



HAL
open science

Conception de biofilms bactériens artificiels électroactifs en vue d'optimiser les réactions de transferts extracellulaires d'électrons

Stéphane Pinck

► **To cite this version:**

Stéphane Pinck. Conception de biofilms bactériens artificiels électroactifs en vue d'optimiser les réactions de transferts extracellulaires d'électrons. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0344 . tel-02131514

HAL Id: tel-02131514

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02131514v1>

Submitted on 16 May 2019

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention « Science de la Vie et de la Santé »

Par Stéphane PINCK

**Conception de biofilms bactériens artificiels électroactifs en vue
d'optimiser les réactions de transferts extracellulaires d'électrons**

Le 24 novembre 2017

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mr Théodore BOUCHEZ Directeur de recherche, IRSTEA, Antony
Mme Petra HELWIG Professeure, Université de Strasbourg, Strasbourg

Examineurs :

Mr Damien FERON Directeur de recherche, CEA, Gif-sur-Yvette
Mme Jennyfer MIOT Maître de conférences, MNHN, Paris

Directeur / co-directeur de thèse :

Mr Frédéric JORAND Professeur, Université de Lorraine, Nancy
Mr Mathieu ETIENNE Directeur de recherche, CNRS, Nancy

Membre invité :

Mr Manuel DOSSOT Maître de conférences, Université de Lorraine, Nancy

**Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement
Unité Mixte de Recherche - UMR 7564, CNRS / Université de Lorraine**

Remerciements

J'ai eu la chance de pouvoir mener ce projet de thèse dans de très bonnes conditions, notamment grâce à l'aide de nombreuses personnes au cours de ces trois années de thèse et à la bonne ambiance présente au laboratoire. Je souhaite les remercier ici.

Mes premiers remerciements vont d'abord à mes deux encadrants de thèses, les Dr Frédéric Jorand et Mathieu Etienne. Ils m'ont offert la possibilité à la suite de mon stage de Master 2 de mener ce projet interdisciplinaire, portant sur une thématique scientifique intéressante. Leurs conseils sur des domaines scientifiques, où je n'étais pas alors à l'aise, m'ont permis d'aboutir sur ces recherches. Leurs encadrements et patiences m'ont particulièrement été bénéfique durant les préparations de communications orales, d'articles scientifiques et du présent manuscrit. Je tiens encore à les remercier pour les opportunités qu'ils m'ont donné de participer à des conférences nationales (Toulouse et Marseille) et internationales (Lisbonne) ainsi que pour les échanges inter-université que j'ai pu aussi effectuer au cours de cette thèse (Lund en Suède et Grahamstone en Afrique du sud).

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel du LCPME, cela a été un plaisir de vous côtoyer au quotidien. Je remercie encore le directeur, M. Alain Walcarius, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire durant ces trois années de thèses. Je remercie en particulier les membres de l'équipe MIC et ELAN que j'ai côtoyé à de nombreuses réunions d'équipes et pour les conseils donnés au cours de ces réunions.

Je remercie en particulier les anciens doctorants de l'équipe MIC, Marjorie ETIQUE, Baptiste MAITTE et Paul-Philippe REMY pour m'avoir aidé à mettre le pied à l'étrier pendant ma première année de thèse, puis plus tardivement, l'ATER/ post-doctorante Alice

LEDUC pour avoir partagé mon bureau et supporté pendant ma dernière année de thèse. Je remercie également l'ensemble des doctorants du laboratoire, notamment ceux de l'équipe MIC pour les journées de réunion de l'école doctorale, votre présence faisait la différence, et ceux de l'équipe ELAN pour les soirées sympathiques notamment Maciej et Tauquir pour avoir su partager les postes de manipulation en électrochimie avec moi. Je voulais aussi remercier les thésards moniteurs, Hugo, Vincent, Pierre Hugo T, etc... qui ont enduré avec moi les formations moniteurs, avec plusieurs belles soirées et de bons moments passés.

Je remercie aussi les organisateurs de l'initiative prétexte, c'était sympa ces petites présentations et l'ambiance durant les événements. Je tiens également à remercier les membres des équipes de chimie théorique souvent présents à ces événements. C'était une bonne expérience.

Je remercie également les stagiaires que j'ai pu aider à encadrer et aidé durant ma thèse

Je tiens aussi à remercier le labo Dynamique, globalement, pour la possibilité qu'ils m'ont offert de donner des enseignements aux licences de biologie, une expérience réellement enrichissante, notamment Annabelle Thibessard et Florence Charron, mais aussi Claire Bertrand pour les conseils donnés durant mon stage de M1 qui me sont encore utiles aujourd'hui.

Je remercie les amis qui comme moi vivent l'aventure de la thèse, Guillaume, Jeremy, Marine, Jodelle et Océane mais aussi les tous les autres, Mathieu, J-S, Pierre, Anne-So, Hipollyte, Ben, Thomas, Romain... merci de m'avoir supporté pendant tout ce temps.

Enfin je remercie ma famille, mes parents pour le soutien et les questions intéressantes posées quand je viens les voir, ma sœur et mes frères pour les bons mais trop rares moments passés ensemble au cours de ces trois dernières années.

Sommaire

Introduction générale	10
Références	13
Chapitre 1. Analyse bibliographique	14
I.1. Introduction.....	14
I.2. Rôle clef des protéines membranaires dans les transferts extracellulaires d'électrons	15
I.2.1. Les transferts d'électrons directs.....	16
I.2.1.1. La famille des Mtr de <i>S. oneidensis</i>	17
I.2.1.2. EET par interaction directe chez <i>G. sulfurreducens</i>	18
I.2.1.3. Transferts d'électrons à travers des appendices conducteurs : les nanowires	21
I.2.2. Les transferts extracellulaires indirects d'électrons.....	22
I.2.2.1. Transferts d'électrons médiés par des navettes autoproduites	22
I.2.2.2. Des molécules et des nanoparticules de l'environnement comme navette ou relais.....	23
I.3. Amélioration des transferts d'électrons dans les processus électrochimiques microbiens	24
I.3.1. Optimisation de l'électrode	26
I.3.2. La bactérie : un point clef dans les systèmes électrochimiques microbiens	26
I.3.3. Optimisation du biofilm avec des médiateurs exogènes	27
I.3.4. Reconstituer un biofilm artificiellement	28
I.4. Position de la thèse.....	29
I.5. Références	32
Chapitre 2. Elaboration d'un protocole pour former un biocomposite mimant les biofilms électroactifs.	37
Chapitre 3. Influence du cytochrome exogène sur les transferts d'électrons à la cathode d'un biofilm artificiel électroactif	71
Chapitre 4. La protamine favorise les transferts directs d'électrons entre <i>Shewanella oneidensis</i> et les nanomatériaux carbonés dans un biofilm artificiel électroactif.	101
Chapitre 5. Discussion générale	129
V.1. Mécanismes d'assemblage des constituants du biocomposite.....	129
V.2. Atténuation de la toxicité des matériaux carbonés dans le biocomposite.....	130
V.3. Les nanotubes de carbone : modèle artificiel de <i>nanowires</i>	132
V.4. Les EET impliqués dans le biofilm artificiel.....	133
V.5. Du mimétisme des nanowires à celui du biofilm.....	135
V.7. Références	137
Conclusion générale	139
Références	142
VI. ANNEXE : Matériels et méthodes	143

Glossaire

AQDS : anthraquinone disulfonate

Cyt *c* : cytochrome *c*

*c*₁ : Cytochrome *c* 1 (extrait de cellules de cœur bovin)

*c*_{7Da} : Cytochrome *c* 7 issu de *Desulfuromonas acetoxidans*

*c*_{3DvH} : Cytochrome *c* 3 issu de *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough)

*c*_{553DvH} : Cytochrome *c* 553 issu de *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough)

*c*_{3DdN} : Cytochrome *c* 3 issu de *Desulfovibrio desulfuricans* (Norvège)

*c*_{3Dg} : Cytochrome *c* 3 issu de *Desulfovibrio gigas*

DLS : Diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering*)

EPS : Substances polymériques extracellulaires (*extracellular polymeric Substances*)

GO : Oxyde de Graphène (*Graphene Oxide*)

Imc : Cytochrome de la membrane interne (*inner membrane cytochrome*)

KB : Ketjen black

Omc : Cytochrome de la membrane externe (*outer membrane cytochrome*)

MCO : Carbone mésoporeux ordonné (*mesoporous carbon ordered*)

MEB : Microscopie électronique à balayage

MFC : Pile à combustible microbienne (*microbial fuel cell*)

Mtr : Métal réductase (enzyme réductrice de métaux)

MWCNT : Nanotubes de carbone multi-parois (*multi-walled carbon nanotubes*)

PS : Protamine sulfate

Ppc : Cytochrome de l'espace périplasmique (*periplasmic cytochrome*)

SWCNT : Nanotubes de Carbones Mono-paroi (*single-walled carbon nanotubes*)

Introduction générale

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit se situent à l'interface entre la microbiologie et l'électrochimie. Ils concernent également le domaine des matériaux et de la biomimétique. Les biofilms électroactifs sont des structures complexes adhérant à des supports conducteurs dans lesquels ont lieu des réactions de transfert d'électrons, entre les bactéries et le support. Ces biofilms électroactifs sont mis à profit dans des systèmes électrochimiques comme les piles microbiennes ou l'électrocatalyse microbienne. L'objectif de cette thèse est d'élaborer un biofilm artificiel électroactif en vue d'optimiser l'activité électrocatalytique de systèmes électro-microbiologiques. Dans un biofilm artificiel, il serait possible d'optimiser les transferts extracellulaires d'électrons (extracellular electron transfer, EET) en utilisant des matériaux et des molécules exogènes dans le but de mimer certains constituants des biofilms naturels, tel que les *nanowires* [1]. Cette thèse repose alors sur trois grandes étapes, explorant ce que peut être un biofilm électroactif artificiel.

La première étape consiste à élaborer un biofilm artificiel électroactif où l'activité bactérienne est conservée et dans lequel un cytochrome exogène participe aux réactions de transfert d'électrons en tant que médiateur redox. L'activité bactérienne est alors estimée électrochimiquement par la capacité des bactéries à transférer leurs électrons à une électrode lors de l'oxydation du formiate. Dans la seconde étape, le système est adapté pour permettre la réduction du fumarate en succinate [2]. Enfin, dans la dernière étape, le biofilm artificiel électroactif est optimisé, en absence d'un cytochrome exogène extracellulaire, en favorisant les réactions de transfert direct d'électrons fonctionnant à la fois en oxydation et en réduction [2]. Les études proposées ici ont d'abord une vocation fondamentale, avec le développement d'un outil de laboratoire permettant d'explorer l'électrochimie des bactéries électroactives. Par ailleurs, ce concept de biofilm artificiel électroactif donne l'occasion de développer un protocole expérimental original pour favoriser une grande densité de courant pouvant à terme déboucher sur des applications électro-microbiologiques. Ce travail de recherche est organisé en cinq chapitres.

Le Chapitre 1 est une revue bibliographique des mécanismes de transfert d'électrons impliqués dans les biofilms électroactifs et les stratégies permettant d'améliorer ces réactions de transfert

d'électrons dans les systèmes électrochimiques microbiens. Il s'agit dans un premier temps de faire le point sur les connaissances liées aux mécanismes et aux acteurs des transferts d'électrons dans les biofilms électroactifs en particulier sur les protéines membranaires impliquées dans ces transferts, véritables interfaces entre la bactérie et son accepteur ou donneur d'électrons extracellulaire, et les connaissances actuelles sur les *nanowires*. Dans un deuxième temps, l'intérêt qu'il peut y avoir à améliorer ces transferts d'électrons dans les processus électrochimiques microbiens est présenté ainsi que les stratégies généralement employées dans ce but. Ce chapitre s'attarde alors sur le concept de biofilm électroactif artificiel et présente le positionnement de la thèse.

Le Chapitre 2 concerne l'élaboration d'un biofilm artificiel électroactif. Cette démarche s'inscrivait dans une stratégie visant à optimiser les transferts d'électrons par la construction d'un biofilm artificiel électroactif, recherche amorcée au laboratoire en 2014 avec l'encapsulation de bactérie dans un gel de silice en présence d'un cytochrome *c* exogène [3]. Dans cette thèse, nous avons utilisé l'auto-assemblage des nanotubes de carbones avec *S. oneidensis* en présence du cytochrome *c* exogène au sein d'un matériau biocomposite qui est ensuite déposé sur une électrode. Les nanotubes de carbone et le cytochrome *c* de cœur de bœuf ont été choisis pour mimer les *nanowires* dans le biofilm [4, 1]. Dans un premier temps, la formation du matériau biocomposite est confirmée par des analyses en diffusion dynamique de la lumière (DLS) et son organisation est étudiée en spectroscopie RAMAN et en microscopie électronique à balayage. Ensuite, la viabilité des bactéries dans le biocomposite est étudiée, les nanotubes de carbones possédant des propriétés cytotoxiques [5, 6]. Enfin l'activité métabolique bactérienne au sein du biofilm artificiel électroactif est vérifiée en étudiant par électrochimie les réactions de transfert d'électrons en absence et en présence de formiate.

Le Chapitre 3 va transposer le système artificiel constitué par *S. oneidensis*, les nanotubes de carbones et le cytochrome *c* exogène de l'anode vers la cathode. Afin de mieux comprendre les mécanismes de transfert d'électrons dans le biocomposite, une gamme de cytochromes différents est alors utilisée. Ces derniers vont varier au niveau de leur charge à pH neutre ainsi qu'au niveau des potentiels redox de leurs hèmes [7]. Il a été ainsi possible de valider, à l'aide d'analyses DLS, l'hypothèse concernant les forces impliquées dans l'assemblage du matériau biocomposite. La diversité des cytochromes utilisés a permis ensuite de mettre en évidence l'importance du potentiel

redox pour favoriser les transferts d'électrons. De ces résultats est sélectionné le cytochrome exogène le plus apte, du point de vue de sa charge et de son potentiel redox, à favoriser la formation du biocomposite et les réactions de transfert extracellulaire d'électrons. La stabilité dans le temps de ces réactions de transfert d'électron est alors étudiée.

Dans le Chapitre 4, *S. oneidensis* est assemblé avec des nanotubes de carbone en présence de protamine. Contrairement aux cytochromes utilisés précédemment, la protamine n'est pas électroactive. Elle permet alors d'explorer les réactions de transfert direct d'électrons. L'absence des cytochromes exogènes associés aux nanotubes de carbone n'invalide pas forcément leur nature mimétique vis-à-vis des *nanowires* bactériens, l'un des modèles de *nanowire* naturel n'étant pas tributaire de ces derniers pour son activité de transfert d'électrons [8]. Dans ce travail, la formation du matériau biocomposite en présence de protamine est validée par DLS et microscopie électronique à balayage. Le biofilm artificiel est ensuite déposé sur différentes électrodes pour être caractérisé par électrochimie en présence de formiate ou de fumarate. Finalement, le biofilm artificiel électroactif est optimisé et la stabilité du processus électrocatalytique est étudiée.

Le chapitre 5 fait le point sur les éléments clefs permettant de produire un biofilm artificiel électroactif en présence de bactéries, de nanomatériaux carbonés et d'une protéine structurante exogène. Nous discutons d'abord les mécanismes permettant l'auto-assemblage du biofilm artificiel et la conséquence de la structure obtenue sur la toxicité des nanomatériaux carbonés. Enfin la question de la biomimétique des *nanowires* par les nanomatériaux carbonés est abordée avec une discussion sur le rôle des nanomatériaux carbonés dans les réactions de transfert extracellulaire d'électrons au sein de ce biofilm artificiel. Enfin la part relative des différents mécanismes de transfert d'électrons possibles est discutée.

Pour finir, une conclusion générale est proposée, incluant également quelques perspectives offertes par ce travail de recherche.

Références

- 1 Pirbadian S.,Barchinger S.E.,Leung K.M.,Byun H.S.,Jangir Y.,et al.(2014) *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *PNAS*, 111(35), 12883–12888.
- 2 Lies D.P.,Hernandez M.E.,Kappler A.,Mielke R.E.,Gralnick J.A.,et al.(2005) *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(8), 4414–4426.
- 3 Ghach W.,Etienne M.,Urbanova V.,Jorand F.P.A.,& Walcarius A.(2014) Sol – gel based “artificial” biofilm from *Pseudomonas fluorescens* using bovine heart cytochrome c as electron mediator. *Electrochem. commun.*, 38, 71–74.
- 4 Steidl R.J.,Lampa-Pastirk S.,& Reguera G.(2016) Mechanistic stratification in electroactive biofilms of *Geobacter sulfurreducens* mediated by pilus nanowires. *Nat. Commun.*, 7, 12217.
- 5 Kang S.,& Mauter M.S.(2008) Physicochemical determinants of multiwalled carbon nanotube bacterial cytotoxicity. *Environ. Sci. Technol.*, 42(19), 7528–7534.
- 6 Kang S.,Herzberg M.,Rodrigues D.F.,& Elimelech M.(2008) Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! *Langmuir*, 24(13), 6409–13.
- 7 Lojou E.,Bianco P.,& Bruschi M.(1998) Kinetic studies on the electron transfer between bacterial c-type cytochromes and metal oxides. *J. Electroanal. Chem.*, 452(2), 167–177.
- 8 Feliciano G.T.,Steidl R.J.,& Reguera G.(2015) Structural and functional insights into the conductive pili of *Geobacter sulfurreducens* revealed in molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17, 22217–22226. Royal Society of Chemistry.

Chapitre 1. Analyse bibliographique

I.1. Introduction

Les biofilms sont des structures complexes constituées de microorganismes enrobées dans une matrice auto-sécrétée de substances polymériques extracellulaires (EPS : extracellular polymeric substances) attachées à une surface. Les biofilms sont considérés comme la forme majoritaire des bactéries dans l'environnement [1]. Au cours des premières étapes de développement du biofilm, peu de bactéries sont attachées au support solide. Ce support solide est une électrode dans le cas de cette thèse [2]. Après une adhésion qui passera de réversible à irréversible, le biofilm va évoluer vers un biofilm mature avec une structure tridimensionnel complexe gouvernée par la production des EPS par les bactéries [3, 4]. La taille et la structure du biofilm seront alors régulées par des phases d'érosions [3]. La vie sous forme de biofilm est intéressante et essentielle pour de nombreuses espèces bactériennes dues aux nombreux avantages qu'elle procure à la bactérie, comme les résistances aux biocides ou la capacité à stocker des nutriments [4]. Les interactions complexes dans le biofilm, comme la capacité à mutualiser des fonctions métaboliques, l'optimisation de la structure du biofilm pour améliorer la diffusion des nutriments et la création d'un réseau d'échanges d'électrons font partie des raisons expliquant pourquoi les biofilms sont aussi efficaces pour une croissance optimale des bactéries dans l'environnement et en particulier en conditions de stress comme une restriction nutritive ou une agression par des biocides [1]. De telles capacités posent de nombreux problèmes dans les milieux où la croissance bactérienne doit être limitée pour des raisons sanitaires ou industrielles. Cependant, elles peuvent être exploitées, notamment dans des processus bioélectrochimiques où les transferts extracellulaires d'électrons (EET) sont impliqués.

Un biofilm électroactif est composé de bactéries capables de réaliser des réactions de transferts extracellulaires d'électrons (EET). Ces bactéries sont capables d'échanger des électrons entre elles, avec des navettes à électron présentes dans la matrice d'EPS mais aussi avec des accepteurs ou des donneurs d'électrons solides comme les électrodes sur lesquelles un biofilm peut être attaché. Aujourd'hui, les principales applications des biofilms électroactifs sont les piles à combustibles

microbiennes, l'électrocatalyse microbienne et l'électrosynthèse microbienne. Par exemple, dans une pile à combustible microbienne, l'énergie est générée par le catabolisme de nutriments au cours duquel les électrons générés sont transférés de la bactérie à l'anode [5, 6]. A l'opposé, l'énergie est consommée lors du transfert d'électrons de la cathode à la bactérie qui produit des composés énergétiques comme l'éthanol ou le dihydrogène, il s'agit alors de systèmes d'électrosynthèse microbienne [7, 8]. Par ailleurs, ces systèmes peuvent aussi aider à la bio remédiation d'espèces azotés ou du sulfate avec les systèmes d'électrocatalyse microbienne [9, 10]. Dans tous les cas, des transferts d'électrons ont lieu de manière simultanée à l'électrode opposée du système électrochimique (*i.e.* l'anode ou la cathode, dépendant du système) en impliquant une réaction biotique ou abiotique. La compréhension des mécanismes de transfert d'électrons et leur identification sont donc essentielles pour améliorer l'efficacité de l'EET dans les biofilms électroactifs naturels ou artificiels. Dans les sections qui vont suivre, nous allons tout d'abord détailler les mécanismes de transfert extracellulaire d'électrons identifiés chez les deux modèles bactériens les plus étudiés dans ce domaine de l'électromicrobiologie : *Shewanella oneidensis* et *Geobacter sulfurreducens*. Ensuite nous allons décrire différentes stratégies proposées dans la littérature permettant d'améliorer ces réactions de transfert d'électrons dans le biofilm pour des applications biotechnologiques avec notamment le concept de biofilm artificiel électroactif. Enfin le positionnement de cette thèse et l'articulation des chapitres qui la composent seront donnés.

I.2. Rôle clef des protéines membranaires dans les transferts extracellulaires d'électrons

La capacité du biofilm à échanger des électrons avec les électrodes est dérivée des interactions métaboliques entre la bactérie et les minéraux solides pouvant être utilisés comme donneurs ou accepteurs d'électrons dans l'environnement. *Shewanella* et *Geobacter* sont deux genres bactériens connus pour être électroactifs dont en particulier les espèces *Shewanella oneidensis* et *Geobacter sulfurreducens* ont été intensivement étudiées comme modèle dans ce domaine. Les deux sont des bactéries négatives à la coloration de Gram et appartiennent respectivement à la sous-division (ou classe) des gamma-proteobactéries et delta-protéobactéries. Au cours de leur évolution, ces bactéries

électroactives ont développé plusieurs mécanismes pour transférer les électrons à un substrat solide extracellulaire. Ces mécanismes sont généralement classés soit en tant que EET direct ou indirect. Au cours de l'EET direct, les transferts d'électrons sont permis soit par interaction directe [11] (Figure I.1.A) soit à travers des appendices conducteurs appelés *nanowires* [12] (Figure I.1.B). Il est intéressant de noter que les bactéries sont ainsi capables par contact direct entre elles de transférer les électrons sur plusieurs millimètres dans la nature [13]. Avec l'EET indirect, les transferts d'électrons sont médiés par des navettes à électrons autoproduites ou non par la bactérie, en diffusion libre dans le biofilm (Figure I.1.C) ou faiblement liées aux EPS [11] (Figure I.1.D). Ces médiateurs sont divers allant des cytochromes excrétés par la bactérie aux minéraux conducteurs présents dans l'environnement.

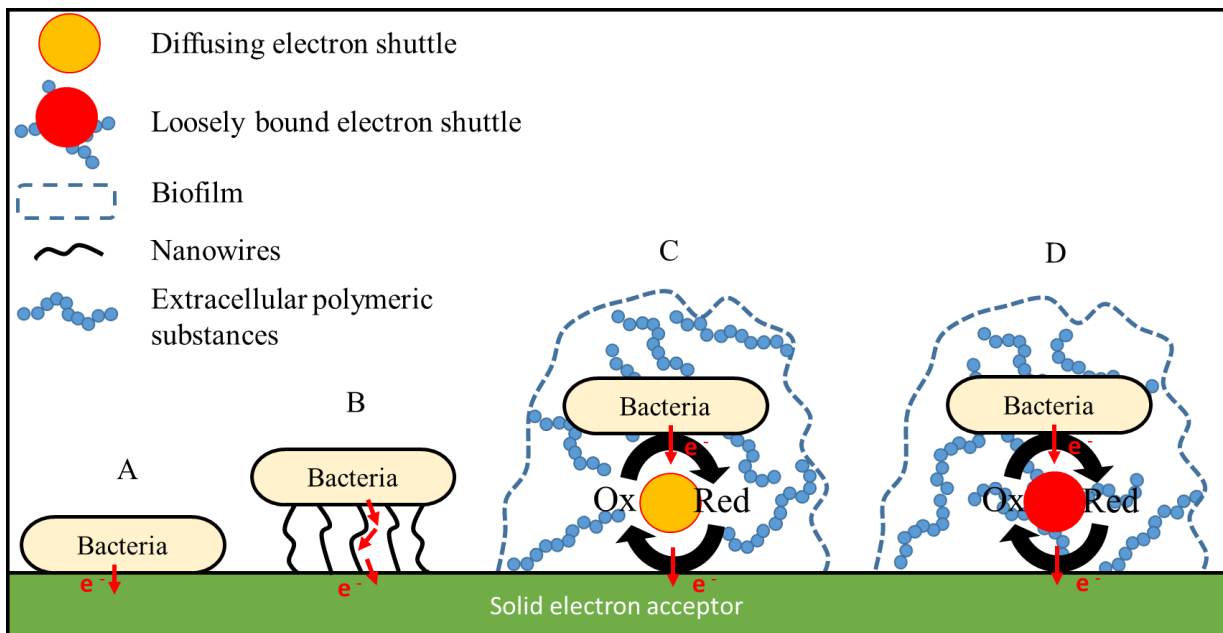


Figure I.1. Mécanismes de transferts extracellulaires d'électrons dans les biofilms électroactifs, extrait de Pinck et al. (2017) [14]. (A) Transfert direct entre la surface de la cellule et l'électrode ; (B) transfert direct avec l'électrode à travers des appendices conductrices, les *nanowires* ; (C) transfert indirect à travers des navettes à électrons diffusant dans le biofilm et (D) transfert indirect à travers des navettes à électrons faiblement liées aux EPS.

I.2.1. Les transferts d'électrons directs

Les protéines membranaires localisées à l'interface entre le cytoplasme bactérien et le milieu extracellulaire sont donc essentielles pour l'EET. Chez les bactéries gram négatives comme *S. oneidensis* et *G. sulfurreducens*, l'EET implique des cytochromes de type *c* [15]. Les analyses

biomoléculaires ont en effet montré que les gènes codant pour ces cytochromes sont très fortement exprimés chez ces bactéries dans les biofilms électroactifs [16, 17].

1.2.1.1. La famille des Mtr de S. oneidensis

Quatre types majeurs de cytochromes ont été identifiés comme participant à la voie *Mtr*, la machinerie moléculaire permettant le transfert des électrons à travers la membrane de *S. oneidensis* (Figure I.2) et conduisant à la réduction des métaux dans la nature. CymA, un cytochrome de type *c* à 4 hèmes de 21 kDa, est ancré dans la membrane interne et est caractérisé électrochimiquement par une gamme de potentiel comprise entre -350 mV et 0 *vs* SHE [18]. Au cours d'une réaction de transfert d'électrons de la bactérie vers l'anode, CymA collecte les électrons des ménaquinones et les transfère à MtrA, un cytochrome de type *c* à 10 hèmes de 32 kDa avec une échelle de potentielle comprise entre -400 mV et -100 *vs* SHE [18]. La localisation de MtrA dans l'espace périplasmique et partiellement dans la membrane externe ont amené certains auteurs à proposer que CymA et MtrA n'interagissent pas directement et que deux cytochromes périplasmiques FccA et STC [19, 20], avec des fonctions redondantes, servent d'intermédiaires dans les transferts d'électrons entre CymA et MtrA. Néanmoins leurs implications restent toujours sujettes à débat à l'heure actuelle. MtrA, une fois réduit par CymA, va former le complexe MtrABC avec MtrC et l'aide de MtrB, une porine de la membrane externe. MtrA est ainsi capable de transférer les électrons à MtrC et OmcA, deux cytochromes de type *c* à 10 hèmes localisés sur la face extracellulaire de la membrane externe. Les échelles de potentiel d'OmcA et MtrC sont respectivement de -400 mV à +100 et de -320 mV à -20 mV *vs* SHE [18]. OmcA et MtrC sont connus pour interagir ensemble [21] et vont être capables de transférer les électrons à l'accepteur final dans le milieu extracellulaire. Cependant, OmcA n'est pas nécessaire à la réalisation des transferts d'électrons vers l'accepteur final d'électrons [22]. Ce cheminement des électrons à travers la membrane de *S. oneidensis* est proposé comme réversible [23] et peut donc à la fois fonctionner à l'anode (où la bactérie transmet des électrons) comme à la cathode (où la bactérie reçoit des électrons).

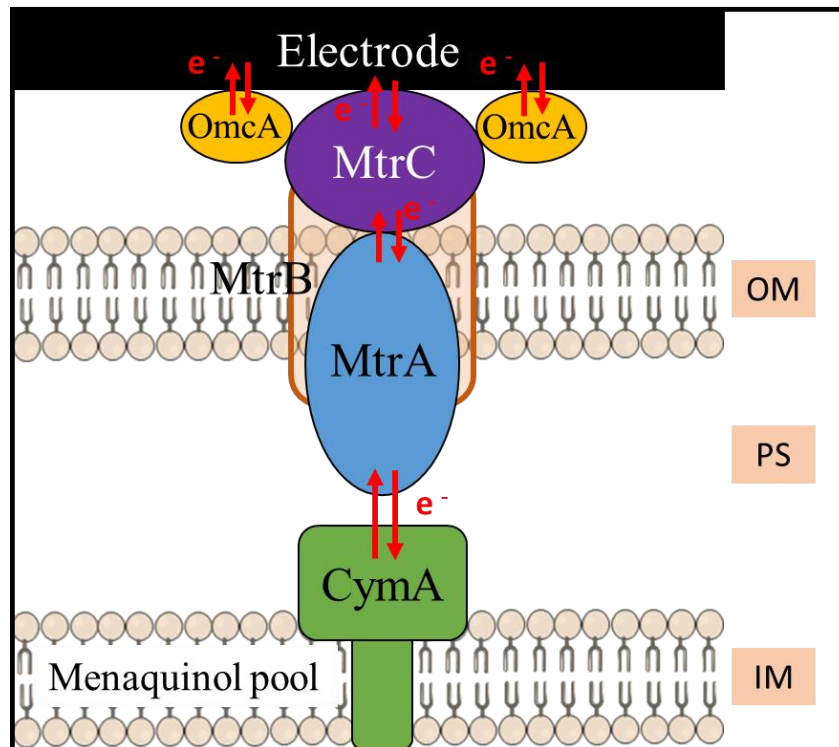


Figure I.2. Voie des *Mtr* de *Shewanella oneidensis* MR-1 [14]. Le cytochrome de la membrane interne *CymA* échange des électrons avec les ménaquinones et le cytochrome périplasmique *MtrA*. *MtrA* échange les électrons avec les cytochromes de la membrane externe *MtrC* et *OmcA* à l'aide de la porine *MtrB*. Le transfert des électrons est réversible. OM: membrane externe, IM: membrane interne (ou membrane cytoplasmique), PS: espace périplasmique.

1.2.1.2. EET par interaction directe chez *G. sulfurreducens*

Les cytochromes impliqués dans l'EET par interaction directe chez *G. sulfurreducens* sont plus divers que ceux chez *S. oneidensis* et les mécanismes moléculaires impliqués sont encore à ce jour en cours d'investigation. Par exemple, une souche mutée pour *OmcS*, *OmcE*, *OmcZ* ou *OmcB*, des cytochromes localisés sur la membrane externe de *G. sulfurreducens* et prédits comme impliqués dans l'EET avec l'anode, ne montre qu'une perte partielle de sa capacité à réaliser des transferts d'électrons [24]. Il est ainsi proposé que *G. sulfurreducens* possède une grande diversité de cytochromes analogues avec des rôles redondants dans les transferts d'électrons. Le modèle alors proposé pour l'EET par contact direct chez *G. sulfurreducens* est décrit par rapport à sa capacité à réduire les oxydes de fer. Dans ce modèle, le cytochrome de type *c* *MacA* localisé sur la membrane interne de la bactérie interagit avec les ménaquinones [25] et transfère ensuite les électrons aux cytochromes de la famille des *PpcA/B/C/D/E* [26] localisés dans le périplasmique. Ces cytochromes interagiraient alors avec le complexe formé par le cytochrome périplasmique *OmaB/C*, les porines

putatives de la membrane externe OmbB/C et les cytochromes de la membrane externe OmcB/C [26]. Cependant OmcB/C ne seraient pas les derniers donneurs d'électrons à l'accepteur solide extracellulaire ; ils transfèreraient ces électrons à d'autres cytochromes de la membrane externe [26] comme OmcE, OmcZ ou encore comme le cytochrome OmcS qui est prédit associé aux *nanowires* [27] (Figure I.3A), avant de les céder au solide considéré comme l'accepteur final.

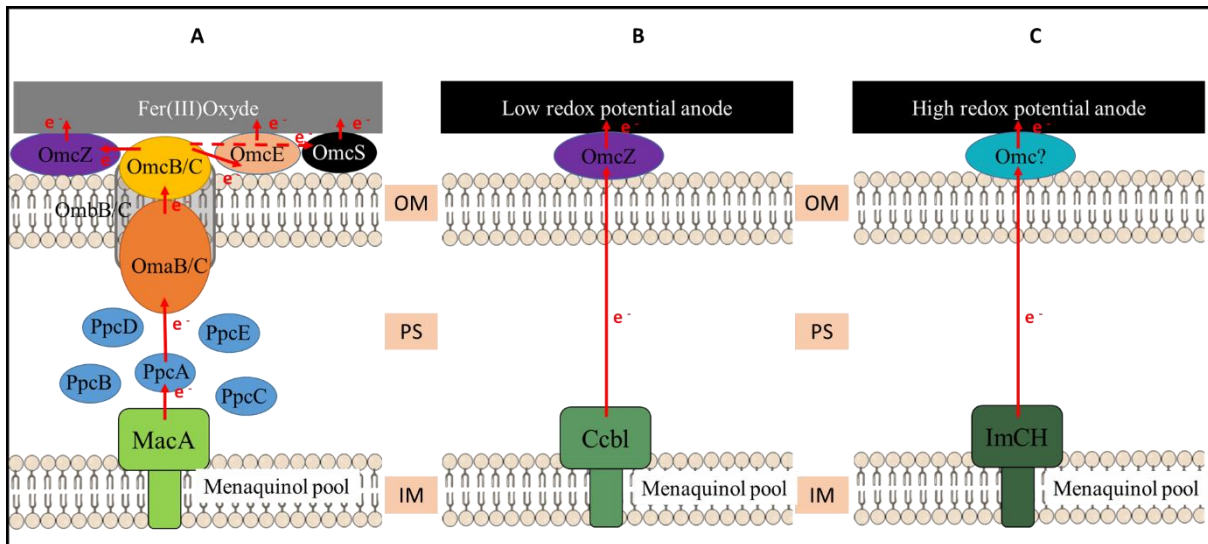


Figure I.3. Mécanisme de transferts extracellulaires d'électrons par contact direct chez *Geobacter sulfurreducens* PCA [14]. (A) Le cytochrome de la membrane interne MacA échange des électrons avec les ménaquinones et les cytochromes périplasmique de la famille des Ppc. PpcA transfère ces électrons au complexe protéique, formé par OmaB/C, OmbB/C et OmcB/C, qui transfère les électrons à des cytochromes de la membrane externe comme OmcE, OmcS or OmcZ pour réduire les oxydes de fer. (B) Le cytochrome de la membrane interne CbcL transfère les électrons des ménaquinones aux protéines redox périplasmiques. Les protéines redox impliquées restent encore à identifier. A faible potentiel redox de l'électrode (< -0.1 V vs SHE), la protéine redox terminale est le cytochrome de la membrane externe OmcZ. (C) A haut potentiel redox de l'électrode (> -0.1 V vs SHE), les électrons des ménaquinones sont transférés aux cytochromes de la membrane interne ImCH. OM : membrane externe, IM : membrane interne, PS : espace périplasmique.

Ce modèle (Fig. I.3), décrivant la capacité de *G. sulfurreducens* à réduire les oxydes de fer, est controversé. En effet, OmcE ne participe pas aux réactions de transfert d'électrons à l'anode et quand OmcS est muté, les transferts d'électrons ne sont que peu impactés [28]. En conséquence, ce modèle n'est pas applicable dans des réactions de transfert d'électrons avec une électrode et dans les systèmes artificiels. Un second modèle, encore incomplet, a récemment été proposé comme alternative dans lequel les acteurs impliqués dans l'ETT par transfert direct dépendraient du potentiel redox de l'électrode.

A faible potentiel redox (Figure I.3B), en dessous de -100 mV vs SHE, CbcL, un cytochrome localisé sur la membrane interne, recevrait les électrons des ménaquinones [29]. Si les acteurs au niveau périplasmique ne sont pas encore déterminés, il est cependant montré que le donneur terminal d'électrons au niveau de la membrane externe serait le cytochrome OmcZ [29]. OmcB ne serait pas impliqué dans ce modèle de transfert d'électrons, la mutation d'OmcB n'ayant aucun effet sur la capacité de la bactérie à transférer les électrons [29]. A haut potentiel redox (Figure 3C), au-dessus de -100 mV vs. SHE, c'est le cytochrome ImcH [28], un autre cytochrome localisé sur la membrane interne, qui recevrait les électrons des ménaquinones. Pour l'instant, aucune autre donnée n'est disponible quant aux autres acteurs impliqués au niveau membranaire dans les transferts d'électrons dans cette configuration (Figure I.3C) [30].

Il est aussi important de noter que les voies de transfert d'électrons décrites précédemment pour *Geobacter* ne sont valables qu'en réaction anodique et ne sont pas confirmées à la cathode. Contrairement à *S. oneidensis* dont la voie de transfert d'électrons est décrite comme réversible dans la littérature, les acteurs des transferts extracellulaires directs d'électrons sont significativement différents chez *Geobacter* à la cathode et à l'anode. Des mutants *knock-out*¹ pour les gènes codant les cytochromes impliqués dans l'EET à l'anode sont en effet capables de réaliser l'EET avec la cathode [31]. Actuellement, seul le cytochrome PccH est proposé comme acteur de l'EET à la cathode chez *G. sulfurreducens* [32]. Cependant une étude récente chez une autre espèce de *Geobacter* a montré qu'elle est capable de réaliser des transferts d'électrons avec la cathode alors qu'elle ne possède aucun gène homologue codant pour la protéine PccH [33]. Il y a consensus pour dire qu'il existe une grande variété de cytochromes analogues présents chez *Geobacter spp.* et impliqués dans l'EET à l'anode comme à la cathode.

¹ C'est-à-dire l'invalidation totale d'un gène, en général par insertion de séquence, pour en étudier les conséquences sur le phénotype.

I.2.1.3. Transferts d'électrons à travers des appendices conducteurs : les nanowires

Les *nanowires*, des appendices bactériens conducteurs, ont tous d'abord été décrits chez deux bactéries différentes : *G. sulfurreducens* [34] et *S. oneidensis* [35]. Les *nanowires* sont habituellement classés en tant que mécanisme d'EET direct. La nature de ces appendices conducteurs dépend du modèle bactérien où ils ont été observés.

Chez *S. oneidensis*, les *nanowires* ont été caractérisés en immunofluorescence et sont décrits comme des extensions périplasmiques de la membrane externe [35](Figure I.4A). Sur ces extensions membranaires, il est supposé que les cytochromes nécessaires aux transferts d'électrons sont présents, *i.e.* le complexe MtrABC avec OmcA. Ce modèle de *nanowire* est assez bien documenté, son analyse a été complétée par des techniques de biologie moléculaire [36]. L'autre modèle de *nanowire* est décrit chez *G. sulfurreducens*. Il impliquerait un pili de type IV conducteur [34]. Sa conductivité serait de type métallique et résulterait d'interactions de type π - π *stacking* entre les résidus des acides aminés aromatiques constituant le pili [34](Figure I.4B). Ce modèle est controversé car les mutants *knock-out* pour ces pili qui ont été utilisés pour démontrer leur rôle dans l'EET, étaient aussi défectifs pour des cytochromes impliqués dans l'EET. De plus, le cytochrome membranaire OmcS avait été trouvé associé à ces pili conducteurs [27]. En outre, une étude récente a montré que le transport d'électrons dans ces biofilms était thermiquement dépendant, ce qui est en accord avec un transport d'électrons impliquant des cytochromes [37]. Cependant, des études récentes ont montré que le cytochrome OmcS est associé avec la surface de la cellule et non avec les *nanowires* [38] et que le pili de *G. sulfurreducens* est effectivement conducteur [39]. Le travail de Feliciano et al. démontre ainsi que la conductivité du pili repose sur des interactions entre les chaînes latérales des acides aminés constituant le pili alors que la conductivité de type métallique précédemment observée est seulement transitoire et situationnelle dans le biofilm [39]. Un modèle réconciliant ces analyses contradictoires a alors été proposé où le transport d'électrons implique des *nanowires* conducteurs coopérant avec les cytochromes présents sur les membranes externes bactériennes et piégés dans la matrice d'EPS pour permettre des réactions de transfert d'électrons efficaces au sein des biofilms épais [40].

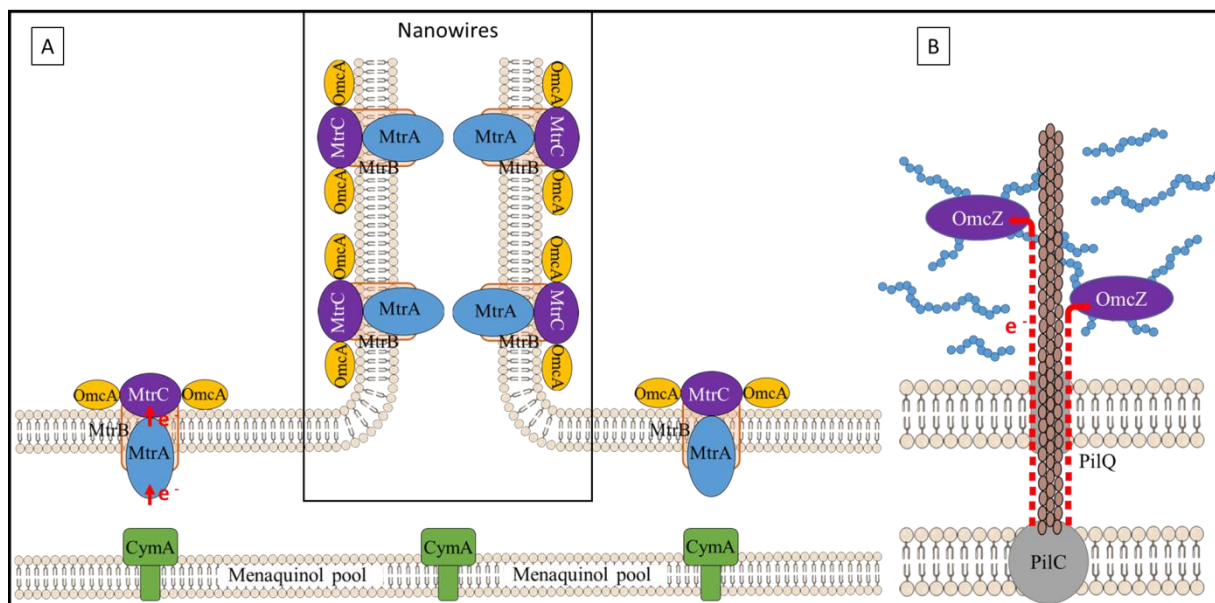


Figure I.4. Les deux modèles d'appendices conducteurs, [14]. (A) Les appendices chez *Shewanella oneidensis* sont des extensions périplasmiques de la membrane externe. Le complexe formé par le cytochrome périplasmique MtrA avec la porine MtrB et les deux cytochromes de la membrane externe MtrC et OmcA est présent sur ces extensions. (B) Les appendices chez *Geobacter sulfurreducens* sont des pili de type IV conducteurs. Les électrons seraient transférés le long des chaînes latérales des acides aminés par saut d'électrons. Les électrons seraient ensuite transférés à des cytochromes faiblement liés aux EPS, comme OmcZ.

