



HAL
open science

Modulation de l'interface entre biofilms microbiens électroactifs et surface d'électrode : modifications de surface et effets de milieu

Hassiba Smida

► **To cite this version:**

Hassiba Smida. Modulation de l'interface entre biofilms microbiens électroactifs et surface d'électrode : modifications de surface et effets de milieu. Autre. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1S135 . tel-01816959

HAL Id: tel-01816959

<https://theses.hal.science/tel-01816959>

Submitted on 15 Jun 2018

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

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

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Chimie

Ecole doctorale Matière, Molécules et Matériaux

présentée par

Hassiba Smida

Préparée à l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes (UMR 6226)
équipe Matière Condensée et Systèmes Electroactifs
UFR Structure et Propriété de la Matière

**Modulation de
l'interface entre
biofilms microbiens
électroactifs et
surface d'électrode:
Modifications de
surface et effet de
milieu**

**Thèse soutenue à Rennes
Le 13 décembre 2017**

devant le jury composé de :

Claire Mangeney

Professeure-Université Paris-Diderot-Paris7 /
rapporteur

Mathieu Etienne

Directeur de recherche CNRS-Université de
Lorraine / *rapporteur*

Jean-Christophe Lacroix

Professeur-Université Paris-Diderot-Paris7 /
examineur

Jean-Pierre Hurvois

Professeur-Université Rennes1 / *examineur*

Frédéric Barrière

Maître de conférences-Université Rennes1 / *co-
directeur de thèse*

Corinne Lagrost

Chargée de recherche CNRS-Université Rennes1 /
co-directeur de thèse

Charles Cougnon

Chargé de recherche CNRS-Faculté des sciences-
Angers / *Invité*

Sommaire général

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

Chapitre I: Etude bibliographique

I.1.	Contexte énergétique	10
I.2.	Notions sur les piles à combustible (PACs)	12
I.2.1.	La pile à combustible (PAC)	12
I.2.2.	La pile à combustible (PAC) à membrane échangeuse d'ions	15
I.2.3.	Intérêt des catalyseurs	17
I.2.4.	Notions sur les piles à combustible microbiennes PCM	17
I.2.4.a.	Principe de fonctionnement d'une pile à combustible microbienne	19
I.2.4.b.	Le Biofilm	20
I.2.4.b.1.	Etapas de formation d'un biofilm	21
I.2.4.b.2.	Les aspects négatifs des biofilms	24
I.2.4.b.3.	Les aspects positifs des biofilms	25
I.2.4.c.	Les biofilms électroactifs (EA)	26
I.2.4.d.	Comportement anodique	26
I.2.4.d.1.	Fonctionnement d'une bioanode microbienne	26
I.2.4.d.2.	Transferts électroniques directs ou indirects	29
I.2.4.d.2.1.	Transfert direct	29
I.2.4.d.2.2.	Transfert indirect	32
I.2.4.d.3.	Constitution des biofilms électroactifs	34
I.2.4.e.	Comportement cathodique	36
I.2.4.e.1.	Fonctionnement de la cathode d'une PCM	36
I.2.4.e.1.1.	Les biocathodes	37
I.2.4.f.	Architecture de la PCM	38
I.2.4.f.1.	Les PCMs à deux compartiments	38
I.2.4.f.2.	Les PCMs à un compartiment	40
I.2.4.g.	Applications des piles à combustibles microbiennes	42

I.2.4.g.1.	Traitement des eaux usées	42
I.2.4.g.2.	Dessalement des eaux de mer	43
I.2.4.g.3.	Production d'énergie	45
I.2.4.g.4.	Production d'hydrogène	46
I.2.4.g.5.	Bioremédiateur	46
I.2.4.g.6.	Biocapteur environnementaux	47
I.3.	Conclusions	48
	Liste des figures	49
	Références du chapitre I	51

Chapitre II: Matériels et méthodes

II.1.	Matériau d'électrode	64
II.1.1.	Le carbone vitreux	64
II.1.2.	Le graphite	65
II.1.3.	Les surfaces Pyrolized Photoresist Film (PPF)	66
II.2.	Techniques de caractérisation	67
II.2.1.	Techniques électrochimiques	67
II.2.1.a.	Mesure de la tension de la pile à circuit ouvert ou sous résistance variable	67
II.2.1.b.	Voltamétrie cyclique	68
II.2.1.c.	Chronoampérométrie	71
II.2.1.d.	Courbe de puissance	72
II.2.1.e.	Calculs des densités de courant et rendements faradiques	74
II.2.2.	Autres techniques de caractérisation 7	74
II.2.2.a.	Microscopie Electronique à Balayage MEB	75
II.2.2.b.	Microscopie à Force Atomique (AFM)	76
II.2.2.c.	Spectroscopie de photoélectron X (XPS)	77
II.2.2.d.	Spectroscopie électronique d'absorption ultraviolet-visible	78
II.2.3.	Estimation de pH	78
II.3.	Préparation des électrodes	78

II.3.1. Préparation de l'électrode de carbone vitreux	78
II.3.2. Préparation de l'électrode de graphite	79
II.4. Modification de surface d'électrode	79
II.5. Eau de la station d'épuration	79
II.6. Le séparateur; la membrane échangeuse d'ion	80
II.7. Les réacteurs: dispositifs expérimentaux	80
II.8. Le séquençage	82
II.8.1. L'extraction de l'ADN	83
II.8.1.a. Lyse des cellules bactériennes	83
II.8.1.b. Elimination des protéines et des peptides	84
II.8.1.c. Récupération de l'ADN	84
II.8.2. Analyse de l'ADN	84
II.8.3. L'amplification de l'ADN	85
II.8.4. Séquençage Illumina	85
II.8.5. Analyse des données de séquençage	87
II.9. Synthèse des Liquides ioniques (LI)	87
Liste des figures	90
Références du chapitre II	91

Chapitre III: Modification chimique de la surface de la bioanode : influence sur la performance des piles à combustible microbiennes (PCMs)

Chapitre III Partie A : Modification de la surface de la bioanode	100
III.1 Point bibliographique sur les modifications de surface d'électrodes et intérêt de la pyridine en tant que modifiant	100
III.1.1 Modification de surface d'électrode visant à faciliter le transfert électronique des bactéries vers l'électrode	100
III.1.1.a Addition de polymères conducteurs et électroactifs	101
III.1.1.b Immobilisation de médiateurs redox	103
III.1.1.c Immobilisation de particules métalliques	104

III.1.2	Modifications visant à améliorer l'affinité des bactéries pour la surface des électrodes	106
III.1.2.a	Traitements de surfaces	105
III.1.2.b	Modifications spécifiques de surface	108
III.2	Greffage d'unités pyridine sur des surfaces de carbone	113
III.2.1	Stratégie de greffage choisie	113
III.2.1.a	Modification électrochimique de la surface par réduction de sels d'aryle diazonium	113
III.2.1.b	Caractérisation des surfaces modifiées	116
III.2.2	Réactivité des dérivés de l'aminopyridine lors de la diazotation	118
III.2.3	Greffage électrochimique à partir de cations diazopyridinium générés in situ	121
III.2.4	Caractérisation des surfaces	123
III.2.4.a	Etude des surfaces modifiées par XPS et AFM	124
III.2.4.b	Etude des propriétés de blocage du transfert de charge des couches modifiées	127
III.2.4.c	Etude de l'effet de la charge consommée pour l'électrogreffage	131
III.2.4.d	Angle de contact	135
III.3	Conclusions sur la partie A	137
Chapitre III	Partie B: Influence de la modification sur la performance des piles à combustible microbiennes	138
III.1	Fonctionnement de la PCM du laboratoire	138
III.1.1	Electroactivité des molécules connectant le biofilm à l'anode	141
III.1.2	Influence de la concentration en acétate	142
III.1.3	Influence de la maturité du biofilm électroactif	144
III.2	Caractérisation de biofilm développé sur l'électrode : identification de la communauté microbienne	147
III.3	Effet de la modification de la surface sur la performance de la pile à combustible microbienne PCM	152
III.3.1	Développement de biofilm sur des électrodes modifiées	152
III.3.2	Catalyse de la réaction d'oxydation de l'acétate par le biofilm anodique	155
III.3.3	Efficacité Faradique	157

III.3.4	Densité de puissance	160
III.3.5	Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)	160
III.3.6	Comparaison de la performance d'une PCM fonctionnant avec une anode modifiée avec la pyridine et d'une PCM contenant une anode modifiée avec multicouches de type polyphénylène généré in situ à partir de l'aniline (phénylamine)	161
III.4	Discussion sur l'effet de la modification de surface sur la performance des biopiles	162
III.5	Caractérisation de cytochrome-c sur des électrodes de carbone vitreux	163
III.6	Conclusions sur la partie B	166
III.7	Conclusions du chapitre III	167
	Liste des figures	168
	Liste des tableaux	173
	Références du chapitre III	174

Chapitre IV : Les piles à combustible microbiennes (PCMs) comme capteurs pour étudier l'impact des liquides ioniques sur une communauté bactérienne ?

	Introduction	186
IV.1	Point bibliographique sur l'emploi des liquides ioniques dans les biotechnologies	186
IV.1.1	Généralités sur les liquides ioniques	186
IV.1.2	Utilisation des liquides ioniques dans les biotechnologies	188
IV.2	Effet d'un liquide ionique hydrophile; l'acétate de 1-butyl-3-méthylimidazolium	192
IV.2.1	Biofilms développés sur graphite nu ou modifié avec des unités pyridine	193
IV.2.1.a	Etude par voltamétrie cyclique	193
IV.2.1.b	Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)	196
IV.2.2	Développement d'un biofilm	197
IV.2.3	Inoculum	198
IV.2.4	Effet de la concentration de [BMIm][AcO]	199
IV.3	Effet de liquides ioniques hydrophobes	202
IV.3.1	Effet de [BMIm][NTf ₂] sur des biofilms développés	202
IV.3.2	Effet sur le développement de biofilm	203

IV.4	Effet de liquides ioniques à base de cations pyridinium	204
IV.5	Conclusion sur l'effet de liquides ioniques en solution sur les PCMs	207
IV.6	Effet d'un LI greffé sur la surface de l'anode de la PCM	207
IV.6.1	Synthèse du bromure de 1-(3-aminopropyl)-3-méthylimidazolium; LI-NH ₂	208
IV.6.2	Greffage de LI-NH ₂	208
IV.6.2.a	Voie oxydante	209
IV.6.2.b	Greffage en 2 étapes à partir de la réduction électrochimique de 4-carboxyphényldiazonium	211
IV.6.3	Effet du LI greffé sur les anodes dans le fonctionnement de PCMs	214
IV.7	Effet des liquides ioniques sur la membrane échangeuse d'ions	216
IV.8	Conclusions du chapitre IV	222
	Liste des figures	223
	Références du chapitre IV	228
	Conclusions générales et perspectives	233
	Contributions scientifiques	237
	Remerciements	241

Abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à Force Atomique
ARN	Acide Ribonucléique
[BmIm][AcO]	Acétate de 1-Butyl-3-méthylimidazolium
[BmIm][Cl]	Chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazolium
[BmIm][NTf ₂]	1-Butyl-3-méthylimidazolium bis(trifluorométhylsulfonyl)imide
[BmIm][PF ₆]	1-butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate
[Chol][dhp]	Dihydrogène phosphate de cholinium
Do	Densité optique
EA	Électroactif
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ECS	Electrode au Calomel Saturé
[EMIm][AcO]	1-éthy-3-méthylimidazolium acétate
[EMIm][MeO(H)PO ₂]	1-éthy-3-méthylimidazolium méthylphosphonate
[EMIm][BF ₄]	Tétrafluoroborate de 1-éthyle-3- méthylimidazolium
[Fe(CN) ₆] ³⁻	Hexacyanoferrate(III)
LI	Liquide ionique

LI-NH ₂	Bromure de 1- (3-aminopropyl)-3-méthylimidazolium
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEI	Membrane Échangeuse d'Ion
MUF	Membranes d'ultrafiltration
OCV	Open circuit voltage
Omc	Outer membrane cytochrome
[OMIm][NTf ₂]	1-Octyl-3-méthylimidazolium bis(trifluorométhylsulfonyl)imide
OTU	Unités Taxonomiques Opérationnelles
PAC	Pile à combustible
PCM	Pile à Combustible Microbienne
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET	Polyéthylène Téréphtalate
PPF	Pyrolized Photoresist Film
[Pyr ₄][AcO]	l'acétate de N-butylpyridinium
[Pyr ₄][NTf ₂])	Bis(trifluorométhyl)sulfonyl)imide de N-butylpyridinium
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
[Ru(NH ₃) ₆ Cl ₃]	Ruthénium (III) hexaammine de chlorure
UV-Vis	UltraViolet-Visible
XPS	X-Ray photoelectron spectrometry

Introduction générale

Depuis longtemps notre consommation d'énergies primaires disponibles dans la nature, telles que le pétrole, le charbon et le gaz, ne cesse d'augmenter. Cette énorme croissance énergétique résultant de l'explosion démographique et du boom économique des pays émergents (Chine, Inde, Brésil, etc.) conduit à un épuisement de ces sources d'énergie non renouvelables. Même les réserves d'uranium, source de l'énergie nucléaire, seront épuisées d'ici quelques dizaine d'années (dans environ 60 ans). De plus, ces énergies sont polluantes ; le pétrole et le gaz rejettent le dioxyde de carbone (CO₂) dans l'air et contribuent à l'effet de serre. Cette pollution atmosphérique serait à l'origine des changements climatiques. Quant à l'énergie nucléaire, elle pose encore plus de problèmes puisqu'elle est dangereuse et nous menace de contaminations radioactives.

Pour lutter contre l'effet de serre, et pour prévoir le remplacement du pétrole, le développement de nouvelles énergies renouvelables est devenu une priorité à l'échelle des nations (Mohan et al., 2008). Le développement des piles à combustible (PACs) est une composante majeure des nombreuses technologies mises en œuvre ces dernières années dans le domaine des énergies renouvelables pour satisfaire les besoins en énergie électrique tout en limitant la pollution. Plus particulièrement, les piles à combustible microbiennes (PCMs) ont attiré beaucoup d'attention ces dernières années en tant que nouveaux dispositifs bioélectrochimiques qui utilisent le métabolisme des microorganismes dans les bioanodes pour convertir l'énergie chimique en énergie électrique avec des émissions minimales ou sans émissions de CO₂ (Logan et al., 2006) et (Santoro et al., 2017). La notion de PCM a été découverte par le professeur de botanique, à l'université de Durham, Michael Cresse Potter en 1911, quand il a publié qu'une électrode de platine immergée dans des cultures de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ou de bactéries (*Escherichia coli*), dans une cellule électrochimique en présence de matière organique en tant que substrat, est capable de générer un courant électrique et une différence de potentiel (Potter, 1911). Rapidement, ce concept de pile à combustible biologique a été abandonné. Mais, dans le cadre de besoin énergétique, qui joue un rôle très important dans le monde moderne, cette technologie a regagné de l'intérêt ces dernières décennies.

Une pile à combustible (PAC) peut être définie comme un système électrochimique qui permet de convertir l'énergie chimique d'un combustible (espèce réduite) et d'un comburant (espèce oxydée) et la transformer en énergie électrique. La production d'électricité est possible grâce à l'échange d'électrons issus des réactions électrochimiques d'oxydo-réduction favorables aux électrodes. Le combustible réducteur s'oxyde à l'anode et les électrons issus de

cette oxydation circulent à travers un circuit électrique externe vers la cathode où ils se combinent à un oxydant, généralement l'oxygène, qui est réduit. Un des facteurs les plus importants affectant la performance des PCMs, est le type de film microbien qui colonise l'électrode. La composition du biofilm, l'épaisseur, l'adhérence et l'interface entre le biofilm et l'électrode jouent un rôle clef dans l'efficacité du transfert d'électrons à travers le biofilm ou entre le biofilm et l'électrode (Borole et al., 2011). Ainsi, les caractéristiques de la surface à coloniser en termes de topologie (en offrant plus de surface colonisable par les bactéries) ou de composition chimique, peuvent avoir une influence sur la performance de PCM. Dans ce contexte, plusieurs études ont été effectuées dans le but d'augmenter la surface spécifique de l'électrode par modification de surface et d'optimiser le processus de transfert électronique à l'interface biofilm/électrode en modulant les propriétés physico-chimiques de la surface de l'électrode, notamment dans notre laboratoire (Lapinsonnière et al., 2013).

Mon travail s'est donc orienté vers l'étude et l'optimisation d'une anode microbienne en utilisant une anode modifiée par de la pyridine.

La nature et les propriétés physico-chimiques de l'anolyte sont également un paramètre important dans développement du biofilm bactérien. Pour cette raison, une partie de cette thèse est consacrée à l'étude de l'effet de liquides ioniques sur la performance des PCMs. Les liquides ioniques sont des solvants non conventionnels qui ont suscité beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique ces vingt dernières années. Leur propriétés uniques ont conduit les équipes de recherches à les utiliser dans de nombreuses applications allant de la synthèse aux dispositifs électrochimiques. Ils ont été ainsi proposés comme alternative aux solvants moléculaires y compris dans des applications biotechnologiques. Toutefois, considérés initialement comme peu toxiques et « verts » (Rogers, 2003), (Hapiot and Lagrost, 2008) et (Hallett and Welton, 2011), les liquides ioniques se sont révélés bien plus toxiques qu'espéré, mais leur effet sur les communautés bactériennes reste encore mal connu et débattu.

La démarche scientifique est présentée en quatre chapitres dans ce mémoire. Le premier chapitre est largement consacré à une étude bibliographique traitant la pile à combustible microbiologique (PCM) et l'électrolyseur microbien étudiés au cours de ce travail de thèse. Dans ce premier chapitre introductif, il s'agit notamment de faire le point sur les connaissances sur les piles à combustible microbiennes (PCMs), dans lesquelles des microorganismes présents dans les milieux naturels sont utilisés comme catalyseurs aux électrodes. Les bases concernant le principe de fonctionnement de la PCM ainsi que les mécanismes mis en jeu lors de

l'oxydation d'une source carbonée par un biofilm électroactif développé sur une anode sont décrits. L'effet de plusieurs facteurs agissant sur ces réactions et par conséquent sur les performances générales des piles microbiennes sont présentées ainsi que les différents designs et applications des biopiles.

Le deuxième chapitre détaille les matériels et méthodes électrochimiques et microbiologiques utilisés pour la caractérisation des électrodes modifiées et colonisées par des biofilms électroactifs et des systèmes de PCMs associés.

Le chapitre III est consacré à présenter une approche pour améliorer la connexion des biofilms électroactifs aux électrodes, considérée comme l'un des principaux facteurs limitants des performances des systèmes microbio-électrochimiques. Elle consiste à moduler les propriétés physico-chimiques de la surface des électrodes de graphite par des unités pyridine afin de promouvoir l'adhésion microbienne et le transfert électronique interfacial entre le biofilm électroactif et l'électrode. Afin d'assurer une interface robuste, les unités de la pyridine sont greffées de façon covalente *via* la réduction électrochimique de cations diazopyridinium, formés *in situ* à partir de précurseurs amine, en s'inspirant de la méthode d'électrogreffage des sels d'aryle diazonium (Baranton and Bélanger, 2005) et (Lyskawa and Bélanger, 2006). Cette approche fait l'objet de la première partie de ce chapitre de thèse. Les surfaces modifiées seront étudiées et caractérisées par différentes techniques d'analyse. L'interface obtenue est susceptible d'influer sur le temps de formation du biofilm, la quantité de microorganismes attachés ainsi que leur connexion électrique. Nous verrons quel est l'impact de cette stratégie sur le fonctionnement de nos PCMs dans la deuxième section de ce chapitre.

Dans le chapitre IV, nous verrons l'effet de différents liquides ioniques hydrophiles et hydrophobes à base de cations imidazolium ou pyridinium dans l'anolyte ou immobilisés à la surface de l'anode sur le développement de biofilms bactériens électroactifs ou sur des biofilms électroactifs déjà développés à la surface de l'anode. La PCM est utilisée comme un moyen simple et commode pour évaluer l'effet toxique ou inhibiteur des liquides ioniques sur une communauté bactérienne organisée en biofilm. Nous examinerons également la possibilité d'utiliser ces liquides ioniques pour éviter le colmatage des membranes par un biofilm microbien, ce qui constitue une réelle problématique affectant les performances des PCMs.

Enfin le rapport se conclut par un récapitulatif des résultats obtenus et ouvre sur des perspectives à intégrer dans les futures projets traitant des PCMs.

Références

- Baranton, S., and Bélanger, D. (2005). Electrochemical derivatization of carbon surface by reduction of in situ generated diazonium cations. *J. Phys. Chem. B* *109*, 24401–24410.
- Borole, A.P., Reguera, G., Ringeisen, B., Wang, Z.-W., Feng, Y., and Kim, B.H. (2011). Electroactive biofilms: Current status and future research needs. *Energy Environ. Sci.* *4*, 4813–4834.
- Hallett, J.P., and Welton, T. (2011). Room-Temperature Ionic Liquids: Solvents for Synthesis and Catalysis. *2. Chem. Rev.* *111*, 3508–3576.
- Hapiot, P., and Lagrost, C. (2008). Electrochemical Reactivity in Room-Temperature Ionic Liquids. *Chem. Rev.* *108*, 2238–2264.
- Lapinsonnière, L., Picot, M., Poriel, C., and Barrière, F. (2013). Phenylboronic Acid Modified Anodes Promote Faster Biofilm Adhesion and Increase Microbial Fuel Cell Performances. *Electroanalysis* *25*, 601–605.
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., and Rabaey, K. (2006). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 5181–5192.
- Lyskawa, J., and Bélanger, D. (2006). Direct Modification of a Gold Electrode with Aminophenyl Groups by Electrochemical Reduction of in Situ Generated Aminophenyl Monodiazonium Cations. *Chem. Mater.* *18*, 4755–4763.
- Mohan, Y., Manoj Muthu Kumar, S., and Das, D. (2008). Electricity generation using microbial fuel cells. *Int. J. Hydrog. Energy* *33*, 423–426.
- Potter, M.C. (1911). Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character* *84*, 260–276.
- Rogers, R.D. (2003). CHEMISTRY: Ionic Liquids--Solvents of the Future? *Science* *302*, 792–793.
- Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B., and Ieropoulos, I. (2017). Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *J. Power Sources* *356*, 225–244.

