(1+\alpha)}$ et $0,3v^{1/2} \geq k^0 \geq 2 \times 10^{-5}v^{1/2}$ cm.s⁻¹. Finalement, pour un système totalement irréversible, $\Lambda \leq 10^{-2(1+\alpha)}$ et $k^0 \leq 2 \times 10^{-5}v^{1/2}$ cm.s⁻¹.

Tout au long de cette thèse, la voltampérométrie cyclique a été employée comme technique de prédilection pour l'étude du comportement électroactif : des monomères étudiés pour la conception de polymères conducteurs, des polymères synthétisés pour la conception des microcapsules conductrices ainsi qu'à l'étude des substrats de la laccase employés comme médiateurs rédox. L'étude de la réversibilité des différents couples rédox (polymères, monomères ou substrats enzymatiques) ainsi que la détermination des différents mécanismes électrochimiques en jeu sont les principaux paramètres investigués.

2.2.2 Électrodes à disque et à anneau-disque tournantes

Il y a plusieurs techniques électrochimiques dans lesquelles l'électrode de travail est en mouvement dans la solution électrolytique. Ces systèmes (électrode à disque tournant, fils tournant, électrodes vibrantes, etc) ou bien ceux où un flux de la solution électrolytique passe à travers une électrode stationnaire (conique, tubulaire, «bubbling electrode», «channel electrodes», etc) sont des méthodes impliquant le transport de masse par convection des espèces en solution. Ces mêmes méthodes sont parfois nommées «hydrodynamiques»; par exemple, une des techniques qui implique la mesure du courant limite est nommée la voltampérométrie en régime stationnaire ou hydrodynamique. Le principal avantage d'une telle technique est que l'état d'équilibre est atteint rapidement et que les mesures de courant ont une précision élevée. De plus, dans cet état d'équilibre, la double-couche électrique ne participe pas à la mesure du courant observé.⁷ Aussi, le taux de

transfert électronique dû au transfert de masse sur la surface d'électrode dans ces méthodes est en général plus grand que dans le cas où seulement la diffusion est en jeu.⁵⁷

Dans le cas d'une «RDE», ou électrode à disque tournant, la solution électrolytique est entraînée dans la rotation près de la surface de l'électrode et, par action de la force centrifuge, se retrouve expulsée vers la périphérie. Il se crée par la suite une aspiration de la solution électrolytique en direction de l'électrode, vers le centre du disque et perpendiculairement à celui-ci, cet écoulement se poursuivant vers la périphérie à l'approche de l'électrode.⁵⁸ Le fonctionnement d'une RDE est schématisé ci-dessous :

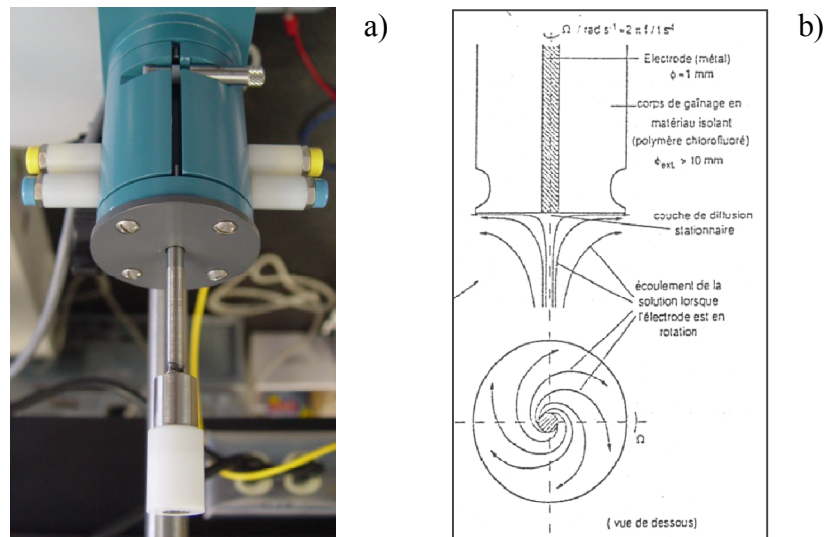


Figure 2. 10 : a) Photo d'une RDE de GC. b) Représentation du fonctionnement d'une RDE. Figure tirée de la référence 58.

L'équation générale pour le flux d'une espèce est décrite par l'équation 2.12. Pour une solution contenant un excès d'électrolyte support, le terme de la migration ionique peut être négligé. Puisque la variation de la concentration d'une espèce est exprimée par l'équation 2.16 et en la combinant à la précédente, l'équation générale de la diffusion-convection est ainsi obtenue :

$$\frac{\partial C_j}{\partial t} = D_j \nabla^2 C_j - \mathbf{v} \cdot \nabla C_j \quad \text{Éq. 2. 63}$$

Le vecteur de la vitesse, \mathbf{v} , d'un fluide près de la surface d'un disque tournant a été obtenu par Karman et Cochran en résolvant les équations hydrodynamiques dans des conditions d'équilibre.⁵⁷ Les traitements les plus simples d'un système convectionnaire-diffusionnel sont basés sur un modèle de couche diffusionnelle. Il est convenu dans ce modèle que la convection du système maintient une concentration de toutes les espèces de façon uniforme et égale à celle que l'on retrouve dans le cœur de la solution (« bulk ») à une certaine distance de l'électrode, δ . Ce modèle, que l'on peut retrouver ci-dessous, est donc appliqué pour une technique telle que la «RDE».

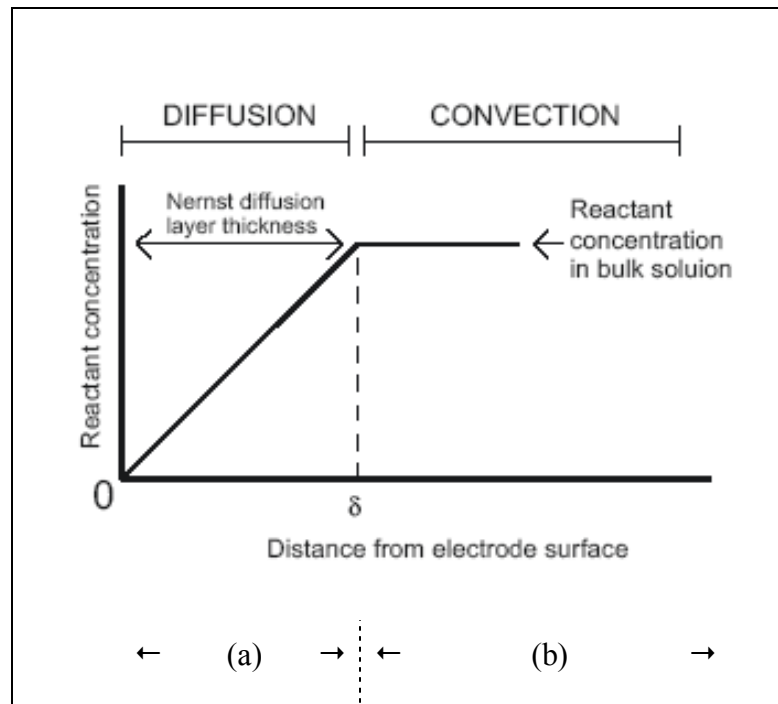


Figure 2. 11 : Représentation du profil du modèle de diffusion de Nernst. Figure tirée de la référence 59.

Selon le modèle de Nernst (GCS) décrit à la Section 2.1.4, l'électrolyte se retrouve dans deux zones distinctes.^{13,59} La première, (a), est près de la surface de l'électrode à une distance maximale de δ de celle-ci où la diffusion est le seul mode de transport des espèces en solution. Dans la deuxième zone, (b), la concentration des toutes les espèces est constante dû à la forte convection du système. Dans ces conditions expérimentales, Levich a déduit une expression reliée à l'épaisseur δ de la première région avec des variables expérimentales telles que le coefficient de diffusion D ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), et la vitesse de rotation de l'électrode ω (vitesse angulaire) :^{7,59}

$$\delta = 1,61 \nu^{1/6} D^{1/3} \omega^{-1/2} \quad \text{Éq. 2. 64}$$

Ainsi, le modèle de Nernst permet une dérivation de façon triviale de la densité de courant à une «RDE» lorsque la réaction à la surface de l'électrode est régit par le transport de masse. Puisque la concentration de l'espèce électro-active est zéro, la densité de courant limite peut alors être exprimée de la façon suivante :^{7,52,59}

$$j_L = nFD \frac{c}{\delta} \quad \text{Éq. 2. 65}$$

Finalement, de ces deux équations, le relation de Levich est obtenue^{5,7,52-53 ; 19,21,134-135}

$$j_L = 0,62 nFD^{2/3} \nu^{-1/6} c \omega^{1/2} \quad \text{Éq. 2. 66}$$

où n est le nombre d'électrons échangés; F , la constante de Faraday ($96485 \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$); ν , la viscosité dynamique ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$); c , la concentration de l'espèce électro-active dans le coeur de la solution ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3}$) et ω , la vitesse angulaire ($\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$). Les voltampérogrammes

représentés à la Figure 2.12 sont obtenus en faisant varier la vitesse de rotation de l'électrode :

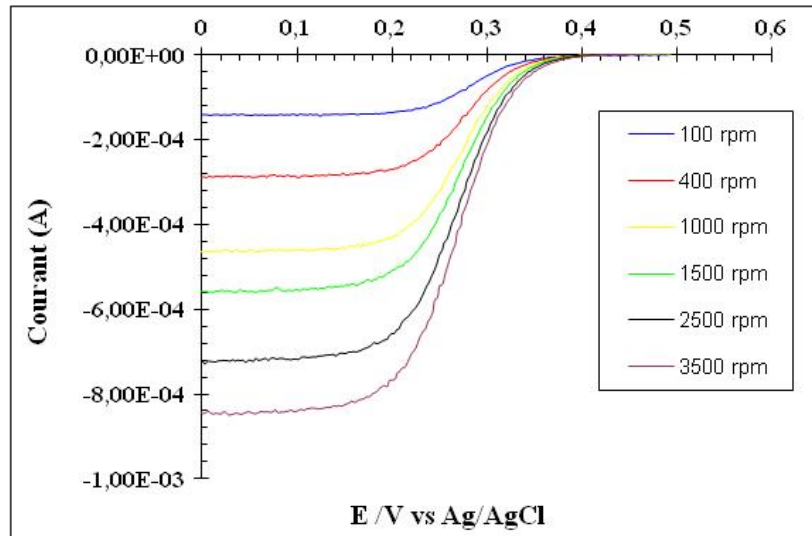


Figure 2. 12 : Exemple d'un voltampérogramme d'une solution de 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ dans 1 M KCl obtenue à une RDE de Pt.

Il existe des systèmes électrochimiques où une ou des espèces intermédiaires sont générées et ne peuvent être détectées avec une RDE selon les conditions expérimentales choisies, par exemple l'étude du mécanisme de réduction de l'oxygène en solution soit en milieu basique ou acide. Il est connu qu'il peut y avoir deux mécanismes possibles : soit la réduction de O_2 directement en H_2O , par un processus global de quatre électrons ou la réduction de O_2 en H_2O_2 pour ensuite être réduit en H_2O , par deux processus consécutifs de deux électrons chacun.⁵⁸ Or, la RRDE ou électrode tournante disque-anneau, permet l'étude de ce genre d'expérience. Ce dispositif, qui a été imaginé par Frumkin et Nekrassov en 1959,⁵⁸ est en fait une double électrode constitué comme une RDE (voir figure ci-dessous) :

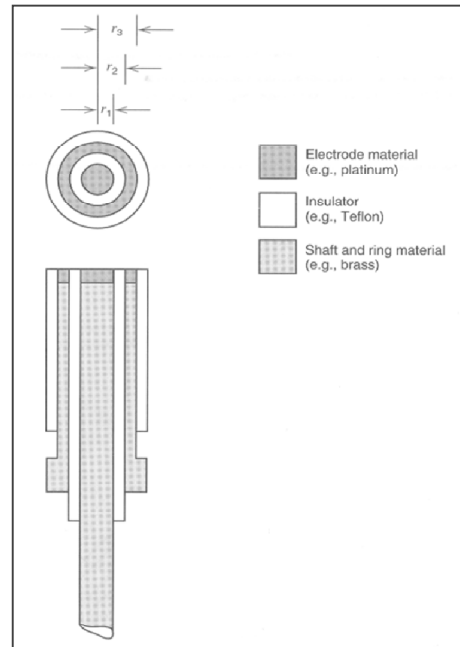


Figure 2. 13 : Schéma technique d'une RRDE. Figure tirée de la référence 7.

La mise en œuvre de ce système conduit à contrôler indépendamment les potentiels au disque, E_D , et à l'anneau, E_A . L'utilisation d'un multipotentiostat est donc nécessaire pour imposer des valeurs de potentiels différentes pour E_A et E_D par rapport à une même électrode de référence et contre-électrode. Il est donc possible d'envisager plusieurs types d'étude pour un système électrochimique donné :

1. E_D et E_A sont tous deux maintenus constants ; E_D est à un potentiel qui permet de produire une réaction et E_A est à une autre valeur qui permet la détection de la dernière réaction. Ce mode sert à l'analyse quantitative d'un processus cinétique.
2. E_D est maintenu fixe, et E_A est balayé sur une plage de potentiel afin d'explorer les différents processus électrochimiques possibles à l'anneau et caractériser les produits formés au disque qui passent au contact de l'anneau.

3. E_A est maintenu fixe, et E_D est balayé sur une plage de potentiel. Ceci permet de déterminer la plage exacte où l'espèce intermédiaire est générée.

Dans chaque expérience, la vitesse de rotation de l'électrode est une variable indépendante. L'augmentation de la vitesse angulaire a pour effet de réduire le temps d'analyse, soit le temps pris par l'analyte généré au disque pour être transporté par convection à l'anneau. La figure ci-dessous démontre ce phénomène.

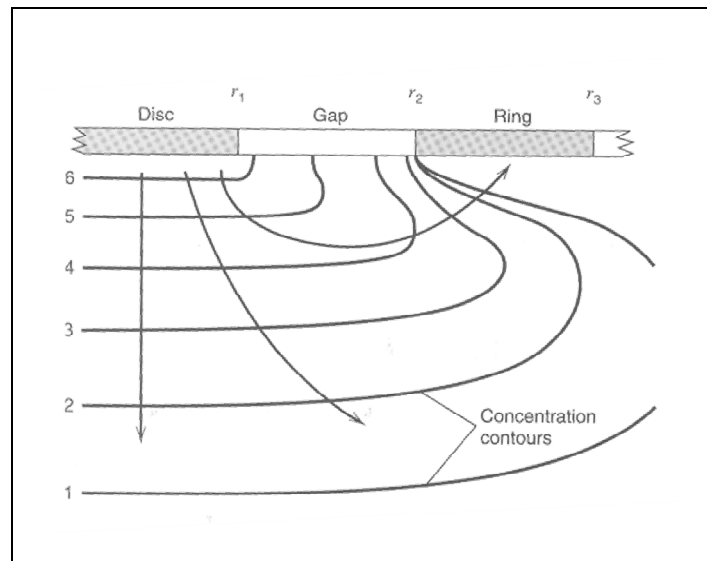


Figure 2. 14 : Schéma représentant le chemin parcouru par convection d'un analyte généré au disque jusqu'à l'anneau d'une RRDE. Figure tirée de la référence 7.

Même si l'espèce générée au disque est totalement stable et libre en solution, seulement une fraction de la quantité générée atteindra l'anneau et sera détectée. Cette situation est démontrée à la Figure 2.14. Il est donc nécessaire de définir un coefficient de collection pour la RRDE. Ceci dernier est simplement la fraction d'une espèce totalement stable et libre en solution qui est générée au disque et détectée à l'anneau. Ce coefficient s'exprime donc de la façon suivante :⁷

$$N = \frac{-i_{\text{anneau}}}{i_{\text{disque}}} \quad \text{Éq. 2. 67}$$

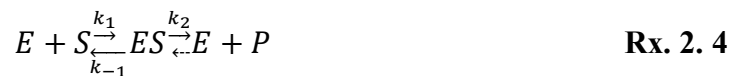
Dans cette thèse, les techniques de la RDE et de la RRDE sont utilisées pour étudier la perméation ainsi que la résistance au transfert de masse des microcapsules envers les substrats enzymatiques choisis.

2.2.3 La détermination de l'activité enzymatique par l'électrode de Clark

L'étude cinétique de réactions catalysées par enzyme permet souvent de mieux comprendre le mode d'action de cette-dernière. Dans les biopiles, une quantité d'enzyme est immobilisée et doit être évaluée afin d'établir l'efficacité de la méthode d'immobilisation et son impact sur l'enzyme elle-même ainsi que sur le dispositif. Pour ce faire, il suffit de comparer le comportement, l'activité et la cinétique enzymatique de l'enzyme libre avec ceux de l'enzyme encapsulée. L'activité enzymatique est une notion fondamentale pour la caractérisation des enzymes, compte tenu du fait qu'elles sont généralement mélangées à d'autres protéines et ne se trouvent pas à l'état pur lors des réactions qu'elles catalysent. De ce fait, il est primordial de trouver une méthode pour repérer leur présence et quantifier les effets qu'elles provoquent. La quantité de matière transformée par unité de temps est proportionnelle au nombre de molécules d'enzymes. Dans une unité de temps donnée et sous des conditions optimales de fonctionnement, on peut considérer que chaque molécule d'enzyme catalyse la transformation du même nombre de molécules de substrat,⁶⁰ ce qui définit l'*unité d'activité enzymatique* (U).

La valeur de U dépend de plusieurs facteurs comme la nature et la concentration du substrat, le pH, la température ainsi que la force ionique.⁶¹ L'activité enzymatique représente donc la quantité d'enzymes réellement actives par rapport à un substrat donné et elle est mesurée par rapport à un substrat de référence, dans des conditions de pH et de température déterminées au préalable. Un autre paramètre de caractérisation d'une enzyme est l'activité spécifique. Elle est une mesure du degré de pureté d'une enzyme et représente l'activité enzymatique par milligramme de protéine totale. Le substrat de référence utilisé pour suivre la réaction enzymatique de la Lcc est l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS). Le radical anionique formé (ABTS^{•-}) suite à l'oxydation enzymatique, à partir d'un sel ABTS²⁻, présente un maximum d'absorption à 420 nm ($\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).⁶² Il est donc possible, grâce à des mesures spectrophotométriques, de calculer l'activité enzymatique de l'enzyme libre en solution.

En se basant sur les résultats obtenus par Victor Henri,⁶⁰ Michaelis et Menten (1913) ont proposé une équation de vitesse représentant le mécanisme d'action des enzymes. Le principe fondamental du fonctionnement des enzymes est la formation du complexe enzyme-substrat (ES) en équilibre avec le substrat libre (S) (Rx. 2.4). Ce mécanisme implique une première étape de fixation de S sur l'enzyme (E) et une seconde étape de conversion de S en produit (P), qui se déroule au sein du complexe ES .⁶⁰ La seconde étape se termine par la libération de P et de E (régénération du catalyseur).



La vitesse totale de la réaction dépend donc de ces deux étapes. De façon générale, la constante k_2 est beaucoup plus faible que k_1 , ce qui veut dire que la transformation en P est l'étape limitante de la réaction. Cette vitesse dépend de plusieurs facteurs comme la concentration de substrat $[S]$, la concentration de l'enzyme $[E]$ ainsi que des conditions expérimentales (température, pH). L'équation de Michaelis-Menten prédit qu'à faible $[S]$,

la vitesse (v) est directement proportionnelle à celle-ci. Par contre, pour $[S]$ suffisamment élevée, v devient alors indépendante de $[S]$ et atteint une limite qu'elle ne peut pas dépasser (V_{max}). À ce moment, E est saturée en S n'ayant plus d'influence sur v et seule $[E]$ influence la vitesse de la réaction enzymatique, pouvant ainsi être exprimée par Éq. 2.68 :

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Éq. 2. 68}$$

La courbe obtenue par Éq. 2.68, présentée à la Figure 2.15, a la forme d'une hyperbole rectangulaire passant par l'origine. La vitesse initiale (v_o) dépend de $[S]$ ainsi que de la constante d'affinité (K_M) entre le substrat et l'enzyme. Dans le cas particulier où $v = V_{max}/2$, on obtient $K_M = [S]$. Ainsi, la valeur de K_M correspond à la concentration en substrat nécessaire pour atteindre la moitié de V_{max} de la réaction.

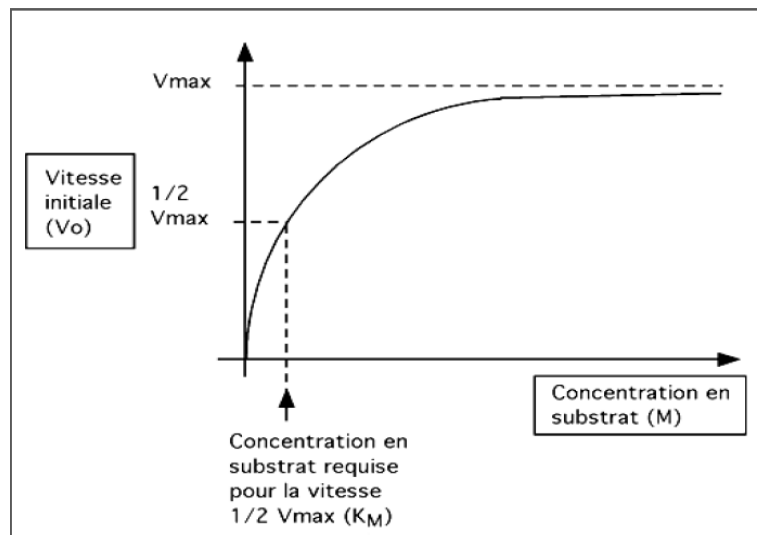
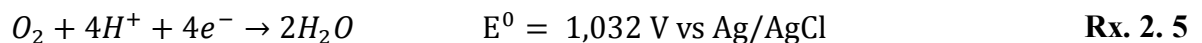


Figure 2. 15 : Exemple d'une courbe de Michaelis-Menten pouvant être exprimée par une fonction hyperbolique. Figure tirée de la référence 63.

Il a été vu plus tôt que l'oxydation enzymatique de l'ABTS mène à la formation d'un radical anionique dont son maximum d'absorption à 420 nm est connu⁶² et qu'il est possible de suivre la vitesse de la réaction enzymatique par spectrophotométrie. Cette méthode présente par contre deux inconvénients majeurs qui peuvent être évités par l'utilisation d'une méthode basée sur la consommation d'oxygène. Un premier inconvénient est la nécessité de déterminer l'absorptivité molaire de la forme oxydée de divers substrats dans différentes conditions expérimentales telles que le milieu tampon ou la température. Le deuxième inconvénient est qu'à des concentrations élevées, l'ABTS subit une réaction de dismutation pouvant entraîner une sous-estimation de l'activité enzymatique en diminuant la $[ABTS^{\cdot-}]$ dans le milieu qui est responsable de l'absorbance à 420 nm. De plus, d'autres travaux ont démontrés que l'utilisation de l'ABTS sous forme de sel d'ammonium ($ABTS^{2-}$) interagit fortement une fois oxydée avec la paroi des microcapsules à base de poly(éthylèneimine) qui sont riches en charges positives.²³ Par surcroît, il sera vu plus loin que l'ABTS ne sera pas le substrat de référence employé pour ce projet.

L'utilisation d'une autre technique analytique est donc nécessaire afin d'éviter les problèmes identifiés ci-dessus. Puisque la Lcc est une enzyme qui réduit l'oxygène, il est possible d'en mesurer l'activité enzymatique en utilisant une électrode de Clark, plus connue sous le nom de cellule à oxygène (Figure 2.16). Cette dernière est constituée d'une membrane en téflon perméable aux gaz permettant ainsi à l'oxygène de se rendre à l'électrode de travail où il est réduit électrochimiquement en eau selon la Rx. 2.5 et ce, suite à l'application d'un potentiel suffisamment négatif (-0,6 V vs. Ag/AgCl) :



Le courant enregistré est proportionnel à la concentration d'oxygène dans la cellule, qui est une mesure directe de la pression partielle de celui-ci dans la solution (loi de Henry). Ainsi donc, il est possible d'étudier électrochimiquement la réaction enzymatique par l'intermédiaire de la consommation d'oxygène selon Éq. 2.69 :

$$i_d = \frac{4FP_mAP_{O_2}}{b} \quad \text{Éq. 2. 69}^{64}$$

où F = constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), P_m = perméabilité du téflon à O_2 ($\text{mol atm}^{-1}\text{s}^{-1}\text{cm}^{-1}$), A = aire de l'électrode (cm^2) P_{O_2} = pression d'oxygène (atm) et b = épaisseur de la membrane de téflon (cm).

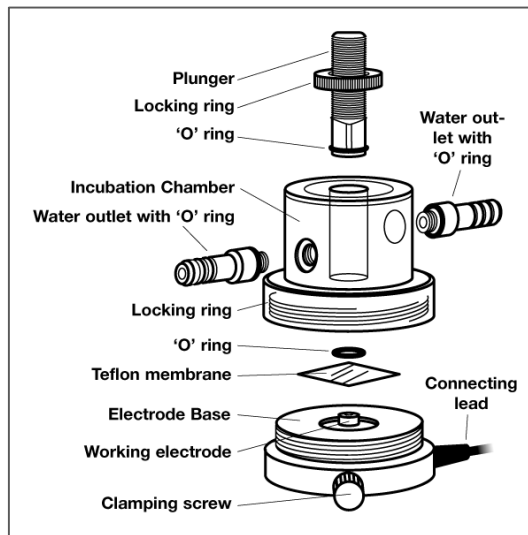


Figure 2. 16 : Schéma de la cellule à oxygène.⁶⁴ La membrane semi-perméable en Téflon sépare la cellule de l'électrode et permet le passage de l'oxygène qui est réduit à l'électrode travail.

Tout au long de cette thèse, l'électrode de Clark a été utilisée pour étudier la l'activité enzymatique de la laccase une fois microencapsulée pour la comparer avec l'enzyme libre en solution.

2.3 Références

1. M. Ciobanu; J. P. Wilburn; M. L. Krim; D. E. Cliffel In Handbook of Electrochemistry; *Fundamentals*; 1st ed.; Zoski, C. G., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **2007**, 1-29.
2. H. R. Rogers; R. J. Rogers; H. L. Mitchell; G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102* (1), 231.
3. J. Heyrovský, *Chem. Listy*, **1922**, *16*, 256.
4. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1959/, consulté le 16 décembre 2011.
5. J. Wang; *Analytical Electrochemistry*; Second ed.; John Wiley & Sons inc.: New York/Chichester/Weinheim/Brisbane/Singapore/Toronto, **2000**, 209 p.
6. M. Hébert, Université du Québec à Montréal, *Étude de nouveaux mélanges électrolytiques à base d'ylures de phosphore ou de phosphine avec leurs sels de phosphonium pour application en pile solaire*, **2007**, 162 p.
7. A. J. Bard; L. R. Faulkner; *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*; 2 ed.; John Wiley & Sons inc.: Hoboken, NJ, **2001**, 833 p.
8. H. L. F. v. Helmholtz, *Ann. Physik*, **1853**, *89*, 211.
9. H. L. F. v. Helmholtz, *Ann. Physik*, **1879**, *7*, 337.
10. G. Gouy, *J. Phys. Radium*, **1910**, *9*, 457.

11. G. Gouy, *Compt. Rend.*, **1910**, 149, 654.
12. D. L. Chapman, *Philos. Mag.*, **1913**, 25, 475.
13. O. Stern, *Z. Elektrochem.*, **1924**, 30, 508.
14. D. Correia-Ledo, Concordia University, *Design and Scanning Electrochemical Microscopy Transport Study of Immobilized Liposome: Towards the Investigation of a Membrane Bound Electroactive Reaction*, **2010**, 133 p.
15. P. W. Atkins; *CHIMIE PHYSIQUE*; Traduction française de la 6 ed.; DeBoeck Université: Paris, Bruxelles, **2000**, 1015 p.
16. Southampton_Electrochemistry_Group; *Instrumental Methods in Electrochemistry*; John Wiley & Sons, Inc: Chichester, England, **1985**, 445 p.
17. M. Pourbaix; *Atlas d'équilibres électrochimiques à 25°C*; Gauthier-Villars: Paris, **1963**, 644 p.
18. J. A. V. Butler, *Trans. Faraday. Soc.*, **1924**, 19 (729), 734.
19. T. Erdey-Grúz; M. Volmer, *Z. Physik. Chem.*, **1930**, 150A, 203.
20. M. Cooke, Université de Montréal, *The Synthesis and Characterization of Rh₂(II,II) Templated Photoactive Assemblies*, **2007**, 252 p.
21. D. C. Ledo; A. A. Arnold; J. Mauzeroll, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 15120.
22. J. H. Thomas; J. M. Drake; J. R. Paddock; S. Conklin; J. Johnson; C. J. Seliskar; H. B. Halsall; W. R. Heinemana, *Electroanalysis*, **2004**, 16 (7), 547.

23. D. Rochefort; L. Kouisni; K. Gendron, *J. Electroanal. Chem.*, **2008**, 617, 53.
24. J. Fei; A. Basu; F. Xue; G. T. R. Palmore, *Org. Lett.*, **2006**, 8 (1), 3.
25. M. Jonsson; J. Lind; T. E. Eriksen; G. Merényi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 1423.
26. L. Mayrand-Provencher; D. Rochefort, *Journal of Physical Chemistry C*, **2009**, 113, 1632.
27. L. Mayrand-Provencher; D. Rochefort, *Electrochim. Acta*, **2009**, 54, 7422.
28. L. Mayrand-Provencher; S. Lin; D. Lazzerini; D. Rochefort, *J. Power Sources*, **2010**, 195, 5114.
29. L. Mayrand-Provencher, Université de Montréal, *Étude des propriétés de liquides ioniques protiques en tant qu'électrolytes pour des supercapacités à base de dioxyde de ruthénium*, **2010**, 131 p.
30. R. J. Wattman; J. Bargon; A. F. Diaz, *J. Phys. Chem.*, **1983**, 87, 1459.
31. R. J. Waltman; J. Bargon, *Can. J. Chem.*, **1986**, 64, 76.
32. S. M. S.-M. Park, *Synth. Met.*, **1995**, 69, 311.
33. X.-G. Li; M.-R. Huang; W. Duan; Y.-L. Yang, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 2925.
34. G. Inzelt, *J Solid State Electrochem*, **2003**, 7, 503.
35. M. Skompska; M. J. Chmielewski; A. Tarajko, *Electrochem. Commun.*, **2007**, 9, 540.

36. A. Tarajko; H. Cybulski; M. J. Chmielewski; J. Bukowska; M. Skompska, *Electrochim. Acta*, **2009**, 54, 4743.
37. J. Forgie, University of Strathclyde, *The Study of Organic Semiconductors Towards Device Applications*, **2010**, 287 p.
38. L. D. S. L. Jr.; B. J. V. Tongol; S.-L. Yau, *Langmuir*, **2010**, 26 (13), 10771.
39. S. Dufresne, Université de Montréal, *Synthèse de nouveaux matériaux conducteurs comportant des unités aromatiques conjuguées et analyse de leurs propriétés physico-chimiques*, **2010**, 423 p.
40. D. Rochefort; D. Leech; R. Bourbonnais, *Green Chem.*, **2004**, 6, 14.
41. P. T. Kissinger; W. R. Heinemen, *J. Chem. Edu.*, **1983**, 60 (9), 702.
42. G. A. Mabbott, *J. Chem. Edu.*, **1983**, 60 (9), 697.
43. D. Leech; K. O. Feerick, *Electroanalysis*, **2000**, 12 (16), 1339.
44. Christine Mousty; Laetitia Vieille; S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, 22 (8), 1733.
45. L. A. Matheson; N. Nichols, *Trans. Electrochem. Soc.*, **1938**, 73, 193.
46. J. E. B. Randles, *Trans. Faraday. Soc.*, **1948**, 44, 327.
47. A. Sevcik, *Collection Ctechoslov. Chem. Communs.*, **1948**, 13, 349.
48. P. Delahay, *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 1190.