I.2.2. Les transferts extracellulaires indirects d'électrons

I.2.2.1. Transferts d'électrons médiés par des navettes autoproduites

La plupart des propriétés redox des EPS résulteraient de cytochromes de la membrane externe sécrétés dans le milieu extracellulaire et faiblement liés aux EPS. Par exemple, il est démontré que les propriétés redox de la matrice d'EPS chez *S. oneidensis* viennent en réalité des cytochromes de la membrane externe MtrC et OmcA excrétés par la cellule et piégés dans la matrice d'EPS [41, 42]. De manière similaire, des études génomiques montrent la présence du cytochrome OmcZ dans la matrice d'EPS des biofilms formés par *G. sulfurreducens* [43]. Ces cytochromes excrétés sont proposés comme jouant le rôle de navettes à électrons dans les EPS et participant aux EET indirects dans le biofilm.

Les transferts extracellulaires d'électrons ont aussi été décrits comme fortement dépendant de la présence de médiateurs autoproduits par la bactérie chez *S. oneidensis*. Ces médiateurs seraient des dérivés des quinones : les flavines mononucléotides et les riboflavines [44]. Cependant des études récentes ont démontré que les flavines et riboflavines étaient plutôt des cofacteurs associés aux

cytochromes de la membrane externe MtrC et OmcA que des navettes à électrons [45, 46]. Un comportement similaire est aussi observé chez *G. sulfurreducens* [47]. Ces molécules auraient donc une faible activité en tant que navette à électrons et agiraient plus en tant que cofacteurs associés aux cytochromes bactériens sur la membrane externe mais aussi avec ceux excrétés et faiblement liés aux EPS.

1.2.2.2. Des molécules et des nanoparticules de l'environnement comme navette ou relais

L'EET indirect peut aussi être médié par des molécules redox présentes dans le milieu extracellulaire et non secrétés par la bactérie. La littérature rapporte ainsi que la présence d'anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS, une molécule diffusible utilisée comme modèle des motifs quinones portés par les substances humiques) ou encore des substances humiques permettent d'améliorer les transferts d'électrons [48]. Ces particules présentes dans l'environnement servent alors d'intermédiaires pour les transferts d'électrons entre les bactéries et le donneur ou accepteur extracellulaire final d'électrons.

Un rôle similaire a été observé avec des nanoparticules minérales dans des processus de transferts d'électrons inter-espèces. Il a été démontré qu'en présence d'oxydes de fer nanoparticulaires semiconducteurs, de magnétite ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_4$) ou d'hématite (Fe_2O_3), et de cellules actives de *G. sulfurreducens*, *Thiobacillus denitrificans* était capable de réaliser une dénitrification à la cathode alors qu'elle en est incapable lorsqu'elle est la seule localisée à la cathode ou juste en présence de *G. sulfurreducens* sans les oxydes de fer [49]. Dans cette configuration *G. sulfurreducens* et *T. denitrificans* s'échangeraient leurs électrons en utilisant les nano-minéraux conducteurs comme relais à électrons. Ces nanoparticules conductrices permettraient ainsi l'EET en participant à une chaîne de transfert d'électrons dans des biofilms électroactifs multi-espèces [49, 50] (Figure I.5).

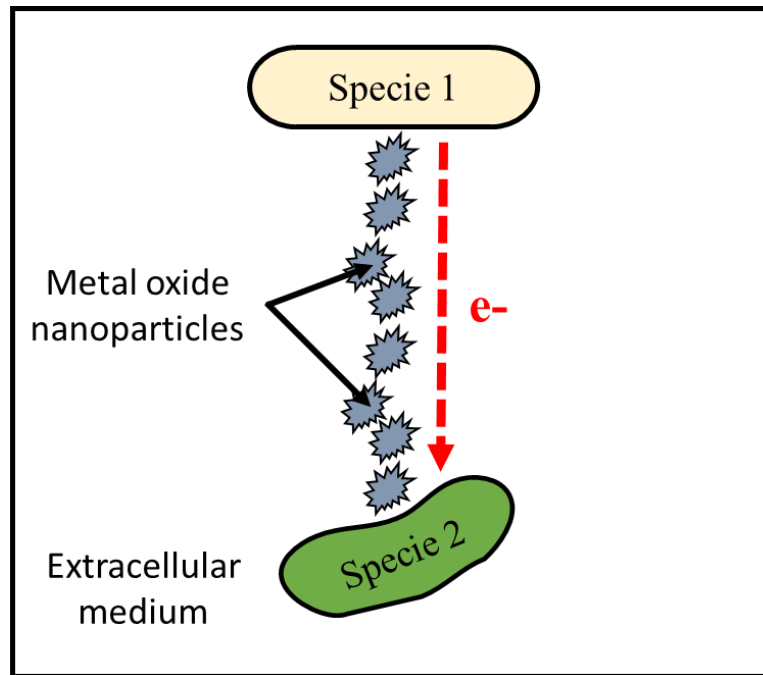


Figure I.5. Transfert indirect inter-espèces d'électrons permis par des nanoparticules d'oxydes de fer, extrait et adapté depuis Miot, J., & Etique, M. (2016) [51] et depuis Kato et al. (2012) [49]. L'espèce bactérienne 1 reçoit les électrons d'une électrode et les transfère à l'espèce bactérienne 2 à l'aide de nanoparticules d'oxydes de fer.

I.3. Amélioration des transferts d'électrons dans les processus électrochimiques microbiens

Avec le temps, les bactéries ont développé pour leur survie de nombreux mécanismes de transfert extracellulaire d'électrons pour échanger ces derniers avec des accepteurs ou donneurs présents dans leur environnement. Ces mécanismes, présentés plus haut, sont divers, allant de l'appendice conducteur aux médiateurs autoproduits ou exogènes. Néanmoins, les transferts d'électrons peuvent ne pas être optimaux dans les biofilms électroactifs naturels ; les bactéries ont certes développé de nombreux mécanismes mais beaucoup ne s'expriment que de manières situationnelles, comme les nanowires [11] et ne sont pas forcément adaptés à un fonctionnement dans les processus électrochimiques découverts par l'Homme. De plus, ajouté à cette expression situationnelle de certains mécanismes, leur fonctionnement et les acteurs impliqués ne sont pas toujours bien définis. Il peut donc être nécessaire d'optimiser les transferts d'électrons dans les systèmes bioélectrochimiques et d'étudier en détail les mécanismes impliqués.

Pour améliorer cette capacité à transférer les électrons entre les bactéries électroactives et les électrodes dans les technologies d'électromicrobiologie, plusieurs stratégies existent à ce jour. Ces stratégies peuvent être définies en quatre grandes catégories avec (A) l'optimisation de l'électrode, (B) l'utilisation de souches bactériennes génétiquement modifiées ou simplement sélectionnées, (C) l'optimisation du biofilm par ajout de médiateurs redox exogènes et (D) l'optimisation de la matrice en assemblant le biofilm artificiellement (Figure I.6).

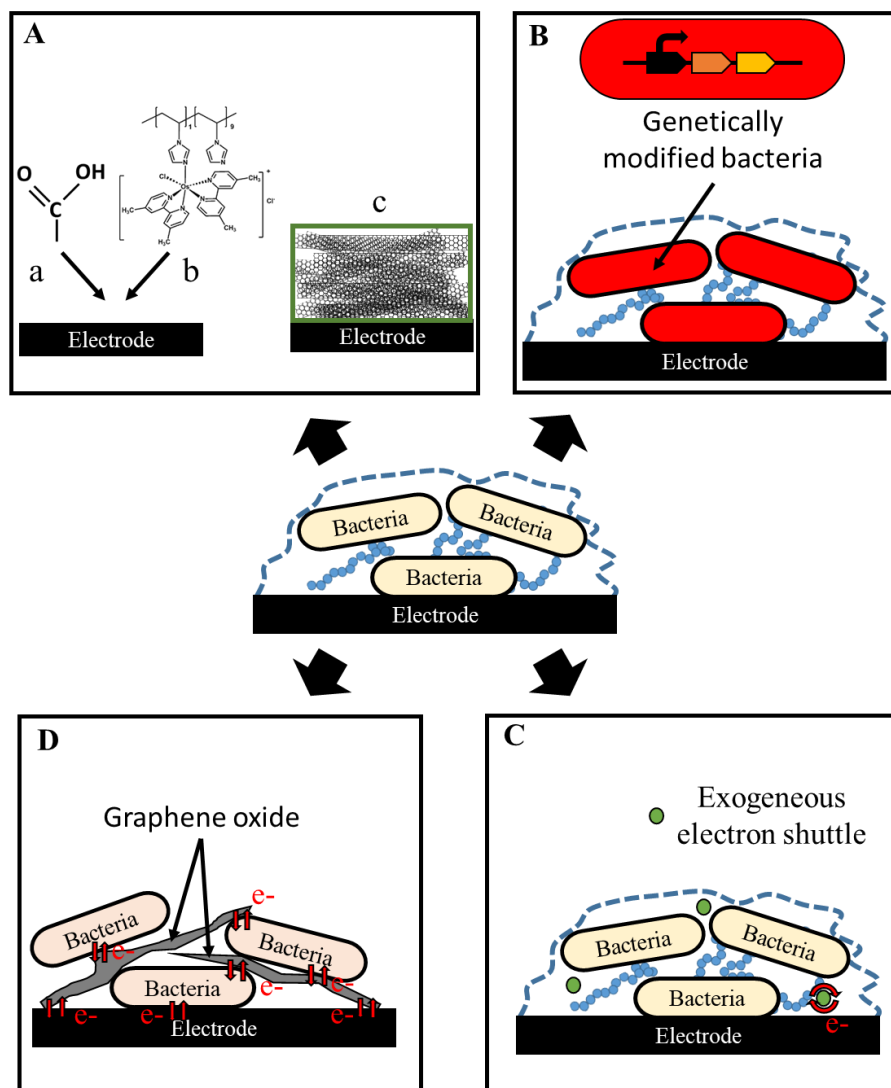


Figure I.6. Optimisation possible des biofilms électroactifs dans les biofilms électroactifs, (A) L'électrode peut être optimisée en la modifiant avec (a) des groupes fonctionnels comme les groupes carboxyles, (b) des polymères redox comme les polymères d'osmium et (c) texturant la surface de l'électrode (ici avec des nanotubes de carbone). (B) La bactérie peut être modifiée génétiquement pour améliorer les transferts d'électrons. (C) Des navettes à électrons exogènes peuvent être ajoutées dans le milieu pour améliorer les transferts d'électrons. (D) Les transferts d'électrons peuvent être optimisés en reconstituant le biofilm de manière artificiel : ici en présence d'oxyde de graphène.

I.3.1. Optimisation de l'électrode

L'électrode peut être optimisée dans le but d'améliorer les transferts d'électrons avec le biofilm bactérien. Cette optimisation est généralement obtenue en contrôlant la texture et la surface de l'électrode (Figure I.6.A).

En général, augmenter la surface active de l'électrode aide à la formation et à la croissance du biofilm [52], néanmoins l'augmentation de cette surface et sa texture peuvent être défavorable au transport des nutriments dans le biofilm. Il est donc nécessaire d'utiliser une combinaison de différentes textures de pore pour atteindre les plus hautes performances (Figure I.6.A).

Augmenter le caractère hydrophile de la surface de l'électrode peut aussi favoriser l'adhésion des cellules à cette dernière durant les phases précoces de formation du biofilm et ainsi aider à enrichir la population microbienne [53]. L'introduction de fonctions spécifiques permet ainsi d'améliorer l'adhésion et la colonisation de l'électrode car cela modifie l'hydrophilie/lipophilie ainsi que les charges de surfaces. Les acides boroniques, les fonctions phosphonium, carboxyle, amine, hydroxyle ou encore méthyle font partie des groupements fonctionnels qui sont généralement étudiés dans ce but [54] (Figure I.6.A). La modification de l'électrodes avec des molécules redox, *e.g.* des complexes d'osmium ou des quinones, influence aussi les transferts d'électrons dans les systèmes électrochimiques microbiens car elles favorisent les échanges avec la bactérie [55] (Figure I.6.A). La texture et la chimie de surface peuvent aussi être utilisées ensemble pour améliorer les transferts d'électrons dans les systèmes microbiens comme cela a été récemment illustré pour une électrode modifiée avec la polydopamine (PDA)[56]. La modification avec la PDA offre un groupement fonctionnel qui augmente l'hydrophilie de l'anode et améliore le nombre de sites électrochimiques actifs capables d'accepter les électrons de la bactérie, permettant ainsi, dans une pile à combustible microbienne, d'augmenter de 31% la puissance maximale avec des valeurs passant de 613 ± 9 à 803 ± 6 mW.m⁻² et de 19 à 48% en efficacité coulombique.

I.3.2. La bactérie : un point clef dans les systèmes électrochimiques microbiens

Les bactéries électroactives présentes dans les biofilms électroactifs sont les catalyseurs permettant la génération du courant dans les piles à combustible microbiennes et l'activité catalytique

dans l'électrocatalyse microbienne et l'électrosynthèse microbienne. Choisir la souche la plus optimale pour l'activité recherchée permet donc déjà d'optimiser le système par rapport à l'utilisation d'un consortium bactérien non contrôlé. La manière habituelle d'améliorer l'EET dans ces biofilms bactériens sera alors d'enrichir ce dernier en bactéries électroactives, soit en inoculant le système avec la ou les souche(s) considérée(s), soit en les sélectionnant dans le temps à partir d'un inoculât complexe, *e.g.* en choisissant la surface et le potentiel d'électrode les plus adaptés [57]. Récemment, une stratégie pour améliorer l'EET dans les biofilms est apparue. Elle consiste à modifier génétiquement des bactéries sélectionnées pour exacerber leur capacité à transférer des électrons dans le milieu extracellulaire [58–61]. La modification génétique de la souche est en général utilisée de deux manières, soit pour faire exprimer à la souche des protéines dont elle est dépourvue à l'origine, soit pour améliorer l'expression d'une protéine que la souche exprime déjà. Une étude récente illustre très bien le premier cas avec une cyanobactérie modifiée génétiquement pour exprimer les cytochromes membranaires OmcS de *Geobacter spp.* [58]. La souche modifiée de cette cyanobactérie a permis alors d'améliorer de 9 fois le photocourant généré (70 mA m^{-2}) par rapport à la souche sauvage (8 mA m^{-2}). Une autre étude permet d'illustrer le second cas, avec une souche de *S. oneidensis* modifiée pour exprimer une voie de biosynthèse des flavines présente chez *B. subtilis* et ainsi améliorer sa production de flavine impliquée dans l'EET indirect de la bactérie [59]. La souche modifiée génétiquement permet alors d'améliorer 15 fois la densité de courant obtenue avec une augmentation de $15,5$ à $255 \mu\text{A cm}^{-2}$ par rapport à la souche sauvage. La modification génétique des organismes ouvre ainsi de nombreuses perspectives d'application en biotechnologie pour les biofilms électroactifs.

I.3.3. Optimisation du biofilm avec des médiateurs exogènes

La matrice d'un biofilm est naturellement perméable, il est donc possible dans ces conditions d'améliorer les transferts d'électrons dans le biofilm en utilisant des médiateurs exogènes, *i.e.* pour favoriser les transferts d'électrons entre les bactéries et l'électrode (Figure I.6C). L'utilisation de molécules redox solubles comme la thionine, le vert de malachite et le 5-méthyle 1,hydroxy phénazine

[62, 63]. Le 5-méthyle 1,hydroxy phénazine peut ainsi permettre d'améliorer les transferts d'électrons jusqu'à 2 fois entre le biofilm et l'électrode [63].

I.3.4. Reconstituer un biofilm artificiellement

Une dernière stratégie permettant d'améliorer et d'optimiser les transferts d'électrons entre la bactérie et son support est de reconstituer artificiellement le biofilm en choisissant les composants présents. Cette stratégie bio-inspirée permet de contrôler la croissance et la viabilité bactérienne mais aussi d'optimiser les transferts d'électrons. Un biofilm artificiel peut être défini comme un film bactérien mimant un biofilm où des bactéries sélectionnées sont immobilisées en présence d'éléments exogènes sous forme d'un biocomposite (Figure 1.6D). Le choix des éléments exogènes ajoutés dans les biofilms permettrait alors d'optimiser l'EET mais aussi d'étudier plus en détail les mécanismes impliqués dans l'EET. Il est possible, par le choix des éléments exogènes, d'optimiser un mécanisme de transfert d'électrons donné. Les avantages du biofilm artificiel dépendront des éléments exogènes choisis pour le former en présence des bactéries.

Le concept de biofilm artificiel électroactif est assez récent. Il a été illustré en 2009 par Nakamura et al. avec un biocomposite bactérien auto-assemblé avec des colloïdes d'oxydes ferriques [64]. Le biocomposite alors formé par *S. liohica* et les colloïdes d'oxydes ferriques a permis une augmentation du courant de 60 fois par rapport à la souche seule (0,5 μA vs 40 μA). Il a été proposé que le courant dans le composite était augmenté due à la présence des colloïdes qui permettent d'optimiser l'EET en jouant le rôle de relais à électrons à l'instar des nanoparticules minérales impliqués dans les transferts d'électrons inter-espèces [49].

En 2011, Luckarift et al. ont illustré un autre type de biofilm artificiel avec la fabrication d'une bioanode où *S. oneidensis* était immobilisé dans un gel de silice [65]. Le gel de silice jouait alors le rôle de matrice artificielle pour les bactéries. Le gel de silice était adapté à la formation du biofilm artificiel, dû à ces conditions de formation compatible avec la manipulation de matériel biologique. Plus de 50 % des bactéries piégées dans un tel biofilm artificiel restaient actives après 1 mois [66]. Une optimisation de ce biofilm artificiel avait ensuite été apportée en enrobant des cytochromes

exogènes en présence de *P. fluorescence* dans le gel de silice permettant d'améliorer les transferts d'électrons de 8 fois avec une densité de courant de $0,4 \mu\text{A cm}^{-2}$ par rapport à $0,05 \mu\text{A cm}^{-2}$ dans un film formé en absence de cytochromes [67]. Ces biofilms artificiels permettaient ainsi d'améliorer les transferts d'électrons dans le biofilm en optimisant la survie des bactéries et en limitant leur décrochage de l'électrode tout en optimisant l'EET indirect avec la présence du cytochrome *c* exogène.

Des études plus récentes ont proposé quant à elle de former des biocomposites en utilisant des nanomatériaux carbonés [68, 69]. Dans une première étude, l'oxyde de graphène a été utilisé pour former un composite avec *S. oneidensis* [68]. La bactérie s'auto-assemblait avec l'oxyde de graphène pendant deux semaines en le réduisant et le système obtenu permettait d'obtenir des courants 25 fois plus important à l'anode ($0,5 \text{ mA cm}^{-2}$ vs $0,02 \text{ mA cm}^{-2}$) et 74 fois plus important à la cathode ($0,9 \text{ mA cm}^{-2}$ vs $0,02 \text{ mA cm}^{-2}$). Dans une autre étude, *S. oneidensis* a été cette fois assemblé avec des oxydes de graphène associés à des nanotubes de carbones [69]. Le biocomposite présentait alors des densités de courants 6 fois supérieures à l'anode par rapport aux biofilms témoins ($120 \mu\text{A cm}^{-2}$ vs $20 \mu\text{A cm}^{-2}$).

La diversité des matériaux et des molécules électroactives font donc de cette stratégie d'assemblage artificielle du biofilm une méthode permettant de répondre à certaines limites des biofilms naturels comme la limitation des transferts d'électrons dans les biofilms épais. La possibilité de choisir des éléments exogènes optimisant l'un ou l'autre des mécanismes impliqués dans l'EET permettrait d'explorer des questions fondamentales sur les mécanismes impliqués dans l'EET bactérien.

I.4. Position de la thèse

Les réactions de transfert d'électrons sont assurées par de nombreux mécanismes impliquant différents acteurs tel que des protéines membranaires, des navettes ou des relais à électrons ou encore des *nanowires*. La variété des bactéries capables de réaliser ces transferts extracellulaires d'électrons ajoutée à ces nombreux mécanismes appellent à plus de recherches fondamentales pour mieux

caractériser, identifier les protéines redox et mieux détailler les mécanismes impliqués. L'importance des biofilms électroactifs dans les systèmes bioélectrochimiques a conduit à proposer différentes stratégies pour favoriser l'application recherchée, comme la production d'énergie, la dépollution de l'eau ou encore la production de molécules. Après des développements majeurs portant sur les électrodes, les outils génétiques et les approches bio-inspirées proposés récemment ouvrent de nouvelles possibilités. L'assemblage artificiel du biofilm, présenté précédemment au cours de cette analyse bibliographique, permet notamment de s'intéresser à des questions fondamentales et de proposer dans le même temps un système favorisant les réactions de transfert d'électrons. Cette stratégie est cependant peu utilisée dans le domaine de l'électrochimie microbienne [64–69]. De nombreux éléments exogènes (protéines, nanomatériaux) peuvent être considérés pour construire un tel biofilm artificiel électroactif. Les nanotubes de carbone, par leurs dimensions et leur forme, peuvent mimer les *nanowires* produits par certaines bactéries. Et nous savons que ces *nanowires* naturels sont associés à des cytochromes de type *c* [35, 39]. Cette thèse s'est donc focalisée au départ sur l'auto-assemblage de *S. oneidensis* en présence de nanotubes de carbone et de cytochrome *c*. Par ailleurs, les nanotubes de carbone possèdent une capacité d'immobilisation élevée pour les bactéries [70] qui résulterait des nombreux sites où les bactéries pourraient s'ancrer [70–72], ce qui leur donnerait un effet structurant. Ces nanotubes sont également conducteurs ; cette propriété a été utilisée avec succès avec des bactéries électroactives par Yazdi et al. [73]. Enfin leurs propriétés de surfaces sont modifiables chimiquement [74]. Cependant, ils peuvent être cytotoxique pour les bactéries [75–77]. Cette cytotoxicité peut être causée par un contact direct entre la membrane bactérienne et le nanotube de carbone et/ou par une induction du stress oxydatif [78]. L'auto-assemblage des bactéries avec les nanotubes de carbone et le cytochrome c_1 a donc été étudié en portant une attention particulière à la cytotoxicité des nanotubes. Les réactions de transfert d'électrons associées à l'oxydation du formiate par le biofilm artificiel électroactif ont ensuite été analysées par électrochimie. Ce système a ensuite été modifié pour permettre la réaction de réduction du fumarate (Chapitre 3). Finalement, une stratégie déduite des travaux précédents a été choisie pour promouvoir les réactions de transfert directs d'électrons entre le complexe *Mtr* réversible de *S. oneidensis* et différents nanomatériaux carbonés (Chapitre 4).

I.5. Références

- 1 Flemming H., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., & Rice S.A. (2016) Biofilms : an emergent form of bacterial life. *Nat. Publ. Gr.*, 14(9), 563–575. Nature Publishing Group.
- 2 Thormann K.M., Saville M., Shukla S., Pelletier D.A., & Spormann A.M. (2004) Initial phases of biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J. Bacteriol.*, 186(23), 8096–8104.
- 3 Thormann K.M., Duttler S., Saville R.M., Hyodo M., Shukla S., et al. (2006) Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *J. Bacteriol.*, 188(7), 2681–2691.
- 4 Jefferson K.K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm ? *FEMS Microbiol. Lett.*, 236, 163–173.
- 5 Kim H.J., Park H.S., Hyun M.S., Chang I.S., Kim M., et al. (2002) A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium , *Shewanella putrefaciens*. *Enzym. Microb. Technol.*, 30, 145–152.
- 6 Park Y.H., Smith G., & Park E. (2016) Mediator-less microbial fuel cell employing *Shewanella Oneidensis*. *Energy Sources, Part A Recover. Util. Environ. Eff.*, 38(12), 1779–1784. Taylor & Francis.
- 7 Steinbusch K.J.J., Hamelers H.V.M., Schaap J.D., Kampman C., & Buisman C.J.N. (2010) Bioelectrochemical ethanol production through mediated acetate reduction by mixed cultures. *Environ. Sci. Technol.*, 513–517.
- 8 Rozendal R.A., Jeremiassen A.W., Hamelers H.V.M., & Buisman C.J.N. (2008) Hydrogen production with a microbial biocathode. *Environ. Sci. Technol.*, 42(2), 629–634.
- 9 Luo H., Teng W., Liu G., Zhang R., & Lu Y. (2016) Sulfate reduction and microbial community of autotrophic biocathode in response to acidity. *Process Biochem.*, 8–15. Elsevier Ltd.
- 10 Al-mamun A., Baawain M.S., Egger F., Al-Muhtaseb A.H., & Ng H.Y. (2017) Optimization of a baffled-reactor microbial fuel cell using autotrophic denitrifying bio-cathode for removing nitrogen and recovering electrical energy. *Biochem. Eng. J.*, 120, 93–102. Elsevier B.V.
- 11 Lies D.P., Hernandez M.E., Kappler A., Mielke R.E., Gralnick J.A., et al. (2005) *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(8), 4414–4426.
- 12 Strycharz-Glaven S.M., Snider R.M., Guiseppi-Elie A., & Tender L.M. (2011) On the electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms. *Energy Environ. Sci.*, 4(11), 4366.
- 13 Pfeffer C., Larsen S., Song J., Dong M., Besenbacher F., et al. (2012) Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances. *Nature*.
- 14 Pinck S., Jorand F.P.A., & Etienne M. (2017) Electrochemistry of biofilms. In *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*.
- 15 Shi L., Squier T.C., Zachara J.M., & Fredrickson J.K. (2007) Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter* : a key role for multihaem c -type cytochromes. *Mol. Microbiol.*, 65, 12–20.
- 16 Bretschger O., Obraztsova A., Sturm C.A., Chang I.S., Gorby Y.A., et al. (2007) Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(21), 7003–7012.
- 17 Aklujar M., Coppi M.V., Leang C., Kim B.C., Chavan M.A., et al. (2013) Proteins involved in electron transfer to Fe(III) and Mn(IV) oxides by *Geobacter sulfurreducens* and *Geobacter*

- uraniireducens*. *Microbiology*, 159(January), 515–535.
- 18 Shi L.,Rosso K.M.,Clarke T.A.,Richardson D.J.,Zachara J.M.,et al.(2012) Molecular underpinnings of Fe (III) oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front. Microbiol.*, 3(February), 1–10.
 - 19 Fonseca B.M.,Paquete C.M.,Neto S.E.,Pacheco I.,Soares C.M.,et al.(2013) Mind the gap : cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochem. J.*, 108, 101–108.
 - 20 Alves M.N.,Neto S.E.,Alves A.S.,Fonseca B.M.,Carrêlo A.,et al.(2015) Characterization of the periplasmic redox network that sustains the versatile anaerobic metabolism of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front. Microbiol.*, 6(June), 1–10.
 - 21 Shi L.,Chen B.,Wang Z.,Elias D.A.,Mayer M.U.,et al.(2006) Isolation of a high-affinity functional protein complex between OmcA and MtrC : two outer membrane decaheme c -type cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1. *J. Bacteriol.*, 188(13), 4705–4714.
 - 22 Coursolle D.,& Gralnick J.A.(2012) Reconstruction of extracellular respiratory pathways for iron (III) reduction in *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Front. Microbiol.*, 3(56), 1–11.
 - 23 Ross D.E.,Flynn J.M.,Baron D.B.,Gralnick J.A.,& Bond D.R.(2011) Towards electrosynthesis in *Shewanella* : energetics of reversing the Mtr pathway for reductive metabolism. *PLoS One*, 6(2).
 - 24 Richter H.,Nevin K.P.,Jia H.,Lowy D.A.,Lovley D.R.,et al.(2009) Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB , OmcZ , type IV pili , and protons in extracellular electron transfer. *Energy Environ. Sci.*, 2, 506–516.
 - 25 Shelobolina E.S.,Coppi M. V,Korenevsky A.A.,Didonato L.N.,Sullivan S.A.,et al.(2007) Importance of c-type cytochromes for U(VI) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiol.*, 7(16), 1–15.
 - 26 Liu Y.,Wang Z.,Liu J.,Levar C.,Edwards M.J.,et al.(2014) A trans-outer membrane porin-cytochrome protein complex for extracellular electron transfer by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Environ. Microbiol. Rep.*, 6, 776–785.
 - 27 Leang C.,Qian X.,Mester T.,& Lovley D.R.(2010) Alignment of the c-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(January 2010), 4080_4084.
 - 28 Han C.H.,Levar C.E.,Jiménez-Otero F.,& Bond D.R.(2016) Genome scale mutational analysis of *Geobacter sulfurreducens* reveals distinct 2 molecular mechanisms for respiration of poised electrodes vs. Fe(III) oxides.
 - 29 Peng L.,& Zhang Y.(2017) Cytochrome OmcZ is essential for the current generation by *Geobacter sulfurreducens* under low electrode potential. *Electrochim. Acta*, 228, 447–452. Elsevier Ltd.
 - 30 Levar C.E.,Hoffman C.L.,Dunshee A.J.,Toner B.M.,& Bond D.R.(2017) Redox potential as a master variable controlling pathways of metal reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *ISME J.*, 11(3), 741–752. Nature Publishing Group.
 - 31 Strycharz S.M.,Glaven R.H.,Coppi M. V,Gannon S.M.,Perpetua L.A.,et al.(2010) Gene expression and deletion analysis of mechanisms for electron transfer from electrodes to *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry*, (May). Elsevier B.V.
 - 32 Dantas J.M.,Campelo L.M.,Duke N.E.C.,Salgueiro C.A.,& Pokkuluri P.R.(2015) The structure of PccH from *Geobacter sulfurreducens* – a novel low reduction potential monoheme

- cytochrome essential for accepting electrons from an electrode. *FEBS J.*, 282, 2215–2231.
- 33 Yang G.,Huang L.,You L.,Zhuang L.,& Zhou S.(2017) Electrochemical and spectroscopic insights into the mechanisms of bidirectional microbe-electrode electron transfer in *Geobacter soli* biofilms. *Electrochem. commun.*, 77, 93–97. Elsevier B.V.
 - 34 Malvankar N.S.,Vargas M.,Nevin K.P.,Franks A.E.,Leang C.,et al.(2011) Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nat. Nanotechnol.*, (August 2011), 1–7. Nature Publishing Group.
 - 35 Pirbadian S.,Barchinger S.E.,Leung K.M.,Byun H.S.,Jangir Y.,et al.(2014) *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *PNAS*, 111(35), 12883–12888.
 - 36 Barchinger S.E.,Pirbadian S.,Sambles C.,Baker C.S.,Leung K.M.,et al.(2016) Regulation of gene expression in *Shewanella oneidensis* MR-1 during electron acceptor limitation and bacterial nanowire formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(17), 5428–5443.
 - 37 Yates M.D.,Golden J.,Roy J.,Strycharz-Glaven S.M.,Tsoi S.,et al.(2015) Thermally activated long range electron transport in living biofilms. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17, 32564–32570. Royal Society of Chemistry.
 - 38 Flanagan K.A.,Leang C.,Ward J.E.,& Lovley D.R.(2017) Improper localization of the OmcS cytochrome may explain the inability of the xapD-deficient mutant of *Geobacter sulfurreducens* to reduce Fe(III) Oxide. 1–14.
 - 39 Feliciano G.T.,Steidl R.J.,& Reguera G.(2015) Structural and functional insights into the conductive pili of *Geobacter sulfurreducens* revealed in molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17, 22217–22226. Royal Society of Chemistry.
 - 40 Steidl R.J.,Lampa-Pastirk S.,& Reguera G.(2016) Mechanistic stratification in electroactive biofilms of *Geobacter sulfurreducens* mediated by pilus nanowires. *Nat. Commun.*, 7, 12217.
 - 41 Cao B.,Shi L.,Brown R.N.,Xiong Y.,Fredrickson J.K.,et al.(2011) Extracellular polymeric substances from *Shewanella* sp . HRCR-1 biofilms : characterization by infrared spectroscopy and proteomics. *Environ. Microbiol.*, 13, 1018–1031.
 - 42 Li S.,Sheng G.,Cheng Y.,& Yu H.(2016) Redox properties of extracellular polymeric substances (EPS) from electroactive bacteria. *Nat. Publ. Gr.*, 1–7. Nature Publishing Group.
 - 43 Inoue K.,Qian X.,Morgado L.,Kim B.-C.,Mester T.,et al.(2010) Purification and characterization of c -type cytochrome essential for optimal current production by *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(12), 3999–4007.
 - 44 Kotloski N.J.,& Gralnick J.A.(2013) Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *MBio*, 4(1), 10–13.
 - 45 Okamoto A.,Hashimoto K.,Nealson K.H.,& Nakamura R.(2013) Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones. *PNAS*, 110(19), 1–6.
 - 46 Xu S.,Jangir Y.,& El-Naggar M.Y.(2016) Disentangling the roles of free and cytochrome-bound flavins in extracellular electron transport from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Electrochim. Acta*, 198, 49–55. Elsevier Ltd.
 - 47 Okamoto A.,Nakamura R.,Nealson K.H.,& Hashimoto K.(2014) Bound flavin model suggests similar electron- transfer mechanisms in *Shewanella* and *Geobacter*. *ChemElectroChem*, (November), 1–6.
 - 48 Lovley D.R.,Coates john D.,Blunt-Harris E.L.,Phillips E.J.P.,& Woodward J.C.(1996) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 382, 445–448.

- 49 Kato S., Hashimoto K., & Watanabe K. (2012) Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. *PNAS*, 109, 10042–10046.
- 50 Li H., Chang J., Liu P., Fu L., Ding D., et al. (2015) Direct interspecies electron transfer accelerates syntrophic oxidation of butyrate in paddy soil enrichments. *Environ. Microbiol.*, 17(5), 1533–1547. Wiley Online Library.
- 51 Miot, J., & Etique, M. (2016). Formation and transformation of iron-bearing minerals by iron (II)-oxidizing and iron (III)-reducing bacteria. *Iron Oxides: From Nature to Applications*, 53–98.
- 52 Thung W., Ong S., Ho L., Wong Y.-S., Ridwan F., et al. (2016) Bioelectricity generation in batch-fed up-flow membrane-less microbial fuel cell: effect of surface morphology of carbon materials as aqueous biocathodes. *Water, Air, Soil Pollut. Water, Air, & Soil Pollution*.
- 53 Borole A.P., Hamilton C.Y., Vishnivetskaya T.A., Leak D., Andras C., et al. (2009) Integrating engineering design improvements with exoelectrogen enrichment process to increase power output from microbial fuel cells. *J. Power Sources*. Elsevier B.V.
- 54 Kumar A., Hsu L.H., Kavanagh P., Barrière F., Lens P.N.L., et al. (2017) The ins and outs of microorganism–electrode electron transfer reactions. *Nat. Rev. Chem.*, 1, 1–13. Macmillan Publishers Limited.
- 55 Schaetzle O., Barrière F., & Baronian K. (2008) Bacteria and yeasts as catalysts in microbial fuel cells: electron transfer from micro-organisms to electrodes for green electricity. *Energy Environ. Sci.*, 1, 607–620.
- 56 Du Q., An J., Li J., Zhou L., Li N., et al. (2017) Polydopamine as a new modification material to accelerate startup and promote anode performance in microbial fuel cells. *J. Power Sources*, 343, 477–482. Elsevier B.V.
- 57 Ding Z., Lu Y., Fu L., Ding J., & Zeng R.J. (2016) Simultaneous enrichment of denitrifying anaerobic methane-oxidizing microorganisms and anammox bacteria in a hollow-fiber membrane biofilm reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (October). Applied Microbiology and Biotechnology.
- 58 Sekar N., Jain R., Yan Y., & Ramasamy R.P. (2015) Enhanced photo-bioelectrochemical energy conversion by genetically engineered cyanobacteria. *Biotechnol. Bioeng.*, (September), 1–5.
- 59 Yang Y., Ding Y., Hu Y., Cao B., Rice S.A., et al. (2015) Enhancing bidirectional electron transfer of *Shewanella oneidensis* by a synthetic flavin pathway. *ACS Synthtic Biol.*, 4(June), 815–827.
- 60 Hajimorad M., & Gralnick J.A. (2016) Towards enabling engineered microbial-electronic systems: RK2-based conjugal transfer system for *Shewanella* synthetic biology. *Electron. Lett.*, 52(6), 426–428. IET.
- 61 West E.A., Jain A., & Gralnick J.A. (2017) Engineering a native inducible expression system in *Shewanella oneidensis* to control extracellular electron transfer. *ACS Synth. Biol.* ACS Publications.
- 62 Chen B., Xu B., Quin L.-L., Lan J.C.-W., & Hsueh C.-C. (2014) Exploring redox-mediating characteristics of textile dye-bearing microbial fuel cells: Thionin and malachite green. *Bioresour. Technol.*, 169(October), 277–283. Elsevier Ltd.
- 63 Yousaf S., Anam M., & Ali N. (2017) Evaluating the production and bio-stimulating effect of 5-methyl 1, hydroxy phenazine on microbial fuel cell performance. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* Springer Berlin Heidelberg.
- 64 Nakamura R., Kai F., Okamoto A., Newton G.J., & Hashimoto K. (2009) Self-constructed electrically conductive bacterial networks. *Angew. Chem. Int.*, 48, 508–511.

- 65 Luckarift H.R., Sizemore S.R., Roy J., Lau C., Gupta G., et al. (2011) Standardized microbial fuel cell anodes of silica-immobilized *Shewanella oneidensis*. *ChemComm*, 46(March 2010), 6048–6050.
- 66 Ghach W., Etienne M., Billard P., Jorand F.P.A., & Walcarius A. (2013) Electrochemically assisted bacteria encapsulation in thin hybrid sol–gel film. *J. Mater. Chem. B*, 1, 1052–1059.
- 67 Ghach W., Etienne M., Urbanova V., Jorand F.P.A., & Walcarius A. (2014) Sol – gel based “artificial” biofilm from *Pseudomonas fluorescens* using bovine heart cytochrome c as electron mediator. *Electrochem. commun.*, 38, 71–74.
- 68 Yong Y., Yu Y., Zhang X., & Song H. (2014) Highly active bidirectional electron transfer by a self-assembled electroactive reduced-graphene-oxide-hybridized biofilm. *Angew. Chemie*, 53, 1–5.
- 69 Zhao C., Wu J., Ding Y., Wang B., & Zhang Y. Hybrid conducting biofilm with built-in bacteria for high-performance microbial fuel cells. *ChemElectroChem*, 2014.
- 70 Upadhyayula V.K.K., Deng S., Mitchell M.C., & Smith G.B. (2009) Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water : A review. *Sci. Total Environ.*, 408, 1–13.
- 71 Agarwal S., Zhou X., Ye F., He Q., Chen G.C.K., et al. (2010) Interfacing live cells with nanocarbon substrates. *Langmuir Lett.*, 26(19), 2244–2247.
- 72 Tegou E., Magana M., Eleni A., Ioannidis A., Raptis V., et al. (2016) Biomaterials terms of endearment : bacteria meet graphene nanosurfaces. *Biomaterials*, 89, 38–55. Elsevier Ltd.
- 73 Alireza Ahmadian Yazdi, Angelo L.D., Omer N., Windiasti G., Lu X., et al. (2016) Biosensors and bioelectronics carbon nanotube modification of microbial fuel cell electrodes. *Biosens. Bioelectron.*, 85, 536–552. Elsevier.
- 74 Pandurangappa M., & Raghu G.K. (2011) Chemically modified carbon nanotubes : derivatization and their applications. *Carbon Nanotub. Appl. Electron Devices*.
- 75 Deryabin D.G., Aleshina E.S., Vasilchenko A.S., Efremova L. V., & Kloko O.S. (2013) Toxicity of carbon based nanomaterials against *Escherichia coli* depends on dispersion efficacy of their water suspensions. *Nanotechnologies Russ.*, 8, 565–572.
- 76 Simon-deckers A., Loo S., Mayne-L’hermite M., Herlin-boime N., Menguy N., et al. (2009) Size-, composition- and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 8423–8429.
- 77 Kang S., Herzberg M., Rodrigues D.F., & Elimelech M. (2008) Antibacterial effects of carbon nanotubes : size does matter ! *Langmuir*, 24(16), 6409–6413.
- 78 Kang S., & Mauter M.S. (2008) Physicochemical determinants of multiwalled carbon nanotube bacterial cytotoxicity. *Environ. Sci. Technol.*, 42(19), 7528–7534.

Chapitre 2. Elaboration d'un protocole pour former un biocomposite mimant les biofilms électroactifs.

Un matériau composite formé à partir de l'auto-assemblage de cellules bactériennes (*Shewanella oneidensis* MR-1) avec des nanotubes de carbone en présence de cytochrome *c* exogène (extrait de cellules de cœur bovin) a été proposé dans ce Chapitre 2 pour mimer un biofilm électroactif. L'utilisation de cytochrome *c* exogène avec des nanotubes de carbone (MWCNT) était proposé dans cette situation pour mimer la présence de *nanowires* artificiellement. Dans un premier temps, l'assemblage et la structure du biocomposite ont été étudiés à l'aide de la diffusion de lumière dynamique (DLS), de microscopie électronique à balayage et de spectrométrie Raman. La DLS a mis en évidence que l'influence du cytochrome *c* sur l'auto-assemblage du biocomposite. L'utilisation de la BSA, chargée négativement à pH neutre à la place du cytochrome exogène, chargé positivement à pH neutre, a permis de proposer que l'auto-assemblage du biocomposite reposait sur des forces électrostatiques, les MWCNTs et les bactéries étant chargés négativement à pH neutre. La microscopie électronique à balayage a permis ensuite de décrire les agrégats formés avec une structure rappelant les biofilms naturels où les MWCNTs remplaceraient la matrice de substances polymériques extracellulaires. La spectroscopie Raman a pu confirmer l'importance des cytochromes *c* exogènes en tant qu'élément clef du biofilm artificiel car ils étaient associés avec les MWCNTs mais interagissaient aussi avec les bactéries.

Les agrégats ont alors été déposés sur des plaques de carbone vitreux, formant un matériau composite à base de MWCNT dans lequel les bactéries étaient enrobées. La densité cellulaire des films formés en présence ou absence de cytochrome exogène était la même, $1 \text{ cell } \mu\text{m}^{-2}$. Mais la présence du cytochrome *c* exogène permettait d'améliorer la viabilité, sans doute dû à l'organisation des MWCNT qui s'agrégeaient entre eux et avec les cytochromes exogènes, en limitant la cytotoxicité mécanique des MWCNT sur la bactérie. L'activité métabolique des bactéries a alors pu être caractérisée en utilisant l'électrochimie. Des analyses en voltampérométrie cyclique puis en ampérométrie ont mis en avant l'importance du cytochrome exogène pour les réactions de transfert d'électrons dans le biofilm artificiel. Des densités de courant 10 et 4 fois plus importantes ont été

obtenues pour le biofilm artificiel ($2,7 \mu\text{A cm}^{-2}$) qu'avec les électrodes modifiées par les bactéries seules ($0,3 \mu\text{A cm}^{-2}$) ou associées aux cytochromes *c* ($0,7 \mu\text{A cm}^{-2}$). Le remplacement de *S. oneidensis* par *Pseudomonas fluorescens*, a produit un courant d'oxydation lors de l'ajout de 1,5 mM de glucose. Un biofilm artificiel avec *Escherichia coli* n'a par contre pas généré de courant d'oxydation après plusieurs ajouts de 0,5 mM de glucose, la bactérie ne possédant aucun cytochrome membranaire pour participer aux transferts extracellulaires d'électrons dans le biofilm artificiel. Les transferts d'électrons dans le biocomposite semblent donc être améliorés par l'activité de navette à électrons du cytochrome exogène. Enfin une optimisation du biofilm artificiel électroactif avec *S. oneidensis* a permis d'atteindre des densités de courant proches de $300 \mu\text{A cm}^{-2}$ lors de l'ajout de 50 mM de formiate.