Chapitre 1
Etude Bibliographique

Table des matières

Chapitre I Etude bibliographique	10
I.1. Contexte énergétique.....	10
I.2. Notions sur les piles à combustible (PACs).....	12
I.2.1. La pile à combustible (PAC).....	12
I.2.2. La pile à combustible (PAC) à membrane échangeuse d'ions.....	15
I.2.3. Intérêt des catalyseurs	17
I.2.4. Notions sur les piles à combustible microbiennes PCMs	17
I.2.4.a. Principe de fonctionnement d'une pile à combustible microbienne	19
I.2.4.b. Le Biofilm	20
I.2.4.b.1. Etapes de formation d'un biofilm.....	21
I.2.4.b.2. Les aspects négatifs des biofilms	24
I.2.4.b.3. Les aspects positifs des biofilms	25
I.2.4.c. Les biofilms électroactifs (EA)	26
I.2.4.d. Comportement anodique	26
I.2.4.d.1. Fonctionnement d'une bioanode microbienne	26
I.2.4.d.2. Transferts électroniques directs ou indirects	29
I.2.4.d.2.1. Transfert direct	29
I.2.4.d.2.2. Transfert indirect	32
I.2.4.d.3. Constitution des biofilms électroactifs	34
I.2.4.e. Comportement cathodique	36
I.2.4.e.1. Fonctionnement de la cathode d'une PCM.....	36
I.2.4.e.1.1. Les biocathodes	37
I.2.4.f. Architecture de la PCM.....	38
I.2.4.f.1. Les PCMs à deux compartiments	38
I.2.4.f.2. Les PCMs à un compartiment.....	40
I.2.4.g. Applications des piles à combustibles microbiennes	42

I.2.4.g.1. Traitement des eaux usées.....	42
I.2.4.g.2. Dessalement des eaux de mer.....	43
I.2.4.g.3. Production d'énergie	45
I.2.4.g.4. Production d'hydrogène	46
I.2.4.g.5. Bioremédiateur	46
I.2.4.g.6. Biocapteur environnementaux.....	47
I.3. Conclusions	48
Liste des figures	49
Références du chapitre I.....	51

Chapitre I Etude bibliographique

I.1. Contexte énergétique

L'énergie, quelle que soit sa forme, joue un rôle essentiel dans le monde moderne. Le réchauffement climatique ainsi que l'épuisement à moyen terme des combustibles fossiles et non renouvelables tels que le pétrole, le charbon et le gaz naturel, ou les sources d'énergie nucléaire, obligent à relancer les recherches afin de trouver d'autres modes de production capables d'éviter notre dépendance aux sources d'énergies actuelles majoritairement non-renouvelables.

En 1972, et au-delà de l'enjeu énergétique, l'ONU (Organisation des Nations Unies) a organisé le premier sommet de la terre à Stockholm afin de répondre à une demande d'énergie en hausse et de réduire les émissions de gaz à effet de serre, en particulier le dioxyde de carbone (CO₂) qui représente 70% des émissions. Ce problème mondial nécessite l'engagement de nombreuses nations du monde pour réduire les émissions de ce gaz à effet de serre et de développer des sources d'énergie alternatives et écologiques dans le cadre du protocole de Kyoto ratifié en 1997. Vu le souci de réduire l'impact de la consommation des sources d'énergie fossiles, ces engagements ont été réitérés au sommet de Rio de Janeiro en 2012, et amplifiés à la COP21 de Paris fin 2015.

Depuis longtemps notre consommation d'énergies primaires disponibles dans la nature, telles que le pétrole, le charbon et le gaz, ne cesse d'augmenter. Cette énorme croissance énergétique résultant de l'explosion démographique et du boom économique des pays émergents (Chine, Inde, Brésil, etc.) conduit à un épuisement de ces sources d'énergie non renouvelables. Les chocs pétroliers ayant eu lieu en 1973, 1979 et plus récemment en 2008 sont un bon exemple qui illustre bien ces problèmes. Même les réserves d'uranium, source de l'énergie nucléaire, seront épuisées d'ici quelques années (dans environ 60 ans). De plus, ces énergies sont polluantes ; le pétrole et le gaz rejettent du CO₂ dans l'air et contribuent à l'effet de serre. Cette pollution atmosphérique serait, avec une grande certitude, l'origine des changements climatiques.

Pour lutter contre l'effet de serre, et pour prévoir le remplacement du pétrole, le développement de nouvelles énergies renouvelables est devenu une priorité à l'échelle des nations (Mohan et al., 2008).

À l'opposé des sources d'énergie fossiles et nucléaires sur notre planète, les sources d'énergies renouvelables sont propres, sans danger et inépuisables.

Selon une étude française intitulée "l'observatoire français des énergies renouvelables: <http://www.energies-renouvelables.org>", l'énergie alternative abondante et renouvelable présente sur notre planète est répartie en cinq grandes familles :

- ✓ L'énergie solaire qui dépend du soleil : elle est considérée comme énergie principale, renouvelable et inépuisable. En effet, elle peut être exploitée directement par les panneaux photovoltaïques qui pourraient couvrir tous nos besoins en électricité (Hermann Scheer démontre "Le solaire et l'économie mondiale"). Le solaire thermique est également en fort développement pour l'eau chaude sanitaire.
- ✓ L'énergie éolienne : elle consiste à exploiter l'énergie cinétique du vent.
- ✓ L'énergie hydraulique : elle est fournie par le mouvement de l'eau, sous toutes ses formes : chutes d'eau, courants marins, marée, vagues.
- ✓ L'énergie géothermique : elle résulte de la chaleur stockée dans le sous-sol et est mise à profit pour la production d'électricité ou de chaleur.
- ✓ L'énergie biologique : elle est dérivée de la conversion de l'énergie solaire en biomasse par des processus biologiques (photosynthèse par exemple).

Plusieurs études scientifiques ont montré comment les énergies renouvelables pourraient assurer 100% de nos besoins en énergie. Toujours dans le but de se détacher complètement de notre dépendance aux énergies fossiles et du nucléaire, une étude énergétique américaine concernant 139 Etats dans le monde montre que la planète pourrait parfaitement n'utiliser que des énergies renouvelables dès 2050 (Copyright © 2008-2010 Conservation-nature.fr).

Dans le cadre des énergies renouvelables, mon travail de thèse se focalise sur le domaine des bioénergies qui seront forcément une branche importante des énergies de demain. Il porte sur les piles à combustible microbiennes (PCMs) capables de convertir l'énergie chimique en énergie électrique.

I.2. Notions sur les piles à combustible (PACs)

I.2.1. La pile à combustible (PAC)

Généralités

En 1839, Sir William Robert Grove a découvert le principe de la pile à combustible (PAC), (Grove, 1839). Mais elle a été abandonnée et oubliée rapidement après sa découverte. En 1935, ce principe a été repris par F. T. Bacon qui a réussi à obtenir un premier prototype de 1 kW qui servit de modèle en 1961 à la pile hydrogène/oxygène de la mission spatiale Apollo.

Une pile à combustible (PAC) peut être définie alors comme un système électrochimique qui permet de convertir l'énergie chimique d'un combustible (espèce réduite) et d'un comburant (espèce oxydée) en énergie électrique. La production d'électricité est possible grâce à l'échange d'électrons issus des réactions électrochimiques d'oxydo-réduction spontanées aux électrodes. Le combustible réducteur s'oxyde à l'anode et les électrons issus de cette oxydation circulent à travers un circuit électrique externe vers la cathode où ils se combinent à un oxydant, généralement l'oxygène, qui est réduit.

Il existe différents types de piles à combustible (PAC) classiques :

- ✓ Pile à combustible alcaline : AFC (*Alcaline Fuel Cell*)
- ✓ Pile à combustible à méthanol direct : DMFC (*Direct Methanol Fuel Cell*)
- ✓ Pile à combustible carbonate fondu : MFCC (*Molten Carbonate Fuel Cell*)
- ✓ Pile à combustible à acide phosphorique : PAFC (*Phosphoric Acid Fuel Cell*)
- ✓ Pile à combustible à membrane échangeuse de proton : PEMFC (*Proton Exchange Membrane Fuel Cell*)
- ✓ Pile à combustible à oxyde solide : SOFC (*Solid Oxide Fuel Cell*)

Ces PACs diffèrent par leurs électrolytes, la nature du combustible ou la température de fonctionnement. Ainsi, certaines peuvent fonctionner à de basses températures. On peut citer les PEMFC comme exemple (entre 30°C et 100°C) alors que d'autres nécessitent des températures très élevées comme les SOFC (entre 500°C et 1100°C).

Les principales caractéristiques des différentes PACs sont reportées dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).

Type de Pile	Alcaline (AFC)	Méthanol direct (DMFC)	Carbonate fondu (MCFC)	Acide phosphorique (PAFC)	Membrane échangeuse de cations (PEMFC)	Oxyde solide (SOFC)
Nom	Pile à combustible alcaline : (Alcaline Fuel Cell)	Pile à combustible à méthanol direct:(Direct-Methanol Fuel Cell)	Pile à combustible carbonate fondu : (Molten Carbonate Fuel Cell)	Pile à combustible à acide phosphorique : (Phosphoric Acid Fuel Cell)	Pile à combustible à membrane échangeuse de proton : (Proton Exchange Membrane Fuel Cell)	Pile à combustible à oxyde solide : (Solid Oxide Fuel Cell)
Combustible	H ₂	Méthanol	H ₂ , CO, CH ₄ et autres hydrocarbures	H ₂	H ₂ produit à partir d'hydrocarbures et de méthanol	H ₂ , CO, CH ₄ et autres hydrocarbures
Electrolyte	KOH	Polymère solide	Sels carbonates (Li ₂ CO ₃ , K ₂ CO ₃ ...) mélangés dans une matrice LiAlO ₂	H ₃ PO ₄	Polymère solide (membrane échangeuse de protons)	Céramique: oxyde de zircon (ZrO ₂) et yttrium (Y ₂ O ₃)
Ion dans l'électrolyte	OH ⁻	H ⁺	CO ₃ ²⁻	H ⁺	H ⁺ (à partir d'hydrocarbures et de méthanol)	O ²⁻
Niveau de température	50 – 200°C	20 – 100°C	500 – 750°C	30 – 100°C	150 – 250°C	500 – 1100°C
Rendement du système	35 – 60%	45%	54%	35 – 50%	40%	45 – 55%
Oxydant	O ₂ (air)	O ₂ (air)	O ₂ (air) + CO ₂	O ₂ (air)	O ₂ (air)	O ₂ (air)
Gamme de puissance	100 kW	5 kW	25 – 100 kW	5 – 250 kW	200 kW – 11 MW	2 kW – multi-MW
Domaines d'application	Spatiale	Systèmes électroniques portables de faible puissance	Cogénération Production centrale de l'électricité (Une centrale stationnaire produit 2 MW dans la ville de Santa Clara en Californie)	Véhicules, portable, cogénération et maritime	Transport, installations stationnaires	Electricité distribuée et cogénération dans les autobus
État de développement	Commercialisée /Développement	Commercialisée	Développement/ Mise sur le marché	Commercialisée/ Développement	Développement	Développement

Tableau 1: Principales caractéristiques des différents types de piles à combustible classiques. AFC: Alcaline Fuel cell, PEMFC: Proton Exchange Membrane Fuel Cell, PAFC: Phosphoric Acid Fuel Cell, MCFC: Molten Carbonate Fuel Cell, SOFC: Solid Oxide Fuel Cell (Larminie and Dicks, 2003).

À partir de ce tableau, les différents domaines d'application ainsi que les différentes gammes de puissance des piles à combustible sont reportés dans la Figure 1.

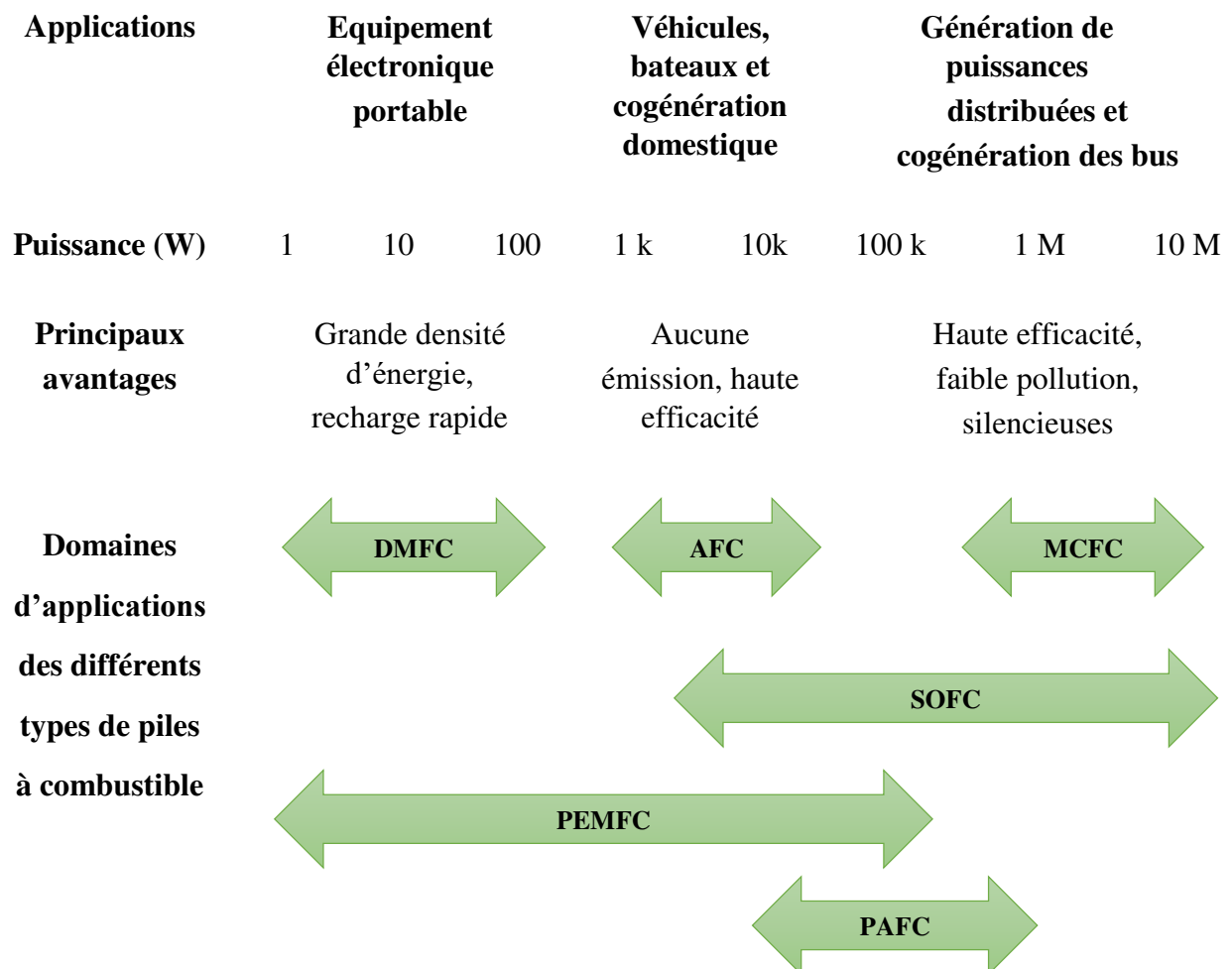


Figure 1 : Applications et avantages principaux des piles à combustible de différents types : (Larminie and Dicks, 2003).

Comme le montre la Figure 1, les piles à combustible présentent plusieurs avantages tels que :

- ✓ Le rendement énergétique : les piles à combustible produisent un rendement qui peut atteindre de 40% à 50% selon le fonctionnement du moteur, tandis qu'un moteur thermique d'automobile a un rendement qui varie entre 25% et 30%.
- ✓ Écologique : la pile à combustible n'est pas polluante, elle n'émet pas de CO₂.
- ✓ Silencieuse : la pile à combustible n'émet aucun bruit, tandis que les moteurs font du bruit et sont responsables de la pollution sonore dans les villes.

- ✓ Les piles à combustible utilisent généralement l'hydrogène qui permet de stocker et distribuer l'énergie tout en étant peu polluant.

Malheureusement, au delà de ces avantages, la pile à combustible possède aussi des inconvénients :

- ✓ Le prix : la pile à combustible utilise des matériaux très coûteux tels que l'électrolyte de la pile, la membrane échangeuse d'ions, le catalyseur en platine.
- ✓ Ces PACs qui utilisent le H₂ en tant que combustible, ont besoin d'énergie pour alimenter le compartiment anodique en hydrogène, c'est à dire que l'hydrogène ne peut être exploité directement dans la nature. Pour pouvoir utiliser ce gaz noble, il faut soit l'extraire d'hydrocarbures, soit le produire par électrolyse ou thermolyse de l'eau. Il faut donc dépenser énormément d'énergie pour le former, peu importe la méthode utilisée.
- ✓ Elles sont aussi dangereuses ; le dihydrogène est très explosif et nécessite donc des précautions lors de sa manipulation.

Les piles à combustible à membrane échangeuse de protons, discutées dans le paragraphe suivant sont celles qui présentent le meilleur compromis en termes de température de fonctionnement (basse température), d'utilisation de l'hydrogène comme combustible et de densité de puissance élevée. Cela permet son application dans de nombreux domaines, comme dans les transports par exemple.

I.2.2. La pile à combustible (PAC) à membrane échangeuse d'ions

La pile à combustible (PAC) à membrane échangeuse d'ions est donc un système électrochimique qui convertit directement l'énergie chimique de l'hydrogène (substrats) en énergie électrique. Les réactions qui permettent cette conversion sont des réactions d'oxydoréduction ; une réaction d'oxydation d'un combustible (H₂) au compartiment anodique et une réaction de réduction d'un comburant (O₂) au compartiment cathodique. Le principe d'une pile à combustible (PAC) à membrane échangeuse d'ions est illustré par la Figure 2 ci-dessous:

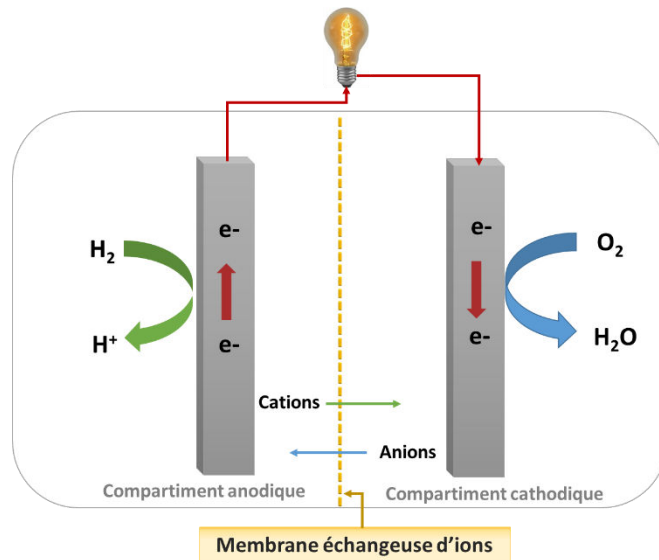


Figure 2 : Schéma du principe de fonctionnement d'une PAC à membrane échangeuse d'ions.

Dans le compartiment anodique a lieu la réaction d'oxydation du dihydrogène (Équation 1):



Dans le compartiment cathodique a lieu la réaction de réduction du dioxygène pour former l'eau (H₂O) (Équation 2).



Les deux compartiments, anodique et cathodique, sont séparés par une membrane échangeuse de protons qui assure l'équilibre des charges par la migration des ions H⁺. L'échange des électrons entre le compartiment anodique et le compartiment cathodique via le circuit extérieur produit du courant électrique.

Ce type de PAC à membrane échangeuse d'ions est le plus répandu car il présente plusieurs avantages tels qu'une basse température de fonctionnement (30-100°C), Tableau 1, un démarrage rapide et l'utilisation de l'hydrogène comme combustible. De plus, la densité de puissance importante (5 – 250 kW) permet son application dans de nombreux domaines, comme source de puissance portable (appareils de musique, appareils téléphoniques, microordinateurs...) et aussi dans le domaine des transports.

I.2.3. Intérêt des catalyseurs

Pour faciliter les réactions d'oxydo-réduction aux électrodes et augmenter les performances de la pile à combustible (PAC), un catalyseur est nécessaire. Les catalyseurs sont des espèces chimiques capables d'accélérer les vitesses des réactions, en abaissant l'énergie d'activation. Les catalyseurs les plus couramment utilisés en électrochimie sont de types métalliques comme le platine, qui est le catalyseur idéal à l'anode permettant d'obtenir des densités de courant importantes ($200 - 400 \text{ A/cm}^2$ avec une tension de l'ordre de $0,7 \text{ V}$) (Hottinen et al., 2004). Ce type de catalyseur présente beaucoup d'inconvénients, notamment son coût élevé qui est de l'ordre de 26 €/g (Cotation au 13/07/2017), ainsi que sa durée de vie limitée. Son coût risque d'augmenter puisque le platine se fait rare et que son recyclage est également coûteux, basé sur une filière encore peu mature.

Afin de remplacer ce catalyseur onéreux, la recherche s'est tournée ces dernières années vers le développement de catalyseurs stables et efficaces. Une stratégie intéressante est l'utilisation de piles à combustible microbiennes (PCMs) qui utilisent des catalyseurs biologiques vivants aux électrodes (microorganismes organisés en biofilms), qu'on retrouve dans la nature et qui permettent de s'affranchir des défauts des catalyseurs métalliques. Ces biopiles vont donc utiliser des bactéries électroactives qui s'organisent en biofilm à la surface de l'électrode. Ces biofilms bactériens électroactifs sont capables de catalyser les réactions d'oxydo-réduction aux surfaces des électrodes impliquées dans les PCMs.

I.2.4. Notions sur les piles à combustible microbiennes PCMs

D'une manière générale, une pile à combustible microbienne (PCM) est une pile basée sur l'utilisation de microorganismes comme biocatalyseurs capables de convertir directement l'énergie chimique de composés organiques (substrats) en énergie électrique. Elles sont également désignées par MFC (microbial fuel cell en anglais). Le courant résulte de l'échange électronique entre la cathode et la bioanode via le circuit extérieur.