49. H. Matsuda; Y. Ayabe, *Ibid.*, **1955**, 59, 494.
50. R. S. Nicholson; I. Shain, *Anal. Chem.*, **1964**, 36, 706.
51. T. J. Smith; K. J. Stevenson In Handbook of Electrochemistry; *Reference Electrodes*; 1st ed.; Zoski, C. G., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **2007**, 73-110.
52. G. Denuault; M. Sosna; K.-J. Williams In Handbook of Electrochemistry; *Classical Experiments*; 1st ed.; Zoski, C. G., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **2007**, 431-469.
53. J. E. Baur In Handbook of Electrochemistry; *Diffusion Coefficients*; 1st ed.; Zoski, C. G., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **2007**, 829-848.
54. R. Pointeau; J. Bonastre; *Éléments de polarographie*; Paris ed., **1970**, 396 p.
55. PRINCETON APPLIED RESEARCH, Applied Instruments Group, *APPLICATION NOTE P-2 BASICS OF VOLTAMMETRY AND POLAROGRAPHY*, 1-12 p.
56. M. V. Mirkin In Handbook of Electrochemistry; *Determination of Electrode Kinetics*; 1st ed.; Zoski, C. G., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **2007**, 639-660.
57. V. G. Levich; *Physicochemical Hydrodynamics*; Prentice-Hall: Englewood Cliffs, N.J., **1962**, 700 p.
58. B. Trémillon; *Électrochimie analytique et réactions en solution*; Masson: Paris, **1993**; Vol. 2, 518 p.
59. J. Nikolic; E. Expósito; J. Iniesta; J. González-García; V. Montiel, *J. Chem. Edu.*, **2000**, 77 (9), 1191.

60. H. R. Horton; L. A. Moran; R. S. Ochs; J. D. Rawn; K. G. Scrimgeour; *Principes de Biochimie*; 1st ed.; De Boeck-Wesmael Press: Bruxelles, **1994**, 720 p.
61. A. Cornish-Bowden; M. Jamin; V. Saks In *Cinétique enzymatique*; EDP Sciences: Grenoble, **2005**, 462.
62. R. Bourbonnais; M. G. Paice; I. D. Reid; P. Lanthier; M. Yaguchi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1995**, *61*, 1876.
63. G. Gusetu, Université de Montréal, *Développement d'un microréacteur à base d'enzyme microencapsulée en vue d'un couplage en ligne à un système d'électrophorèse capillaire*, **2010**, 126 p.
64. <http://www.rankbrothers.co.uk/prod2.htm>, consulté le le 3 août 2011.

3 ELECTRODE PASSIVATION BY REACTION PRODUCTS OF THE ELECTROCHEMICAL AND ENZYMATIC OXIDATION OF *p*-PHENYLENEDIAMINE

Mathieu Hébert et Dominic Rochefort, *Electrochimica Acta*, **53**(16), 5272-5279 (2008).

Un article complémentaire à celui-ci est présenté en Annexe 1. Il a été publié dans le *ECS Transactions* dans le cadre d'une conférence présentée au 214th Meeting of ECS (PRIME) à Honolulu (Hawaii) en 2008.

Mathieu Hébert, et Dominic Rochefort, *ECS Transactions*, **16**(11), 85-97 (2008).

3.1 Abstract

The electrochemical and enzymatic oxidation of *p*-phenylenediamine (PPD) was studied under various conditions to evaluate its reversibility and stability when used as a laccase redox mediator. In accordance with published results, PPD oxidation during cyclic voltammetry showed that a passivation occurred with cycling in static systems without

laccase. Such passivation was observed both in McIlvaine and acetate buffers on glassy carbon and platinum electrodes. Our results suggest that the oxidised form of PPD reacts with other PPD molecules in their reduced state to form a polymer on the surface of the electrode. When laccase is present in solution, PPD is only found in its oxidised state and another behaviour is observed at the electrode, with the appearance of a redox couple with an E' centered at about -25 mV vs. Ag/AgCl in 0.1 M acetate buffer. These redox waves are attributed to the formation of soluble PPD oligomers. RRDE experiments showed no passivation, meaning that in order to form a film, the reaction products from the first oxidation of PPD must be further oxidised in a slow, homogeneous reaction. Results from these experiments have a significant importance in the design of efficient enzyme-modified electrodes since PPD diffusion in the thick polymer layers used to immobilise enzymes is a much slower process than in free solution, which allows enough time for the oxidation products to further react at the electrode and to polymerise on its surface. Passivation can therefore be observed with modified electrodes, even under hydrodynamic conditions, while similar conditions will provide a reversible system on bare electrodes. An example of this consequence of the reactivity of PPD oxidation products on the mediator's reversibility is given through experiments with a modified glassy carbon RDE functionalised with a thick layer of poly(ethyleneimine) microcapsules. In such case, the cyclic voltammograms showed that the oxidation and reduction processes are broader than at a bare electrode and that higher scan rates or rotation rates must be used to avoid passivation.

3.2 Introduction

Para-phenylenediamine (PPD) is an aromatic molecule mainly used in polymer, textile and hair dye industries. In the hands of electrochemists, PPD is also used as a monomer than can be chemically or electrochemically polymerised into conductive or non-conductive polymers, depending on the conditions used during polymerisation.¹⁻² PPD is also reported as a redox mediator to shuttle electrons between oxidase enzymes and an electrode. Laccases for instance oxidise PPD to its radical cation, which can be reduced back at the electrode under certain conditions. Laccases are blue colored multicopper oxidoreductases widely distributed in plant and fungal species.³⁻⁶ They attracted particular attention a while ago because of the wide variety of substrates that can be oxidised (phenols, anilines, benzenethiols, phenothiazinines) with the concomitant reduction of O₂ into water via a four electron reduction process.⁷⁻⁹ For over two decades, extensive research on laccases has been done in the fields of bio-fuel cells¹⁰⁻¹² and biosensors.^{7-8,13} As an essential step towards bio-fuel cell and biosensor development, many immobilization methods have been developed to modify electrodes with laccase: (i) adsorption on electrode surface, (ii) enzyme entrapment in a matrix of gel or paste or polymer, (iii) enzyme cross-linking, (iv) covalent attachment with a mediator covalently linked at the surface of glassy carbon, gold or platinum electrodes and (v) microencapsulation.¹⁴ The last technique can be divided in three main methods: (a) layer-by-layer (LbL) self-assembly technique using polyelectrolytes¹⁵⁻¹⁶ (b) ionic cross-linking of alginate or alginate/chitosan mixtures¹⁷⁻²⁰ and (c) interfacial condensation or polymerisation.²¹⁻²³ An advantage of microencapsulation lies in its ability to immobilise high amounts of enzyme.

In a recent manuscript, our group reported the behaviour of microencapsulated laccase in presence of the substrate *p*-phenylenediamine (PPD) and its use as an electron mediator.²⁴ The microcapsules consisted of a cross-linked poly(ethyleneimine) (PEI) wall generated from an emulsion of an aqueous phase containing both laccase and PEI, and of an

organic phase containing a cross-linking agent. When deposited on the surface of a glassy carbon electrode, the microcapsules immobilised laccase and a rapid electron transfer was established with the electrode by PPD. In this case PPD was chosen over 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) acid (ABTS), the most commonly used substrate for laccase, because the amine-rich poly(ethyleneimine) composing the walls of the microcapsules bears a positive charge in the buffer solutions needed to sustain enzyme activity. The dianion ABTS was found to have strong interactions with the capsule walls and was therefore unable to mediate electrons efficiently.

The chemical, electrochemical and enzymatic oxidation of para-, meta- and ortho-phenylenediamines are well described in the literature and give rise to the formation of a broad range of products (dimers, trimers and polymers either conductive or not), the nature of which strongly depends on the conditions used during the experiments. Some contradicting results were also found and we could not determine what type of species would be formed in complex systems where laccase is present in solution and when the laccase-PPD reaction products are further oxidised electrochemically under hydrodynamic conditions. We shall begin by pointing out some of the known facts about PPD oxidation. The oxidation of PPD to a radical cation in aqueous and buffered media via a one electron process to $\text{PPD}^{\bullet+}$ that have been found to be irreversible.²⁵⁻²⁶ Oppositely, in non-aqueous solutions, Yao *et al.*²⁷ observed two voltammetric waves on platinum in acetonitrile at a sweep rate of 200 mVs^{-1} that corresponds to two successive one-electron reversible processes leading to diimine formation. More recently, Quan *et al.*⁸ obtained, for a 1 mM PPD in a McIlvaine buffer solution at a pH of 6, a reversible process where the $E^{0'}$ vs. Ag/AgCl was 210 mV at $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$. In contrast to this reversible behaviour, Xu and Chen²⁸ showed that a poly-PPD film is obtained by cyclic voltammetry in a potential range of -0.2 to 0.6 V vs. SCE at 50 mVs^{-1} on platinum, gold and glassy carbon microelectrodes. The oxidation current of PPD dropped rapidly with successive sweeps upon the quick formation of a non-conductive film at the electrode surface (irreversible oxidation

process).²⁸ Lately, Palys *et al.*²⁹ studied the behaviour of the laccase entrapped in a matrix of poly-*o*-phenylenediamine (POPDA) generated from PPD oxidation on a glassy carbon electrode. In this case, the polymerisation was used to form a conductive film and the POPDA obtained revealed a unique ability to serve as a redox mediator for laccase and immobilising matrix at the same time.²⁹

It appears that electrode passivation occurs in some conditions via the formation of a polymer film on the surface of the electrode. Such passivation is not observed in cases when PPD is used as a redox mediator with oxidase enzymes.^{8,24,27-28} The reversible behaviour of PPD could be either due to different oxidation mechanisms occurring in the presence of enzymes, to the use of different reaction conditions, or to its fast reduction at the electrode. The aim of this work is to determine the conditions influencing the reversibility and stability of PPD and to study its oxidation on the surface of an electrode in aqueous buffered media. We will investigate electrode passivation by PPD oxidation under static and hydrodynamic conditions by comparing the results obtained by a static electrode versus a rotating disk electrode (RDE). Finally, the diffusion of PPD through a layer of microcapsules made from poly(ethyleneimine) will be studied to demonstrate that a slow diffusion of PPD oxidation products favours their subsequent reaction at the electrode surface and therefore promotes passivation.

3.3 Experimental Section

3.3.1 Materials

Polyethyleneimine (PEI, $M_n = 1200 \text{ gmol}^{-1}$; 50% in water), sebacoyl chloride (SC), cyclohexane, Span[®] 80, and *p*-phenylenediamine (PPD) were purchased from Sigma-

Aldrich. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) diammonium salt (ABTS) was purchased from Boehringer Mannheim. All salts used for buffer preparation were from A&C American Chemicals Ltd. McIlvaine buffer solutions were prepared as indicated in the literature.³⁰ Deionised water (18M Ω .cm) from a MilliQ water purification system was used for all solutions. The redox mediator K₄Mo(CN)₈ has been synthesised accordingly to a published procedure.³¹ Laccase II (E.C. 1.10.3.2) from *Trametes Versicolor* was produced and partially purified by ion-exchange chromatography on DEAE-Bio-Gel as described previously.³²

3.3.2 Apparatus and methods

PEI microcapsules were prepared from a procedure published by Poncelet et al.²³ In short, an aqueous phase consisting of PEI (1 mL 50% w/w in water) and milliQ water (8.1 mL) was emulsified by mechanical agitation in an organic phase of cyclohexane containing Span[®] 80 as a surfactant. Sebacyl chloride, dissolved in cyclohexane, was added to the emulsion and allowed to react for 10 min. An additional volume of cyclohexane was added to gradually stop the reaction. The suspension was then allowed to settle before discarding the supernatant. The microcapsules were rinsed with 50 mL of cyclohexane followed by 300 mL of water, recuperated by filtration and washed with three additional volumes of water. For the adsorption procedure, the microcapsules synthesised were suspended in 95% EtOH solution at 5°C before deposition on the electrode surface. A high concentration of microcapsule suspension was taken with a Pasteur pipette and let decanted for a minute. A drop of this suspension was then deposited on the RDE at a rotating speed of 40 rpm to allow formation of a uniform layer of microcapsules. Laccase enzymatic activity was measured by oxygen consumption in the presence of a substrate (ABTS or PPD) with an oxygen electrode apparatus (Rank Brothers Ltd.). The water jacketed oxygen cell was

thermostated to 27°C using a circulating bath. In this instrument, the O₂ concentration in the cell is measured by the current generated by the reduction of O₂ at a Pt electrode poised at a potential of -0.6V vs. Ag/AgCl. The working and reference electrodes are isolated from the solution by a gas-permeable membrane. The cell was calibrated before each experiment by saturating the buffer solution (acetate or McIlvaine) containing the enzyme with oxygen ([O₂] = 7.95 mgL⁻¹ at 27°C). Laccase activity is expressed in units (U), where 1U equals the necessary amount of enzyme to form 1 μmol of ABTS^{•-} or PPD^{•+} per minute. The electrochemical measurements were performed at room temperature in a homemade heart-shaped electrochemical cell using a Parstat 2273 potentiostat of Princeton Applied Research with the acquisition software Powersuite version 2.58. Solutions (3 mL) were all degassed with nitrogen for 5 min before running experiments. A Pt electrode (Bioanalytical Systems; 0.0249 cm²) or a GC electrode (BAS; 0.0707 cm²) and a Pt spiral were used as working and auxiliary electrodes, respectively. Experiments performed in hydrodynamic systems at room temperature used an AFCBP-1 bipotentiostat model (Pine Instruments), a rotator (Pine Instrument) and PineChem 2.8.0f acquisition software. Solutions (100 mL) studied under these conditions were all degassed with nitrogen for 15 min before initiating the run. A GC-RDE ($r_{\text{disk}} = 2.5$ mm, Pine instrument) or a GC-Pt RRDE ($r_{\text{disk}} = 2.5$ mm; $r_{\text{inner ring}} = 3.25$ mm, $r_{\text{outer ring}} = 3.75$ mm, Pine Instrument) and a Pt gauze (Aldrich) were used as working (RDE and RRDE) and auxiliary electrodes. In both types of experiment an Ag/AgCl (BAS; 3M NaCl) was used as the reference electrode. In the experiments with the GC-RDE modified by a layer of microcapsules, the electrode was soaked in the buffer solution for a period of 30 min at a rotation speed of 40 rpm before being used. In the case of the experiments with laccase, the solutions (3 mL) were saturated with air at room temperature for 10 min. Prior to all electrochemical measurements, the working electrodes were polished with a homemade polisher equipped with a rotating plate with nylon cloth (Buelher, 8×0 Nylon Cloth PSA). Diamond (1 micron particles, Buelher, Metad II) and alumina (0.05 micron Buelher, Gamma) pastes were used for polishing the electrode. The

electrodes were then immersed in EtOH 95% solution and sonicated for 10 min. The auxiliary electrodes were cleaned using a hot flame for a few seconds.

3.4 Results and Discussion

3.4.1 Laccase activity measurements by oxygen consumption

A popular method to determine the enzymatic activity is to follow the reaction of the enzyme with its substrate spectrophotometrically. In the case of laccase, its activity can be monitored by the oxidation of ABTS^{2-} to $\text{ABTS}^{\bullet-}$ at $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$ ($\epsilon_{420} = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$).³² This method shows two main disadvantages that can be avoided by the use of a method based on oxygen consumption. A first drawback is the need to determine the molar absorptivity of the oxidised form of various substrates in different conditions (buffers). The second one is the formation of reaction intermediates and unstable reaction products. At elevated ABTS concentrations for instance, a disproportionation reaction can result in an underestimation of the laccase activity by decreasing the $\text{ABTS}^{\bullet-}$ concentration which is responsible for the absorbance at 420 nm. Activity measurements by an oxygen cell are therefore more appropriate with substrates that present such complex reactions. Figure 3.1 shows an optimum activity of the laccase at pH 4.5 with a value of $(3500 \pm 100) \text{ U/mL}$. The activity at pH 4.5 is similar to that at pH 4.25, but the incertitude on the first one is lower. This value has then been taken for all subsequent measurements of laccase activity with ABTS.

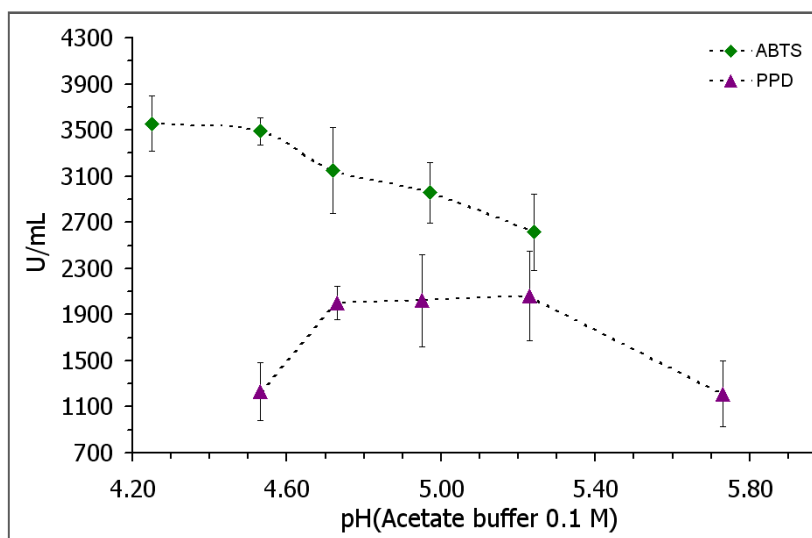


Figure 3. 1 : Determination of the optimum enzymatic activity of Lcc with 1 mM ABTS (diamonds) or 1.6 mM PPD (triangles) in 0.1 M acetate buffer. The errors bars represent the incertitude calculated on 3 experiments with a $t_{95} = 4.3$.

The Michaelis-Menten curve was then traced by measuring the initial oxidation rate of ABTS by laccase, using the O_2 consumption method, over a wide range of substrate concentrations. The curve, presented in Figure 3.2, shows the plateau indicative of a saturating substrate concentration when ABTS is present above 0.6 mM. An important parameter of such curve is the Michaelis constant (K_M) that can be calculated with the following Eq. 3.1.

$$\%O_2/s = v_0 = \frac{V_{MAX}[ABTS]}{(K_M + [ABTS])} \quad \text{Eq. 3. 1}$$

The Michaelis-Menten curve was fitted to a hyperbola function where V_{max} is the asymptote of the curve (the value of $\%O_2/s$ at infinite value of $[ABTS]$) and K_M is the value of concentration corresponding of $V_{max}/2$.³³ A K_M of 127 μM was calculated in acetate buffer

0.1 M. Establishing a reliable comparison between K_M obtained by other authors, is a very delicate task due to the variations in conditions and on the wide variety of laccase fungal sources reported. Nevertheless, our value of 127 μM falls in the range of others who published K_M between 25 and 177 μM for *Trametes*' laccases with ABTS.³⁴⁻³⁶

We previously showed that the amine-rich PEI of the microcapsule's walls interacts strongly with the dianionic ABTS because the polymer bears a positive charge in the buffer solution.²⁴ To avoid such interactions and promote the electron transfer between an encapsulated enzyme and an electrode, mediators that are either neutral or slightly positive in their reduced state must be used. *p*-phenylenediamine (PPD) is chosen as a substrate for laccase precisely for this reason. It is also known that the optimum activity for the laccase with PPD in McIlvaine buffer is found somewhere between 5.0 and 5.25.^{8,24} A comparison between laccase oxidation of PPD and ABTS is then necessary and was done in the acetate buffer. The Figure 3.1 shows an optimum activity of the laccase with PPD at pH 4.7 with a value of (2000 \pm 100) U/mL. The maximum laccase activity obtained with PPD is only 57% of what was measured with ABTS (3500 U/mL). This difference in the maximal activity is reflected in the Michaelis-Menten curve for laccase-catalysed PPD oxidation where the V_{max} value for ABTS is higher (Figure 3.2). A K_M of 645 μM was calculated for PPD, a value much higher than that obtained for ABTS, indicating the lower affinity of laccase for PPD than for ABTS. Our value agrees with the K_M values for the PPD oxidation by free laccase from different sources that were found between 0.1 and 5 mM in the literature.³⁷⁻³⁹ Despite this lower affinity, PPD remains a useful laccase substrate for bioelectrocatalytic systems. However, its reaction with laccase is much less understood than that of ABTS and several authors reported different behaviour for the enzymatic and electrochemical oxidation of PPD.

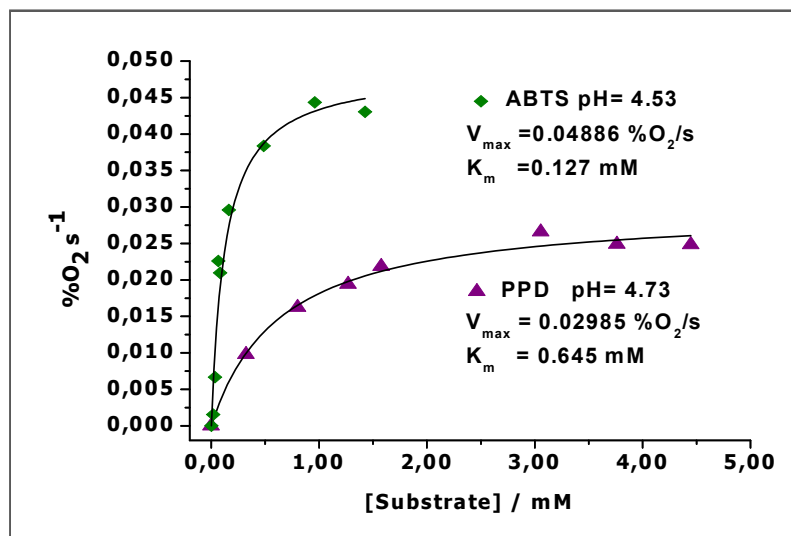


Figure 3. 2 : Determination of the Michaelis-Menten curves for the Lcc with ABTS (diamond) or PPD (triangles) using the oxygen cell method in 0.1 M acetate buffer, pH = 4.5.

3.4.2 Study of PPD in acetate and McIlvaine buffer by voltammetric experiments

In Figure 3.1 we presented the activity dependence on pH observed for laccase with the two mediators ABTS and PPD from the oxygen cell-based method. The tendencies noted in this figure are in agreement with the current knowledge of the reaction between laccase and redox substrates. It is known that the redox potential of ABTS shows little dependence on pH, while PPD and *p*-aminophenol (PAP) see their E^0 changing by about 60 mV per pH unit.⁸ The variation of oxidation and reduction peak potentials is also shown in this study by the data listed in Table 3.1. This influence of pH on the substrates' E^0 has an impact on their oxidation by laccase since the reaction rate is governed in part by the

potential difference between the enzyme's active site and that of the substrate. The linear activity decrease with pH observed with ABTS is typical of a substrate with a pH-independent E^0 . In this case, the activity decrease is caused by the gradual concentration increase of hydroxyl ions in the solution which inhibits the laccase O_2 reduction reaction site. Generally, the bell-shaped curve obtained for PPD oxidation catalysed by laccase is ascribed to the combination of the two effects just discussed. The bell-shaped curve explanation is usually based on the assumption of a reversible redox mechanism of the mediator. The cyclic voltammograms of Figure 3.3 for a PPD solution, obtained at various pH and from which the data in Table 3.1 were measured, show that under the conditions used here PPD oxidation does not appear as reversible. Table 3.1 shows that all ΔE_p calculated are well over the $59 \text{ mV}/n$ Nernstian's reversibility, where $n=2$.

Table 3. 1 : Peak potential parameters determined from cyclic voltammograms in Figure 3.3 for 5 mM PPD solutions at different pH (see caption for others conditions).

Buffer	pH	E_{pa}/mV	E_{pc}/mV	$\Delta E_p/\text{mV}$
0.1 M acetate	4.3	392	270	122
	4.5	380	242	138
	4.7	372	230	142
	5.0	348	217	131
	5.2	326	200	126

In addition, the different values of anodic and cathodic currents in the CVs of Figure 3.3 also demonstrate that the oxidation cannot be classified as reversible. We therefore undertook a series of experiments to determine how the mechanisms of PPD oxidation can be affected by the conditions used in the experiments.

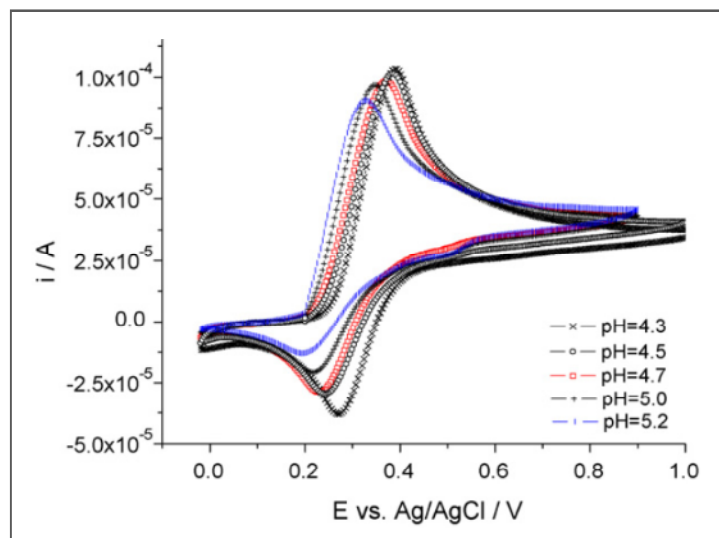


Figure 3.3 : CVs (first cycles) of a 5 mM PPD solution in 0.1 M acetate buffer GC, using $\nu = 40 \text{ mVs}^{-1}$ and various pH values.

Successive potential cycles in a 5 mM PPD solution at pH 4.5 suggest a passivation of the electrode since we observed not only an increase in ΔE_p but a significant diminution of the anodic current (Figure 3.4A). As noted in Figure 3.4A, the last of five cycles recorded at a scan rate of 40 mV/s shows no distinguishable oxidation or reduction peaks. This observation rules out the possibility of a simple instability of the oxidised form of PPD that could have been used to explain the small cathodic currents in Figure 3.3. We therefore hypothesise the formation of a film from a secondary reaction of the diimine species electrochemically generated by PPD oxidation. To confirm this passivation by a film formation which blocks the electrode, we deliberately passivated the electrode by cycling the GC electrode in the PPD solution. The electrode was then removed, rinsed and immersed in the same PPD solution where $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ was added as a reversible redox probe. As it would be expected from an electrode that is blocked with a sufficiently thick, insulating film, no redox waves appeared on the CV (Figure 3.4B) for the $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ which has an E' of 543 mV vs. the Ag/AgCl reference. The GC electrode was then

removed, polished to get rid to the film and replaced in the same solution of PPD and octacyanomolybdate. The CV curves of Figure 3.4B clearly shows redox processes for the two species PPD and $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ for a clean electrode. Sweeping the potential for several cycles resulted in electrode passivation and the redox process attributed to PPD and $\text{Mo}(\text{CN})_8^{4-}$ disappeared. We also observed a passivation with a platinum working electrode instead of GC in same conditions (results not shown).

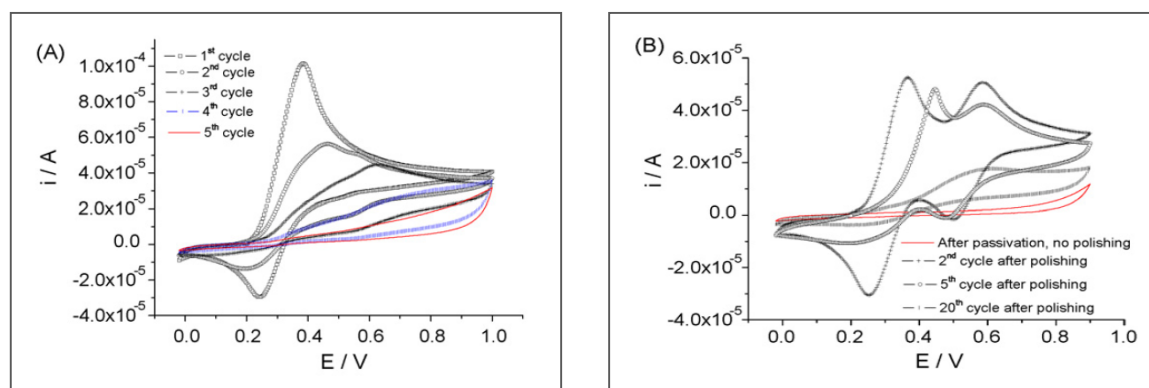


Figure 3. 4 : CVs (first cycles) of a 5 mM PPD solution in 0.1 M acetate buffer GC, using $v = 40 \text{ mVs}^{-1}$ and various pH values.

In an attempt to determine which parameters affect the mechanisms involved in the film formation upon *p*-phenylenediamine oxidation, we varied PPD concentration, pH and scan rate. In Figure 3.5A we show that the electrode passivation is obtained much faster at a pH of 6.2 (McIlvaine buffer) than in the acetate buffer solution with a lower pH, even if the voltammograms were recorded at the same scan rate. The pH values have been chosen to allow a comparison with the experiments reported in the literature.⁸ We were consistently unable to observe any reduction peak even on the first cycle and the presence of several oxidation peaks at about 400 and 500 mV indicates that a complex mechanism is involved in the film formation. The second scan shows appreciable oxidation currents which could only be due to diffusion of PPD from the bulk of the solution to electrode surface that, at

this point, must not be completely covered by a film. Subsequent cycles showed strong electrode passivation. A similar behaviour was reported by Xu and Chen²⁸ who showed that at 50 mVs^{-1} on Pt microdisk electrode, a poly-PPD film is obtained by cycling between -200 mV and 600 mV vs. SCE. They also observed a completely irreversible oxidation process from the first cycle in a phosphate buffer at pH 7.0 for 0.1 M of PPD. In our case, passivation is achieved less quickly probably because of lower PPD concentration (5 mM vs. 0.1 M). When further decreasing the concentration to 1 mM (Figure 3.5B), the reduction peak at 200 mV that was also seen at lower pH appears and the passivation is even more delayed.