A rapid and simple protocol to prepare a living biocomposite that mimics electroactive biofilms

Abstract.

A living material was formed by self-assembly of bacterial cells (*Shewanella oneidensis* MR-1 or *Pseudomonas fluorescens*) with carbon nanotubes in the presence of cytochrome *c* from a bovine heart with the goal to mimic electroactive biofilms. The role of cytochrome *c* on self-assembly, cell viability and extracellular electron transfer was studied. Scanning electron microscopy and dynamic light scattering experiments highlighted its role on the self-assembly of bacteria-carbon nanotube aggregates within only 2 hours in solution. The deposition of these aggregates on glassy carbon surfaces led to a homogenous composite film in which the bacteria were embedded in a carbon nanotube network. A comparable cell density of 1 cell μm^{-2} was achieved in the presence or in the absence of cytochrome *c*, but this protein allowed maintaining a higher bacterial viability. Electrochemical characterization demonstrated the role of cytochrome *c* on electron transfer reactions, leading to a current density of up to 300 $\mu\text{A cm}^{-2}$ in the presence of 50 mM formate.

1. Introduction

The ability of microorganisms to produce electricity by decomposing organic matter has been described for more than a century ago [1], however, without creating any significant interest for a long period of time [2,3]. The discovery of bacterial nanowires or conductive pili from *Shewanella oneidensis* MR-1 and [4] *Geobacter sulfurreducens* [5] has dramatically revived this topic and pushed forward the research on extracellular electron transfer (EET) in biofilms and their direct application in mediator-free microbial fuel cells [6]. Nowadays, many exciting research studies are striving to better characterize these nanowires [7–13] or

propose new applications of bacterial biofilms for energy production [14], water treatment [15], commodity production [16] and biosensors [17].

Conductive pili from *S. oneidensis* MR-1 [8] and *G. sulfurreducens* [7] display different properties and involve different mechanisms for EET. Some recent results indicate that redox conductivity would be involved and not metallic-like conductivity [10]. A model is proposed in which the conductive pili operate coordinately with cytochromes [9]. With *S. oneidensis* MR-1, the conductive appendages are extensions of the outer membrane and periplasm that include the multiheme cytochromes involved in electron transfer reactions [8]. In addition to these systems, filamentous bacteria, acting as “living electrical cables”, were found responsible for electron conduction over cm in marine sediments [18]. To conduct electrons in some environments, nature has thus developed powerful strategies that we wish to control or mimic in some extent for biotechnological applications.

A major challenge is to facilitate electron transfer reactions between bacteria and electrodes. Malvankar and Lovley pointed out that increasing nanowire production in *G. sulfurreducens* biofilms led to improved current-producing capabilities in microbial fuel cells (MFC) [19]. So, bacterial strain selection or genetic manipulation are good strategies for improving EET [20]. Moreover, the power from MFC has been increased significantly over the past few years by gradually improving bioreactors [21], electrode materials [22], increasing the surface area, tuning the porosity [21] and modifying the surface with carbon nanomaterials [23] or selected chemical functions [24] and electron mediators [25].

Generally, biofilms from multi bacterial species are grown on the electrode surface for periods of time that can vary from days to weeks before reaching an optimal electrode response. Another approach involves the elaboration of a composite material made by mixing planktonic bacteria and exogenous materials that have not been self-produced by bacteria. A good example is the application of silica gel mimicking the extra-cellular polymeric substance

(EPS) matrix to create standardized microbial fuel cell anodes [26]. An EET pathway between bacteria and electrode could even be improved in silica gel by using exogenous cytochrome *c*, in a system that can be considered as an artificial biofilm [27]. We define here an artificial biofilm as a man-made biocomposite, designed from the assembly of living bacterial cells with polymeric matrices, redox species (such as cytochromes) or conducting nanomaterials that mimic some functions of natural biofilms.

Electron transfer being one key issue, self-assembly of *S. oneidensis* MR-1 with graphene oxide has been proposed. The resulting macroporous biofilm had remarkable properties, delivering a 25-fold increase in the anodic current and a 74-fold increase in the cathodic one if compared to the values for naturally occurring biofilms [28]. The EET can also be enhanced by biogenic nanoparticles [29].

Synthesis of bacterial composite materials is potentially a powerful approach for biotechnological applications such as synthetic biology [30], as it would allow rapid production of artificial biofilms [27], with engineered or selected strains [31]. The ideal route would be to directly involve planktonic bacteria cultivated in batch before immobilization under controlled and reproducible conditions. However, the factors inducing the synthesis by bacteria of conductive pili or other natural nanowires in biofilms are far from being understood. Therefore, controlling the nanowire production in bioelectrodes is not simple to realize. The introduction of artificial nanowires would be highly beneficial and would certainly furnish more opportunities for improving the EET with a variety of bacterial strains.

We report here a rapid method to produce a biocomposite film from planktonic bacteria and carbon nanotubes. The design of this bacterial composite was validated in this present study using planktonic *S. oneidensis* MR-1 and multi-walls carbon nanotubes (MWCNT) as a mimic of conductive pili. In addition, since electron conduction in biofilms naturally involves electron hopping between multiheme cytochromes [9,12,13] and

considering the properties of cytochrome *c* (cyt *c*) which has been used as wiring agent in the field of bioelectrochemistry [32,33], we studied the role of cyt *c* from bovine heart as a model, in the EET effectiveness of the bacterial composite. We show that exogenous cytochrome molecules promote cell viability, organization of MWCNT with bacteria and EET. Self-assembly, cell viability and electron transfer reactions were evaluated by dynamic light scattering, scanning electron microscopy, confocal Raman spectroscopy, fluorescence imaging and electrochemistry.

2. Experimental

2.1. Reagents

Sodium formate (GC for analysis $\geq 99\%$; MERCK) and glucose (99 %, Acros) were used as electron donors for the bacterial cells. The multi-walled carbon nanotubes ($\geq 95\%$, MWCNT-COOH, outer diameter: 30 ± 10 nm, length: 1-5 μm) were purchased from Nanolab. Glassy carbon (SIGRADUR) was obtained from HTW Hochtemperatur-Werkstoffe GmbH (Germany) and graphite felt (GFD 4,6 E.A.) from SGL Group (Germany). The buffer and growth media were prepared from potassium chloride KCl solution ($\geq 99\%$, 1 mM, Sigma-Aldrich), trypticase soy broth (TSB-D, bioMérieux), trypticase soy agar (TSA-D, bioMérieux), lysogeny-broth (LB, Sigma-Aldrich) and phosphate buffer was prepared from 50 mM solutions of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99.6\%$; Prolabo) and $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99\%$; Fluka). Cytochrome *c* bovine hearth was purchased from Sigma-Aldrich ($\geq 95\%$). All solutions were prepared with high purity water (18 M Ω cm) from a Purelab Option water purification system (Elga LabWater, Veolia Water STI, Antony, France).

2.2. Bacterial strains and growth conditions

Escherichia coli CGE1 (environmental strain isolated from drinking water network) was from our laboratory collection, *Shewanella oneidensis* MR-1 (ATCC 700550) and *Pseudomonas*

fluorescens (CIP 69.13) were from German or US collections, respectively. Each strain was streaked on plate culture medium from a glycerol stocks kept at -80 °C. When needed, 0.1 mL of an overnight culture from a single colony on TSA-D was inoculated in 200 mL TSB-D and incubated at 30 °C under stirring (160 rpm) for 48 h (*S. oneidensis* MR-1) and 24 h (*P. fluorescens*). Bacterial growth was measured by monitoring the optical density at 600 nm. *E. coli* was streaked on LB plates from stocks at -80 °C. When needed, 0.1 mL of an overnight culture from a single colony was inoculated in 200 mL LB and incubated at 37 °C under stirring (160 rpm) for 24 h. The culture was harvested by centrifugation at 5000 g for 10 min at room temperature. The pellet was washed twice with 1 mM KCl, and then suspended in 1 mM KCl in order to reach a cell density between 2×10^9 and 5×10^9 cell mL⁻¹ (determined by optical density measurement).

2.3. Electrode preparation and characterization

The bacterial cell suspension was mixed with the stock solution of cyt *c* (1 mM) and the stock suspension of MWCNT-COOH (5 mg mL⁻¹, dispersed in water by sonication for 30 min) in order to reach a final bacterial cell concentration of 1×10^9 cell mL⁻¹, a final cyt *c* concentration of 0.2 mM (or different if stated otherwise) and a final MWCNT-COOH concentration of 1 mg mL⁻¹. We did not observe an influence of the order of mixing on the experiments, however we always introduced MWCNT in the last step. The components of the suspension were allowed to self-assemble for 2 h. 10 µL of the final suspension was dropped on glassy carbon electrode (GCE) and allowed to dry at 4°C for 40 min. Another method of preparation was also used to reach a higher current density. In that case, 1.5 mL of the final suspension was deposited through a graphite felt (1.32 cm² geometric surface area). Measurements were done in an electrochemical cell containing 10 mL (CGE electrode) or 30 mL (graphite felt) of 50 mM PBS buffer (pH = 7) under stirring. In cyclic voltammetry experiments, the potential scan rate was 50 mV s⁻¹. In constant potential chronoamperometry,

a potential of 0.35 V was applied to the biocomposite electrode. The counter electrode was a platinum wire and the reference electrode was Ag/AgCl 3M KCl.

2.4. Microscopy observation (SEM and epifluorescence)

To observe samples in epifluorescence microscopy, the LIVE/DEAD BacLight™ kit (Thermo Fischer Scientific) was used. Briefly, samples were mixed with DNA dyes SYTO 9 (1.67 μ M) and propidium iodide (1.67 μ M) and incubated for 15 min before filtration (on 0.22 μ m membrane filters). The filtrate was afterwards dropped on microscope glass slide and observed with an epifluorescence microscope (OLYMPUS BX51) with a magnification factor \times 1000. Samples analyzed by scanning electron microscopy (SEM) were prepared using two different methods. In the first one, the suspensions were filtered on 0.22 μ m membrane filters and fixed afterward with glutaraldehyde 2.5% in sodium cacodylate buffer (pH 7.2). A washing step in sodium cacodylate buffer for 20 min was performed before a dehydrating step in an alcohol gradient for 70 min. After preparation, samples were dried and then metallized for the characterization with a Cambridge Stereoscan S240 SEM at an acceleration voltage of 1 kV. In the second one, the aggregates were dropped on a glassy carbon plate without any further preparation and observed with a Hitachi S-4800 SEM at an acceleration voltage of 1 kV.

4.5. Dynamic Light scattering

A Malvern Zetasizer 3000 HSA instrument was used to measure the size of particles in water by dynamic light scattering (DLS). Laser light was from a Helium-Neon laser with 5 mW of output power at 633 nm, and the scattered light was detected at 90°. The sample was introduced in a flow-through cell thermostated at 25°C. All the measurements were performed under suitable conditions by systematically diluting 50 times the samples with pure water in order not to saturate the detector, given the nature of aggregates. Water was first filtered with

a mixed cellulose ester (surfactant-free) filter (0.45 μm of porosity). The attenuator (diaphragm) of the photomultiplier was automatically adapted for each sample in order to not saturate the detector. The data were analyzed by the CONTIN method [34]. Data are extracted from a global distribution in volume and the apparent diameter is the D50 value with its interquartile range (IQR) (see **Figure S1** for a visual representation of these data).

4.6. Raman Spectroscopy

In order to characterize interactions between the components, Raman spectroscopy analyses and Raman mapping experiments were performed. The spectra were obtained using a Jobin-Yvon T64000 triple-monochromator set-up equipped with a confocal microscope, a N_2 -cooled CCD detector, a 1800 grooves mm^{-1} grating, a frequency-doubled Nd: YAG laser with a wavelength of 530.53 nm. The spectral resolution was 1 cm^{-1} , the laser irradiance was kept below 5 kW cm^{-2} to avoid heating of the sample. The back-scattered configuration was used with a X50 microscope objective (0.55 of numerical aperture). Raman mapping was realized on a Witec alpha 300 S set-up equipped with a cooled CCD detector, a frequency-doubled Nd: YAG laser with a wavelength of 532.26 nm and a 600 grooves mm^{-1} grating. The spectral resolution was 4 cm^{-1} and the reproducibility better than 0.5 cm^{-1} . The back-scattered configuration was used with a X100 long working distance microscope objective (0.90 of numerical aperture). The spatial resolution reached the diffraction limit and was estimated to be around 350 nm.

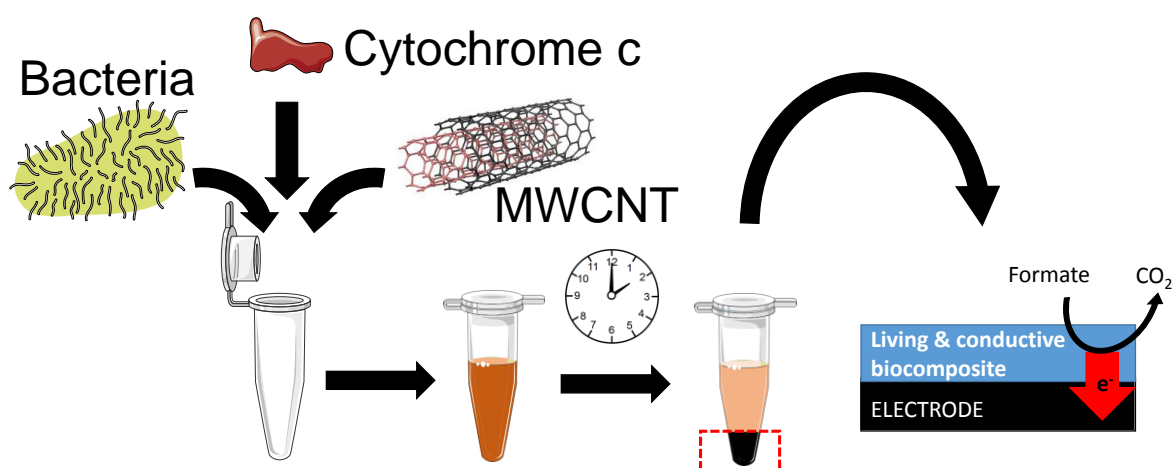
4.7. Cytochrome concentrations analysis

Cytochrome concentrations were determined by absorbance at 550 nm in a microplate reader (Infinite® 200, Tecan, Mannedorf, Switzerland). The amount of cytochrome in the biocomposite was deduced from cytochrome concentrations in supernatants after 2 h of self-

assembly between *S. oneidensis* MR-1, MWCNT and cyt *c*. Sampling were performed in triplicate.

2. Results and discussion

The protocol to prepare the living biocomposite is summarized in **Scheme II.1**. The individual elements of the biocomposite were mixed together in a solution and let to interact for two hours. Afterward, the suspension was deposited on an electrode surface, dried at 4 °C for 40 min and tested in solution as a functional material for electrocatalytic oxidation of formate.



Scheme II.1. Protocol for self-assembly of bacteria with carbon nanotubes in the presence of cytochrome *c* before deposition on electrodes for bioelectrochemistry.

S. oneidensis was cultivated and concentrated in order to achieve a cell density of 10^9 cells mL⁻¹. As such, the bacterial suspension was stable and no evidence of precipitation was observed during two hours in 1 mM KCl solution (**Figure II.1A**, item a). The use of this medium prevented cell growth while protecting the bacteria from osmotic stress. Particle dimensions from the suspension could be estimated by dynamic light scattering (**Figure II.1B**, a). The apparent diameter of bacteria was 1.6 ± 0.4 μm , which is consistent with the

typical length of individual planktonic bacteria that have a rod-like shape, as confirmed by SEM showing cells displaying 1 to 3 μm length and 300 to 500 nm diameter (**Figure II.2A**).

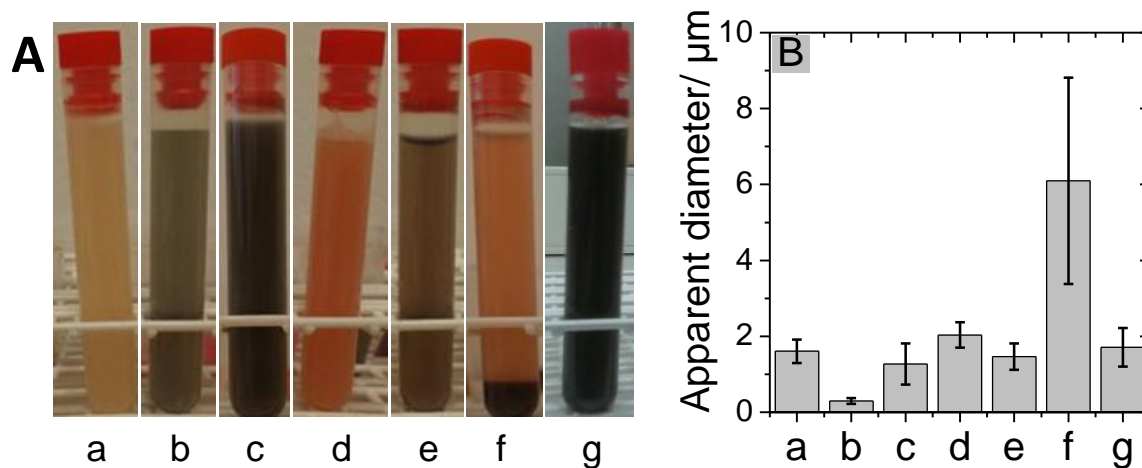


Figure II.1. (A) Pictures and (B) Size distribution diagrams determined by dynamic light scattering of a 1 mM KCl solution after 2 h at room temperature with: (a) *Shewanella oneidensis* MR-1, (b) multi-walled carbon nanotubes (MWCNT), (c) *Shewanella oneidensis* MR-1 and MWCNT, (d) *Shewanella oneidensis* MR-1 and cytochrome *c*, (e) MWCNT and cytochrome *c*, (f) *Shewanella oneidensis* MR-1, MWCNT and cytochrome *c* and (g) *Shewanella oneidensis* MR-1, MWCNT and bovine serum albumin. Data are extracted from a global distribution in volume and the apparent diameter is the D_{50} value with its interquartile range (IQR).

Multi-walled carbon nanotubes were chosen in this study as they are conductive and they display a length of 1-5 μm that is in the range reported for *S. oneidensis* nanowires [8]. However, the diameter of MWCNT used here (30 ± 10 nm) was bigger than that of nanowires from *Geobacter* (pili, ~ 3 nm) [7] and nanowires from *S. oneidensis* (membrane extensions, ~ 10 nm in dry conditions) [8]. An alternative would have been to use single-walled carbon nanotubes with a diameter of the order of 1 nm, but this material exhibit stronger cytotoxicity than multi-walled carbon nanotubes [35]. MWCNT-COOH were used in order to favor water dispersion and interactions with bacteria and proteins. A suspension of MWCNT at a concentration of 1 mg mL^{-1} in 1 mM KCl was stable and showed by DLS an apparent diameter of 300 ± 76 nm, *i.e.* much smaller than bacteria (**Figure II.1**, item b). Note that this

value does not correspond to either the diameter (30 nm) or the length of MWCNT (1-5 μm) because a DLS measurement simply provides in that case an average size of the hydrodynamic beam of MWCNT and does not reflect their one-dimensional shape. An apparent diameter of $1.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ was found by mixing MWCNT with bacteria (**Figure II.1**, item *c*), which was not significantly different from the average diameter of the bacteria alone. A careful analysis of the global distributions in **Figure II.2** shows that this average diameter is not a simple combination of separated particles from a polydisperse suspension. The size distribution of bacteria is broader, resulting either from aggregation of MWCNT or from the interaction between bacteria and MWCNT that could possibly be deleterious, *e.g.* leading to cellular fragments or partially-lysed bacteria.

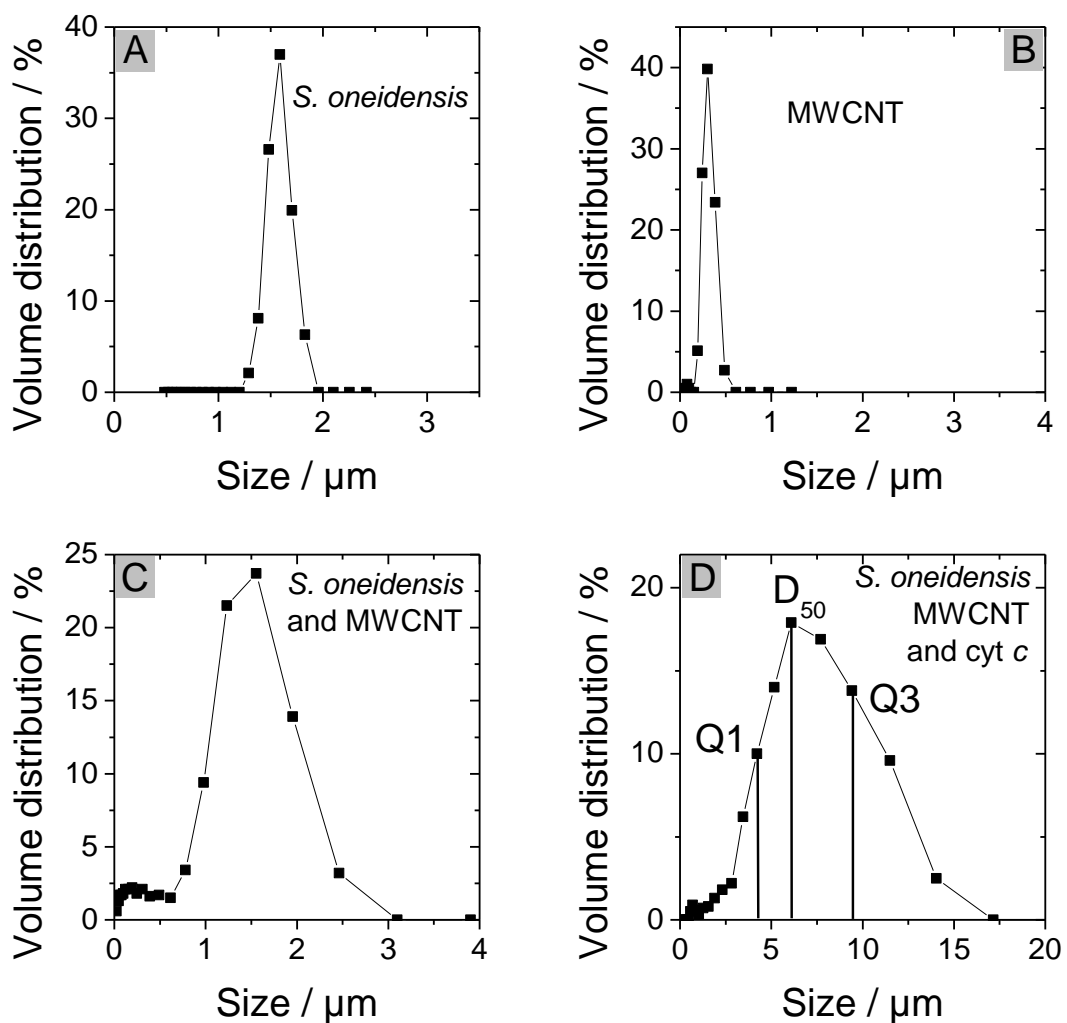


Figure II.2. Global distribution in volume determined by dynamic light scattering with a suspension containing (A) *Shewanella oneidensis* MR-1, (B) MWCNT, (C) *Shewanella oneidensis* MR-1 with MWCNT and (D) *Shewanella oneidensis* MR-1 with MWCNT and cytochrome c. D_{50} and quartiles Q1 and Q3 are presented in (D).

As cytochrome can contribute to extracellular electron transfer reactions in biofilms produced from *S. oneidensis*, our first motivation was to incorporate exogenous cyt *c* (from bovine heart) in order to study its influence on the electrochemical response of artificial biocomposite films used as bioanode. This protein being positively charged at neutral pH (isoelectric point $pI = 10 - 10.5$), it could also promote electrostatic interactions between *S. oneidensis* and MWCNT, both being negatively charged on their outer surfaces in neutral conditions. However, the apparent diameter was only slightly increased by adding 0.2 mM cyt *c* to the bacterial suspension, reaching $2.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$ after 2 h of interaction (**Figure II.1**, item d). The influence of cyt *c* on the MWCNT suspension was more visible as the apparent average particle diameter increased up to $1.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ (**Figure II.1**, item e), *i.e.* 5 times greater than the value for MWCNT alone (**Figure II.1**, item b). The most dramatic effect was finally achieved after mixing together the three components, *i.e.* $10^9 \text{ cell mL}^{-1}$ bacteria, 1 mg mL^{-1} MWCNT and 0.2 mM cyt *c*. A precipitation was rapidly observed in the test tube resulting from an increase in the apparent diameter of the particles up to $6.0 \pm 2.5 \mu\text{m}$ after two hours (**Figure II.1**, item f). Such a wide diameter range of particles could be explained by the method of preparation used to observe these samples in DLS that includes a dilution step. Cyt *c* could thus act as a promoter of self-assembly between MWCNT and *S. oneidensis*. This putative mechanism could also involve MWCNT reorganization into bundles that is known to favor the adsorption of biological objects [36]. The kinetic of this phenomenon was monitored by following the increase in the apparent diameter of the assembly as a function of time, and it was found that large aggregates were produced after the first hour of reaction (**Figure II.3**) and their size was not significantly changed during the second hour.

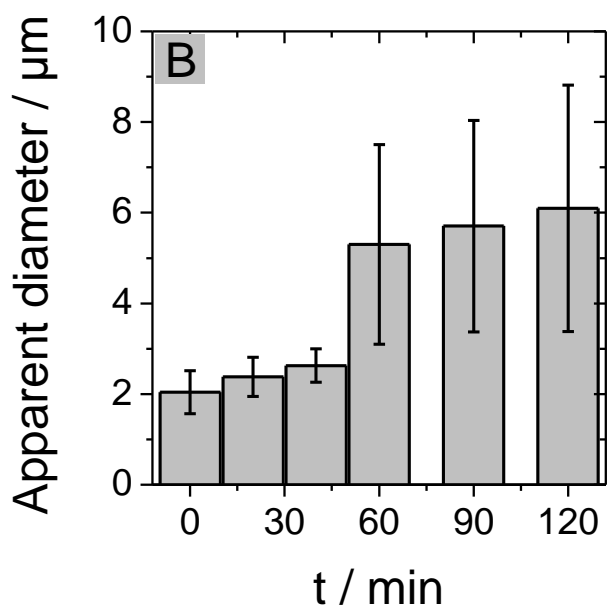


Figure II.3. Variation of the size distribution determined by dynamic light scattering with a suspension containing *Shewanella oneidensis* MR-1, CNT and cytochrome *c*. Data are extracted from a global distribution in volume.

Two hours of reaction time was later chosen for all the experiments reported in this work. The concentration of MWCNT was varied from 0.01 to 5 mg mL⁻¹ and the concentration of cyt *c* was changed from 0.01 to 1 mM and the optimal conditions determined on the base of this self-assembly process were the one analyzed here in details, i.e. 1 mg mL⁻¹ MWCNT, 0.2 mM cyt *c* and with 10⁹ cell mL⁻¹. For example, the optimal concentration of cyt *c* was determined by monitoring the remaining concentration of cyt *c* in the supernatant after 2 h interactions with 1 mg mL⁻¹ MWCNT and 1×10⁹ cell mL⁻¹. The experiment was performed with an initial concentration of cyt *c* ranging from 0.05 to 0.8 mM. **Table II.1** shows that no precipitation was observed in the presence of 0.05 or 0.1 mM cyt *c*, leading to high absorbance at 550 nm, due to the high optical density caused by the presence of bacteria and MWCNT. For higher concentrations of cyt *c*, an aggregation was observed, leading to the precipitation of the suspension (as illustrated in **Figure II.1A**, item f). The quantity of

cytochrome *c* adsorbed to bacteria and MWCNT was deduced from the concentration of cyt *c* remaining in the supernatant. The immobilized cyt *c* varies from 23×10^{-9} mole in the presence of 0.2 mM cyt *c* to 28×10^{-9} mole in the presence of 0.8 mM cyt *c*. Given the small differences in the cyt *c* adsorption with a concentration higher than 0.2 mM, this latter concentration was kept during all the studies.

Table II.1. Absorbance measured at 550 nm, final concentration of cytochrome *c* (cyt *c*) and amount of immobilized cyt *c* after 2 h self-assembly between *Shewanella oneidensis* MR-1 (1×10^9 cell mL⁻¹), MWCNT (1 mg mL⁻¹) and cyt *c* (initial concentration between 0.05 and 0.8 mM) in 1 mM KCl or 0.4 M phosphate buffer. Standard deviation is estimated from triplicate measurements.

	1 mM KCl						0.4 M phosphate buffer
Initial cyt <i>c</i> concentration (mM)	0.05	0.1	0.2	0.2	0.4	0.8	0.200
Absorbance at 550 nm	3.54 ± 0.08	3.91 ± 0.06	0.60 ± 0.03	0.61 ± 0.03	1.37 ± 0.03	2.91 ± 0.04	>4
Final cyt <i>c</i> concentration (mM)	nd	nd	0.153 ± 0.008	0.154 ± 0.008	0.350 ± 0.008	0.744 ± 0.01	n.d.
Amount of immobilized cyt <i>c</i> (10 ⁻⁹ mole)	nd	nd	23 ± 4	23 ± 4	25 ± 4	28 ± 5	n.d.

The suspended particles were then analyzed by SEM after filtration on a nitrocellulose membrane with 0.2 μm porosity. The images obtained for *S. oneidensis* alone did not reveal any particular connections between bacteria and no extra-cellular polymeric substance or fibrous structure were noted (**Figure II.4A**). This would indicate that the bacteria did not produce bacterial nanowire in the culture conditions used in this study. On the contrary, the suspension containing both *S. oneidensis* and MWCNT clearly presented individual filaments connecting dispersed cells together (**Figure II.4B**) and assumed to be MWCNT. Those

connections could be the result of the drying step during SEM preparation as no significant aggregation was observed by DLS when MWCNT was mixed with *S. oneidensis* cells (**Figure II.1** item c) The images of the suspension with the three components, *i.e.* *S. oneidensis* cells, MWCNT and cyt *c*, indicated the presence of a fibrous material surrounding the bacterial cells and connecting them together (**Figure II.4C**). Considering the composition of the suspension this material must be composed of MWCNT, resulting from the self-assembly with bacterial cells in the presence of cyt *c*, which is consistent with the formation of aggregates observed by DLS in these conditions (**Figure II.1** item f).

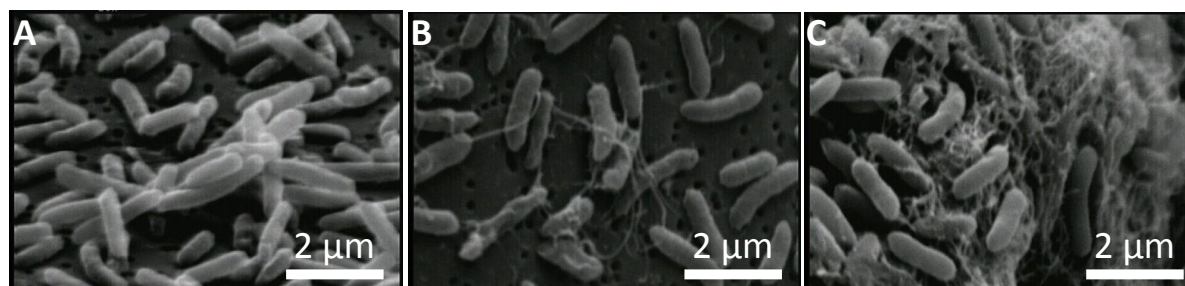


Figure II.4. Scanning electron microscopy of the aggregates obtained after two hours at room temperature with (A) *Shewanella oneidensis* MR-1, (B) *Shewanella oneidensis* MR-1 and MWCNT and (C) *Shewanella oneidensis* MR-1, cytochrome *c* and MWCNT. Each system have been previously diluted and filtered. Samples were filtered on 0.22 μm membrane filters and fixed afterward with glutaraldehyde 2.5% in sodium cacodylate buffer (pH 7.2). A washing step in sodium cacodylate buffer for 20 min was performed before a dehydrating step in an alcohol gradient for 70 min. After preparation, samples were dried then metallized for the characterization with a Cambridge Stereoscan S240 SEM at an acceleration voltage of 1 kV.

The self-assembly process was further analyzed by confocal Raman spectroscopy imaging (**Figure II.5**). A five microliters drop of the suspension or solution was deposited on a microscope glass slide and left to dry. Raman spectra of cyt *c*, MWCNT and *S. oneidensis* were then collected individually (**Figure II.6A-C**) aiming at identifying some characteristic bands of these individual components. In the spectral region 1000-1700 cm^{-1} , D and G band signals from MWCNT overlap with bands observed with cyt *c* and bacteria and cannot be

used for their individual identification. Only the G' band at 2700 cm^{-1} could be used to unambiguously localize the MWCNT (**Figure II.6C**). A small signal at 755 cm^{-1} was also found as a vibrational fingerprint of cytochromes, either bacterial (**Figure II.6A**) or exogenous (**Figure II.6B**). This signal has been ascribed in the literature to the pyrrole breathing mode ν_{15} [37]. Note that the intensity of the exogenous signal was about 10 times higher than that from bacteria, in these conditions.

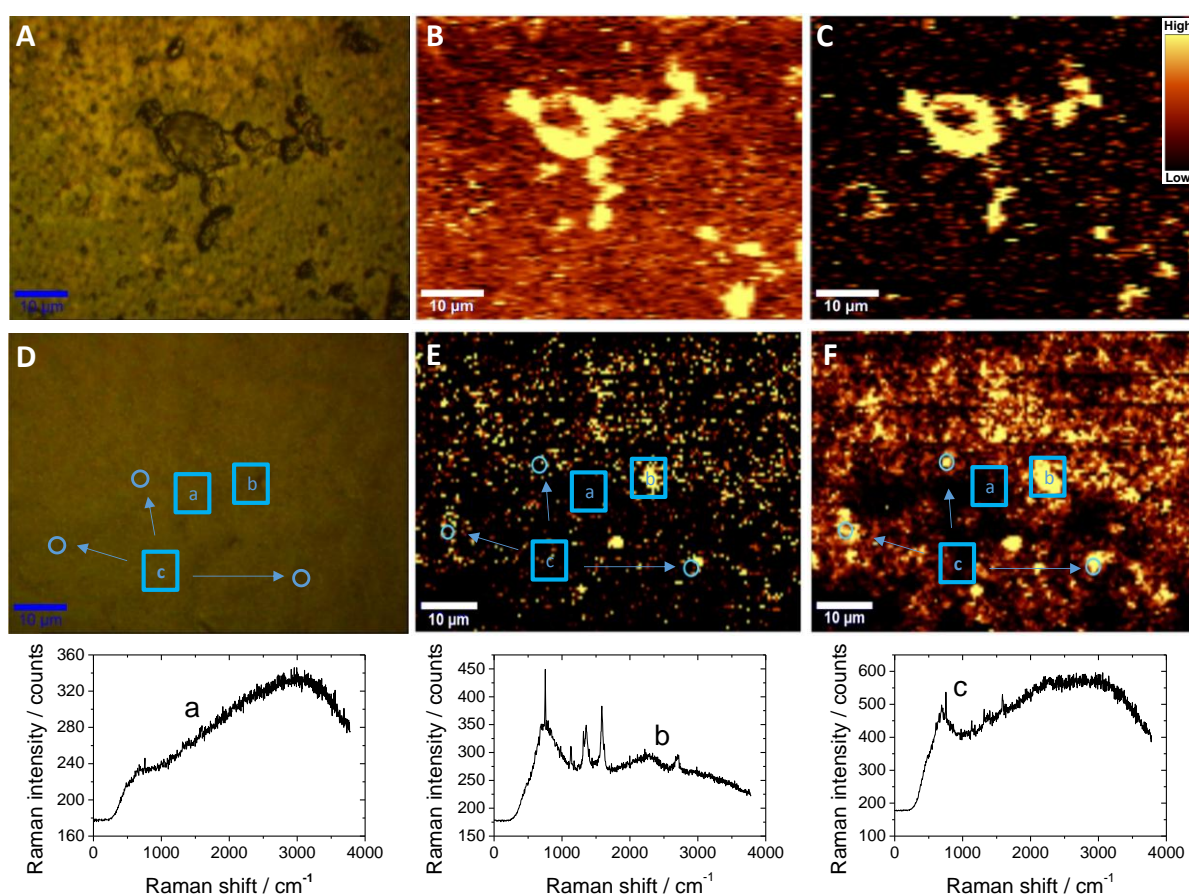


Figure II.5 (A&D) Optical images and Raman cartography integrating (B&E) G' band of carbon nanotubes at 2700 cm^{-1} and (C&F) cytochrome *c* band at 755 cm^{-1} on composite materials made of (A – C) MWCNT and cytochrome *c* or (D – F) *Shewanella oneidensis*, MWCNT and cytochrome *c*.

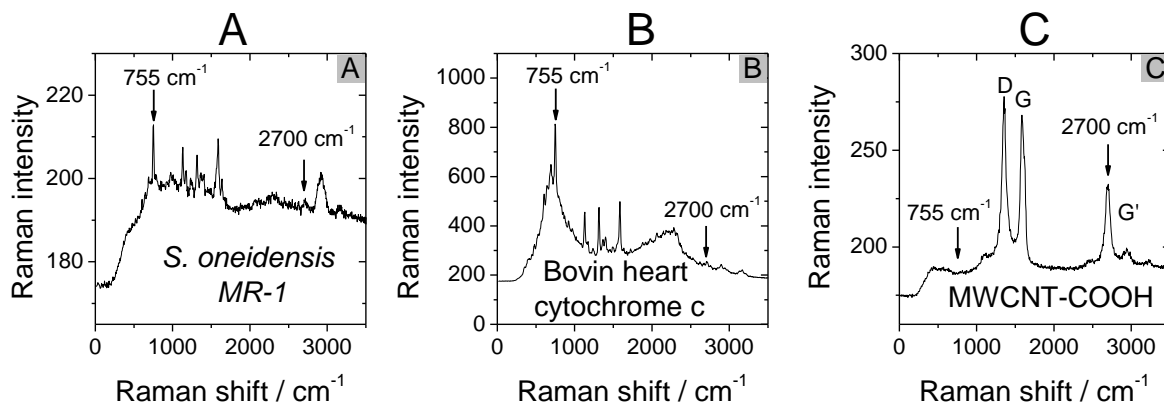


Figure II.6. Reference spectra recorded from (A) *Shewanella oneidensis* MR-1, (B) bovine heart cytochrome c and (C) oxidized multi-walled carbon nanotube (MWCNT).

The deposit obtained from the suspension with both MWCNT and cyt *c* from bovine heart (**Figure II.5A-C**) was then studied. Heterogeneous and large patches were observed, larger than 10 μm in diameter, as shown in the center of the optical image (**Figure II.5A**). The image at 2700 cm^{-1} shows that these large aggregates contain MWCNT. Carbon nanotubes were also found in a few other places at the surface, in the form of smaller aggregates (see area (b) in **Figure II.7**). The imaging at 755 cm^{-1} permitted localizing cyt *c* and a similar image was found (**Figure II.5B**). The good superposition of these two Raman images indicates that MWCNT and cyt *c* were co-localized in the sample within the aggregates (a spectrum collected in this area (a) is provided in **Figure II.7**). We attribute the co-localization to the adsorption of positively-charged cytochrome molecules on the surface of negatively-charged MWCNT as has already been suggested in the literature [38].

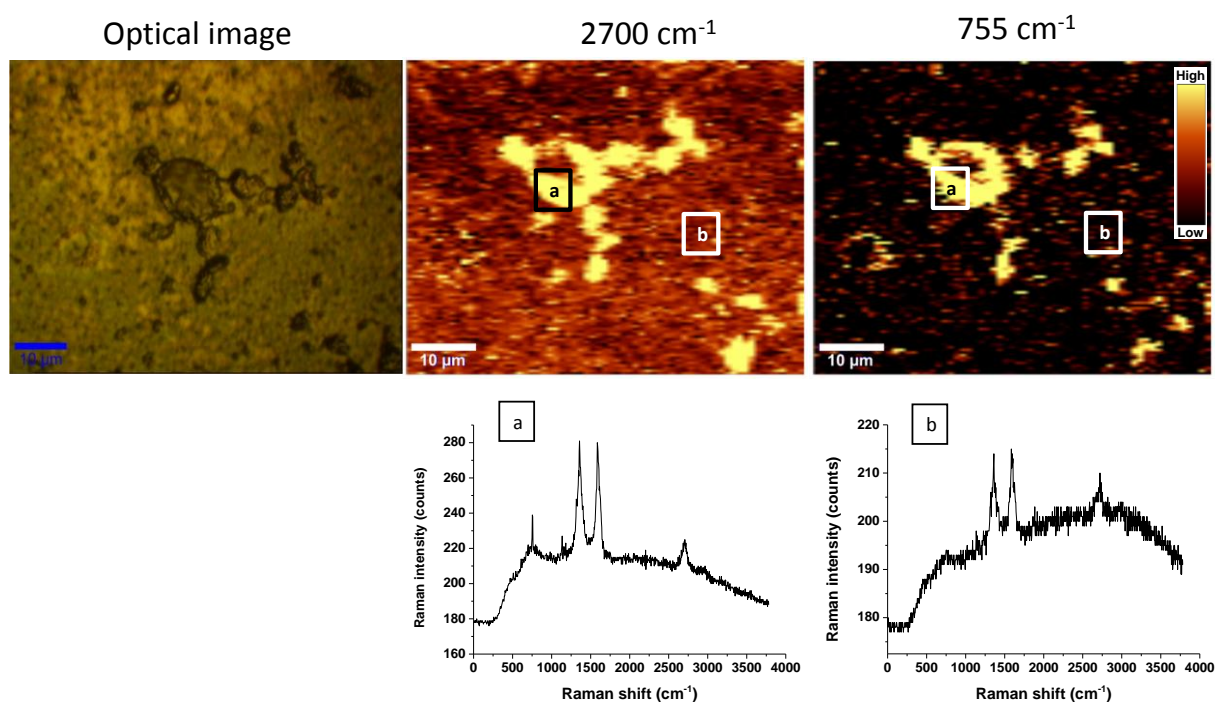


Figure II.7. Optical image and Raman cartography integrating G' band of carbon nanotubes at 2700 cm^{-1} and cytochrome c band at 755 cm^{-1} on composite materials made of MWCNT and cytochrome c. Raman spectra (a) and (b) have been recorded at the location reported in the Raman cartographies.

In a second experiment, the suspension containing *S. oneidensis*, MWCNT and cyt *c* was dropped on the glass slide and dried. The optical image shows that this layer was homogeneous all over the surface (**Figure II.5D**), as confirmed with a higher resolution SEM analysis (**Figure II.8**). Raman imaging at 2700 cm^{-1} indicates that MWCNT are better dispersed in the film with only a few brighter spots at some places (**Figure II.5E**). Imaging at 755 cm^{-1} confirmed the homogeneity of the cytochrome distribution, also with visible bright spots (**Figure II.5F**). A few areas were analyzed in more details. Circle areas (“c” on Fig II.5D, E, F) show a large abundance of cytochrome while MWCNTs were not clearly visible (**Figure II.5**, spectrum c). This result can be explained if we consider that cyt *c* in these areas was interacting with bacteria (more difficult to visualize) and not with MWCNT. In the same image, area (b) is characterized by the presence of both MWCNT and cyt *c* (spectrum b) and area (a) does not allow distinguishing signal peaks (spectrum a). It can be deduced that

positively charged cyt *c* interacts with bacteria, notably through electrostatic interactions with the negatively charged outer membrane of the cells [39]. Self-assembly of particles or biological elements are driven by nanoscale forces, including van der Waals, electrostatic and molecular surface forces, magnetic interactions and entropic effects [40]. We suppose that electrostatic forces would be here the driving force of the self-assembly observed between the negatively bacterial surface and the negatively charged MWCNT in the presence of exogenous cyt *c*.