La notion de pile à combustible microbienne PCM a été découverte par le professeur de botanique, à l'université de Durham, Michael Cresse Potter en 1911, quand il a publié qu'une électrode de platine immergée dans des cultures de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ou de bactéries (*Escherichia coli*) est capable de générer un courant électrique ou une différence de potentiel (Potter, 1911). En 1931, B. Cohen a confirmé ces résultats après avoir connecté en série des piles à combustible microbiennes qui génèrent une tension de l'ordre de 35 V pour un courant de 2 mA (Cohen, 1931).

Dans les années 60, plusieurs études se sont focalisées sur les piles à combustible microbiennes. Notamment, la NASA (National Aeronautics and Space Administration) s'est intéressée au recyclage des déchets organiques et à leur transformation en électricité pour ses vols spatiaux (Davis and Yarbrough, 1962) et (Canfield and Lutwack, 1963). En 1963 les premières piles à combustible microbiennes furent commercialisées en tant que sources d'énergie dans des radios et appareils en mer, mais les puissances obtenues restaient faibles. Elles ont donc été abandonnées car le coût des énergies fossiles était faible et la complexité des processus bio-électrochimiques mis en jeu était un frein à la compréhension des phénomènes. Pendant ce temps, d'autres technologies de production d'énergies alternatives telles que le photovoltaïque avançaient rapidement.

Au début des années 2000, et dans le cadre de besoin énergétique qui joue un rôle très important dans le monde, ce domaine de recherche a regagné de l'intérêt, notamment lorsque Benetto et Allen ont démontré que pour améliorer le transfert d'électron et pour augmenter les performances des biopiles, il faut ajouter un médiateur électrochimique (Bennetto et al., 1981) et (Allen and Bennetto, 1993a). Ce développement de la recherche portant sur les PCMs est bien illustré par le nombre des publications, en plein essor depuis une dizaine d'années. La Figure 3 montre l'évolution du nombre des publications pour le terme " Microbial Fuel Cell" dans la littérature depuis 2000 d'après Science-Direct-Juillet 2017.

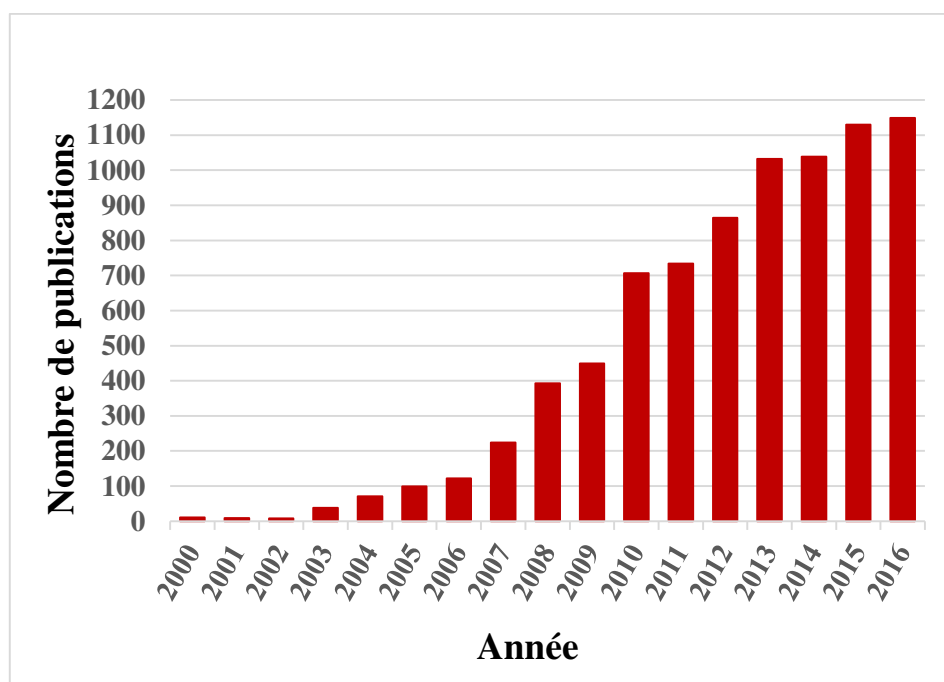


Figure 3: Evolution du nombre de publications portant sur le terme « Microbial Fuel Cell » dans la littérature depuis 2000 (d'après Sciences Direct-Juillet 2017).

Ces études ont permis d'améliorer la compréhension des phénomènes ainsi que les performances fournies par ces piles. Mais les limitations de ces dispositifs ne sont pas encore complètement comprises et dépassées. Notamment les faibles densités de puissance qui sont actuellement de l'ordre de 1 mW/cm^2 .

1.2.4.a. Principe de fonctionnement d'une pile à combustible microbienne

Les piles à combustible microbiologiques (PCM), décrites précédemment, sont des piles galvanostatiques. Elles sont capables de fournir de l'énergie sous forme d'électricité.

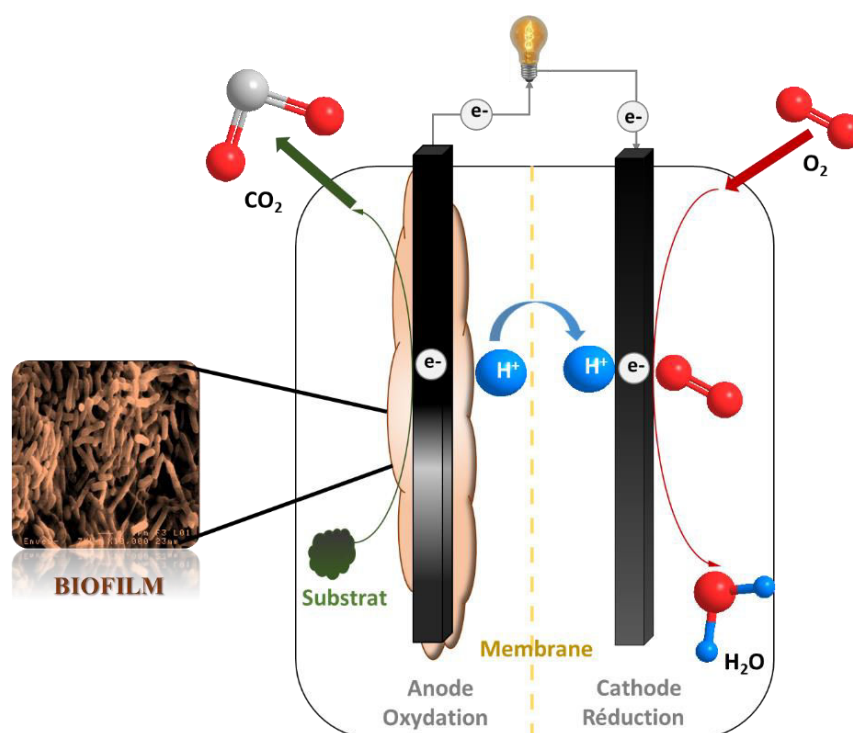


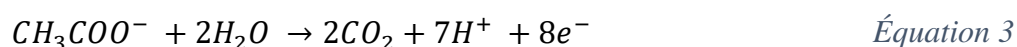
Figure 4: Principe de fonctionnement d'une pile à combustible microbienne : une bioanode et une cathode abiotique.

Le principe de fonctionnement d'une PCM est illustré sur la Figure 4 ci-dessus. Les bactéries adhérentes sur la surface de l'anode forment des films appelés biofilms électroactifs (EA) (Bond and Lovley, 2003), qui catalysent à l'anode le transfert des électrons issus de l'oxydation des composés organiques fournis en tant que substrats comme l'acétate, l'acide lactique, le glucose, etc... L'anode est alors appelée bioanode ou anode biologique. Les électrons circulent dans un circuit externe jusqu'à la cathode (biotique ou abiotique). A la cathode, les électrons sont utilisés dans des réactions de réduction catalysées (biotiques) ou non (abiotiques) par des bactéries. Ces deux compartiments (anodique et cathodique) sont séparés

par une membrane échangeuse d'ions (Kumar et al., 2017). L'anode et la cathode sont connectées par un circuit électrique externe représenté par une résistance électrique. Pour nos études, nous connectons une résistance électrique variable, habituellement fixée à 1 kΩ, aux bornes de la pile.

Dans beaucoup de piles à combustible microbiologiques étudiées en laboratoire, la pile oxyde à l'anode l'acétate comme combustible et est équipée d'une cathode à air abiotique qui assure la réduction du dioxygène. Les réactions chimiques globales en jeu dans ce type de piles à combustible microbiologiques sont les suivantes :

À l'anode, l'oxydation de l'acétate a lieu au niveau du biofilm (Équation 3), (Du et al., 2007a)



À la cathode abiotique, la réduction du dioxygène est présentée dans l'Équation 4:



1.2.4.b. Le Biofilm

Généralement, les microorganismes vivent au sein de communautés microbiennes organisées sur des surfaces appelées biofilms (Figure 5). Les biofilms sont enrobés d'une matrice extracellulaire de substances polymériques, en général des exopolysaccharides comme principale composante (Sutherland, 1982), mais des protéines, des acides nucléiques et des lipides ont également été recensés (Flemming and Wingender, 2010 et Sutherland, 2001). Il a été montré que plus de 99% des bactéries se développent en biofilms (Coghlan, 1996 et Donlan and Costerton, 2002) sur une grande variété de surfaces, c'est-à-dire toutes les surfaces terrestres, les métaux, les plastiques, les surfaces minérales (pierres, bétons) et les tissus vivants (tissus humains, feuilles et racines des végétaux). Lens et al (2003) ont montré aussi que tous les systèmes dans lesquels l'eau est en contact avec une surface solide sont susceptibles de servir de support à la formation d'un biofilm qui peut être constitué d'une seule espèce bactérienne ou de plusieurs espèces de bactéries.

En général, un biofilm est une communauté sessile plus ou moins complexe, adhérant à une surface des microorganismes d'une manière irréversible entre eux enrobés dans une matrice exopolymérique extracellulaire auto-produite (Donlan and Costerton, 2002).

Dans un biofilm, les cellules microbiennes ne présentent qu'environ 15% du volume total, 85% du reste du biofilm est une matrice d'exopolymères hydratée.

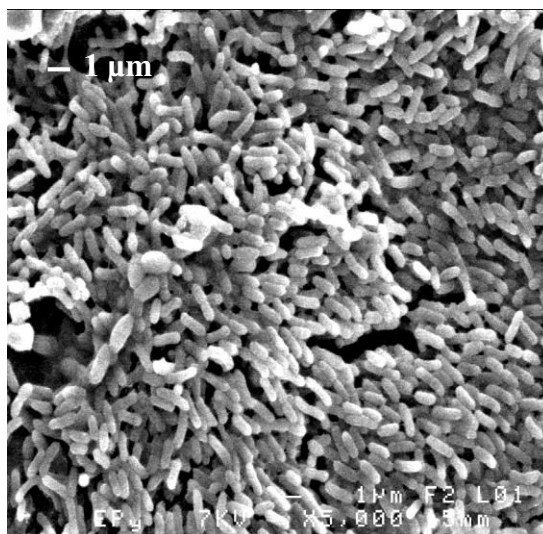


Figure 5 : Image MEB (microscopie électronique à balayage) d'un biofilm électroactif sur une anode en graphite.

I.2.4.b.1. Étapes de formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm sur une surface est le résultat d'un ensemble de processus physiques, chimiques et biologiques. Elle se compose de cinq étapes successives (P. Stoodley et al., 2002).

La formation des biofilms sur un support solide est actuellement bien connue et détaillée dans la Figure 6, simplifiée, ci-dessous.

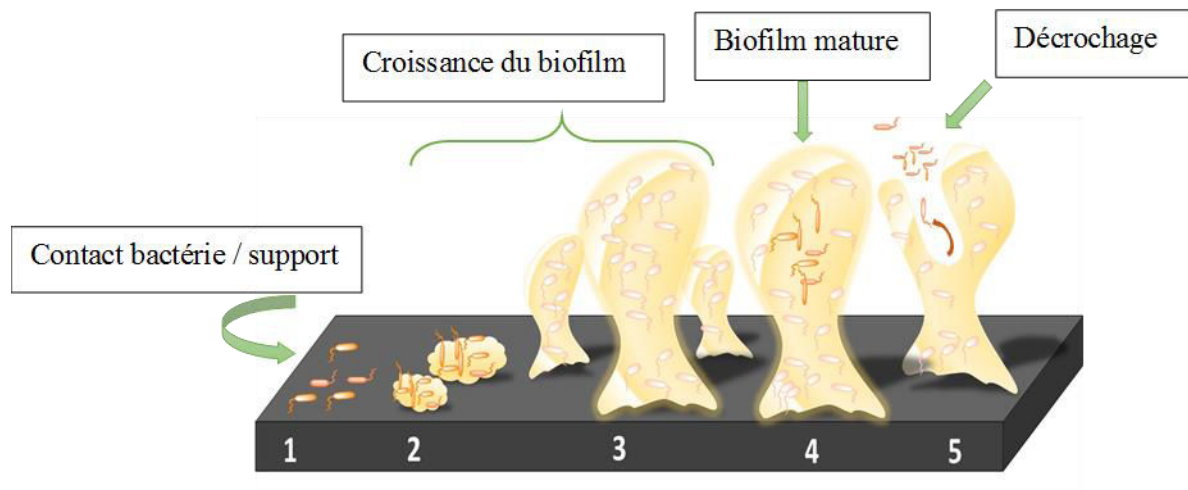


Figure 6 : Les 5 étapes de maturation d'un biofilm. 1: transport et adsorption des microorganismes sur la surface inerte; 2: attachement irréversible; 3: colonisation et croissance; 4: maturation; 5: dispersion.

❖ *Etape 1 : Transport et adsorption*

Toute adsorption de microorganismes à une surface suppose le rapprochement de ces derniers avec le support. Le transport des particules de petites tailles (0.01 à 0.1 μm) vers la surface peut être décrit en termes de diffusion. Pour les particules de grandes tailles (0.5 à 10 μm), comme la plupart des microorganismes, elles se déplacent sous l'effet de l'hydrodynamique pour adhérer à la surface. Pendant cette étape, les liaisons mises en jeu sont des liaisons non covalentes ; des liaisons de type Van der Waals (pour des distances > 50 nm), des interactions électrostatiques (entre 10 et 20 nm) et des interactions acide-base de Lewis (<1.5 nm), dépendant de la nature de la surface.

❖ *Etape 2 : Attachement irréversible*

Cette étape peut être considérée comme l'étape clef de la formation du biofilm. C'est l'étape de l'installation et de la fixation des cellules au support et entre elles. L'irréversibilité de l'adhésion fait appel au métabolisme bactérien. En effet, l'attachement des bactéries sur la surface est assuré par la sécrétion d'exopolysaccharides : l'adhésine, le lipopolysaccharide A dans le cas des surfaces hydrophobes et le lipopolysaccharide B dans le cas des surfaces hydrophiles (Makin and Beveridge, 1996). Cela leur permet de consolider leur adhésion en formant autour de la bactérie une enveloppe, appelée glycocalyx, d'une part, et par les

interactions de faible énergie de nature électrostatique avec les groupements phosphate et carboxylate d'autre part. En 1994, Suci et al. ont montré que cette matrice d'exopolymères peut représenter jusqu'à 59 à 75% du volume de biofilm (Suci et al., 1994).

❖ *Etape 3 : Colonisation et croissance*

Pendant cette étape, et lorsque les bactéries sont fixées de manière irréversible au support, les microorganismes se divisent pour former des micro-colonies qui vont recouvrir tout ou partie de la surface (en quelques heures ou quelques mois selon la nature et les propriétés de surface, la nature des bactéries et la quantité de matière organique biodégradable disponible). En plus de la multiplication de ces cellules, la croissance du biofilm peut également être attribuée à des cellules planctoniques venant se greffer à sa surface. Généralement, la croissance des bactéries se caractérise par le développement d'un biofilm plus épais (Stoodley et al., 2002).

❖ *Etape 4 : Maturation du biofilm*

La phase de maturation du biofilm se caractérise par une augmentation de la taille de la structure via la multiplication cellulaire jusqu'à acquérir une structure tridimensionnelle et l'évacuation importante des produits issus de l'activité métabolique. Lors de cette étape des canaux se forment pour permettre la circulation des nutriments et de l'oxygène ou autres molécules dans les régions profondes du biofilm (Costerton, 1999). À ce stade, et après la maturité du biofilm, l'évolution de son épaisseur se ralentit jusqu'à stabilité.

❖ *Etape 5 : Dispersion du biofilm*

Après vieillissement du biofilm, ce dernier, ou un fragment de ce dernier, se détache et se disperse. C'est-à-dire que les formes planctoniques sont libérées à l'extérieur de la matrice formée et sont prêtes à coloniser de nouveau d'autres surfaces plus favorables.

L'attachement microbien et la structure du biofilm dépendent de nombreux facteurs environnementaux et microbiologiques (Davey and O'toole, 2000), (Donlan, 2002) et (Simões et al., 2010).

De nombreux paramètres, présentés dans le Tableau 2, peuvent intervenir et affecter la structure du biofilm. Tous ces facteurs vont donc plus ou moins favoriser l'attachement, l'adhésion et la croissance de microorganismes pour former un biofilm.

Effets de milieu	Effets de la composition microbiologique	Effets de de la surface ou de l'interface
<ul style="list-style-type: none"> - Température - pH - Intensité lumineuse - Concentration en substrat - Vitesse d'écoulement de l'eau (hydrodynamique) 	<ul style="list-style-type: none"> - Surface cellulaire (protéines, lipopolysaccharides, exopolysaccharides, ...) - Appendices extracellulaires (flagelles ou fimbriae (pili)) - Hydrophobicité de la surface cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Nature de la surface - Rugosité de la surface - Hydrophobicité de la surface

Tableau 2: Différents facteurs environnementaux et microbiologiques influençant l'attachement microbien et la structure du biofilm.

I.2.4.b.2. Les aspects négatifs des biofilms

Les biofilms peuvent provoquer divers problèmes dans de nombreux secteurs industriels ou dans le domaine de la santé. Ils sont, par exemple, à l'origine de dégradations de matériaux (corrosion) ou de graves problèmes sanitaires (Donlan and Costerton, 2002) et (Roux and Ghigo, 2006).

Concernant les problèmes de santé, il a été montré que les biofilms sont à l'origine de 60% des infections chez l'Homme (Chicurel, 2000). Le développement des biofilms sur le matériel médical (seringues, cathéters, prothèses, implants...) ou sur les tissus corporels (yeux, oreilles, dents, poumons, os...) est le responsable direct de ces problèmes dans le domaine médical (Costerton, 1999). La bactérie la plus étudiée dans ce domaine est *Pseudomonas aeruginosa*. L'organisation de ce type de bactéries en biofilm est à l'origine des infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose (Vilain et al., 2004).

Les biofilms posent également des problèmes dans de nombreux secteurs industriels. Dans l'industrie pétrolière par exemple, la colonisation des systèmes d'injection d'eau peut entraîner une acidification du pétrole qui rend ce dernier inutilisable. Lorsque le développement des biofilms s'effectue dans les canalisations d'eau potable, il présente également un problème majeur car l'ajout de chlore ne permet pas d'éliminer totalement les bactéries fixées sur la surface.

Les biofilms sont aussi capables d'induire des problèmes dans le milieu marin. Des problèmes de corrosion directe ou indirecte de différents matériaux. Notons la formation de biofilms sur les coques des navires, appelé phénomène de « biofouling » (ou « biocolmatation »), qui conduit à une augmentation significative du poids et qui peut provoquer une augmentation des forces de frottement, d'où une diminution de la vitesse des bateaux (Coetser and Cloete, 2005). Cela entraîne des surcoûts énergétiques importants qui se traduisent par une surconsommation de carburant et ainsi des pertes économiques importantes et des problèmes environnementaux résultants des émissions de CO₂ par exemple.

L'industrie agro-alimentaire n'est pas épargnée par les problèmes induits par les biofilms contaminant des produits dans divers secteurs tels que les laiteries, les sucreries, les brasseries, etc. En gros, tout équipement non stérilisé abrite des micro-organismes qui peuvent s'organiser en biofilms en quelques heures dans des conditions favorables, permettant ainsi aux bactéries de devenir résistantes aux agents extérieurs grâce à la protection physique apportée par cette organisation.

Lutter contre le développement des biofilms est un enjeu important dans les différents domaines médicaux ou industriels. Leur élimination nécessite souvent la mise en jeu de composés nocifs qui polluent les sols et l'eau.

Cependant les biofilms peuvent aussi jouer des rôles positifs dans plusieurs domaines.

I.2.4.b.3. Les aspects positifs des biofilms

Les biofilms jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus : ils contribuent à la production et à la dégradation de la matière organique, au recyclage de l'azote, du soufre et de nombreux métaux. Dans le cas de la bio-minéralisation, l'eau accumulée dans les nappes souterraines et lors de son passage dans les sous-sols, subit une épuration naturelle par l'action des biofilms qui permettent la fixation de l'azote et du carbone (Banwart et al., 2007). Dans le cas de la bio-rémediation, les biofilms servent au traitement des déchets en transformant les matières organiques et inorganiques toxiques ou indésirables en sous-produits bénins (Fuchs et al., 1996). On peut citer comme exemple la réduction ou l'oxydation des contaminants de l'eau.

Ainsi, les nitrates et nitrites peuvent être réduits biologiquement en azote, aussi le perchlorate en eau et chlore et les solvants chlorés en éthylène et chlore. Les biofilms sont aussi utilisés pour la biolixiviation des minerais pour mobiliser les métaux lourds d'un sol ou d'un déchet. Dans le secteur de l'industrie agroalimentaire, les biofilms sont utilisés pour différents

raisons, par exemple, les bactéries lactiques interviennent dans la fabrication de fromages, du vin, des yaourts.

Un des meilleurs exemples pour mettre en évidence l'effet bénéfique des biofilms en lieu avec ce travail de thèse, est leur utilisation dans le domaine du traitement des eaux usées qui s'effectue grâce à l'utilisation de biofilms électroactifs (EA), qui ont la capacité de transférer des électrons, issus de l'oxydation des matières organiques, à une surface d'électrode solide (anode) permettant ainsi la production de « bio-électricité ».