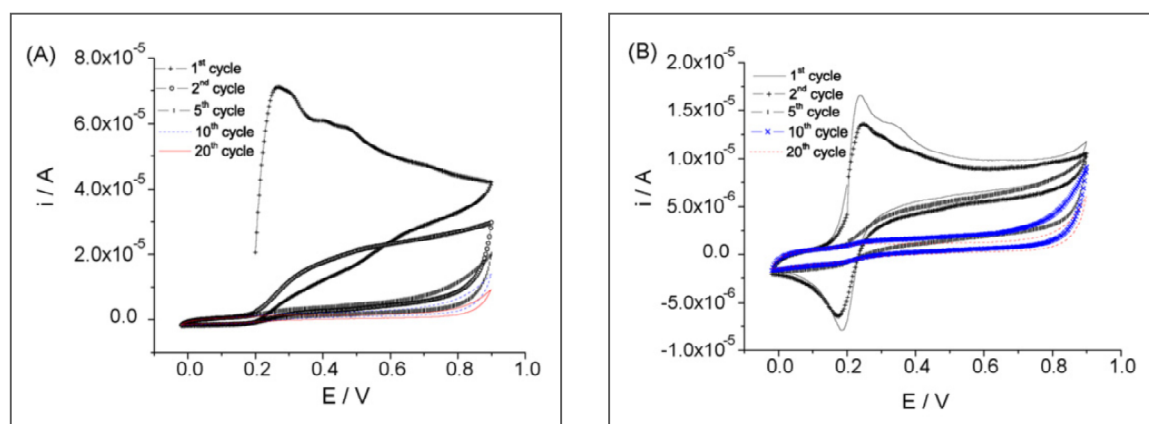


Figure 3. 5 : GC electrode passivation in 0.1M McIlvaine buffer pH 6.2 upon potential cycling at $v = 40 \text{ mVs}^{-1}$. PPD concentration was 5 mM (A) and 1 mM (B).

Table 3.2 shows the thermodynamic parameters determined for the PPD 1.00 mM in acetate and McIlvaine buffers with Pt and GC electrodes. It is shown that all $E_{p,a}$ and $E_{p,c}$ process have similar values in the same buffer, that the ΔE_p is still above the $59 \text{ mV}/n$ value for Nernstian's reversibility (recall that $n = 2$), and that the ΔE_p values are much smaller than in the 5 mM PPD solutions. These observations strongly suggest that the oxidised form of PPD, the diimine, reacts with PPD and polymerises on the surface of the electrode.

This polymerisation was already utilised to immobilise Glucose oxidase on the surface of a Pt electrode.²⁸ In this reference, the authors suggested that the cationic radical $\text{PPD}^{+\cdot}$ is responsible for the reaction with PPD and film formation. According to Parker and Adams,²⁵ the electrochemical semiquinone formation occurs only at very low pH. Their oxidation curve for PPD obtained in a pH range similar to those used here and in reference²⁸ shows a one oxidation step of two electrons to the diimine (Figure 3.6). The diimine then reacts with PPD to form an insulating polymerised film that passivates the electrode. The influence of pH on the passivation can also be explained by the different protonation equilibrium of the diimine presented in Figure 3.6. The pK_a values are from the work by Parker and Adams and the numbers given must be taken as approximations due to the difficulty of measuring the dissociation constants of such unstable species. At a pH of 6.2 used here, the unprotonated diimine would be found in concentrations higher than at a pH of 4.7. The $=\text{NH}$ groups, more active than the protonated $=\text{NH}_2^+$ would favour the reaction with PPD due to the presence of two reactive groups and form an irreversibly oxidised product. The nature of the products remains to be elucidated but they are irreversibly formed and that their adsorption on the electrode surface results in a passivated electrode. Possible structures are found in reference.⁴⁰

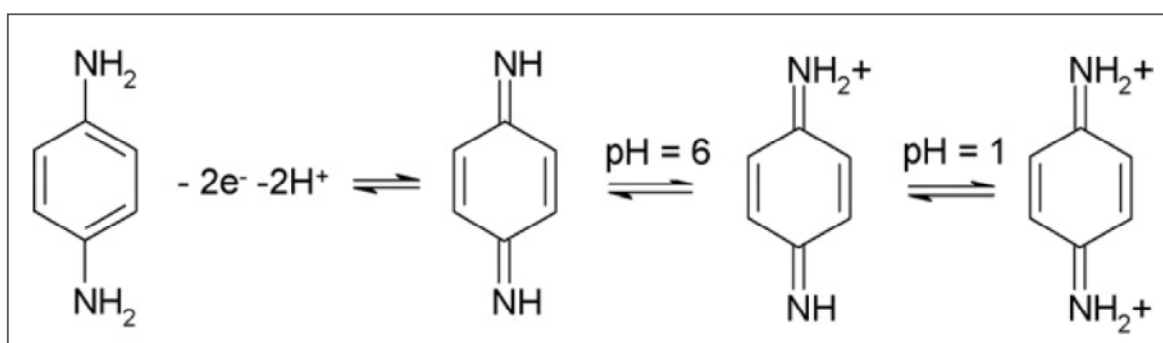


Figure 3. 6 : pH equilibrium of the diimine oxidation product.

Table 3. 2 : Comparison of peak potential parameters for the cyclic voltammograms of 1 mM PPD solutions under different conditions.

Electrode	Buffer	pH	E_{pa}/mV	E_{pc}/mV	$\Delta E_p/mV$
<i>GC</i>	Acetate 0.1 M	4.7	328	256	72
	McIlvaine	6.2	237	185	52
<i>Pt</i>	McIlvaine	6.2	235	189	46
	McIlvaine	6.0	233	186	47

^a Values from reference ⁸ at $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Figure 3.7 shows that electrode passivation involves a relatively slow step on the time scale of our electrochemical experiments. When the potential scan rate is increased to 500 mV/s, passivation takes a longer time to occur since less time is spent in oxidation and anodic current values are close to cathodic ones until the fifth cycle. In this case, the cathodic and anodic currents are almost identical, showing that the diimine can be reduced back to the diamine if the potential is swept rapidly. A careful evaluation of the currents shows that the reduction is always smaller than the oxidation, meaning that a small fraction of the diimine must undergo the irreversible reaction with the diamine which will ultimately lead to complete electrode passivation. A ΔE_p of 101 mV is obtained for the first cycle of PPD at $v = 500 \text{ mVs}^{-1}$ (Figure 3.7).

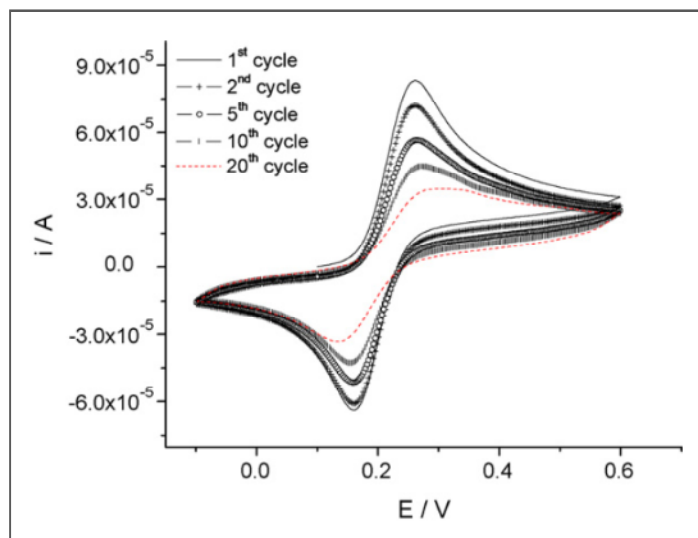


Figure 3. 7 : Electrode passivation observed at higher scan rate ($v = 500 \text{ mVs}^{-1}$) in a 1 mM PPD solution (0.1 M McIlvaine buffer at pH 6.2).

We previously determined in Figure 3.1 that the optimum pH to work with laccase is 4.7 in a 0.1 M acetate buffer and that around 2.00 mM of PPD saturates the enzyme kinetics. However, voltammetric experiments in Figure 3.5 showed that passivation is obtained for a concentration of 1 mM, but in a slower fashion than at 5 mM. When we compare the CVs obtained in both buffers, we see that a broader shape is obtained for McIlvaine than in acetate buffer. It is also clear that the currents are higher in acetate than the McIlvaine, a difference that could be explained by a higher stability of the PPD at pH 4.7 (acetate) than at 6.2 (McIlvaine).

3.4.3 Study of Laccase with PPD in acetate buffer by voltammetric experiments

Many reports studied the electrochemical PPD oxidation in very acidic solutions.^{1,25} It is believed that in such solutions the semiquinone intermediate is stable unlike in less acidic solutions where the diimine is predominant. To study the electrochemical oxidation of the PPD^{•+} and evaluate electrode passivation in the presence of an enzyme, we oxidised a solution of PPD with laccase. The PPD oxidation by laccase, even in solutions with a pH between 4 and 5, involves the PPD^{•+} formation as evidenced by an initially yellow color appearance. PPD solutions containing laccase will eventually turn purple due to the formation of oligomers. By proceeding rapidly to cyclic voltammetry experiments after laccase addition, we will be able to determine if the final products at the electrode are different from when we start with a reduced PPD solution. In addition, since we and others have been using PPD as an electron mediator for laccase, it is important to determine its behaviour in presence of the enzyme. It has been shown for covalently immobilised laccase on platinum that a stable amperometric response to PPD is observed.⁸ However, with the enzyme in solution rather than immobilised, it is possible to observe different processes that occur at the electrode surface and that are not observed with a thin laccase film adsorbed at the surface of the electrode. A freshly made solution of 1.00 mM PPD in acetate 0.1 M buffer presents no color. It takes about 4 days to see an appreciable purple color in solution due to the PPD auto-oxidation. In voltammetric experiments in the presence and absence of laccase, all solutions were freshly made on a daily basis. However, each experiment presented a purple coloration of the PPD solution after a sufficient long time. In CVs recorded for these aged solutions, we observed a reversible couple with an E' centered at about -25 mV and an anodic current at $E_{p,a} \sim 0.3$ mV and a cathodic current at $E_{p,c} \sim -47$ mV vs. Ag/AgCl. To rule out the presence of a contaminant in PPD crystals, we recorded the CV of a freshly made solution of 1 mM PPD in the region where we noticed

the possible PPD oligomer redox behaviour (not shown). No faradic currents were observed, suggesting that the redox species must be formed during our experiments.

As expected after the previous experiment, even with cycling at low sweep rate (20 mVs^{-1}), no faradic currents were observed in the region of interest as it shown in Figure 3.8A. Even when laccase is added to the solution, no waves can be noted during the first few cycles (Figure 3.8B). After a few cycles and cycling to a potential where we are just on the beginning of the electrochemical oxidation of PPD, it becomes possible to observe the same redox couple that was present on the CV of an aged PPD solution. Upon cycling, the reduction current for the peak at 250 mV decreases. Oppositely, the oxidation and reduction currents for the redox process observed at -25 mV are steadily increasing with the number of cycles. This observation shows that under such conditions, the electrode is not passivated and that the products formed must be very different from those yielding the formation of an insulating film.

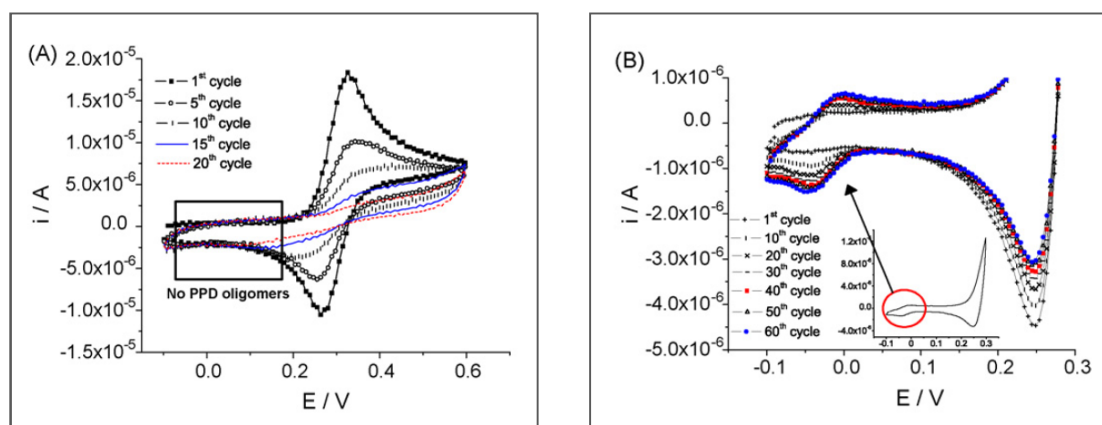
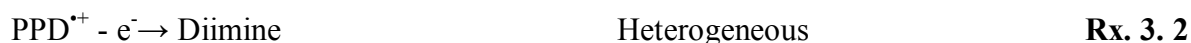
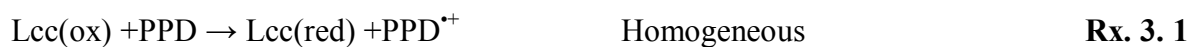


Figure 3. 8 : CVs obtained in a freshly made solution of PPD (1 mM). In (A) no laccase was added, while (B) contained an amount of 70U of laccase. CVs were recorded in 0.1M acetate buffer pH 4.7 on GC at $v= 20 \text{ mVs}^{-1}$.

Another important observation is the stability over the cycling and the increase of the currents with the sweep rate show in Figure 3.9, and which are typical for a stable reversible species in solution. It is possible to say that soluble oligomers are a result of PPD^{*+} formed by laccase oxidation of PPD. The PPD^{*+} can be further oxidised at the electrode to the diimine when the potential reaches 200 mV vs. Ag/AgCl. This diimine then reacts with PPD^{*+} in solution to give oligomers. Jiao et al. proposed a similar mechanism for the HRP-catalysed oxidation of PPD.² They suggested that two cationic radicals (PPD^{*+}) can react with one unprotonated diimine molecule to form a trimer which shows a reversible redox behaviour at $E' = -0.97$ V vs. Ag/AgCl (measured on an Hg electrode). The reversible behaviour only occurred in solutions of pH between 6 and 13 and both oxidised and reduced forms were strongly adsorbed on the surface of the Hg drop. This is not what is observed here but we believe that a similar reaction between PPD^{*+} and the diimine formed at the electrode is responsible for the formation of soluble dimers or trimers by a combination of homogeneous and heterogeneous reactions (Rx 3.1 to Rx 3.3). A careful comparison of the curves in Figure 3.8 A and B shows that the onset for the oxidation peak differs by about 50 mV. This difference is ascribed to the easier diimine formation from the already oxidised PPD^{*+} .



Passivation of the electrode is observed if the cycling goes to higher potentials, where the further oxidation of reactions products gives irreversible products. After deliberately passivating the electrode, we were unable to retrieve the redox waves (Figure 3.9) and only

the background current increased as a consequence of film formation which only occurs if the potential applied at the electrode is higher than 300 mV vs. Ag/AgCl.

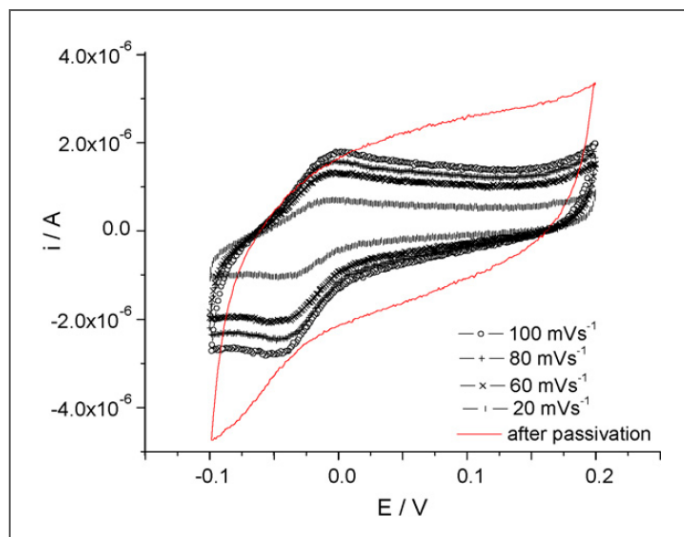


Figure 3. 9 : Influence of scan rate on the oxidation and reduction currents of the PPD oligomers formed in solution in presence of laccase. The solid line is representative of the curves obtained after cycling at potential higher than 500 mV vs. Ag/AgCl and demonstrate electrode passivation. See Figure 3.8 for conditions.

3.4.4 Study of PPD in acetate buffer by RRDE and μ Caps-GC-RDE

We showed in the last section that passivation occurs at the electrode when PPD oxidation is realised at high potential. These experiments were carried out in a diffusion-controlled regime (no convection). We then studied the PPD oxidation on a rotating glassy

carbon electrode (RRDE with Pt ring) at high potentials to favour the film-forming oxidation reaction and evaluate if the intermediates or the final products that adsorb on the surface of the electrode. Figure 3.10 shows that the current obtained for the oxidation of the PPD at the disk, as well the collected current at the ring are linear with the rotation speed (between 100 and 1500 rpm) in respect with the Levich's equation. The fact that all measurements were done in the same solution and without polishing demonstrates the absence of passivation. The cathodic currents measured at the ring also shown almost quantitative reduction of the species formed at the disk when taking the collection factor previously determined. This fact also implies that the diimine formed is stable enough so when it is removed from the electrode surface (by rotating the electrode in this case), it would not go through further oxidation and passivation is avoided. Slope analysis of the disk current gave an n value close to 2, as expected for the PPD oxidation to diimine.

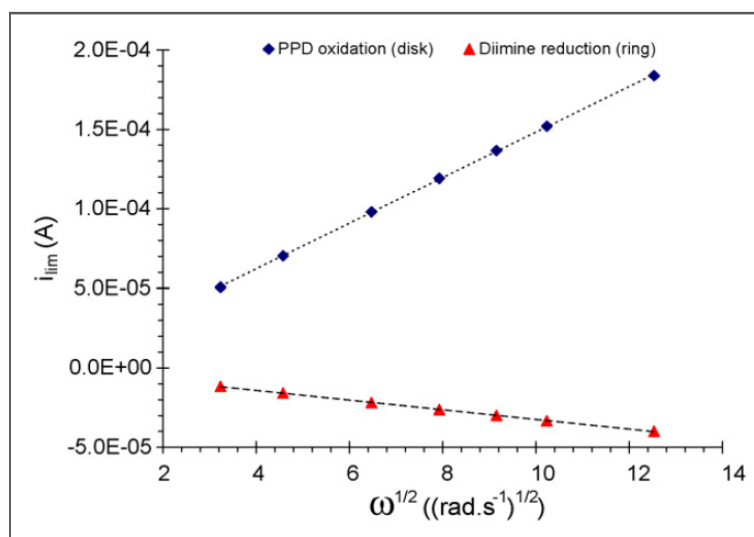


Figure 3. 10 : PPD oxidation under hydrodynamic conditions (100-500 rpm). Oxidation currents (at disk) were taken at $E = 590$ mV while the ring electrode was poised at 100 mV. See Figure 3.8 for other conditions.

While only small levels of convection, which could be obtained in a flow cell or by rotating the electrode, appears to be enough to prevent passivation, the modification of the electrode surface with a thick layer of polymer could suppress the beneficial effect of convection by trapping the PPD reaction products and allow their further oxidation. Modifying electrodes with layers of polymer is a common way to immobilise enzymes. Our immobilisation platform relies on the use of microcapsules to do so. When the microcapsules are deposited on the electrode, they form uniform layers that restrain the diffusion of PPD.²⁴ To determine if such layers can in fact promote the polymerisation of PPD oxidation products into an insulating film, we functionalised a GC-RDE with microcapsules to study its passivation. As it can be seen in Figure 3.11, oxidation and reduction process are broadened probably because of the difficulty of the PPD to diffuse through the microcapsules. Even broader CVs were obtained if the sweep rate was higher than 50 mVs^{-1} . Together, the current, which is fading upon cycling, and the presence of a second oxidation peak during cycling toward higher potential values suggest the occurrence of some passivation which was not observed on the CVs recorded at a bare electrode under identical conditions. We think that PPD might be trapped, or at least its diffusion slowed down, near the electrode surface by the presence of the microcapsules, allowing the subsequent oxidation reactions to occur and to passivate the electrode.

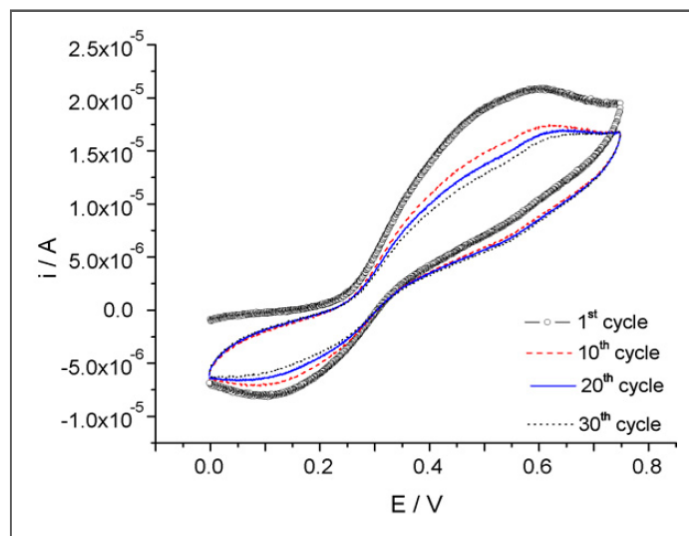


Figure 3. 11 : Cyclic voltammograms of a rotating GC electrode modified with polymer microcapsules in a 1 mM PPD solution (0.1 M acetate buffer, pH 4.7) at $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$ and 50 rpm.

3.5 Conclusions

We presented a study of the electrochemical and enzymatic oxidation of *p*-phenylenediamine that was stimulated by the very different behaviours for PPD oxidation found in the literature. In this work, we showed that care must be taken when choosing the conditions to obtain a sufficiently reversible system so PPD can be used as an electron transfer mediator between an enzyme, may it be in solution or immobilised on the surface of an electrode. Spectrophotometric determination of the laccase-PPD oxidation rates is probably to be avoided due to the slow conversion of PPD^{*+} to the species absorbing at 520 nm and to the structures yet to be elucidated for these species. In that sense, oxygen cell measurements are probably more reliable. Glassy carbon and platinum electrodes were

readily passivated when using the pH conditions necessary to observe enzymatic activity (pH range 4–5). Once passivation occurs, it prevented any current measurements and the electrode must be thoroughly polished to remove the film. RDE experiments showed that with little rotation no passivity state was obtained and when using RRDE, the diimine formed at the disk was quantitatively reduced at the ring. This finding implies that the reaction products of diimine with PPD must be further oxidised to initiate film formation, a step that was avoided under hydrodynamic conditions. Additional oxidation peaks were noted on the CVs recorded at high PPD concentrations which are attributed to this further oxidation of the reaction products. In the presence of laccase, which readily oxidises PPD to its radical cation, a slightly different behaviour was observed. In this case, a stable and soluble reaction product was formed when $\text{PPD}^{\bullet+}$ was further oxidised at the electrode at a potential of 200 mV vs. Ag/AgCl. This reaction product is an oligomer (a dimer or trimer) which is electrochemically active with an equilibrium potential at -25 mV. Electrode passivation in the presence of laccase was however achieved by cycling the potential to higher values. We also showed that the slower PPD diffusion through a microcapsule layer to the electrode surface allows enough time for its reaction products to be further oxidised and that the electrode passivation could not be entirely avoided, even with a rotated electrode.

3.6 Acknowledgements

The authors would like to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for its financial support. Cédric Ginard is also thanked for the confection of our electrochemical cells.

3.7 References

1. F. Cataldo, *Eur. Polym. J.*, **1996**, 32 (1), 43.
2. K. Jiao; W. Sun; S.-s. Zhang; G. Sun, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 413, 71.
3. B. Reinhammar In Copper Proteins & Copper Enzymes; *Laccase*; Lontie, R., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, **1984**; Vol. III, 1-35.
4. C. F. Thurston, *Microbiology*, **1994**, 140, 19.
5. A. I. Yaropolov; O. V. Skorobogatko; S. S. Vartanov; S. D. Varfolomeyev, *Appl. Biochem. Biotech.*, **1994**, 49 (3), 257.
6. E. I. Solomon; U. M. Sundaram; T. E. Machonkin, *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 2577.
7. Christine Mousty; Laetitia Vieille; S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, 22 (8), 1733.
8. D. Quan; Y. Kim; W. Shin, *J. Electroanal. Chem.*, **2004**, 561, 181.
9. D. Rochefort; R. Bourbonnais; D. Leech; M. G. Paice, *Chem. Commun.*, **2002**, 1182.
10. F. Davis; S. P. J. Higson, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, 22, 1224.
11. G. T. R. Palmore; H.-H. Kim, *J. Electroanal. Chem.*, **1999**, 464, 110.
12. W. E. Farneth; M. B. D'Amore, *J. Electroanal. Chem.*, **2005**, 581 (2), 197.

13. D. Leech; K. O. Feerick, *Electroanalysis*, **2000**, *12* (16), 1339.
14. J. Shah; E. Wilkins, *Electroanalysis*, **2003**, *15* (3), 157.
15. G. Decher; J. D. Hong; J. Schmitt, *Thin Solid Films*, **1992**, *210*, 831.
16. G. B. Sukhorukov; E. Donath; S. Davis; H. Lichtenfeld; F. Caruso; V. I. Popov; H. Mohwald, *Polym. Adv. Technol.*, **1998**, *9*, 759.
17. A. Blandino; M. Macías; D. Cantero, *Process Biochem.*, **2001**, *36*, 601.
18. L. W. Chan; H. Y. Lee; P. W. S. Heng, *Int. J. Pharm.*, **2002**, *242* (1-2), 259.
19. A. Ghanem; A. Ghaly, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2004**, *91* (2), 861.
20. D. Quong; R. J. Neufeld, *Biotechnol. Bioeng.*, **1998**, *60* (1), 124.
21. M. Monshipouri; R. J. Neufeld, *Enzyme Microb. Technol.*, **1991**, *13* (4), 309.
22. T. L. Whateley In *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications; Microcapsules: preparation by interfacial polymerization and interfacial complexation and their application.*; 1st ed.; Benita, S., Ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, **1996**, 349–375.
23. D. Poncelet; T. Alexakis; B. P. D. Smet; R. J. Neufeld, *J. Microencapsulation*, **1994**, *11* (1), 31.
24. D. Rochefort; L. Kouisni; K. Gendron, *J. Electroanal. Chem.*, **2008**, *617*, 53.
25. R. E. Parker; R. N. Adams, *Anal. Chem.*, **1956**, *28*, 828.

26. H. B. M. JR; F. C. Anson, *Anal. Chem.*, **1963**, 35, 722.
27. T. Yao; S. Musha; M. Munemori, *Chem. Lett.*, **1974**, 8, 939.
28. X. Jing-Juan; C. Hong-Yuan, *Anal. Biochem.*, **2000**, 280 (2), 221.
29. B. Palys; A. Bokuna; J. Rogalski, *Electrochim. Acta*, **2007**, 52, 7075.
30. R. M. C. Dawson; D. C. Elliott; W. H. Elliott; K. M. Jones; *Data For Biochemical Research*; Third ed.; Oxford science publications: Oxford, **1986**, 580 p.
31. N. H. Furman; C. O. Miller, *Inorg. Synth.*, **1950**, 3, 160.
32. R. Bourbonnais; M. G. Paice; I. D. Reid; P. Lanthier; M. Yaguchi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1995**, 61, 1876.
33. H. R. Horton; L. A. Moran; R. S. Ochs; J. D. Rawn; K. G. Scrimgeour; *Principes de Biochimie*; 1st ed.; De Boeck-Wesmael Press: Bruxelles, **1994**, 720 p.
34. Y. Xiao; X. Tu; J. Wang; M. Zhang; Q. Cheng; W. Zeng; Y. Shi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, 60 (6), 700.
35. J. J. Roy; T. E. Abraham, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, 38 (1), 31.
36. Y. Z. Xiao; Q. Chen; J. Hang; Y. Y. Shi; J. Wu; Y. Z. Hong; Y. P. Wang, *Mycologia*, **2004**, 96, 26.
37. M. Nagai; M. Kawata; H. Watanabe; M. Ogawa; K. Saito; T. Takesawa; K. Kanda; T. Sato, *Microbiology*, **2003**, 149, 2455.

38. D.A.Wood, *J. Gen. Microbiol.*, **1980**, *117*, 327.
39. J. Peisach; W. G. Levine, *J. Biol. Chem.*, **1965**, *240*, 2285.
40. X.-G. Li; M.-R. Huang; W. Duan; Y.-L. Yang, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 2925.

4 STUDY OF Et₃N-HCO₂H/Pd(OAc)₂(PPh₃)₂ AND Pd/C-Et₃N CATALYSTS FOR THE REDUCTIVE DEHALOGENATION OF MONO- AND DI-HALODINITROCARBAZOLE TO 1,6- AND 1,8-DIAMINOCARBAZOLE

Mathieu Hébert et Dominic Rochefort, *Synlett*, Soumis le 6 septembre 2011 2011, #S86-09-11.

4.1 Abstract

Syntheses of 1,6- and 1,8-diaminocarbazole were achieved in two steps. Nitration of 3,6-dibromocarbazole gave a mixture of 3-bromo-1,6-dinitrocarbazole and 3,6-dibromo-1,8-dinitrocarbazole at a 1.5/1 ratio. These compounds were then reacted with Et₃N and 10% Pd/C as catalyst in MeOH under H₂ atmosphere to obtain a mixture of 1,6/1,8-diaminocarbazole. The separation of these isomers was realized using a SP4TM Purification system from Biotage[©].

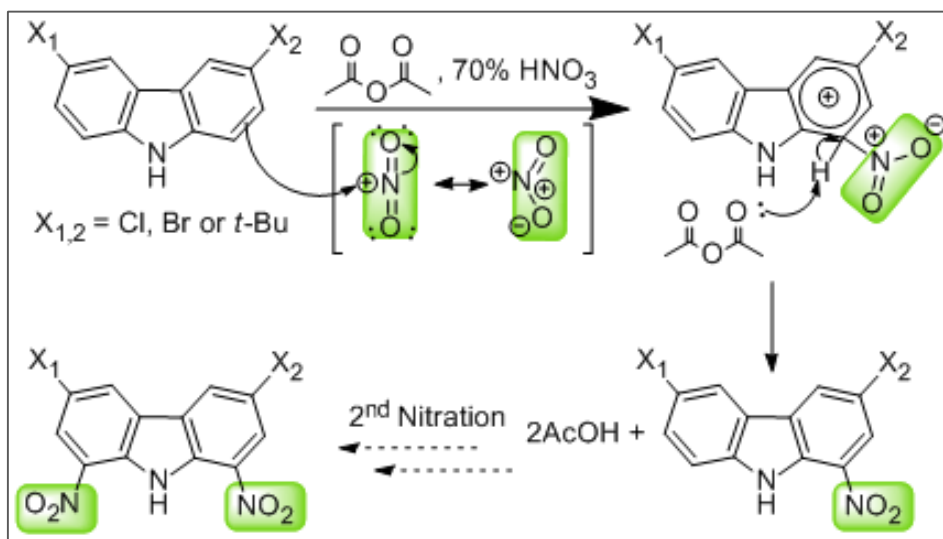
4.2 Introduction

Since the discovery of conducting polymers in 1977,¹ carbazole chemistry (**CBZ**) has been revisited and oriented for the synthesis of conjugated polymers in which **CBZ** monomers are incorporated in the main chain as building blocks. Considerable efforts were made over the last decade to develop efficient methods for their functionalization on 3,6 and 2,7 positions toward conductive polymer.² However, few reports have been published on the 1,8-functionalization of **CBZ**.³ Recently, Skompska *et al.*⁴ have demonstrated that 1,8-diamino**CBZ**, (**10**) which has a greater electronic density at the 3,6 linking position, has interesting redox properties in organic and aqueous media. Also, little work has been realized on a synthetic route to obtain **10** as the major product.⁵ Cortese and Heck⁶ reported that aromatic halides and nitro compounds are readily reduced at 50-100°C to hydrocarbon and amine, respectively, with triethylammonium formate in the presence of either Pd/C or a soluble triarylphosphine-Pd acetate catalyst. More recently, dehydrodechlorination of different aromatic chlorides containing deactivating groups (-CO₂H, -NO₂) have been published.⁷ Herein, we report a study on the reductive deprotection of 3,6-functionalized **CBZ** and their nitrated derivatives using two catalytic systems: triethylammonium formate/Pd acetate and triphenyl-phosphine; triethylamine in MeOH with Pd/C under H₂.