To strengthen this hypothesis, two experiments were performed. Firstly, the ionic strength of the solution was increased by using 0.4 M phosphate buffer solution in place of 1 mM KCl. Whereas a precipitation was rapidly observed when the experiment was performed in 1 mM KCl (**Figure II.1**, item f), it was not observed after 2 h in 0.4 M phosphate buffer, leading to a high absorbance at 550 nm due to interference caused by MWCNT and bacteria cells (**Table II.1**). Indeed, if electrostatic forces are the driving forces of self-assembly, as we suppose, it must be hindered when ionic strength is increased. In the second test, the positively charged exogenous cyt *c* was replaced by bovine serum albumin (BSA) that is negatively charged in our experimental conditions (isoelectric point of BSA is 4.7 at 25 °C in water). While a precipitation was rapidly observed in the test tube containing positively charged cyt *c* with MWCNT and bacteria in 1 mM KCl (**Figure II.1A**, item f), it was not observed in the presence of BSA (**Figure II.1A**, item g). The suspension issued from bacteria mixed with MWCNT and BSA show an apparent diameter of $1.7 \mu\text{m} \pm 0.5 \mu\text{m}$ (**Figure II.1B**, item g), not significantly different from the diameter measured with bacteria alone or mixed with MWCNT but clearly smaller than the diameter observed with the positively charged cyt *c*. To conclude, electrostatic forces could play a crucial role in the self-assembly process that we report here.

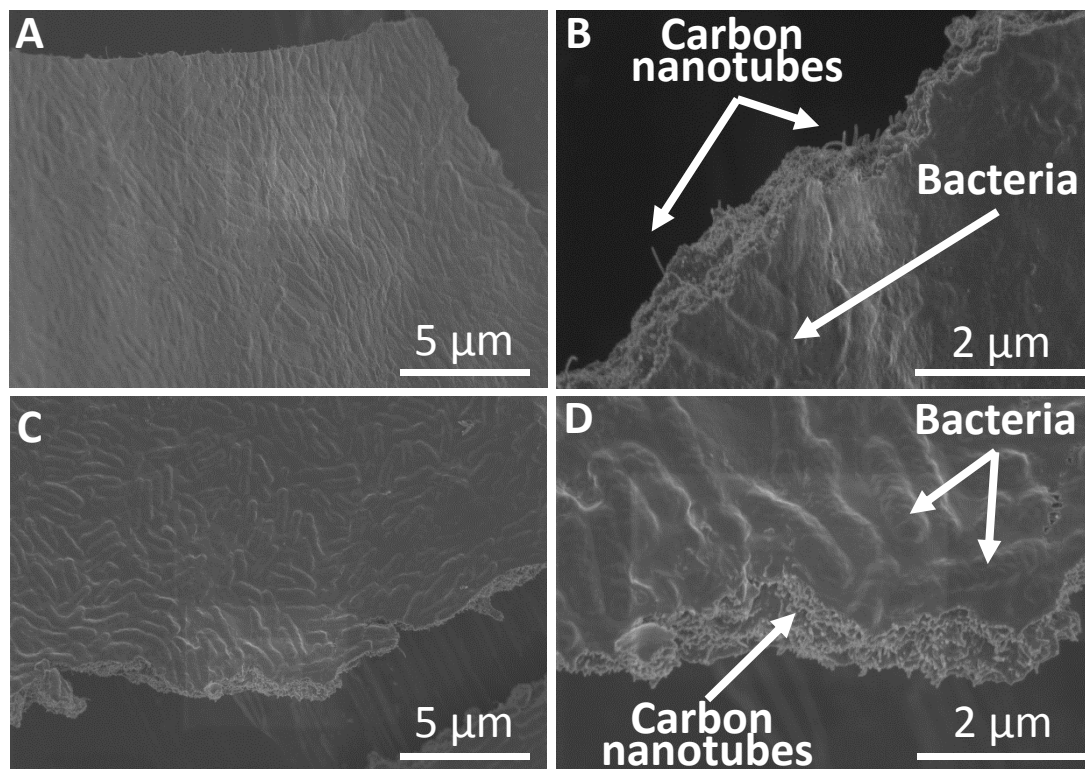


Figure II.8. Scanning electron microscopy of the biocomposite layer made from (A&B) *Shewanella oneidensis* and MWCNT and (C&D) *Shewanella oneidensis*, MWCNT and cytochrome *c*. Samples were dropped on a glassy carbon plate without any further preparation and observed with a Hitachi S-4800 SEM at an acceleration voltage of 1 kV.

The produced aggregates could be thus considered as bricks to produce the artificial biofilm on electrodes. Scanning electron microscopy (SEM) was performed on the biocomposite deposited on a glassy carbon surface resulting from the mixing of *S. oneidensis* with MWCNT (Figure II.8A&B) and from the mixing of *S. oneidensis* with MWCNT and cytochrome *c* (Figure II.8C&D). Rod-shaped bacteria are clearly visible in both samples and the large-scale imaging (Figure II.8B&D), which indicates that the surface densities are comparable, around 1.1 ± 0.2 cells cm^{-2} . Interestingly, when imaging these samples at higher magnification, a different apparent surface texture was observed: the bacterial shape on the biocomposite prepared in the absence of cytochrome *c* appears flat (Figure II.8B) while in the presence of cytochrome *c* their shape was curved (Figure II.8D). These different images suggest that positively-charged cytochrome *c* molecules influence the interaction between bacterial cells and

MWCNT in a biocomposite layer deposited on a solid surface. Additional SEM images are provided in Supplementary Material that confirm the presence of carbon nanotubes and bacteria in the layer (**Figure II.9**).

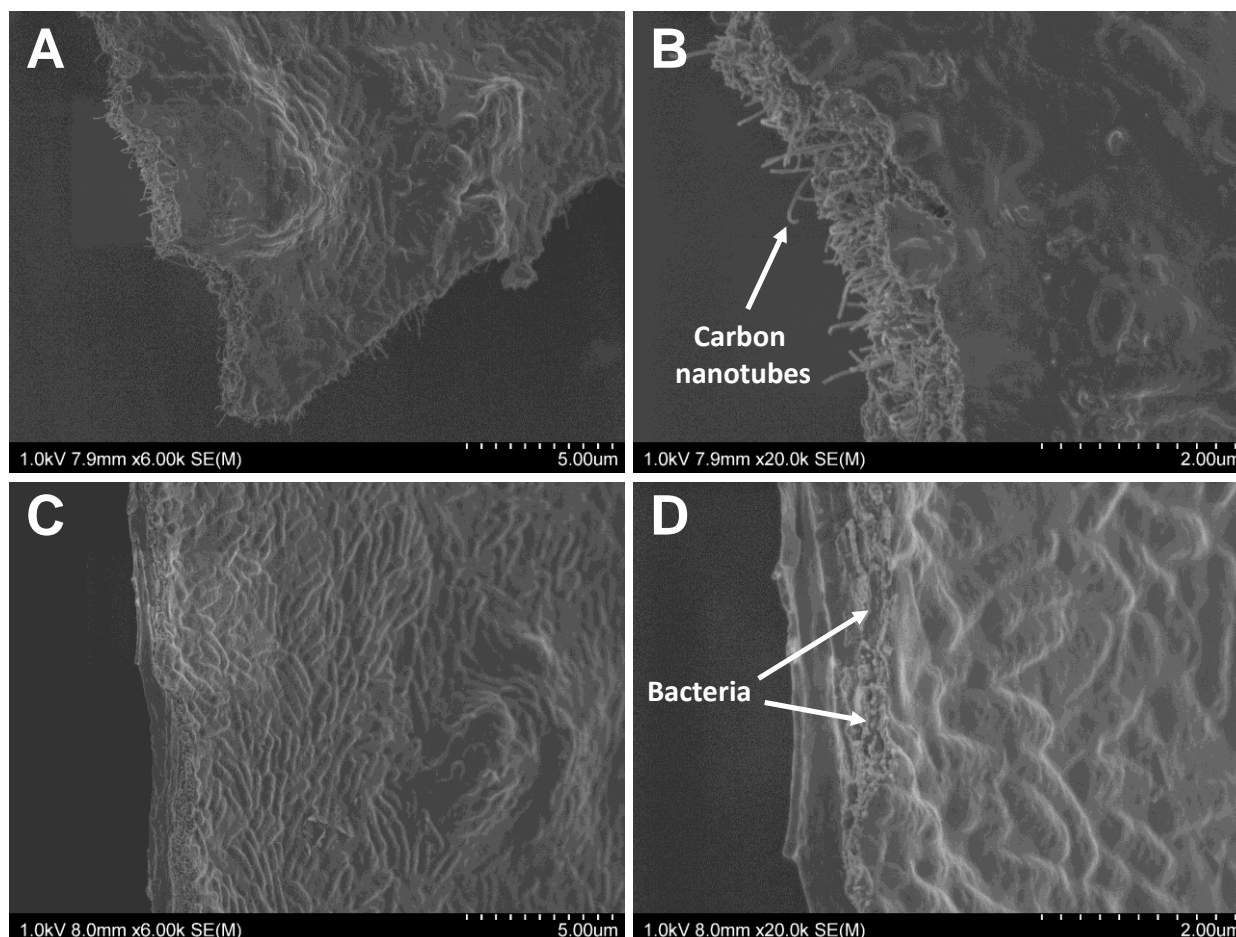


Figure II.9. Scanning electron micrographs of the biocomposite layer made from *Shewanella oneidensis*, MWCNT and cytochrome c.

To assess the health of bacterial cells before their incorporation into the biocomposite, the live/dead® BacLight™ viability test was applied to the suspended bacteria after two hours of interaction with MWCNT. With this test, bacteria with a permeable membrane to the propidium iodide, are assumed to be dead or strongly altered, and conversely, they are considered to be alive when their cytoplasmic membrane is not permeable to the dye. As a

control, a fresh bacterial suspension incubated by itself, resulted in 92 ± 4 % of intact cells (**Table II.2**). In the presence of MWCNT, only 8 ± 4 % of the cells remained stable (**Table II.3**). MWCNT cytotoxicity can be described by 3 mechanisms: a physical interaction between the cells and MWCNT resulting in the release of the intracellular content [41], an oxidative stress with reactive oxygenated species produced while the cells are in contact with MWCNT [42] and a toxicity provided by MWCNT impurities [43]. The addition of cyt *c* with MWCNT and bacteria in the suspension resulted in a net decrease of MWCNT toxicity upon bacteria, with 50 ± 4 % of intact cells (**Table II.4**). The physical interaction between cells and MWCNT is thus considered here as the most critical source of cytotoxicity; we suspect the self-assembly of MWCNT around bacteria in the presence of cyt *c* to promote cell viability by limiting membrane deterioration. And whatever the exact mechanism, these different results indicate that positively-charged cyt *c* molecules allow a protective interaction between bacterial cells and MWCNT in the biocomposite. This phenomenon was also favorable to extracellular electron transfer (EET) reactions that can be evaluated through electrochemical measurements.

PI stained cell	SYTO 9 stained cell	% intact membrane cell
6	132	95.6
8	123	93.9
9	121	93.1
6	102	94.4
3	98	97.0
5	87	94.6
8	97	92.4
15	79	84.0
11	111	91.0
8	89	94.7

Table II.2. Number of cell stained with propidium iodide (PI) or Syto9™ and percentage of cells with intact membrane calculated from samples with *Shewanella oneidensis*.

PI stained cell	SYTO 9 stained cell	% intact membrane cell
100	17	14.5
121	20	14.2
165	16	8.8
80	14	14.9
161	30	15.7
136	19	12.3
89	16	15.2
188	19	9.2
189	11	5.5
97	8	7.6

Table II.3. Number of cell stained with propidium iodide (PI) or Syto9 and percentage of cells with intact membrane calculated from samples with *Shewanella oneidensis* and MWCNT.

PI stained cell	SYTO 9 stained cell	% intact membrane cell
61	55	47.4
59	37	38.5
101	87	46.3
51	55	51.9
81	83	50.6
60	61	50.4
47	50	51.5
50	46	47.9
52	48	48.0
72	89	55.3

Table II.4. Number of cell stained with propidium iodide (PI) or Syto9™ and percentage of cells with intact membrane calculated from samples with *Shewanella oneidensis*, cytochrome *c* and MWCNT.

A first insight into the electrochemical properties of the biocomposite deposited on glassy carbon electrodes was provided by cyclic voltammetry (CV). CV experiments with the biocomposite made of *S. oneidensis* and MWCNT showed only a poor electrochemical response with no clearly-defined current peaks (**Figure II.10A**, curve a) that would have been related to outer-membrane cytochrome, free flavin or flavin bound to cytochrome [44]. In the presence of the exogenous *cyt c*, the cyclic voltammogram was dramatically changed with the appearance of a pair of redox peaks at 0.020 V (cathodic) and 0.115 V (anodic) versus Ag/AgCl (**Figure II.10**, curve b).

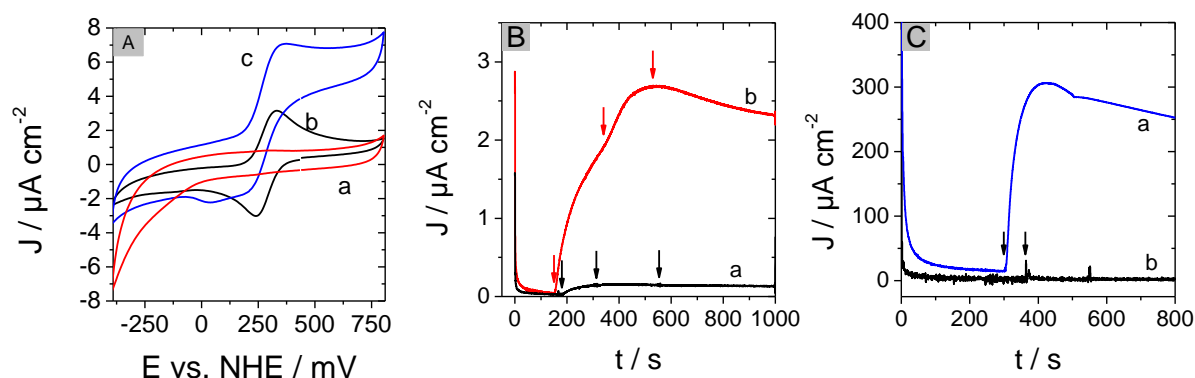


Figure II.10. (A) Cyclic voltammograms measured with the biocomposites made of *Shewanella oneidensis* MR-1 and MWCNT, in the absence (curve a) and in the presence (curve b) of cytochrome *c*, in the absence (curve a,b) and in the presence (curve c) of 0.3 mM formate (B) Amperometric current responses to several additions (arrows) of 0.1 mM of formate measured with a glassy carbon electrode modified with *Shewanella oneidensis* MR-1 and MWCNT (curve a) or with *S. oneidensis* MR-1, MWCNT and cytochrome *c* (curve b). (C) Amperometric current response to 50 mM formate measured with a graphite felt electrode impregnated with a biocomposite made from *Shewanella oneidensis* MR-1, MWCNT and cytochrome *c* (curve a) or only *Shewanella oneidensis* MR-1 (curve b). The measurements were performed in 50 mM phosphate buffer (pH 7) at room temperature. Cyclic voltammograms were obtained at 50 mV s⁻¹. All amperometric curves were recorded at +0.35 V versus an Ag/AgCl reference electrode. Note that experiments reported in curves b and c of Figure 5A have been performed respectively before and after the chronoamperometric measurement shown in curve b of Figure II.10B.

The existence of EET was observed in the presence of formate, an usual electron donor for the *Shewanella* strain. Electrons from formate oxidation are transferred to the outer membrane by the respiratory chain of the bacteria and flow out to the external acceptor, here the biocomposite electrode. A catalytic signal located at the potential of cyt *c* oxidation was clearly observed after addition of 0.3 mM formate in the solution (**Figure II.10A**, curve c). We also observe a variation of the capacitive current measured with this electrode, possibly linked to changes in the living material during the measurement (curve c was measured approximately 20 min later than curve a). In a combined series of chronoamperometric experiments, a potential of 0.35 V versus Ag/AgCl was applied to the different electrodes, *i.e.* about 200 mV more positive than the peak potential of cyt *c* oxidation so as not to be limited

by electron transfer kinetics between cyt *c* and electrode materials (MWCNT and glassy carbon), and aliquots of 0.1 mM formate were spiked at three different times (**Figure II.10B**). With the biocomposite prepared with bacteria and MWCNT, in the absence of exogenous cyt *c*, EET was observed but the maximum current was limited to $0.15 \mu\text{A cm}^{-2}$ (**Figure II.10B**, curve a). The introduction of cyt *c* into the biocomposite then allowed increasing EET as characterized by the rapid increase of current when formate was delivered to the bacteria up to a current density of $2.7 \mu\text{A cm}^{-2}$ (**Figure II.10B**, curve b). As expected, the current intensity was of the same order of magnitude and slightly lower than the Faradaic current measured by cyclic voltammetry using 50 mV s^{-1} scan rate ($5.1 \mu\text{A}$, curve c of **Figure II.10A**). The experiment is well reproducible with a mean current density of $2.5 \pm 0.3 \mu\text{A cm}^{-2}$ calculated from four independent biocomposite electrode prepared from four independent batch of *Shewanella oneidensis*. The protein thus provided a protection to the bacteria that allowed maintaining a sufficient fraction of living cells which could then transfer electrons to the neighboring MWCNT network. This currents were more than 10 and 4 times higher than those measured with electrodes prepared with suspensions containing only bacteria (**Figure II.11A**) or bacteria and cyt *c* (**Figure II.11B**), respectively. Thus, cyt *c*, in combination with MWCNT, could increase EET both through structural organization of the components in the biocomposite and by electron shuttling.

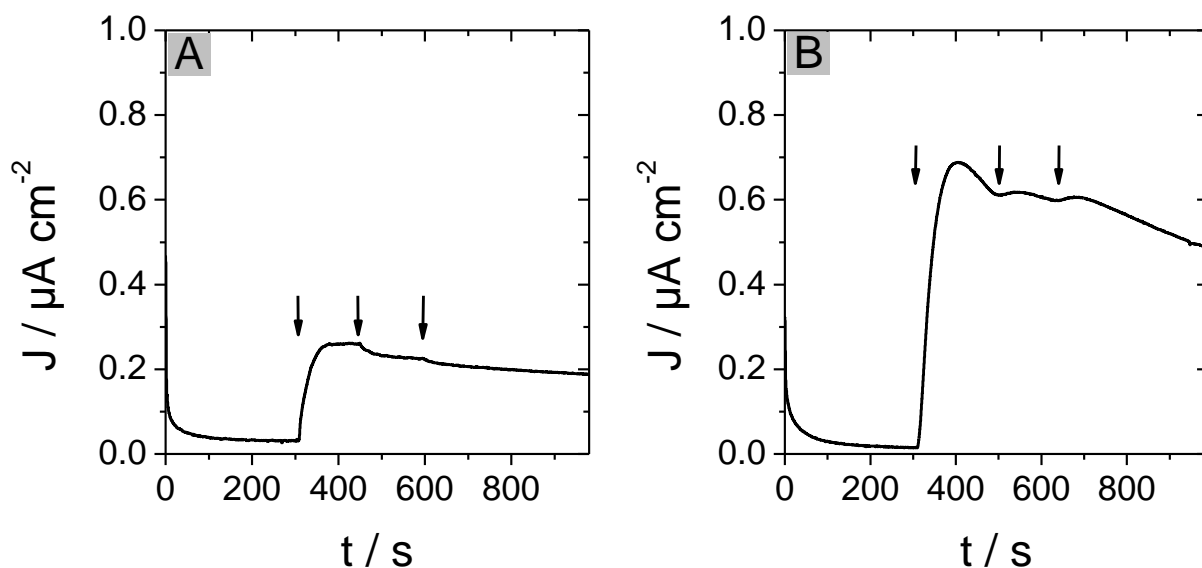


Figure II.11. Amperometric current responses to four additions (arrows) of 0.1 mM of formate measured with a glassy carbon electrode modified with (A) *Shewanella oneidensis* MR-1 and (B) *Shewanella oneidensis* MR-1 and cytochrome c.

Similar biocomposites were then prepared with *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* (**Figure II.12**). *E. coli* cannot allow extracellular electron transfer as it does not possess any outer-membrane cytochrome. This is indeed confirmed electrochemically as no current increase was observed upon successive additions of 5 mM glucose in the solution (Figure II.12A). On the contrary, an increase in current was observed upon successive additions of 0.5 mM glucose with the biocomposite film prepared with *P. fluorescens* (Figure II.12B). This bacterial species possesses an outer membrane cytochrome but, contrary to *S. oneidensis*, to our knowledge it has not been reported to produce conductive nanowires. This experiment illustrates the great potential of bacterial biocomposite materials as it provides a rapid and effective way to efficiently connect electroactive bacteria, even those that would not be as efficient as *S. oneidensis* or *G. sulfurreducens* to transfer electrons over long distances in naturally grown biofilms.

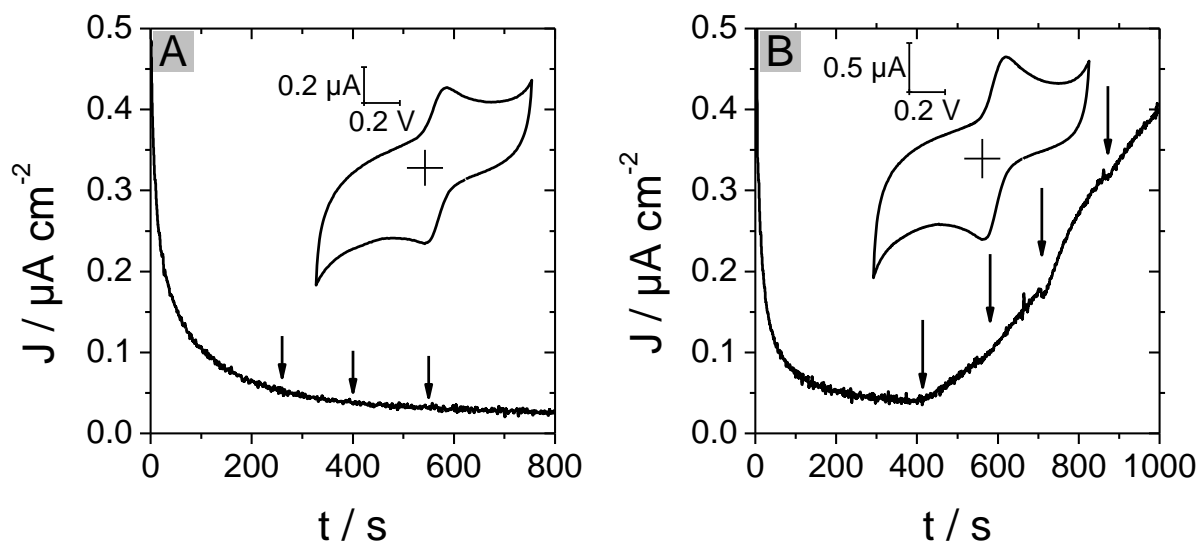


Figure II.12. (A) Amperometric current responses to three additions (arrows) of 5 mM of glucose measured with a glassy carbon electrode modified with *Escherichia coli*, MWCNT and cytochrome c. (B) Amperometric current responses to four additions (arrows) of 0.5 mM of glucose measured with a glassy carbon electrode modified with *Pseudomonas fluorescens*, MWCNT and cytochrome c.

The current density generated by the artificial biofilm could be further improved by depositing the biocomposite on a porous graphite felt electrode: up to $300 \mu\text{A cm}^{-2}$ in the presence of 50 mM formate (Figure II.10C, curve a), thus approaching the current that can be encountered with biofilms naturally produced on electrodes over long periods of time [14]. A control experiment observed with applying the same protocol to *Shewanella oneidensis* show only a negligible current response (Figure II.10C, curve b). One advantage of the method proposed in this report is that the biofilm was produced in about two hours, a short time on the scale of biofilm formation. This is the main interest of artificial biofilms made from a biocomposite material, the achievement in a short time and under controlled conditions of what nature needs to do slowly or cannot do.

3. Conclusion

Self-assembly of MWCNT with *Shewanella oneidensis* MR-1 was observed in the presence of cyt *c*. The resulting aggregates have been used to build a bacterial biocomposite that promoted extracellular electron transfer reactions. From a conceptual point of view, the association of MWCNT and cyt *c* with bacteria makes an artificial biofilm that mimics electroactive biofilm. The fabrication of this artificial biofilm, or biofilm-like layers, is rapid and was applied to another bacteria, i.e. *Pseudomonas fluorescens*. Connecting electroactive bacteria to an electrode surface thus becomes easy and rapid, which opens new opportunities for the application of a large diversity of bacterial strains from the emerging field of synthetic biology in bioelectrochemical systems. One important and still opened question is the possibility to stabilize the electrochemical response of the biocomposite for long-term experiments, a point that we will examine in further work.

References

- [1] M.C. Potter, Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds, Proc. R. Soc. London. Ser. B. Contain. Pap. a Biol. Character. 84 (1911) 260–276.
- [2] D.R. Bond, D.E. Holmes, L.M. Tender, D.R. Lovley, Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments, Science (80-.). 295 (2002) 483–485. doi:10.1126/science.1066771.
- [3] U. Schröder, Discover the possibilities: microbial bioelectrochemical systems and the revival of a 100-year-old discovery, J. Solid State Electrochem. 15 (2011) 1481–1486. doi:10.1007/s10008-011-1395-7.
- [4] Y.A. Gorby, S. Yanina, J.S. McLean, K.M. Rosso, D. Moyles, A. Dohnalkova, et al., Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 (2006) 11358–63. doi:10.1073/pnas.0604517103.
- [5] G. Reguera, K.D. McCarthy, T. Mehta, J.S. Nicoll, M.T. Tuominen, D.R. Lovley, Extracellular electron transfer via microbial nanowires., Nature. 435 (2005) 1098–1101. doi:10.1038/nature03661.
- [6] H.J. Kim, H.S. Park, M.S. Hyun, I.S. Chang, M. Kim, B.H. Kim, A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*, Enzyme Microb. Technol. 30 (2002) 145–152. doi:10.1016/S0141-0229(01)00478-1.
- [7] N.S. Malvankar, S.E. Yalcin, M.T. Tuominen, D.R. Lovley, Visualization of charge propagation along individual pili proteins using ambient electrostatic force microscopy, Nat. Nanotechnol. 9 (2014) 1012–1017. doi:10.1038/nnano.2014.236.
- [8] S. Pirbadian, S.E. Barchinger, K.M. Leung, H.S. Byun, Y. Jangir, R. a. Bouhenni, et al., *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components, Proc. Natl. Acad. Sci. 111 (2014) 1–6. doi:10.1073/pnas.1410551111.
- [9] R.J. Steidl, S. Lampa-Pastirk, G. Reguera, Mechanistic stratification in electroactive biofilms of *Geobacter sulfurreducens* mediated by pilus nanowires, Nat. Commun. 7 (2016) 12217. doi:10.1038/ncomms12217.
- [10] M.D. Yates, S.M. Strycharz-Glaven, J.P. Golden, J. Roy, S. Tsoi, J.S. Erickson, et al., Measuring conductivity of living *Geobacter sulfurreducens* biofilms, Nat. Nanotechnol. 11 (2016) 910–913. doi:10.1038/nnano.2016.186.
- [11] S. Lampa-Pastirk, J.P. Veazey, K.A. Walsh, G.T. Feliciano, R.J. Steidl, S.H. Tessmer, et al., Thermally activated charge transport in microbial protein nanowires., Sci. Rep. 6 (2016) 23517. doi:10.1038/srep23517.
- [12] M.Y. El-Naggar, G. Wanger, K.M. Leung, T.D. Yuzvinsky, G. Southam, J. Yang, et al., Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (2010) 18127–18131. doi:10.1073/pnas.1004880107.
- [13] M.D. Yates, J. Golden, J. Roy, S.M. Strycharz-Glaven, S. Tsoi, J. Erickson, et al., Thermally activated long range electron transport in living biofilms, Phys. Chem. Chem. Phys. 17 (2015) 32564–32570. doi:10.1039/C5CP05152E.
- [14] H. Wang, J. Park, Z.J. Ren, Practical Energy Harvesting for Microbial Fuel Cells: A

- Review, Environ. Sci. Technol. (2015) 150211042126005. doi:10.1021/es5047765.
- [15] B.E. Logan, K. Rabaey, Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies., Science. 337 (2012) 686–90. doi:10.1126/science.1217412.
- [16] D.R. Lovley, K.P. Nevin, Electrobiocommodities : powering microbial production of fuels and commodity chemicals from carbon dioxide with electricity, Curr. Opin. Biotechnol. 24 (2013) 385–390. doi:10.1016/j.copbio.2013.02.012.
- [17] X.C. Abrevaya, N.J. Sacco, M.C. Bonetto, A. Hilding-Ohlsson, E. Cortón, Analytical applications of microbial fuel cells. Part II: Toxicity, microbial activity and quantification, single analyte detection and other uses., Biosens. Bioelectron. 63C (2015) 591–601. doi:10.1016/j.bios.2014.04.053.
- [18] C. Pfeffer, S. Larsen, J. Song, M. Dong, F. Besenbacher, R.L. Meyer, et al., Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances, Nature. (2012) 10–13. doi:10.1038/nature11586.
- [19] N.S. Malvankar, D.R. Lovley, Microbial nanowires for bioenergy applications, Curr. Opin. Biotechnol. 27 (2014) 88–95. doi:10.1016/j.copbio.2013.12.003.
- [20] M. a. Rosenbaum, A.W. Henrich, Engineering microbial electrocatalysis for chemical and fuel production, Curr. Opin. Biotechnol. 29 (2014) 93–98. doi:10.1016/j.copbio.2014.03.003.
- [21] T. Krieg, A. Sydow, U. Schröder, J. Schrader, D. Holtmann, Reactor concepts for bioelectrochemical syntheses and energy conversion, Trends Biotechnol. 32 (2014) 645–655. doi:10.1016/j.tibtech.2014.10.004.
- [22] S. Wu, P. Liang, C. Zhang, H. Li, K. Zuo, X. Huang, Enhanced performance of microbial fuel cell at low substrate concentrations by adsorptive anode, Electrochim. Acta. 161 (2015) 245–251. doi:10.1016/j.electacta.2015.02.028.
- [23] L. Peng, S.-J. You, J.-Y. Wang, Carbon nanotubes as electrode modifier promoting direct electron transfer from *Shewanella oneidensis*., Biosens. Bioelectron. 25 (2010) 1248–51. doi:10.1016/j.bios.2009.10.002.
- [24] M. Picot, L. Lapinsonnière, M. Rothballer, F. Barrière, Graphite anode surface modification with controlled reduction of specific aryl diazonium salts for improved microbial fuel cells power output., Biosens. Bioelectron. 28 (2011) 181–8. doi:10.1016/j.bios.2011.07.017.
- [25] S. a Patil, K. Hasan, D. Leech, C. Hägerhäll, L. Gorton, Improved microbial electrocatalysis with osmium polymer modified electrodes., Chem. Commun. (Camb). 48 (2012) 10183–5. doi:10.1039/c2cc34903e.
- [26] H.R. Luckarift, S.R. Sizemore, J. Roy, C. Lau, G. Gupta, P. Atanassov, et al., Standardized microbial fuel cell anodes of silica-immobilized *Shewanella oneidensis*., Chem. Commun. 46 (2010) 6048–6050. doi:10.1039/c0cc01255f.
- [27] W. Ghach, M. Etienne, V. Urbanova, F.P.A. Jorand, A. Walcarius, Sol–gel based “artificial” biofilm from *Pseudomonas fluorescens* using bovine heart cytochrome c as electron mediator, Electrochem. Commun. 38 (2014) 71–74. doi:10.1016/j.elecom.2013.11.001.
- [28] Y.-C. Yong, Y.-Y. Yu, X. Zhang, H. Song, Highly active bidirectional electron transfer by a self-assembled electroactive reduced-graphene-oxide-hybridized biofilm., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 53 (2014) 4480–3. doi:10.1002/anie.201400463.

- [29] X. Jiang, J. Hu, A.M. Lieber, C.S. Jackan, J.C. Biffinger, L.A. Fitzgerald, et al., Nanoparticle facilitated extracellular electron transfer in microbial fuel cells., *Nano Lett.* 14 (2014) 6737–42. doi:10.1021/nl503668q.
- [30] A.Y. Chen, C. Zhong, T.K. Lu, Engineering living functional materials, *ACS Synth. Biol.* 4 (2015) 8–11. doi:10.1021/sb500113b.
- [31] A.Y. Chen, Z. Deng, A.N. Billings, U.O.S. Seker, M.Y. Lu, R.J. Citorik, et al., Synthesis and patterning of tunable multiscale materials with engineered cells., *Nat. Mater.* 13 (2014) 515–23. doi:10.1038/nmat3912.
- [32] I. Willner, M. Lion-Dagan, S. Marx-Tibbon, E. Katz, Bioelectrocatalyzed amperometric transduction of recorded optical signals using monolayer-modified Au-electrodes1, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 6581–6592. doi:10.1021/ja00129a023.
- [33] R. Dronov, D.G. Kurth, H. Möhwald, R. Spricigo, S. Leimkühler, U. Wollenberger, et al., Layer-by-layer arrangement by protein-protein interaction of sulfite oxidase and cytochrome c catalyzing oxidation of sulfite, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 1122–1123. doi:10.1021/ja0768690.
- [34] A. Scotti, W. Liu, J.S. Hyatt, E.S. Herman, H.S. Choi, J.W. Kim, et al., The CONTIN algorithm and its application to determine the size distribution of microgel suspensions, *J. Chem. Phys.* 142 (2015) 234905. doi:10.1063/1.4921686.
- [35] S. Kang, M. Herzberg, D.F. Rodrigues, M. Elimelech, Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter!, *Langmuir.* 24 (2008) 6409–13. doi:10.1021/la800951v.
- [36] V.K.K. Upadhyayula, S. Deng, M.C. Mitchell, G.B. Smith, Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: A review, *Sci. Total Environ.* 408 (2009) 1–13. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.09.027.
- [37] M. Okada, N.I. Smith, A.F. Palonpon, H. Endo, S. Kawata, M. Sodeoka, et al., Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 28–32. doi:10.1073/pnas.1107524108.
- [38] M. Patila, I. V. Pavlidis, E.K. Diamanti, P. Katapodis, D. Gournis, H. Stamatis, Enhancement of cytochrome c catalytic behaviour by affecting the heme environment using functionalized carbon-based nanomaterials, *Process Biochem.* 48 (2013) 1010–1017. doi:10.1016/j.procbio.2013.04.021.
- [39] E. Dague, J. Duval, F. Jorand, F. Thomas, F. Gaboriaud, Probing Surface Structures of *Shewanella spp.* by Microelectrophoresis, *Biophys. J.* 90 (2006) 2612–2621. doi:10.1529/biophysj.105.068205.
- [40] K.J.M. Bishop, C.E. Wilmer, S. Soh, B.A. Grzybowski, Nanoscale forces and their uses in self-assembly, *Small.* 5 (2009) 1600–1630. doi:10.1002/smll.200900358.
- [41] R.J. Narayan, C.J. Berry, R.L. Brigmon, Structural and biological properties of carbon nanotube composite films, *Mater. Sci. Eng. B.* 123 (2005) 123–129. doi:10.1016/j.mseb.2005.07.007.
- [42] S.K. Manna, S. Sarkar, J. Barr, K. Wise, E. V. Barrera, O. Jejelowo, et al., Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kb in human keratinocytes, *Nano Lett.* 5 (2005) 1676–1684. doi:10.1021/nl0507966.
- [43] A. a Shvedova, E.R. Kisin, R. Mercer, A.R. Murray, V.J. Johnson, A.I. Potapovich, et al., Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 289 (2005) L698-708.

doi:10.1152/ajplung.00084.2005.

- [44] S. Xu, Y. Jangir, M.Y. El-Naggar, Disentangling the roles of free and cytochrome-bound flavins in extracellular electron transport from *Shewanella oneidensis* MR-1, *Electrochim. Acta.* 198 (2016) 49–55. doi:10.1016/j.electacta.2016.03.074.

Chapitre 3. Influence du cytochrome exogène sur les transferts d'électrons à la cathode d'un biofilm artificiel électroactif

L'utilisation des MWCNTs pour permettre la formation d'un biofilm artificiel avec *S. oneidensis* a été démontrée avec succès au cours du Chapitre 2. Les MWCNTs seuls ne permettaient pas cependant d'optimiser les transferts d'électrons dans le biofilm artificiel. Il était nécessaire de les associer à des cytochromes *c* exogènes pour y arriver. Le cytochrome exogène utilisé au cours du Chapitre 2 possédait un potentiel redox élevé, 254 mV vs NHE. Ce potentiel, adéquat pour l'oxydation du formiate ou du glucose à l'anode, n'était pas adapté à des réactions de réduction du fumarate à la cathode. Afin d'adapter le biofilm artificiel à la cathode, l'utilisation de divers cytochromes *c* exogène a été proposé. Ces cytochromes, c_3DvH , c_7Da , $c_{553}DvH$, c_3DdN et c_3Dg possédaient des potentiels redox plus bas, compris entre -400 mV et 20 mV vs. NHE. Ces cytochromes variaient aussi au niveau de leur charge à pH neutre. De premières analyses en DLS ont donc permis de confirmer l'hypothèse posée au Chapitre 2 ; les forces électrostatiques étaient à l'origine de l'auto-assemblage du biocomposite. En effet les biocomposites s'étaient formés avec c_3DvH , c_7Da et $c_{553}DvH$, chargées positivement à pH neutre au contraire des expériences menées avec c_3DdN et c_3Dg , chargée négativement ou neutre à pH=7.

L'activité catalytique des biofilms artificiels a ensuite été testée par électrochimie pour la réduction du fumarate en succinate. Quand le biocomposite n'est pas formé, avec c_3DdN ou c_3Dg , aucun courant catalytique n'est mesuré, montrant l'importance de l'étape d'auto-assemblage pour les transferts d'électrons. Les cytochromes exogènes dans ces situations peuvent s'échapper du composite et ne participent plus aux réactions de transferts d'électrons. Parmi les biocomposites assemblés en présence du cytochrome exogène, seules ceux avec c_3DvH et c_7Da ont montrés des signaux catalytiques en voltampérométrie cyclique et des courants de réduction : $65 \mu A cm^{-2}$ pour c_3DvH et $36 \mu A cm^{-2}$ pour c_7Da lors de l'addition de 50 mM de fumarate. Le biocomposite assemblé en présence de $c_{553}DvH$ n'a quant à lui donné aucune réponse lors de l'addition de fumarate. $C_{553}DvH$ possède un potentiel redox (20 mV vs. NHE) plus haut que c_3DvH (-140 à -270 mV) et c_7Da (-290 à -375 mV).

Ce potentiel est plus élevé que celui du cytochrome membranaire MtrA (-100 à -400 mV) qui est impliqué dans le complexe membranaire chargé de recevoir les électrons des cytochromes exogènes. Les cytochromes exogènes choisis sont donc extrêmement importants pour la réalisation des transferts extracellulaires d'électrons avec l'électrode car ils doivent être compatibles avec les cytochromes membranaires de la bactérie pour participer aux transferts d'électrons. Enfin un biocomposite formé en présence de c_3DvH a été optimisé permettant d'obtenir des densités de courant catalytique proche de $170 \mu A cm^{-2}$. Cette activité catalytique n'est malheureusement pas pérenne dans le temps, devenant quasiment nulle après 12 h. Ce manque de stabilité serait dû à l'utilisation de cytochromes exogènes, associés aux biocomposites par des interactions faibles, causant une désorption des cytochromes au cours du temps vers la solution de travail. L'utilisation d'éléments électroactifs exogènes pour constituer un biofilm électroactif limite donc l'utilisation du biocomposite par cette instabilité temporelle.

Influence of cytochrome charge and potential on the cathodic current of electroactive artificial biofilms

Abstract

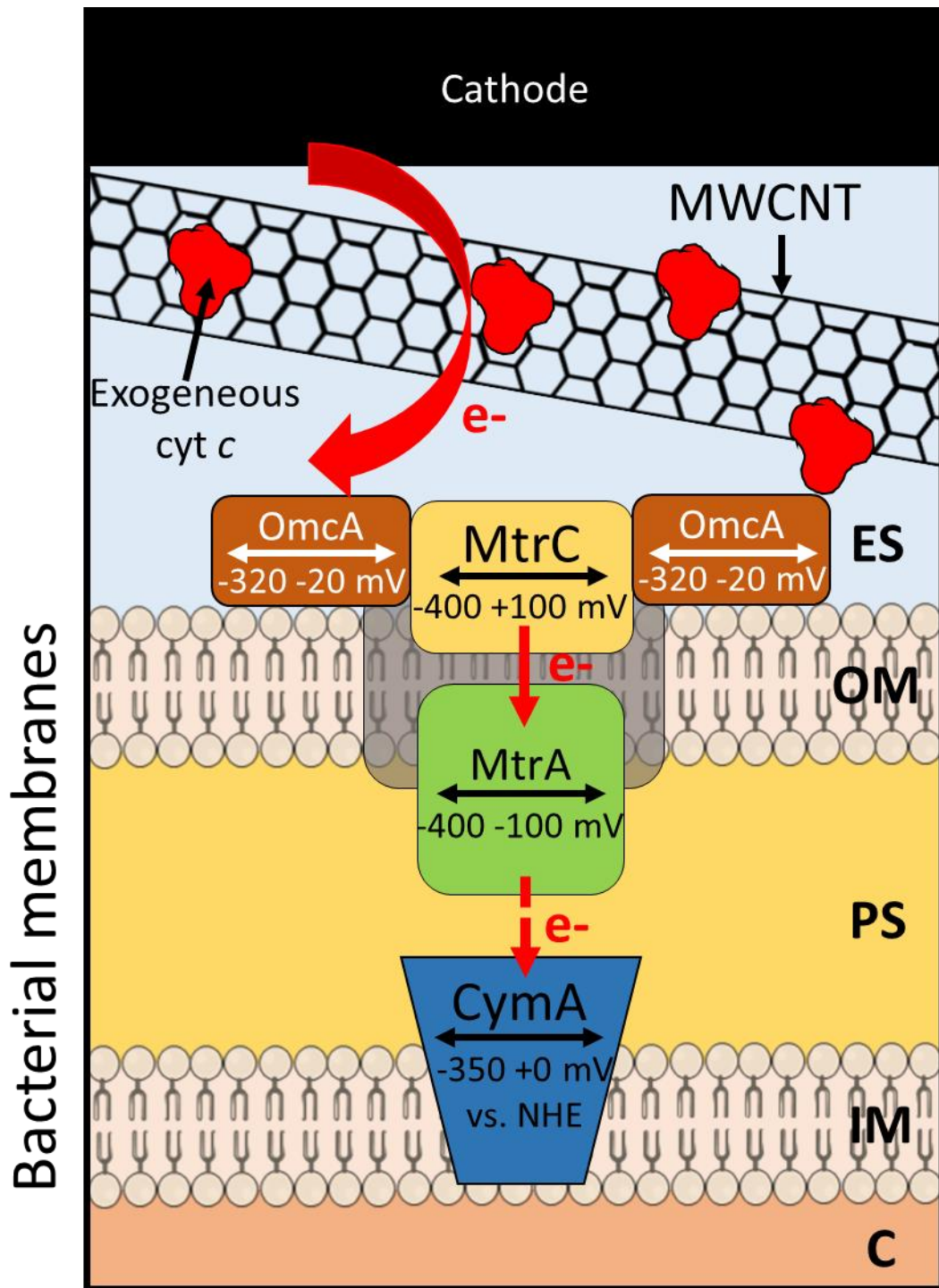
An electroactive artificial biofilm has been optimized for the cathodic reduction of fumarate by *Shewanella oneidensis*. The system is based on the self-assembly of multi-walled carbon nanotubes with bacterial cells in the presence of a c-type cytochrome. The aggregates are then deposited on an electrode to form the electroactive artificial biofilm. Six c-type cytochromes have been studied, extracted from bovin heart, or *Desulfuromonas* and *Desulfuvibrio* strains. The isoelectric point of the cytochrome has a critical influence on the self-assembly process that occurs only with positively-charged cytochromes. The redox potential of the cytochrome is critical for electron transfer reaction with membrane cytochromes of the *Mtr* pathway. Optimal results have been obtained with c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough having an isoelectric point of 10,2 and a redox potential comprised between -290 and -375 mV vs. NHE. A current density of $170 \mu\text{A cm}^{-2}$ could be achieved in the presence of 50 mM fumarate. The stability of the electrochemical response was evaluated, showing a regular decrease of the current within 13 h, possibly due to the leaching of loosely-bound cytochromes from the biofilm.