1.2.4.c. Les biofilms électroactifs (EA)

Depuis environ un siècle, il est bien connu que les micro-organismes sont capables de convertir de la matière organique en électricité dans les PCMs ou ses dérivés. C'est-à-dire de pouvoir échanger des électrons avec des surfaces solides et conductrices (Erable et al., 2010).

A l'anode des piles à combustible microbiennes et en absence d'un accepteur final d'électrons tel que des substrats solubles (oxygène, nitrate, sulfate, etc.) ou solides (oxydes de Fe^{III} ou de Mn^{IV} par exemple), présents naturellement dans les milieux sédimentaires, certaines bactéries, organisées en biofilm électroactif (EA), transfèrent directement ou indirectement leurs électrons aux surfaces solides conductrices utilisées comme anodes (Lovley and Nevin, 2008) et (Babauta et al., 2012).

De manière générale, une culture de bactéries oxyde un donneur d'électron tel que l'acétate ou le glucose. Les électrons issus de cette oxydation sont transmis à l'anode par l'intermédiaire d'une ou plusieurs réactions d'oxydo-réduction. Le mécanisme de transfert électronique du biofilm électroactif à la surface d'une anode est assuré par le métabolisme respiratoire des microorganismes à l'anode (Bond et al., 2002), (Bond and Lovley, 2003).

1.2.4.d. Comportement anodique

1.2.4.d.1. Fonctionnement d'une bioanode microbienne

❖ *Respiration des bactéries électroactives et production d'énergie*

Dans les PCMs, les bactéries impliquées dans une bioanode microbienne doivent être capables de transférer leurs électrons à un accepteur d'électrons final solide. Parmi les bactéries identifiées, deux espèces servent de modèles, respectivement *Geobacter sulfurreducens* (Bond and Lovley, 2003) et *Shewanella oneidensis* (Ringeisen et al., 2006). Ces types de bactéries utilisent un métabolisme respiratoire et un accepteur final d'électrons extracellulaire solide

(l'anode) pour dégrader et oxyder progressivement des composés organiques, tels que les sucres, les lipides, les protéines et leurs dérivés (Bond et al., 2002), (Bond and Lovley, 2003). Ces composés subissent un ensemble de réactions enzymatiques ordonnées qui entraînent leur oxydation progressive jusqu'au CO_2 . Les bactéries extraient de l'énergie des composés organiques qu'elles dégradent, et la stockent sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), qui est considérée comme la source d'énergie biochimique universelle, ou l'utilisent comme pouvoir réducteur dans la cellule. Ce pouvoir réducteur prend la forme de coenzymes réduits tels que la NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et la FADH_2 (Flavine Adénine Dinucléotide). L'ATP et le pouvoir réducteur sont les principaux fournisseurs d'énergie, essentiel pour la survie, la croissance et la reproduction des bactéries.

Afin de comprendre ces phénomènes, nous allons détailler l'exemple de la métabolisation de l'acétate, le substrat le plus communément utilisé dans les études de bioanodes microbiennes (Figure 7).

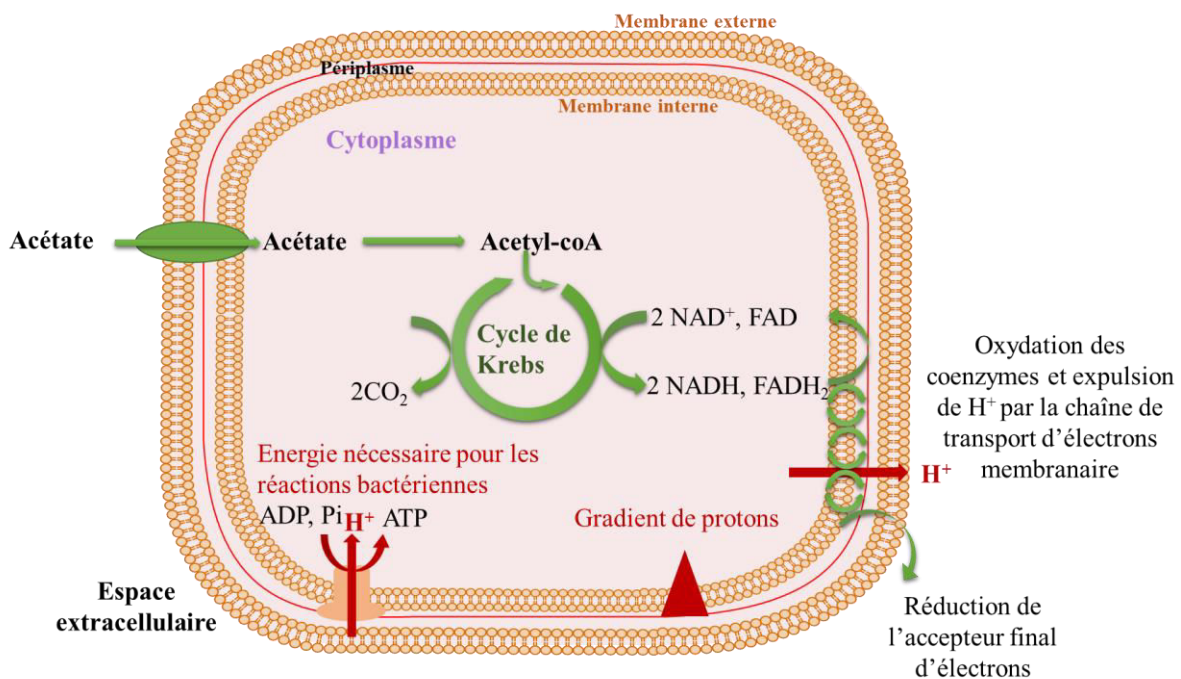


Figure 7 : La métabolisation de l'acétate chez les microorganismes électroactifs.

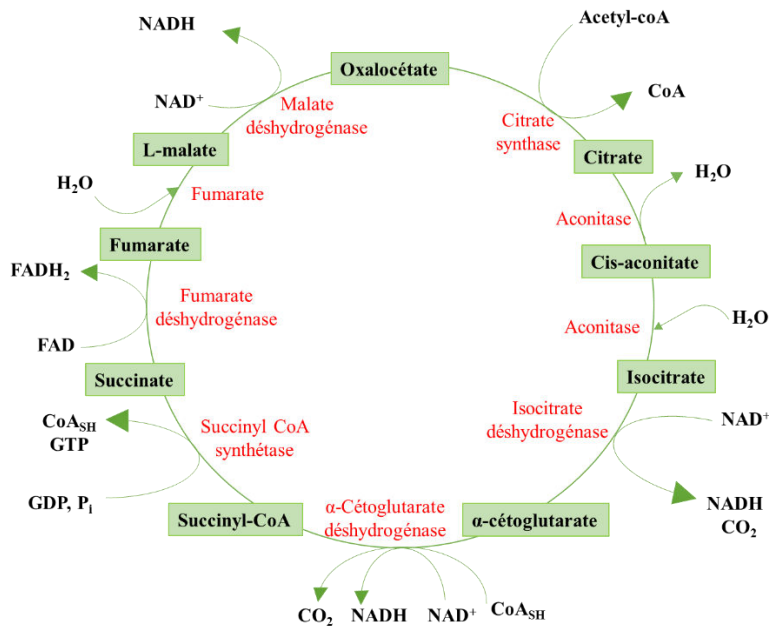


Figure 8: Schéma de cycle de Krebs.

Tout d'abord, l'acétate, absorbé par la cellule dans le cytoplasme, est converti en acétyl-coenzyme A (Acetyl-coA) par réaction avec un coenzyme A et de l'ATP. C'est la première étape de la dégradation de l'acétate. Cet intermédiaire poursuivra sa dégradation en subissant une oxydation complète grâce au cycle de Krebs (Figure 8), qui est une voie métabolique présente dans des métabolismes glucidiques, lipidiques et protéiques de la cellule et constituée de huit réactions. Quatre d'entre elles sont des réactions d'oxydation couplées à la réduction de coenzymes NAD⁺ et FAD. Par la suite, le NADH et le FADH₂ vont être réoxydés dans la chaîne de transport d'électrons localisée dans la bicouche phospholipidique membranaire interne des bactéries pour générer l'ATP par phosphorylation oxydative. Au cours de cette étape, une cascade de réactions d'oxydoréduction successives a lieu, depuis le transporteur d'électrons (coenzymes NADH ou FADH₂) jusqu'au dernier échange avec l'accepteur final d'électron extracellulaire. Certaines des réactions se produisant dans la chaîne de transfert des électrons vont entraîner l'expulsion de protons dans le périplasme, ce qui crée un gradient de protons transmembranaire. Ce gradient de protons va alimenter l'ATP synthase qui permet la conversion de l'ADP en ATP. Ce dernier représente la source énergétique cellulaire de base pour les êtres vivants.

Le transfert d'électrons via la cascade des réactions redox représente le mécanisme naturel de fermentation et de respiration cellulaire, la fermentation ayant préférentiellement lieu

en milieu anaérobie et la respiration cellulaire pouvant avoir lieu avec ou sans la présence de dioxygène.

Dans le cas de la respiration cellulaire, aérobie ou non, le donneur d'électrons est un composé organique et l'accepteur final d'électrons est un composé inorganique tel que le dioxygène (milieu aérobie) ou le nitrate (milieu anaérobie) ou encore, comme dans le cas de nombreuses bactéries électroactives, des substrats solides. C'est cette capacité qu'ont certaines bactéries employées dans les PCMs: elles utilisent comme accepteur d'électrons une surface d'électrode (une anode) (Lovley, 2011).

Pour les échanges électroniques des microorganismes vers l'électrode (bioanode), deux modes de transfert sont possibles ; transfert direct et transfert indirect. Dans le paragraphe qui suit, nous présentons les différents mécanismes mis en jeu par les bactéries pour transférer leurs électrons à une surface pour les deux modes de transfert.

I.2.4.d.2. Transferts électroniques directs ou indirects

Le transfert électronique vers l'électrode s'effectue selon plusieurs voies en fonction des espèces bactériennes présentes mais également de la composition du milieu.

Les deux modes de transfert, directs ou indirects, sont décrits selon plusieurs processus principaux: l'utilisation de protéines transmembranaires, la présence de pili sur les cellules bactériennes et l'utilisation de médiateurs endogènes ou exogènes.

I.2.4.d.2.1. *Transfert direct*

Ce mode de transfert d'électron implique un contact physique direct entre la membrane de la cellule bactérienne et la surface de l'électrode. Ce contact est assuré par des protéines membranaires situées sur la membrane externe des bactéries appelés Omc (Outer membrane cytochrome) capables de transférer les électrons de l'intérieur de la cellule bactérienne à l'extérieur vers un accepteur d'électron solide final (Schröder, 2007), (Lovley, 2008) et (Logan and Regan, 2006a).

Les cytochromes sont des protéines qui contiennent au moins un groupement prosthétique (non protéique) appelé hème (Figure 9), capable, dans le cas des PCMs, de s'oxyder à la surface d'une anode, assurant ainsi le transfert électronique. Dans le cas de *Geobacter sulfurreducens*, par exemple, le cytochrome de type *c* possède 12 hèmes (Pokkuluri et al., 2011). Chaque hème est constitué d'un noyau porphyrine complexé avec du fer, responsable du pouvoir réducteur du cytochrome avec le couple redox Fe^{3+}/Fe^{2+} . Ce cytochrome possède le rôle de relais

électronique pour la première couche des bactéries adhérees à la surface de l'électrode dans les PCMs.

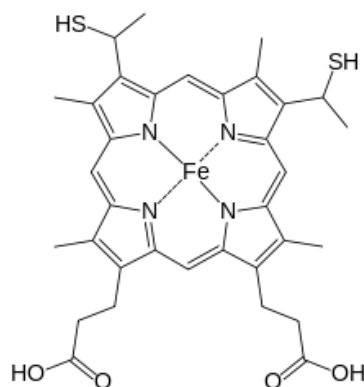


Figure 9: Structure de l'hème du cytochrome de type c.

Dans le cas de *G. sulfurreducens*, des études génomiques ont révélé que cette espèce possède plus de 100 cytochromes de type *c* et plusieurs d'entre eux sont impliqués dans des rôles importants dans la respiration de cet organisme dans diverses conditions (Shelobolina et al., 2007) et (Shi et al., 2007). Par exemple, un cytochrome de membrane externe, OmcB, est indispensable pour la réduction de l'oxyde de Fe (III) insoluble (Leang et al., 2003), et est l'accepteur d'électron terminal naturel pour les *G. sulfurreducens* dans des environnements souterrains.

À part les rôles de transfert d'électrons, il a été suggéré que certains cytochromes multi hèmes de *G. sulfurreducens* participent également à la régulation des gènes. Kim et al (2005 et 2006) ont montré le rôle des cytochromes OmcF, OmcG et OmcH dans le contrôle des niveaux d'expression de l'OmcB et, par conséquent, des niveaux de réduction de Fe (III). Une autre hypothèse proposée pour la présence d'un grand nombre de cytochromes multi-hèmes dans les *G. sulfurreducens* est la possibilité que ces molécules puissent servir de puits ou de condensateurs à électrons (Esteve-Núñez et al., 2008). Comme chaque hème peut transporter un électron, les protéines multi-hèmes peuvent contenir de nombreux électrons collectivement et permettre à l'organisme de survivre en l'absence d'accepteurs d'électrons externes. Une telle capacité permettrait la génération continue d'énergie fournissant un temps supplémentaire nécessaire pour que l'organisme atteigne de nouveaux environnements contenant les accepteurs d'électrons externes. Bien que plusieurs cytochromes multi-hèmes aient été identifiés pour jouer un rôle critique dans le métabolisme bactérien, les fonctions physiologiques exactes de la plupart des cytochromes multi-hèmes de *G. sulfurreducens* sont encore inconnues.

Les biofilms de *G. sulfurreducens* peuvent atteindre des épaisseurs de l'ordre de 50 μm ou plus (Franks and Nevin, 2010). Les bactéries, qui ne sont pas en contact avec la surface de l'électrode, ont alors besoin de produire des excroissances protéiques bactériennes conductrices appelées pili (nano-fils ou nano-câbles) capables de se connecter électriquement aux bactéries primo-adhérentes (Schröder, 2007), (Logan and Regan, 2006b), (Lovley, 2006), (Gorby et al., 2006), (Reguera et al., 2005).

Dans le cas de *G. sulfurreducens*, ces pili mesurent de 3 à 5 nm de diamètre et entre 15 et 20 μm de longueur. Reguera *et al.* (2006) ont montré que dans le cas d'une culture pure de ces bactéries, une augmentation de la production d'électricité d'un facteur supérieur à 10 résulte de la formation de pili dans le biofilm électroactif (Reguera et al., 2006).

Le mécanisme de transfert électronique à l'intérieur des pili reste un sujet scientifique extrêmement intéressant. Deux modèles sont alors proposés. Le premier fait l'hypothèse d'un mécanisme classique appelé « *superexchange model* » (Strycharz-Glaven and Tender, 2012). Ce modèle repose sur le transfert d'électrons entre les hèmes des cytochromes associés aux pili dans le biofilm. L'autre modèle propose une conductivité de type métallique dans les pili des biofilms (Malvankar et al., 2012). Pour le moment, aucune des deux théories ne fait consensus et de nouvelles expériences sont nécessaires afin de pouvoir élucider et expliquer le mécanisme de transfert dans le biofilm.

Le transfert d'électron direct, via les cytochromes membranaires ou via les pili conducteurs, est présenté dans le schéma ci-dessous (Figure 10).

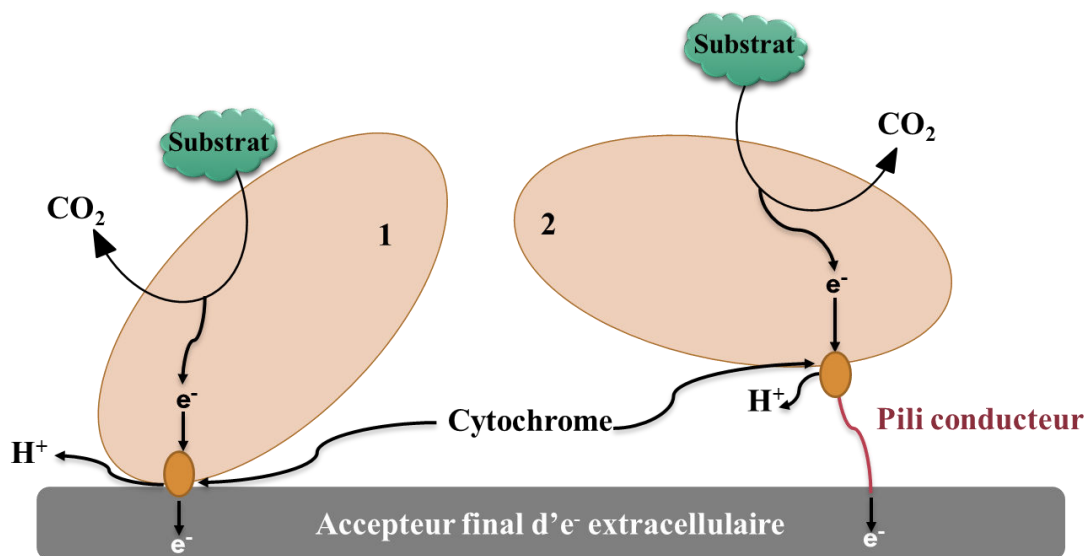


Figure 10 : Les deux mécanismes de transfert direct: 1 = via les cytochromes membranaires; 2 = via les pili conducteurs.

I.2.4.d.2.2. *Transfert indirect*

Les bactéries électroactives sont capables d'utiliser des médiateurs redox pour réduire des accepteurs d'électrons insolubles situés à grande distance (plusieurs nm). Un médiateur électrochimique est une molécule de petite taille capable de s'oxyder et de se réduire en cycles successifs. Sous sa forme oxydée le médiateur est capable de pénétrer dans la cellule bactérienne en traversant la membrane cellulaire de la bactérie, d'accepter des électrons issus des processus métaboliques à l'intérieur de la cellule, de sortir de cette dernière sous forme réduite pour se réoxyder à la surface de l'anode en lui transférant les électrons (Lovley, 2006)

Dans ce paragraphe, nous allons décrire le transfert électronique via des médiateurs redox sécrétés par la bactérie elle-même, ou ajoutés artificiellement.

❖ Médiateurs redox artificiels (médiateurs exogènes)

Les médiateurs, aussi appelés transporteur d'électrons, peuvent être naturellement présents dans le milieu à traiter, notamment les acides humiques ou certains composés soufrés (Stams et al., 2006), ou ajoutés artificiellement dans la solution. Dans ce cas, la bactérie profite de la présence de ces médiateurs pour transférer les électrons. Ces médiateurs ont prouvé leur efficacité comme le bleu de méthylène, le rouge de méthyle et le rouge neutre. Park *et al.* ont montré en 2000 que dans le cas d'*Escherichia coli* et suite à l'ajout du rouge neutre, comme médiateur en solution, le courant délivré par la bioanode est augmenté d'un facteur dix (Park and Zeikus, 2000).

❖ Médiateurs produits par la bactérie elle-même (médiateurs endogènes)

Certaines bactéries sont capables de synthétiser elles-mêmes leurs médiateurs, comme par exemple des quinones (Dong et al., 2000), flavines, cystéines ou phénazines (Rabaey et al., 2005a). *Shewanella oneidensis* est par exemple connue pour sécréter des médiateurs solubles de type riboflavine (Figure 11), ou flavine mononucléotide qui augmentent les cinétiques de transfert électronique (Burns et al., 2009) (von Canstein et al., 2008).

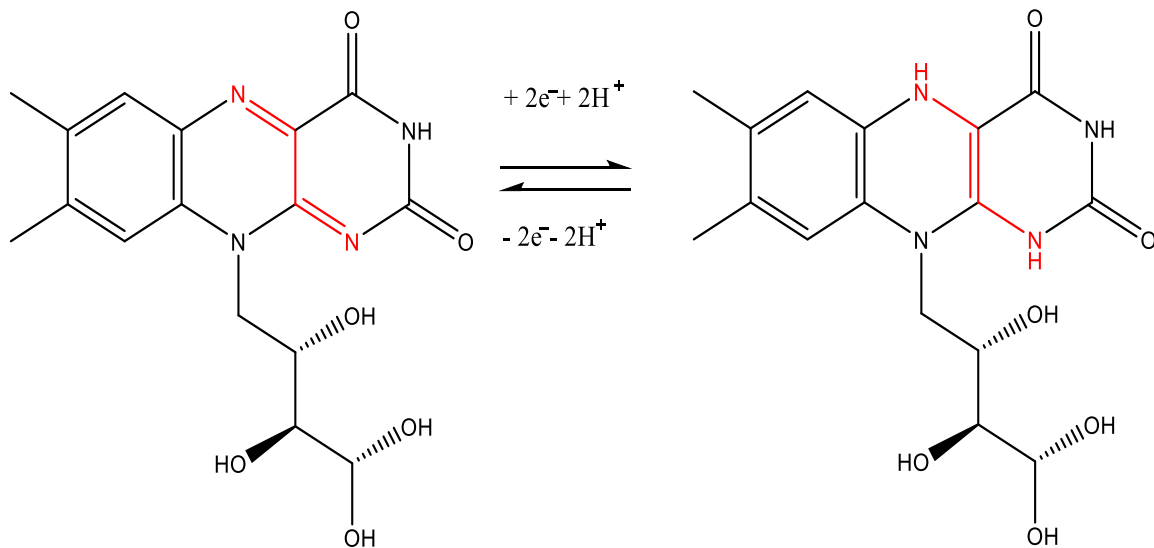


Figure 11: Oxydo-réduction de la riboflavine ($E_0 = -0.409$ V vs. Ag/AgCl à pH 7) produite par *Shewanella oneidensis*.

Les différents mécanismes de transfert indirect entre un biofilm et une surface d'anode dans le cadre des PCMs sont résumés sur la Figure 12 ci-dessous. Deux mécanismes redox sont possibles : via les protéines membranaires externes (cytochromes) ou via les médiateurs produits par la bactérie elle-même (médiateurs endogènes) ou les médiateurs artificiels (médiateurs exogènes).