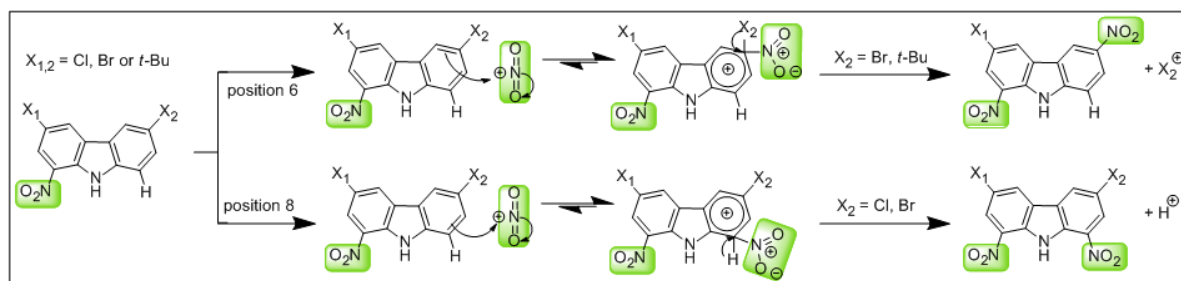
4.3 Results and Discussion

In a first step, **CBZ** with functional groups in 3,6 position have been synthesised. The chlorination of **CBZ** with sulfur chloride, which was based on the work of Chmielewski, Charon and Jurczak,⁸ gave 3,6-dichloro**CBZ** (**1**) with a yield of 68% while the 3,6-di-*tert*-butyl**CBZ** (**3**) was obtained from a Friedel-Crafts reaction with a yield of 54%.⁹

Nitration of these compounds and of 3,6-dibromoCBZ (**2**) were obtained using 70% HNO₃ instead of absolute nitric acid.⁸ It is known that mononitration of benzene can be achieved in concentrated sulfuric acid with HNO₃ at moderate heat (electrophilic substitution).¹⁰ However, the second nitration step is much harder to achieve because of the greatly deactivating nitro group previously introduced on the aromatic structure. Moreover, the solubility of **CBZ** compounds rapidly decreases with nitration substitution, raising the level of difficulty of the second nitration step. Increasing the temperature could also lead to unwanted secondary reactions depending of the nature of the protecting groups in 3,6 positions of **CBZ**. A substitution in position 6 is observed when **3** is nitrated, yielding 52% of 3-*tert*-butyl-1,6-dinitroCBZ (**3b**) with traces of 3,6-di-*tert*-butyl-1,8-dinitroCBZ (**3a**). Only substitution on 1,8 positions was observed when **1** is nitrated, yielding 81% of 3,6-dichloro-1,8-dinitroCBZ (**1a**). Products **1a** and **3a** could be explained by the mechanism showed in Scheme 4.1. In the *tert*-butyl version, the substitution in position 6 can be explained by the stability of a tertiary carbocation formed during the reaction. Here, we assumed that the de-*tert*-butylation takes place while the second electrophilic substitution of -NO₂ draws the electron density to favor the C-C bond breaking between the **CBZ** aromatic ring and the *tert*-butyl (Scheme 4.2). Mineral acids can be used as catalysts for de-*tert*-butylation of substituted arene systems. For instance, de-*tert*-butylation of mono- and di-*tert*-butylated aromatic esters and acids produced 4-hydroxyphenyl propionic acids¹¹ while **CBZ** can be obtained in good yield by the thermal de-*tert*-butylation of 2,2'-diamino-4,4'-di-*tert*-butyl-biphenyl.¹² **1a** does not show any signs of substitution in 3,6 positions and moreover, a decreasing yield was obtained with lower equivalents of nitric acid.



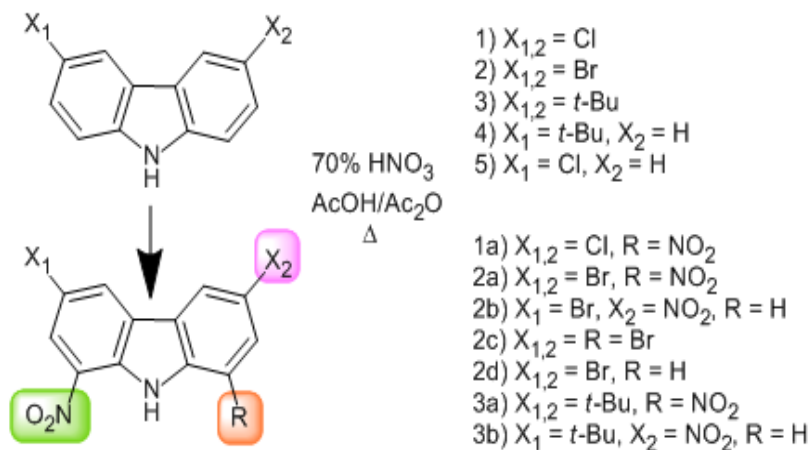
Scheme 4. 1 : Mechanism for 1,8-nitration of 3,6-protected CBZ.



Scheme 4. 2 : Proposed electrophilic substitution mechanism of 3,6-protected-1-nitro CBZ intermediates.

When characterizing the nitration reaction of **2**, an additional step is observed when position 6 is substituted. Three products were isolated by TLC (50% hexane, 50% dichloromethane %v/v) and identified by ^1H NMR: $R_f = 0.60$ as 1,3,6-tribromo-8-nitroCBZ (**2c**); 0.35 as 3,6-dibromo-1,8-dinitroCBZ (**2a**); and 0.29 as 3-bromo-1,6-dinitroCBZ (**2b**). LC-MS analysis of the mixture (C_6 -Phenyl column) showed a doublet (m/z $[\text{M}-\text{H}]^- = 334.0$

and 335.9) for **2b**; a quadruplet (m/z $[M-H]^- = 444.8, 446.8, 448.8$ and 416.8) for **2c** and a triplet (m/z $[M-H]^- = 413.8, 415.8$ and 370.8) for **2a**. This confirmed the existence of a competition between a previously released Br^+ and NO_2^+ for electrophilic substitution reaction on 3,6-dibromo-1-nitroCBZ (**2d**) to yield **2c**. However, high amounts of HNO_3 used during synthesis favored **2b**, as seen with entries 1 and 2 in Table 4.1. Another triplet (m/z $[M-H]^- = 366.8, 368.8$ and 370.8) was observed for a compound that eluted between **2b** and dibromodinitroCBZ species with a mass fitting that of **2d**, in agreement with our proposed mechanism in Scheme 4.1. Flash chromatography could not be used to isolate the compounds at a large scale because of the poor solubility of these nitrated compounds in various solvent. Fortunately, it was possible to remove **2c** from the mixture once bromine was added to a suspension of **2a**, **2b** and **2c** in dioxane under reflux. Simple filtration on a Büchner at R.T. gave **2a/2b** in 1:1.5 ratio for a yield of 21% and 31% respectively (Entry 2, Table 4.1). Using less equivalents of nitric acid at lower temperature favored **2d** while small traces of **2a** and **2b** were detected by LC-MS and 1H NMR. A given yield of 54% after a purification by flash chromatography was obtained for **2d** (Entry 3, Table 4.1).

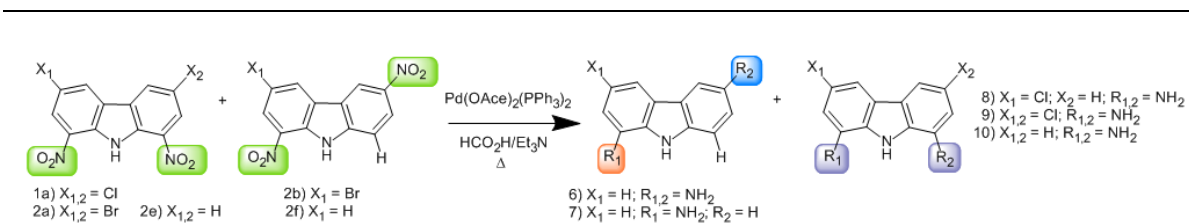
Table 4. 1 : Nitration reactions of 3,6-protected CBZ derivatives.

Entry	Compound	HNO ₃ (éq.)	Product	% yield
1	1	5.65	1a	81 ^a
2	2	4.77	2a	21 ^a
			2b	31 ^a
			2c	trace ^b
3	2	1.75	2d	54 ^a
			2a	trace ^b
4	3	6.5	2b	trace ^b
			3a	trace ^b
			3b	52 ^b

^a Isolated yield, ^b Determined by LC-MS and by ¹H NMR.

The nitro substituent is a known deactivating group in aryl compounds. We therefore assumed that both nitro groups in positions 1 and 8 on **CBZ** should favor the reductive dehalogenation of the 3,6 positions of **2a** and **2d** in presence of triethylammonium formate/Pd(OAc)₂(PPh₃)₂ as the catalyst. However, activation of halogenated carbons would be less important if NO₂ groups were to be reduced to NH₂ before a complete dehalogenation could be achieved. In order to evaluate properly the influence of NO₂ on these compounds, **1**, **2** and **3** were reacted with Pd(OAc)₂(PPh₃)₂ and reported in Table 4.2. Entries 1, 2 and 3 show that only **2** is deprotected efficiently yielding

pure **CBZ** while traces of 3-chloro**CBZ** (**5**) and 3-*tert*-butyl**CBZ** (**4**) were observed for the reaction from **1** and **3** respectively. Entries 4, 5 and 6 show that increasing the temperature did not allow a dechlorination for **1a** where 1,8-diamino-3,6-dichloro**CBZ** (**9**) was the major product, with traces of 1,8-diamino-1-chloro **CBZ** (**8**) and **10** detected. We could not reproduce the expected product **10** with a yield as high as reported previously,⁵ despite a meticulous reproduction of the reaction conditions. While the presence of NO₂ on 1,8 positions did not allow the dechlorination reaction to take place (Entries 4 & 5, Table 4.2), reduction of nitro groups to amino was observed. Increasing catalyst loading, temperature and reaction time lead to the formation of oligomeric species. The isotopic mass of these oligomers reveals a dichloro substituted **CBZ**, IR and ¹H NMR analysis, and Kaiser's test did not reveal any evidence of the presence of primary amino groups. We believe that the reaction produced oligomers consisting of 2-3 **CBZ** units linked by an amino group and a carbon in position 3 (Entry 6, Table 4.2). We conclude from this set of experiments that a direct reductive dehalogenation of **1** and **1a** is not favored due to the strength of the C-Cl bond. Altogether, these results suggest that the conditions required for an efficient deprotection of 3,6-functionalised **CBZ** and nitro derivatives are not met and providing more energy to the system results in the formation of unwanted oligomers rather than promoting deprotection when Cl or *t*-Bu are used as protecting groups.

Table 4. 2 : Summary data for reductive dehalogenation reaction with Pd(OAc)₂(PPh₃)₂.

Entry	Compound	Quant. (mmol)	HCO ₂ H (mmol)	Cat. (Mol %)	Temp. (°C)	Rx time (h)	Product (% Yield)
1	1	9.98	100.0	2.0	107	72	5 [§] (Traces) ^a
2	2	9.98	100.0	2.1	88	50	CBZ (18) ^c
3	3	10.0	100.6	2.1	88	48	4 [§] (Traces) ^b 9 (50) ^c
4	1a	10.0	100.0	2.1	108	48	8 (Traces) ^b Oligomeric species ^b
5	1a	6.71	100.7	2.9	88	48	9 (47) ^c 10 (traces) ^b
6	1a	1.91	188.2	10.2	130	62	Oligomeric species ^b 10 ^a
7	2a/2b *	1.50/2.25	100.7	1.8	60	24	7 ^{a, b} Oligomeric species ^b 10 ^a
8	2a/2b *	1.49/2.23	100.7	1.8	88	24	2e/2f ^a 7 ^a 10 ^{a, †}
9	2a/2b *	2.01/3.01	92.8	1.8	R.T. 30-88 88 R.T.	0.78 0.5 0.25 75	7 ^{a, b} 2e/2f ^a
10	2a/2b *	1.99/2.99	132.5	4.2	88	96	Oligomeric species ^b 2e/2f ^{a, b}
11	2a/2b	3.05/4.58	79.5	0.5	88	1	2a/2b ^{a, b} 10 ^{a, †}
12	2a/2b	2.60/3.90	100.7	3.1	88	1	Oligomeric species ^b 2f (63) ^a 2e (31) ^{a, c}
13	2a/2b	1.51/2.27	100.7	1.8	40	24	

Identified by: ^a LC-MS ^b ¹H NMR. ^c Isolated yield.

*Trace of **2c** [†]m/z [M+H]⁺ of 228.1 (singlet) detected. [§] See Table3.1.

All reactions were carried out with 28.5 mmol of Et₃N.

Consequently, bromine, a better leaving group, was then used to evaluate several reaction conditions and to achieve the synthesis of **10**. Mixture of **2a**, **2b** and **2c** were reacted under different conditions and reported as entries 7 to 10 in Table 4.2. Considering that **2c** was present, it is obvious that 1-aminoCBZ (**7**) was detected (Entries 7 to 9, Table 4.2). 1,8- and 1,6-dinitroCBZ (**2e** and **2f**) were also detected, indicating that dehalogenation could be identified as the step prior to the reduction of NO₂ to NH₂. Moreover, entry 9 shows that a singlet m/z [M+H]⁺ = 228.1 was detected, which indicates that only one nitro group is reduced (**2e/2f**). 1,8-diaminoCBZ (**10**) was detected in each case but never as the product with the highest yield. Increasing temperature and catalyst loading lead to the formation of oligomeric species (Entry 10, Table 4.2). The absence of **2c** in the mixture is directly related to the absence (undetected) of **7** (Entries 11 to 13, Table 4.2). Also, the reaction carried out at 40°C (Entry 13, Table 4.2) gave a mixture of **2f/2e** with a yield of 63% and 31% respectively. Based on this set of experiments, we therefore conclude that the reductive dehalogenation is a kinetically-favored product, while the oligomerisation and reduction of NO₂ to NH₂ are observed at higher temperatures and for an extended period of time.

It had been shown previously that **6** or **10** could not be obtained at high yields and isolated when starting substrates were reacted with triethylammonium-formate in presence of Pd(OAc)₂(PPh₃)₂ as the catalyst. The work of Monguchie *et al.*⁷ showed that the reduction of NO₂ group to NH₂ is achieved concomitantly with the dechlorination of 1-chloro-3-nitrotoluene when Pd/C is used as catalyst under H₂ atmosphere using MeOH as the solvent. Herein, we report that, based on these conditions, **1a** could not be dehalogenated and only reduction of NO₂ groups to NH₂ was observed leading to **9** for a yield of 81%. When 10% Pd/C was used as catalyst (Entries 1 and 2, Table 4.3). Using **2a/2b** at 40°C yielded to 43% of **10** or quantitatively based on **2a** (Entry 3, Table 4.3). We hypothesise that the excess of Et₃N increased the deprotonation of **6** formed during the reaction after purification (drying, sonication in water and filtration on Büchner). Surprisingly, when lowering the concentration of starting materials, **2b** was recovered even

after 40 hours of reaction (Entry 4, Table 4.3). Using more equivalents of Et₃N and increasing the temperature to 70°C for shorter reaction times produced 1,8-diamino-3,6-dibromoCBZ (**11**) with a yield of 85% based on **2a** (Entry 6, Table 4.3). Entries 7 and 8 of Table 4.3 show that it is possible to have a mixture of **6** and **10** where the yields are improved when a higher concentration of starting materials is used and as well as longer reaction times. This mixture was separated using a SP4TM Purification system from Biotage[©]. Using **2d** as the starting material, only 1-amino-3,6-dibromoCBZ (**12**) is obtained. Finally, considering our results, we can propose that the reductive dehalogenation of **2a** and **2b** proceed through a radical mechanism as reported in the literature.⁷

Table 4.3 : Summary data for reductive dehalogenation reaction with Pd/C under H₂ atmosphere (balloon).

6) X₁ = H; R_{1,2} = NH₂
7) X₁ = H; R₁ = NH₂; R₂ = H

8) X₁ = Cl; X₂ = H; R_{1,2} = NH₂
9) X_{1,2} = Cl; R_{1,2} = NH₂
10) X_{1,2} = H; R_{1,2} = NH₂
11) X_{1,2} = Br; R_{1,2} = NH₂
12) X_{1,2} = Br; R₁ = NH₂; R₂ = H

Entry	Compound	Conc. (mmol)	Pd/C (% wt.)	Et ₃ N (eq.) [§]	Temp. (°C)	Rx time (h)	Product (% Yield)
1	1a	70.9	1.0 ^a	9.3	40	24	9 (81) ^d
2	1a	70.7	1.1 ^b	9.3	40	24	No reaction
3	2a/2b	25.2/37.8	1.0 ^a	-	R.T.	0.66	10 (43) ^d Quant. based on 2a
				93.	40	24	
4	2a/2b	8.10/12.1	1.3 ^a	8.9	40	40	2b (Quant.) ^d
5	2a/2b *	49.1/73.6	1.1 ^a	-	40	0.5	Oligomeric Species
				8.4	50	1	
6	2a/2b	26.0/39.0	1.1 ^a	9.1	40	1	11 (85) ^c based on 2a
				9.1	40	21	
				9.1	70	3	
7	2a/2b	16.4/24.8	3.6 ^a	14.3	40	6	10 (23) ^c 6 (35) ^c
8	2a/2b	66.6/99.9	2.9 ^a	8.5	40	24	10 (31) ^c 6 (47) ^c
9	2d	80.5	2.9	1.1	40	26	12 (41) ^d
				-	R.T.	40	

^a 10% Pd ^b 3% Pd Determined: ^c ¹H NMR and LC-MS ^d Isolated yield. All reactions were done in 20 mL of MeOH.

[§]Eq. based on total halogen mmol. *Trace of **2c**.

4.4 Conclusions

1,6- and 1,8-diaminocarbazole isomers were successfully synthesised and separated using an improved protocol which is more efficient and contain fewer steps than the one previously reported.¹³ We have shown that by using commercially available 3,6-dibromocarbazole as the starting material, an additional synthetic step such as 3,6-protection of **CBZ** can be avoided. One must notice that none of the tested catalytic systems successfully yielded 1,8-diaminocarbazole starting from **1a** despite previous reports.⁵ It is worth mentioning that we were able to obtain and isolate 1,6-diaminocarbazole, and thereby, to our knowledge, it is the most efficient synthetic pathway to obtain it.

4.5 Supporting Information¹

Supporting Information for this article is available and contains the synthetic protocols for compounds **1**, **3**, **2a/2b**, **2d**, **6**, **10** and **12**. ¹H/¹³C NMR and HRMS (ESI) characterisations are given for these products.

4.6 Acknowledgements

The authors thank the staff of the Regional Center for Mass Spectrometry of the Université de Montréal for LC-MS analyses. Members of Andreea Schmitzer's group at Université de Montréal are also thanked for their help and advice in synthesis. The authors

¹ Les «Supporting Information» reliées à cet article sont présentées à l'Annexe 2.

also acknowledge NSERC for funding. M. Hébert personally thanks NSERC and FQRNT for research fellowships.

4.7 References

1. H. Shirakawa; E. J. Louis; A. G. MacDiarmid; C. K. Chiang; A. J. Heeger, *J. Chem. Soc. D*, **1977**, 1977, 578.
2. J.-F. Morin; M. Leclerc; D. Adès; A. Siove, *Macromol. Rapid Commun.*, **2005**, 26, 761.
3. T. Michinobu; H. Osako; K. Shigehara, *Macromolecules Rapid Communications*, **2008**, 29, 111.
4. M. Skompska; M. J. Chmielewski; A. Tarajko, *Electrochem. Commun.*, **2007**, 9, 540.
5. M. J. Chmielewski, *Synthesis*, **2010**, 18, 3067.
6. N. A. Cortese; R. F. Heck, *J. Org. Chem.*, **1977**, 42 (22), 3491.
7. Y. Monguchi; A. Kume; K. Hattori; T. Maegawa; H. Sajiki, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 7926.
8. M. J. Chmielewski; M. Charon; J. Jurczak, *Org. Lett.*, **2004**, 6 (20), 3501.
9. V. C. Gibson; S. K. Spitzmesser; A. J. P. White; D. J. Williams, *Dalton Transactions*, **2003**, 2718

10. K. A. Kobe; J. J. Mills, *Ind. Eng. Chem.*, **1953**, 45 (2), 287.
11. S. A. Saleh; H. L. Tashtoush, *Tetrahedron*, **1998**, 54, 14157.
12. M. Tashiro; Y. Fukuda; T. Yamato, *Heterocycles*, **1981**, 16 (5), 771.
13. K. Takahashi; H. Eguchi; S. Shiwaku; T. Hatta; E. Kyoya; T. Yonemitsu; S. Mataka; M. Tashiro, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1988**, 1869.

5 ELECTROCHEMICAL STUDY OF AMINATED CARBAZOLE POLYMER DERIVATIVES FOR LACCASE MICROENCAPSULATION IN A PERMEABLE CONDUCTIVE CAGE

Mathieu Hébert, Pierre-Louis Brunner, Dominic Laliberté et Dominic Rochefort, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Soumis le 15 novembre 2011, #CP-ART-09-2011-022877.

5.1 Abstract

A bioelectrode was obtained by immobilising laccase on a Pt electrode by means of electroactive microcapsules made from aminated carbazole derivatives. Copolymer poly[(9H-octylcarbazol-3,6-diyl)-alt-co-(2-amino-9H-carbazol-3,6-diyl)] (CoPoD) was chosen among others based on three main reasons. It is easily synthesised in large quantities, its electrochemical behaviour is similar to the one of poly(1,8-diaminocarbazole), which is an interesting conductive polymer for electroactive microcapsules, and finally, it presents adequate physical properties to be used in an interfacial polymerisation by microemulsion. Laccase in CoPoD-based microcapsules presented an experimental enzymatic activity of 0.296 U/mL in 0.1 M acetate buffer pH = 4.3 at room temperature, which is lower compared to free laccase.

5.2 Introduction

Enzymatic biofuel cells rely on immobilised enzymes as catalysts to generate electrical energy from the oxidation of a fuel and the oxygen reduction. The high selectivity of the enzymes for a given reaction allows easy miniaturisation and a membrane-less cell design that can operate in complex solutions.¹⁻² However, enzyme immobilisation remains a challenge that has to be addressed in order to increment the output power and increase the stability of the current biofuel cells. The major advantage of microencapsulation lies in its ability to immobilise high amounts of enzymes. This technique is considered as very promising for enzyme immobilisation and is an essential step towards biofuel cell and biosensor development. It can be divided in three main methods: (a) layer-by-layer (LbL) self-assembly technique using polyelectrolytes,³⁻⁴ (b) ionic cross-linking of alginate or alginate/chitosan mixtures,⁵⁻⁸ and (c) interfacial condensation or polymerisation.⁹⁻¹¹

For a suitable biofuel cell to be built from a microcapsule template, the choice of a redox mediator that is able to diffuse through the microcapsules walls is a critical step. Our group previously reported that 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) acid (ABTS) interacts too strongly with the microcapsules and is therefore unable to shuttle electrons efficiently.¹² However, we demonstrated that *para*-phenylenediamine (PPD), an aromatic molecule that can be chemically or electrochemically polymerized into conductive and non-conductive polymers, depending on the conditions used during polymerization,¹³⁻¹⁵ can be oxidised by microencapsulated laccases (Lcc) to electroactive species.^{12-13,16-17} Another limitation of such capsules is the insulating nature of the poly(ethyleneimine) (PEI) used in the microcapsules walls, and which prevents establishing a fast electron transfer and requires the use of a dissolved mediator. Our strategy towards biofuel cells improvement is to adapt our immobilisation platform to allow the electron transfer between the enzyme and the electrode by means of a conductive template (Figure 5.1).

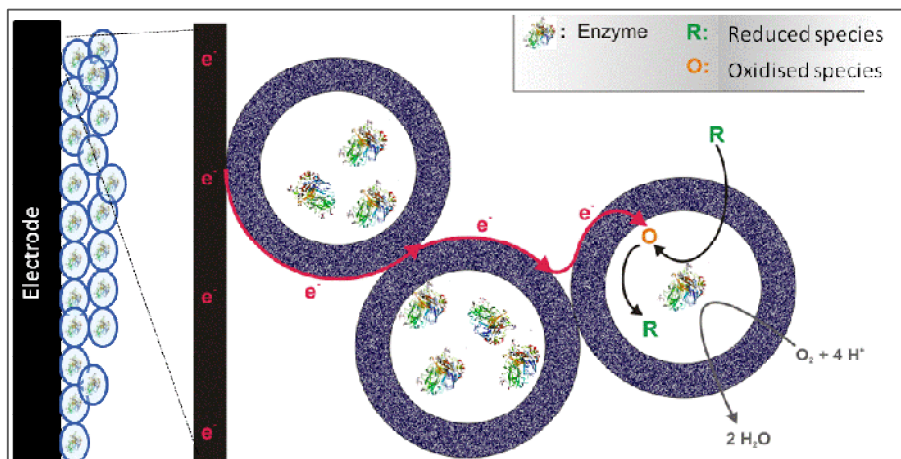


Figure 5. 1 : Scheme of microencapsulated enzyme as a conductive template for biofuel cell technology.

Carbazole (CBZ) is an important heteroaromatic compound that can be extracted from coal and synthesised from the reaction of 2-nitrobiaryl with triphenylphosphite with moderate to excellent yields (35-83%).¹⁸ Since the discovery of conducting polymers in 1977,¹⁹ carbazole chemistry has been revisited and oriented towards the synthesis of conjugated polymers in which carbazole monomers are covalently incorporated in the main chain as building blocks. It is now well known that *N*-substituted carbazole and its derivatives polymerise via two different linkage positions as poly(3,6- and 2,7-carbazole) derivatives.²⁰ The first type possesses the highest electron density when linked either directly or via π -spacers.²¹⁻²² It has also been reported that their good electrical and electrophosphorescence properties are of interest for an application in batteries²³ and organic light emitting diodes (OLED)²⁴ technologies. The second type shows promising optical properties in the visible region for light emitting diode (LED) devices.^{20,25} Considerable efforts were made over the last decade to develop efficient methods for their functionalisation on 3,6 and 2,7 positions toward conductive polymers. It has been demonstrated that 1,8-diaminocarbazole (1,8-(NH₂)₂CBZ), which has a greater electronic density at the 3,6 linking position, has interesting redox properties in organic and aqueous media.²⁶⁻²⁸ Recently, our research group developed new synthetic protocols²⁹ to obtain 1,8-

diaminocarbazole, 1,6-diaminocarbazole and 1-amino-3,6-dibromocarbazole, which are considered interesting monomers that can be used to obtain functionalised polymers suitable for enzyme microencapsulation.

Herein, we report the design of microcapsules made of poly[(9H-octylcarbazol-3,6-diyl)-alt-co-(2-amino-9H-carbazol-3,6-diyl)] as an electroactive immobilisation template for Lcc microencapsulation. Comparison studies of the latter copolymer, 1,8-diaminocarbazole and 1-amino-3,6-dibromocarbazole by cyclic voltammetry are described clarifying the electropolymerisation reactions mechanism for the monomers and the role of primary amine on aromatic rings for the electroactivities of all candidates studied. Enzymatic activity measurements of microencapsulated and free laccase by Clark electrode was realised with PPD as substrate. Finally, electrochemical characterisations of a platinum electrode functionalised with these capsules was investigated.

5.3 Methods

5.3.1 General methods

Poly(ethyleneimine) (PEI, $M_n = 1200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; 50% in water), sebacoyl chloride (SC), Span[®] 85, *p*-phenylenediamine (PPD), Benzene-1,4-diboronic acid, thiophene-2,5-diboronic acid and Laccase II (E.C. 1.10.3.2) from *Trametes Versicolor* (> 20U/mg) were purchased from Sigma-Aldrich. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) diammonium salt (ABTS) was purchased from Boehringer Mannheim. All salts used for buffer preparation were from A&C American Chemicals Ltd. All solvents were purchased from Fisher Scientific. McIlvaine buffer solutions were prepared as indicated in the literature.³⁰ Deionized water (18M Ω .cm) from a MilliQ water purification system was used for aqueous solutions. 3,6-dibromo-9-(3-Boc-aminopropyl)-9H-carbazole, 9-octyl-3,6-bis(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-9H-carbazole, Pd(PPh₃)₄, and 2,7-

dibromo-9,9-bis-(3-Boc-aminopropyl)-9H-fluorene were provided by Solaris Chem Inc. 3,6-dibromo-1-nitro-carbazole (**3,6-Br₂-NO₂-CBZ**) and 1-amino-3,6-dibromocarbazole (**1-NH₂-3,6-Br₂-CBZ**) were synthesised according to literature.²⁹ All microcapsules were stored at 4°C after fabrication.

5.3.2 Synthesis of copolymers

CoPoA: Poly[(9H-aminopropylcarbazol-3,6-diyl)-alt-co-(1,4-phenylene)]. In a 250 mL three neck flask having a condenser 3,6-dibromo-9-(3-Boc-aminopropyl)-9H-carbazole (1.78 g, 3,69 mmol), benzene-1,4-diboronic acid (613 mg, 3,70 mmol), and potassium carbonate (3,06 g, 22,2 mmol) were added followed by the addition of deoxygenated THF (100 mL) and deoxygenated distilled water (50 mL) under an inert atmosphere of argon. The mixture was purged with argon for 5 min prior to the addition of Pd(PPh₃)₄ (213 mg, 0,184 mmol). The mixture was refluxed for 24 h and then cooled down to room temperature. The organic layer was separated and filtered over filtration paper (Whatman[®], grade 1) and MeOH (100 mL) was added, which resulted in precipitation of a very fine grey solid. The resulting polymer was filtered and washed with MeOH. The polymer was then dissolved in THF (50 mL) and HCl conc (2 mL, 37 %) was added for deprotection of the NH-BOC. After 2 days, all the volatiles were removed to afford CoPoA (1,16 g) as a yellow solid.

GPC analysis. $M_w = 2020$, $M_n = 1900$, $pd = 1.06$

CoPolyB: Poly[(9,9-diaminopropylfluorenyl-2,7-diyl)-alt-co-(1,4-phenylene)]. **CoPoB** was synthesised according to **CoPoA** using 2,7-dibromo-9,9-bis-(3-Boc-aminopropyl)-9H-fluorene (1,59 g, 2,49 mmol), benzene-1,4-diboronic acid (412 mg, 2,49 mmol), potassium carbonate (2,06 g, 14,9 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (143 mg, 0,124 mmol). This gave CoPoB (700 mg) as a beige solid.