1. Introduction

Redox reactions are central for the cellular energetic metabolism [1]. For their needs, some bacteria are able to exchange electrons with solid compounds present in their extracellular environment. For example, species that belong to genera *Geobacter* and *Shewanella* can *respire* solids such as iron or manganese oxides by a complex extracellular electron transfer (EET) occurring from cytoplasm to the extracellular solid electron acceptors [2–4].

This property has been domesticated in microbial fuel cells to produce energy from wastewaters or sediments with using anodes as a solid electron acceptors [5–7]. In this biotechnology, a so-called *electroactive biofilm*, colonizes the anode and transfers electrons to it [8]. Electroactive biofilms can also be exploited to catalyse electrochemical reactions at the cathode for molecule production [9,10] or for bioremediation in aqueous environment as the removal of sulfate in acidic industrial wastewaters [11] or nitrogen in urban wastewater [11,12].

In Gram-negative electroactive bacteria such as *Shewanella oneidensis* MR1, EET involves *c*-type cytochromes [13]. Four major types of cytochromes have been identified in the Mtr pathway of *S. oneidensis*. CymA, a tetraheme *c*-type cytochrome, is anchored in the inner membrane of bacteria with a range of potential between 0 and -350 mV vs standard hydrogen electrode (SHE) [14]. In anodic reactions, CymA collects electron from the menaquinol pool and transfers them to MtrA, a decaheme *c*-type cytochrome with a range of potential between -100 mV and -400 mV vs NHE [14]. MtrA, localized in the periplasmic space, can then transfer those electrons to MtrC, with the help of MtrB, an outer membrane porin. MtrC and OmcA are decaheme *c*-type cytochromes, localized in the outer membrane (**Scheme III.1**), that interact together [15]. Their range of potential are comprised respectively between +100 and -400 mV and -20 to -320 mV [14]. MtrC and OmcA are then able to transfer those electrons to the final acceptor in the extracellular medium, even though OmcA is not strictly necessary to the realization of the Mtr pathway [16].



Scheme III.1. Drawing of the interface between electrode materials and the bacterial membrane of *Shewanella oneidensis* considered in this work. Range of potential of the protein implied are indicated. ES: extracellular space. OM: Outer Membrane. PS: periplasmic space. IM: Inner membrane. C: cytoplasm. MtrA, MtrC and OmcA are outer-membrane cytochromes.

Mtr pathway is reversible and can therefore be interfaced with both anodes and cathodes [17]. Conductive appendages at the cell surface of *S. oneidensis* are also reported to participate in EET and are described as a periplasmic and outer membrane extension [18]. It is then assumed that all the cytochromes required in the Mtr pathway are present. Extracellular electron transfer by *S. oneidensis* was also reported to be dominated by self-produced redox mediators derived from quinone such as flavin mononucleotide and riboflavin [19]. However, a recent study has demonstrated that flavin and riboflavin are cofactors that associate with outer membrane cytochrome MtrC and OmcA to mediate electron transfer reactions [20]. Finally, it is assumed that the architecture of the biofilm, e.g. driven by pili [21] and electrostatic interactions as the bacteria can produce charged EPS when interacting with inorganic electron source [22], can be essential for its electroactivity.

Natural electroactive biofilms are typically grown on electrode for long periods, between few days to weeks, before reaching an optimal catalytic activity. During this period, bacteria evolve and adapt to their extracellular environment, i.e. the electrode surface and the medium. This growth on electrode can also lead to the self-production of electron shuttles that allow the optimization of electron transfer reactions [23]. When considering environmental applications of microbial electrochemical technologies, natural complex biofilms grown in this environment, in a situation of competition with the all reserve of microorganisms, are necessarily the best electroactive living materials to be deposited on the electrode surface, e.g. associated to the wastewater treatment (organic matter oxidation or denitrification). However, when considering other biotechnological applications, such as microbial electrosynthesis, selected strain or genetically modified microorganism are to be used, and the strategy to produce the biofilm is different, with a better control of the strains involved and of the conditions of culture. These electroactive biofilms can also be grown on a selected electrode material by controlling the electrode potential and the culture conditions. Another strategy is

to reconstitute artificially a biofilm on an electrode surface by selecting all the components present there, and therefore to control EET reactions occurring in this biofilm-like material or artificial biofilm. In principle, these model systems could also help identify some factors involved in EET.

The idea of artificial electroactive biofilm has appeared few years ago when silica gel was used as artificial extracellular polymeric substances (EPS) to create standardized microbial fuel cell anode [24]. In a similar matrix, it has been demonstrated that exogenous cytochrome *c* from bovine heart could be used to mimic loosely-bound *c*-type cytochrome from natural biofilms [25]. More recently, the interest of carbon nanotube for immobilization and wiring of bacteria was demonstrated. But carbon nanotube itself was not sufficient to get an electroactive artificial biofilm. It was necessary to add exogenous cytochrome *c*, e.g. from bovine heart, to achieve electroactive artificial biofilm, leading to an anodic current density of up to 300 $\mu\text{A cm}^{-2}$ at +0.35 V vs. Ag/AgCl in the presence of 50 mM formate. Here, we extend this preliminary study to cathodes, by applying the same protocol to a larger variety of *c*-type cytochromes from *Desulfovibrio* and *Desulfuromonas* genera that display a wide range of potentials and isoelectric points in order to explore the driving force of the self-assembly and to evidence if the cathodic reduction of fumarate to succinate, catalyzed by *S. oneidensis*, can be achieved with an artificial biofilm. We show, with dynamic light scattering and electrochemical characterizations, that the formation and the electrochemistry of the living biocomposite used as an electroactive artificial biofilm is strongly affected by the properties of the cytochrome.

2. Experimental

2.1. Reagents

Sodium fumarate dibasic (assay $\geq 99\%$; Sigma-aldrich) was used as electron acceptor for the bacterial cells. Oxidized multi-walled carbon nanotubes (MWCNT, outer diameter: 30 ± 10 nm, length: 1-5 μm) were purchased from Nanolab. A pyrolytic graphite (PG) electrode was purchased from Bio-Logic SAS. Glassy carbon (SIGRADUR) was obtained from HTW Hochtemperatur-Werkstoffe GmbH (Germany) and graphite felt (GFD 4,6 E.A.) from SGL Group (Germany). The growth media were prepared from potassium chloride KCl solution ($\geq 99\%$; 1 mM, Sigma-Aldrich), trypticase soy broth (TSB, Fluka), trypticase soy agar (TSA, Fluka). Phosphate buffer (50 mM) was prepared from $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99.6\%$; Prolabo) and $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99\%$; Fluka). *c*-type cytochrome from bovine heart was purchased from Sigma-Aldrich (c_I , $\geq 95\%$). Bacterial *c*-type cytochromes were prepared and purified as previously described [26]. All solutions were prepared with high purity water (18 M Ω cm) from a Purelab Option water purification system (Elga LabWater, Veolia Water STI, France).

2.2. Bacterial strains and growth conditions

S. oneidensis MR-1 (ATCC 700550) was streaked on plate culture medium from glycerol stock stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$. When needed, 0.1 mL of an overnight culture from a single colony was inoculated in 200 mL TSB and incubated at $30\text{ }^\circ\text{C}$ under stirring (160 rpm) for 48 h. Bacterial growth was measured by monitoring the optical density at 600 nm. The culture was harvested by centrifugation at 5000 *g* for 10 min at room temperature. The pellet was washed twice with 1 mM KCl, and then suspended in 1 mM KCl.

2.3. Electrode preparation and characterization

The bacterial cell suspension was typically mixed with the stock solution of cytochrome (1 mM $c_3\text{DvH}$, 1 mM $c_7\text{Da}$, 540 μM , $c_3\text{Dg}$, 480 μM , $c_{553}\text{DvH}$, 360 μM $c_3\text{DdN}$) and the stock suspension of MWCNT (5 mg mL $^{-1}$, dispersed in water by sonication for 30 min at 37 kHz with 80 W effective ultrasonic power) in order to reach a final bacterial cell

concentration of 1×10^9 cell mL^{-1} , a final cytochrome concentration of 0.2 mM and a final MWCNT concentration of 1 mg mL^{-1} . We did not observe any influence of the order of mixing of the components, however we always introduced bacteria at last step. The components of the suspension were allowed to self-assemble for 2 h. Ten microliters of the final suspension were dropped on glassy carbon electrode (GCE) and allowed to dry at 4°C for 40 min. Another method of preparation was also used to reach a higher current density. In that case, 0.5 mL (or 2 mL with $c_3\text{DvH}$) of the final suspension was deposited through a graphite felt (1.32 cm^2 geometric surface area). Measurements were done in an electrochemical cell containing 10 mL (CGE electrode) or 30 mL (graphite felt) of 50 mM PBS buffer ($\text{pH} = 7$) under stirring, in the absence and in the presence of fumarate. In cyclic voltammetry experiments, the potential scan rate was 50 mV s^{-1} . In constant potential chronoamperometry, the applied potential was 50 mV more negative than the most negative peak potential of the immobilized cytochrome.

2.4. Dynamic Light scattering

A Malvern Zetasizer 3000 HSa instrument was used to measure the size of particles in water by dynamic light scattering (DLS). Laser light was from a Helium-Neon laser with 5 mW of output power at 633 nm, and the scattered light was detected at 90° . The sample was introduced in a flow-through cell thermostated at 25°C . All the measurements were performed under suitable conditions by systematically diluting 50 times the samples with pure water in order not to saturate the detector, given the nature of aggregates. Water was first filtered with a mixed cellulose ester (surfactant-free) membrane ($0.45 \mu\text{m}$ of porosity). The attenuator (diaphragm) of the photomultiplier was automatically adapted for each sample in order to not saturate the detector. The data were analyzed by the CONTIN method [27]. Data are extracted from a global distribution in volume and the apparent diameter is the D_{50} value with its interquartile range (IQR).

3. Results and discussion

3.1. Electrostatic interactions between cytochromes, CNT and *S. oneidensis*

Five *c*-type cytochromes have been used in this study. They are listed in **Table III.1**, with their isoelectric point (pI), number of hemes and corresponding redox potentials reported in the literature [26]. These cytochromes were extracted from different bacterial strains of *Desulfovibrio* (*c*₃DdN, *c*₃Dg, *c*₃DvH and *c*₅₅₃DvH) and *Desulfuromonas* (*c*₇Da) genera. Cytochrome *c* from bovine heart (*c*₁) was also used in control experiments.

Table III.1. List of the cytochromes used in this study with the redox potentials of their hemes and their isoelectric point (pI).

Acronym	Cytochrome	pI	Number of heme	$E_{\text{V/NHE}} / \text{mV}$	Ref.
<i>c</i> ₇ Da	<i>c</i> ₇ <i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	7.8	3	-140 -210 -240	[28]
<i>c</i> ₃ DdN	<i>c</i> ₃ <i>Desulfuvibrio desulfuricans</i> Norway (DdN)	7	4	-165 -305 -365 -400	[29]
<i>c</i> ₃ Dg	<i>c</i> ₃ <i>Desulfovibrio gigas</i> (Dg)	5	4	-235 -235 -305 -315	[30]
<i>c</i> ₃ DvH	<i>c</i> ₃ <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough (DvH)	10.2	4	-290 -335 -345 -375	[31]
<i>c</i> ₅₅₃ DvH	<i>c</i> ₅₅₃ <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough (DvH)	8.9	1	20	[32]
<i>c</i> ₁	<i>c</i> ₁ from bovine heart	10-10.5	1	254	[33]

As discussed in a previous report [34], the fabrication of a living biocomposite with carbon nanotubes, *Shewanella oneidensis* and cytochromes, involves first a self-assembly of the three components in a low salt concentration solution before deposition of the produced aggregates on the electrode surface, either a glassy carbon plate or a carbon felt. Several

questions can be investigated here: (1) can we further demonstrate our hypothesis that electrostatic forces are the driving force of the self-assembly process [34] and (2) can we use this living biocomposite to catalyze a cathodic reaction, e.g. the reaction of fumarate to succinate, and what would be the influence of the cytochrome redox potential on electron transfer reactions?

To investigate the role of electrostatic interactions, we compared the influence of the isoelectric point of cytochromes on the size of the aggregates produced after 2 h in 1 mM KCl solution showing a pH close to 6 with MWCNT and bacteria. Three exogenous cytochromes are positively charged in these conditions (pI c_7Da = 7.8, pI $c_{553}DvH$ = 8.9, pI c_3DvH = 10.2), and two cytochromes are close to neutrality or negatively charged (pI c_3DdN = 7; pI c_3Dg = 5). MWCNT are negatively charged at neutral pH. The hydrodynamic diameter of the suspended particles was monitored by dynamic light scattering (DLS). **Figure III.1A** reports the apparent diameter of MWCNT in the absence or in the presence of the cytochromes. Isoelectric points are also reported (triangles in Figure III.1A). The apparent diameter of MWCNT in the absence of cytochrome was $0.30 \pm 0.08 \mu\text{m}$. DLS measurement provides in that case an average size of the hydrodynamic beam of MWCNT and does not reflect their one-dimensional shape (15 ± 5 nm diameter and 1-5 μm length). In the presence of cytochromes having an isoelectric point above 7 (i.e. c_7DA , $c_{553}DvH$ and c_3DvH), the apparent diameter of the particles was increased by a factor of 4 ($1.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$ in the presence of c_3DvH that has a pI of 10.2) to 5 ($1.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ in the presence of c_7Da that has a pI of 7.8). The control experiments performed in the presence of c_1 led to an apparent diameter in the same range as with other cytochromes ($1.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$, pI of 10-10.5). At the opposite, in the presence of cytochrome with pI close to or lower than 7, no increase in the apparent diameter of the particles in the suspension was observed ($0.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$ with c_3Dg that has a pI of 5; 0.3

$\pm 0.1 \mu\text{m}$ with $c_3\text{DdN}$ that has a pI of 7). These results strongly support the hypothesis of a self-assembly driven by electrostatic interactions.

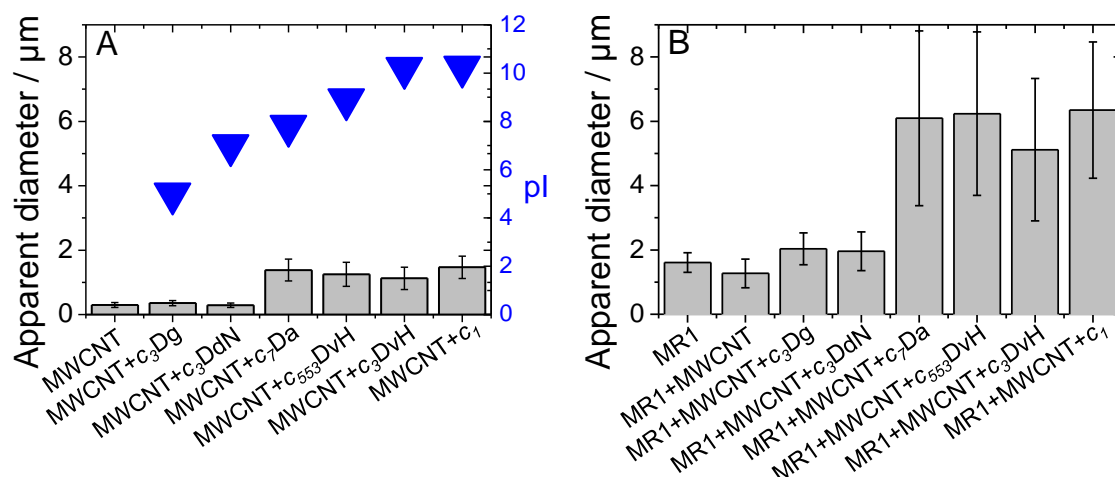


Figure III.1. Size distribution diagrams determined by dynamic light scattering of (A) 1 mg mL^{-1} MWCNT or (B) 1 mg mL^{-1} MWCNT and $10^9 \text{ cells mL}^{-1}$ *Shewanella oneidensis* in 1 mM KCl after 2 h at room temperature in the presence of 0.2 mM cytochromes ($c_3\text{Dg}$, $c_3\text{DdN}$, $c_7\text{Da}$, $c_{553}\text{DvH}$, $c_3\text{DvH}$ and c_1). Control experiments with only 1 mg mL^{-1} MWCNT, only $10^9 \text{ cells mL}^{-1}$ *Shewanella oneidensis* and a mixture of $10^9 \text{ cells mL}^{-1}$ *Shewanella oneidensis* with 1 mg mL^{-1} MWCNT are also reported. Data are extracted from a global distribution in volume and apparent diameter are the one of D50 with its interquartile range (IQR). The isoelectric point of the six cytochromes is indicated in (A) as triangles.

The experiments were then performed in the presence of *S. oneidensis* MR1 cells (Figure III.1B). The apparent diameter of the bacterial cell is $1.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$. This size is consistent with the global length and diameter of *S. oneidensis* MR-1, but we must do here the same comment as for MWCNT, *i.e.* DLS measurement provides in that case an average size of the hydrodynamic diameter of bacterial cells and does not reflect perfectly their shape (300-500 nm diameter and 1-3 μm length). Mixing *S. oneidensis* MR-1 and MWCNT leads to a slightly lower diameter, $1.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$, which is consistent with an unsuccessful self-assembly of bacteria with MWCNT alone. The introduction of cytochromes leads to increasing average apparent diameter. With $c_3\text{Dg}$ (pI = 5) and $c_3\text{DdN}$ (pI = 7), the average

apparent diameters were only slightly increased, $2.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$ and $2.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$, respectively. The presence of protein with low pI (5 and 7) can thus induce additional interactions between *S. oneidensis* MR-1 and MWCNT, but this effect is limited, and the variations of size are comprised within the typical error of the measurement. In the presence of cytochrome having higher isoelectric point, the increase of apparent was significant, up to $6.2 \pm 2.5 \mu\text{m}$ with $c_{553}\text{DvH}$. This value is close to the size observed with cytochrome c_1 from bovine heart, *i.e.* $6.3 \pm 2.1 \mu\text{m}$. The global charge of the protein is thus critical to induce an efficient self-assembly between MWCNT and *S. oneidensis* MR-1. The smaller size, *i.e.* $5.1 \pm 2.2 \mu\text{m}$, observed with $c_3\text{DvH}$ having the highest isoelectric point, suggests that the charge of the protein is not the only parameter to influence its interaction with bacteria and CNT. Charge anisotropy has been observed in $c_3\text{DvH}$ that could be not so favorable to the self-assembly. In the present state of these experimental investigations, and taking into account previous observations with bovine serum albumin [34], we think that electrostatic interactions is the main driving force that induce the self-assembly of MWCNT with *S. oneidensis* MR-1 in the presence of cytochromes, but contributions from other forces (hydrophobic and van der Waals forces, hydrogen bonding) cannot be excluded.

Table III.2. Suspensions compositions and size distribution diagrams determined by dynamic light scattering of a 1 mM KCl solution after 2 h at room temperature. Data are extracted from a global distribution in volume and the apparent diameter is the D_{50} value with its interquartile range (IQR).

Composition of the suspension	Apparent diameter μm
CNT	0.3 ± 0.1
CNT and $c_7\text{Da}$	1.4 ± 0.3
CNT and $c_{553}\text{DvH}$	1.3 ± 0.4
CNT and $c_3\text{DvH}$	1.1 ± 0.3
CNT and c_1	1.5 ± 0.3

CNT and c_3Dg	0.4 ± 0.1
CNT and c_3DdN	0.3 ± 0.1
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1	1.6 ± 0.3
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1 and MWCNT	1.3 ± 0.4
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1, MWCNT and c_7Da	6.1 ± 2.7
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1, MWCNT and $c_{553}DvH$	6.2 ± 2.5
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1, MWCNT and c_3DvH	5.1 ± 2.2
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1, MWCNT and c_1	6.3 ± 2.1
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1, MWCNT and c_3Dg	2.0 ± 0.5
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1, MWCNT and c_3DdN	2.0 ± 0.6

3.2. Electrochemical characterizations

We have then investigated the influence of these cytochromes on the electrochemical reduction of fumarate catalyzed by *S. oneidensis* MR-1. The redox potential of the reduction of fumarate to succinate (2 electrons) is + 30 mV versus NHE [35]. The expected redox potential of the hemes of the various cytochromes evaluated in this work are reported in Table 1, ranging from + 20 mV ($c_{553}DvH$) to - 400 mV (c_3DdN), allowing to identify the best cytochrome to transfer electrons to bacteria for fumarate reduction. We performed systematically three electrochemical experiments with these cytochromes: a cyclic voltammetry of the protein adsorbed on PG electrode, a cyclic voltammetry of the biocomposite prepared on glassy carbon with MWCNT, *S. oneidensis* MR-1 and cytochrome, following the protocol reported recently [34], in the absence and in the presence of 0.5 mM fumarate, and finally a chronoamperometric experiment performed at a potential 50 mV more negative than the potential of the cathodic peak of the cytochrome, in order to follow with time the current induced by the addition of 50 mM fumarate. Each cytochrome is considered, from the lowest to the highest isoelectric point, in the following order c_3Dg , c_3DdN , c_7Da ,

c_{553} DvH and c_3 DvH. Control experiments with cytochrome c_1 are also presented at the end of the section.

c₃ from Desulfovibrio gigas (c₃Dg), pI 5

Cytochrome c_3 from *Desulfovibrio gigas* (c_3 Dg) is a tetraheme protein with a range of potentials between - 235 and - 315 mV vs NHE [30]. The experiment performed on PG permitted to observe only one pair of redox peak, at - 370 mV and - 60 mV (vs SHE, **Figure III.2A**). Peak separation is large, which can be a consequence of the weak adsorption of c_3 Dg on PG (diffusion controlled electrochemical response). The negative charge of both protein and PG surface probably compromise their respective interaction. The biocomposite electrode with c_3 Dg, MWCNT and *S. oneidensis* is not showing any clearly defined redox peak between 0 and -400 mV (curve a of Figure III.2B), and no change of the electrochemical response could be observed after addition of 0.5 mM fumarate. The experiment performed with a carbon felt electrode allows in principle to increase the amount of biocomposite involved in the electrochemical experiment so as to visualize even a limited electrochemical activity. A potential of -390 mV vs NHE was applied to the electrode and 50 mM fumarate was added after 240 s at this potential. A slight increase of current was noticed. However, the current decreased after rapidly to a value close to zero.

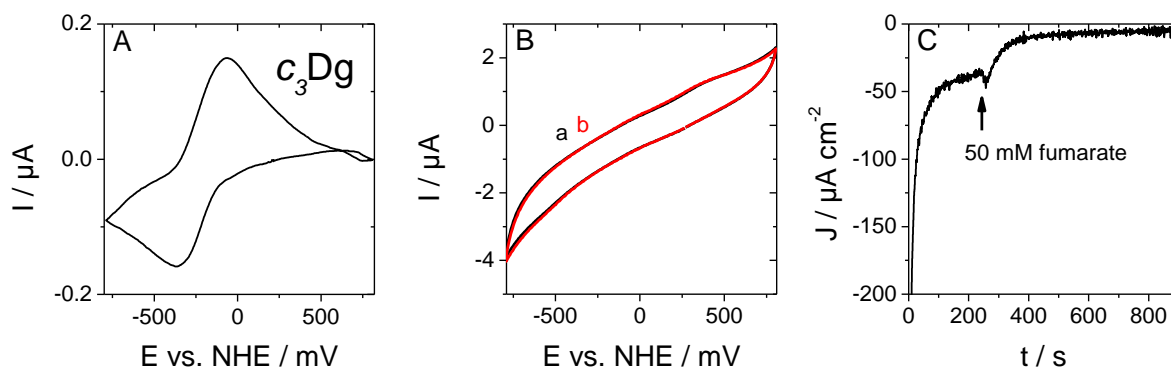


Figure III.2. (A) Cyclic voltammogram measured with cytochrome $c_3\text{Dg}$ adsorbed on a PG electrode. (B) Cyclic voltammograms measured with a biocomposite deposited on glassy carbon electrode from a suspension containing 1 mg mL^{-1} MWCNT, $10^9 \text{ cell mL}^{-1}$ *Shewanella oneidensis* and 0.2 mM of cytochrome $c_3\text{Dg}$ in the absence (a) or presence (b) of 0.5 mM fumarate. (C) Amperometric current response to 50 mM fumarate measured at -390 mV vs SHE with a graphite felt electrode impregnated with 0.5 mL of same suspension as (B). Cyclic voltammetric experiments were performed at 50 mV s^{-1} . All experiments have been performed in phosphate buffer (pH 7.0) at room temperature.

*c*₃ from *Desulfovibrio desulfuricans* (*c*₃DdN), pI 7

c-type cytochrome c_3 from *Desulfovibrio desulfuricans* Norway (*c*₃DdN) is a tetraheme protein with a range of potential comprised between -165 mV and -400 mV vs SHE [29]. The characterization with PG leads to well separated redox peaks and several redox systems are observed (**Figure III.3A**) compatible with the previously determined individual redox transitions. The response of the biocomposite does not allow to identify any catalytic signal, neither on glassy carbon electrode (Figure III.3B) nor on carbon felt (Figure III.3C).

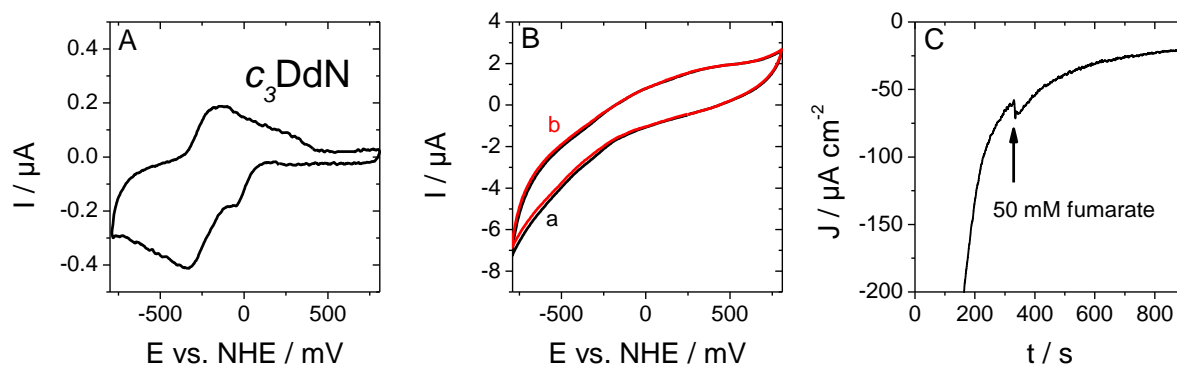


Figure III.3. (A) Cyclic voltammogram measured with cytochrome c_3 DdN adsorbed on a PG electrode. (B) Cyclic voltammograms measured with a biocomposite deposited on glassy carbon electrode from a suspension containing 1 mg mL^{-1} MWCNT, $10^9 \text{ cell mL}^{-1}$ *Shewanella oneidensis* and 0.2 mM of cytochrome c_3 DdN in the absence (a) or presence (b) of 0.5 mM fumarate. (C) Amperometric current response to 50 mM fumarate measured at -390 mV vs SHE with a graphite felt electrode impregnated with 0.5 mL of the same suspension as (B). Cyclic voltammetric experiments were performed at 50 mV s^{-1} . All experiments have been performed in a phosphate buffer (pH 7.0) at room temperature.

In conclusion, both c_3 Dg and c_3 DdN behave similarly, and cannot be used to transfer electrons in a biocomposite made of cytochrome, *S. oneidensis* and MWCNT, while the redox potential of the hemes in these cytochromes would theoretically allow electron transfer reactions to the outer membrane cytochromes of *S. oneidensis*. We think that the absence of reaction is due to the absence of self-assembly organization of these cytochromes with MWCNT and bacteria during the formation of the biocomposite.

c₇ from *Desulfuromonas acetoxidans* (*c₇Da*), *pI* 7.8

c₇Da is a triheme cytochrome purified from *Desulfuromonas acetoxidans* displaying a range of potential comprised between -140 and -240 mV vs NHE [28]. A well-defined pair of redox peak is observed at -190 mV vs NHE (curve a of **Figure III.4A**). The absence of peak separation on PG is proving the strong interaction of the positively charged *c₇Da* with the negatively-charged PG surface, leading to surface-confined electrochemical response. This interaction with PG is consistent with the interaction observed before with MWCNT (Figure

III.1A) because of similarities in surface properties between both carbon materials. The cytochrome was also detected electrochemically in the biocomposite (curve a, Figure III.4B) at the potential of -190 mV vs NHE. The addition of 0.5 mM fumarate in the solution led to a slight shift of the response towards a more negative current (curve b, Figure III.4B). This signal, that was suspected to be electrocatalytic, was then better visualized with a carbon felt electrode modified with the same biocomposite material, where an increase of current density about $36 \mu\text{A cm}^{-2}$ was being observed after addition of 50 mM fumarate (Figure III.4C). A control experiment with PG was done with $c_7\text{Da}$ in the presence of 0.5 mM fumarate (i.e. in the absence of *S. oneidensis*) and no catalytic response was observed (curve of Figure III.4A). The electrochemical response observed when fumarate was added to the solution is thus due only to the bacterial catalysis and the ability of $c_7\text{Da}$ to mediate electron transfer reaction from the electrode material to the outer membrane cytochromes from *S. oneidensis*.

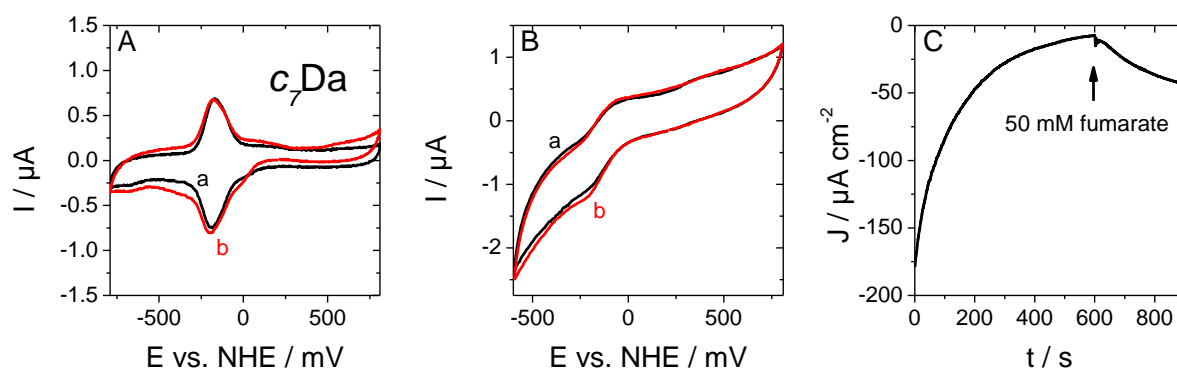


Figure III.4. (A) Cyclic voltammogram measured with cytochrome $c_7\text{Da}$ adsorbed on a PG electrode in the absence (a) or presence (b) of 0.5 mM fumarate. (B) Cyclic voltammograms measured with a biocomposite deposited on glassy carbon electrode from a suspension containing 1 mg mL^{-1} MWCNT, $10^9 \text{ cell mL}^{-1}$ *Shewanella oneidensis* and 0.2 mM of cytochrome $c_7\text{Da}$. (C) Amperometric current response to 50 mM fumarate measured at -240 mV vs SHE with a graphite felt electrode impregnated with 0.5 mL of the same suspension as (B). Cyclic voltammetric experiments were performed at 50 mV s^{-1} . All experiments have been performed in a phosphate buffer (pH 7.0) at room temperature.

*c*₅₅₃ from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*c*₅₅₃DvH), pI 8.9

c-type cytochrome 553 DvH (*c*₅₅₃DvH) is a single heme cytochrome extracted from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. It presents a potential of + 20 mV vs NHE, thus higher than *c*₇Da [32]. The electrochemical response on PG was well defined, symmetrical and centered at + 30 mV vs NHE, close to the expected value (**Figure III.5A**). Surprisingly, the electrochemical signal of this cytochrome was not clearly observed in the biocomposite electrode. Only a small signal was observed with a peak potential of -30 mV vs NHE that could be due to *c*₅₅₃DvH. No catalytic signal was observed after the addition of fumarate neither on glassy carbon electrode (curve b of Figure III.5B) nor with carbon felt (Figure III.5C). We interpret this absence of response to a denaturation of the cytochrome in the biocomposite that would explain the weak signal that was observed, or to the too positive potential that would not allow electron transfer reactions to outer-membrane cytochrome *c* from *S. oneidensis* (see section 3.3. for a detailed discussion).

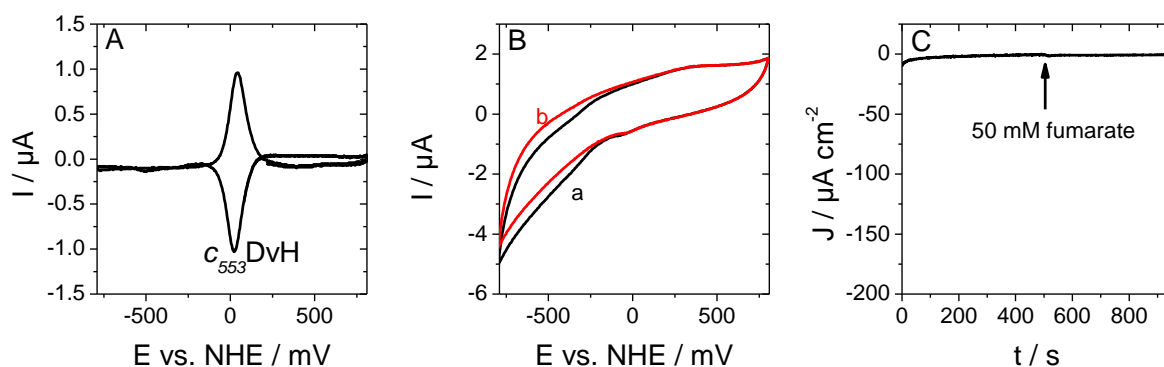


Figure 5. (A) Cyclic voltammogram measured with cytochrome *c*₅₅₃DvH adsorbed on a PG electrode. (B) Cyclic voltammograms measured with a biocomposite deposited on glassy carbon electrode from a suspension containing 1 mg mL⁻¹ MWCNT, 10⁹ cell mL⁻¹ *Shewanella oneidensis* and 0.2 mM of cytochrome *c*₅₅₃DvH in the absence (a) or presence (b) of 0.5 mM fumarate. (C) Amperometric current response to 50 mM fumarate measured at -80 mV vs SHE with a graphite felt electrode impregnated with 0.5 mL of the same suspension as (B). Cyclic voltammetric experiments were performed at 50 mV s⁻¹. All experiments have been performed in a 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) at room temperature.

*c*₃*Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*c*₃*DvH*), *pI* 10.2

The final experiment of this series was done with the cytochrome *c*₃*DvH*. It is a tetraheme cytochrome with a range of potential comprised between -290 and -370 mV vs NHE [31]. The electrochemical response of the more negative heme was recovered on PG electrode (**Figure III.6A**). Moreover, the cytochrome redox response was clearly visible on the cyclic voltammogram performed with the biocomposite deposited on glassy carbon (curve a of Figure III.6B). Then, a catalytic signal was appearing after the addition of 0.5 mM fumarate (curve b of Figure III.6B). This electrocatalytic activity was confirmed on carbon felt electrode. The electrochemical response upon addition of 50 mM fumarate was measured using a similar protocol for electrode preparation as used in previous experiments, reaching 65 $\mu\text{A cm}^{-2}$ current density after 300 s (Figure III.6C). This allows to confirm that this biocomposite electrode prepared with cytochrome *c*₃*DvH* allows to achieve the highest current density of the series, slightly higher than with *c*₇*Da*.

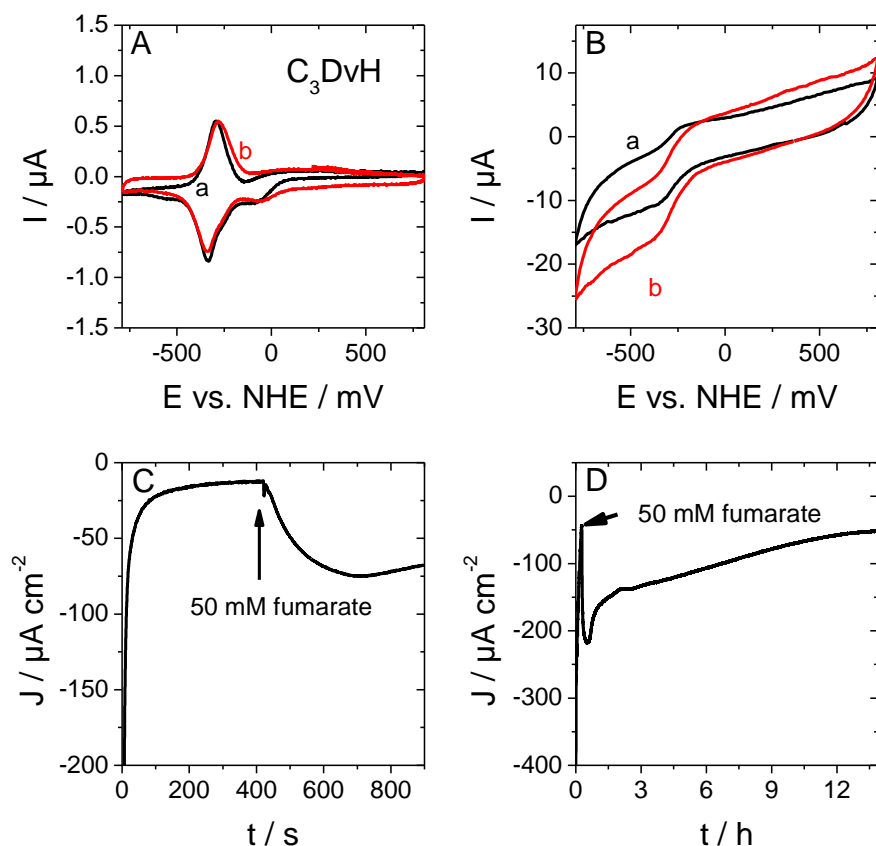


Figure III.6. (A) Cyclic voltammogram measured with cytochrome c_3 DvH adsorbed on a PG electrode in the absence (a) or presence (b) of 0.5 mM fumarate. (B) Cyclic voltammograms measured with a biocomposite deposited on glassy carbon electrode from a suspension containing 1 mg mL^{-1} MWCNT, $10^9 \text{ cell mL}^{-1}$ *Shewanella oneidensis* and 0.2 mM of cytochrome c_3 DvH in the absence (a) or presence (b) of 0.5 mM fumarate. (C&D) Amperometric current response to 50 mM fumarate measured at -390 mV vs SHE with a graphite felt electrode impregnated with (C) 0.5 mL or (D) 2 mL of the same suspension. Cyclic voltammetric experiments were performed at 50 mV s^{-1} . All experiments have been performed in a 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) at room temperature.

*c*₁ from bovine heart, pI 10-10.5

A control experiment was done with cytochrome c_1 from bovine heart. We already reported the use of this cytochrome to transfer electron from *S. oneidensis* to the electrode when formate was oxidized [34]. This electron transfer reaction was occurring at the redox potential of cytochrome c_1 . Here, c_1 was first adsorbed on PG, leading to a reversible electrochemical signal centered at 265 mV vs SHE (**Figure III.7A**), in agreement with values reported in the

literature [33,36]. The biocomposite electrode was then prepared on glassy carbon electrode (Figure III.7B). The signal from c_1 was clearly distinguished in the cyclic voltammogram. No difference in the measurement was observed before (curve a) and after (curve b) addition of 0.5 mM fumarate in the solution. Finally, the chronoamperometric measurement performed with the biocomposite deposited in carbon felt confirmed the absence of electrocatalysis with c_1 , despite the formation of the biocomposite and the electroactivity of the redox protein in the living material.

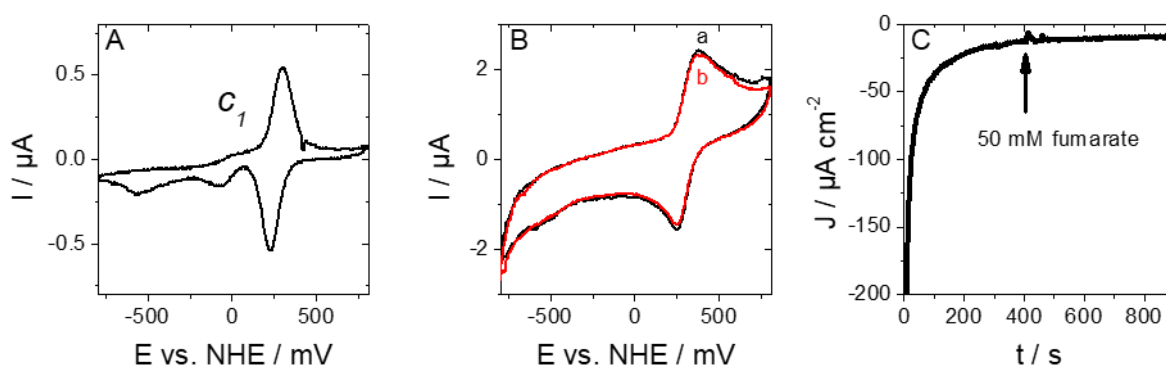


Figure III.7. (A) Cyclic voltammogram measured with cytochrome c_1 adsorbed on a PG electrode. (B) Cyclic voltammograms measured with a biocomposite deposited on glassy carbon electrode from a suspension containing 1 mg mL^{-1} MWCNT, $10^9 \text{ cell mL}^{-1}$ *Shewanella oneidensis* and 0.2 mM of cytochrome c_1 in the absence (a) or presence (b) of 0.5 mM fumarate. (C) Amperometric current response to 50 mM fumarate measured at -390 mV vs SHE with a graphite felt electrode impregnated with 0.5 mL of the same suspension. Cyclic voltammetric experiments were performed at 50 mV s^{-1} . All experiments have been performed in a 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) at room temperature.