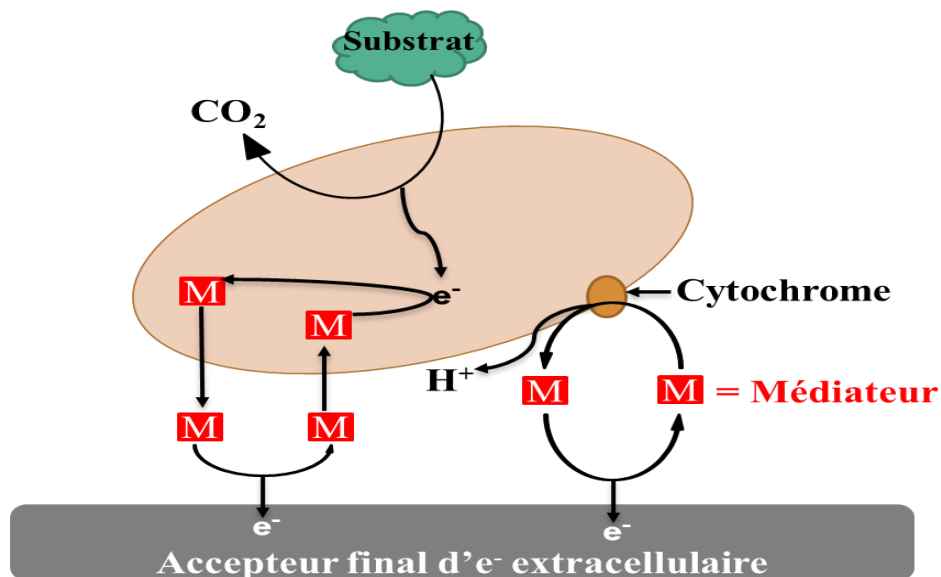


Figure 12: Transfert électronique indirect entre une bactérie et une surface d'anode. Deux mécanismes redox possibles: via les protéines externes membranaires (cytochromes) ou via des médiateurs endogènes ou exogènes (Schröder, 2007).

I.2.4.d.3. Constitution des biofilms électroactifs

Pour le développement de biofilms électroactifs dans les piles à combustibles microbiennes, il est possible d'utiliser deux types d'inoculum ; Inoculum mixte et inoculum simple.

❖ *Inoculum mixte*

C'est un échantillon de microorganismes divers qui peut être obtenu à partir d'environnements naturels tels que les eaux usées, les boues provenant d'usines de traitement des déchets, les sédiments marins, les sols, ou encore le terreau de jardin. Dans ces cultures bactériennes, une grande diversité de bactéries électroactives est présente, parfois en petite quantité. Ces espèces peuvent s'adapter aux changements de conditions environnementales et de ce fait sont considérées comme robustes dans les systèmes de PCMs. Des densités élevées de puissance jusqu'à 5 W/m^2 ont été obtenues dans le cas de sédiments marins (Erable et al., 2009) ou encore dans le cas des eaux usées domestiques (Liu et al., 2005a).

Une partie des inocula complexes naturels recensés dans la littérature est regroupée dans le Tableau 3, ci-dessous (Pocaznoi, 2012).

Inoculum	Substrat	Matériau de l'électrode	J_{\max} (mA/m ²)	P_{\max} (mW/m ²)	Référence
Eaux usées domestiques	Acétate	Papier de carbone	4200	1330	(Liu et al., 2005a)
Sédiments marins	Acétate	Graphite	1200	5000	(Erable et al., 2009)
Boues activées	Acétate	Tissu de carbone	2000	550	(Nam et al., 2010)
Sol	Acétate	Tissu de carbone	-	44	(Dunaj et al., 2012)
Boues prélevées d'une station d'épuration	Lactate	Graphite	1750	790	(Park and Zeikus, 2003a)
Eaux usées hospitalières	Acétate	Graphite	-	48	(Rabaey et al., 2005b)
Boues anaérobies issues de brasseries	Sucrose	Carbone vitreux	1000	170	(He et al., 2005a)

Tableau 3: Exemples de densités de courant et densités de puissances obtenues avec divers inocula complexes naturels.

D'après le tableau, les densités de courant et de puissance varient en fonction des inocula utilisés. Prenons comme exemple la densité de puissance qui est de l'ordre de 44 mW/cm² dans le cas du sol comme inocula, qui atteint jusqu'à 5000 mW/cm² dans le cas de sédiments marins. Ces données ne sont cependant pas comparables car les expériences ont été effectuées dans des PCMs avec des designs et conditions différents.

❖ Cultures pures

Plusieurs souches pures sont capables de transférer des électrons à la surface d'une électrode. Les souches ont été isolées à partir de biofilms EA multi-espèces ou ont été sélectionnées par criblage systématique de collections de micro-organismes. Elles servent maintenant de souches modèles pour comprendre les phénomènes de transfert électronique à l'interface bactérie/électrode.

Plusieurs souches pures ont été étudiées aussi bien à l'anode qu'à la cathode; nous pouvons ainsi citer *Shewanella oneidensis* (Peng et al., 2010), *Pseudomonas* (Yong et al., 2011), ou encore *Desulfobrio desulfuricans* (Cordas et al., 2008). Pour ce dernier exemple, Cordas *et al.* (2009) utilisent une culture pure de *D. desulfuricans* pour produire du courant sur la surface d'un acier inoxydable (254 SMO) ou d'un graphite polarisé à différents potentiels (-0,6, -0,4, -0,2, 0,2, 0,4 vs ECS). Les meilleurs rendements ont été obtenus à -0,4 V/ECS.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons testé une culture mixte de bactéries issues des eaux usées de la station d'épuration de Beaurade (Rennes, France).

I.2.4.e. Comportement cathodique

Dans les PCMs, la production de courant dépend étroitement des performances de la cathode, qui reste souvent un élément limitant.

I.2.4.e.1. Fonctionnement de la cathode d'une PCM

Dans le compartiment cathodique, la cathode sert à catalyser la réduction de diverses espèces. La majorité des PCMs, utilisent le dioxygène en tant qu'accepteur final de nombreux processus d'oxydoréduction, car il est facilement disponible dans l'air, il conduit à un produit final non toxique (H_2O) et son potentiel d'oxydation est élevé (Franks and Nevin, 2010). Cependant la cinétique de sa réduction à la surface des électrodes de carbone est lente et conduit à une forte surtension, considérée comme l'un des facteurs les plus limitants dans les PCMs (Gil et al., 2003). Ces inconvénients rendent son utilisation en technologie dépendante de catalyseurs tels que le platine ou d'autres métaux (Cheng et al., 2006a), (Zhao et al., 2005). Différents oxydes métalliques ont aussi été testés comme catalyseurs cathodiques, notamment les oxydes de manganèse (MnO_2) (Roche and Scott, 2009), (Jiang et al., 2011), les oxydes de cobalt (CoO_2) (Li et al., 2011), (Mahmoud et al., 2011) et les oxydes de plombs (PbO_2). D'autres électrodes composées de phtalocyanine (Zhao et al., 2006) ,(Cheng et al., 2006b), (Zhuang et al., 2010), ont été utilisées dans le compartiment cathodique. L'utilisation de ces électrodes abiotiques comme catalyseur de la réduction de l'oxygène moléculaire a comme principal inconvénient d'être coûteuse surtout pour les applications à grande échelle, et de ne pas convenir aux applications à long terme, d'être rares et peu adaptés aux processus de traitement des eaux usées.

Afin de s'affranchir des défauts des catalyseurs métalliques, les systèmes PCMs de laboratoire utilisent généralement du ferricyanure de potassium comme accepteur d'électrons (Nevin et al., 2008), (Logan et al., 2006a), (Park and Zeikus, 2003b) et (Yi et al., 2009).

L'avantage majeur du ferricyanure de potassium est sa cinétique de réduction rapide qui permet à la cathode de travailler à un potentiel proche du potentiel à circuit ouvert. Ceci permet alors aux PCMs de fournir des densités de puissance significatives du fait du potentiel constant et élevé à la cathode (Lee et al., 2008). Toutefois, l'utilisation de ferricyanure à l'extérieur du laboratoire n'est pas pratique en raison de la toxicité et de la réoxydation insuffisante par

l'oxygène nécessitant un remplacement régulier du catholyte (Rabaey et al., 2005c),(Logan et al., 2006b).

Dans le cadre de nos travaux et afin de se concentrer sur les phénomènes anodiques, on a choisi de travailler avec une cathode non limitante et réduisant le ferricyanure (0.1 M).

1.2.4.e.1.1. Les biocathodes

Afin d'obtenir un catalyseur approprié pour la réduction de l'oxygène dans un système PCM, la recherche étudie l'utilisation d'une biocathode basée sur des biofilms capables de réduire le dioxygène en H₂O. Ces micro-organismes sont peu coûteux, possèdent une durée de vie importante grâce à la division cellulaire et sont adaptés au processus de traitement des eaux usées.

Contrairement aux bioanodes, la découverte de la capacité de certains consortiums de microorganismes à catalyser des réactions de réduction à la cathode est bien plus récente (Gregory et al., 2004a). Les biocathodes utilisent des micro-organismes, organisés en biofilms sur la surface de l'électrode, comme catalyseurs de la réaction de réduction de l'oxygène (Bergel et al., 2005) ou de composés organiques ou minéraux dissous dans le milieu tels que les nitrates (Viridis et al., 2008a) ou les sulfates. Dans ce paragraphe, nous reviendrons sur les connaissances disponibles concernant les biocathodes microbiennes catalysant la réduction de l'oxygène.

Les biocathodes aérobies qui catalysent la réaction de réduction de l'oxygène sont en principe des bons substituts aux catalyseurs chimiques à la cathode, puisqu'elles sont peu onéreuses, robustes et durables. Récemment, Milner et al. ont montré que la PCM avait une densité de puissance de 62 $\mu\text{W cm}^{-2}$ en présence d'une biocathode et de 7 $\mu\text{W cm}^{-2}$ dans le cas d'une électrode de feutre à base de carbone (Milner et al., 2016).

Plusieurs études ont rapporté l'utilisation de biocathodes aérobies et une large gamme d'espèces bactériennes appartenant aux Alphaprotéobactéries (Clauwaert et al., 2007a), Du et al., 2014 et Zhang et al., 2011), Betaprotéobactéries (Clauwaert et al., 2007a, Zhang et al., 2011, Chen et al., 2008a, Rabaey et al., 2008, Sun et al., 2012 et Zhang et al., 2012), Gammaprotéobactéries (Clauwaert et al., 2007a, Du et al., 2014, Zhang et al., 2011, Rabaey et al., 2008, Rothballer et al., 2015, Chung et al., 2011, Reimers et al., 2006, Schampelaire et al., 2010, Strycharz-Glaven et al., 2013, Wang et al., 2015 et Chen et al., 2010), Bacteroidetes (Chen et al., 2008a, Rabaey et al., 2008, Chen et al., 2010 et Xia et al., 2012), et d'autres groupes moins connus (Du et al., 2014, Rimboud et al., 2015 et Blanchet et al., 2014), ont été identifiés

comme étant dominants dans les biocathodes aérobies. Ces espèces proviennent de nombreuses sources d'inoculum, notamment les boues de station d'épuration, les sols ou encore l'eau de mer.

Dans le cas des biocathodes anaérobiques, réduisant les nitrates, il s'agit le plus souvent des bactéries dénitrifiantes (Puig et al., 2011, Gregory et al., 2004a, Clauwaert et al., 2007b, Lefebvre et al., 2008 et Viridis et al., 2008b). Pour les biocathodes réduisant le CO₂ en acides organiques, les bactéries impliquées sont des bactéries acétogènes et des bactéries hydrogénotrophes.

Cette multiplicité des réactions et des espèces rend difficile la compréhension du mécanisme de transfert électronique de la cathode au biofilm notamment dans le cas d'une biocathode microbienne réduisant l'oxygène moléculaire. Néanmoins, certains auteurs ont récemment proposé que les mécanismes à la cathode pourraient être similaires à ceux proposés à l'anode, c'est-à-dire que des cytochromes ayant des potentiels redox plus élevés que dans le cas des bioanodes seraient utilisés et transfèreraient leurs électrons jusqu'à l'oxygène (Rosenbaum et al., 2011).

1.2.4.f. Architecture de la PCM

L'architecture des PCMs actuelles se basent sur deux grands types ; les PCMs à deux compartiment et les PCMs à un seul compartiment.

1.2.4.f.1. Les PCMs à deux compartiments

Les piles à deux compartiments sont les plus répandues en laboratoire. Elles sont composées d'un compartiment anodique et d'un compartiment cathodique séparés par une membrane échangeuse d'ions (MEI) assurant le transfert ionique entre les deux compartiments. Ce type de design est utilisé si la réaction cathodique est abiotique et met en jeu un composé soluble comme le peroxyde d'hydrogène ou le ferricyanure (Fe(CN)₆³⁻), ou si la réaction cathodique utilise des biocatalyseurs (biocathode).

Le design le plus anciennement utilisé dans ce type de piles dites PCM en H, est composé de deux bouteilles (Figure 13, A), servant de compartiments pour les électrodes et l'électrolyte. Elles sont reliées par un tube dans lequel se trouve une membrane échangeuse d'ions. Cependant, ce système possède une grande résistance interne qui résulte de la présence de la membrane et de la distance entre les deux électrodes. En raison de la chute ohmique, l'augmentation de la résistance interne de la pile conduit à une diminution de la performance

de ce type de dispositif qui peut être aussi avoir une géométrie rectangulaire (Figure 13, B), (Allen and Bennetto, 1993a).

Pour améliorer les performances des biopiles, Ringeisen *et al.* ont présenté une pile à deux compartiments avec un design miniaturisé (Figure 13, C) dont le volume est de 2 cm³ et ayant permis d'atteindre de fortes densités de puissance entre 3 et 4,2 W/m² (Ringeisen et al., 2006).

He et al. ont présenté des biopiles fonctionnant avec une alimentation continue en substrat (Figure 13, D et E). Ce design est plus approprié pour les PCMs destinées à traiter les eaux usées (He et al., 2005b, He et al., 2006). Les électrodes mises en jeu dans ces études sont constituées de lits granulaires de carbone activées dans le but d'augmenter la surface d'adhésion des microorganismes. Afin de diminuer la résistance interne de premier design (Figure 13, D) qui est de l'ordre de 84 Ω, l'espace entre ces électrodes est réduit en plaçant une cathode en U, entourée par une membrane, dans le compartiment anodique (Figure 13, E). Dans ce design la résistance interne est faible et évaluée à 4 Ω. Des densités de puissance maximales de 29,2 W/m³ ont été atteintes. L'inconvénient de ce design est que les membranes qui servent de séparateur sont relativement chères, elles risquent de se colmater et ont souvent des résistances élevées qui font diminuer les performances des biopiles.

Un autre type de PCM a été étudié par Min et Logan : la pile à combustible microbienne à plaque plate (flat plate microbial fuel cell ; FPMFC, Figure 13, F) (Min and Logan, 2004). Dans cette étude, l'équipe de Logan a testé la capacité d'une FPMFC contenant des électrodes directement liées à la membrane échangeuse de protons. La cathode, constituée d'un tissu de carbone contenant du platine en tant que catalyseur, a été pressée à chaud sur une membrane de Nafion puis mise en contact avec une feuille de papier carbone formant l'anode. L'air sec a été passé à travers la chambre cathodique pour fournir de l'oxygène comme accepteur d'électron. L'anode, est alimentée en eau usée domestique ou en milieu électrolytique contenant des composés organiques purs. La densité de puissance maximale, obtenue dans ce cas, est de 72 mW/m² pour les eaux usées domestiques. Ce qui représente une augmentation de 2,8 fois par rapport à celle précédemment obtenue dans des conditions d'écoulement continu avec un autre type de réacteur (PCM à une seule chambre) (Liu et al., 2004).

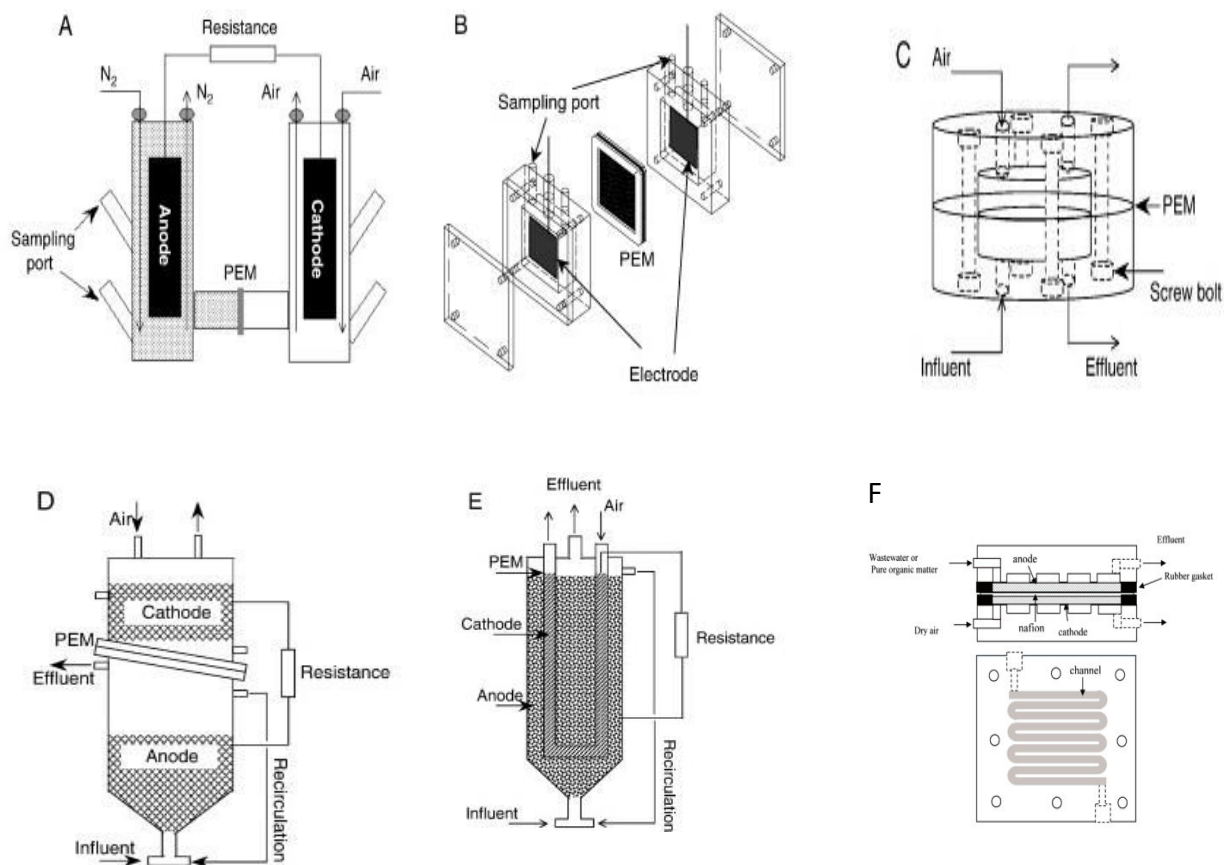


Figure 13 : PCMs à deux compartiments ; (A) Cellule de type « H » d'après (Delaney et al., 1984). (B) cellule rectangulaire d'après (Allen and Bennetto, 1993b). (C) cellule miniature d'après (Ringelsen et al., 2006). (D) cellule à lits granulaires d'après (He et al., 2005b). (E) cellule à lits granulaires et cathode en « U » d'après (He et al., 2006). (F) cellule plate à écoulement serpentin d'après (Min and Logan, 2004). Les schémas sont adaptés de Du et al (Du et al., 2007b).

I.2.4.f.2. Les PCMs à un compartiment

Les piles à un compartiment unique sont constituées d'un compartiment anodique et d'une cathode à air, située à une extrémité de la pile avec une face tournée vers l'air et une autre face vers l'électrolyte aqueux. Dans ce type de pile, l'utilisation d'une membrane échangeuse d'ions peut être évitée grâce à l'utilisation de cathode à diffusion gazeuse recouverte de polytétrafluoroéthylène (PTFE) pour limiter la diffusion de l'air dans le compartiment anodique. Dans cette géométrie les performances des PCMs sont plus faibles qu'en présence de la membrane échangeuse d'ions en raison de la diffusion de l'oxygène vers la chambre anodique. En effet, cette diffusion est de 0.05 mg/h en présence de membrane d'échange

cationique, alors qu'en absence de cette membrane, la diffusion est de 0.18 mg/h selon des études faites par Liu et al (Liu et al., 2004).

Des architectures très différentes sont également rencontrées dans le cas des PCM à un seul compartiment (Figure 14).