GPC analysis. $M_w = 1780$, $M_n = 1730$, $pd = 1.03$

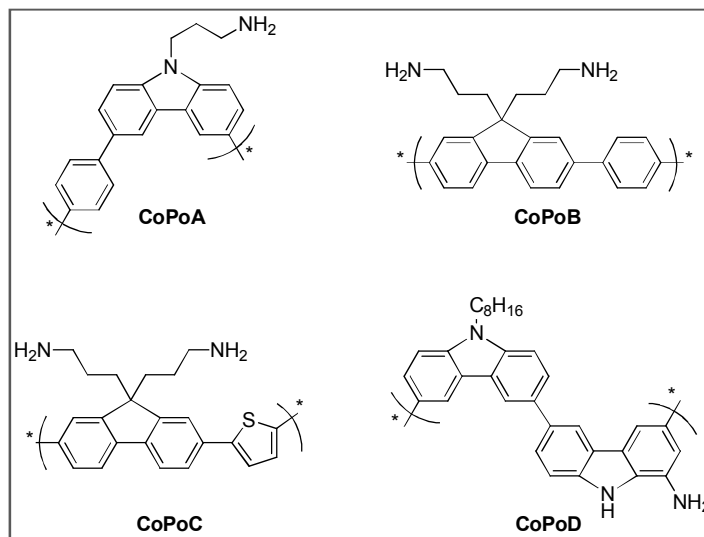
CoPoC: Poly[(9,9-diaminopropylfluorenyl-2,7-diyl)-alt-co-(2,5-thiophene)].

CoPoC was synthesized according to CoPoA using 2,7-dibromo-9,9-bis-(3-Boc-aminopropyl)-9H-fluorene (997 mg, 1,56 mmol), thiophene-2,5-diboronic acid (268 mg, 1,56 mmol), potassium carbonate (1,30 g, 9,41 mmol) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (90 mg, 0,078 mmol). This gave CoPoC (512 mg) as a beige solid.

GPC analysis. $M_w = 2250$, $M_n = 2640$, $pd = 1.17$

CoPoD: Poly[(9H-octylcarbazol-3,6-diyl)-alt-co-(2-amino-9H-carbazol-3,6-diyl)]. In a 100 mL three neck flask 9-octyl-3,6-bis(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-9H-carbazole (685 mg, 1,29 mmol), 3,6- $\text{Br}_2\text{-NO}_2\text{-CBZ}$ (477 mg, 1,29 mmol), and tetraethyl-ammonium hydroxide (20% aqueous solution; 4.0 mL, 5,2 mmol) were added followed by addition of deoxygenated toluene (20 mL) under an inert atmosphere of argon. The mixture was purged with argon for 5 min prior to addition of $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (30 mg, 0,026 mmol). The mixture was stirred for 24 h at 80 °C and then cooled down to room temperature. MeOH (100 mL) and HCl conc (1 mL, 37%) were added to the mixture, which resulted in precipitation of a red solid. The resulting polymer was filtered and washed with MeOH. The polymer (530 mg) was then dissolved in THF (75 mL) and Pd/C (10%, 130 mg) was added and allowed to react with hydrogen (55 psi) over a period of 24h. The resulting solution was filtered over Celite and the volatiles were removed to afford CoPoD (460 mg) as a red solid.

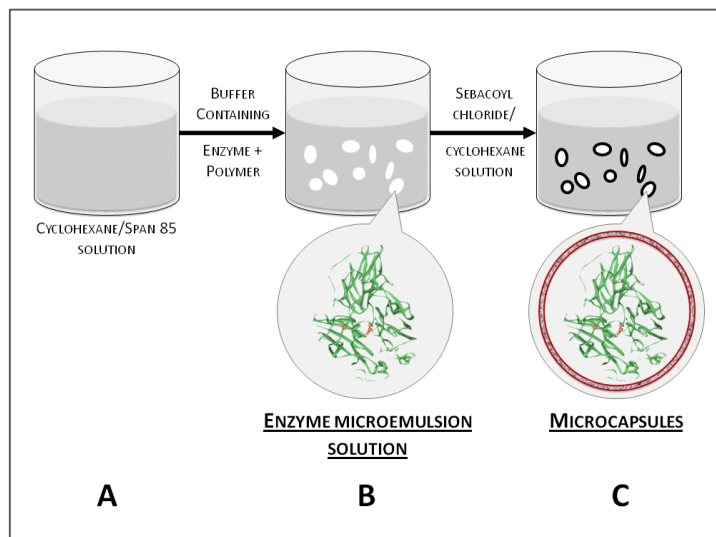
GPC analysis. $M_w = 7000$, $M_n = 3180$, $pd = 2.20$



Scheme 5. 1 : Structure of copolymers studied.

5.3.3 Microcapsule design

PEI microcapsules (control). PEI microcapsules were prepared from a modified procedure (Scheme 5.2) published by our group.^{13,16} In a test tube (16x125 mm) containing 0.45 mL of water and 0.45 mL of THF, 0.1 mL of PEI 50% was added. In another test tube, 0.05 mL of sebacyl chloride was added to a volume of 0.9 mL of cyclohexane. Both solutions were stirred for one minute. Meanwhile, 5 mL of cyclohexane and 0.02 mL of Span[®] 85 were stirred at 400 rpm using a double helix impeller in a 100 mL beaker. Then, the previously prepared aqueous/THF solution was poured in the reaction vessel; a milky solution was observed instantly. After a minute, the organic solution, containing the reticulating agent, was poured and microcapsules were formed instantly. An additional volume of cyclohexane (10 mL) was added to stop the reaction. The suspension of microcapsules was then recuperated by filtration and washed with a large volume of water.



Scheme 5. 2 : General scheme for microcapsule fabrication.

CoPolyD/PEI microcapsules. A similar protocol as the one for PEI microcapsules was used, but the aqueous solution (twice volume, same proportion of water and THF) contained 10.75 mg of CoPolyD, 3.92 mg of Laccase and 0.1 mL of PEI 50%. The volumes of cyclohexane and sebacoyl chloride (test tube) were kept the same while the volumes (cyclohexane and Span[®] 85) in the reaction vessel were doubled.

5.3.4 Enzymatic activity measurements

Free and microencapsulated laccase's enzymatic activities were measured by oxygen consumption in the presence of a substrate (ABTS or PPD) with an oxygen electrode apparatus (Rank Brothers Ltd.). The water jacketed oxygen cell was thermostated to 27°C using a circulating bath. In this instrument, the O₂ concentration in the cell is measured by the current generated by the reduction of O₂ at a Pt electrode poised at a potential of -0.6V vs. Ag/AgCl. The working and reference electrodes are isolated from the

solution by a gas-permeable membrane. The cell was calibrated before each experiment by saturating the solution (buffer) containing the free or microencapsulated enzyme with oxygen ($[O_2] = 7.95 \text{ mg.L}^{-1}$ at 27°C). Laccase activity is expressed in units (U), where 1U equals the necessary amount of enzyme to form $1 \mu\text{mol}$ of $\text{ABTS}^{\bullet-}$ or $\text{PPD}^{\bullet+}$ per minute.

5.3.5 Electrochemical characterisations

The electrochemical measurements were performed at room temperature in a homemade heart-shaped electrochemical cell using a Parstat 2273 potentiostat of Princeton Applied Research with the acquisition software Powersuite version 2.58. All solutions (3 mL) were degassed with nitrogen for 5 min prior to measurements. A Pt electrode (Bioanalytical Systems; 0.0249 cm^2) and a Pt mesh (Aldrich) were used as working and auxiliary electrodes respectively. An Ag/AgCl (BAS; 3M NaCl) was used as the reference electrode. For the experiments where the working electrode was modified by a layer of microcapsules, the electrode was soaked in the buffer solution for a period of 30 min prior to its use. Solutions that contains Laccase dissolved were saturated with air at room temperature for 10 min. Diamond (1 micron particles, Buelher, Metad II) and alumina (0.05 micron Buelher, Gamma) pastes were used for polishing the electrode on a rotating plate with nylon cloth (Buelher, 8×0 Nylon Cloth PSA) prior to all electrochemical measurements. The electrodes were then immersed in EtOH 95% and sonicated for 10 min. The auxiliary electrodes were cleaned using a hot flame for a few seconds. Electrolytic solutions that contain copolymers were prepared with 50 mg/mL and those that contain monomers were prepared at a concentration of 1 mM.

5.4 Results and discussion

5.4.1 Electrochemical investigation of copolymers, 3,4-(⁺NH₃)₂CBZ, 1,8/1,6-(NH₂)₂CBZ and 3,6-Br₂-1-(NH₂)CBZ.

The synthesis of 1,8-(NH₂)₂CBZ developed by our group lead to a structural isomers mixture before purification, where the amino groups are located in positions 1,6 or 1,8.²⁹ The two compounds should not have a great difference in their response by cyclic voltammetry (CV). The cyclic voltammograms of the 1,6/1,8-(NH₂)₂CBZ isomers mixture and of the 1,8-(NH₂)₂CBZ are shown in Figure 5.2. In both cases, it is possible to see the formation of an electroactive film during the electropolymerisation from the current increase with cycling. 1,8-(NH₂)₂CBZ (Figure 5.2a) exhibited a sharp peak at 0.74 V in the first scan, which corresponds to the oxidation of the monomer and redox couple. This leads to an increase in the intensity over the subsequent polymerisation cycles, where $E_{p,a} = 0.35$ V and $E_{p,c} = 0.20$ V vs Ag/AgCl are in agreement with the literature.²⁶⁻²⁸ Capillary electrophoresis (CE) confirmed that at least one of the amino groups is protonated and bears a positive charge that has been quickly detected in a pH = 2.5 phosphate buffer. Table 5.1 presents selected parameters that were obtained from the curves analysis (Figure 5.2) and highlights some differences between the two environments. Indeed, the solution that contains the mixture of isomers shows a lower ΔE_p value and a slower decreasing of ΔE_p with cycling vs the pure 1,8-(NH₂)₂CBZ. However, the I_{pa}/I_{pc} ratios are lower and decrease more rapidly for the mixture compared to pure 1,8 isomer. Moreover, regardless of their good redox activity, a stepwise polymer synthesis would use the brominated version of 1,8-(NH₂)₂CBZ in positions 3,6 to control the polymerisation via C-C bonding to obtain the best conductive form of the polymer. However, more synthetic steps are needed to make these two monomers available for such target and the overall yield could decrease rapidly after purification. Thus, microcapsules fabrication at a large scale using these latter becomes less desirable.

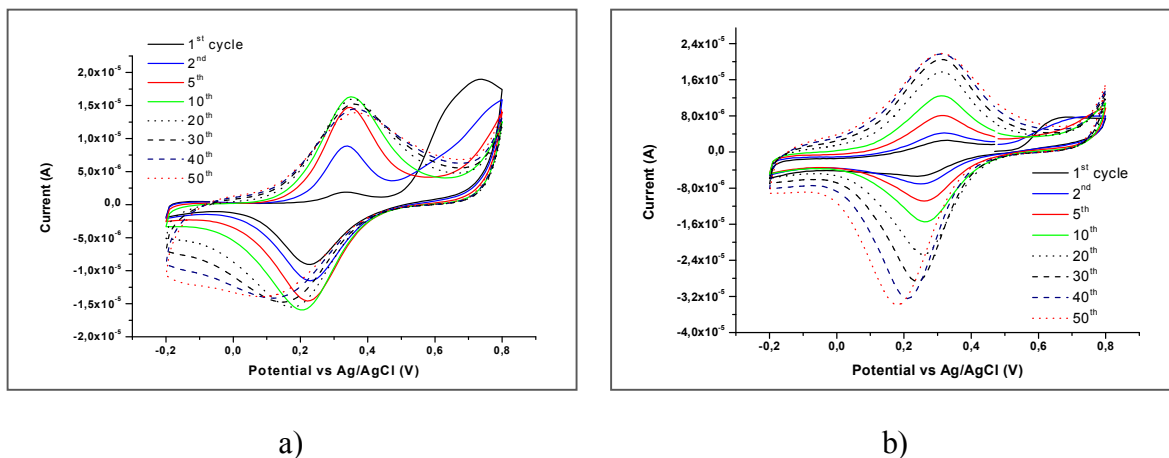


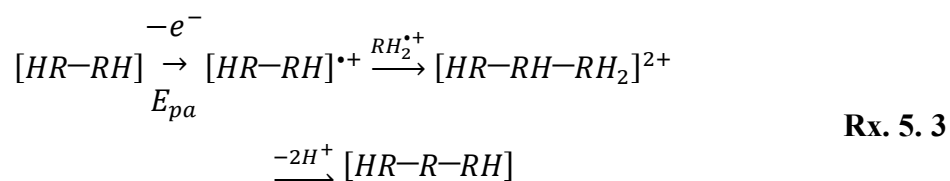
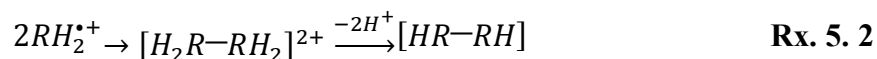
Figure 5. 2 : Cyclic voltammograms of 1mM of a) 1,8-(NH₂)₂CBZ and b) mixture of 1,6/1,8-(NH₂)₂CBZ at $v = 40 \text{ mVs}^{-1}$ in 0.1 M HClO₄.

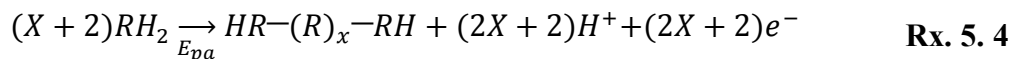
Table 5. 1 : Thermodynamic parameters extracted from Figure 5.2.

Isomer	Cycle	$\frac{E_{p,a}^*/V}{E_{p,c}^\dagger/V}$	$\Delta E_p/mV$	I_{pa}/I_{pc}
1,8	10 th	0.352^* 0.205^\dagger	147	1.14
	30 th	0.358^* 0.145^\dagger	213	0.982
	50 th	0.358^* 0.145^\dagger	277	0.874
Mixture 1,6/1,8 ^a	10 th	$0.315^{*\dagger}$ 0.265	50.0	0.847
	30 th	0.310^* 0.240^\dagger	70.0	0.523
	50 th	0.310^* 0.240^\dagger	130	0.402

^a1,6/1,8 ratio of 1.5:1.

Cyclic voltammograms of 1-NH₂-3,6-Br₂-CBZ and 3,4-(⁺NH₃)₂TPH are shown in Figure 5.3. It has been reported that thiophene has a greater π-electron density on positions 3,4 compared to the 3,6 positions of the carbazole.²² Consequently, thiophene polymerises more easily than carbazole. However, when electron withdrawing groups are inserted on the aromatic ring, π-electron density is dragged towards these groups and modulates the oxidation potential value of the monomer to a more anodic one. Oppositely, an electron donating group will increase the π-electron density of the aromatic ring and modulates the oxidation potential of the monomer by shifting towards cathodic values. In the case of the hydrochloride salt of diaminothiophene (3,4-(⁺NH₃)₂TPH, Figure 5.3b), more anodic potential values are observed compared to thiophene because of the presence of the ammonium groups on the aromatic ring. The oxidation of the monomer is observed at E_a = 0.75 V and the reduction process is attributed to the reduction of oligomers formed following the polymerisation pathway described by the [Rx 5.1] to [Rx 5.4] and is observed at E_c = 0.46 V vs Ag/AgCl. That electropolymerisation is explained by an E(CE)_n cascade mechanism where [Rx. 5.1] to [Rx 5.3] describe the step by step electropolymerisation reaction of a monomer RH₂, while [Rx 5.4] represents the overall reaction.²²





Indeed, when a molecule (R) is electro-oxidised to its radical cation ($R^{\bullet+}$) at the electrode surface, the electron transfer reaction is much faster than the diffusion of R from the bulk solution to the electrode surface. That applied voltage will keep the R molecules close to the electrode surface region in their oxidized state, $R^{\bullet+}$, where its concentration is continuously maintained by the steady state diffusion of R from the bulk. These monomeric radical cations can undergo a variety of follow-up reactions depending upon their intrinsic stability. When $R^{\bullet+}$ is relatively stable, it can diffuse away from the electrode surface and undergo reactions to form low molecular weight soluble products.²² In the case of R is already a polymer and if no deprotonation reaction is favoured or possible once $R^{\bullet+}$ is formed, [Rx 5.4] should not be respected. However, the capacitive behaviour of the electrode does not increase greatly with the cycling (over 50 cycles, not shown) while the faradic current increases with cycling. We removed the working electrode from the solution for polishing and reintroduced it in the solution to verify if a film is formed with cycling. Surprisingly, a freshly polished electrode showed the same cyclic voltammogram in the already used solution (cycle 1). We therefore hypothesise that only soluble oligomers are formed during the electropolymerisation.

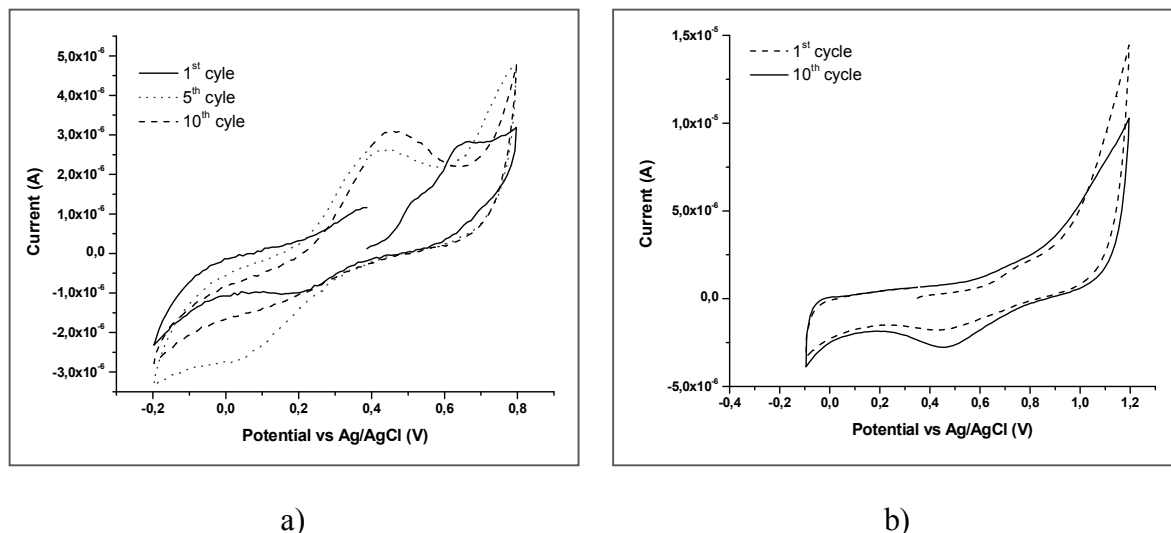


Figure 5. 3 : Cyclic voltammograms of a) 1-NH₂-3,6-Br₂-CBZ at $v = 40 \text{ mVs}^{-1}$ and b) 3,4-(⁺NH₃)₂TPH at $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$ respectively in 0.1 M HClO₄.

We expected 1-NH₂-3,6-Br₂-CBZ (Figure 5.3a) to exhibit a behaviour similar to 1,8-(NH₂)₂CBZ (Figure 5.2a) since the amino group in position 1 has a greater influence on the π -electron density of the aromatic ring compared to the Br present in 3,6 position. Indeed, two oxidation processes similar to the first scan of 1,8-(NH₂)₂CBZ at 0.65 V and at 0.43 V corresponds to the oxidation of the monomer and of the polymers respectively (clearer from the second to the fifth cycle, not shown) while a reduction process is observed at 0.19 V. With subsequent polymerisation cycles, at $E_{\text{pa}} = 0.46 \text{ V}$, the faradic current increases until the 10th cycle (see Figure 5.3a) and subsequently diminishes until a purely capacitive behaviour is observed at the 50th cycle (not shown) for this potential window. Analysis by CE did not give any signal associated to the monomer at pH = 1, while a weak signal on noise ratio at pH = 6 was observed in phosphate buffer indicating that the monomer is not protonated. Also, this means that primary amino groups attached to monomers diffusing from the bulk could react with a $\text{R}^{\bullet+}$ and with polymerisation, there will be no more free amino groups available near the electrode surface. Consequently, the reduction process at 0.19 V disappears with the cycling while the 1,8-(NH₂)₂CBZ (Figure

5.2a) continues to have a redox activity over multiple cycles.

The four copolymers presented in Scheme 1 were studied by cyclic voltammetry in acidic solutions. The potential windows of 1.0 M HCl and 0.1 M HClO₄ at different scan rates have been investigated to verify at which potential oxygen evolution occurs. In these electrolyte solutions, the oxygen evolution reaction (OER) is observed around 1.12 V vs Ag/AgCl on platinum. The hydrogen evolution reaction (HER) zone is less well defined for 0.1 M HClO₄ than for 1.0 M H₂SO₄.³¹ The cathodic limit is observed at -0.50 V vs Ag/AgCl. The thermodynamic parameters calculated from the cyclic voltammogram of CoPoA and B in Figure 5.4a) are very close, showing a similarity in the redox moiety: $E_{a, \text{CoPoA}} = 1.46 \text{ V}$; $E_{a, \text{CoPoB}} = 1.53 \text{ V}$; $E_{c, \text{CoPoA}} = 1.01 \text{ V}$; $E_{c, \text{CoPoB}} = 1.03 \text{ V}$ $\Delta E_{p, \text{CoPoA}} = 450 \text{ mV}$; $\Delta E_{p, \text{CoPoB}} = 500 \text{ mV}$. The fact that both copolymers exhibit conventional diffusion processes demonstrate that the linkage in 3,6 positions of the carbazole unit with phenyl in CoPoA have no significant difference with the linkage of the 2,7 positions of the fluorene unit of CoPoB. In Figure 5.4b, the cyclic voltammogram of CoPoC presents a different behaviour than the typical electropolymerisation of thiophene in aqueous solution. Indeed, the oxidation of thiophene and water (peaks at 1.35 and 1.60 V vs Ag/AgCl) leads to oxygen evolution and the formation of polythiophene at the platinum electrode.³² Both oxidation peaks disappear and the anodic current decreases with cycling. That process led to the formation of a uniform deep yellow film on the platinum electrode that hinders oxygen evolution after several cycles.³² This electro-polymerisation is explained by [Rx 5.1] to [Rx 5.4] described previously.²²

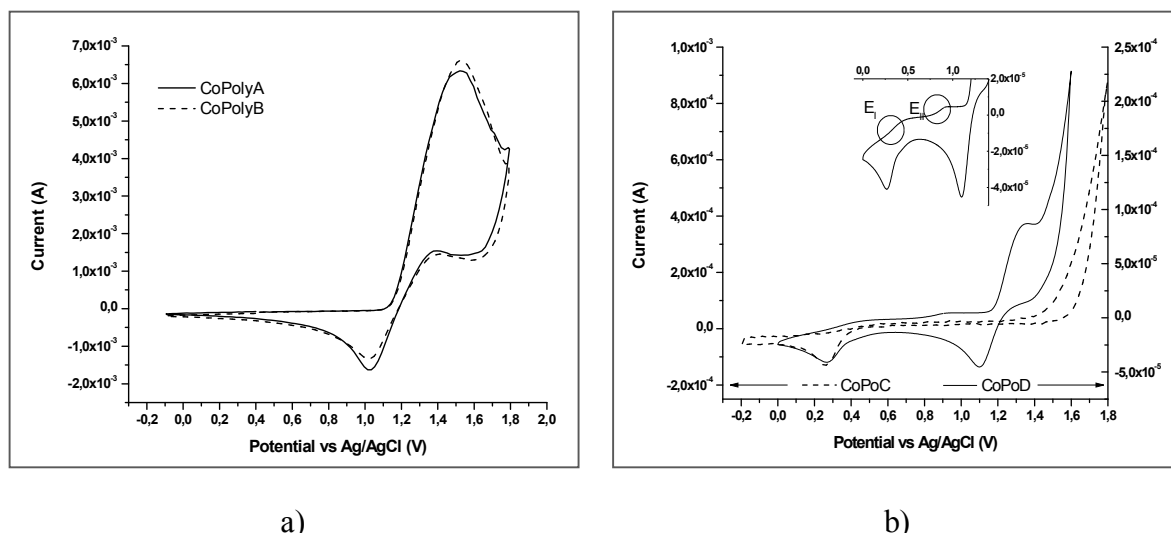


Figure 5. 4 : Cyclic voltammograms after 10 cycles of a) CoPolyA and B at $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$ in 1.0 M HCl; b) CoPolyC and D at $v = 200$ and 100 mVs^{-1} respectively in 0.1 M HClO_4 . Inset graph show closer look of CoPolyC between 0 and 1 V.

CoPoC have on its end chain 3-bromothiophenyl or 2-fluorophenyl groups, which can affect the oxidation potential of the polymer as well as the coupling (tail-tail, head-head or head-tail) of polymer chains together. According to Waltman *et al*,²²⁻²³ the oxidation of 3-bromothiophene in 0.1 M TEAFB/ CH_3CN occurs at 2.06 V vs Ag/AgCl compared to 1.02 V Ag/AgCl for the electropolymerised film on a Pt electrode, while thiophene would oxidise at 2.02 V compared to 0.92 V for the film. These values demonstrate that the propagation pattern should be similar. Interestingly, 3,4-dibromothiophene does have a much more anodic oxidation potential $E_{\text{pa}} = 2.16 \text{ V}$ vs Ag/AgCl compared to 1.35 V for the polymer formed.²² However, we could not reach such potential in 0.1M HClO_4 without OER and investigating properly the HOMO of CoPoC. When cycling below potential of 1.0 V, the reduction process at $E_{\text{c, CoPoC}} = 0.24 \text{ V}$ was not observed while over 2.3 V, it did not increase the cathodic current associated with it. This shows that the reduction process is associated somehow to an oxidation process hidden within the OER. We therefore conclude

that the presence of thiophene moiety greatly stabilise the HOMO of CoPoC compared to phenyl in CoPoB.

In general, the main factors that affect the potential energy of an aromatic molecule are its functionalisation by substituting electrodonor or withdrawing groups and the degree of substitution. Indeed, amino groups on aromatic systems will lower the oxidation potential value compared to non functionalised ones. For example, indole has an $E_{pa} = 1.22$ V compared to an $E_{pa} = 0.64$ V for 5-aminoindole in 0.1M TBAP / CH₃CN.²² Carbazole polymerisation in perchloric acid shows a high irreversible oxidation peak at $E = 0.9$ V vs. SCE, which corresponds to the formation of carbazole cation radicals followed by the C-C dimerisation of these cation radicals resulting in 3,3'-dicarbazyl and/or polymer of similar structure and further oxidation of the dimer. Progressively, two reversible redox processes appeared with the cycling ($E_{1pa} = 0.4$ V, $E_{1pc} = 0.23$ V and $E_{2pa} = 0.82$ V, $E_{2pc} = 0.66$ V) and belong to the dimer and/or the polymer (polycarbazole).³³ The structure of CoPoD have 1-amino-carbazole moiety linked in position 3,6 to a *N*-alkylated carbazole allowing to observed a redox process at $E_{a, CoPoD} = 1.35$ V and $E_{c, CoPoD} = 1.10$ V vs Ag/AgCl. That last oxidation potential is below the two other oxidation values of CoPoA and CoPoB ($E_{a, CoPoA} = 1.46$ V; $E_{a, CoPoB} = 1.53$ V). The reversibility of CoPoD, $\Delta E_{p, CoPoD} = 250$ mV, is greatly improved compared to CoPoA ($\Delta E_{p, CoPoA} = 450$ mV) and CoPoB ($\Delta E_{p, CoPoB} = 500$ mV). It seems that the presence of a primary amino group on the carbazole ring plays an important role in the delocalisation of the positive charge once the $R^{\bullet+}$ is formed. A closer look to the inset graph in Figure 5.4b) indicates the presence of two sigmoidal curves that appeared after the first scan. A differential calculus was applied on these two segments of data to find the inflection points attributed to the half wave potential ($E_{1/2}$) for each process: $E_{I,1/2} = 0.33$ V and $E_{II,1/2} = 0.86$ V vs Ag/AgCl. A cathodic process at $E_c = 0.27$ V, similar to $E_{p,c}$ values shown in Table 5.1, is linked to these oxidations. Usually, sigmoidal curves are characteristic of a spherical or hemispheric geometry electrode for diffusional process in non-hydrodynamic conditions.³⁴ In order to verify if some polymer chains could be electrografted during the cycling, the electrode was rinsed and immersed in

a ferricyanide 0.1 M KCl solution. The typical ferri/ferro redox couple was observed demonstrating that the polymer does not adsorb on or passivates the electrode. However, this does not prove without any doubt that the diffusion process is purely hemispherical. We therefore investigated CoPoD by CE to clarify how the polymer diffuses in the electrolyte and if it bears an overall positive charge or not depending of the pH and voltage applied with two different solutions of phosphate buffer at pH = 1 and 6. For the solution at pH = 1, the polymer could not be detected, but when at pH = 6, a signal was observed. These results suggest that even at pH = 1, the protonation of primary amino groups seems difficult and the majority of the polymer chains are probably not protonated. Consequently, neutral analytes could not be detected at pH = 1, while in buffer pH = 6, a peak was detected after 25 minutes. We conclude that CoPoD does have mostly unprotonated amino groups that could be available to react at the surface of the electrode as it can be seen in Figure 5.4b. However, it is still not clear if the two processes, E_I and E_{II} , are related to a specific orientation or folding of the polymer chains that can affect the oxidation potential of the primary amino group.

5.4.2 Lcc and microencapsulated Lcc activity measurements by oxygen consumption

A popular method to determine the enzymatic activity is to follow the reaction of the enzyme with its substrate spectrophotometrically. In the case of Lcc, its activity can be monitored by the oxidation of $ABTS^{2-}$ to $ABTS^{\bullet-}$ at $\lambda_{max} = 420 \text{ nm}$ ($\epsilon_{420} = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$).³⁵ This method shows two main disadvantages that can be avoided by the use of a technique based on oxygen consumption. A first drawback is the need to determine the molar absorptivity of the oxidized form of various substrates in different conditions (buffers). The second one is the formation of reaction intermediates and unstable reaction products. At elevated ABTS concentrations for instance, a disproportional reaction can result in an

underestimation of the Lcc activity by decreasing the $\text{ABTS}^{\bullet-}$ concentration, which is responsible for the absorbance at 420 nm. Activity measurements by an oxygen cell are therefore more appropriate with substrates that present such complex reactions.¹³ In order to avoid interactions of the redox mediator with the microcapsules wall and to promote the electron transfer between an encapsulated enzyme and an electrode, mediators that are either neutral or slightly positive in their reduced state must be used. PPD is chosen as a substrate for Lcc precisely for this reason. A comparison between Lcc oxidation of PPD and ABTS is thus necessary.

The values reported in Table 2 show an experimental activity for Lcc towards PPD at pH 4.3 with a value of 1268.2 U/mL, which fits with our previous work.^{13,16} Despite this lower affinity compared to ABTS in same conditions,^{13,16} PPD remains a useful Lcc substrate for bioelectrocatalytic systems. Indeed, Table 5.2 indicates that a suspension of microencapsulated Lcc allows PPD to diffuse through the shell and undergo oxidation by the enzyme resulting in an experimental activity of 0.296 U/mL, while a theoretical activity of 16.97 U/mL and an efficiency of 1.74 % were calculated. The theoretical activity was determined from the amount of enzyme used during the microencapsulation fabrication. Two main factors explained why a lower enzymatic activity is observed for microencapsulated enzyme. The first one is that the buffer acetate at pH = 4.3 used here could be not the optimal one for microencapsulated Lcc compare with PPD as the substrate.^{12-13,16} The second one is the microcapsule shell that acts like a barrier and slows down the PPD diffusion, therefore affecting the PPD concentration around the enzyme, which is probably far below the saturated concentration needed by Lcc to work at its maximum rate.