3.3. Interaction with outer membrane cytochromes from *S. oneidensis*

Self-assembly into biocomposite was demonstrated for four cytochromes, $c_7\text{Da}$, $c_{553}\text{DvH}$, $c_3\text{DvH}$ and c_1 (Figure III.1), and assumed to be linked to favorable electrostatic interactions. However only the biocomposite obtained with $c_7\text{Da}$ and $c_3\text{DvH}$ had shown an effective EET with cathode (Figures III.4&6). Our data strongly suggest that the heme redox potential is a

crucial parameter that can be tune, by choosing the proper cytochrome, to promote EET in the biocomposite. Actually, two groups of cytochromes can be defined based on the heme redox potentials, those with lowest potentials, i.e. $c_7\text{Da}$ -140 to -240 mV and $c_3\text{DvH}$ -290 to -375 mV vs NHE, and those with highest potentials, i.e. c_1 +300 mV and $c_{553}\text{DvH}$ + 20 mV vs NHE. Endogenous outer membrane proteins, OmcA and MtrC, are decaheme cytochromes with a range of potential comprised respectively between -20 to -320 mV and +100 to -400 mV vs SHE [14]. Such a negative range of potential could then explain the inability of c_1 and $c_{553}\text{DvH}$ to participate in EET at cathode, given that they have redox potentials higher than OmcA or MtrC. Inability from $c_{553}\text{DvH}$ to participate in EET could be further explained by the range of potential of MtrA, a decaheme periplasmic cytochrome which connects in EET outer membrane cytochrome OmcA and MtrC to CymA. MtrA has a range of potential between -100 mV and -400 mV vs NHE [14]. $c_{553}\text{DvH}$ could reduce MtrC at + 20 mV but MtrC heme potential would be too high to reduce a heme from MtrA. The redox potential of exogenous cytochromes is thus a critical parameter to consider when EET with bacteria is to be optimized in artificial biofilms. This hypothesis is enforced by the highest current density observed with $c_3\text{DvH}$ (Figure III.6) that has a lower range of potential than $c_7\text{Da}$. $c_3\text{DvH}$ is in principle able to reduce more hemes from MtrC and OmcA than $c_7\text{Da}$.

3.4. Increasing the current and exploring the stability

In this section, we would like to point out some potential and an actual limit of the biocomposite used here as an artificial biofilm. The electrostatic interactions has been proposed as the driving force that contributes to the interaction of bacteria with carbon nanotubes and cytochromes. The self-assembly between particles occurs in solution before deposition of the material on the surface of an electrode. The current density can be increased by introducing the biocomposite in a porous electrode, and this has been illustrated in this work with the different cytochromes. The current density can moreover be increased by using

a larger amount of the biocomposite. It is illustrated in Figure III.6D with the cytochrome c_3DvH . By increasing 4 times the amount of composite, we were able to increase the current density by about 3 ($65 \mu A cm^{-2}$ in Figure III.6C versus $170 \mu A cm^{-2}$ in Figure III.6D). The method allows to reach rapidly a high current density when compared to natural biofilms. Figure III.6D is also showing a critical weakness of the artificial biofilm prepared here. The bioelectrode was let at $-390 mV$ vs NHE for more than 12 h. After a rapid increase of the current density upon addition of 50 mM fumarate, the current decreased by 30 % during the first hour, it started then to decrease more slowly with time. After 12 h, the current density stabilized around $50 \mu A cm^{-2}$. The initial decrease could be due to the rapid loss of cytochromes in the solution followed by slower bacterial inactivation with time. Strategies could be proposed to improve the immobilization of the redox proteins while allowing mass transfer of molecules and longer bacterial viability as it was described for example with sol-gel based biocomposites [25].

4. Conclusion

Shewanella oneidensis MR-1 was successfully assembled with MWCNT and different exogenous *c*-type cytochromes into bacterial biocomposites. Use of various exogenous *c*-type cytochromes with different isoelectric point has strengthened the hypothesis of self-assembly based on electrostatic interactions. The biocomposite formed with exogenous *c*-type cytochromes has shown an efficient electrocatalytic activity for the cathodic reduction of fumarate to succinate. This study points out the critical role of redox potential when EET in artificial biofilm is to be optimized. The highest current densities ($65 \mu A cm^{-2}$) were observed with a biocomposite prepared with cytochrome c_3DvH (pI: 10.2; E° : -290 to $-375 mV$ vs SHE) that was able to transfer electrons to hemes to MtrC (100 to $-400 mV$ vs NHE) and OmcA (20 to $-320 mV$ vs NHE) located in the outer-membrane of the bacteria. This study

shows the route to follow when cathodic current densities must be increased and paves the way for future researches that will allow the stabilization of artificial biofilms in biotechnological applications.

5. References

- [1] Gerhard Gottschalk, Bacterial metabolism, Springer-Verlag New York Inc., New York, 1985. doi:10.13140/RG.2.1.5159.5363.
- [2] D.R. Lovley, Extracellular electron transfer : wires , capacitors , iron lungs , and more, *Geobiology*. 6 (2008) 225–231. doi:10.1111/j.1472-4669.2008.00148.x.
- [3] Y. Xu, T. Zheng, X. Yong, D. Zhai, R. Si, B. Li, Y. Yu, Y. Yong, Trace heavy metal ions promoted extracellular electron transfer and power generation by *Shewanella* in microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 211 (2016) 542–547. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.144.
- [4] J. Miot, M. Etique, Formation and transformation of iron-bearing minerals by Iron(II)-oxidizing and Iron(III) -reducing bacteria, in: Damien Faivre (Ed.), *Iron Oxides From Nat. to Appl.*, First Edit, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016: pp. 53–99.
- [5] B.J. Mathis, C.W. Marshall, C.E. Milliken, R.S. Makkar, S.E. Creager, H.D. May, Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78 (2008) 147–155. doi:10.1007/s00253-007-1266-4.
- [6] Z. He, H. Shao, L.T. Angenent, Increased power production from a sediment microbial fuel cell with a rotating cathode, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 3252–3255. doi:10.1016/j.bios.2007.01.010.
- [7] H.J. Kim, H.S. Park, M.S. Hyun, I.S. Chang, M. Kim, B.H. Kim, A mediator-less

- microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*, *Enzyme Microb. Technol.* 30 (2002) 145–152. doi:10.1016/S0141-0229(01)00478-1.
- [8] S. Pinck, F.P.A. Jorand, M. Etienne, Electrochemistry of biofilms, in: *Encycl. Interfacial Chem. Surf. Sci. Electrochem.*, 2017. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.13805-3.
- [9] K.J.J. Steinbusch, H.V.M. Hamelers, J.D. Schaap, C. Kampman, C.J.N. Buisman, Bioelectrochemical ethanol production through mediated acetate reduction by mixed cultures, *Environ. Sci. Technol.* (2010) 513–517.
- [10] R.A. Rozendal, A.W. Jeremiase, H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, Hydrogen production with a microbial biocathode, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 629–634.
- [11] A. Al-mamun, M.S. Baawain, F. Egger, A.H. Al-Muhtaseb, H.Y. Ng, Optimization of a baffled-reactor microbial fuel cell using autotrophic denitrifying bio-cathode for removing nitrogen and recovering electrical energy, *Biochem. Eng. J.* 120 (2017) 93–102. doi:10.1016/j.bej.2016.12.015.
- [12] H. Luo, W. Teng, G. Liu, R. Zhang, Y. Lu, Sulfate reduction and microbial community of autotrophic biocathode in response to acidity, *Process Biochem.* (2016) 8–15. doi:10.1016/j.procbio.2016.12.025.
- [13] L. Shi, T.C. Squier, J.M. Zachara, J.K. Fredrickson, Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter* : a key role for multiheme c -type cytochromes, *Mol. Microbiol.* 65 (2007) 12–20. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05783.x.
- [14] L. Shi, K.M. Rosso, T.A. Clarke, D.J. Richardson, J.M. Zachara, J.K. Fredrickson, Molecular underpinnings of Fe(III) oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1, *Front. Microbiol.* 3 (2012) 1–10. doi:10.3389/fmicb.2012.00050.

- [15] L. Shi, B. Chen, Z. Wang, D.A. Elias, M.U. Mayer, Y.A. Gorby, S. Ni, B.H. Lower, D.W. Kennedy, D.S. Wunschel, H.M. Mottaz, M.J. Marshall, E.A. Hill, A.S. Beliaev, J.M. Zachara, J.K. Fredrickson, T.C. Squier, Isolation of a high-affinity functional protein complex between OmcA and MtrC : two outer membrane decaheme c -type cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 4705–4714. doi:10.1128/JB.01966-05.
- [16] D. Coursolle, J.A. Gralnick, Reconstruction of extracellular respiratory pathways for iron(III) reduction in *Shewanella oneidensis* strain MR-1, *Front. Microbiol.* 3 (2012) 1–11. doi:10.3389/fmicb.2012.00056.
- [17] D.E. Ross, J.M. Flynn, D.B. Baron, J.A. Gralnick, D.R. Bond, Towards electrosynthesis in *Shewanella* : energetics of reversing the Mtr pathway for reductive metabolism, *PLoS One.* 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0016649.
- [18] S.E. Barchinger, S. Pirbadian, C. Sambles, C.S. Baker, K.M. Leung, N.J. Burroughs, M.Y. El-Naggar, J.H. Golbeck, Regulation of gene expression in *Shewanella oneidensis* MR-1 during electron acceptor limitation and bacterial nanowire formation, *Appl. Environ. Microbiol.* 82 (2016) 5428–5443. doi:10.1128/AEM.01615-16.Editor.
- [19] N.J. Kotloski, J.A. Gralnick, Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*, *MBio.* 4 (2013) 10–13. doi:10.1128/mBio.00553-12.Editor.
- [20] S. Xu, Y. Jangir, M.Y. El-Naggar, Disentangling the roles of free and cytochrome-bound flavins in extracellular electron transport from *Shewanella oneidensis* MR-1, *Electrochim. Acta.* 198 (2016) 49–55. doi:10.1016/j.electacta.2016.03.074.
- [21] G. Reguera, R.B. Pollina, J.S. Nicoll, D.R. Lovley, Possible nonconductive role of

- Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 2125–2127. doi:10.1128/JB.01284-06.
- [22] B. Vu, M. Chen, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation, *Molecules.* 14 (2009) 2535–2554. doi:10.3390/molecules14072535.
- [23] H. Von Canstein, J. Ogawa, S. Shimizu, J.R. Lloyd, Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer □, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 615–623. doi:10.1128/AEM.01387-07.
- [24] H.R. Luckarift, S.R. Sizemore, J. Roy, C. Lau, G. Gupta, P. Atanassov, G.R. Johnson, B. Drive, T. Air, F. Base, Standardized microbial fuel cell anodes of silica-immobilized *Shewanella oneidensis*, *ChemComm.* 46 (2011) 6048–6050.
- [25] W. Ghach, M. Etienne, V. Urbanova, F.P.A. Jorand, A. Walcarius, Sol – gel based “artificial” biofilm from *Pseudomonas fluorescens* using bovine heart cytochrome c as electron mediator, *Electrochem. Commun.* 38 (2014) 71–74. doi:10.1016/j.elecom.2013.11.001.
- [26] E. Lojou, P. Bianco, M. Bruschi, Kinetic studies on the electron transfer between various c-type cytochromes and iron (III) using a voltammetric approach, *Electrochim. Acta.* 43 (1998) 2005–2013. doi:10.1016/S0013-4686(97)10124-4.
- [27] A. Scotti, W. Liu, J.S. Hyatt, E.S. Herman, H.S. Choi, J.W. Kim, L.A. Lyon, U. Gasser, A. Fernandez-Nieves, The CONTIN algorithm and its application to determine the size distribution of microgel suspensions, *J. Chem. Phys.* 142 (2015) 234905. doi:10.1063/1.4921686.
- [28] E. Lojou, P. Bianco, M. Bruschi, Kinetic studies on the electron transfer between

- bacterial c-type cytochromes and metal oxides, *J. Electroanal. Chem.* 452 (1998) 167–177. doi:10.1016/S0022-0728(98)00141-7.
- [29] P. Bianco, J. Haladjian, Current—potential responses for a tetrahemic protein: a method of determining the individual half-wave potentials of cytochrome c3 from *Desulfovibrio desulfuricans* strain Norway, *Electrochim. Acta.* 26 (1981) 1001–1004. doi:10.1016/0013-4686(81)85068-2.
- [30] V. Nivière, E.C. Hatchikian, P. Bianco, J. Haladjian, Kinetic studies of electron transfer between hydrogenase and cytochrome c3 from *Desulfovibrio gigas*. Electrochemical properties of cytochrome c3, *BBA - Bioenerg.* 935 (1988) 34–40. doi:10.1016/0005-2728(88)90105-3.
- [31] E. Lojou, P. Bianco, Electrocatalytic reduction of uranium by bacterial cytochromes: Biochemical and chemical factors influencing the catalytic process, *J. Electroanal. Chem.* 471 (1999) 96–104. doi:10.1016/S0022-0728(99)00255-7.
- [32] M.M. Correia dos Santos, P.M. Paes de Sousa, M.L. Simões Gonçalves, L. Krippahl, J.J.G. Moura, É. Lojou, P. Bianco, Electrochemical studies on small electron transfer proteins using membrane electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 541 (2003) 153–162. doi:10.1016/S0022-0728(02)01427-4.
- [33] F.L. Rodkey, E.G. Ball, Oxidation-reduction cytochrome potentials of the cytochrome c system, *J. Biol. Chem.* 182 (1950) 17–28.
- [34] S. Pinck, M. Etienne, M. Dossot, F.P.A. Jorand, A rapid and simple protocol to prepare a living biocomposite that mimics electroactive biofilms, *Bioelectrochemistry.* 118 (2017) 131–138. doi:10.1016/j.bioelechem.2017.07.010.
- [35] K. Rabaey, R.A. Rozendal, Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route

for microbial production., *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 706–16.

doi:10.1038/nrmicro2422.

- [36] X. Jiang, Z. Zhang, H. Bai, X. Qu, J. Jiang, E. Wang, S. Dong, Effect of electrode surface microstructure on electron transfer induced conformation changes in cytochrome c monitored by in situ UV and CD spectroelectrochemistry, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 61 (2005) 943–951.

doi:10.1016/j.saa.2004.05.036.

Chapitre 4. La protamine favorise les transferts directs d'électrons entre *Shewanella oneidensis* et les nanomatériaux carbonés dans un biofilm artificiel électroactif.

Au cours des chapitres précédents, nous avons montré que le biocomposite qui sert de base à la formation biofilm artificiel électroactif pouvait être efficace en termes de capacité de transferts d'électrons aussi bien vers l'anode (Chapitre 2) que de la cathode (Chapitre 3). A ce stade de l'étude, notre biocomposite était alors constitué par l'auto-assemblage de cellules de *S. oneidensis* avec des MWCNTs et du cytochrome exogène de type *c*. L'utilisation de cytochrome exogène pour améliorer les transferts d'électrons a montré qu'il représentait une contrainte dans le sens où il conditionnait la stabilité du biocomposite dans le temps (Chapitre 3). Afin de s'affranchir de cette limite, nous nous sommes proposés, dans ce chapitre, d'optimiser le biofilm artificiel où les transferts d'électrons sont directs. Le biocomposite est alors issu de l'assemblage de *S. oneidensis* toujours avec les MWCNT mais avec cette fois-ci la protamine, une protéine non électroactive contrairement au cytochrome exogène. La protamine, comme le cytochrome *c* exogène, est aussi chargée positivement à pH neutre et permet l'assemblage entre eux des éléments du biocomposite. Cet auto-assemblage a été validé en DLS et la microscopie électronique à balayage (MEB) a permis de montrer que le biocomposite déposé sur une plaque de carbone était similaire à celui formé avec les cytochromes exogènes. Une première caractérisation de sa capacité à transférer des électrons a été réalisée, à l'anode, par électrochimie. L'ampérométrie a alors montré des densités de courant de l'ordre de $0.94 \pm 0.18 \mu\text{A cm}^{-2}$. Dans le but d'amplifier les signaux redox des cytochromes membranaires de la bactérie et d'améliorer les transferts d'électrons, le composite a été déposé à l'intérieur d'un feutre de graphite. Des observations en MEB ont alors mis en évidence que le composite se déposait bien à l'intérieur du feutre. Le dépôt du composite dans le feutre permettait alors d'optimiser les transferts directs d'électrons par le caractère conducteur des fibres de graphite. Dans ces conditions, des signaux redox centrés à 150 mV vs NHE et -250 mV ont pu être observés en voltampérométrie cyclique. Ces signaux étaient cohérents avec les potentiels des cytochromes membranaires bactériens. Les feutres modifiés avec les biocomposites ont aussi permis d'obtenir en ampérométrie des densités de courant de 50 μA

cm^{-2} à l'anode lors de l'ajout de 50 mM de formiate et $380 \mu\text{A cm}^{-2}$ à la cathode lors de l'ajout de 50 mM de fumarate. Les transferts d'électrons ont pu être augmentés en saturant le feutre avec le biocomposite, permettant d'obtenir des courants catalytiques au-delà de $1,2 \text{ mA cm}^{-2}$ lors de l'ajout de 50 mM de fumarate. Les transferts d'électrons dans un tel composite étaient alors uniquement obtenus par des transferts directs. La stabilité de l'activité du biocomposite a aussi été testée et a montré un courant biotique de $175 \mu\text{A cm}^{-2}$ après 24 h de réduction de 50 mM de fumarate. D'autres nanomatériaux carbonés ont alors été testés pour optimiser les transferts d'électrons. Le biocomposite formé avec le Ketjen Black a montré les densités de courant les plus importantes, $900 \mu\text{A cm}^{-2}$, deux fois plus élevées qu'avec les nanotubes de carbone multi-parois. Enfin, le biofilm artificiel a été testé avec *Geobacter sulfurreducens* et a montré des signaux, en voltampérométrie cyclique, en accord avec les potentiels redox des cytochromes membranaires de la bactérie. Nous avons donc montré ici que l'organisation structurale des éléments du biocomposite était un aspect essentiel de l'efficacité des transferts extracellulaires d'électrons, bien plus importante que la présence de navette à électrons exogènes, rôle joué par les cytochromes *c* utilisés dans les chapitres précédents. Cette organisation 3D peut ainsi être assurée ici par des protéines comme la protamine, un rôle sans doute aussi assuré par les EPS des biofilms. Les cytochromes endogènes et membranaires de la souche bactérienne utilisée dans le biocomposite suffisent à assurer les transferts d'électrons vers les autres constituants du biocomposite.

Protamine promotes direct electron transfer reactions between *Shewanella oneidensis* and carbon nanomaterials in electroactive artificial biofilms

Abstract

Protamine promotes the self-assembly of carbon nanomaterials (MWCNT, SWCNT, graphene oxide, Ketjen black and ordered mesoporous carbon) with *S. oneidensis* in biocomposite aggregates. The deposition of these aggregates on a carbon felt electrode allows to measure remarkable current densities for the oxidation of 50 mM formate and for the reduction of 50 mM fumarate. The protamine favors close interactions between outer-membrane cytochromes and carbon nanomaterials that promotes direct electron transfer reactions. The redox potential observed for fumarate reduction was strongly affected by the nature of the carbon, half wave potential was -0.1 V vs. NHE with MWCNT and more negative at -0.22 V vs. NHE in the presence of Ketjen black. A maximum current density 12 A m^{-2} was reached with this electroactive artificial biofilm. A biotic current of 1.75 A m^{-2} was kept after 24 h of continuous reduction of fumarate.

1. Introduction

The concept to artificially reconstitute an electroactive biofilm is a recent strategy used in order to optimize electron transfer reaction and mimic natural biofilm. The artificial biofilm was illustrated with different exogenous material as iron oxide colloids [1], silica gels without [2,3] or with exogenous *c*-type cytochromes [4] and carbon nanomaterials such as graphene oxide [5,6]. Electroactive artificial biofilms provide opportunities to optimize extracellular electron transfer (EET) reactions between electroactive bacteria, such as *Shewanella*

oneidensis, and electrode materials, for both anodic [1,4] and cathodic reactions [5]. These reactions are allowed by the presence of a redox protein along the bacterial membrane known as cytochrome [8] that play a key role at the interface between the cell and its extracellular environment. EET reactions are generally categorized in two categories: (1) direct EET that is realized by direct interaction of the bacterial membrane or conductive appendages with the electrode, and (2) indirect EET that are mediated by electron shuttles [7]. Different examples of strategies to improve EET can be given here. Nakamura et al. used iron oxide colloids as electron relay with *Shewanella loihilica*, that allowed an 80-fold increase of the current delivered by the electromicrobiological device [1]. The addition of exogenous cytochromes *c* in an artificial biofilm allowed to improve 8-fold the current density [4]. Recent try with graphene oxide have allowed to enhance 24 fold the anodic current density and 75 fold the density current to the cathode [5] with the formation of a hybrid biofilm resulting from the reduction of graphene oxide by the bacteria, *S. oneidensis*. The graphene oxide was there believed to improve the direct EET.

Those artificial biofilms would greatly benefit to electrochemical bacterial devices such as microbial fuel cell (MFC), where electrons are transferred to the anode and generate energy [9,10] or sustain biosensors [11,12]. They would also benefit to microbial electrosynthesis or electrocatalysis systems where EET from cathode is driven to an electroactive biofilm, and bacteria are able to realize their catalytic activities with a current consumption. Recent studies have reported application of microbial electrochemical systems in biochemical production of ethanol or hydrogen [13,14] and to bioremediation of sulphate or nitrogen species in aqueous environment [15,16]. Those artificial biofilms would also represent an interesting tool to investigate some EET mechanisms.

Natural biofilms which grow in rich wastewater or sediment are very effective in current generation on bioanode and can be of used in biocathode. However, it takes time to

grow the mature biofilm that is able to realize the most efficient activity. Important part of this activity will rely on the secretion of mediator over the time [17]. Efficiency of electron transfer will then be limited by the low amount of secretion in natural biofilms [18]. Two pathways are then conceivable to enhance the EET: either to increase the quantity of secreted mediator in the biofilm or to conceive a biofilm independent of indirect EET. Recently, a biocomposite formed by the self-assembly of *S. oneidensis* MR-1 with multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) and exogenous *c*-type cytochromes was investigated at the anode [19] and at the cathode [20] and show promising results. However, the need for *c*-type cytochrome as electron shuttle in the biocomposite material introduce major limitations. The cytochrome must be chosen with the proper potential according to the targeted reaction, c_1 cytochrome from bovine heart was suitable for the oxidation of formate but had to be replaced by c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough for the reduction of fumarate [20]. Moreover, these cytochromes were loosely-bound to the carbon nanotubes and the bacteria constituting the biocomposite, leading to a rapid loss of electroactivity with time. It would be beneficial to establish a protocol that would promote direct EET in an electroactive artificial biofilm. In this way, outer membrane cytochromes would be directly connected to the electrode materials and a better stability of the bioelectrode would be possible. Moreover, the *Mtr* Pathway of *S. oneidensis*, composed of several membrane cytochromes, is proposed to be reversible. The direct connection of these outer-membrane cytochromes would allow both anodic and cathodic reactions with the same electroactive artificial biofilm.

In this work, a biocomposite were formed by self-assembling *S. oneidensis* MR-1 with different carbon nanomaterials and protamine, a non-electroactive protein. The system has been studied with dynamic light scattering, scanning electron microscopy, epifluorescence microscopy and electrochemistry. Both formate oxidation and fumarate reduction have been studied. Maximum current density that can achieved with the optimal system as well as the

stability of the electrocatalytic response have been studied for the reduction of 50 mM fumarate. We report efficient EET with both anode and cathode and we study the redox potential of these reactions in this electroactive artificial biofilm.

2. Experimental

2.1. Reagents

Sodium formate (GC for analysis $\geq 99\%$; MERCK), sodium fumarate dibasic (assay $\geq 99\%$; Sigma-aldrich) was used as electron acceptor for the bacterial cells. Oxidized multi-walled carbon nanotubes (MWCNT, outer diameter: 30 ± 10 nm, length: 1-5 μm) and Oxidized single-walled carbon nanotubes (SWCNT, outer diameter: 1.5 nm, length: 1-5 μm) were purchased from Nanolab. Graphene oxide (diameter: 90 ± 15 nm), ordered mesoporous carbon (cmk 3, 0.5- 5 μm) and Ketjen Black (diameter: 34 nm) were respectively purchase from GrapheneSupermarket, ACS material and AkzoNobel. Glassy carbon (SIGRADUR) was obtained from HTW Hochttemperatur-Werkstoffe GmbH (Germany) and graphite felt (GFD 4,6 E.A.) from SGL Group (Germany). The growth media were prepared from potassium chloride KCl solution ($\geq 99\%$; 1 mM, Sigma-Aldrich), trypticase soy broth (TSB, Fluka), trypticase soy agar (TSA, Fluka). 50 mM phosphate buffer was prepared from $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99.6\%$; Prolabo) and $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99\%$; Fluka). Protamine sulfate (Grade 2, Sigma-aldrich) was used in the structuration to the biocomposite. All solutions were prepared with high purity water (18 $\text{M}\Omega$ cm) from a Purelab Option water purification system (Elga LabWater, Veolia Water STI, France).

2.2. Bacterial strains and growth conditions

S. oneidensis MR-1 (ATCC 700550) was streaked on plate culture medium from glycerol stock stored at -80 °C. When needed, 0.1 mL of an overnight culture from a single colony was inoculated in 200 mL TSB and incubated at 30 °C under stirring (160 rpm) for 48 h. Bacterial

growth was measured by monitoring the optical density at 600 nm. The culture was harvested by centrifugation at 5000 g for 10 min at room temperature. The pellet was washed twice with 1 mM KCl, and then suspended in 1 mM KCl (pH=7).

2.3. Electrode preparation and characterization

The bacterial cell suspension was mixed with the stock solution of protamine sulphate (10 mg mL⁻¹) and the stock suspension of MWCNT (5 mg mL⁻¹, dispersed in water by sonication for 30 min) in order to reach a final bacterial cell concentration of 1×10^9 cell mL⁻¹, a final protamine sulphate concentration of 1 mg mL⁻¹ (or different if stated otherwise) and a final MWCNT concentration of 1 mg mL⁻¹. We did not observe an influence of the order of mixing on the experiments, however we always introduced bacteria in last step. The components of the suspension were allowed to self-assemble for 2 h. 10 μ L of the final suspension was dropped on glassy carbon electrode (GCE) and allowed to dry at 4°C for 40 min. Another method of preparation was also used to reach a higher current density. In that case, 3 mL (or different in the optimization part) of the final suspension was deposited through a graphite felt (1.32 cm² geometric surface area), prior treated by ethanol bath to be more hydrophilic. Measurements were done in an electrochemical cell containing 10 mL (CGE electrode) or 30 mL (graphite felt) of 50 mM PBS buffer (pH = 7) under stirring. In cyclic voltammetry experiments, the potential scan rate was 50 mV s⁻¹. In constant potential chronoamperometry, a potential of -390 mV vs. NHE was applied to the biocomposite electrode before addition of 50 mM fumarate in cathodic reaction. A potential of 560 mV vs. NHE was applied to the biocomposite electrode before addition of 50 mM formate in anodic reaction. The counter electrode was a platinum wire and the reference electrode was NHE.

2.4. Microscopy observation (SEM and epifluorescence)

To observe samples in epifluorescence microscopy, the LIVE/DEAD BacLight™ kit (Thermo Fischer Scientific) was used. Briefly, samples were mixed with DNA dyes SYTO 9 (1.67 μM) and propidium iodide (1.67 μM) and incubated for 15 min before filtration (on 0.22 μm membrane filters). The filtrate was afterwards dropped on microscope glass slide and observed with an epifluorescence microscope (OLYMPUS BX51) with a magnification factor 1000. Samples analysed by scanning electron microscopy (SEM) were dropped on a glassy carbon plate without any further preparation, dried and then observed with a Hitachi S-4800 SEM at an acceleration voltage of 1 kV.

2.5. Dynamic Light scattering

A Malvern Zetasizer 3000 HSa instrument was used to measure the size of particles in water by dynamic light scattering (DLS). Laser light was from a Helium-Neon laser with 5 mW of output power at 633 nm, and the scattered light was detected at 90°. The sample was introduced in a flow-through cell thermostated at 25°C. All the measurements were performed under suitable conditions by systematically diluting 50 times the samples with pure water in order not to saturate the detector, given the nature of aggregates. Water was first filtered with a mixed cellulose ester (surfactant-free) filter (0.45 μm of porosity). The attenuator (diaphragm) of the photomultiplier was automatically adapted for each sample in order to not saturate the detector. The data were analysed by the CONTIN method [23]. Data are extracted from a global distribution in volume and the apparent diameter is the D_{50} value with its interquartile range (IQR).

3. Results

3.1. Self-assembly of *S. oneidensis* MR-1 with MWCNT and protamine

A biocomposite was designed by the self-assembly of protamine (1 mg mL^{-1} protamine sulfate) with *S. oneidensis* MR-1 (10^9 cell mL^{-1}) and MWCNT (1 mg mL^{-1}).

Protamine has a recognized biocide effect on bacteria [21] but it was used at concentration lower than the microbial biocide concentration ($< 4 \text{ mg mL}^{-1}$). As in the previous works, the aggregation phenomenon was characterized with the help of DLS that allows to get an average size of particles in suspension. The D_{50} represent here the median value of the particle size. **Figure IV.1A** report the DLS distribution graph obtained from the individual suspensions of MWCNT (blue curve) and bacteria (red curve) and from the suspension containing *S. oneidensis* MR-1, MWCNT and protamine. A D_{50} of $1.6 \mu\text{m}$ with an IQR around $0.2 \mu\text{m}$ is reported with the suspension of bacteria and a D_{50} of $0.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ with the suspension of MWCNT (Fig. IV.1A). DLS distribution graph clearly show an increase of the size of particles characterized between the suspension of bacteria alone, with a D_{50} of $1.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$, and the product of the assembly of the bacteria with protamine and MWCNT, with an apparent diameter of $8 \pm 2.8 \mu\text{m}$ (Fig. IV.1.A). This increase is due to the self-assembly of bacteria with MWCNT and protamine.

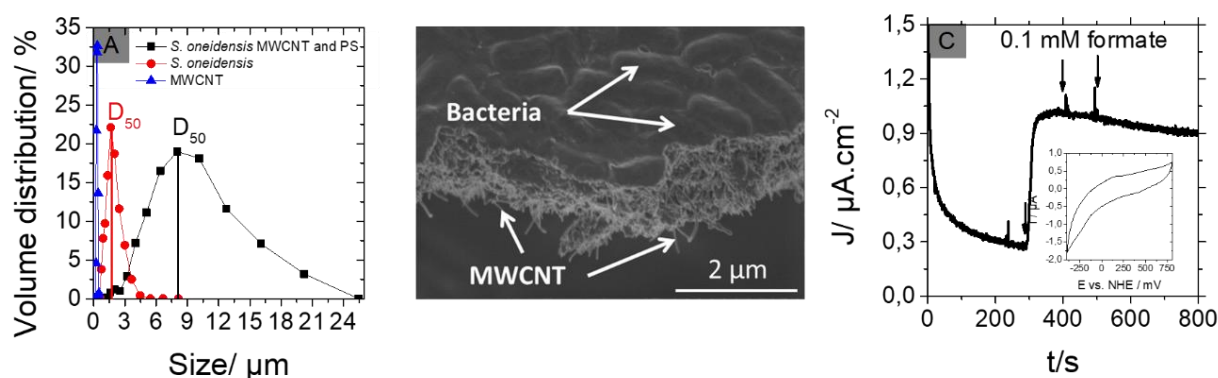


Figure IV.1. (A) Global distribution in volume determined by dynamic light scattering of a suspension containing MWCNT, *S. oneidensis* MR-1 cells or *S. oneidensis* MR-1 cells with MWCNT and protamine sulphate. (B) Scanning electron microscopy of the biocomposite layer made from *S. oneidensis* MR-1, MWCNT and protamine sulphate. Samples were dropped on a glassy carbon plate without any further preparation and observed with a Hitachi S-4800 SEM at an acceleration voltage of 1 kV. (C) Amperometric current responses to several additions (arrows) of 0.1 mM of formate measured with a glassy carbon electrode modified with the biocomposite made of *S. oneidensis* MR-1, MWCNT and protamine sulphate. Cyclic voltammogram measured with the same biocomposite.

A DLS distribution graph obtained with the suspension issued of the mix of *S. oneidensis* with MWCNT without protamine is reported in **Figure IV.2** with a D_{50} of $1.9 \pm 0.6 \mu\text{m}$. The apparent diameter recorded here is not significantly different from the one of the bacteria alone, $1.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$. The self-assembly of the bacterial cells with MWCNT particles is thus only possible when protamine is present in the solution. Those results are consistent with the hypothesis presented in the previous works [19,20] that the self-assembly is driven by electrostatic forces. At pH 7, protamine is positively charged (isoelectric point of 9.5) whereas bacterial cells and MWCNT are negatively charged. Moreover, the use of positively charged proteins to induce the aggregation of these elements find some echoes in the literature, acknowledging that bacteria can produce positively-charged EPS in order to form more efficient biofilm when interacting with negatively-charged mineral particles such as pyrite [22].

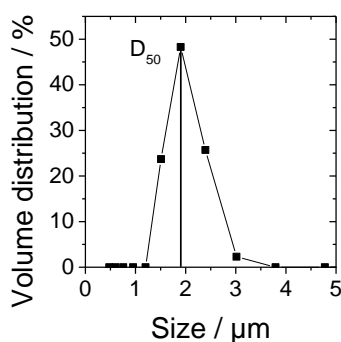


Figure IV.2. Global distribution in volume determined by dynamic light scattering with a suspension containing *S. oneidensis* MR-1 cells with MWCNT. D_{50} is presented.

The biocomposite aggregates formed by self-assembly of *S. oneidensis* MR-1 with MWCNT and protamine were then dropped on GCE plate to form the so-called artificial biofilm. This artificial biofilm was first characterized by SEM. When deposited on GCE plate, the biocomposite will formed a multilayer bacterial film with a bacterial density about 1.2

$\pm 0.2 \text{ cells cm}^{-2}$ (**Figure IV. 1B and Figure IV.3**). The appearance and the cell density are very similar to those obtained in the previous work when the protein used to structure the artificial biofilm was bovine heart cytochrome *c* (*Chapter 2*) [19].

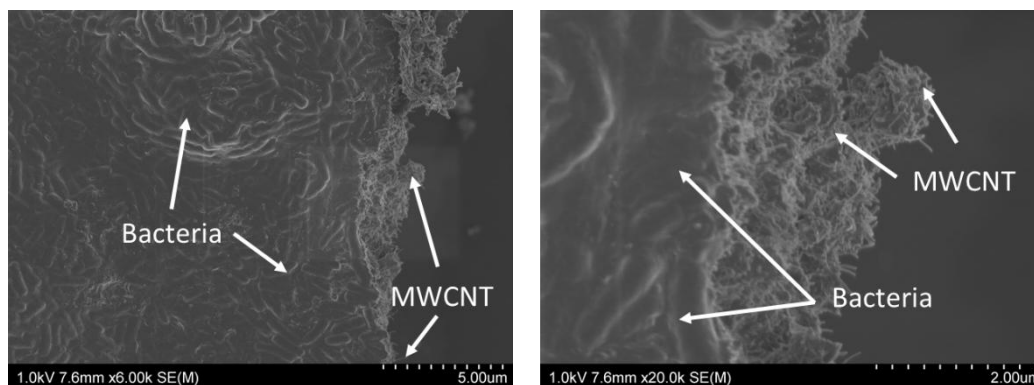


Figure IV.3. Scanning electron microscopy of the biocomposite layer made from *S. oneidensis* MR-1, MWCNT and protamine sulphate. Samples were dropped on a glassy carbon plate without any further preparation and observed with a Hitachi S-4800 SEM at an acceleration voltage of 1 kV.

This biofilm was then characterized by electrochemistry. Electron transfer were then tested on GCE plate with electrochemical analysis at the anode. A first insight was provided with cyclic voltammetry and only a poor electrochemical response with no clearly defined peaks is obtained (**See inset of Fig IV.1C**). An undefined peak could be localized at 125 mV vs. NHE but no well-defined peaks are observable. Those results are consistent with the one observed on a previous work with film constituted only with *S. oneidensis* and MWCNT[19], given the membrane cytochrome were not easily detected within the biocomposite on GCE plates. Chronoamperometric experiment was then realised to test the ability of the biocomposite to oxidize formate and to perform extracellular electron transfer reactions. A potential of 510 mV vs. NHE was set up to the electrode in order to favour electron transfers between the bacteria and the electrode. Here a current density of $1.07 \mu\text{A cm}^{-2}$ was obtained upon the successive addition of 0.1 mM formate (**Fig IV.1C**). The experiment was

reproducible with a mean current density of $0.94 \pm 0.18 \mu\text{A cm}^{-2}$ obtained from four different composite prepared with different batch of *S. oneidensis* MR-1. These electrochemical results can be then considered as limited because the CV response was poorly-defined and the measured current density was lower than the one obtained in similar conditions in the presence of cytochrome *c in place of protamine* ($2.7 \mu\text{A cm}^{-2}$ [19]), even though it could be due to the importance of indirect EET in anodic reaction [17] and therefore the absence of the exogenous electrons shuttle. In order to improve the system without the use of exogenous mediator, the biocomposite was deposited inside a carbon felt. The aim was initially to increase the current density by allowing more biocomposite, and thus more bacteria, to interact with a larger electrode surface area.

3.2. Deposition of the artificial biofilm in the carbon felt

The deposition into the carbon felt was realized by filtration across it (**Figure IV.4A**). The filtration allows to trap the biocomposite inside the carbon felt. Filtration of bacteria that were not assembled into a biocomposite with MWCNT and protamine did not result in an efficient immobilization, most of the bacteria crossing the carbon felt without being immobilized, resulting in the deposition of most of the suspension on the nitrocellulose filter (450 nm diameter) positioned behind the carbon felt. Particles of bigger size than a sole bacterium were needed to get a deposition inside the carbon felt. To confirm the deposition of the biocomposite aggregates inside the carbon felt, SEM was realized on a cross section of the electrode. Those transversal cross section showed the presence of the bacterial composite inside the carbon felt (Fig. IV.4B-E). SEM pictures show that the bacterial composite are mostly localized at the intersection between graphite fibre of the carbon felt.

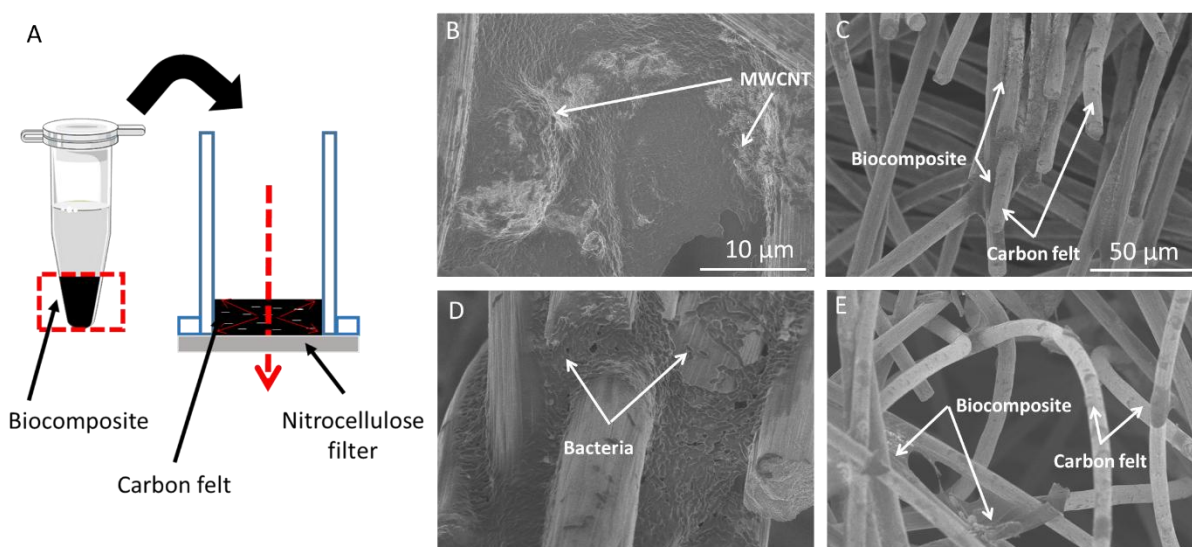


Figure IV.4. (A) Protocol for deposition of the biocomposites made of *S. oneidensis* MR-1, MWCNT and protamine sulphate inside a carbon felt. A nitrocellulose filter (0.45 μm diameter) is placed under the carbon felt to verify the success of the deposition. (B-E) Scanning electron microscopy of transversal section cross of the carbon felt modified with the biocomposite made from *S. oneidensis* MR-1, MWCNT and protamine sulphate. Samples were deposited inside the carbon felt then thin cross section were proceeded before observation without any further preparation with a Hitachi S-4800 SEM at an acceleration voltage of 1 kV.

This modified carbon felt electrode containing the bacterial composite was then tested electrochemically. Several redox peaks are observed by cyclic voltammetry (curve a of **Figure IV.5A**): the most important signals that seems to be reversible is located at 160 mV vs. NHE. Additional signals, lower in intensity, are also observed below 0 mV vs. NHE. After addition of 50 mM formate, the all voltammogram is shifted towards more positive currents (curve b), confirming the electrocatalytic activity of the bacterial biocomposite used here as electroactive artificial biofilm. Chronoamperometric measurement confirmed this catalytic activity with an increase of current density of about $50 \mu\text{A cm}^{-2}$ when 50 mM formate was added at 300 s (Fig IV.5B) with the electrode potential set up at 560 mV. The experiment was repeated with different batch of bacteria and a mean current density of $44 \pm 5 \mu\text{A cm}^{-2}$ (n=3).

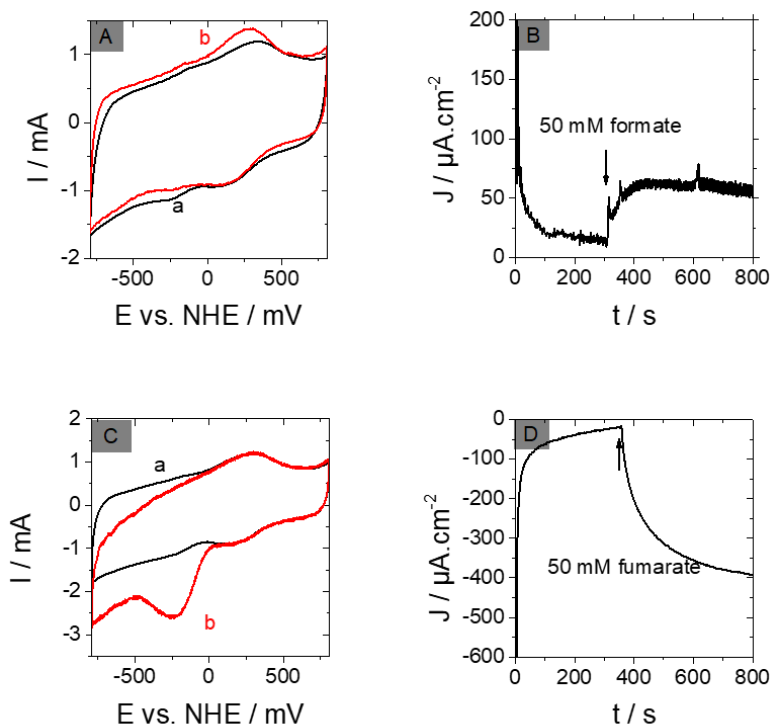


Figure IV.5. (A) Cyclic voltammograms measured with the biocomposites made of *S. oneidensis* MR-1, MWCNT and protamine sulphate deposited inside a carbon felt, in the absence (curve a) and in the presence (curve b) 50 mM of formate. (B) Amperometric current responses upon the addition of 50 mM formate measured with a carbon felt electrode modified with *S. oneidensis* MR-1, MWCNT and protamine sulphate. (C) Cyclic voltammograms measured with the biocomposites made of *S. oneidensis* MR-1, MWCNT and protamine sulphate deposited inside a carbon felt, in the absence (curve a) and in the presence (curve b) of 50 mM fumarate. (D) Amperometric current responses upon the addition of 50 mM fumarate measured with a carbon felt electrode modified with *S. oneidensis* MR-1, MWCNT and protamine sulphate. The measurements were performed in 50 mM phosphate buffer (pH 7) at room temperature. Cyclic voltammograms were obtained at 50 mV s⁻¹. Amperometric curves were recorded at 560 mV versus an NHE reference electrode in (B) and at -390 mV in (D).