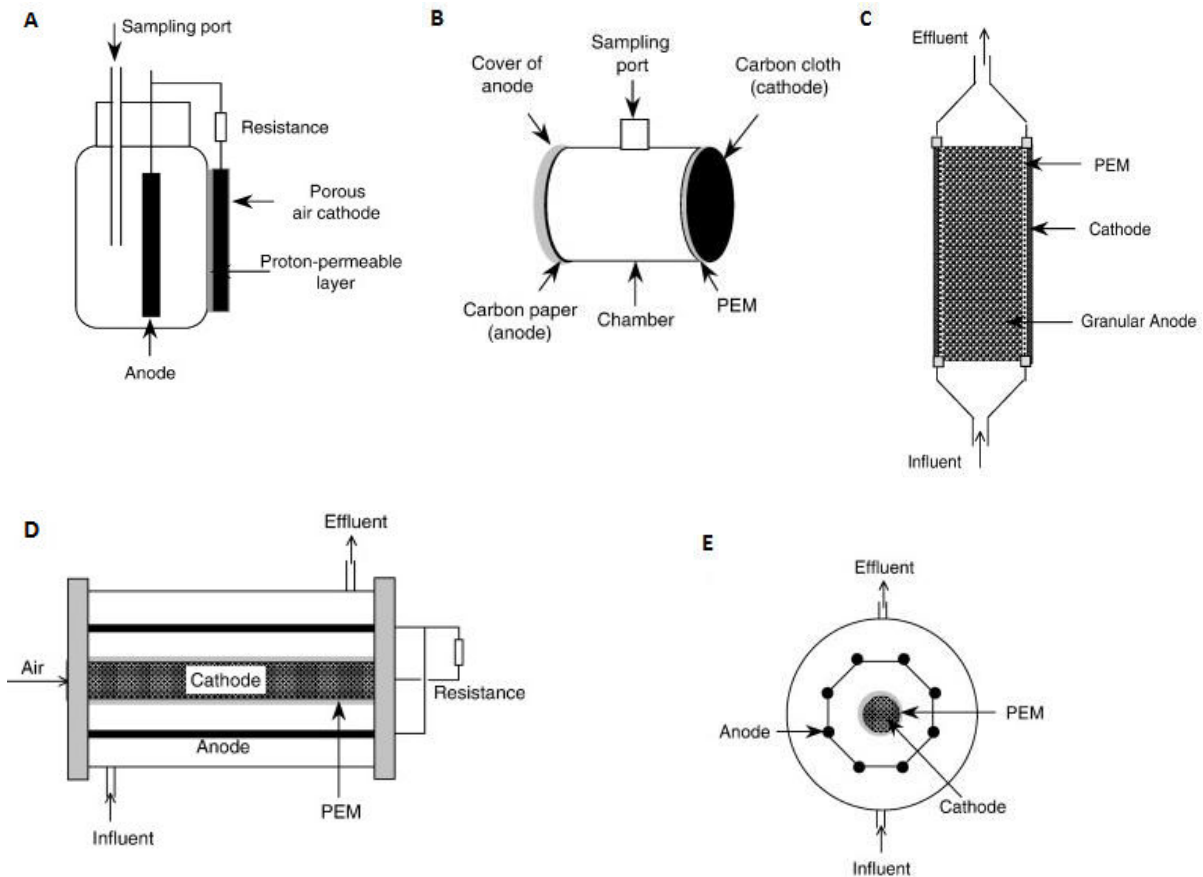


Figure 14 : Différents design de PCM à cathode à air. (A) PCM avec une couche de d'échange cationique recouvrant l'intérieur de la fenêtre sur laquelle la cathode est montée (Park and Zeikus, 2003c) ; (B) PCM cylindrique avec l'anode et la cathode en vis-à-vis (Liu and Logan, 2004) ; (C) PCM tubulaire avec la cathode à l'extérieur (Rabaey et al., 2005d) ; (D et E) PCM contenant huit électrodes de graphite en tube comme anodes et entourant une cathode unique (vue du profil et de face) (Liu et al., 2004). Illustrations schématiques issues de Du et al (Du et al., 2007c).

Pour augmenter les performances des PCM, d'autres modèles ont été développés, notamment l'utilisation de modules de PCM connectés en série ou en parallèle. Les PCM connectées en série assurent l'augmentation de la tension avec un même courant qui circule à travers chaque module. Ces systèmes sont présentés dans la Figure 15 ci-dessous.

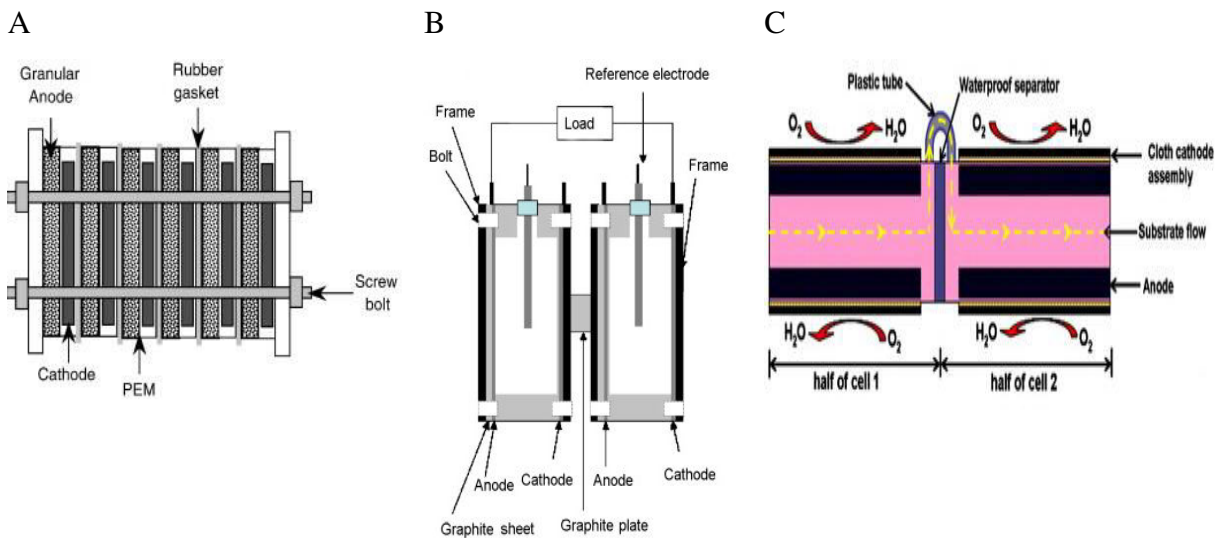


Figure 15 : (A) MFC empilées composées de six unités à lit granulaire (Aelterman et al., 2006) schématisées par Du et al (Du et al., 2007c); (B) empilement de deux cellules (Oh and Logan, 2007); (C) PCMs en série (Zhuang et al., 2012).

I.2.4.g. Applications des piles à combustibles microbiennes

Les piles à combustible microbiennes trouvent des applications dans plusieurs domaines discutés ci-après.

I.2.4.g.1. Traitement des eaux usées

Les microorganismes présents dans l'eau usée domestique ou industrielle sont capables de dégrader les matières organiques présentes en grande concentration dans ce milieu (Rabaey et al., 2007), (Lovley, 2008). Les bioanodes sont également capables d'oxyder ces substrats organiques dans une large gamme de concentration même lorsqu'ils sont très dilués. À la cathode aussi d'autres procédés de traitements de pollutions spécifiques sont possible. Viridis et al. (2010) ont mis au point une pile à combustible microbiologique permettant de traiter de l'eau usée modèle, contenant l'acétate comme polluant organique et l'ammoniac comme polluant inorganique (Viridis et al., 2010). L'utilisation des PCMs représente alors à plus ou moins long terme une alternative économique intéressante aux procédés actuels de traitement des eaux usées puisqu'elles permettent en principe de dépolluer tout en produisant de l'électricité.

Le premier prototype de PCM à grande échelle a été conçu en Australie (Queensland) dès 2005 dans une brasserie de la société Foster (Figure 16). Le prototype est constitué de 12 modules de 3 mètres de hauteur chacun et de 1 m³ de volume. Les anodes sont en brosses de

fibres de carbone et les cathodes sont en brosses de graphite. On a peu d'information sur les performances de cette biopile (Ahn and Logan, 2010). On sait seulement que les performances sont limitées par la faible conductivité de l'effluent de brasserie à traiter.



Figure 16 : PCM tubulaire.

I.2.4.g.2. Dessalement des eaux de mer

Le dessalement de l'eau de mer est une option pour produire de l'eau potable dans de nombreuses régions du monde, mais la plupart des technologies de dessalement de l'eau sont coûteuses (Shannon et al., 2008). Les principales technologies de dessalement de l'eau de mer qui ont été utilisées sont l'osmose inverse, l'électrodialyse qui nécessite de l'énergie pour séparer les espèces ioniques, la distillation ainsi que le dessalement alimenté par des énergies renouvelables, telles que l'électricité solaire et éolienne (Mathioulakis et al., 2007). Les biopiles peuvent être couplées au dessalement de l'eau de mer qui repose sur le transfert d'espèces ioniques en utilisant le courant généré par les bactéries (Cao et al., 2009). La Figure 17 ci-dessous présente le dispositif microbien de dessalement.

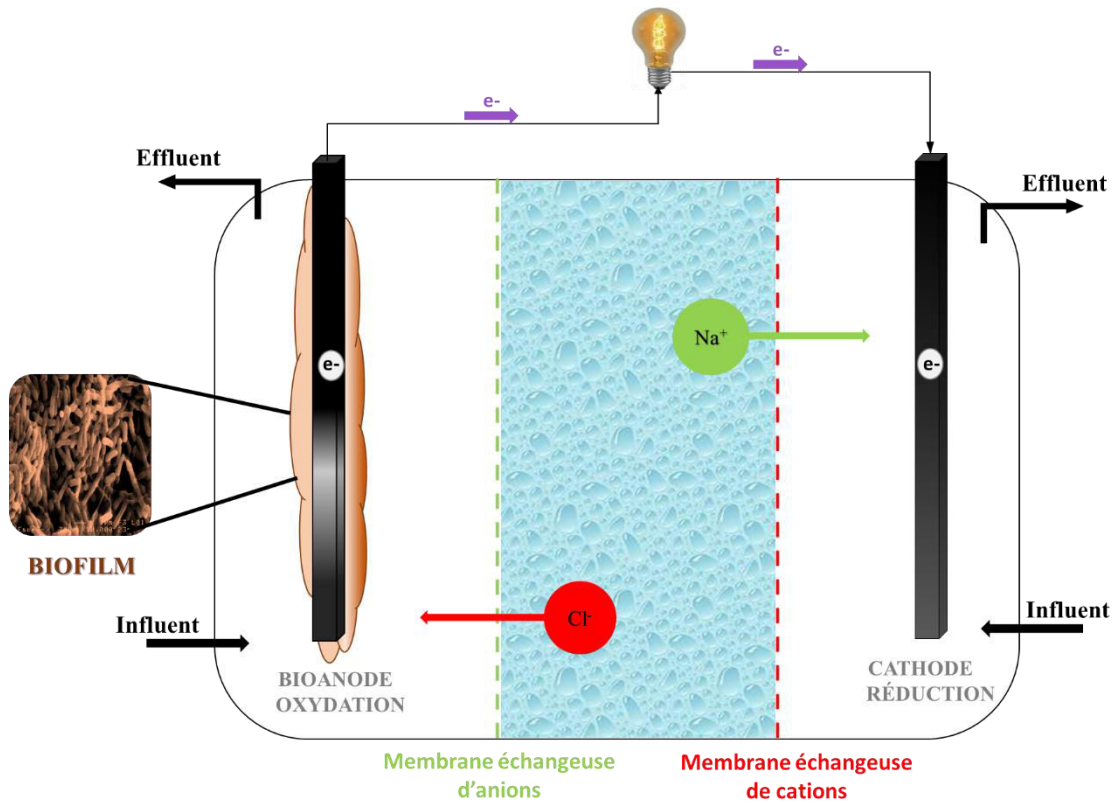


Figure 17 : Cellule microbienne de dessalement à trois compartiments
(adaptée de Cao et al., 2009).

Dans ce cas, la cellule de dessalement microbienne se compose de trois compartiments ; un compartiment anodique, un compartiment cathodique et un compartiment intermédiaire contenant de l'eau de mer. Les compartiments anodique et central sont séparés par une membrane échangeuse d'anions (MEA). Le compartiment cathodique est séparé du compartiment central à l'aide d'une membrane échangeuse de cations (MEC). La production des électrons au niveau de la bioanode suivie de la libération de protons en solution conduit au transfert des ions chlorure vers le compartiment anodique tandis que les ions sodium sont transférés dans le compartiment cathodique. Cette perte d'espèces ioniques de la chambre centrale entraîne le dessalement de l'eau sans pressurisation de l'eau ou l'utilisation de solutions de tirage (Cath et al., 2006), et aucune pression d'eau ou d'énergie électrique n'est requise. En parallèle, l'électricité est générée pendant que l'eau est dessalée.

Comme dans le cas de traitement des eaux usées, une des limites de ce système reste de le développer à grande échelle ce qui nécessite de continuer les recherches. Une stratégie développée par Zhang and He (2015) (Figure 18) consiste à augmenter le nombre de biopiles tubulaires précédemment développées pour former un système avec un volume de liquide total

de 105 L. Les objectifs spécifiques de cette étude étaient dans un premier temps d'examiner la faisabilité de ce système de traitement des eaux usées synthétiques et de l'eau de mer, dans un deuxième temps de comprendre les problèmes liés à l'exploitation systématique de plusieurs modules de biopiles de dessalement, puis d'étudier l'influence de l'application d'une tension électrique externe sur la performance du système et la consommation d'énergie, et enfin d'étudier les effets des concentrations en substrats organiques dans les eaux usées synthétiques. Ce système a été exploité en continu pendant plus de 10 mois. L'application d'une tension électrique externe a considérablement augmenté la génération de courant de 670 mA (pas de tension externe), ce qui correspond à un dessalement de $3,7 \text{ kg m}^{-3} \text{ jour}^{-1}$, jusqu'à 2000 mA lorsqu'un potentiel de 1,1 V est appliqué, ce qui correspond à un dessalement de $9,2 \text{ kg m}^{-3} \text{ jour}^{-1}$.

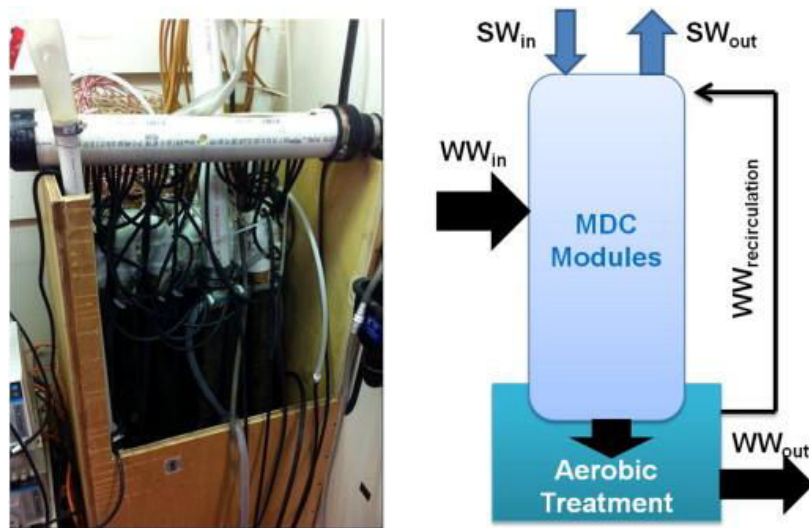


Figure 18 : Prototype de la cellule microbienne de dessalement (Zhang and He, 2015).

I.2.4.g.3. Production d'énergie

Les Piles à combustible microbiennes offrent des nouvelles possibilités pour la production durable d'énergie à partir de composés biodégradables tels que les matières organiques (Du et al., 2007b), (Nor et al., 2015), (Watson and Logan, 2010).

Malgré l'évolution des PCMs comme alternatives pour la production d'énergie renouvelable, la génération d'énergie par cette technologie reste encore très faible (Tender et al., 2002). Les PCMs sont particulièrement adaptées pour alimenter de petits systèmes de télémétrie et des capteurs sans fil qui n'ont que des exigences de faible puissance dans des régions où l'accès à l'électricité est difficile (Shantaram et al., 2005). Un moyen possible pour

résoudre le problème des faibles puissances produites est de stocker l'électricité dans des appareils rechargeables et ensuite de distribuer l'électricité aux utilisateurs finaux (Ieropoulos et al., 2003).

L'utilisation de PCM à grande échelle est ainsi difficilement envisageable à ce stade (Chen et al., 2008b) et la majorité d'entre elles sont de petites taille et construites dans les laboratoires.

I.2.4.g.4. Production d'hydrogène

Les PCM peuvent être facilement modifiées pour produire de l'hydrogène au lieu de l'électricité (Liu et al., 2005b), (Das and Veziroglu, 2008), (Call and Logan, 2008) et (Holzman, 2005).

Ces biopiles consomment de l'électricité (renouvelable si possible) dans une configuration connue sous le nom de cellule d'électrolyse microbienne et produisent de l'hydrogène à la cathode tout en oxydant la matière organique à la bioanode microbienne.

Dans les conditions de fonctionnement normales d'une PCM, les protons libérés par la réaction anodique migrent vers la cathode pour se combiner avec de l'oxygène pour former de l'eau. L'hydrogène est formé à la cathode par la réduction des protons ou de l'eau. Logan et al (2010) ont appliqué un potentiel de 250 mV aux bornes d'une PCM, les protons et les électrons produits par la réaction anodique sont combinés à la cathode pour former des protons qui vont être réduits en dihydrogène.

I.2.4.g.5. Bioremédiateur

Pour traiter les sols et les eaux souterraines pollués, il est nécessaire de mettre en œuvre des technologies qui consomment peu d'énergie pour transformer *in situ* les contaminants en composés peu ou pas toxiques (Banwart et al., 2007). Le bioremédiateur assure alors la décontamination de milieux pollués par dégradation chimique de ces polluants ou par l'intermédiaire de bactéries.

En 2004, Gregory et al (2004b) ont exploré l'idée d'utiliser des biopiles microbiennes pour la bioremédiation de nitrate *in situ*. Dans ce cas la bioélectrode est la cathode qui sert à réduire les polluants par le biofilm développé à la surface, qui peut être soit issu d'une culture mixte soit d'une culture pure de *Geobacter metallireducens* dans des conditions anaérobiques. Dans les biopiles microbiennes, *Geobacter* est connu pour la production de l'électricité (Bond et al., 2002), (Bond and Lovley, 2003) en utilisant les anodes comme accepteur d'électron, mais

le *Geobacter* est aussi capable d'utiliser les électrons de la cathode (Gregory et al., 2004b). Lorsqu'un potentiel de 500 mV (vs Ag/AgCl) est appliqué, le nitrate (NO_3^-) est réduit en nitrite (NO_2^-) par une culture pure de *Geobacter metallireducens*. Le même groupe de recherche a aussi montré que des cultures de *Geobacter sulfurreducens* étaient capables de réduire le fumarate ($\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_4^-$) en succinate ($\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4^-$). Dans d'autres cas, par exemple la contamination souterraine par de l'uranium (VI), une biocathode microbienne utilisée comme donneur d'électron permet la précipitation sur sa surface de l'uranium sous forme d'uranium (IV) insoluble qui est ainsi facilement extrait du sol. L'électrode est ensuite lavée par un simple traitement au bicarbonate (Lovley, 2006).

I.2.4.g.6. Biocapteur environnementaux

Les PCM sont aussi envisagées comme biocapteurs environnementaux (Dai and Choi, 2013). La mesure de la demande biologique en oxygène (DBO) d'un effluent est l'une des applications visées par les biopiles pour évaluer le taux de matière organique contenue dans cet effluent. La méthode la plus utilisée pour mesurer la concentration en matière organique biodégradable dans les eaux usées est la DBO_5 introduire par l'American Public Health Association Standard Methods Committee en 1936. Cette technique consiste à mesurer l'oxygène dissous consommé par les microorganismes pour la dégradation de la matière organique (ou le DBO) après 5 jours d'incubation à 20°C. Une mesure de la concentration initiale en oxygène est effectuée dans un premier temps. Après 5 jours, la concentration résiduelle en oxygène est à nouveau mesurée. Ainsi, la différence entre ces deux concentrations représente le DBO_5 .

Les piles à combustible microbiennes ont été utilisées comme capteurs capables de suivre en continu l'évolution de la DBO d'un effluent. Plusieurs capteurs ont été mis en place sur ce principe (Kim et al., 2003, Chang et al., 2004, Chang et al., 2005). L'étude de Kim et al. par exemple, a montré qu'à partir d'une biopile qui utilise des boues activées comme inoculum, la charge électrique (exprimée en Coulomb) était proportionnelle à la DBO des eaux usées. En plus de son efficacité, cette PCM a démontré une grande stabilité puisqu'elle a fonctionné pendant 5 ans.

I.3. Conclusions

En conclusion, de ce premier chapitre introductif, nous avons cherché à présenter les piles à combustible microbiennes (PCMs) et à décrire les bases concernant leur principe de fonctionnement ainsi que les mécanismes mis en jeu lors de l'oxydation d'une source carbonée par un biofilm électroactif développé sur une anode. Nous avons aussi décrit les différents designs des biopiles. Nous avons vu que les biopiles peuvent être employées dans diverses applications.

Les éléments discutés dans ce chapitre montrent que l'interface entre le biofilm microbien et l'électrode ainsi que le milieu électrolytique sont des facteurs environnementaux essentiels influençant le développement, la structure et l'adhésion de biofilm bactérien à l'anode. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à ces deux facteurs en examinant l'effet d'une modification de la surface de l'anode d'une part, et de l'ajout de liquides ioniques dans l'électrolyte d'autre part.

Le chapitre III est consacré à l'étude d'une bioanode modifiée par une couche organique fine d'unités pyridine. Cette couche organique est obtenue via le greffage covalent de radicaux pyridyles sur la surface de l'électrode en utilisant la réduction électrochimique de cations diazopyridinium. Les surfaces modifiées seront étudiées et caractérisées par différentes techniques d'analyse. L'interface obtenue est susceptible d'influer sur le temps de formation du biofilm, la quantité de microorganismes attachés ainsi que leur connexion électrique. Nous verrons quel est l'impact de cette stratégie sur le fonctionnement de nos PCMs.

Dans le chapitre IV, des liquides ioniques à base de cations imidazolium ont été ajoutés à l'électrolyte. Les liquides ioniques sont des sels liquides à température ambiante. Leurs propriétés uniques, notamment pression de vapeur négligeable, inflammabilité et leur grande capacité de solvatation, ont conduit à les classer comme « solvant vert », tout en envisageant leur emploi dans les biotechnologies. Toutefois, le comportement de communautés bactériennes en présence de ces sels reste encore peu connu. Nous verrons l'effet de l'ajout de différents liquides ioniques hydrophiles et hydrophobes sur le développement de biofilms bactériens électroactifs.