Table 5. 2 : Enzymatic parameters extracted from PPD enzymatic oxydation by free and microencapsulated Lcc in an 0.1 M acetate buffer pH = 4.3.

Lcc	Weight (mg)	Exp. Activity (U/mL)	Theo. Activity (U/mL)	Efficiency (%)
Free	-	1268.2	-	-
μ -caps	49.5 ^a	0.296	16.97	1.7

^a Wet microcapsules previously stored in refridgirator at 4°C for 24 hrs.

5.4.3 Bioelectrode characterisation by cyclic voltammetry

The control PEI microcapsules have been characterised by our group and reported on elsewhere using different electrochemical techniques with PPD substrate.^{12-13,16} We reported that the enzymatic oxidation of PPD leads to the formation of a soluble oligomer that exhibits a redox behaviour and a small $\Delta E_p = 48.0$ mV at a sweep rate of 100 mVs^{-1} .¹⁶ LC-MS experiments revealed a $[M+H]^+$ of 319.16697 g/mol for an aliquot that contain that enzymatic product. In order to verify if enzymatic and self-oxidation reactions lead to the same oligomer product, a 10 mM aqueous solution of PPD was prepared to favour the auto-oxidation reaction. After three months, sufficient dark purple crystals could be extracted. LC-MS revealed a mass $[M+H]^+$ of 319.16661 g/mol and similar retention times than the enzymatic oxidation product (see Supplementary Information). The solution used for oxygen consumption analysis (Table 5.2) was analysed by CV without the microcapsule. It is possible to see that the enzymatic and the self-oxidation reaction lead to the same oligomer and have the same electrochemical signature by CV with our published results.^{13,16} It was therefore concluded that the enzymatic and self-oxidation reactions lead to the same product and it is possible to study free and microencapsulated Lcc by oxygen cell and cyclic voltammetry.

It is expected that microcapsules made of CoPoD and PEI will have a CV signature

similar to CoPoD in Figure 5.4b). Figure 5.5 presents the cyclic voltammograms of a platinum electrode functionalised with microencapsulated Lcc (bioelectrode), where Nafion was used to hold a microcapsule islet over its surface. It is possible to see that the shell of the capsules is electroactive despite the fact that it is not 100% made of CoPoD. An $E_{pc} = 0.06V$ is clearly visible and does not shift with cycling. However, it is not possible to cycle at high anodic potentials since the electrochemical oxidation of PPD leads to the passivation of the bioelectrode as for a bare platinum electrode in an aqueous PPD solution,¹³ further demonstrating that the microcapsules are permeable to PPD.

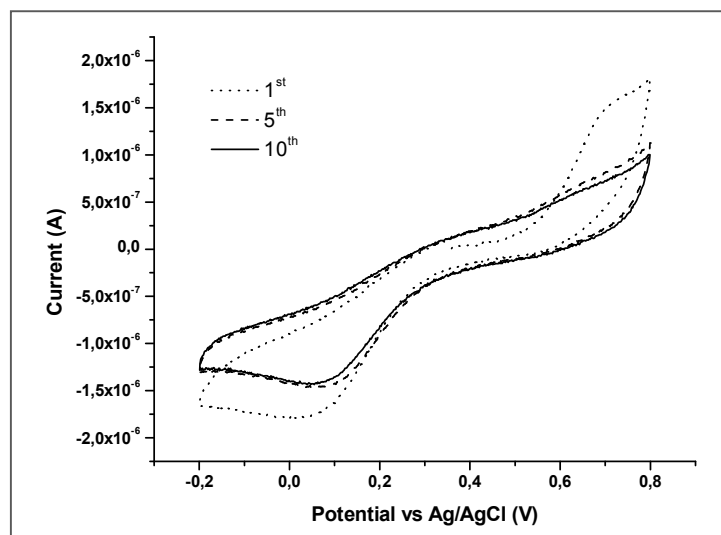


Figure 5. 5 : Cyclic voltammograms of bioelectrode at $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$ in 0.1 M acetate buffer pH = 4.3.

5.5 Conclusions

No significant differences were observed when studying electrochemically and comparing 1,8-(NH₂)₂CBZ and 1,6/1,8-(NH₂)₂CBZ mixture with one another. Therefore,

the polymeric species electrogenerated at the surface of the electrode are similar to each other. Also, it was demonstrated that the presence of an electron withdrawing group on 3,4 positions of thiophene (3,4-(⁺NH₃)₂TPH) raises the difficulty of the electropolymerisation compared to report thiophene polymerisations. The cyclic voltammograms of carbazole bearing halogens on 3,6 positions indicated that the amine on the 1-NH₂-3,6-dibromocarbazole is not protonated in the bulk. Indeed, the disappearance of the faradaic process with cycling leads us to believe that no primary amines are available during the electropolymerisation.

Four copolymers of different structures were studied by cyclic voltammetry. Among them, poly[(9H-octylcarbazol-3,6-diyl)-alt-co-(2-amino-9H-carbazol-3,6-diyl)] (CoPoD) presented an electrochemical behaviour similar to the one of 1,8-(NH₂)₂CBZ and 1,6/1,8-(NH₂)₂CBZ mixture. The cathodic process observed for CoPoD is comparable to the electrochemical behaviour (cycle 1) observed for the previously studied monomers, e.g. the primary amine does not seem to be protonated. The difference compared to the monomers, is that, with cycling, no electropolymerisation occurs.

Also, it was possible to microencapsulate Lcc using a mixture of PEI and CoPoD. The microcapsules thus obtained presented an experimental enzymatic activity of 0.296 U/mL for a calculated efficiency of 1.7% compared to free Laccase in 0.1 M acetate buffer pH = 4.3 at room temperature. This demonstrates that these microcapsules are permeable to PPD. Finally, a bioelectrode was designed from the microcapsules containing Lcc and its electrochemical signature was observed to be close to that of CoPoD. Therefore, we demonstrated that these microcapsules are electroactive and probably suitable for electron shuttling. The study of these microcapsules with various redox mediators is currently underway.

5.6 Acknowledgements

The authors acknowledge NSERC for funding. M. Hébert personally thanks NSERC and FQRNT for research fellowships. Karen Waldron's research group (Université de Montréal) is also thanked for capillary electrophoresis analysis.

5.7 References

1. F. Davis; S. P. J. Higson, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, *22*, 1224.
2. D. Trau; R. Renneberg, *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, *18*, 1491.
3. G. Decher; J. D. Hong; J. Schmitt, *Thin Solid Films*, **1992**, *210*, 831.
4. G. B. Sukhorukov; E. Donath; S. Davis; H. Lichtenfeld; F. Caruso; V. I. Popov; H. Mohwald, *Polym. Adv. Technol.*, **1998**, *9*, 759.
5. A. Blandino; M. Macías; D. Cantero, *Process Biochem.*, **2001**, *36*, 601.
6. L. W. Chan; H. Y. Lee; P. W. S. Heng, *Int. J. Pharm.*, **2002**, *242* (1-2), 259.
7. A. Ghanem; A. Ghaly, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2004**, *91* (2), 861.
8. D. Quong; R. J. Neufeld, *Biotechnol. Bioeng.*, **1998**, *60* (1), 124.
9. M. Monshipouri; R. J. Neufeld, *Enzyme Microb. Technol.*, **1991**, *13* (4), 309.

10. T. L. Whateley In *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications; Microcapsules: preparation by interfacial polymerization and interfacial complexation and their application.*; 1st ed.; Benita, S., Ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, **1996**, 349–375.
11. D. Poncelet; T. Alexakis; B. P. D. Smet; R. J. Neufeld, *J. Microencapsulation*, **1994**, *11* (1), 31.
12. D. Rochefort; L. Kouisni; K. Gendron, *J. Electroanal. Chem.*, **2008**, *617*, 53.
13. M. Hébert; D. Rochefort, *Electrochim. Acta*, **2008**, *53*, 5272.
14. F. Cataldo, *Eur. Polym. J.*, **1996**, *32* (1), 43.
15. K. Jiao; W. Sun; S.-s. Zhang; G. Sun, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *413*, 71.
16. M. Hébert; D. Rochefort, *ECS Transactions*, **2008**, *16* (11), 85.
17. L. Kouisni; D. Rochefort, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2009**, *111*, 1.
18. J. I. G. Cadogan, *Synthesis*, **1969**, *1969* (01), 11.
19. H. Shirakawa; E. J. Louis; A. G. MacDiarmid; C. K. Chiang; A. J. Heeger, *J. Chem. Soc. D*, **1977**, *1977*, 578.
20. J.-F. Morin; M. Leclerc; D. Adès; A. Siove, *Macromol. Rapid Commun.*, **2005**, *26*, 761.
21. T. Michinobu; H. Osako; K. Shigehara, *Macromolecules Rapid Communications*, **2008**, *29*, 111.

22. R. J. Waltman; J. Bargon, *Can. J. Chem.*, **1986**, *64*, 76.
23. P. Novák; K. Müller; K. S. V. Santhanam; O. Haas, *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 207.
24. D. B. Romero; M. Schaer; M. Leclerc; D. Adès; A. Siove; L. Zuppiroli, *Synth. Met.*, **1996**, *80*, 271.
25. N. Blouin; M. Leclerc, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41* (9), 1110.
26. M. Skompska; M. J. Chmielewski; A. Tarajko, *Electrochem. Commun.*, **2007**, *9*, 540.
27. A. Tarajko; H. Cybulski; M. J. Chmielewski; J. Bukowska; M. Skompska, *Electrochim. Acta*, **2009**, *54*, 4743.
28. A. Tarajko; A. Michota-Kaminska; M. J. Chmielewski; J. Bukowska; M. Skompska, *Electrochim. Acta*, **2009**, *54*, 4751.
29. M. Hébert; D. Rochefort, *Synlett*, **2011**, *submitted S86-09-11*.
30. R. M. C. Dawson; D. C. Elliott; W. H. Elliott; K. M. Jones; *Data For Biochemical Research*; Third ed.; Oxford science publications: Oxford, **1986**, 580 p.
31. R. J. Forster; T. E. Keyes In Handbook of Electrochemistry; *Ultramicroelectrodes*; 1st ed.; Zoski, C. G., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **2007**, 155-171.
32. S. M. S.-M. Park, *Synth. Met.*, **1995**, *69*, 311.
33. G. Inzelt, *J Solid State Electrochem*, **2003**, *7*, 503.

34. A. J. Bard; L. R. Faulkner; *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*; 2 ed.; John Wiley & Sons inc.: Hoboken, NJ, **2001**, 833 p.
35. R. Bourbonnais; M. G. Paice; I. D. Reid; P. Lanthier; M. Yaguchi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1995**, *61*, 1876.

6 CONCLUSIONS

L'objectif général de cette thèse a été amené par une problématique reliée dans un premier temps à la demande énergétique estimée pour la conception de différents implants artificiels pour le domaine médical. Ajouté à cela, plus spécifiquement les ensembles d'appareils de diagnostique et de traitement destinés à des patients souffrant de diabète de type 1 (pompes à insuline et glucomètres). L'utilisation des pompes à insuline actuellement disponibles sur le marché requiert pour fonctionner des piles au lithium qui ont besoin constamment d'être rechargées ou tout simplement disposées pour des modèles jetables. De plus, l'utilisation d'un réservoir à insuline impose une restriction majeure quant à la miniaturisation de ce type d'appareil. Pour ce qui est du glucomètre proprement dit, l'utilisation de bandelettes-test jetables peut s'avérer onéreuse à long terme. Dans un deuxième temps, il est également à toutes fins pratiques impossible de rendre insulino-indépendant sur une période de plus de cinq ans les patients ayant subi une greffe d'îlots de Langerhans. Puisque le nombre de donneurs de pancréas cadavériques est faible, l'accessibilité à une greffe d'îlots est réservée aux patients présentant des conditions particulières et un contrôle ardu de leur glycémie malgré les injections quotidiennes d'insuline.

Pour répondre simultanément aux limitations de la pompe à insuline ainsi qu'à la greffe d'îlots de Langerhans par exemple, nous avons proposé ici le prototype d'une biopile à combustible tout-en-un (implant artificiel) utilisant un système glucose oxidase/laccase microencapsulées, qui servirait à alimenter le glucomètre pour une lecture de la glycémie en temps réel, et qui fournirait conjointement l'énergie nécessaire au fonctionnement du compartiment contenant les îlots de Langerhans microencapsulés responsables de la production d'insuline. C'est donc l'aspect «biopile» d'un tel prototype d'implant artificiel qui a notamment été ciblé comme point de départ pour les travaux de recherches présentés dans cette thèse. L'objectif principal de cette dernière consistait à élaborer une plateforme

conductrice d'immobilisation d'enzymes afin d'augmenter l'efficacité du transfert électronique entre l'électrode et l'enzyme pour application en biopile. Cet objectif a donc été divisé en trois sous-objectifs : 1) identification d'un substrat enzymatique ayant des propriétés rédox et pouvant diffuser à travers les microcapsules, 2) développement et optimisation d'une route de synthèse du monomère clé identifié pour la fabrication du polymère conducteur recherché et enfin 3) microencapsulation d'enzymes avec le polymère conducteur identifié pour fabriquer une bioélectrode et caractérisation de ce système par différentes techniques électrochimiques.

Le chapitre 2 présentait dans un premier temps la théorie, les concepts ainsi que les développements mathématiques nécessaires à la compréhension des équations analytiques utilisées lors des expériences de caractérisations électrochimiques tout au long de cette thèse. La deuxième section quant à elle présentait les techniques de caractérisations électrochimiques qui ont été utilisées permettant d'extraire les informations nécessaires à l'évaluation de notre plateforme d'immobilisation d'enzymes grâce en outre aux équations analytiques expliquées dans la première section de ce chapitre.

Le chapitre 3 présentait les travaux réalisés dans le cadre du premier sous-objectif. Il a été possible d'identifier dans quelles conditions le *p*-phénylènediamine (PPD) peut être utilisé comme substrat de la laccase. Il a été démontré que dans des conditions stationnaires (aucune agitation dans la solution), les radicaux PPD^{•+} formés électrochimiquement en surface d'une électrode sont à nouveau oxydés pour donner des diimines qui à leur tour réagissent chimiquement entre elles pour former un film passivant l'électrode de travail. Lorsque la laccase se retrouve dans le milieu électrolytique, une réaction enzymatique a lieu et mène à la formation éventuelle d'un oligomère ayant un potentiel apparent, E' , situé à -25 mV vs Ag/AgCl. La présence de ce couple rédox a été identifiée comme étant un oligomère ayant une masse molaire de $[M+H]^+ = 319.16697$ g/mol déterminée par LC-MS et s'est avéré être identique au produit d'auto-oxydation du PPD (voir Chapitre 5). Sous conditions hydrodynamiques, l'oxydation du PPD vers sa forme diimine est complètement réversible

démontrant ainsi que le phénomène de passivation, observé en conditions stationnaires, fait intervenir une autre réaction impliquant le PPD⁺⁺ et la diimine en surface de l'électrode. Lorsqu'une électrode est modifiée avec des microcapsules à base de PEI, les voltampérogrammes cycliques alors observés pour une solution de PPD sont élargis comparativement à une électrode non-modifiée. Ceci démontre que les microcapsules agissent tel un obstacle à la diffusion du substrat vers la surface de l'électrode. De plus, la passivation est également observée sous ces conditions démontrant par le fait même que l'oxydation électrochimique du PPD est à éviter dans tous les cas. Ainsi, si le PPD est oxydé par la laccase, il est possible d'envisager que la formation de l'oligomère est suffisamment lente pour être évité dans le cas où la réduction du PPD⁺⁺ serait réalisée en surface des microcapsules conductrices.

Le chapitre 4 présentait les travaux réalisés dans le cadre du deuxième sous-objectif, soit le développement et l'optimisation d'une route de synthèse du monomère clé. La famille des poly(aminocarbazoles) a été identifiée comme cible pour remplacer le PEI dans la fabrication de microcapsules conductrices. Pour ce faire, la synthèse du monomère 1,8-diaminocarbazole a été explorée dans le cadre de ce projet de recherche. À priori, il a été impossible d'obtenir ce monomère en se basant sur les travaux déjà publiés, soit ceux de Chmielewski (voir Section 1.5.4). Ainsi, il a donc été nécessaire d'élaborer une nouvelle route de synthèse pour le 1,8-diaminocarbazole. En considérant les travaux de recherche de Monguchi *et al.*, le protocole de synthèse présenté a pu être optimisé afin d'obtenir les isomères 1,6 et 1,8 diaminocarbazoles. De manière succincte, ce protocole se divise en deux étapes. Tout d'abord, à partir du 3,6-dibromocarbazole, disponible commercialement, une réaction de nitration a été réalisée pour ainsi obtenir un mélange de produits nitrés ne pouvant être séparés de manière efficace. Par la suite, une réaction de déhydrodéhalogénéation suivie de la réduction des groupements nitros en amines a conduit à l'obtention des isomères 1,6 et 1,8 diaminocarbazoles en proportion 1.5 :1. Il a été possible de séparer ces deux composés par un procédé de séparation *SP4TM Purification System* de la compagnie Biotage[©]. Toutefois, cette façon de faire est beaucoup trop longue pour

permettre son utilisation courante dans le processus d'obtention du 1,8-diaminocarbazole en grande quantité pour la fabrication d'un polymère conducteur constitué uniquement de ce dernier. Il n'est donc pas avantageux de procéder d'une telle manière dans une optique à grande échelle. Une alternative a donc été apportée, soit l'utilisation du 3,6-dibromo-1-nitrocarbazole obtenu par une réaction de nitration sur le 3,6-dibromocarbazole. Ce dernier s'est avéré être le monomère clé à utiliser pour obtenir les polymères ou copolymères utilisés dans la fabrication des microcapsules conductrices. Malgré le choix alternatif du 3,6-dibromo-1-nitrocarbazole, il importe de mentionner qu'il a tout de même été possible de synthétiser et de séparer de manière efficace le 1,8-diaminocarbazole ainsi que son isomère, le 1,6-diaminocarbazole. L'obtention de ce dernier monomère revêt une importance primordiale puisqu'à notre connaissance aucun protocole de synthèse du 1,6-diaminocarbazole n'était disponible dans la littérature.

Le chapitre 5 présentait les expériences et les résultats se rapportant au troisième sous-objectif. Tout d'abord, une étude comparative sur le comportement électroactif des monomères synthétisés au chapitre 3 avec le 3,4-($^+\text{NH}_3$)₂CBZ a été réalisée dans du HClO_4 à 0,1 M. Lorsque le monomère carbazole est toujours protégé aux positions 3 et 6, les processus d'oxydation et de réduction du monomère sont plus difficiles que dans le cas des isomères 1,6 et 1,8 diaminocarbazoles. Des analyses par électrophorèse capillaire ont permis de démontrer que le 1-amino-3,6-dibromocarbazole n'est pas protoné à un $\text{pH} = 1$, ce qui nous amène à formuler comme hypothèse que la forme neutre de ce monomère peut réagir rapidement avec sa forme oxydée. Cette nouvelle entité subissant une électropolymérisation formerait un polymère ne contenant pratiquement plus de groupements amines responsables de la réversibilité observée dans le cas des isomères 1,6 et 1,8 diaminocarbazoles. Dans le cas du 3,4-($^+\text{NH}_3$)₂CBZ, la présence des groupements ammonium sur le cycle aromatique rend plus difficile l'oxydation du monomère comparativement au cas du thiophène rapporté dans la littérature. La fabrication de quatre copolymères a été réalisée grâce à la collaboration de la compagnie Solaris Chem Inc. Parmi ces copolymères (CoPoA, CoPoB, CoPoC et CoPoD), un seul possède des

groupements amines directement attachés à la structure aromatique de la chaîne polymérique, soit le poly[(9H-octylcarbazol-3,6-diyl)-alt-co-(2-amino-9H-carbazol-3,6-diyl)] (CoPoD). Le voltampérogramme cyclique de ce copolymère a permis de retrouver un processus cathodique $E_c = 0,27 \text{ V}$ qui s'apparente à la signature du mélange des isomères 1,6 et 1,8 diaminocarbazoles dont une valeur de $E_{p,c} = 0,265 \text{ V vs Ag/AgCl}$ a été déterminée au dixième cycle. Par contre, il n'a pas été possible de retrouver une valeur de potentiel de pic anodique, $E_{p,a}$, autour de $0,352 \text{ V vs Ag/AgCl}$ tout comme la solution monomérique. À la place, deux processus anodique $E_{I,1/2} = 0,33 \text{ V}$ et $E_{II,1/2} = 0,86 \text{ V vs Ag/AgCl}$ ont été observés et reliés au processus cathodique mentionné ci-haut.

Tel qu'attendu, il a été démontré par VC que le CoPoD possédait les propriétés électroactives recherchées pour la fabrication de microcapsules conductrices. Cependant, une quantité relativement faible de copolymère synthétisé nous a forcés à non pas construire des microcapsules fait seulement de CoPoD, mais plutôt de le prendre comme additif à une solution de PEI en apportant des modifications au protocole de fabrication des microcapsules de PEI déjà publié par notre groupe. Ainsi, une électrode de Pt modifiée avec ces nouvelles microcapsules contenant de la Lcc a pu être étudiée par voltampérométrie cyclique dans une solution de PPD. Un processus cathodique stable avec le cyclage de potentiel et situé à $E_{p,c} = 0,06 \text{ V vs Ag/AgCl}$ dans un tampon acétate à $0,1 \text{ M}$, nous amène à croire que cette signature est de nature différente que celle obtenue dans le cas de microcapsules de PEI seulement (Figure 3.11). En balayant vers des potentiels plus anodiques, une passivation de l'électrode est obtenue démontrant par le fait même que ces nouvelles microcapsules sont perméables au PPD. Des mesures par électrode de Clark ont permis de trouver que ces microcapsules contenant de la laccase expriment une activité enzymatique expérimentale de $1,7\%$ comparativement à l'enzyme libre en solution. L'hypothèse pour cette faible valeur est que les microcapsules agissent comme barrière au PPD affectant le transport de masse vers l'enzyme. Ainsi, la concentration du substrat autour de la laccase doit très certainement être loin de celle nécessaire pour atteindre le plateau selon la loi de Michaelis-Menten pour fonctionner à son optimum.

En résumé, l'objectif principal de cette thèse consistait à élaborer une plateforme conductrice d'immobilisation d'enzymes (microencapsulation) afin de permettre un meilleur transfert électronique entre l'électrode et l'enzyme. Ces nouvelles microcapsules peuvent être aisément préparées via une polymérisation interfaciale en incorporant du poly[(9H-octylcarbazol-3,6-diyl)-alt-co-(2-amino-9H-carbazol-3,6-diyl)] comme additif à du poly(éthylèneimine). En plus de démontrer les propriétés électroactives nécessaires à un bon échange d'électrons, ces microcapsules permettent de conserver l'activité enzymatique de la laccase. Le copolymère employé a été synthétisé à partir du précurseur 3,6-dibromo-1-nitro-carbazole. Finalement, une nouvelle route de synthèse, plus simple et plus efficace que celle présentée dans la littérature, a été développée pour la synthèse du 1,8-diaminocarbazole et comporte deux étapes. Mentionons également, que par cette même route de synthèse un second produit, soit le 1,6-diaminocarbazole, a été obtenu et s'est révélé intéressant de part ses propriétés électrochimiques quasi-identiques à son isomère 1,8-diaminocarbazole.

6.1 Perspectives futures

En somme, une plateforme d'immobilisation d'enzymes ayant des propriétés conductrices a été développée répondant ainsi à la problématique mentionnée dans la section 1.3. Rappelons que le *p*-phénylènediamine a été choisi pour la simple raison qu'il diffuse à travers les microcapsules, mais n'est pas le meilleur substrat de la laccase comparativement à l'ABTS. De plus, le copolymère développé n'est soluble qu'en milieu acide ou organique, amenant à utiliser du THF dans la fabrication de ces microcapsules conductrices. Il n'est actuellement pas possible avec ce protocole d'utiliser l'ABTS comme substrat puisque ce dernier diffuserait vers le cyclohexane. Il importerait donc d'encapsuler ce médiateur rédox pouvant être oxydé par la laccase afin qu'il n'interfère pas lors de la réaction de réticulation du polymère conducteur pour la fabrication des microcapsules. De

ce fait, l'enzyme ne souffrirait pas d'une concentration faible du substrat enzymatique empêchant ainsi une baisse drastique de l'activité enzymatique. Par exemple, la fonctionnalisation du copolymère avec un dérivé de l'ABTS serait une solution. Ceci apporterait très probablement une plus grande solubilité au polymère conducteur en milieu aqueux, permettant d'augmenter sa proportion lorsque mélangé au PEI. La présence de ce médiateur rédox dans la paroi de la microcapsule permettrait d'avoir un substrat ayant une meilleure affinité avec la laccase ainsi qu'une réversibilité électrochimique plus adéquate.

Ainsi, l'avenir de notre plateforme d'immobilisation d'enzyme est très prometteur. Nous sommes confiants que les travaux de cette thèse permettront de réaliser d'ici peu une première biopile qui saura répondre aux exigences énergétiques des implants artificiels du domaine médical.

ANNEXE 1

INVESTIGATION OF MICROENCAPSULATED LACCASE AS ENZYME IMMOBILIZATION TEMPLATE FOR APPLICATION IN BIOFUEL

M. Hébert et D. Rochefort, *ECS Transaction*, **16**(11), 85-97 (2008).

Abstract

The electrochemical behavior of microencapsulated laccase with a non-conductive polymer (poly(ethyleneimine), PEI) adsorbed on a glassy carbon electrode (GC) had been investigated. A K_M value of 76 μM and a sensitivity of $16.6 \pm 0.1 \text{ nA}/\mu\text{M}$ with a response time of 7.5s had been determined for a laccase microencapsulated with PEI that was deposited on a bare GC electrode in a McIlvaine buffer at $\text{pH} = 5.75$ with *p*-phenylenediamine (PPD). The bioelectrode has found to have a permeability, P_m , of $4.9 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ for PPD and too strong interactions with 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) acid to observe any diffusion processes. The electrochemical and enzymatic oxidation of PPD was studied under various conditions to

evaluate its reversibility and stability as a suitable redox mediator. RDE experiments showed a passivation for a glassy carbon electrode modified with empty poly(ethyleneimine) microcapsules under static conditions. Under hydrodynamic conditions however, the passivation was slowed down.

Introduction

For over two decades, extensive research on laccases (Lcc) has been done in the fields of biofuel cells¹⁻³ and biosensors.⁴⁻⁶ Many immobilization methods have been developed to modify electrodes with Lcc: (i) adsorption on electrode surfaces, (ii) enzyme entrapment in a matrix of gel, paste or polymer, (iii) enzyme cross-linking, (iv) covalent attachment with a mediator covalently linked at the surface of glassy carbon, gold or platinum electrode and (v) microencapsulation.⁷ Microencapsulation is considered as a very promising technique in enzyme immobilization and could be advantageously used in biofuel cell and biosensor development. Microcapsules can be divided into three main groups, according to their preparation methods: (a) layer-by-layer (LbL) self-assembly technique using polyelectrolytes.⁸⁻⁹ (b) ionic cross-linking of alginate or alginate/chitosan mixtures,¹⁰⁻¹³ and (c) interfacial condensation or polymerization.¹⁴⁻¹⁶ One of the main advantages of this last technique lies in its ability to immobilize high amounts of enzyme. On the other hand, for a suitable bioelectrode built from a microcapsule template, the choice of a redox mediator able to diffuse through the microcapsule walls is a critical step. Indeed, our group previously reported that the dianion 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) acid (ABTS) has too strong interactions with the positively charged microcapsules walls and thus is unable to shuttle electron efficiently.¹⁷ *Para*-phenylenediamine (PPD) is an aromatic molecule mainly used in polymer, textile and hair dye industries which is neutral or slightly positively charged at pH values used to sustain enzyme activity. However, electrochemists use PPD as a monomer that can be chemically or electrochemically polymerized into conductive or non-conductive polymers, depending

on the conditions used during polymerization.¹⁸⁻¹⁹ Because we have to avoid such polymerization, the aim of this work is to determine which conditions will make PPD suitable as a redox mediator for microencapsulated Lcc with PEI adsorbed on a glassy carbon electrode.

Experimental Section

Materials

Poly(ethyleneimine) (PEI, $M_n = 1200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; 50% in water), sebacyl chloride (SC), cyclohexane, Span[®] 80, and *p*-phenylenediamine (PPD) were purchased from Sigma–Aldrich. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) diammonium salt (ABTS) was purchased from Boehringer Mannheim. All salts used for buffer preparation were from A&C American Chemicals Ltd. McIlvaine buffer solutions were prepared as indicated in the literature.²⁰ Deionized water (18 M Ω .cm) from a MilliQ water purification system was used for all solutions. The redox mediator $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ has been synthesized accordingly to a published procedure.²¹ Laccase II (E.C. 1.10.3.2) from *Trametes Versicolor* was produced and partially purified by ion-exchange chromatography on DEAE-Bio-Gel as described previously.²²

Apparatus and Methods

Synthesis of PEI microcapsules. PEI microcapsules were prepared from a procedure published by Poncelet et al.¹⁶ In short, an aqueous phase consisting of PEI (1 mL 50% w/w in water) and milliQ water (8.1 mL) was emulsified by mechanical agitation in an organic phase of cyclohexane containing Span[®] 80 as a surfactant. Sebacyl chloride,

dissolved in cyclohexane, was added to the emulsion and allowed to react for 10 min. An additional volume of cyclohexane was added to gradually stop the reaction. The suspension was then allowed to settle before discarding the supernatant. The microcapsules were rinsed with 50 mL of cyclohexane followed by 300 mL of water, recuperated by filtration and washed with three additional volumes of water. For the adsorption procedure, the microcapsules synthesized were suspended in 95% EtOH solution at 5°C before deposition on the electrode surface.^{17,23}

Adsorption of PEI microcapsules on electrode. A high concentration of microcapsule suspension was taken with a Pasteur pipette and let decanted for a minute. A drop of this suspension was then deposited on the RDE at a rotating speed of 40 rpm to allow formation of a uniform layer of microcapsules.²³

Electrochemical measurements. Electrochemical measurements were performed at room temperature in a homemade heart-shaped electrochemical cell using a Parstat 2273 potentiostat of Princeton Applied Research with the acquisition software Powersuite version 2.58. Electrolyte solutions (3 mL) were all degassed with nitrogen for 5 min before running experiments. A Pt electrode (Bioanalytical Systems; 0.0249 cm²) or a GC electrode (BAS; 0.0707 cm²) and a Pt spiral were used as working and auxiliary electrodes, respectively. RDE experiments were performed on an AFCBP-1 bipotentiostat model (Pine Instruments) using PineChem 2.8.0f acquisition software. Solutions (100 mL) studied under these conditions were all degassed with nitrogen for 15 min before initiating the run. A GC-RDE ($r_{\text{disk}} = 2.5$ mm, Pine instrument) or a GC-Pt RRDE ($r_{\text{disk}} = 2.5$ mm; $r_{\text{inner ring}} = 3.25$ mm, $r_{\text{outer ring}} = 3.75$ mm, Pine Instrument) and a Pt gauze (Aldrich) were used as working (RDE and RRDE) and auxiliary electrodes. In all experiments an Ag/AgCl (BAS; 3 M NaCl) was used as the reference electrode. In the experiments with the GC-RDE modified by a layer of microcapsules, the electrode was soaked in the buffer solution for a period of 30 min at a rotation speed of 40 rpm before being used. In the case of the experiments with laccase, the solutions (3 mL) were saturated with air at room temperature for 10 min. Prior to all electrochemical measurements, the working electrodes were polished with a

homemade polisher equipped with a rotating plate with nylon cloth (Buelher, 8×0 Nylon Cloth PSA). Diamond (1 micron particles, Buelher, Metad II) and alumina (0.05 micron Buelher, Gamma) pastes were used for polishing the electrode. The electrodes were then immersed in a EtOH 95% solution and sonicated for 10 min. The auxiliary electrodes were cleaned with a flame for a few seconds.