The CV redox peaks and the catalytic activity were biotics as control experiments with carbon felt and MWCNT did not show any response in CV (**Figure IV.6A**) and amperometry upon the addition of 50 mM formate (Fig IV.6B).

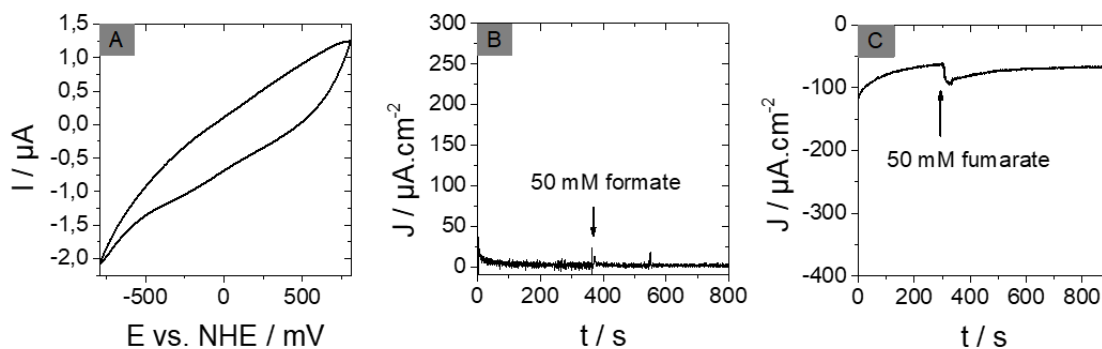


Figure IV.6. (A) Cyclic voltammograms measured with the carbon felt electrode modified with MWCNT. (B) Amperometric current responses upon the addition of 50 mM formate measured with a carbon felt electrode modified with MWCNT (C) Amperometric current responses upon the addition of 50 mM fumarate measured with a carbon felt electrode modified with MWCNT. The measurements were performed in 50 mM phosphate buffer (pH 7) at room temperature. Cyclic voltammograms were obtained at 50 mV s^{-1} . Amperometric curves were recorded at 560 mV versus an NHE reference electrode in (B) and at -390 mV in (C).

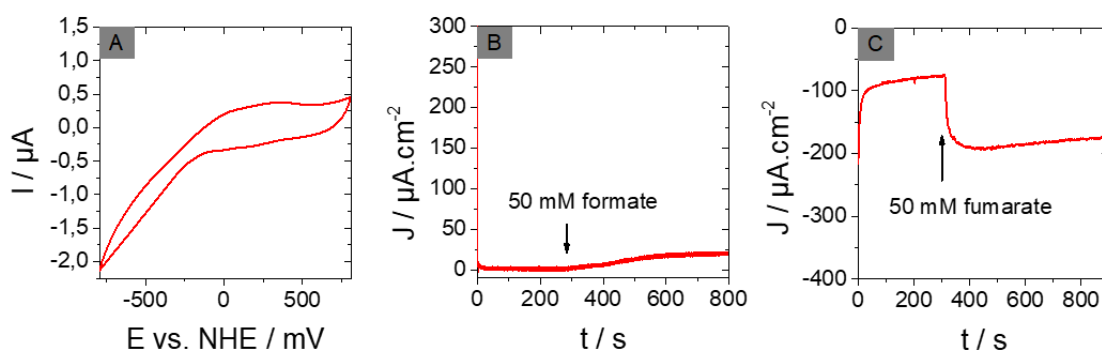


Figure IV.7. (A) Cyclic voltammograms measured with the carbon felt electrode modified with a film made of *S. oneidensis* MR-1. (B) Amperometric current responses upon the addition of 50 mM formate measured with a carbon felt electrode modified with a film made of *S. oneidensis* MR-1 (C) Amperometric current responses upon the addition of 50 mM fumarate measured with a carbon felt electrode modified with a film made of *S. oneidensis* MR-1. The measurements were performed in 50 mM phosphate buffer (pH 7) at room temperature. Cyclic voltammograms were obtained at 50 mV s^{-1} . Amperometric curves were recorded at 560 mV versus an NHE reference electrode in (B) and at -390 mV in (C).

Importance of the biocomposite was also confirmed with the CV results of carbon felt modified with the bacteria alone (**Figure IV.7A**) and bacteria in presence of protamine

(Figure IV.8A) as only low intensity redox signals were observed. In amperometry, the carbon felt electrodes modified with the bacteria alone (Figure IV.7B) or with bacteria associated with protamine (Figure IV.8B) allow current densities around $15 \mu\text{A cm}^{-2}$ upon the addition of 50 mM formate.

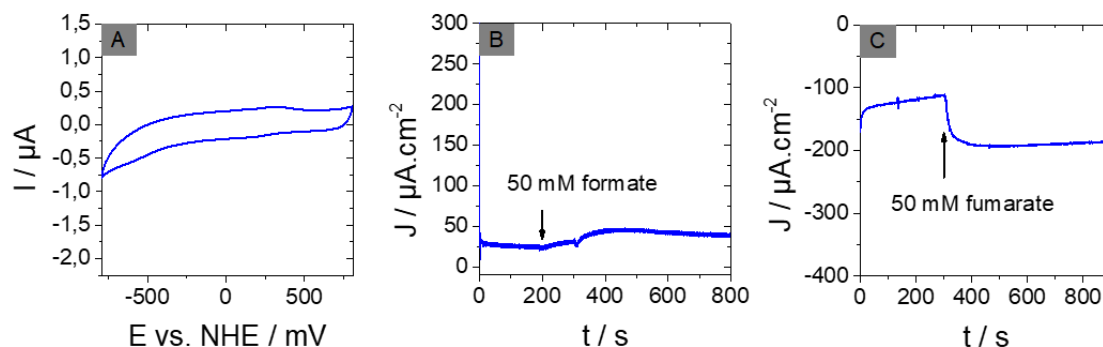


Figure IV.8. (A) Cyclic voltammograms measured with the carbon felt electrode modified with a film made of *S. oneidensis* MR-1 and protamine sulphate. (B) Amperometric current responses upon the addition of 50 mM formate measured with a carbon felt electrode modified with a film made of *S. oneidensis* MR-1 and protamine sulphate (C) Amperometric current responses upon the addition of 50 mM fumarate measured with a carbon felt electrode modified with a film made of *S. oneidensis* MR-1 and protamine sulphate. The measurements were performed in 50 mM phosphate buffer (pH 7) at room temperature. Cyclic voltammograms were obtained at 50 mV s^{-1} . Amperometric curves were recorded at 560 mV versus an NHE reference electrode in (B) and at -390 mV in (C).

The modified carbon felt electrode with bacterial composite was also investigated at the cathode. Fig. IV.5C reports a CV measurement showing similar redox peaks as reported in Fig IV.5A. Upon the addition of 50 mM fumarate, a clear catalytic response was observed at -116 mV (curve b). The electrode potential was then set at -390 mV vs. NHE in order to maximize the response in chronoamperometry. The catalytic activity was confirmed as a current density close to $400 \mu\text{A cm}^{-2}$ was generated upon the addition of 50 mM fumarate (Fig IV.5D). A mean catalytic current of $393 \pm 52 \mu\text{A cm}^{-2}$ ($n=3$) was also determined upon the repetition of the experiment with different batch of bacteria. As in the anodic reaction, control

experiments were realized showing a negligible response for the carbon felt modified with a MWCNT suspension, $8 \mu\text{A cm}^{-2}$ (Fig IV.6C), upon the addition of 50 mM fumarate and a catalytic current 5 and 4 time weaker respectively with the bacteria alone, $73 \mu\text{A cm}^{-2}$ (Fig IV.7C), and with the bacteria in presence of protamine, 118mA cm^{-2} (Fig IV.8C).

The strategy consisting of depositing the electroactive artificial biofilm within a carbon felt electrodes allowed a clear improvement in current density compare to GCE as it was expected from the larger electrode surface area given by the porous electrode. More interestingly, this electrode configuration allowed the observation of well-defined catalytic responses for the cathodic reaction. Considering that the theoretical quantity of biocomposite were the same in the experiments performed with formate and with fumarate, the difference of activity observed between the anodic reaction and the cathodic reaction can only be explained by the bacterial activity or connection. Similar observations have been done with an hybrid film constituted with reduce graphene oxide and *S. oneidensis* [23]. A hypothesis would be that direct electron transfer are more favourable to *S. oneidensis* at the cathode than at the anode but no proof nor evidence would enforce this hypothesis in the literature, given the indirect EET is considered as the major actor in EET with *S. oneidensis* [18].

3.3. Maximum current density and stability of the electrochemical response

Figure IV.9A shows the influence of the quantity of bacteria on the electrocatalytic response of the electroactive artificial biofilm. The current density increased with the quantity of composite deposited inside the carbon felt, shown here as the quantity of bacteria that was introduced. This current increased up to 1.2mA cm^{-2} in the presence of 21×10^9 cells, which we believe to be close to the saturation of the carbon felt.

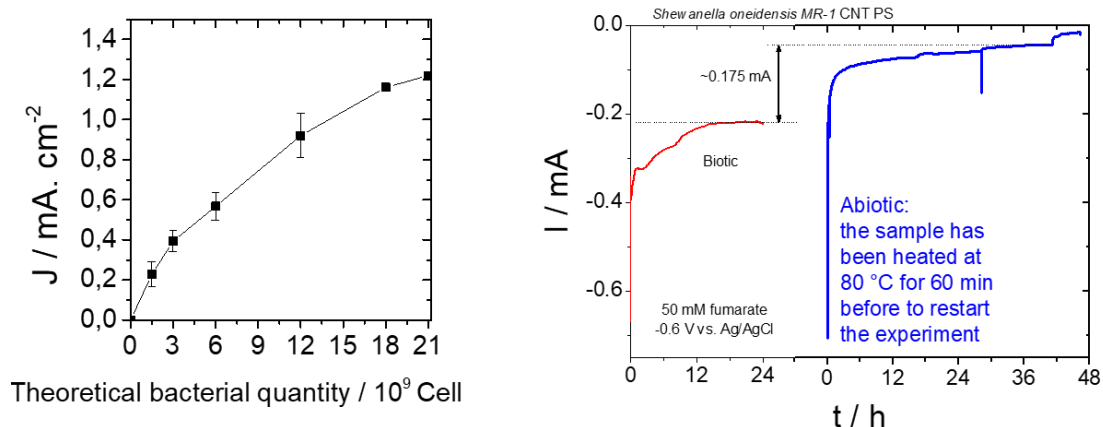


Figure IV.9. (A) Graph recapitulating the catalytic current obtained depending of the quantity of biocomposite deposited inside. The quantity of biocomposite deposited is determined by the theoretical quantity of bacterial cell present. Catalytic currents are issued from chronoamperometric experiment recorded at -390 mV vs. NHE reference electrode and performed in 50 mM phosphate buffer (pH 7) at room temperature. (B) Amperometric current responses upon the addition 50 mM of fumarate measured with a carbon felt electrode modified with *S. oneidensis* MR-1, MWCNT and protamine sulphate. The measurements were performed in 50 mM phosphate buffer (pH 7) at room temperature. Cyclic voltammograms were obtained at 50 mV s^{-1} . Amperometric curves were recorded at -390 mV versus a NHE reference electrode. The sample were heated at 80°C for 60 min at 24 h before to restart the experiment.

The stability over the time of the bacterial catalytic activity in biocomposite was also tested. Considering that the bacteria were not grown over the time in it, they were not accustomed to the system, it was then necessary to verify they were able to perform EET during at least 24 h. A chronoamperometric measurement over 24 h with the carbon felt modified with the biocomposite constituted by *S. oneidensis* MR-1 with MWCNT and protamine was realized with an electrode potential set up at -390 mV vs NHE (Fig IV.9B). 50 mM fumarate was added at the beginning of the experiment and the current was monitored with time. After 1 hours, a maximal current around -400 μA was observed. Then, the current dropped steeply to -330 μA and slowly to -225 μA over 14 h and was then stable up to 24 h. To confirm if the remaining current of -225 μA was due to the bacterial catalytic activity, the modified carbon felt was heated at 80 $^\circ\text{C}$ for 60 min in order to deactivated and kill the

bacteria inside the biocomposite. The experiment was then restarted and the current observed dropped to $-50 \mu\text{A}$. A difference of current about $175 \mu\text{A}$ was recorded that we attributed to the biotic activity. The remaining $50 \mu\text{A}$ was due to abiotic reactions occurring at -390mV vs. NHE. The loss of activity observed during the first hours could be explained by the death of bacterial population due to the toxicity of MWCNT [25] before the bacteria inside the biocomposite starts to adapt to this environment.

3.4. Optimization of artificial biofilm deposited in carbon felt.

To improve the system, we searched to replace the MWCNT by other carbon nanomaterials potentially less toxic to the bacteria while they are able to assemble with the bacteria. We tested mesoporous ordered carbon (MCO), graphene oxide (GO), ketjen black (KB) and SWCNT. The concentration chosen were the same as with MWCNT, *i.e.* 1 mg mL^{-1} . The success of self-assembly was confirmed by monitoring the size of particles formed after 2 h in suspension. First, the suspensions of carbon nanomaterials were analysed. Most of these materials have similar apparent diameters, *i.e.* $1.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ for MCO, $0.9 \pm 0.4 \mu\text{m}$ for GO and $1.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$ for KB (**Figure IV.10A**). Only SWCNT is smaller, with an apparent diameter of $0.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ close to the one of MWCNT. As for the MWCNT, the size determined here were not representative of the object as they are not spherical object but the increase of the size between the different carbon nanomaterials gave some indications about the difference of diameter and length between them. The product of the self-assembly of those different materials with *S. oneidensis* MR-1 and protamine were then investigated. The self-assembly were successful with a D_{50} of $7.7 \pm 3.5 \mu\text{m}$ for the biocomposite formed with MCO, $10.9 \pm 4.1 \mu\text{m}$ with GO, $11.5 \pm 4.4 \mu\text{m}$ with KB, $7.9 \pm 2.2 \mu\text{m}$ with SWCNT. These average size of the bacterial composite formed were not that significantly different from the one formed with MWCNT, *i.e.* $8 \pm 2.8 \mu\text{m}$ whereas the sizes particles of MCO, GO and KB were 3 to 5 time bigger than the MWCNT.

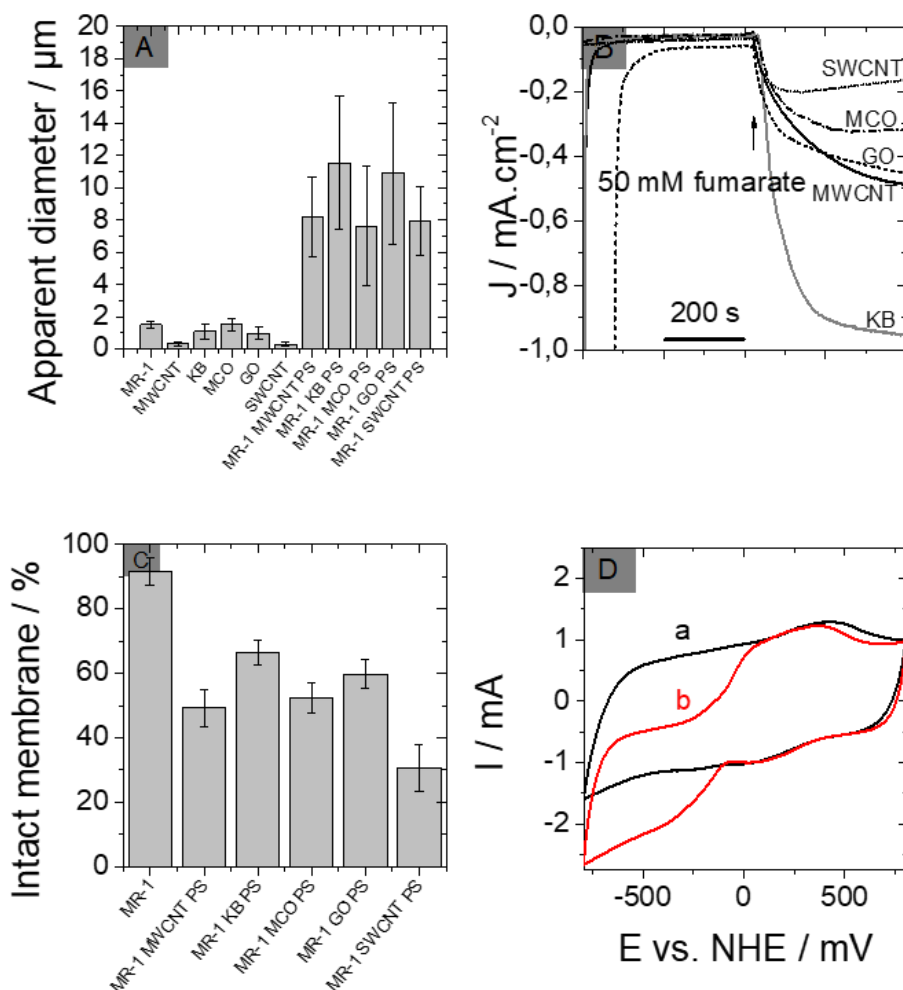


Figure IV.10. (A) Size distribution diagrams determined by dynamic light scattering of a 1 mM KCl solution after 2 h at room temperature with *S. oneidensis* MR-1, different carbon nanomaterials (MWCNT, SWCNT, KB, MCO, GO) and the biocomposite made from *S. oneidensis* MR-1, protamine sulphate (PS) and those different carbon nanomaterials. Data are extracted from a global distribution in volume and the apparent diameter is the D50 value with its interquartile range (IQR). (B) Amperometric current responses upon the addition of 50 mM fumarate measured with a carbon felt electrode modified with *S. oneidensis* MR-1, PS and different carbon nanomaterials: MWCNT, SWCNT, KB, MCO, GO. The measurements were performed in 50 mM phosphate buffer (pH 7) at room temperature. All amperometric curves were recorded at -390 mV versus a NHE reference electrode. (C) Percent of bacterial population with an intact membrane when encapsulated in a biocomposite formed with *S. oneidensis* MR-1, PS and different carbon nanomaterials: MWCNT, SWCNT, KB, MCO, GO. (D) Cyclic voltammograms measured with the biocomposites made of *S. oneidensis* MR-1, KB and protamine sulphate deposited inside a carbon felt, in the absence (curve a) and in the presence (curve b) of 50 mM fumarate. Cyclic voltammograms were obtained at 50 mV s⁻¹.

The different biocomposites were deposited inside a carbon felt and then tested electrochemically with chronoamperometry at the cathode with an electrode potential set at -390 mV vs. NHE in order to identify the best nanomaterial for the biocomposite. The lowest response was observed with SWCNT, showing a catalytic current of 110 mA cm^{-2} (Fig IV.10B) despite the presence of well-defined redox peaks in the cyclic voltammogram with this biocomposite, before and after addition of fumarate (**Figure IV.11**). This weak catalytic current, compared to the other carbon could be explained by the bacterial membrane state in the biocomposite as only $30.7 \pm 7.1 \%$ of the bacterial population kept its membrane intact (Fig IV.10C) instead of above 50% with the other carbon materials. This result was expected as SWCNTs are more toxic than other carbon nanomaterials [26].

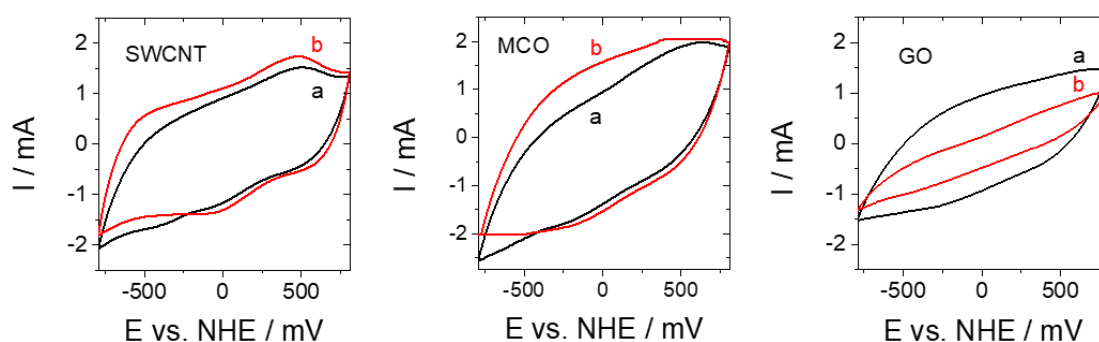


Figure IV.11. Cyclic voltammograms measured with the biocomposites made of *S. oneidensis* MR-1, PS and SWCNT; *S. oneidensis* MR-1, PS and MCO; *S. oneidensis* MR-1, PS and GO deposited inside a carbon felt, in the absence (curve a) and in the presence (curve b) of 50 mM fumarate. The measurements were performed in 50 mM phosphate buffer (pH 7) at room temperature. Cyclic voltammograms were obtained at 50 mV s^{-1} .

The biocomposite formed with GO and MCO presented a catalytic current similar to the one with MWCNT, respectively 400 and $300 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ (Fig IV.10B) upon the addition of 50 mM fumarate, but the CV response were rather poorly-defined with no clear catalytic response upon addition of fumarate (Fig IV.11). Moreover, the CV response are strongly changed between first and second CV, indicating that these biocomposites are less stable than

the one prepared with MWCNT. The viability of bacteria, assessed by the state of their membrane, in the biocomposite do not help here to explain the difference of electrocatalytic responses as the bacterial population did not show significant differences with the BacLight the live/dead® *bacLight*TM viability experiment, as 52.3 ± 4.7 % of bacterial population kept their membrane integrity with MCO instead of 59.8 ± 4.3 % with GO (Fig IV.10C). The biocomposite formed with KB showed the more interesting result with an electrocatalytic current close to $900 \mu\text{A cm}^{-2}$ upon the addition of 50 mM fumarate (Figure IV.10B) and a well-defined response in cyclic voltammetry (Figure IV.10C) with a catalytic signal around -230 mV vs. NHE, 100 mV more negative than with MWCNT. However, the catalytic current was here 2-fold higher than the one obtained with a biocomposite formed with MWCNT (Fig. IV.10B). A possible explanation could be the viability of the bacteria in the system, as shown in a previous work, the structuration in the biocomposite only limit partially the cytotoxicity of MWCNT [19]. To asses it, the viability of bacteria was investigated by verifying the membrane integrity of the bacteria inside the biocomposite. 66.3 ± 3.8 % of the bacterial population in the composite formed with KB kept their membrane intact whereas only 49.3 ± 5.6 % kept it with the composite formed with MWCNT (Fig IV.10C). This difference could be then explained by an observation often noted in the literature, the the lower is the size of the carbon nanomaterials, the higher is its toxicity [25].

4. *G. sulfurreducens* into the biocomposite with MWCNT and protamine sulphate

In a tentative to extend this optimal system to other bacteria, *G. sulfurreducens* PCA was assembled into a biocomposite instead of *S. oneidensis* MR-1. An electrochemical investigation was conducted with CV. An interesting redox peak was then observed, centered around -10 mV vs. NHE (**Figure IV.12**). More experiment need there to be conducted with these bacteria. But the potential of the redox species present on it would allow to realize reduction of fumarate at a higher potential than *S. oneidensis*.

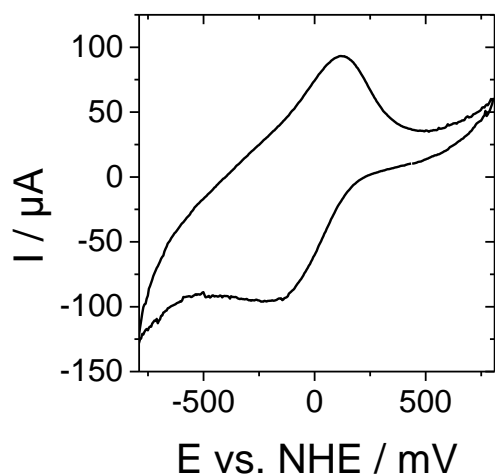


Figure IV.12. Cyclic voltammogram measured with the carbon felt electrode modified with a biocomposite made of *G. sulfurreducens* PCA, PS and MWCNT. The measurements were performed in 50 mM phosphate buffer (pH 7) at room temperature. Cyclic voltammograms were obtained at 50 mV s^{-1} .

5. Conclusion

A biocomposite between *S. oneidensis* and MWCNT was designed with the help of protamine as organizing agent. The electrochemical response of the electroactive artificial biofilm was improved when the biocomposite was deposited inside a carbon felt, leading to a current density higher than 1.2 mA cm^{-2} . Evidence of direct electron transfer is shown. Experiment with different carbon nanomaterials have shown the possibility to “tune” the properties of the artificial biofilm in order to lower the redox potential for electrocatalytic reduction of fumarate or to maximize the current density. The outlook of this research is the application of this protocol to other bacteria, such as *G.sulfurreducens*.

5. References

- [1] R. Nakamura, F. Kai, A. Okamoto, G.J. Newton, K. Hashimoto, Self-constructed electrically conductive bacterial networks, *Angew. Chem. Int.* 48 (2009) 508–511.

doi:10.1002/anie.200804750.

- [2] H.R. Luckarift, S.R. Sizemore, J. Roy, C. Lau, G. Gupta, P. Atanassov, G.R. Johnson, B. Drive, T. Air, F. Base, Standardized microbial fuel cell anodes of silica-immobilized *Shewanella oneidensis*, *ChemComm*. 46 (2011) 6048–6050.
- [3] W. Ghach, M. Etienne, P. Billard, F.P.A. Jorand, A. Walcarius, Electrochemically assisted bacteria encapsulation in thin hybrid sol–gel film, *J. Mater. Chem. B*. 1 (2013) 1052–1059. doi:10.1039/c2tb00421f.
- [4] W. Ghach, M. Etienne, V. Urbanova, F.P.A. Jorand, A. Walcarius, Sol – gel based “artificial” biofilm from *Pseudomonas fluorescens* using bovine heart cytochrome c as electron mediator, *Electrochem. Commun.* 38 (2014) 71–74.
doi:10.1016/j.elecom.2013.11.001.
- [5] Y. Yong, Y. Yu, X. Zhang, H. Song, Highly active bidirectional electron transfer by a self-assembled electroactive reduced-graphene-oxide-hybridized biofilm, *Angew. Chemie*. 53 (2014) 1–5. doi:10.1002/anie.201400463.
- [6] C. Zhao, J. Wu, Y. Ding, B. Wang, Y. Zhang, Hybrid conducting biofilm with built-in bacteria for high-performance microbial fuel cells, *ChemElectroChem*. 2014 (n.d.).
doi:10.1002/celec.201402458.
- [7] L. Shi, T.C. Squier, J.M. Zachara, J.K. Fredrickson, Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem c-type cytochromes, *Mol. Microbiol.* 65 (2007) 12–20. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05783.x.
- [8] D.R. Lovley, Extracellular electron transfer: wires, capacitors, iron lungs, and more, *Geobiology*. 6 (2008) 225–231. doi:10.1111/j.1472-4669.2008.00148.x.

- [9] H.J. Kim, H.S. Park, M.S. Hyun, I.S. Chang, M. Kim, B.H. Kim, A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium , *Shewanella putrefaciens*, *Enzym. Microb. Technol.* 30 (2002) 145–152.
- [10] Y.H. Park, G. Smith, E. Park, Mediator-less microbial fuel cell employing *Shewanella Oneidensis*, *Energy Sources, Part A Recover. Util. Environ. Eff.* 38 (2016) 1779–1784.
- [11] A. Kaur, J.R. Kim, I. Michie, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, G.C. Premier, Microbial fuel cell type biosensor for specific volatile fatty acids using acclimated bacterial communities, *Biosens. Bioelectron.* 47 (2014) 50–55. doi:10.1016/j.bios.2013.02.033.
- [12] A. Kumlanghan, J. Liu, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, B. Mattiasson, Microbial fuel cell-based biosensor for fast analysis of biodegradable organic matter, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2939–2944.
- [13] K.J.J. Steinbusch, H.V.M. Hamelers, J.D. Schaap, C. Kampman, C.J.N. Buisman, Bioelectrochemical ethanol production through mediated acetate reduction by mixed cultures, *Environ. Sci. Technol.* (2010) 513–517.
- [14] R.A. Rozendal, A.W. Jeremiase, H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, Hydrogen production with a microbial biocathode, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 629–634.
- [15] H. Luo, W. Teng, G. Liu, R. Zhang, Y. Lu, Sulfate reduction and microbial community of autotrophic biocathode in response to acidity, *Process Biochem.* (2016) 8–15. doi:10.1016/j.procbio.2016.12.025.
- [16] A. Al-mamun, M.S. Baawain, F. Egger, A.H. Al-Muhtaseb, H.Y. Ng, Optimization of a baffled-reactor microbial fuel cell using autotrophic denitrifying bio-cathode for removing nitrogen and recovering electrical energy, *Biochem. Eng. J.* 120 (2017) 93–102. doi:10.1016/j.bej.2016.12.015.

- [17] H. Von Canstein, J. Ogawa, S. Shimizu, J.R. Lloyd, Secretion of flavins by shewanella species and their role in extracellular electron transfer, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 615–623. doi:10.1128/AEM.01387-07.
- [18] Y. Yang, Y. Ding, Y. Hu, B. Cao, S.A. Rice, S. Kjelleberg, H. Song, Enhancing bidirectional electron transfer of *Shewanella oneidensis* by a synthetic flavin pathway, *ACS Synthtic Biol.* 4 (2015) 815–827. doi:10.1021/sb500331x.
- [19] S. Pinck, M. Etienne, M. Dossot, F.P.A. Jorand, A rapid and simple protocol to prepare a living biocomposite that mimics electroactive biofilms, *Bioelectrochemistry.* 118 (2017) 131–138. doi:10.1016/j.bioelechem.2017.07.010.
- [20] S. Pinck, E. Lojou, F.P.A. Jorand, M. Etienne, Influence of cytochrome charge and potential on the cathodic current of electroactive artificial biofilms, (2017).
- [21] C. Johansen, A. Verheul, L. Gram, T.O.M. Gill, Protamine-induced permeabilization of cell envelopes of gram-positive and gram-negative bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 1155–1159.
- [22] B. Vu, M. Chen, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation, *Molecules.* 14 (2009) 2535–2554. doi:10.3390/molecules14072535.
- [23] Yang-Chun Yong, Y.-Y. Yu, X. Zhang, H. Song, Highly active bidirectional electron transfer by a self-assembled electroactive reduced-graphene-oxide-hybridized biofilm, *Angew. Chem. Int.* 53 (2014) 1–5. doi:10.1002/anie.201400463.
- [24] S. Kang, M.S. Mauter, Physicochemical determinants of multiwalled carbon nanotube bacterial cytotoxicity, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 7528–7534.

- [25] A. Simon-deckers, S. Loo, M. Mayne-L'hermite, N. Herlin-boime, N. Menguy, C. Reynaud, B. Gouget, M. Carriere, Size-, composition- and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 8423–8429.

Chapitre 5. Discussion générale

Nous avons décrit dans cette thèse que l'assemblage des nanoparticules carbonées (par exemple les nanotubes de carbone) en présence d'une protéine « structurante » (rôle joué soit par un cytochrome de type *c* soit par la protamine) et de bactéries électroactives conduisait à des assemblages biocomposites où les réactions de transfert d'électrons étaient favorisées. Nous avons appelé ces assemblages des « biofilms artificiels électroactifs ». Il était attendu que dans ces biocomposites les nanotubes de carbone mimaient les *nanowires* produits par *S. oneidensis* MR-1 ou *Geobacter sulfurreducens* dans certaines conditions [1]. Une utilisation coordonnée de cytochromes exogènes avec ces nanotubes de carbone a été ainsi proposée pour expliquer l'efficacité du transfert indirect d'électrons qui s'est produit (chapitres 2 et 3). La protamine, non électroactive, favorisait les réactions de transfert direct d'électrons essentiellement en améliorant la structuration du biocomposite (Chapitre 4). Dans ce dernier chapitre, les mécanismes permettant la formation du matériau biocomposite, de sa structure et l'impact sur la viabilité des bactéries seront discutés. Nous discuterons également de la nature biomimétique des nanomatériaux carbonés par rapport aux *nanowires* naturels. Enfin, la nature des réactions de transfert d'électrons impliquées dans les différents systèmes étudiés, soit directe soit indirecte, et leur importance relative dans le biofilm artificiel électroactif seront discutées.

V.1. Mécanismes d'assemblage des constituants du biocomposite

Dans cette thèse, l'importance des forces électrostatiques pour la formation du biofilm artificiel a été plusieurs fois évoquée. Ce constat provient des différentes expériences menées avec des protéines présentant à pH neutre des charges différentes, *i.e.* la BSA chargée négativement (Figure II.1), la protamine chargée positivement (Figure IV.1) et les différents cytochromes de type *c* ayant des points isoélectriques compris entre 5 et 10,5 (Figure III.1). Les expériences menées avec ces protéines ont toutes confirmé que les agrégats biocomposites étaient formés seulement en présence des protéines qui étaient chargées positivement, et jamais avec celle chargées négativement ou

globalement neutre. La littérature confirme l'importance des molécules positivement chargées lorsqu'un biofilm se forme avec des particules négativement chargées, par exemple la pyrite [2]. Les forces électrostatiques, associées aux propriétés d'absorptions avec les micro-organismes des nanomatériaux carbonés quand ils sont agrégés [3-5], permettent l'assemblage du biocomposite. Cependant, la taille des agrégats varie selon les protéines utilisées (Table III.2 et Figure IV.1). Même si ces variations sont peu importantes, elles laissent penser que si les forces électrostatiques sont le moteur principal de la formation du biofilm artificiel, elles ne sont pas les seules impliquées. En présence de c_3DvH , la taille des agrégats biocomposites était estimée à $5,1 \pm 2,2 \mu\text{m}$ (Table III.2) alors que la taille de ceux formés en présence de protamine était de $8,0 \pm 2,8 \mu\text{m}$ (Figure IV.1). Si les seules forces impliquées avaient été les forces électrostatiques, la taille des agrégats formés en présence de c_3DvH aurait dû être aussi importante qu'en présence de protamine. Si le protocole de préparation des échantillons peut induire un biais avec leur dilution pour ne pas saturer le détecteur lors de l'analyse par DLS. L'assemblage du biocomposite reposant sur des liaisons faibles, il aurait plutôt tendance à normaliser les tailles des agrégats vers des valeurs plateaux, mais ici ce biais ne semble pas s'appliquer. La différence de taille des agrégats formés en présence de ces deux protéines est donc bien dépendante d'un autre paramètre influençant l'assemblage du matériau biocomposite. La littérature permet d'apporter quelques pistes dont la nature des polymères de surface de la bactérie, reconnue depuis longtemps dans la littérature pour leur importance dans les étapes d'agrégations des bactéries [6], la nature de la structure de la protéine ou encore les interactions hydrophobes pouvant intervenir avec les nanotubes de carbone.

V.2. Atténuation de la toxicité des matériaux carbonés dans le biocomposite

La structure du biocomposite obtenue par l'assemblage des bactéries avec les nanomatériaux carbonés et la protéine structurante a permis de réduire la cytotoxicité des nanomatériaux sur les bactéries (Table II.2 à 4 et Figure IV.10C). Cette atténuation a d'abord été observée avec l'assemblage des bactéries en présence de nanotubes de carbone et de cytochrome *c* exogène et a été attribuée à une organisation particulière, *i.e.* l'agrégation des nanotubes de carbone avec la protéine structurante en un treillis qui semble piéger les bactéries (Figure II.4). Il a été montré avec la Figure II.5 que les

nanotubes s'associaient aux protéines exogènes et que dans cette situation ils formaient une structure rappelant les EPS d'un biofilm naturel. Cette hypothèse est soutenue par les travaux de Liu et al. (2009) qui ont montré que la cytotoxicité des nanotubes de carbone était plus élevée dans un état dispersé qu'agrégé. La structuration des nanotubes de carbone sous l'impact de certaines protéines permettrait donc de limiter leur effet cytotoxique. La cytotoxicité des nanomatériaux carbonés sur les bactéries décrite dans la littérature repose sur une déstabilisation mécanique de la membrane bactérienne et cet effet est également rencontré pour les autres nanomatériaux carbonés testés au Chapitre 4 (Figure IV.10C) [4, 7, 8]. L'agrégation des nanotubes de carbone entre eux sous l'influence de la protéine structurante, *i.e.* la protamine ou le cytochrome *c* exogène, permettait donc de limiter cet effet car il diminuerait le nombre d'interactions délétères pour la bactérie [9] (Figure V.1A). Ces interactions délétères seraient des contacts favorisant la pénétration des nanotubes à travers la membrane bactérienne [10] (Figure V.1B). Un facteur aggravant la cytotoxicité des nanotubes de carbone serait alors le diamètre de ce dernier, un plus faible diamètre facilitant l'interaction délétère pour la cellule [10–12]. Nous observons effectivement une plus grande toxicité avec les nanotubes mono-paroi qu'avec les nanotubes multi-parois (Table II.2 à 4 et Figure IV.10C). A ce mécanisme de toxicité mécanique pourrait aussi s'ajouter un stress oxydatif [4, 9, 12] ou une toxicité due à des résidus métalliques [4, 9] présents sur les nanomatériaux carbonés. Si la littérature démontre que ces points sont négligeables dans le processus de cytotoxicité des nanotubes de carbone sur les bactéries [10], ils s'avèrent avoir leur importance pour les autres nanomatériaux carbonés [4].

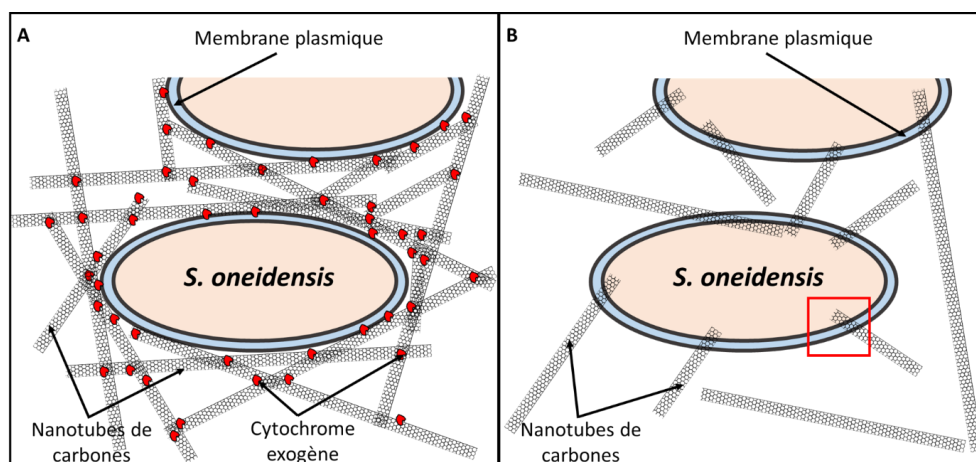


Figure V.1. A. L'agrégation des MWCNT entre eux et avec les protéines structurantes, ici les cytochromes exogènes, permet d'enrober la bactérie et limite les interactions délétères avec la bactérie.

B. Interaction délétère entre un MWCNT et une bactérie : Le MWCNT va transpercer la membrane bactérienne.

V.3. Les nanotubes de carbone : modèle artificiel de *nanowires*

Malgré leurs effets cytotoxiques, les nanomatériaux carbonés permettent de favoriser les réactions de transfert d'électrons dans le biofilm artificiel électroactif (Figure II.10, III.6 et IV.5). Initialement les nanotubes de carbone avaient été proposés afin de mimer la présence de *nanowires*, ces derniers n'étant présents chez la bactérie que lorsque les accepteurs d'électrons sont en quantité limitée [1], une condition pas toujours adéquate pour une utilisation dans un système électrochimique microbien. Dans cette optique, des nanotubes de carbone avaient été assemblés en présence de cytochromes exogènes, la littérature décrivant les *nanowires* chez *S. oneidensis* comme des extensions périplasmiques et de membranes externes de plusieurs dizaines de nanomètres de diamètre avec des cytochromes membranaires présents le long de ces dernières [1, 13]. Les nanotubes de carbone, des matériaux conducteurs ou semi-conducteurs, possèdent une forme et des dimensions rappelant les *nanowires* naturels, bien que ces derniers ne soient pas intrinsèquement conducteurs. L'extension périplasmique en elle-même n'est pas décrite comme conductrice chez *S. oneidensis*, seule la présence de cytochromes localisés tout le long du *nanowire* la rend électroactive [13]. Sur ce point, l'utilisation de nanotubes de carbone pour mimer les *nanowires* était plus cohérente avec la représentation des *nanowires* décrite chez *Geobacter sulfurreducens* [14]. Chez *G. sulfurreducens*, les *nanowires* sont des pili de type IV conducteurs qui interagissent fortement avec des cytochromes présents dans les EPS du biofilm [15]. Par rapport à ce modèle, les nanotubes de carbone utilisés possèdent un diamètre bien plus important que les pili conducteurs (une dizaine de nanomètres contre quelques nanomètres). En outre, le mécanisme précis par lequel les nanotubes de carbone améliorent les réactions de transfert d'électrons dans le biofilm artificiel reste mal défini. Dans les chapitres 2, 3 et 4, il a été montré que les nanomatériaux carbonés avaient un impact favorable sur ces réactions de transfert d'électrons. Mais il n'a pas pu être déterminé si cette amélioration était due à la conductivité des nanomatériaux carbonés ou à la meilleure structuration du biocomposite qu'ils pouvaient permettre. Il est envisageable que ces réactions de transfert d'électrons dans un tel système soient uniquement favorisées par un meilleur contact avec les bactéries. Il est à noter qu'un tel rôle ne serait pas

forcément très différent de celui des *nanowires* naturels, une fonction structurante leurs étant aussi accordée dans la littérature [15].

V.4. Les EET impliqués dans le biofilm artificiel

Cet impact des nanomatériaux carbonés sur les réactions de transfert d'électrons nous amène à une autre question : quelle est la part des transferts indirects et directs dans les différents biofilms artificiels créés ? Un des buts de notre travail était de mieux contrôler les réactions de transfert d'électrons qui ont lieu dans le biofilm artificiel, notamment en cherchant à optimiser l'un ou l'autre de ces mécanismes. Le Chapitre 2 proposait un biofilm dans lequel les réactions de transfert d'électrons étaient gouvernées par le cytochrome *c*, c'est-à-dire que ces transferts étaient indirects. La densité de courant obtenue avec un tel système était de l'ordre de $165 \mu\text{A cm}^{-2}$ rapportée à 10^9 cellules avec une électrode en feutre de graphite à l'anode (Figure II.10C). Le Chapitre 4 apporte un éclairage différent : quand une protéine non électroactive, la protamine, se substitue au cytochrome *c* qui jouait le rôle de navette à électrons, les transferts d'électrons restent néanmoins efficaces, ils sont donc en principe directs. Il était considéré alors que le lavage de la suspension bactérienne permettait d'éliminer les navettes à électrons potentiellement secrétées par la bactérie durant sa croissance et que les temps de formation du biofilm artificiel et d'expérimentation (2 h à 4 °C et environ 1 h à 24 °C dans un milieu sans nutriment et source de carbone) étaient trop court pour que la bactérie secrète ou libère des médiateurs d'électrons dans le biofilm artificiel. Les densités de courant obtenues sur feutre de graphite à l'anode étaient de l'ordre de $20 \mu\text{A cm}^{-2}$ rapportées à 10^9 cellules (Figure IV.5B). Ces valeurs sont alors 8 fois moins importantes que celles en présence de cytochrome *c*. On peut alors proposer comme hypothèse que dans le biofilm artificiel constitué de cytochrome *c*, les sept huitièmes des transferts d'électrons étaient dus à des transferts indirects (*i.e.* avec la participation du cytochrome *c* exogène) et qu'un huitième était dû à des réactions de transfert direct d'électrons (Figure V.2A). Cette hypothèse est en accord avec la littérature, où il est en effet considéré que les transferts indirects d'électrons sont prépondérants dans les biofilms [16, 17]. Néanmoins, si ces résultats sont applicables à l'anode pour le biofilm artificiel, ils ne le sont pas à la cathode. En réduction, à la cathode avec l'électrode en feutre de graphite à un potentiel de -0,6 V en présence de cytochrome exogène, un

courant catalytique de $130 \mu\text{A cm}^{-2}$ rapporté à 10^9 cellules est obtenue (Figure III.6) alors qu'en présence de protamine, un courant catalytique de $143 \mu\text{A cm}^{-2}$ rapporté à 10^9 cellules est obtenue (Figure IV.5D). Le courant généré n'est donc pas plus important avec le cytochrome exogène contrairement à ce qui a été observé précédemment pour l'anode. Les transferts directs au niveau du biocomposite à la cathode sont donc suffisants pour un transfert optimal d'électrons (Figure V.2B). Ces réactions de transfert direct d'électrons seraient permises par la proximité entre les nanotubes de carbone et le complexe Mtr de la membrane bactérienne. Ensuite, les électrons seraient transférés électriquement au travers des nanotubes de carbone.