Liste des figures

Figure 1 : Applications et avantages principaux des piles à combustible de différents types : (Larminie and Dicks, 2003).	14
Figure 2 : Schéma du principe de fonctionnement d'une PAC à membrane échangeuse d'ions.	16
Figure 3: Evolution du nombre de publications portant sur le terme « Microbial Fuel Cell » dans la littérature depuis 2000 (d'après Sciences Direct-Juillet 2017).	18
Figure 4: Principe de fonctionnement d'une pile à combustible microbienne : une bioanode et une cathode abiotique.	19
Figure 5 : Image MEB (microscopie électronique à balayage) d'un biofilm électroactif sur une anode en graphite.	21
Figure 6 : Les 5 étapes de maturation d'un biofilm. 1: transport et adsorption des microorganismes sur la surface inerte; 2: attachement irréversible; 3: colonisation et croissance; 4 : maturation ; 5: dispersion.	22
Figure 7 : La métabolisation de l'acétate chez les microorganismes électroactifs.	27
Figure 8: Schéma de cycle de Krebs.	28
Figure 9: Structure de l'hème du cytochrome de type c.	30
Figure 10 : Les deux mécanismes de transfert direct: 1 = via les cytochromes membranaires; 2 = via les pili conducteurs.	31
Figure 11: Oxydo-réduction de la riboflavine ($E_0 = - 0.409 \text{ V vs. Ag/AgCl à pH 7}$) produite par <i>Shewanella oneidensis</i>	33
Figure 12: Transfert électronique indirect entre une bactérie et une surface d'anode. Deux mécanismes redox possibles: via les protéines externes membranaires (cytochromes) ou via des médiateurs endogènes ou exogènes (Schröder, 2007).	33
Figure 13 : PCMs à deux compartiments ; (A) Cellule de type « H » d'après (Delaney et al., 1984). (B) cellule rectangulaire d'après (Allen and Bennetto, 1993b). (C) cellule miniature d'après (Ringeisen et al., 2006). (D) cellule à lits granulaires d'après (He et al., 2005b). (E) cellule à lits granulaires et cathode en « U » d'après (He et al., 2006). (F) cellule plate à écoulement serpentin d'après (Min and Logan, 2004). Les schémas sont adaptés de Du et al (Du et al., 2007b).	40
Figure 14 : Différents design de PCMs à cathode à air. (A) PCM avec une couche de d'échange cationique recouvrant l'intérieur de la fenêtre sur laquelle la cathode est montée (Park and Zeikus, 2003c) ; (B) PCM cylindrique avec l'anode et la cathode en vis-à-vis (Liu and Logan,	

2004) ; (C) PCM tubulaire avec la cathode à l'extérieur (Rabaey et al., 2005d) ; (D et E) PCM contenant huit électrodes de graphite en tube comme anodes et entourant une cathode unique (vue du profil et de face) (Liu et al., 2004). Illustrations schématiques issues de Du et al (Du et al., 2007c)..... 41

Figure 15 : (A) MFC empilées composées de six unités à lit granulaire (Aelterman et al., 2006) schématisées par Du et al (Du et al., 2007c); (B) empilement de deux cellules (Oh and Logan, 2007); (C) PCMs en série (Zhuang et al., 2012). 42

Figure 16 : PCM tubulaire..... 43

Figure 17 : Cellule microbinne de dessalement à trois compartiments..... 44

Figure 18 : Prototype de la cellule microbienne de dessalement (Zhang and He, 2015)..... 45

Références du chapitre I

- Aelterman, P., Rabaey, K., Pham, H.T., Boon, N., and Verstraete, W. (2006). Continuous Electricity Generation at High Voltages and Currents Using Stacked Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 3388–3394.
- Ahn, Y., and Logan, B.E. (2010). Effectiveness of domestic wastewater treatment using microbial fuel cells at ambient and mesophilic temperatures. *Bioresour. Technol.* *101*, 469–475.
- Allen, R.M., and Bennetto, H.P. (1993a). Microbial fuel-cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *39–40*, 27–40.
- Allen, R.M., and Bennetto, H.P. (1993b). Microbial fuel-cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *39–40*, 27–40.
- Babauta, J., Renslow, R., Lewandowski, Z., and Beyenal, H. (2012). Electrochemically active biofilms: facts and fiction. A review. *Biofouling* *28*, 789–812.
- Banwart, S.A., Thornton, S., Rees, H., Lerner, D., Wilson, R., Romero-Gonzalez, M., Tohji, K., Tsuchiya, N., and Jeyadevan, B. (2007). In Situ Bioremediation by Natural Attenuation: from Lab to Field Scale. *AIP Conf. Proc.* *898*, 207–210.
- Bennetto, H.P., Stirling, J.L., Dew, M.E., and Tanaka, K. (1981). Rates of reduction of phenothiazine 'redox' dyes by *E. coli*. *Chem. Ind.* 776–8.
- Bergel, A., Féron, D., and Mollica, A. (2005). Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochem. Commun.* *7*, 900–904.
- Blanchet, E., Pécastaings, S., Erable, B., Roques, C., and Bergel, A. (2014). Protons accumulation during anodic phase turned to advantage for oxygen reduction during cathodic phase in reversible bioelectrodes. *Bioresour. Technol.* *173*, 224–230.
- Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2003). Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 1548–1555.
- Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., and Lovley, D.R. (2002). Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments. *Science* *295*, 483–485.
- Burns, J.L., Ginn, B.R., Bates, D.J., Dublin, S.N., Taylor, J.V., Apkarian, R.P., Amaro-Garcia, S., Neal, A.L., and DiChristina, T.J. (2009). Outer membrane-associated serine protease involved in adhesion of *Shewanella oneidensis* to Fe (III) oxides. *Environ. Sci. Technol.* *44*, 68–73.
- Call, D., and Logan, B.E. (2008). Hydrogen Production in a Single Chamber Microbial Electrolysis Cell Lacking a Membrane. *Environ. Sci. Technol.* *42*, 3401–3406.
- Canfield, J.H., and Lutwack, R. (1963). Research on applied bioelectrochemistry First quarterly progress report. In: NASA technical .
- von Canstein, H., Ogawa, J., Shimizu, S., and Lloyd, J.R. (2008). Secretion of Flavins by *Shewanella* Species and Their Role in Extracellular Electron Transfer. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 615–623.
- Cao, X., Huang, X., Liang, P., Xiao, K., Zhou, Y., Zhang, X., and Logan, B.E. (2009). A New Method for Water Desalination Using Microbial Desalination Cells. *Environ. Sci. Technol.* *43*, 7148–7152.

- Cath, T.Y., Childress, A.E., and Elimelech, M. (2006). Forward osmosis: Principles, applications, and recent developments. *J. Membr. Sci.* *281*, 70–87.
- Chang, I.S., Jang, J.K., Gil, G.C., Kim, M., Kim, H.J., Cho, B.W., and Kim, B.H. (2004). Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor. *Biosens. Bioelectron.* *19*, 607–613.
- Chang, I.S., Moon, H., Jang, J.K., and Kim, B.H. (2005). Improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors. *Biosens. Bioelectron.* *20*, 1856–1859.
- Chen, G.-W., Choi, S.-J., Lee, T.-H., Lee, G.-Y., Cha, J.-H., and Kim, C.-W. (2008a). Application of biocathode in microbial fuel cells: cell performance and microbial community. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *79*, 379–388.
- Chen, G.-W., Choi, S.-J., Lee, T.-H., Lee, G.-Y., Cha, J.-H., and Kim, C.-W. (2008b). Application of biocathode in microbial fuel cells: cell performance and microbial community. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *79*, 379–388.
- Chen, G.-W., Choi, S.-J., Cha, J.-H., Lee, T.-H., and Kim, C.-W. (2010). Microbial community dynamics and electron transfer of a biocathode in microbial fuel cells. *Korean J. Chem. Eng.* *27*, 1513–1520.
- Cheng, S., Liu, H., and Logan, B.E. (2006a). Power Densities Using Different Cathode Catalysts (Pt and CoTMPP) and Polymer Binders (Nafion and PTFE) in Single Chamber Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 364–369.
- Cheng, S., Liu, H., and Logan, B.E. (2006b). Power Densities Using Different Cathode Catalysts (Pt and CoTMPP) and Polymer Binders (Nafion and PTFE) in Single Chamber Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 364–369.
- Chicurel, M. (2000). Slimebusters. *Nature* *408*, 284–286.
- Chung, K., Fujiki, I., and Okabe, S. (2011). Effect of formation of biofilms and chemical scale on the cathode electrode on the performance of a continuous two-chamber microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* *102*, 355–360.
- Clauwaert, P., van der Ha, D., Boon, N., Verbeken, K., Verhaege, M., Rabaey, K., and Verstraete, W. (2007a). Open Air Biocathode Enables Effective Electricity Generation with Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* *41*, 7564–7569.
- Clauwaert, P., Rabaey, K., Aeltermann, P., De Schamphelaire, L., Pham, T.H., Boeckx, P., Boon, N., and Verstraete, W. (2007b). Biological Denitrification in Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* *41*, 3354–3360.
- Coetsier, S.E., and Cloete, T.E. (2005). Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems. *Crit. Rev. Microbiol.* *31*, 213–232.
- Coghlan (1996). Slime city - ScienceBase-Catalog.
- Cohen, B. (1931). The Bacteria Culture as an Electrical Half-Cell. *J. Bacteriol.* *21*, 18–19.
- Cordas, C.M., Guerra, L.T., Xavier, C., and Moura, J.J.G. (2008). Electroactive biofilms of sulphate reducing bacteria. *Electrochimica Acta* *54*, 29–34.
- Costerton, J.W. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* *284*, 1318–1322.
- Dai, C., and Choi, S. (2013). Technology and Applications of Microbial Biosensor. *2013*.

- Das, D., and Veziroglu, T.N. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 6046–6057.
- Davey, M.E., and O'toole, G.A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867.
- Davis, J.B., and Yarbrough, H.F. (1962). Preliminary Experiments on a Microbial Fuel Cell. *Science* 137, 615–616.
- Delaney, G.M., Bennetto, H.P., Mason, J.R., Roller, S.D., Stirling, J.L., and Thurston, C.F. (1984). Electron-transfer coupling in microbial fuel cells. 2. performance of fuel cells containing selected microorganism—mediator—substrate combinations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 34, 13–27.
- Dong, C., Yang, D.D., Tournier, C., Whitmarsh, A.J., Xu, J., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (2000). JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* 405, 91–94.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces - Volume 8, Number 9—September 2002 - Emerging Infectious Disease journal - CDC.
- Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193.
- Du, Y., Feng, Y., Dong, Y., Qu, Y., Liu, J., Zhou, X., and Ren, N. (2014). Coupling interaction of cathodic reduction and microbial metabolism in aerobic biocathode of microbial fuel cell. *RSC Adv.* 4, 34350–34355.
- Du, Z., Li, H., and Gu, T. (2007a). A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol. Adv.* 25, 464–482.
- Du, Z., Li, H., and Gu, T. (2007b). A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol. Adv.* 25, 464–482.
- Du, Z., Li, H., and Gu, T. (2007c). A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol. Adv.* 25, 464–482.
- Dunaj, S.J., Vallino, J.J., Hines, M.E., Gay, M., Kobyljanec, C., and Rooney-Varga, J.N. (2012). Relationships between Soil Organic Matter, Nutrients, Bacterial Community Structure, And the Performance of Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* 46, 1914–1922.
- Erable, B., Etcheverry, L., and Bergel, A. (2009). Increased power from a two-chamber microbial fuel cell with a low-pH air-cathode compartment. *Electrochem. Commun.* 11, 619–622.
- Erable, B., Duțeanu, N.M., Ghangrekar, M.M., Dumas, C., and Scott, K. (2010). Application of electro-active biofilms. *Biofouling* 26, 57–71.
- Esteve-Núñez, A., Sosnik, J., Visconti, P., and Lovley, D.R. (2008). Fluorescent properties of c-type cytochromes reveal their potential role as an extracytoplasmic electron sink in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ. Microbiol.* 10, 497–505.
- Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633.
- Franks, A.E., and Nevin, K.P. (2010). Microbial Fuel Cells, A Current Review. *Energies* 3, 899–919.

- Fuchs, S., Haritopoulou, T., and Wilhelmi, M. (1996). Biofilms in freshwater ecosystems and their use as a pollutant monitor. *Water Sci. Technol.* *34*, 137–140.
- Gil, G.-C., Chang, I.-S., Kim, B.H., Kim, M., Jang, J.-K., Park, H.S., and Kim, H.J. (2003). Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron.* *18*, 327–334.
- Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T.J., Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, K.S., et al. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 11358–11363.
- Gregory, K.B., Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2004a). Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* *6*, 596–604.
- Gregory, K.B., Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2004b). Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* *6*, 596–604.
- Grove, W.R.G.E. (1839). XXIV. On voltaic series and the combination of gases by platinum. *Philos. Mag.* *14*, 127–130.
- He, Z., Minteer, S.D., and Angenent, L.T. (2005a). Electricity generation from artificial wastewater using an upflow microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* *39*, 5262–5267.
- He, Z., Minteer, S.D., and Angenent, L.T. (2005b). Electricity Generation from Artificial Wastewater Using an Upflow Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* *39*, 5262–5267.
- He, Z., Wagner, N., Minteer, S.D., and Angenent, L.T. (2006). An Upflow Microbial Fuel Cell with an Interior Cathode: Assessment of the Internal Resistance by Impedance Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 5212–5217.
- Holzman, D.C. (2005). Microbe Power! *Environ. Health Perspect.* *113*, A754.
- Hottinen, T., Himanen, O., and Lund, P. (2004). Effect of cathode structure on planar free-breathing PEMFC. *J. Power Sources* *138*, 205–210.
- Ieropoulos, I., Greenman, J., and Melhuish, C. (2003). Imitating metabolism: Energy autonomy in biologically inspired robots. In *Proceedings of the 2nd International Symposium on Imitation of Animals and Artifacts*, pp. 191–4.
- Jiang, D., Curtis, M., Troop, E., Scheible, K., McGrath, J., Hu, B., Suib, S., Raymond, D., and Li, B. (2011). A pilot-scale study on utilizing multi-anode/cathode microbial fuel cells (MAC MFCs) to enhance the power production in wastewater treatment. *Int. J. Hydrog. Energy* *36*, 876–884.
- Kim, B.-C., Leang, C., Ding, Y.-H.R., Glaven, R.H., Coppi, M.V., and Lovley, D.R. (2005). OmcF, a Putative c-Type Monoheme Outer Membrane Cytochrome Required for the Expression of Other Outer Membrane Cytochromes in *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* *187*, 4505–4513.
- Kim, B.-C., Qian, X., Leang, C., Coppi, M.V., and Lovley, D.R. (2006). Two Putative c-Type Multiheme Cytochromes Required for the Expression of OmcB, an Outer Membrane Protein Essential for Optimal Fe(III) Reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* *188*, 3138–3142.
- Kim, B.H., Chang, I.S., Gil, G.C., Park, H.S., and Kim, H.J. (2003). Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell. *Biotechnol. Lett.* *25*, 541–545.

- Kumar, G., Bakonyi, P., Zhen, G., Sivagurunathan, P., Koók, L., Kim, S.-H., Tóth, G., Nemestóthy, N., and Bélafi-Bakó, K. (2017). Microbial electrochemical systems for sustainable biohydrogen production: Surveying the experiences from a start-up viewpoint. *Renew. Sustain. Energy Rev.* *70*, 589–597.
- Larminie, J., and Dicks, A. (2003). *Fuel cell systems explained* (Chichester, West Sussex: J. Wiley).
- Leang, C., Coppi, M.V., and Lovley, D.R. (2003). OmcB, a c-Type Polyheme Cytochrome, Involved in Fe(III) Reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* *185*, 2096–2103.
- Lee, H.-S., Parameswaran, P., Kato-Marcus, A., Torres, C.I., and Rittmann, B.E. (2008). Evaluation of energy-conversion efficiencies in microbial fuel cells (MFCs) utilizing fermentable and non-fermentable substrates. *Water Res.* *42*, 1501–1510.
- Lefebvre, O., Al-Mamun, A., and Ng, H.Y. (2008). A microbial fuel cell equipped with a biocathode for organic removal and denitrification. *Water Sci. Technol.* *58*, 881–885.
- Lens, P., O’Flaherty, V., Moran, A.P., Stoodley, P., and Mahony, T. (2003). *Biofilms in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology* (IWA Publishing).
- Li, X., Hu, B., Suib, S., Lei, Y., and Li, B. (2011). Electricity generation in continuous flow microbial fuel cells (MFCs) with manganese dioxide (MnO₂) cathodes. *Biochem. Eng. J.* *54*, 10–15.
- Liu, H., and Logan, B.E. (2004). Electricity Generation Using an Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in the Presence and Absence of a Proton Exchange Membrane. *Environ. Sci. Technol.* *38*, 4040–4046.
- Liu, H., Ramnarayanan, R., and Logan, B.E. (2004). Production of Electricity during Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* *38*, 2281–2285.
- Liu, H., Cheng, S., and Logan, B.E. (2005a). Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. *Environ. Sci. Technol.* *39*, 5488–5493.
- Liu, H., Grot, S., and Logan, B.E. (2005b). Electrochemically Assisted Microbial Production of Hydrogen from Acetate. *Environ. Sci. Technol.* *39*, 4317–4320.
- Logan, B.E., and Regan, J.M. (2006a). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* *14*, 512–518.
- Logan, B.E., and Regan, J.M. (2006b). *Microbial fuel cells—challenges and applications* (ACS Publications).
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., and Rabaey, K. (2006a). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 5181–5192.
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., and Rabaey, K. (2006b). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 5181–5192.
- Logan, B.E., Grot, S., Mallouk, T., and Liu, H. (2010). Bio-electrochemically assisted microbial reactor that generates hydrogen gas and methods of generating hydrogen gas.
- Lovley, D.R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 497–508.

- Lovley, D.R. (2008). The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Curr. Opin. Biotechnol.* *19*, 564–571.
- Lovley, D.R. (2011). Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination. *Energy Environ. Sci.* *4*, 4896.
- Lovley, D.R., and Nevin, K.P. (2008). Electricity Production with Electricigens. 295–306.
- Mahmoud, M., Gad-Allah, T.A., El-Khatib, K.M., and El-Gohary, F. (2011). Power generation using spinel manganese–cobalt oxide as a cathode catalyst for microbial fuel cell applications. *Bioresour. Technol.* *102*, 10459–10464.
- Makin, S.A., and Beveridge, T.J. (1996). The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology* *142*, 299–307.
- Malvankar, N.S., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2012). Comment on “On electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms” by S. M. Strycharz-Glaven, R. M. Snider, A. Guiseppi-Elie and L. M. Tender, *Energy Environ. Sci.*, 2011, *4*, 4366. *Energy Environ. Sci.* *5*, 6247–6249.
- Mathioulakis, E., Belessiotis, V., and Delyannis, E. (2007). Desalination by using alternative energy: Review and state-of-the-art. *Desalination* *203*, 346–365.
- Milner, E.M., Popescu, D., Curtis, T., Head, I.M., Scott, K., and Yu, E.H. (2016). Microbial fuel cells with highly active aerobic biocathodes. *J. Power Sources* *324*, 8–16.
- Min, B., and Logan, B.E. (2004). Continuous Electricity Generation from Domestic Wastewater and Organic Substrates in a Flat Plate Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* *38*, 5809–5814.
- Mohan, Y., Manoj Muthu Kumar, S., and Das, D. (2008). Electricity generation using microbial fuel cells. *Int. J. Hydrog. Energy* *33*, 423–426.
- Nam, J.-Y., Kim, H.-W., Lim, K.-H., Shin, H.-S., and Logan, B.E. (2010). Variation of power generation at different buffer types and conductivities in single chamber microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* *25*, 1155–1159.
- Nevin, K.P., Richter, H., Covalla, S.F., Johnson, J.P., Woodard, T.L., Orloff, A.L., Jia, H., Zhang, M., and Lovley, D.R. (2008). Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environ. Microbiol.* *10*, 2505–2514.
- Nor, M.H.M., Mubarak, M.F.M., Elmi, H.S.A., Ibrahim, N., Wahab, M.F.A., and Ibrahim, Z. (2015). Bioelectricity generation in microbial fuel cell using natural microflora and isolated pure culture bacteria from anaerobic palm oil mill effluent sludge. *Bioresour. Technol.* *190*, 458–465.
- Oh, S.-E., and Logan, B.E. (2007). Voltage reversal during microbial fuel cell stack operation. *J. Power Sources* *167*, 11–17.
- P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, and Costerton, J.W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* *56*, 187–209.
- Park, D.H., and Zeikus, J.G. (2000). Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore. *Appl. Environ. Microbiol.* *66*, 1292–1297.
- Park, D.H., and Zeikus, J.G. (2003a). Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. *Biotechnol. Bioeng.* *81*, 348–355.

- Park, D.H., and Zeikus, J.G. (2003b). Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. *Biotechnol. Bioeng.* *81*, 348–355.
- Park, D.H., and Zeikus, J.G. (2003c). Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. *Biotechnol. Bioeng.* *81*, 348–355.
- Peng, L., You, S.-J., and Wang, J.-Y. (2010). Electrode potential regulates cytochrome accumulation on *Shewanella oneidensis* cell surface and the consequence to bioelectrocatalytic current generation. *Biosens. Bioelectron.* *25*, 2530–2533.
- Pocaznoi, D. (2012). Optimisation d'anodes microbiennes à partir de lixiviat de sol pour la conception de piles à combustible microbiennes. INPT.
- Pokkuluri, P.R., Londer, Y.Y., Duke, N.E.C., Pessanha, M., Yang, X., Orshonsky, V., Orshonsky, L., Erickson, J., Zagzyanskiy, Y., Salgueiro, C.A., et al. (2011). Structure of a novel dodecaheme cytochrome c from *Geobacter sulfurreducens* reveals an extended 12nm protein with interacting hemes. *J. Struct. Biol.* *174*, 223–233.
- Potter, M.C. (1911). Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character* *84*, 260–276.
- Puig, S., Serra, M., Vilar-Sanz, A., Cabré, M., Bañeras, L., Colprim, J., and Balaguer, M.D. (2011). Autotrophic nitrite removal in the cathode of microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* *102*, 4462–4467.
- Rabaey, K., Boon, N., Höfte, M., and Verstraete, W. (2005a). Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environ. Sci. Technol.* *39*, 3401–3408.
- Rabaey, K., Clauwaert, P., Aelterman, P., and Verstraete, W. (2005b). Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. *Environ. Sci. Technol.* *39*, 8077–8082.
- Rabaey, K., Clauwaert, P., Aelterman, P., and Verstraete, W. (2005c). Tubular Microbial Fuel Cells for Efficient Electricity Generation. *Environ. Sci. Technol.* *39*, 8077–8082.
- Rabaey, K., Clauwaert, P., Aelterman, P., and Verstraete, W. (2005d). Tubular Microbial Fuel Cells for Efficient Electricity Generation. *Environ. Sci. Technol.* *39*, 8077–8082.
- Rabaey, K., Rodríguez, J., Blackall, L.L., Keller, J., Gross, P., Batstone, D., Verstraete, W., and Nealon, K.H. (2007). Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities. *ISME J.* *1*, 9–18.
- Rabaey, K., Read, S.T., Clauwaert, P., Freguia, S., Bond, P.L., Blackall, L.L., and Keller, J. (2008). Cathodic oxygen reduction catalyzed by bacteria in microbial fuel cells. *ISME J.* *2*, 519–527.
- Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* *435*, 1098–1101.
- Reguera, G., Nevin, K.P., Nicoll, J.S., Covalla, S.F., Woodard, T.L., and Lovley, D.R. (2006). Biofilm and Nanowire Production Leads to Increased Current in *Geobacter sulfurreducens* Fuel Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 7345–7348.
- Reimers, C.E., Girguis, P., Stecher, H.A., Tender, L.M., Ryckelynck, N., and Whaling, P. (2006). Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep. *Geobiology* *4*, 123–136.
- Rimboud, M., Desmond-Le Quemener, E., Erable, B., Bouchez, T., and Bergel, A. (2015). The current provided by oxygen-reducing microbial cathodes is related to the composition of their bacterial community. *Bioelectrochemistry* *102*, 42–49.