Enzymatic activity measurements. Laccase enzymatic activity was measured by oxygen consumption in the presence of a substrate (ABTS or PPD) with an oxygen electrode apparatus (Rank Brothers Ltd.). The water jacketed oxygen cell was thermostated to 27°C using a circulating bath. In this instrument, the O₂ concentration in the cell is measured by the current generated by the reduction of O₂ at a Pt electrode poised at a potential of -0.6V vs. Ag/AgCl. The working and reference electrodes are isolated from the solution by a gas-permeable membrane. The cell was calibrated before each experiment by saturating the buffer solution (acetate or McIlvaine) containing the enzyme with oxygen ([O₂] = 7.95mgL⁻¹ at 27°C). Laccase activity is expressed in units (U), where 1U equals the necessary amount of enzyme to form 1 μmol of ABTS^{•-} or PPD^{•+} per minute.

Results and Discussion

PEI cross-linked microcapsules characterization

Microcapsules were prepared as described in the experimental section. A fast interfacial condensation of the polymer, which is the key to an efficient entrapment of the enzyme into the core of the capsules, was achieved with a diacid chloride. The primary and secondary amines on highly-branched PEI, which together represent about 75% of the total N atoms in PEI,²⁴ react with the acid group at each end of the sebacoyl (decanedioyl) chloride through nucleophilic substitution reaction and covalently links PEI chains together. Since the reticulation is accomplished at the organic–aqueous interface (sebacoyl

chloride is hydrolysed in water), the capsule wall is built around the water (a solution of PEI and laccase) microdroplets formed in the emulsion. Therefore, the microcapsules size is predominantly determined by the size of the microdroplets, which itself depends on the conditions used for the emulsion. Our way of preparation yielded microcapsules with a wide range of diameters ranging from few microns to 50 μm with an average size of 35 μm as determined from microscopic measurements.¹⁷ Confocal laser scanning microscopy (CLSM) image from Figure S1.1 was taken for empty capsules that were labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) as a fluorescent tag that was linked to PEI prior to capsule formation. The focal point of the microscope was set to the center of the capsules, allowing a precise measurement of the diameter. The wall thickness can be controlled with the cross-linker to PEI ratio and is found to be 1.2 μm (also determined by CLSM). This value is consistent with other published results on similar microcapsules.^{17,25}

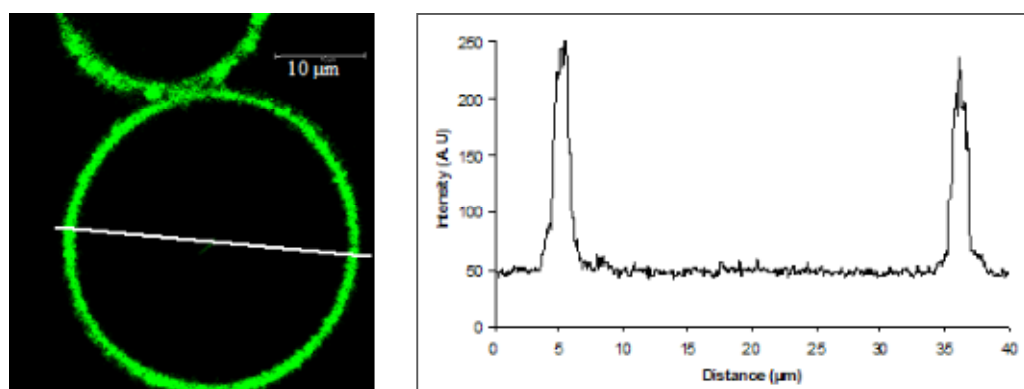


Figure S1. 1 : CLSM image taken at the center of a PEI microcapsule modified with fluorescein isothiocyanate (FITC).

Once deposited on the surface of the electrode described earlier, the microcapsules tend to form aggregates as it can be seen in Figure S1.2. Indeed, a multilayer film of microcapsule was obtained and dried with a light flow of nitrogen (Figure S1.2a). Then a drop of EtOH 95% was poured on the film while the electrode was still rotating. It is clear in Figure S1.2d that the film had been swelling by the solvent. This process can be repeated many times and show an eventual advantage of our immobilization enzyme template. These

bioelectrodes could be stored in a dry environment without risking damaging the microcapsules films.

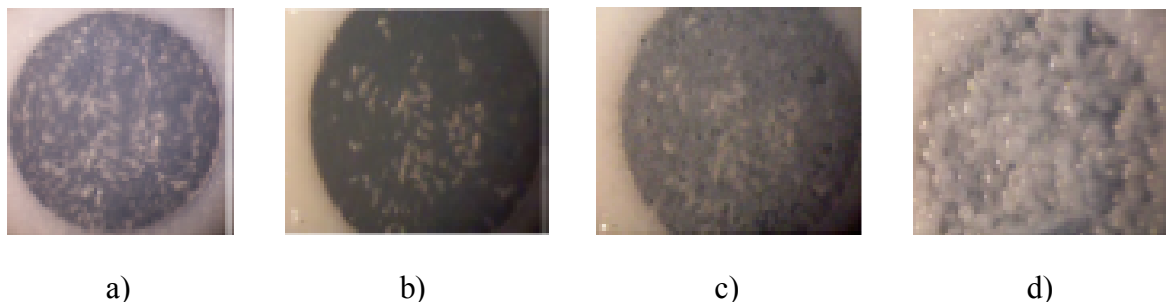


Figure S1. 2 : Image taken of the GC-RDE modified with empty PEI microcapsules. Picture of the hydration process of the adsorbed multilayer microcapsule aggregates at a) 0 secondes b) 3 secondes c) 25 secondes and d) 137 secondes after the deposition of one drop of EtOH 95%.

Laccase activity measurements by oxygen consumption

A popular method to determine the enzymatic activity is to follow the reaction of the enzyme with its substrate spectrophotometrically. In the case of Lcc, its activity can be monitored by the oxidation of ABTS^{2-} to $\text{ABTS}^{\bullet-}$ at $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$ ($\epsilon_{420} = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$).²² This method shows two main disadvantages that can be avoided by the use of a method based on oxygen consumption. A first drawback is the need to determine the molar absorptivity of the oxidized form of various substrates in different conditions (buffers). The second one is the formation of reaction intermediates and unstable reaction products. At elevated ABTS concentrations for instance, a disproportionational reaction can result in an underestimation of the Lcc activity by decreasing the $\text{ABTS}^{\bullet-}$ concentration which is responsible for the absorbance at 420 nm. Activity measurements by an oxygen cell are therefore more appropriate with substrates that present such complex reactions.²³ Figure S1.3 shows an optimum activity of the Lcc at pH 4.5 with a value of $(3500 \pm 100) \text{ U/mL}$.

The activity at pH 4.5 is similar to that at pH 4.25, but the uncertainty on the first one is lower. This value has then been taken for all subsequent measurements of Lcc activity with ABTS.²³

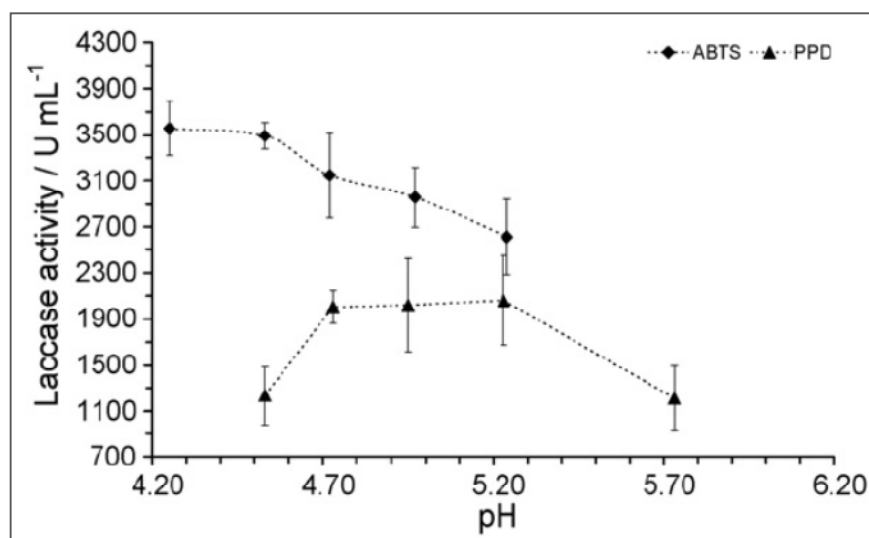


Figure S1.3 : Determination of the optimum enzymatic activity of Lcc with 1 mM ABTS (diamonds) or 1.6 mM PPD (triangles) in 0.1 M acetate buffer. The errors bars represent the incertitude calculated on 3 experiments with a $t_{95} = 4.3$.

The Michaelis–Menten curve was traced by measuring the initial oxidation rate of ABTS by Lcc, using the O₂ consumption method, over a wide range of substrate concentrations. The curve, presented in Figure S1.4, shows a plateau indicative of a saturating substrate concentration when ABTS is present above 0.6 mM. An important parameter of such curve is the Michaelis constant (K_M) that can be calculated with the following Eq. S1.1.

$$\%O_2/s = v_o = (V_{\max} [ABTS]) / (K_M + [ABTS]) \quad \text{Eq. S1.1}$$

The Michaelis–Menten curve was fitted to a hyperbola function where V_{\max} is the asymptote of the curve (the value of %O₂/s at infinite value of [ABTS]) and K_M is the value

of concentration corresponding of $V_{\max}/2$.^{23,26} A K_M of 127 μM was calculated in acetate buffer 0.1 M. Establishing a reliable comparison between K_M obtained by other authors is a very delicate task due to variations in conditions and on the wide variety of Lcc fungal sources reported. Nevertheless, our value of 127 μM falls in the range of others who published K_M between 25 and 177 μM for *Trametes*' laccases with ABTS.²⁷⁻²⁹

To avoid interactions of the redox mediator with the microcapsules wall and promote the electron transfer between an encapsulated enzyme and an electrode, mediators that are either neutral or slightly positive in their reduced state must be used. PPD is chosen as a substrate for Lcc precisely for this reason. A comparison between Lcc oxidation of PPD and ABTS is thus necessary and was done in acetate buffer. The Figure S1.4 shows an optimum activity of the Lcc with PPD at pH 4.7 with a value of (2000 ± 100) U/mL and a value of 3500 U/mL for ABTS at pH 4.5.²³ This difference in the maximal activity is reflected in the Michaelis–Menten curve for laccase-catalysed PPD oxidation where the V_{\max} value for ABTS is higher (Figure S1.4). A K_M of 645 μM was calculated for PPD, a value much higher than that obtained for ABTS which is 128 μM . This indicate the lower affinity of laccase for PPD than for ABTS.²³ Our value agrees with the K_M values for the PPD oxidation by free Lcc from different sources that were found between 0.1 and 5 mM in the literature.³⁰⁻³² Despite this lower affinity, PPD remains a useful Lcc substrate for bioelectrocatalytic systems. However, its reaction with Lcc is much less understood than that of ABTS and several authors reported different behavior for the enzymatic and electrochemical oxidation of PPD as previously mentioned.

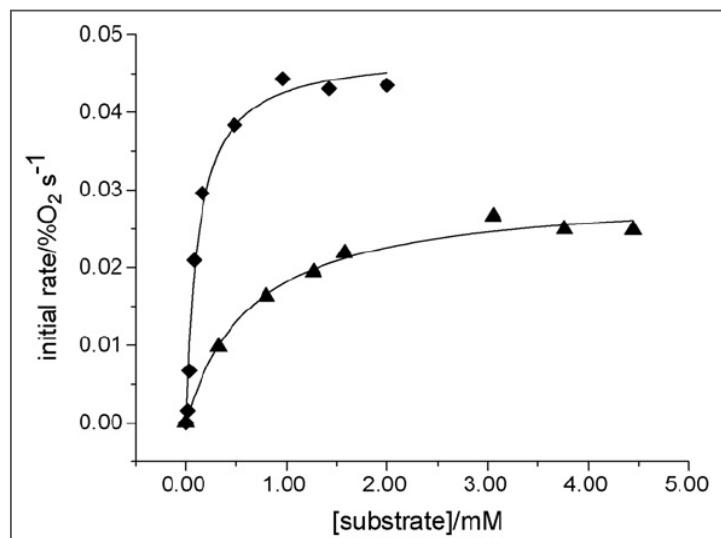


Figure S1. 4 : Determination of the Michaelis–Menten curve for the Lcc with ABTS at pH = 4.5 (♦) and PPD at pH = 4.7 (▲) using the oxygen cell method in 0.1 M acetate buffer.

Study of PPD in acetate and McIlvaine buffer by voltammetric experiments

Different voltammetric experiments had been made in order to see which conditions PPD would exhibit a good redox behavior. Successive potential cycles in a 5 mM PPD solution at pH 4.5 suggest a passivation of the GC electrode since we observed not only an increase in ΔE_p but a significant decrease of the anodic current (Figure S1.5A). As noted in Figure S1.5A, the last of five cycles shows no distinguishable oxidation or reduction peaks. We did also observed the same behavior with a solution 5 times less concentrate and also on Pt electrode (not shown here). We therefore hypothesized the formation of a film from a secondary reaction of the diimine species electrochemically generated by PPD oxidation.²³ To confirm this passivation by a film formation which blocks the electrode, we deliberately passivated the electrode by cycling the GC electrode in the PPD solution. The electrode

was then removed, rinsed and immersed in the same PPD solution where $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ was added as a reversible redox probe. As it would be expected from an electrode that is blocked with a sufficiently thick, insulating film, no redox waves appeared on the CV (Figure S1.5B) for the $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ which has an E° of 543 mV vs. The Ag/AgCl reference. The GC electrode was then removed, polished to get rid to the film and replaced in the same solution of PPD and octacyanomolybdate. The CV curves of Figure S1.5B clearly shows redox processes for the two species PPD and $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ for a clean electrode. Sweeping the potential for several cycles resulted in electrode passivation and the redox process attributed to PPD and $\text{Mo}(\text{CN})_8^{4-}$ disappeared. Again, similar behavior has been observed with a platinum working electrode instead of GC in same conditions (results not shown).²³

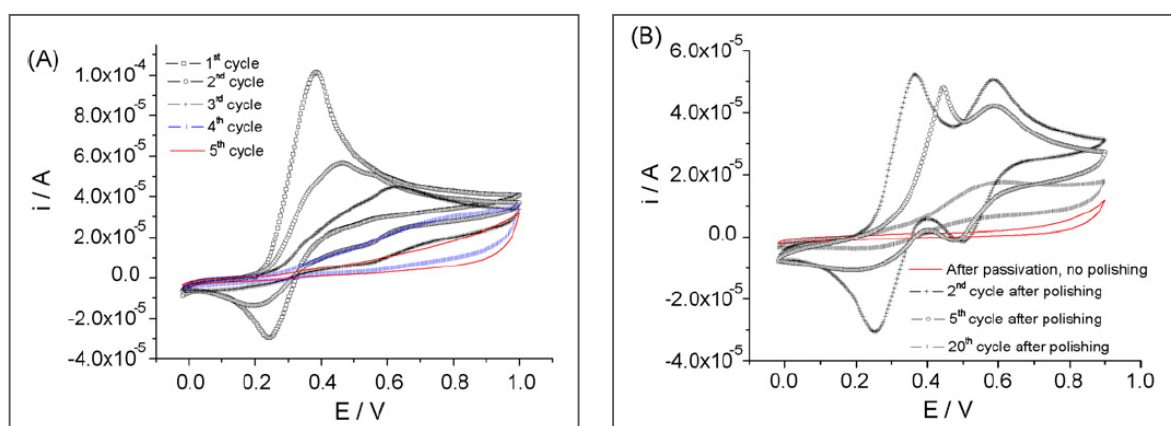


Figure S1. 5 : CVs demonstrating electrode passivation from electrochemical PPD oxidation for (A) 5 mM PPD solution only and (B) same solution with $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ added. $\text{pH} = 4.5$ $v = 40 \text{ mVs}^{-1}$ on GC.

In an attempt to determine which parameters affect the mechanisms involved in the film formation upon *p*-phenylenediamine oxidation, we varied PPD concentration, pH and scan rate. The electrode passivation is much faster at a pH of 6.2 (McIlvaine buffer) than in the acetate buffer solution with a lower pH for voltammograms recorded at the same scan rate (not shown here). We were consistently unable to observe any reduction peak even on

the first cycle. Subsequent cycles showed strong electrode passivation.²³ The pH values have been chosen to allow a comparison with the experiments reported in the literature.⁵ A similar behaviour was reported by Xu and Chen³³ who showed that at 50 mVs^{-1} on Pt microdisk electrode, a poly-PPD film is obtained by cycling between -200 mV and 600 mV vs. SCE. They also observed a completely irreversible oxidation process from the first cycle in a phosphate buffer at pH 7.0 for 0.1 M of PPD. In our case, passivation is achieved less quickly probably because of lower PPD concentration (5 mM vs. 0.1 M).

Table S1.1 shows the thermodynamic parameters determined for the PPD 1.00 mM in acetate and McIlvaine buffers with Pt and GC electrodes. It is shown that all $E_{p,a}$ and $E_{p,c}$ process have similar values in the same buffer and that the ΔE_p is still above the $59 \text{ mV}/n$ value for Nernstian's reversibility (recall that $n = 2$).²³ These observations strongly suggest that the oxidized form of PPD, the diimine, reacts with PPD and polymerizes on the surface of the electrode. This polymerization was already used to immobilize glucose oxidase on the surface of a Pt electrode.³³ In this reference, the authors suggested that the cationic radical PPD^{+} is responsible for the reaction with PPD and film formation. According to Parker and Adams,³⁴ the electrochemical semiquinone formation occurs only at very low pH. Their oxidation curve for PPD obtained in a pH range similar to those used here and in reference³³ shows a one oxidation step of two electrons to the diimine. The diimine then reacts with PPD to form an insulating polymerized film that passivates the electrode. The influence of pH on the passivation can also be explained by the different protonation equilibrium of the diimine.²³ At a pH 6.2 used here, the unprotonated diimine would be found in concentrations higher than at a pH 4.7. The NH groups, more active than the protonated NH^{2+} would favour the reaction with PPD due to the presence of two reactive groups and form an irreversibly oxidized product. The nature of the products remains to be elucidated but they are irreversibly formed and their adsorption on the electrode surface results in a passivated electrode. Possible structures are proposed in reference.³⁵

Table S1. 1 : Comparison of peak potential parameters for the cyclic voltammograms of 1 mM PPD solutions under different conditions.

Electrode	Buffer	pH	$E_{p,a}$ (mV)	$E_{p,c}$ (mV)	ΔE_p (mV)
GC	Acetate 0.1 M	4.7	328	256	72
	McIlvaine	6.2	237	185	52
Pt	McIlvaine	6.2	235	189	46
	McIlvaine	6.2	233 ^a	186 ^a	47

^aValues from reference (5) at $v = 50 \text{ mV}^{-1}$.

Study of Laccase with PPD in acetate buffer by voltammetric experiments

The electrochemical oxidation of the PPD and the electrode passivation in the presence of Lcc had been studied. The PPD oxidation by Lcc, even in solutions with a pH between 4 and 5, involves the PPD^{++} formation as evidenced by an initially yellow color appearance. PPD solutions containing Lcc will eventually turn purple due to the formation of oligomers.²³ By proceeding rapidly to cyclic voltammetry experiments after Lcc addition, determination of the nature of the final products at the electrode will reveal if that product is different from a freshly made solution of PPD (reduced PPD). It has been shown for covalently immobilised laccase on platinum that a stable amperometric response to PPD is obtained.⁵ Moreover, our group reported in a recent manuscript the characterization of a microencapsulated Lcc with PEI on a GC electrode in presence of PPD in McIlvaine buffer. A rapid amperometric response of the bioelectrode was observed.¹⁷ However, with the enzyme in solution rather than immobilised, it is possible to observe different processes that occur at the electrode surface and that are not observed with a thin laccase film adsorbed at the surface of the electrode. A freshly made solution of 1.00 mM PPD in acetate 0.1 M buffer presents no color. It takes about 4 days to see an appreciable purple color in solution due to the PPD auto-oxidation. In voltammetric experiments in the

presence and absence of Lcc, all solutions were freshly made on a daily basis. However, each experiment presented a purple coloration of the PPD solution after a sufficient long time. In CVs recorded for these aged solutions, we observed a reversible couple with an E' centered at about -25mV and an anodic current at $E_{p,a} \cong 0.3$ mV and a cathodic current at $E_{p,c} \cong -47$ mV vs. Ag/AgCl. To rule out the presence of a contaminant in PPD crystals, we recorded the CV of a freshly made solution of 1 mM PPD in the region where we noticed the possible PPD oligomer redox behaviour (not shown). No faradic currents were observed, suggesting that the redox species must be formed during our experiments. As expected after the previous experiment, even with cycling at low sweep rate (20 mVs^{-1}), no faradic currents were observed in the region of interest as it shown in Figure S1.6A. Even when Lcc is added to the solution, no waves can be noted during the first few cycles (Figure S1.6B). After a few cycles and cycling to a potential where we are just on the beginning of the electrochemical oxidation of PPD, it becomes possible to observe the same redox behavior that was present on the CV of an aged PPD solution. Upon cycling, the reduction current for the peak at 250 mV decreases. Oppositely, the oxidation and reduction currents for the redox process observed at -25 mV are steadily increasing with the number of cycles.

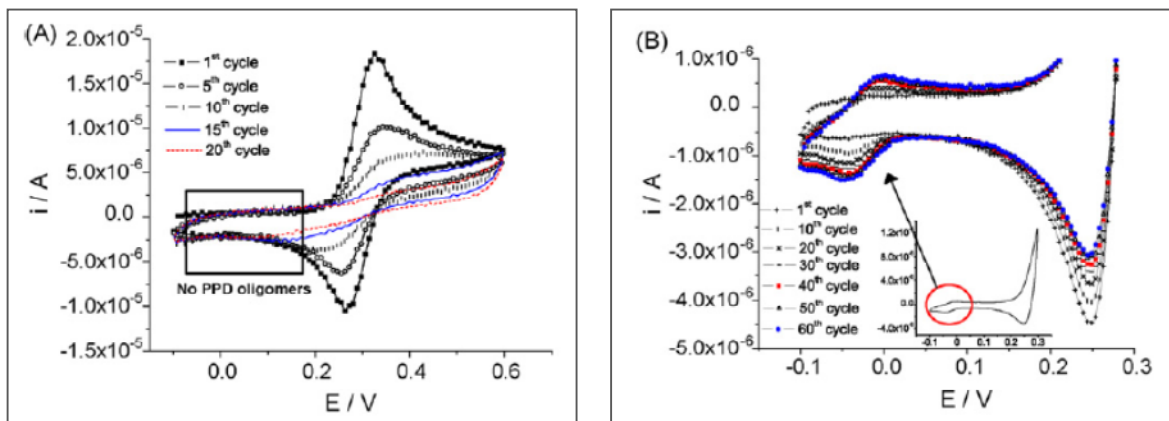


Figure S1. 6 : CVs obtained in a freshly made solution of PPD (1 mM). In (A) no laccase was added, while (B) contained an amount of 70 U of laccase. 0.1 M acetate buffer pH 4.7 on GC at $v = 20 \text{ mVs}^{-1}$.

This observation proves that under such conditions, the electrode is not passivated and that the products formed must be very different from those yielding to the formation of an insulating film.²³ Another important observation is the stability over the cycling and the increase of the currents with the sweep rate which are typical for a stable reversible species in solution (not shown). It is possible to say that soluble oligomers are a result of PPD^{++} formed by Lcc oxidation of PPD. The PPD^{++} can be further oxidized at the electrode to the diimine form when the potential reaches 200 mV vs. Ag/AgCl. This diimine then reacts with PPD^{++} in solution to give oligomers. Moreover, table II clearly shows that the different thermodynamic parameters obtained conclude that the nature of the enzymatic oxidation product of PPD is different from that of the electrochemical oxidation product (Table S1.2). We proposed a mechanism describing these reactions in a recent manuscript.²³ A careful comparison of the curves in Figure S1.6A and B shows that the onset for the oxidation peak differs by about 50 mV. This difference is ascribed to the easier diimine formation from the already oxidized PPD^{++} . Passivation is observed if higher anodic potential is reached. We are currently studying these products by LC-MS.

Table S1. 2 : Comparison of peak potential parameters for the cyclic voltammograms of 1 mM PPD with Lcc added in acetate buffer 0.1 M at pH 4.7 after 15 cycles on GC electrode.

ν (mVs ⁻¹)	$E_{p,a}$ (mV)	$E_{p,c}$ (mV)	ΔE_p (mV)
100	1.39	-46.6	48.0
80	-3.44	-43.6	40.2
60	-4.63	-44.7	40.1
20	-9.33	-43.0	33.6

Study of PPD in acetate and McIlvaine buffer by RRDE and μ Caps-GC-RDE

It was previously demonstrated that passivation occurs at the electrode when PPD is oxidized at high anodic potential. These experiments were carried out in a diffusioncontrolled regime (no convection). We then studied the PPD oxidation on a rotating glassy carbon electrode (RRDE with Pt ring) at high potentials to favor the film-forming oxidation reaction and evaluate if the intermediates or the final products adsorb on the surface of the electrode. The current obtained for the oxidation of the PPD at the disk, as well the collected current at the ring, are linear with the rotation speed (between 100 and 1500 rpm) in respect with the Levich's equation (not shown).²³ The fact that all measurements were carried out in the same solution and without polishing demonstrate the absence of passivation. The cathodic currents measured at the ring also show early quantitative reduction of the species formed at the disk when taking the collection factor previously determined. This fact also implies that the diimine formed is stable enough so when it is removed from the electrode surface (by rotating the electrode in this case), it would not go through further oxidation and passivation is avoided. Slope analysis of the disk current gave an n value close to 2, as expected for the PPD oxidation to diimine.

While only small levels of convection, which could be obtained in a flow cell or by rotating the electrode, appears to be enough to prevent passivation, the modification of the electrode surface with a thick layer of polymer could suppress the beneficial effect of convection by trapping the PPD reaction products and allow their further oxidation. Modifying electrodes with layers of polymer is a common way to immobilize enzymes. Our immobilization platform relies on the use of microcapsules to do so. We previously showed that when the microcapsules are deposited on the electrode, they form layers that restrain the diffusion of PPD.¹⁷ To determine if such layers can in fact promote the polymerization of PPD oxidation products into an insulating film, we functionalized a GC-RDE with microcapsules to study its passivation. As it can be seen in Figure S1.7, oxidation and reduction processes are broadened probably because of the difficulty of the PPD to diffuse through the microcapsules. Even broader CVs were obtained if the sweep rate was higher than 50 mVs^{-1} . Together, the current, which is fading upon cycling, and the presence of a second oxidation peak during cycling toward higher potential values suggest the occurrence of some passivation which was not observed on the CVs recorded at a bare electrode under identical conditions. We think that PPD might be trapped, or at least its diffusion slowed down, near the electrode surface by the presence of the microcapsules, allowing the subsequent oxidation reactions to occur and to passivate the electrode.

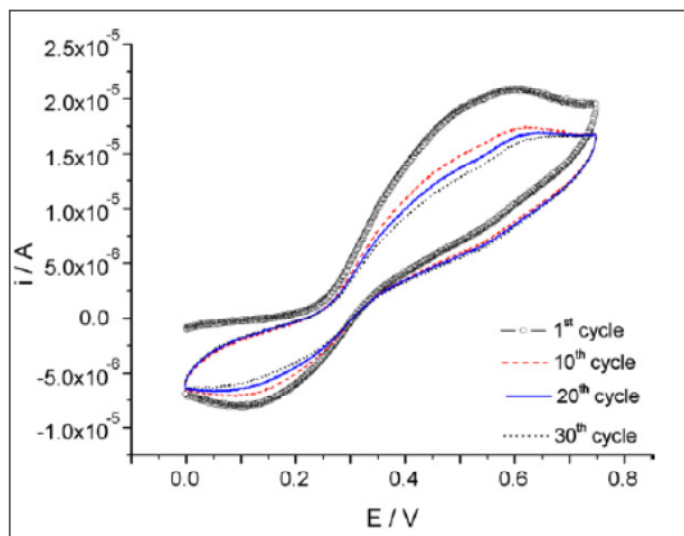


Figure S1. 7 : CVs of a RDE-GC electrode modified with PEI microcapsules in a 1 mM PPD solution (0.1 M acetate buffer, pH 4.7) at $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$ and 50 rpm.

Amperometric study of microencapsulated laccase electrode

The steady state current response of the microencapsulated laccase electrode for successive PPD mediator concentration increases is presented in Figure S1.8. This experiment was carried out in a McIlvaine buffer at the optimum pH 5.75 determined by pH dependency (not shown).¹⁷ Each increase of the reduction current corresponds to an addition of the PPD solution to increase the mediator concentration by $5 \mu\text{M}$. The response of the electrode upon addition of PPD is fast, with a t_{95} (the time needed to reach 95% of the steady state current) of 7.5 s. In comparison, a t_{90} of 2 s was achieved by Quan et al. with a covalently-immobilized Laccase on a Pt electrode.⁵ This smaller value is attributed to the proximity of the Lcc to the electrode which decreases the time needed for the mediator to shuttle electrons between the enzyme and the electrode surface. Response times between 3 and 5 s were reported for glucose biosensors based on microencapsulation architectures.³⁶⁻³⁷ Trau and Renneberg used a strategy based on a layer-by-layer technique

to encapsulate microparticles of Glucose oxidase within a polyelectrolyte film made from sequential layers of polystyrene sulfonate and polyallylamine.³⁷ Relying on the self-limitation of the layer-by-layer process, they were able to gain a very fine control on the coating thickness by applying a desired number of coating cycles. They reported capsules with a wall thickness in the nanometer scale (8–20 nm), which is much lower than the values normally obtained by interfacial condensation. The inverse value of the steady state currents measured at each plateau were plotted against $1/[\text{PPD}]$ to determine the K_M for PPD oxidation by the immobilized Lcc. An apparent Michaelis constant of 76 μM was calculated from the Lineweaver–Burk plot showed in the inset of Figure S1.8. This demonstrate that the potential of the immobilization platform allows an ex situ preparation of the microcapsules prior to their immobilization on the electrode. Our K_M value is close to the 55 μM reported for the oxidation of PPD by the covalently-immobilized laccase of Quan et al.³⁶⁻³⁷ The sensitivity for PPD oxidation was determined to be 16.6 $\text{nA}/\mu\text{M}$ at a pH of 5.75 and was linear up to 30 μM PPD. This value is substantially lower than other sensitivities reported although the amount of laccase units found on the surface of our electrodes is much smaller (0.2 U). Despite encouraging results, a closer look on the few last additions of PPD shows a decreasing in the electrode response. This could be explained by the electrode passivation earlier observed. RDE experiments are currently under investigation to see if passivation could be minimized.