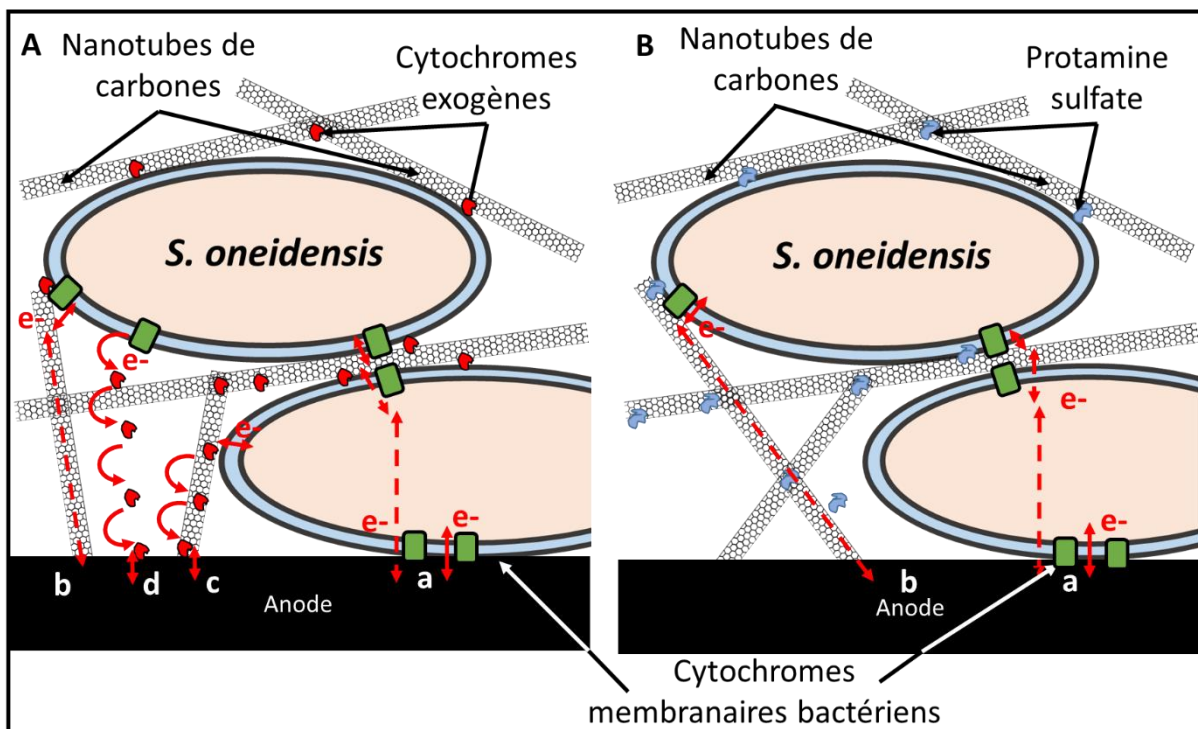


Figure V.2. Différents types de transferts d'électrons : (A), dans le biocomposite formé en présence de MWCNT, cyt *c* exogène et de *S. oneidensis* ; (B), dans le biocomposite formé en présence de MWCNT, protamine et de *S. oneidensis* avec : (a), transferts d'électrons par contact direct entre les bactéries ou avec l'électrode ; (b), à travers le MWCNT conducteur ; (c), par saut d'électrons le long des cyt *c* exogènes localisés le long du MWCNT et (d), conduit par les cyt *c* exogènes

Nous pouvons noter que le biofilm artificiel préparé avec la protamine n'est pas aussi efficace pour l'oxydation du formiate (densité de courant de $20 \mu\text{A cm}^{-2}$ rapportée à 10^9 cellules) que pour la réduction du fumarate (densité de courant de $143 \mu\text{A cm}^{-2}$ rapportée à 10^9 cellules) (Figure IV.5). Chez *S. oneidensis*, le même complexe Mtr est impliqué quel que soit le sens des transferts d'électrons [18],

il est donc contradictoire, en apparence, que les courants mesurés pour l'oxydation du formiate et pour la réduction du fumarate n'aient pas des intensités comparables. De plus, l'observation des réactions de transfert direct d'électrons à la cathode dans ce biofilm artificiel va à contrecourant des observations réalisées dans les biofilms naturels où l'on considère les transferts indirects d'électrons comme prépondérants [17].

Cependant des résultats similaires ont déjà été observés dans un biocomposite formé avec des oxydes de graphène où le courant à l'anode était deux fois moins important qu'à la cathode ($0,5 \text{ mA cm}^{-2}$ vs $0,9 \text{ mA cm}^{-2}$) et où la présence de l'oxyde de graphène permettait d'augmenter 25 fois le courant à l'anode et 75 fois à la cathode, par rapport au courant mesuré avec un biofilm témoin équivalent à l'anode comme à la cathode [19]. Dans ce biofilm hydride, les oxydes de graphène avaient aussi pour fonction de favoriser les réactions de transfert direct d'électrons. Une hypothèse envisageable pour expliquer cette différence entre processus cathodiques et anodiques serait que dans le biofilm artificiel, les réactions de transfert indirect d'électrons seraient plus favorables à *S. oneidensis* à l'anode et que les transferts directs seraient plus favorables à la cathode. Aucune donnée dans la littérature au niveau des biofilms naturels ne vient étayer une telle hypothèse. Hypothèse qui serait cependant supportée par les potentiels à demi-vague, témoin de la réaction de réduction du fumarate à la cathode par le biocomposite formé avec la protamine (Figure IV.5), à -116 mV vs NHE, comparé à celui obtenu avec le composite formé en présence de cytochrome exogène (Figure III.4&6), à -145 mV pour $c_7\text{Da}$ et à -280 mV pour $c_3\text{DvH}$. Le composite formé avec la protamine est ainsi capable de réaliser la réduction du fumarate à un potentiel redox significativement moins négatif que celui formé en présence de cytochrome exogène.

V.5. Du mimétisme des nanowires à celui du biofilm

Le biocomposite déposé sur électrode pour former un biofilm artificiel présente un certain nombre de propriétés liées à sa structure, *i.e.* ses constituants et son organisation. Cette structure est essentiellement permise entre les différents constituants du biocomposite par des forces électrostatiques, La structure formée permet de limiter assez efficacement la cytotoxicité des

nanomatériaux carbonés. Cette structure va également favoriser les réactions de transfert d'électrons. Nous avons commencé cette thèse en cherchant à mimer les *nanowires* bactériens par des nanotubes de carbone associés au cytochrome *c*. Au final, il est apparu que le cytochrome *c* n'était pas essentiel et que les nanotubes de carbone pouvaient être remplacés par d'autres nanomatériaux carbonés dont le rôle est d'établir un contact intime avec la membrane bactérienne pour favoriser les échanges directs d'électrons. Ces électrons étaient ensuite conduits électriquement vers l'électrode à travers le réseau de particules carbonées formées avec les bactéries. Ainsi, nous pourrions considérer que nous n'avons pas mimé ces *nanowires*. Cependant les nanotubes de carbone ont permis d'observer des processus de transfert direct d'électrons à un potentiel significativement plus haut que le ketjen black, signifiant là qu'ils autorisaient une interaction plus favorable avec les cytochromes bactériens. Par ailleurs, nous avons accompli l'organisation 3D des bactéries dans un matériau biocomposite, ce qui a permis de maintenir leur viabilité et leur activité métabolique. Finalement, ce sont ces derniers aspects, la viabilité et l'activité métabolique, essentiels dans les biofilms naturels, que nous avons pu favoriser dans ce biofilm artificiel électroactif, mimant ainsi ce que la nature fait depuis si longtemps dans les biofilms naturels.

V.7. Références

- 1 Barchinger S.E.,Pirbadian S.,Sambles C.,Baker C.S.,Leung K.M.,et al.(2016) Regulation of gene expression in *Shewanella oneidensis* MR-1 during electron acceptor limitation and bacterial nanowire formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(17), 5428–5443.
- 2 Vu B.,Chen M.,Crawford R.J.,& Ivanova E.P.(2009) Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14, 2535–2554.
- 3 Upadhyayula V.K.K.,Deng S.,Mitchell M.C.,& Smith G.B.(2009) Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water : A review. *Sci. Total Environ.*, 408, 1–13.
- 4 Tegou E.,Magana M.,Eleni A.,Ioannidis A.,Raptis V.,et al.(2016) Biomaterials terms of endearment : bacteria meet graphene nanosurfaces. *Biomaterials*, 89, 38–55. Elsevier Ltd.
- 5 Agarwal S.,Zhou X.,Ye F.,He Q.,Chen G.C.K.,et al.(2010) Interfacing live cells with nanocarbon substrates. *Langmuir Lett.*, 26(19), 2244–2247.
- 6 Harris R.H.,& Mitchell R.(1973) The role of polymers in microbial aggregation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 27(1), 27–50. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- 7 Kang S.,& Mauter M.S.(2008) Physicochemical determinants of multiwalled carbon nanotube bacterial cytotoxicity. *Environ. Sci. Technol.*, 42(19), 7528–7534.
- 8 Liu S.,Zeng T.H.,Hofmann M.,Burcombe E.,Wei J.,et al.(2011) Antibacterial activity of graphite , graphite oxide , graphene oxide , and reduced graphene oxide : membrane and oxidative stress. *ACS Nano*, 5(9), 6971–6980.
- 9 Deryabin D.G.,Aleshina E.S.,Vasilchenko A.S.,Efremova L. V,& Klokoval O.S.(2013) Toxicity of carbon based nanomaterials against *Escherichia coli* depends on dispersion efficacy of their water suspensions. *Nanotechnologies Russ.*, 8, 565–572.
- 10 Liu S.,Wei L.,Hao L.,Fang N.,Chang M.W.,et al.(2009) Sharper and faster “ nano darts ” kill more bacteria : a study of antibacterial pristine single-walled carbon nanotube. *ACS Nano*,

- 3(12), 3891–3902.
- 11 Kang S., Herzberg M., Rodrigues D.F., & Elimelech M. (2008) Antibacterial effects of carbon nanotubes : size does matter ! *Langmuir*, 24(16), 6409–6413.
 - 12 Simon-deckers A., Loo S., Mayne-L'hermite M., Herlin-boime N., Menguy N., et al. (2009) Size-, composition- and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward Bacteria. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 8423–8429.
 - 13 Pirbadian S., Barchinger S.E., Leung K.M., Byun H.S., Jangir Y., et al. (2014) *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *PNAS*, 111(35), 12883–12888.
 - 14 Feliciano G.T., Steidl R.J., & Reguera G. (2015) Structural and functional insights into the conductive pili of *Geobacter sulfurreducens* revealed in molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17, 22217–22226.
 - 15 Steidl R.J., Lampa-Pastirk S., & Reguera G. (2016) Mechanistic stratification in electroactive biofilms of *Geobacter sulfurreducens* mediated by pilus nanowires. *Nat. Commun.*, 7, 12217.
 - 16 Tremblay P., & Angenent L.T. (2017) Extracellular electron uptake : among autotrophs and mediated by surfaces. *Trends Biotechnol.*, 35(4), 360–371. Elsevier Ltd.
 - 17 Yang Y., Ding Y., Hu Y., Cao B., Rice S.A., et al. (2015) Enhancing bidirectional electron transfer of *Shewanella oneidensis* by a synthetic flavin pathway. *ACS Synthetic Biol.*, 4(June), 815–827.
 - 18 Ross D.E., Flynn J.M., Baron D.B., Gralnick J.A., & Bond D.R. (2011) Towards electrosynthesis in *Shewanella* : energetics of reversing the Mtr pathway for reductive metabolism. *PLoS One*, 6(2).
 - 19 Yong Y., Yu Y., Zhang X., & Song H. (2014) Highly active bidirectional electron transfer by a self-assembled electroactive reduced-graphene-oxide-hybridized biofilm. *Angew. Chemie*, 53, 1–5.

Conclusion générale

Le but de cette thèse était de réaliser un biofilm artificiel électroactif en vue d'optimiser l'activité électrocatalytique de systèmes électromicrobiologiques. Cette approche a été réalisée en élaborant le biofilm à l'aide d'un biocomposite résultant de l'assemblage de *Shewanella oneidensis* en présence de nanoparticules carbonées et d'une protéine structurante.

Dans un premier temps, un biocomposite a été obtenu par auto-assemblage des bactéries avec des nanotubes de carbones en présence de cytochromes *c* exogènes. Le dépôt de ce biocomposite sur une électrode permet alors la formation du biofilm artificiel. La structure de ce dernier, où les bactéries sont enrobées dans un treillis de nanotubes de carbone agrégés entre eux, permet de limiter la cytotoxicité des nanotubes de carbone sur les bactéries. Dans ce biofilm artificiel les courants observés par l'oxydation de 0,3 mM de formiate à l'anode sont plus importants que dans un film bactérien préparé en l'absence d'un des composants du biocomposite. Un biofilm artificiel a été préparé avec *P. fluorescens* conduisant à des courants de $0,4 \mu\text{A cm}^{-2}$, montrant que le concept pouvait être développé avec toute souche possédant des cytochromes membranaires permettant les transferts extracellulaires d'électrons. Un contrôle avec *Escherichia coli* n'a conduit à aucun courant lors de l'ajout de 1,5 mM de glucose, cette espèce ne possédant pas les cytochromes membranaires nécessaires aux transferts d'électrons à travers la membrane, vers le milieu extracellulaire. Le cytochrome *c* exogène possède donc, en plus de sa propriété structurante, un rôle de navette à électrons.

Dans un deuxième temps, nous avons optimisé ce biofilm pour la réduction du fumarate en succinate. Etant donné que le cytochrome exogène utilisé auparavant possède un potentiel redox relativement haut, il est alors nécessaire, pour une activité de transfert d'électrons du biofilm artificiel optimale à la cathode, de tester d'autres cytochromes exogènes. Nous avons travaillé avec des cytochromes d'autres micro-organismes. Ces derniers présentaient des points isoélectriques allant de 5 à 10,2 et des potentiels redox allant de -0,37 V à 0 V *vs* NHE. Ces variations permettent d'abord de valider que les forces électrostatiques sont effectivement une force motrice de l'auto-assemblage du biofilm artificiel proposé. Elles permettent ensuite de déterminer le cytochrome *c* exogène le plus

efficace pour participer aux réactions de transfert d'électrons pour la réaction choisie. Ce dernier, le cytochrome c_3DvH , a le potentiel redox le plus négatif du groupe, ce qui lui permet d'interagir électrochimiquement le plus efficacement avec les cytochromes membranaires de *S. oneidensis*. Cependant le système s'avère peu stable dans le temps, montrant les limites d'un système artificiel reposant sur des réactions de transfert indirect d'électrons avec des navettes à électrons exogènes faiblement liées aux systèmes, *i.e.* assemblées par des forces électrostatiques.

Une autre protéine que les cytochromes de type *c* est alors testée : la protamine. Cette dernière a été choisie pour sa charge positive à pH neutre et son absence d'activité électrochimique. Le biocomposite formé a une structure similaire au système précédemment formé et montre une cytotoxicité limitée pour les bactéries. Les analyses électrochimiques révèlent ensuite que les réactions de transfert direct d'électrons sont favorisées entre les bactéries et les différents nanomatériaux testés. Les optimisations alors apportées ont permis d'atteindre des courants cathodiques de plus de 12 A m^{-2} en présence de 50 mM de fumarate. Les expériences de stabilité ont ensuite montré la présence d'un courant biotique de $1,75 \text{ A m}^{-2}$ après 24 h de réduction en continu de 50 mM de fumarate en succinate par le biofilm artificiel électroactif.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses. Il faudrait tout d'abord appliquer cette approche à d'autres espèces bactériennes. Le système validé avec *S. oneidensis* a été testé avec succès avec *Pseudomonas fluorescens*. Nous souhaiterions maintenant l'appliquer à *Geobacter sulfurreducens*, l'autre grand modèle dans ce domaine de la microbiologie. Des expériences préliminaires ont été menées à ce sujet, mais en raison de la culture fastidieuse de cette souche, elles n'ont pas pu être suffisamment approfondies (Figure IV.12). Il serait aussi intéressant de l'appliquer à d'autres souches possédant des activités catalytiques à la cathode comme celles des genres *Clostridium* ou *Desulfovibrio* [1].

Ensuite, le biofilm artificiel pourrait être particulièrement profitable dans des applications biotechnologiques impliquant plusieurs espèces bactériennes. Le biofilm artificiel permettrait non seulement de faciliter l'assemblage de ces espèces en un simili biofilm, ce qui n'est pas forcément possible naturellement, mais permettrait aussi d'optimiser les réactions de transfert d'électrons.

Une troisième perspective très fondamentale est de continuer à optimiser le biofilm artificiel électroactif. Sa stabilité notamment n'est démontrée que sur une journée (Figure IV.9) Des études sur des périodes plus longues seraient donc nécessaires avant de pouvoir l'appliquer dans des processus d'électrocatalyse ou d'électrosynthèse microbienne qui nécessitent une utilisation en continue sur plusieurs semaines. Le contrôle de la souche ou des souches impliquées et la possibilité d'optimiser les transferts d'électrons, tout en permettant l'obtention rapide du système représenteraient alors des avantages significatifs pour ces domaines.

Enfin, une dernière perspective est l'utilisation de ce biofilm artificiel électroactif comme outil d'étude et de criblage. Il s'agirait d'utiliser le protocole proposé pour étudier les processus de transfert d'électrons susceptibles de se produire en présence de bactéries génétiquement modifiées ou sélectionnées. Notre outil permettrait alors de cribler des banques de souches bactériennes afin d'identifier les plus prometteuses dans des applications électromicrobiologiques données, par exemple la réduction du CO₂.

Références

- 1 Choi O., & Sang B.I. (2016) Extracellular electron transfer from cathode to microbes : application for biofuel production. *Biotechnol. Biofuels*, 9(11), 1–14.

VI. ANNEXE : Matériels et méthodes

VI.1. Espèces chimiques et biologiques

VI.1.1. Souches bactériennes

Les souches utilisées au cours de ces travaux sont *Shewanella oneidensis* MR-1, *Pseudomonas fluorescens* et *Escherichia coli*, ces trois souches appartiennent au groupe des γ -proteobactéries.

Shewanella oneidensis MR-1 (ATCC 700550) est une souche anaérobie facultative, négative à la coloration de Gram, en forme de bacille.

Pseudomonas fluorescens (CIP 69.13) est une souche aérobie, négative à la coloration de Gram, en forme de bacille et possèdent plusieurs flagelles. Ces souches proviennent de la collection américaine (ATCC, American Type Culture Collection) et de la française (CIP, Collection Institut Pasteur).

Escherichia coli CGE1 est une souche environnementale isolé d'un réseau d'eau et dans la collection du laboratoire (LCPME, Villers-les-Nancy, 54600). C'est une bactérie anaérobie facultative, négative à la coloration de Gram et en forme de bacille.

VI.1.2. Milieu de cultures

Tous les milieux de cultures utilisés ont été stérilisés par la chaleur humide (traitement par autoclave à 121°C pendant 15 min). Le tableau VI.1 décrit leur composition.

Tableau VI.1. Composition chimique des milieux de culture.

Trypticase soy broth (TSB) (Sigma-Aldrich)	Le TSB contient 17 g/L de peptone de caséine, 3 g/L de peptone de soja, 5 g/L de chlorure de sodium, 2,5 g/L d'hydrogène phosphate di potassium, 2,5 g/L de glucose pour 1 L d'eau déionisé (pH = 7,3 \pm 0,2)
Trypticase soy agar (TSA) (Sigma-Aldrich)	Le TSA contient 15 g/L de peptone de caséine, 5 g/L de

Aldrich)	peptone de soja, 5 g/L de chlorure de sodium, 15 g/ L d'agar pour 1 L d'eau déionisé (pH = 7,3 ± 0,2)
Lysogeny broth (LB) (Sigma-Aldrich)	Le LB contient 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 5 g/ L de chlorure de sodium pour 1 L d'eau déionisé (pH = 7,0 ± 0,2)
Lysogeny broth with Agar (LA) (Sigma-Aldrich)	Le LA contient 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 5 g/ L de chlorure de sodium et 15 g/L d'agar pour 1 L d'eau déionisé (pH = 7,0 ± 0,2)

VI.1.3. Nanomatériaux carbonés

Les nanomatériaux utilisés au cours de cette thèse sont : les nanotubes de carbones multi-parois (MWCNT), les nanotubes de carbones paroi unique (SWCNT), les carbones mésoporeux ordonnés (MCO), les oxydes de graphènes (GO) et le ketyen black (KB). Le Tableau VI.2 décrit leurs caractéristiques principales.

Tableau VI.2. Caractéristiques des nanomatériaux utilisés.

Produits	Abréviations	Fonctionnalisation	Pureté	Dimensions	Fournisseurs
Nanotubes de carbone multi-parois	MWCNT	-COOH	95%	Diamètre : 15 ± 5 nm 1-5 µm	nanolab
Nanotubes de carbone mono paroi	SWCNT	-COOH	95%	Diamètre : 1,5 nm 1-5 µm	nanolab
Carbones	MCO	/	/	0,5 -5 µm	ACS material

mésoporeux ordonnés					
Oxydes de graphènes	GO	/	99%	Diamètre : 90 ± 15 nm	Graphene supermarket
Ketjen black	KB	/	/	Diamètre : 34 nm	AkzoNobel

VI.1.4. Cytochromes exogènes

Les cytochromes qui ont été utilisés sont décrits dans le Tableau VI.3

Tableau VI.3. Caractéristiques des cytochromes utilisés

Acronyme	Cytochrome	pI	Nombres d'hèmes	E_{SHE} / mV	Ref.
c_7 Da	c_7 <i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	7.8	3	-140 -210 -240	[21]
c_3 DdN	c_3 <i>Desulfuvibrio desulfuricans</i> Norway (DdN)	7	4	-165 -305 -365 -400	[22]
c_3 Dg	c_3 <i>Desulfovibrio gigas</i> (Dg)	5	4	-235 -235 -305 -315	[23]
c_3 DvH	c_3 <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	10.2	4	-290	[24]

	(DvH)			-335	
				-345	
				-375	
C_{553} DvH	C_{553} <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough (DvH)	8.9	1	20	[25]
C_1	C_1 from bovine heart	10-10.5	1	254	[26]

VI.1.5. Produits chimiques

Le formiate de sodium (GC > 99% ; MERCK) et le glucose sont utilisés en tant que donneurs d'électrons pour les bactéries. Le fumarate de sodium dibasic (>99% ; Sigma-Aldrich) est utilisé en tant qu'accepteur d'électrons pour les bactéries. Les électrodes utilisées sont du carbone vitreux (SIGRADUR) obtenu de HTW Hochtemperature-Werkstoffe GmbH (Allemagne), du graphite pyrolytic (PG) obtenu de Bio-Logic SAS ou enfin du feutre de graphite (GFD 4,6 E.A.) du groupe SGL (Allemagne). Les tampons utilisés sont des tampons KCl (>99%, 1mM, Sigma-aldrich) et phosphate préparés à partir de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99.6\%$; Prolabo) and $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99\%$; Fluka). Toutes les solutions sont préparées à partir d'eau pure (18 M Ω cm) obtenue à l'aide d'un système de purification Purelab (Elga LabWater, Veolia Water STI, Antony, France).

VI.2. Préparation des suspensions de nanomatériaux

Les différents nanomatériaux carbonés ont été dispersés à une concentration de 5 mg/mL dans de l'eau déionisée pendant 30 min avant d'être utilisé pour l'auto-assemblage du biocomposite à l'exception de l'oxyde de graphène déjà en solution aqueuse.

VI.3. Electrodes

Les électrodes de carbone vitreux (GCE, 3 mm de diamètres), de graphite pyrolytic (PG, 2mm de diamètres) ou de feutre de graphite (65 mm de diamètres) ont servi d'électrodes de travail. Avant chaque mesure, les électrodes GCE sont polies avec du papier émeri 4000 puis passées aux ultrasons dans l'eau déionisé pendant 5 minutes et séchées à l'air libre.

Les électrodes en feutre de graphites ont été traitées avant chaque utilisation par un gradient décroissant d'éthanol pour nettoyer le feutre et le rendre plus hydrophile. Elles sont ensuite traitées aux ultrasons dans l'eau déionisée pendant 5 minutes avant d'être utilisées directement dans le procédé d'immobilisation du biocomposite.

La contre-électrode est un fil de platine et l'électrode de référence est du Ag/AgCl 3M KCl (Les potentiels ont été recalculés par rapport à SHE ou NHE en utilisant une équivalence de Ag/AgCl 3 M KCl + 210 mV = NHE).

VI.4. Culture des micro-organismes

S. oneidensis MR-1 et *P. fluorescens* CIP 69.13 ont été revivifiées par culture sur gélose TSA d'un stock conservé dans du glycérol à -80°C puis cultivées en bouillon (TSB) à partir d'une colonie isolée, 0,1 mL de cette culture est alors utilisée pour inoculer 200 mL de TSB, incubée à 30 °C sous agitation (160 rpm) pendant 24 h pour *P. fluorescens* et 48 h pour *S. oneidensis*. La croissance bactérienne a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 600 nm. La culture a été récupérée par centrifugation à 5000 g pendant 10 min à température ambiante (24 °C). Le culot a été lavé deux fois par une solution de KCl 1 mM puis suspendue dans KCl 1 mM avant d'être utilisée pour former le biocomposite.

E. coli CGE1 a été revivifiée par culture sur gélose LA d'un stock conservé dans du glycérol à -80°C puis cultivée en bouillon (LB) à partir d'une colonie isolée, 0,1 mL de cette culture est alors utilisée pour inoculer 200 mL de LB, incubée à 37 °C sous agitation (160 rpm) pendant 24 h. La croissance bactérienne a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 600 nm. La culture a été récupérée par centrifugation à 5000 g pendant 10 min à température ambiante (24 °C). Le culot a été lavé deux fois avec 1mM de KCl puis suspendue dans 1 mM KCl avant d'être utilisée pour former le biocomposite.

VI.5. Protocole d'assemblage du biofilm artificiel

La suspension bactérienne est mélangée avec une solution stock de cytochrome *c* (1mM ou moins dépendant du cytochrome utilisé) / protamine sulfate (10 mg mL⁻¹) et une suspension stock de

nanomatériaux carbonés (5 mg mL^{-1} , dispersés dans de l'eau pendant 30 min) dans le but d'atteindre une concentration finale en bactérie de $10^9 \text{ cell mL}^{-1}$, une concentration finale de nanomatériaux carbonés de 1 mg mL^{-1} et une concentration finale de cytochrome *c* de 0,2 mM ou de protamine sulfate de 2 mg mL^{-1} . Après 2 h de contact, le produit de l'assemblage ($10 \text{ }\mu\text{L}$) est déposé sur l'électrode GCE et laisser sécher pendant 40 min à 4°C avant d'être analysé en électrochimie. Une autre méthode de préparation consiste à filtrer 1,5 mL du produit de l'assemblage (ou un volume différent si indiqué) à travers un feutre de graphite ($1,32 \text{ cm}^2$ en aire de surface). Les mesures sont ensuite réalisées dans une cellule d'électrochimie contenant 10 mL (avec l'électrode GCE) ou 30 mL (avec le feutre de graphite) d'un tampon phosphate d'une force ionique de 50 mM à $\text{pH}=7$ sous agitation. En analyse de voltampérométrie cyclique, la vitesse de balayage est réglée à 50 mV s^{-1} . En chrono-ampérométrie, le potentiel de l'électrode est réglé vs Ag/AgCl.

VI.6. Méthodes d'analyses

VI.6.1. Voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie cyclique est une technique très utilisée en analyse électrochimique. Elle est basée sur l'application d'un potentiel variable à une électrode en contrôlant l'intensité des transferts d'électrons produits à ces potentiels. Le balayage des potentiels va s'effectuer d'abord de la valeur initiale de potentiel réglée à une valeur finale avant de se réaliser en sens inverse. Cette analyse permettra alors de localiser les potentiels d'oxydation et de réduction des espèces redox présentes sur l'électrode. Dans notre cas, cette analyse permettra de déterminer le potentiel des protéines redox présentes dans le biofilm artificiel et de déterminer à quel potentiel elles participent aux transferts d'électrons avec l'électrode. Le graphe obtenu par cette analyse est appelé voltampérogramme cyclique. Enfin les potentiels d'oxydation et de réduction des espèces redox impliqués permettent ensuite de choisir le potentiel auquel l'électrode doit être réglée pour permettre leur participation aux transferts d'électrons à l'électrode durant des réactions d'oxydations ou de réduction pendant les expérimentations de chronoampérométrie.

Dans l'exemple présenté ici, tiré du Chapitre 3, le cytochrome c_{553} DvH est testé à l'électrode en voltampérométrie cyclique. Dans un premier temps, le balayage est réalisé de -0,8 V à 0,8 V vs NHE avant d'être réalisé dans le sens inverse. Deux pics sont observables, un d'oxydation sur le balayage aller (courant positif) et un de réduction sur le balayage retour (courant négatif), Ces pics permettent de déterminer que le potentiel redox du cytochrome c_{553} DvH est à 0,02 V vs NHE (Figure VI.1). Pour permettre la participation de c_{553} DvH aux réactions à la cathode, on règlera donc le potentiel de la cathode à un potentiel plus négatif que celui de c_7 Da de manière à permettre à l'électrode de céder ses électrons à c_{553} DvH et donc de réduire c_{553} DvH.

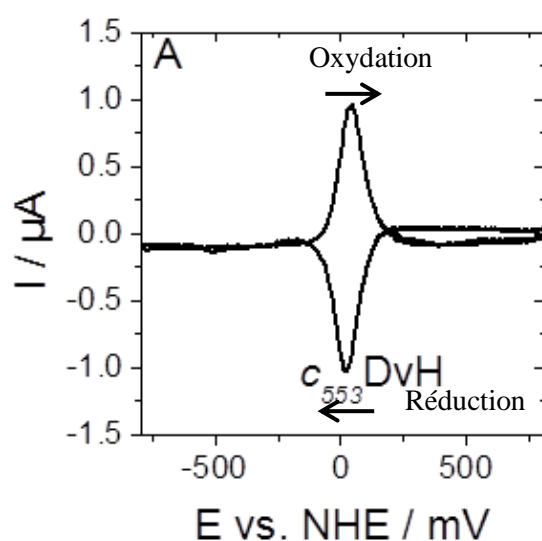


Figure VI.1. Voltampérogramme cyclique de c_{553} DvH

VI.6.2. Mesure d'ampérométrie à potentiel constant

L'ampérométrie est basée sur la mesure d'un courant produit dans le temps lors de l'application d'un potentiel donné fixe à une électrode. Dans cette analyse, l'agitation de la solution de travail est nécessaire pour permettre l'apport du donneur (formiate ou glucose) ou accepteur d'électrons (fumarate) soluble. Dans une telle analyse, le courant va varier lors de l'ajout d'un donneur ou un accepteur d'électrons en fonction de la réaction de transferts d'électrons recherchée. A la cathode, l'ajout d'un accepteur d'électrons finales solubles, permettra d'observer l'apparition d'un courant cathodique (diminution du courant dans le domaine négatif) tandis qu'à l'anode lors de l'ajout

d'un donneur d'électrons initiales solubles permettra d'observer la génération d'un courant anodique (augmentation du courant dans le domaine positif).

Ces mesures d'ampérométrie (comme de voltampérométrie cyclique) sont réalisées avec une cellule à trois électrodes (travail, contre-électrode, référence) et à l'aide d'un potentiostat Palm.Sens et compilées à l'aide du logiciel PS trace.

VI.6.3. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est envoyé sur un objet très fin. L'interaction des électrons avec la surface de l'objet va permettre de former une image tridimensionnelle. Cette dernière sera alors enregistrée par un capteur.

Les échantillons analysés au cours de cette thèse en MEB ont été préparés de deux façons. Dans le premier cas, les échantillons étaient filtrés sur des membranes 0,22 µm et fixés ensuite avec du glutaraldéhyde 2,5% dans un tampon cacodylate (pH 7,2). Après lavage dans le même tampon, les échantillons étaient déshydratés dans un gradient d'alcool pendant 70 minutes. Enfin, ils étaient séchés, métallisés puis observés avec un microscope électronique à balayage Cambridge Steroscan S240 avec une tension de 1kV. Dans le deuxième cas, les échantillons étaient déposés sur une plaque de carbone vitreux et observés sans préparation supplémentaire avec un microscope électronique à balayage Hitachi S-4800 à une tension de 1kV.

VI.6.4. Analyse de viabilité bactérienne par *BacLight*TM

L'analyse de viabilité bactérienne par le kit LIVE/DEAD[®] *BacLight*TM est basée sur une différence de coloration entre des bactéries « blessées » ou mortes, dont la membrane est devenue perméable à un fluorochrome (l'iodure de propidium ou PI), et des bactéries présentant une membrane intègre prenant seulement la coloration du SYTO9, un fluorochrome diffusant librement au travers des membranes intactes ou endommagées. Les cellules après le double marquage sont observées en microscopie optique sous épifluorescence après excitation à 470-490 nm. L'iodure de propidium (PI), donne à la cellule une fluorescence rouge et le SYTO 9 une fluorescence verte. Le PI, plus volumineux

que le SYTO 9, ne passe pas à travers les pores membranaires et ne rentre dans la cellule que si la bactérie a sa membrane abîmée au contraire du SYTO 9. Un comptage en épifluorescence permettra donc d'estimer la proportion relative de cellules intactes et endommagées dans la population bactérienne.

Pour observer les échantillons en microscopie à épifluorescence, les échantillons ont d'abord été mélangés avec des marqueurs à ADN SYTO 9 (1,67 μM) et PI (1,67 μM) et incubés pendant 15 min avant filtration (0,22 μm). Le filtre est ensuite déposé sur une lame de microscope et observé avec le microscope à épifluorescence OLYMPUS BX51 sous huile à immersion objectif $\times 100$.

VI.6.5. Spectroscopie RAMAN

La spectroscopie RAMAN repose sur la propriété d'un milieu à modifier la fréquence de la lumière qui y circule. Le décalage de fréquence correspond alors à un échange d'énergie entre le rayon et le milieu, et dépend de la composition moléculaire et de sa structure. Il permet ainsi de déterminer la nature de certains composants de ce milieu. Un laser monochrome sera donc utilisé pour déterminer la composition d'un échantillon.

Les spectres en spectroscopie RAMAN ont été obtenus en utilisant un spectromètre Jobin-Yvon T64000 triple-monochromator équipé avec un microscope confocal, un détecteur CCD refroidi à l'azote, une grille à 1800 rainures par mm et un laser YAG à double fréquences avec une longueur d'onde de 530,53 nm. La résolution est de 1 cm^{-1} , l'irradiance du laser a été gardée en dessous de 5 kW/cm^2 .

La cartographie au RAMAN a été réalisée avec un Witec alpha 300 S équipé d'un détecteur CCD et d'un laser YAG à double fréquences avec une longueur d'onde de 532,26 nm. La résolution était de 4 cm^{-1} et la reproductibilité au-delà de $0,5 \text{ cm}^{-1}$. La résolution spatiale a été estimée à 350 nm.

VI.6.6. Analyse des particules par DLS

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) permet d'estimer la taille d'une particule en l'assimilant à une sphère dotée d'un rayon hydrodynamique. L'ensemble des rayons hydrodynamiques des particules enregistrés donnera alors une distribution globale de la taille de l'objet, le diamètre D médian de l'objet selon la distribution en volume de cet objet correspond à la D_{50} .

La taille des particules a été estimée à l'aide d'un Malvern Zetasizer 3000 HS. Le rayon lumineux était produit par un laser Helium-Neon avec une puissance de 5 mW à 633 nm. La lumière était détectée à un angle de 90° . L'échantillon était introduit dans une cellule régulée à 25°C . Tous les échantillons ont été dilués 50 fois avec de l'eau pure avant observation dans le but d'éviter de saturer le détecteur. L'eau avait été filtrée avant utilisation avec des filtres de cellulose de $0,45\mu\text{m}$. Les données ont été analysées avec la méthode CONTIN [7] et elles sont extraites de la distribution globale en volume avec la D_{50} et l'IQR (valeurs interquartiles).

VI.7. Références

- 1 Lojou E., Bianco P., & Bruschi M. (1998) Kinetic studies on the electron transfer between bacterial c-type cytochromes and metal oxides. *J. Electroanal. Chem.*, 452(2), 167–177.
- 2 Bianco P., & Haladjian J. (1981) Current—potential responses for a tetrahemic protein: a method of determining the individual half-wave potentials of cytochrome c3 from *Desulfovibrio desulfuricans* strain Norway. *Electrochim. Acta*, 26(8), 1001–1004.
- 3 Nivière V., Hatchikian E.C., Bianco P., & Haladjian J. (1988) Kinetic studies of electron transfer between hydrogenase and cytochrome c3 from *Desulfovibrio gigas*. Electrochemical properties of cytochrome c3. *BBA - Bioenerg.*, 935(1), 34–40.
- 4 Lojou E., & Bianco P. (1999) Electrocatalytic reduction of uranium by bacterial cytochromes: Biochemical and chemical factors influencing the catalytic process. *J. Electroanal. Chem.*, 471(2), 96–104.
- 5 Correia dos Santos M.M., Paes de Sousa P.M., Simões Gonçalves M.L., Krippahl L., Moura J.J.G., et al. (2003) Electrochemical studies on small electron transfer proteins using membrane electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, 541, 153–162.
- 6 Rodkey F.L., & Ball E.G. (1950) Oxidation-reduction cytochrome potentials of the cytochrome c system. *J. Biol. Chem.*, 182, 17–28.

Résumé

Nous avons cherché dans ce travail à élaborer un biofilm artificiel électroactif dans le but de promouvoir les réactions de transfert extracellulaire d'électrons (EET) en reconstituant artificiellement un biofilm en présence de matériaux exogènes. Un matériau composite auto-assemblé constitué de cellules bactériennes (*Shewanella oneidensis*), de nanotubes de carbone et de cytochromes *c* exogènes (issue de cellules de cœur de bœuf) a été tout d'abord proposé. Le processus d'auto-assemblage a été étudié par diffusion de lumière dynamique, microscopie électronique à balayage et spectroscopie Raman. Ces analyses ont mis en évidence l'importance du cytochrome exogène dans l'assemblage et l'organisation du matériau. La viabilité bactérienne a été étudiée et l'activité métabolique a été caractérisée par électrochimie. Les courants à l'anode étaient 10 et 4 fois plus importants avec ce biofilm artificiel ($0,027 \text{ A m}^{-2}$) qu'avec les électrodes modifiées par les bactéries seules ($0,003 \text{ A m}^{-2}$) ou associées au cytochrome *c* ($0,007 \text{ A m}^{-2}$). Le biofilm artificiel a été testé en substituant *S. oneidensis* par *Pseudomonas fluorescens*, produisant un courant d'oxydation lors de l'ajout de 1,5 mM de glucose. Le cytochrome *c* possède, outre son rôle structurant, une activité de navette à électrons. Son potentiel redox, 254 mV (vs NHE), était adapté à l'oxydation du formiate mais inadapté à la réduction du fumarate. Pour cette raison, il a été substitué par d'autres cytochromes ($c_3\text{DvH}$, $c_7\text{Da}$, $c_{553}\text{DvH}$, $c_3\text{DdN}$ ou $c_3\text{Dg}$) possédant des potentiels redox plus bas, de 20 mV à -400 mV. Ces cytochromes variaient aussi au niveau de leur charge à pH neutre, permettant de valider l'importance des forces électrostatiques dans l'assemblage du biocomposite. Les résultats optimaux obtenus avec $c_3\text{DvH}$ et $c_7\text{Da}$ ont montré l'importance du potentiel redox des éléments exogènes pour l'EET. Nous avons ensuite remplacé le cytochrome *c* par la protamine. Cette protéine non électroactive a permis l'assemblage du biocomposite tout en maintenant les transferts directs d'électrons entre les bactéries et les différents nanomatériaux testés. Les optimisations ont permis d'atteindre des courants cathodiques de plus de 12 A m^{-2} en présence de 50 mM de fumarate. Les expériences de stabilité ont montré la présence d'un courant biotique de $1,75 \text{ A m}^{-2}$ après 24 h de réduction de 50 mM de fumarate.

Mots-clefs: *Shewanella oneidensis*, biofilm, cytochrome, protamine, biomimétisme, transfert d'électrons

Abstract

The aim of this PhD work was to design an artificial electroactive biofilm in order to optimize extracellular electron transfers (EET) by artificially reconstituting the biofilm in the presence of exogenous materials. A biocomposite material was proposed from the self-assembly of the bacteria *Shewanella oneidensis* with carbon nanotubes and cytochrome *c* (extract from bovine heart). The self-assembly was first studied by diffusion light scattering, scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. These analyzes showed the importance of the cytochrome *c* in the assembly and organization of the biocomposite. Bacterial viability was studied and metabolic activity was characterized with the help of electrochemistry. The current at the anode was 10 and 4 times higher with the artificial biofilm (0.027 A m^{-2}) than with film composed with bacteria alone (0.003 A m^{-2}) or associated with cytochrome *c* (0.007 A m^{-2}). Artificial biofilm was also tested with *Pseudomonas fluorescens* instead of *S. oneidensis*, producing an oxidative current upon the addition of 1.5 mM glucose. That indicates cytochrome *c* has, in addition to its structuring role, an electron shuttle activity. Its redox potential, +254 mV (vs. NHE), was adapted to the oxidation of formate but was unsuitable for the reduction of fumarate. For this reason, it has been substituted by other cytochromes, $c_3\text{DvH}$, $c_7\text{Da}$, $c_{553}\text{DvH}$, $c_3\text{DdN}$, and $c_3\text{Dg}$, possessing lower redox potentials, in the range of 20 mV to -400 mV. These cytochromes also varied at the level of their charge at neutral pH and allowed to validate the importance of the electrostatic forces in the assembly of the biocomposite. The optimal results obtained with $c_3\text{DvH}$ and $c_7\text{Da}$ showed the importance of the redox potential of the exogenous elements for the EET. We then replaced the cytochrome *c* with protamine. This non-electroactive protein allowed the assembly of the biocomposite by promoting direct electrons transfer between the bacteria and the different nanomaterials tested. The optimizations made it possible to reach cathodic currents of more than 12 A m^{-2} in the presence of 50 mM of fumarate. The stability experiments showed the presence of a biotic current of 1.75 A m^{-2} after 24 h of reduction of 50 mM of fumarate.

Keywords: *Shewanella oneidensis*, biofilm, cytochrome, protamine, biomimetics, electron transfer