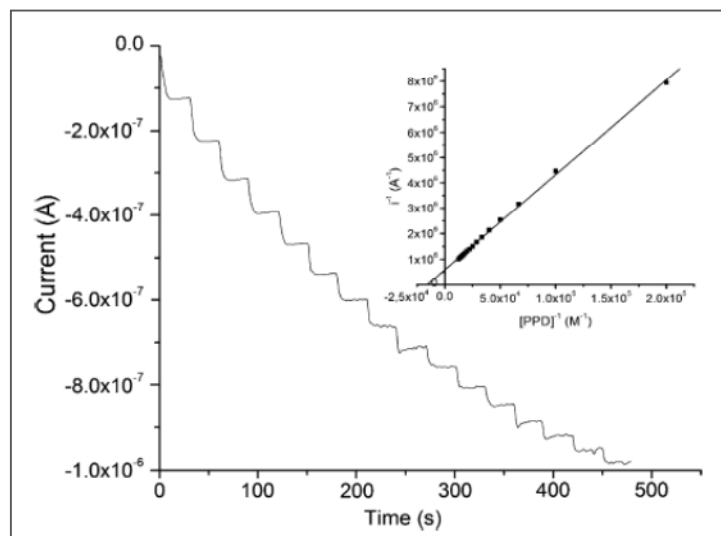


Figure S1. 8 : Current response of an electrode containing 65 μg of laccase microcapsules. Each step corresponds to a 5 μM increase in PPD concentration. The electrode was poised at a potential of +85 mV (vs. Ag/AgCl) and immersed in a 0.05 M McIlvaine buffer at pH 5.75. Inset: Lineweaver–Burk plotted from the current value of each plateau.

Conclusions

We showed that microencapsulated Laccase with cross-linked PEI can be deposited on the surface of an electrode to immobilize the enzyme. The electrical connection between the electrode and the enzyme can be achieved by its substrate, PPD, acting as electron shuttle. The mediation of the electron is possible by the diffusion of the substrate through the microcapsules in aqueous buffered solutions. Moreover, the electrochemical and enzymatic oxidation of *p*-phenylenediamine experiments that was stimulated by the very different behaviours for PPD oxidation found in the literature, pointed out the conditions that make PPD suitable as a redox mediator for our enzyme immobilization template. glassy carbon and platinum electrodes were readily passivated when using pH conditions

necessary to observe enzymatic activity (pH range 4–5). Once passivation occurred, it prevented any current measurements and the electrode must be thoroughly polished to remove the film. RDE experiments showed that with little rotation no passivity state was obtained and when using RRDE, the diimine formed at the disk was quantitatively reduced at the ring. This finding implies that the reaction products of diimine with PPD must be further oxidized to initiate film formation, a step that was avoided under hydrodynamic conditions. In the presence of Laccase, which readily oxidizes PPD to its radical cation, a slightly different behaviour was observed. In this case, a stable and soluble reaction product was formed when $\text{PPD}^{\bullet+}$ was further oxidized at the electrode at a potential of 200 mV vs. Ag/AgCl. This reaction product is an oligomer (a dimer or trimer) which is electrochemically active with an equilibrium potential at -25 mV. Electrode passivation in the presence of Laccase was however achieved by cycling the potential to higher values. We also showed that the slower PPD diffusion through microcapsule layer to the electrode surface allows enough time for its reaction products to be further oxidized and that the electrode passivation could not be entirely avoided, even with a rotated electrode.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Sentinel Network, FQRNT and Université de Montréal for their financial support. Cédric Ginard is also thanked for the confection of our electrochemical cells.

References

1. F. Davis; S. P. J. Higson, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, *22*, 1224.

2. G. T. R. Palmore; H.-H. Kim, *J. Electroanal. Chem.*, **1999**, 464, 110.
3. W. E. Farneth; M. B. D'Amore, *J. Electroanal. Chem.*, **2005**, 581 (2), 197.
4. Christine Mousty; Laetitia Vieille; S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, 22 (8), 1733.
5. D. Quan; Y. Kim; W. Shin, *J. Electroanal. Chem.*, **2004**, 561, 181.
6. D. Leech; K. O. Feerick, *Electroanalysis*, **2000**, 12 (16), 1339.
7. J. Shah; E. Wilkins, *Electroanalysis*, **2003**, 15 (3), 157.
8. G. Decher; J. D. Hong; J. Schmitt, *Thin Solid Films*, **1992**, 210, 831.
9. G. B. Sukhorukov; E. Donath; S. Davis; H. Lichtenfeld; F. Caruso; V. I. Popov; H. Mohwald, *Polym. Adv. Technol.*, **1998**, 9, 759.
10. A. Ghanem; A. Ghaly, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2004**, 91 (2), 861.
11. D. Quong; R. J. Neufeld, *Biotechnol. Bioeng.*, **1998**, 60 (1), 124.
12. A. Blandino; M. Macías; D. Cantero, *Process Biochem.*, **2001**, 36, 601.
13. L. W. Chan; H. Y. Lee; P. W. S. Heng, *Int. J. Pharm.*, **2002**, 242 (1-2), 259.
14. M. Monshipouri; R. J. Neufeld, *Enzyme Microb. Technol.*, **1991**, 13 (4), 309.
15. T. L. Whateley In *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications; Microcapsules: preparation by interfacial polymerization and interfacial complexation and their application.*; 1st ed.; Benita, S., Ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, **1996**, 349–375.

16. D. Poncelet; T. Alexakis; B. P. D. Smet; R. J. Neufeld, *J. Microencapsulation*, **1994**, *11* (1), 31.
17. D. Rochefort; L. Kouisni; K. Gendron, *J. Electroanal. Chem.*, **2008**, *617*, 53.
18. F. Cataldo, *Eur. Polym. J.*, **1996**, *32* (1), 43.
19. K. Jiao; W. Sun; S.-s. Zhang; G. Sun, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *413*, 71.
20. R. M. C. Dawson; D. C. Elliott; W. H. Elliott; K. M. Jones; *Data For Biochemical Research*; Third ed.; Oxford science publications: Oxford, **1986**, 580 p.
21. N. H. Furman; C. O. Miller, *Inorg. Synth.*, **1950**, *3*, 160.
22. R. Bourbonnais; M. G. Paice; I. D. Reid; P. Lanthier; M. Yaguchi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1995**, *61*, 1876.
23. M. Hébert; D. Rochefort, *Electrochim. Acta*, **2008**, *53*, 5272.
24. J. Suh; H. J. Paik; B. K. Hwang, *Bioorg. Chem.*, **1994**, *22*, 318.
25. M. Asaki; T. Ichinose; H. Monjushiroh; T. Fukumoto; H. Watarai, *J. Microencapsulation*, **1998**, *15*, 453.
26. H. R. Horton; L. A. Moran; R. S. Ochs; J. D. Rawn; K. G. Scrimgeour; *Principes de Biochimie*; 1st ed.; De Boeck-Wesmael Press: Bruxelles, **1994**, 720 p.
27. Y. Xiao; X. Tu; J. Wang; M. Zhang; Q. Cheng; W. Zeng; Y. Shi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, *60* (6), 700.
28. J. J. Roy; T. E. Abraham, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, *38* (1), 31.

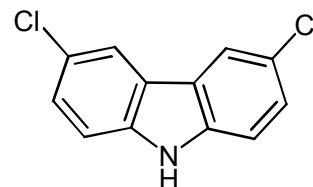
29. Y. Z. Xiao; Q. Chen; J. Hang; Y. Y. Shi; J. Wu; Y. Z. Hong; Y. P. Wang, *Mycologia*, **2004**, *96*, 26.
30. M. Nagai; M. Kawata; H. Watanabe; M. Ogawa; K. Saito; T. Takesawa; K. Kanda; T. Sato, *Microbiology*, **2003**, *149*, 2455.
31. D.A. Wood, *J. Gen. Microbiol.*, **1980**, *117*, 327.
32. J. Peisach; W. G. Levine, *J. Biol. Chem.*, **1965**, *240*, 2285.
33. X. Jing-Juan; C. Hong-Yuan, *Anal. Biochem.*, **2000**, *280* (2), 221.
34. R. E. Parker; R. N. Adams, *Anal. Chem.*, **1956**, *28*, 828.
35. X.-G. Li; M.-R. Huang; W. Duan; Y.-L. Yang, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 2925.
36. S. Cosnier; S. Szunerits; R. S. Marks; A. Nova; L. Puech; E. Perez; I. Rico-Lattes, *Talanta*, **2001**, *55*, 889.
37. D. Trau; R. Renneberg, *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, *18*, 1491.

ANNEXE 2

STUDY OF Et₃N-HCO₂H/Pd(OAc)₂(PPh₃)₂ AND Pd/C-Et₃N CATALYSTS FOR THE REDUCTIVE DEHALOGENATION OF MONO- AND DI-HALODINITROCARBAZOLE TO 1,6- AND 1,8-DIAMINOCARBAZOLE

Mathieu Hébert et Dominic Rochefort, *Synlett*, Soumis le 6 septembre 2011, #S86-09-11. (Supplementary Information)

3,6-dichlorocarbazole (1)

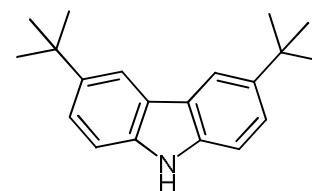


To a 3-neck, 500 mL round-bottomed flask equipped with a septum, carbazole (20.0 g, 120 mmol) and CH₂Cl₂ (200 mL) were added. While stirring, the suspension was cooled to 4°C with an ice bath for 5 minutes. Then, SO₂Cl₂ (19.2 mL, 240 mmol) was added dropwise. Following the addition, the cooling bath was removed and the reaction mixture

was stirred for another 12 hour at RT. After this time, a crude brownish precipitate is obtained. A filtration on Büchner with a ashless 40 Whatman filter paper was done then and the precipitate washed with dichloromethane and dried to give a white product. The precipitate has been purified in hot hexane for 30 minutes. The suspension was filtered, giving pure product (19.3 g, 68%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_{DMSO} : 11.59 (s, 1H, NH), 8.29 (d, 2H, $J_1 = 2.1\text{Hz}$, aromatic H-4 and H-5), 7.53 (d, 2H, $J_1 = 8.6\text{Hz}$, aromatic H-1 and H-8), 7.42 (dd, 2H, $J_1 = 8.6\text{Hz}$, $J_2 = 2.1\text{Hz}$, aromatic H-2 and H-7).

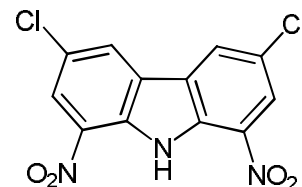
3,6-di-*tert*-butylcarbazole (3)



To a 3-neck 250 mL round-bottomed flask equipped with a septum, carbazole (5.00 g, 29.9 mmol) and CH_2Cl_2 (100 mL) were added and flushed with nitrogen for 8 minutes. While stirring, the suspension was cooled to 4°C with an ice bath. After 5 minutes, AlCl_3 (4.53 g, 34.0 mmol) was added to the suspension and degassed with nitrogen for another 5 minutes. $(\text{CH}_3)_3\text{CCl}$ (6.59 mL, 59.8 mmol) is added at rate of 1 mL each 10 minutes until completion. The ice bath was removed and the suspension let stirred for 64 hours. The brownish solution was transferred in a 500 mL separatory funnel. The solution is washed 2x50 mL with 1M HCl and with a Brine solution. The organic phase was dried with MgSO_4 and evaporated with a rotavap. The product was recrystallised in hot hexane and filtrated on Buchner with an ashless 40 Whatman filter paper giving white needles (2.644 g, 31%). The filtrate was recuperated and evaporated for another recrystallisation giving extra compound (1.877 g, 22%).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ_{DMSO} : 10.96 (s, 1H, NH), 8.17 (d, 2H, $J_1 = 1.7\text{Hz}$, aromatic H-4 and H-5), 7.46 (dd, 2H, $J_1 = 8.6\text{Hz}$, $J_2 = 1.8\text{Hz}$, aromatic H-2 and H-7), 7.38 (d, 2H, $J_1 = 8.6\text{Hz}$, aromatic H-1 and H-8), 1.43 (s, 18H, CH_3).

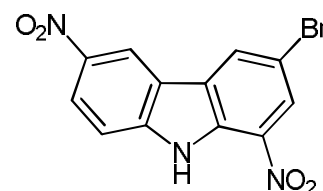
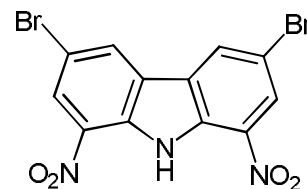
3,6-dichloro-1,8-dinitrocarbazole (1a)



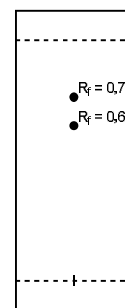
To a 3-neck, 250 mL round-bottomed flask equipped with a septum, **1** (1.308 g, 5.54 mmol), acetic acid (50 mL) and anhydride acetic (35 mL) were added. While stirring, the suspension was cooled to 4°C with an ice bath for 5 minutes. Then, 70% HNO_3 (0.2 mL, 0.56 eq.) was added slowly. After 5 minutes, the ice bath was replaced by an oil bath and the temperature was set at 60°C. From there, 70% HNO_3 (0.2 mL, 0.56 eq.) was added each 15 minutes until a total volume of 2.02 mL (5.65 eq.) of acid. Meanwhile, after a total of 1 mL of acid added, the temperature was raised at 75°C. When all the acid was added, the temperature was raised at 110°C for 30 minutes. Then, the suspension was allowed to cool down at RT and filtrated on Büchner with an ashless 40 Whatman filter paper and rinsed with water. The yellow powder was dried in an oven at 80°C and (1.47 g, 81%).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ_{DMSO} : 11.31 (s, 1H, NH), 9.00 (d, 2H, $J_1 = 1.6\text{Hz}$, aromatic H-2 and H-7), 8.50 (d, 2H, $J_1 = 1.6\text{Hz}$, aromatic H-4 and H-5).

**3,6-dibromo-1,8-dinitrocarbazole (2a) /
3-bromo-1,6-dinitrocarbazole (2b)**



To a 3-neck, 250 mL round-bottomed flask equipped with a septum, commercially available dibromocarbazole (2.372 g, 7.30 mmol), acetic acid (50 mL) and anhydride acetic (35 mL) were added. Then, 70% HNO₃ (0.2 mL, 0.43 eq.) was added slowly. While stirring and the addition of the acid, the suspension was cooled to 4°C with an ice bath for 15 minutes. After, the ice bath was replaced by an oil bath and the temperature was set at 60°C. From there, 70% HNO₃ (0.2 mL, 0.43 eq.) was added each 5 minutes until a total volume of 2.22 mL of acid. Meanwhile, after a total of 1 mL of acid added, the temperature was raised at 75°C. When all the acid was added, the temperature was raised at 110°C for 30 minutes. Then, the suspension was allowed to cool down near 40°C and filtrated on Büchner with a qualitative 1 Whatman filter paper and rinsed with water. The yellow powder was dried in an oven at 80°C overnight. A mass of 1.97735 g was weighted and TLC analysis (30% Ethyl Acetate and 70% Hexane % v/v) revealed 3 yellow spots as nitrated species ($R_f = 0.83, 0.76, \text{ and } 0.64$). 1,077 g of the yellow powder was added in a 250 mL Erlenmeyer containing 30 mL of 1,4-dioxane. While stirring, 0.1 mL of bromide (3.88 mmol) was added to the suspension and heated until reflux is obtained. Then, another volume of 0.1 mL of bromide was added and the solution was let stirred for 20 minutes. After, the solution is cool down to room temperature and filtrated on Büchner with a qualitative 1 Whatman filter paper and rinsed with diethyl ether. The yellow powder was dried in an oven at 80°C overnight. A mass of 0.75323 g was weighted and TLC analysis



(70% Ethyl Acetate and 30% Hexane v/v %) revealed 2 yellow spots. ^1H NMR showed a ratio of 1:1.5 for **2a** and **2b** at yield of 21% and 31% respectively.

^1H NMR (**2a**) (DMSO- d_6) δ_{DMSO} : 11.32 (s, 1H, NH), 9.14 (d, 2H, $J_1 = 1.2\text{Hz}$, aromatic H-2 and H-7), 8.58 (d, 2H, $J_1 = 1.2\text{Hz}$, aromatic H-4 and H-5). $R_f = 0.64$.

^{13}C NMR (**2a**) (DMSO- d_6) δ_{DMSO} : 133.9 (C_q), 133.6 (C_q), 132.5 (CH), 127.2 (C_q), 126.7 (CH), 112.8 (C_q).

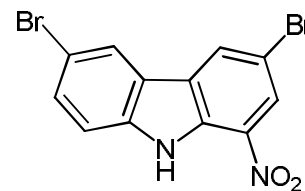
HRMS (ESI) (**2a**): m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_4^-$: 413.99; found: 413.8551.

^1H NMR (**2b**) (DMSO- d_6) δ_{DMSO} : 12.68 (s, 1H, NH), 9.36 (d, 1.5H, $J_1 = 2.0\text{Hz}$, aromatic H-7), 9.17 (d, 1.5H, $J_1 = 1.3\text{Hz}$, aromatic H-2), 8.48 (d, 1.5H, $J_1 = 1.3\text{Hz}$, aromatic H-4), 8.44 (dd, 1.5H, $J_1 = 9.1\text{Hz}$, $J_2 = 2.0\text{Hz}$, aromatic H-6), 7.86 (d, 1.5H, $J_1 = 9.1\text{Hz}$, aromatic H-5). $R_f = 0.76$.

^{13}C NMR (**2b**) (DMSO- d_6) δ_{DMSO} : 145.2 (C_q), 142.5 (C_q), 133.9 (C_q), 132.2 (CH), 129.2 (C_q), 125.6 (CH), 123.9 (CH), 121.3 (C_q), 119.2 (CH), 115.4 (CH), 111.4 (C_q), 110.2 (C_q).

HRMS (ESI) (**2b**): m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_5\text{BrN}_3\text{O}_3^-$: 333.95; found: 333.94733.

3,6-dibromo-1-nitrocarbazole (**2d**)



To a 3-neck 250 mL round-bottom flask equipped with a septum, commercially available dibromocarbazole (2.878 g, 8.85 mmol), acetic acid (50 mL) and anhydride acetic (35 mL) were stirred at 85°C . Then, 0.1 mL of 70% HNO_3 was added each minute until a

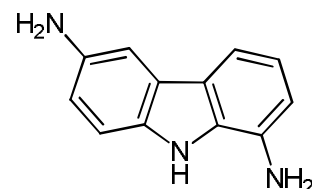
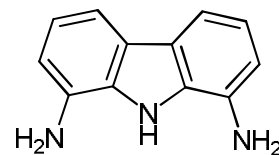
volume of 1.0 mL (1.75 eq) reached. While the addition of the acid, a suspension was obtained after 0.3 mL of acid added. After 3 hours of stirring, the suspension was cooled to 4°C with an ice bath, left for 20 minutes, and filtrated on Büchner with a qualitative 1 Whatman filter paper and rinsed with water. The crude paste was dried in an oven at 80°C overnight and a mass of 2.613 g was weighted. An isocratic chromatographic separation was realised on silica column (90% toluene, 8% hexane and 2% dioxane). The recuperated fractions of purified product were then evaporated under reduced pressure. A mass of 1.757 g (4.74 mmol) of pure compound was obtained for a given yield of 54%.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ_{DMSO}: not observed (s, 1H, NH), 8.94 (d, 1.0H, J₁ = 1.9Hz, aromatic H-2), 8.57 (m, 1.0H, aromatic H-7), 8.41 (d, 1.0H, J₁ = 1.8Hz, aromatic H-8), 7.69 (d, 2.0H, J₁ = 1.3Hz, aromatic H-4 and H-5).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ_{DMSO}: 140.7 (C_q), 133.0 (C_q), 132.9 (C_q), 131.8 (CH), 131.5 (CH), 128.6 (C_q), 124.7, (CH) 125.0 (CH), 123.4 (C_q), 115.6 (CH), 113.9 (C_q), 110.3 (C_q).

HRMS (ESI): *m/z* [M-H]⁻ calcd for C₁₂H₅Br₂N₂O₂: 368.87; found:368.8696.

1,8-diaminocarbazole (10) /
1,6-diaminocarbazole (6)



To a 3-neck, 100 mL round-bottomed flask equipped with a septum, mix of **2a** and **2b** (1.22179 g, 1.332 mmol of **2a** and 1.993 mmol of **2b** respectively) and Pd/C 10wt% (36.0 mg, 3% of substrate weight) were added in methanol (20 mL) at 40°C. While stirring, the yellow suspension is flushed with argon for five minutes and switched to hydrogen until a party balloon is filled. After 15 minutes, Et₃N (5.6 mL, 8.5 eq.) was added and the solution was let stirred for 24 hours. The solution was allowed to cool down at R.T. and was then filtrated on Büchner with an ashless 40 Whatman filter paper and rinsed with acetone. The recuperated solution was dried by rotary evaporator until a purple sticky gel was obtained. 1M HCl was added into it until complete solubilisation. Then, NH₄OH was added slowly until a gray suspension was obtained then filtrated on Büchner with an ashless 40 Whatman filter paper and rinsed with water. The precipitate was dried under vacuum overnight. A mass of 0.51589 g was weighted yielding a clean mixture of **10** (31%) and **6** (47%). TLC analysis (60% THF and 40% Toluene % v/v) revealed 2 spots R_f = 0.33 and R_f = 0.53 for **10** and **6** respectively. The mixture was separated using a SP4TM Purification system from Biotage[®] applying a gradient of eluant.

Flow rate 12mL/min; THF (A) and toluene (B):

60% A, 40% B for 5 min; 60% to 90% of A for 10 min; 90% A for 3 min.

¹H NMR (10) (DMSO-d₆) δ_{DMSO}: 11.39 (s, 1H, NH), 7.29 (d, 2H, J₁ = 7.5Hz, aromatic H-4 and H-5), 6.89 (t, 2H, J₁ = 7.5Hz, aromatic H-3 and H-6), 6.66 (d, 2H, J₁ = 7.5Hz, aromatic H-2 and H-7), 4.99 (s, 4H, NH₂).

¹³C NMR (10) (DMSO-d₆) δ_{DMSO}: 133.3 (C_q), 129.6 (C_q), 123.4 (C_q), 119.6 (CH), 109.6 (CH), 109.2 (CH).

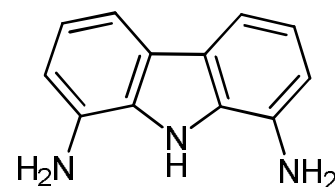
HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₂H₁₂N₃⁺: 198.24; found: 198.10247.

¹H NMR (6) (DMSO-d₆) δ_{DMSO}: 10.25 (s, 1H, NH), 7.21 (m, 3H, aromatic), 6.84 (t, 1H, J₁ = 7.6Hz, aromatic H-3), 6.77 (dd, 1H, J₁ = 6.7Hz, J₂ = 8.5Hz, aromatic H-6), 6.59 (dd, 1H, J₁ = 0.1Hz, J₂ = 7.5Hz, aromatic H-2).

¹³C NMR (6) (DMSO-d₆) δ_{DMSO}: 141.8 (C_q), 134.3 (C_q), 134.2 (C_q), 130.3 (C_q), 124.9 (C_q), 124.4 (C_q), 120.2 (CH) 115.6 (CH), 112.0 (CH), 110.1 (CH), 109.8 (CH), 104.9 (CH).

HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₂H₁₂N₃⁺: 198.24; found: 198.10214.

1,8-diaminocarbazole (10)



To a 3-neck, 100 mL round-bottomed flask equipped with a septum, mix of **2a** and **2b** (0.462 g, 0.504 mmol of dibromo and 0.757 mmol of mono respectively) and Pd/C 10wt% (4.56 mg, 1.0% of substrate weight) were added in methanol (20 mL). While stirring, the yellow suspension is flushed with nitrogen for five minutes. Then, Et₃N (2.3 mL, 9.3 eq.) was added slowly. After 5 minutes, the oil bath temperature was set at 40°C and the nitrogen atmosphere was replaced with hydrogen. After 20 hours, a deep red

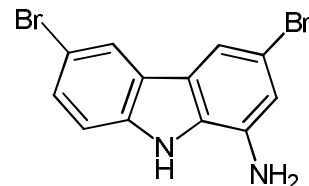
solution is obtained. Another volume of Et₃N (2.3 mL, 9.3 eq.) was added and let it stirred for 4 hours. After 24 hours, the solution was allowed to cool down at RT and dried by rotary evaporator. 30 mL of distilled water is then added in the round-bottomed flask and sonicated for 15 minutes. The suspension was then filtrated on Büchner with an ashless 40 Whatman filter paper and rinsed with water. The black powder was dried in an oven at 80°C overnight. A mass of 0.1080 g was weighted yielding pure **10** (0.108 g, 43%).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ_{DMSO}: 11.39 (s, 1H, NH), 7.29 (d, 2H, J₁ = 7.5Hz, aromatic H-4 and H-5), 6.89 (t, 2H, J₁ = 7.5Hz, aromatic H-3 and H-6), 6.66 (d, 2H, J₁ = 7.5Hz, aromatic H-2 and H-7), 4.99 (s, 4H, NH₂).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ_{DMSO}: 133.3 (C_q), 129.6 (C_q), 123.4 (C_q), 119.6 (CH), 109.6 (CH), 109.2 (CH).

HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₂H₁₂N₃⁺: 198.24; found: 198.10247.

1-amino-3,6-dibromocarbazole (12)



To a 3-neck 100 mL round-bottom flask equipped with a septum, **2d** (0.595 g, 1.61 mmol) and Pd/C 10wt% (17.3 mg, 3% of substrate weight) were added in methanol (20 mL) and was set at 40°C on an oil bath. While stirring, the suspension is flushed with argon for 5 minutes and replace for hydrogen atmosphere. After 4 minutes, Et₃N (1.35 mL, 6 eq.) was added. After 5 minutes, the oil bath temperature and the nitrogen atmosphere was replaced with hydrogen. After 24 hours, another volume of Et₃N (0.5.3 mL, 2.2 eq.) was added and let it stirred for an extra 26 hours. The solution was allowed to cool down at RT and stirred again for an extra 40 hours. Then, the solution was dried by rotary

evaporator. 50 mL of 0.1M HCl was added and the solution was sonicated for 15 minutes. The brown suspension was then filtrated on Büchner with a qualitative 1 Whatman filter paper and rinsed with water. The powder was dried in an oven at 80°C overnight. A mass of 0.2238 g (0.658 mmol) of pure compound was obtained for a given yield of 41%.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ_{DMSO}: 11.23 (s, 1H, NH), 8.33 (bs, 1.0H, aromatic H-5), 7.65 (d, 1.5H, J₁ = 1.9Hz, aromatic H-3), 7.51 (m, 2H, aromatic H-7 and H-8), 6.84 (d, 1H, J₁ = 1.8Hz, aromatic H-2), not observed (s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ_{DMSO}: 138.7 (C_q), 128.9 (CH), 128.9 (C_q), 125.0 (C_q), 123.9 (CH), 123.9 (C_q), 114.1, (CH) 113.1 (C_q), 112.7 (CH), 111.9 (C_q), 111.9 (C_q), 111.6 (CH).

HRMS (ESI): *m/z* [M-H]⁺ calcd for C₁₂H₉Br₂N₂

ANNEXE 3**ELECTROCHEMICAL STUDY OF AMINATED
CARBAZOLE POLYMER DERIVATIVES FOR
LACCASE MICROENCAPSULATION IN A
PERMEABLE CONDUCTIVE CAGE**

Mathieu Hébert, Pierre-Louis Brunner, Dominic Laliberté et Dominic Rochefort, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Soumis le 15 novembre 2011, #CP-ART-09-2011-022877. (Supplementary Information)

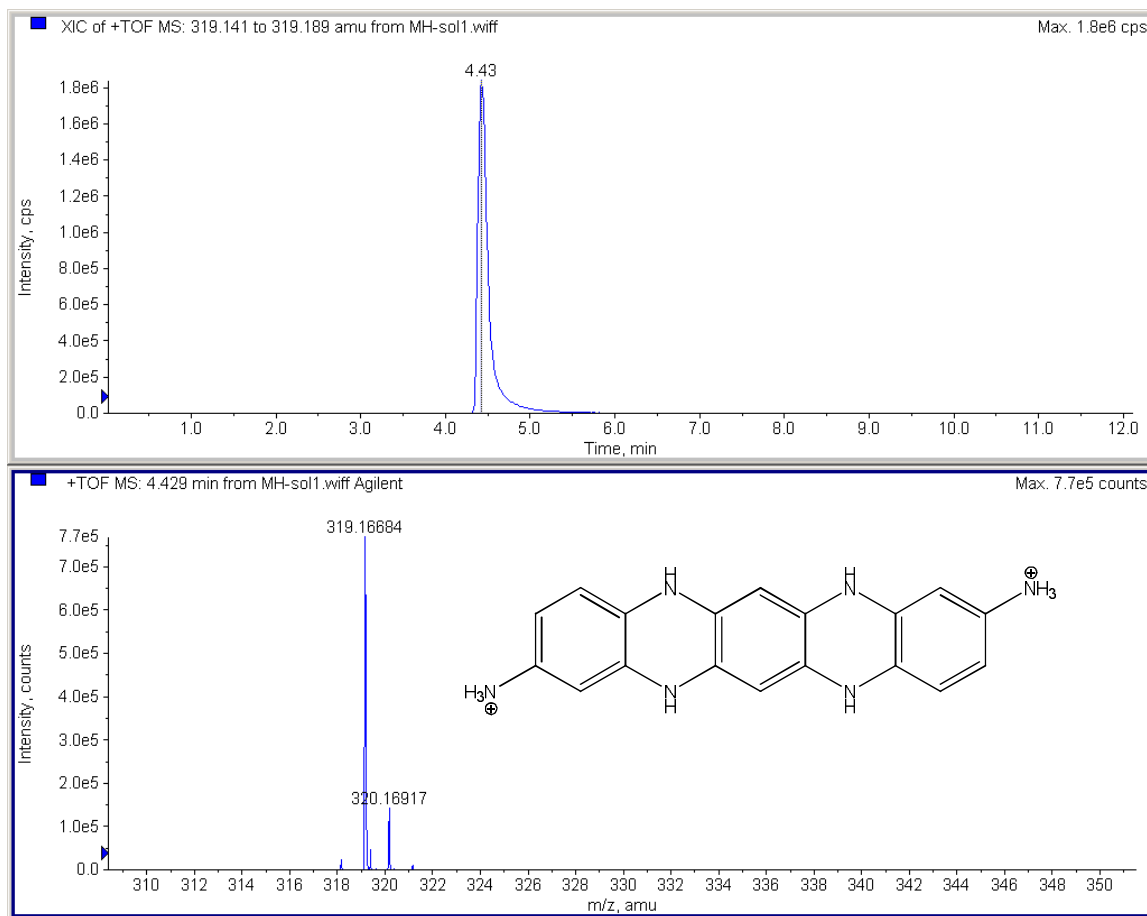


Figure S3. 1 : LC-MS and proposed structure of self-oxidised PPD.

LC-MS instrumentation :

1100 Series Agilent Technologies, Gemini C₆-Phenyl column (150 x 4.6 mm, 5 μ), UV-Vis acquisition (200 – 400 nm).

Gradient of eluant :

Flow rate 0.3 mL/min; H₂O 0.1% formic acid (A) and ACN 0.1% formic acid (B): 95% A, 5% B for 7 min; 10% A, 90% B for 2 min; 95% A, 5% B for 3 min.