- Ringeisen, B.R., Henderson, E., Wu, P.K., Pietron, J., Ray, R., Little, B., Biffinger, J.C., and Jones-Meehan, J.M. (2006). High Power Density from a Miniature Microbial Fuel Cell Using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 2629–2634.
- Roche, I., and Scott, K. (2009). Carbon-supported manganese oxide nanoparticles as electrocatalysts for oxygen reduction reaction (orr) in neutral solution. *J. Appl. Electrochem.* *39*, 197–204.
- Rosenbaum, M., Aulenta, F., Villano, M., and Angenent, L.T. (2011). Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresour. Technol.* *102*, 324–333.
- Rothballer, M., Picot, M., Sieper, T., Arends, J.B.A., Schmid, M., Hartmann, A., Boon, N., Buisman, C.J.N., Barrière, F., and Strik, D.P.B.T.B. (2015). Monophyletic group of unclassified γ -Proteobacteria dominates in mixed culture biofilm of high-performing oxygen reducing biocathode. *Bioelectrochemistry* *106, Part A*, 167–176.
- ROUX, A., and GHIGO, J.-M. (2006). Les biofilms bactériens.
- Schamphelaire, L.D., Boeckx, P., and Verstraete, W. (2010). Evaluation of biocathodes in freshwater and brackish sediment microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *87*, 1675–1687.
- Schröder, U. (2007). Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *9*, 2619–2629.
- Shannon, M.A., Bohn, P.W., Elimelech, M., Georgiadis, J.G., Mariñas, B.J., and Mayes, A.M. (2008). Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature* *452*, 301–310.
- Shantaram, A., Beyenal, H., Veluchamy, R.R.A., and Lewandowski, Z. (2005). Wireless Sensors Powered by Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* *39*, 5037–5042.
- Shelobolina, E.S., Coppi, M.V., Korenevsky, A.A., DiDonato, L.N., Sullivan, S.A., Konishi, H., Xu, H., Leang, C., Butler, J.E., Kim, B.-C., et al. (2007). Importance of c-Type cytochromes for U(VI) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiol.* *7*, 16.
- Shi, L., Squier, T.C., Zachara, J.M., and 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.
- Simões, M., Simões, L.C., and Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* *43*, 573–583.
- Stams, A.J.M., de Bok, F.A.M., Plugge, C.M., van Eekert, M.H.A., Doling, J., and Schraa, G. (2006). Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environ. Microbiol.* *8*, 371–382.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* *56*, 187–209.
- Strycharz-Glaven, S.M., and Tender, L.M. (2012). Reply to the “Comment on ‘On electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms’” by N. S. Malvankar, M. T. Tuominen and D. R. Lovley, *Energy Environ. Sci.*, 2012, 5, DOI: 10.1039/c2ee02613a. *Energy Environ. Sci.* *5*, 6250–6255.

- Strycharz-Glaven, S.M., Glaven, R.H., Wang, Z., Zhou, J., Vora, G.J., and Tender, L.M. (2013). Electrochemical Investigation of a Microbial Solar Cell Reveals a Nonphotosynthetic Biocathode Catalyst. *Appl. Environ. Microbiol.* *79*, 3933–3942.
- Suci, P.A., Mittelman, M.W., Yu, F.P., and Geesey, G.G. (1994). Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* *38*, 2125–2133.
- Sun, Y., Wei, J., Liang, P., and Huang, X. (2012). Microbial community analysis in biocathode microbial fuel cells packed with different materials. *AMB Express* *2*, 21.
- Sutherland, I.W. (1982). Microbial Exopolysaccharides - their Role in Microbial Adhesion in Aqueous Systems. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* *10*, 173–201.
- Sutherland, I.W. (2001). The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* *9*, 222–227.
- Tender, L.M., Reimers, C.E., Stecher, H.A., Holmes, D.E., Bond, D.R., Lowy, D.A., Pilobello, K., Fertig, S.J., and Lovley, D.R. (2002). Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nat. Biotechnol.* *20*, 821–825.
- Vilain, S., Cosette, P., Hubert, M., Lange, C., Junter, G.-A., and Jouenne, T. (2004). Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: a multivariate statistical approach. *Anal. Biochem.* *329*, 120–130.
- Viridis, B., Rabaey, K., Yuan, Z., and Keller, J. (2008a). Microbial fuel cells for simultaneous carbon and nitrogen removal. *Water Res.* *42*, 3013–3024.
- Viridis, B., Rabaey, K., Yuan, Z., and Keller, J. (2008b). Microbial fuel cells for simultaneous carbon and nitrogen removal. *Water Res.* *42*, 3013–3024.
- Viridis, B., Rabaey, K., Rozendal, R.A., Yuan, Z., and Keller, J. (2010). Simultaneous nitrification, denitrification and carbon removal in microbial fuel cells. *Water Res.* *44*, 2970–2980.
- Wang, Z., Leary, D.H., Malanoski, A.P., Li, R.W., Hervey, W.J., Eddie, B.J., Tender, G.S., Yanosky, S.G., Vora, G.J., Tender, L.M., et al. (2015). A Previously Uncharacterized, Nonphotosynthetic Member of the Chromatiaceae Is the Primary CO₂-Fixing Constituent in a Self-Regenerating Biocathode. *Appl. Environ. Microbiol.* *81*, 699–712.
- Watson, V.J., and Logan, B.E. (2010). Power production in MFCs inoculated with *Shewanella oneidensis* MR-1 or mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.* *105*, 489–498.
- Xia, X., Sun, Y., Liang, P., and Huang, X. (2012). Long-term effect of set potential on biocathodes in microbial fuel cells: Electrochemical and phylogenetic characterization. *Bioresour. Technol.* *120*, 26–33.
- Yi, H., Nevin, K.P., Kim, B.-C., Franks, A.E., Klimes, A., Tender, L.M., and Lovley, D.R. (2009). Selection of a variant of *Geobacter sulfurreducens* with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* *24*, 3498–3503.
- Yong, Y.-C., Yu, Y.-Y., Li, C.-M., Zhong, J.-J., and Song, H. (2011). Bioelectricity enhancement via overexpression of quorum sensing system in *Pseudomonas aeruginosa*-inoculated microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* *30*, 87–92.
- Zhang, F., and He, Z. (2015). Scaling up microbial desalination cell system with a post-aerobic process for simultaneous wastewater treatment and seawater desalination. *Desalination* *360*, 28–34.

Zhang, G., Zhao, Q., Jiao, Y., Zhang, J., Jiang, J., Ren, N., and Kim, B.H. (2011). Improved performance of microbial fuel cell using combination biocathode of graphite fiber brush and graphite granules. *J. Power Sources* *196*, 6036–6041.

Zhang, G., Zhao, Q., Jiao, Y., Wang, K., Lee, D.-J., and Ren, N. (2012). Biocathode microbial fuel cell for efficient electricity recovery from dairy manure. *Biosens. Bioelectron.* *31*, 537–543.

Zhao, F., Harnisch, F., Schröder, U., Scholz, F., Bogdanoff, P., and Herrmann, I. (2005). Application of pyrolysed iron(II) phthalocyanine and CoTMPP based oxygen reduction catalysts as cathode materials in microbial fuel cells. *Electrochem. Commun.* *7*, 1405–1410.

Zhao, F., Harnisch, F., Schröder, U., Scholz, F., Bogdanoff, P., and Herrmann, I. (2006). Challenges and Constraints of Using Oxygen Cathodes in Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 5193–5199.

Zhuang, L., Zhou, S., Li, Y., and Yuan, Y. (2010). Enhanced performance of air-cathode two-chamber microbial fuel cells with high-pH anode and low-pH cathode. *Bioresour. Technol.* *101*, 3514–3519.

Zhuang, L., Yuan, Y., Wang, Y., and Zhou, S. (2012). Long-term evaluation of a 10-liter serpentine-type microbial fuel cell stack treating brewery wastewater. *Bioresour. Technol.* *123*, 406–412.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

Table des matières

Chapitre II	Matériels et méthodes.....	64
II.1.	Matériau d'électrode	64
II.1.1.	Le carbone vitreux.....	64
II.1.2.	Le graphite.....	65
II.1.3.	Les surfaces Pyrolized Photoresist Film (PPF)	66
II.2.	Techniques de caractérisation	67
II.2.1.	Techniques électrochimiques	67
II.2.1.a.	Mesure de la tension de la pile à circuit ouvert ou sous résistance variable.....	67
II.2.1.b.	Voltammétrie cyclique.....	68
II.2.1.c.	Chronoampérométrie	71
II.2.1.d.	Courbe de puissance	72
II.2.1.e.	Calculs des densités de courant et rendements faradiques.....	74
II.2.2.	Autres techniques de caractérisation	74
II.2.2.a.	Microscopie Electronique à Balayage MEB.....	75
II.2.2.b.	Microscopie à Force Atomique (AFM)	76
II.2.2.c.	Spectroscopie de photoélectron X (XPS).....	77
II.2.2.d.	Spectroscopie électronique d'absorption ultraviolet-visible.....	78
II.2.3.	Estimation de pH.....	78
II.3.	Préparation des électrodes	78
II.3.1.	Préparation de l'électrode de carbone vitreux	78
II.3.2.	Préparation de l'électrode de graphite.....	79
II.4.	Modification de surface d'électrode.....	79
II.5.	Eau de la station d'épuration	79
II.6.	Le séparateur; la membrane échangeuse d'ion.....	80
II.7.	Les réacteurs: dispositifs expérimentaux	80
II.8.	Le séquençage	82

II.8.1.	L'extraction de l'ADN	83
II.8.1.a.	Lyse des cellules bactériennes	83
II.8.1.b.	Élimination des protéines et des peptides	84
II.8.1.c.	Récupération de l'ADN	84
II.8.2.	Analyse de l'ADN	84
II.8.3.	L'amplification de l'ADN	85
II.8.4.	Séquençage Illumina	85
II.8.5.	Analyse des données de séquençage	87
II.9.	Synthèse des Liquides ioniques (LI)	87
Liste des figures	90
Références du chapitre II	91

Chapitre II Matériels et méthodes

II.1. Matériau d'électrode

Du fait de ses nombreux avantages (coût modéré, bonne stabilité thermique, bonne conductivité électrique, absence de toxicité pour les microorganismes, etc.) le carbone est utilisé en tant que matériau d'électrode, pour la modification de surface et comme anode et cathode dans les piles à combustibles microbiennes PCMs (Wei et al., 2011).

Dans le cas des PCMs, les matériaux des électrodes utilisés à l'anode doivent être biocompatibles et chimiquement stables dans l'électrolyte (Logan et al., 2006). Bien que leur résistivité au transfert d'électrons soit près de 1000 fois supérieure à celle des métaux, ce sont les matériaux à base de carbone disponibles sous forme de plaques, tige en graphite (Liu et al., 2004), granules, carbone vitreux réticulé (Wang and Han, 2009) ou encore sous forme de matériaux fibreux ; feutre de carbone (Kim et al., 2002), tissu de carbone (Ishii et al., 2008), papier de carbone (Kim et al., 2008), mousse de carbone (Larrosa-Guerrero et al., 2010), qui sont les plus fréquemment utilisés comme anodes (Pham et al., 2009). En effet, ils sont non seulement stables dans les cultures microbiennes, peu chers, faciles à utiliser, mais ils possèdent en outre de grandes surfaces actives qui permettent d'obtenir de meilleurs rendements pour les piles (Logan et al., 2006), (Watanabe, 2008). Pour cette raison, la recherche actuelle se focalise de plus en plus sur la modification chimique de la surface des électrodes afin de d'augmenter la surface spécifique du matériau pour avoir une surface d'échange plus grande d'une part, pour favoriser l'adhésion microbienne et pour améliorer le transfert électronique à l'interface biofilm/électrode d'autre part.

Dans nos travaux, nous avons utilisé deux formes de carbone: le carbone vitreux et le graphite.

II.1.1. Le carbone vitreux

Durant mes travaux de thèse, les électrodes de carbone vitreux utilisées, ont été obtenues auprès de Bioanalytical Systems Inc et IJ Cambria (disque de diamètre = 3 mm).

Le carbone vitreux est un matériau combinant les propriétés du carbone et de la céramique. La structure de ce matériau est partiellement apparentée à celle des fullerènes (P. J. F. Harris, 2004). Le carbone vitreux est obtenu par traitement thermique (jusqu'à 3000°C) de résidus polymères comme le polyacrylonitrile. Après ce traitement à haute température, seuls les atomes de carbone restent, mais le squelette du polymère n'est pas détruit. On observe

seulement des plans de graphite de taille limitée dans une matrice polymère désorganisée (McCreery, 2008a). Grâce à ses propriétés exceptionnelles, le carbone vitreux est plus attractif que le graphite. En effet, ce matériau possède une faible porosité et une haute densité, et des surfaces peu rugueuses après polissage. Le carbone vitreux peut être utilisé sous forme de feuille, de film, de barreaux, etc.,

II.1.2. Le graphite

Le graphite a été employé dans les piles à combustibles microbiennes en tant qu'anodes et cathodes. Les électrodes utilisées dans notre travail sont en graphite (Einsenhuth GmbH & Co). Deux formes différentes ont été exploitées ; des barreaux de dizaine de centimètre carrés et des parallélépipèdes rectangles d'une vingtaine de centimètres carrés.

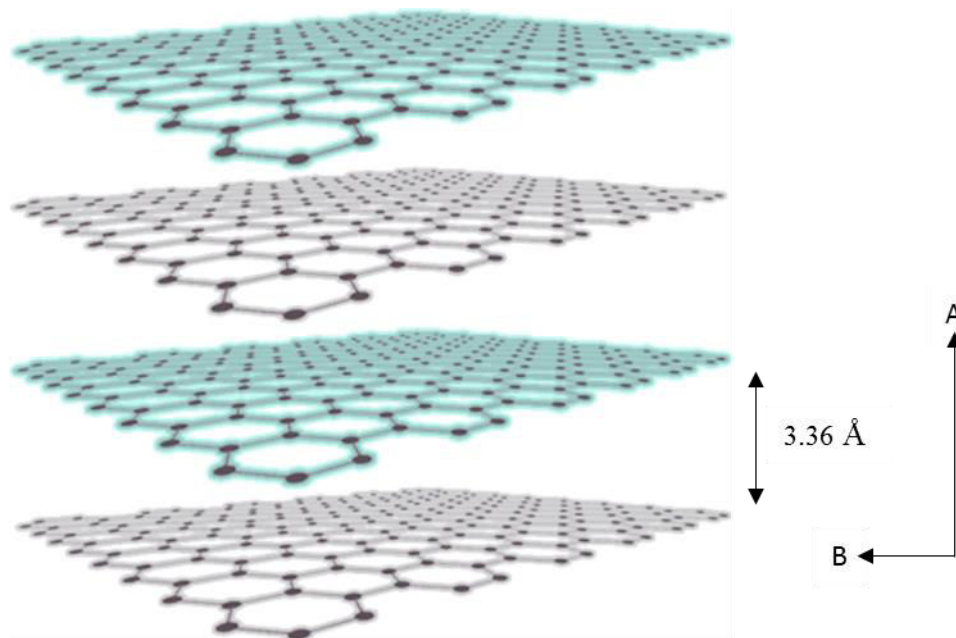


Figure 1 : Structure du graphite.

La Figure 1 ci-dessus montre la structure de graphite en forme tridimensionnelle. Il est formé des feuillets hexagonaux non compacts de graphène qui s'empilent les uns sur les autres sous forme lamellaire. Ces plans atomiques sont espacés les uns des autres d'environ 3,36 Å. Le côté de chaque hexagone mesure 1,41 Å, c'est la distance entre les atomes de carbone liés par des liaisons covalentes de type σ pour les électrons sp^2 et des liaisons covalentes de type π pour les autres électrons p . Ces types de liaisons π sont des liaisons conjuguées avec les trois autres liaisons, d'où la mobilité des électrons qui explique la grande conductivité électrique du

graphite. Entre les feuilles, les liaisons sont faibles, de type Van der Waals, ce qui explique le clivage facile et la faible dureté du graphite.

Selon (McCreery, 2008a), le plan hexagonal selon l'axe (A) est dit le plan "basal" tandis que le plan selon l'axe (B) est appelé plan "edge".

II.1.3. Les surfaces Pyrolyzed Photoresist Film (PPF)

Dans le but de réaliser différents types de mesure (XPS, angle de contact, etc) et de caractériser le dépôt par AFM, nous avons utilisé le PPF (Pyrolyzed Photoresist Film) qui possède une rugosité de surface très faible (moins de 0.5 nm), de bonnes propriétés électroniques et une réactivité chimique/électrochimique proches de celles du carbone vitreux (Ranganathan and McCreery, 2001) et (del Campo et al., 2011).

Les surfaces de PPF ont été utilisées dans une large gamme d'applications, y compris les capteurs électrochimiques (Matthew K. et al., 2009), (Sánchez-Molas et al., 2013), dans les systèmes micro-électrochimiques (Wang et al., 2004) et électronique moléculaire (McCreery, 2008b), (Anariba et al., 2003a), (Lehr et al., 2010) (Mattiuzzi et al., 2012), (Leroux et al., 2010).

Les surfaces de PPF ont été fabriquées selon une procédure décrite par Brooksby et al, (Brooksby and Downard, 2004a).

❖ Préparation du substrat PPF

Pour réaliser les surfaces de PPF, la procédure décrite précédemment a été adaptée ; un wafer de silicium (Si (100)) est découpé en plaque ($1.4 \times 1.4 \text{ cm}^2$) pour un batch à l'aide d'une pointe diamant. Les plaques sont ensuite lavées au bain à ultrasons successivement avec de l'acétone (99+%, extra pure, ACROS Organics), le méthanol et le 2-propanol pendant 5 minutes pour chaque solvant.

Après avoir séché les plaques PPF avec de l'argon, une petite quantité de la résine photorésistante (AZ4562, fournie par Microchemicals) a été déposée délicatement sur les plaquettes puis « spincoatées » à 6000 tr/min pendant 30 s (à l'aide d'un « spin-coateur »: SUSS MiroTec). Les échantillons ont ensuite été chauffés à 90°C (dans un étuve : Wiseven Fuzzy Control system), pendant 30 minutes. Après refroidissement, une deuxième couche de résine photosensible a été déposée. Les substrats de PPF ont été pyrolysés dans un four tubulaire (Carbolite), en utilisant une rampe de température de 10°C / min jusqu'à atteindre 1100°C. Cette température a été maintenue pendant 1 h, puis réduite à la température ambiante. Pendant les phases de chauffage et de refroidissement, un flux de gaz (Ar 95% et H₂ 5%) est envoyé à

travers le four tubulaire (Carbolite), à 1 atm. Cette étape est importante car le taux d'espèces oxygénées en surface est fortement diminué lorsque la pyrolyse est réalisée en présence de ce gaz réducteur (Ranganathan et al., 2000). Finalement, les échantillons sont brièvement nettoyés au bain à ultrasons dans de l'acétone, du méthanol et du 2-propanol, successivement, puis séchés à l'argon. Ils sont stockés à température ambiante à l'air pendant au moins une semaine avant utilisation.

II.2. Techniques de caractérisation

Dans cette partie, nous allons présenter les différentes techniques de caractérisation utilisées pour la modification de la surface de l'électrode, principalement par réduction de sels d'aryles diazonium, et pour mesurer les paramètres de fonctionnement des PCMs afin de pouvoir analyser et comparer les différentes conditions opératoires.

II.2.1. Techniques électrochimiques

Ce paragraphe présente les principes des différentes méthodes électrochimiques utilisées au cours de ma thèse.

II.2.1.a. Mesure de la tension de la pile à circuit ouvert ou sous résistance variable

Les piles à combustibles microbiennes mises en jeu durant mes travaux de thèse, fonctionnent à une température contrôlée de 30 ± 2 °C et en mode batch. Une résistance externe fixe de 1 k Ω est imposée entre les deux compartiments anodique et cathodique de la pile. Au cours de son développement, le courant I (A) et la différence de potentiel ΔE (V) varient librement. À l'aide d'un multimètre (IDM 66RT Multimeter), la ΔE (V) entre l'anode et la cathode est suivie régulièrement une fois par jour. Une fois que la différence de potentiel de la pile en fonctionnement stationnaire est stable, on caractérise ses performances en effectuant des mesures de voltammétrie cyclique à l'aide d'un potentiostat (Autolab PGSTAT302N).

La Figure 2 ci-dessous présente un schéma simplifié d'une pile à combustibles microbienne constituée du compartiment cathodique (contenant le catholyte, ici du ferricyanure de potassium) relié au compartiment anodique (contenant l'anolyte, ici une solution d'eaux usées de station d'épuration) par une bague de serrage intégrant la membrane. La différence de potentiel (ΔE) est mesurée entre les deux électrodes (cathode et anode).

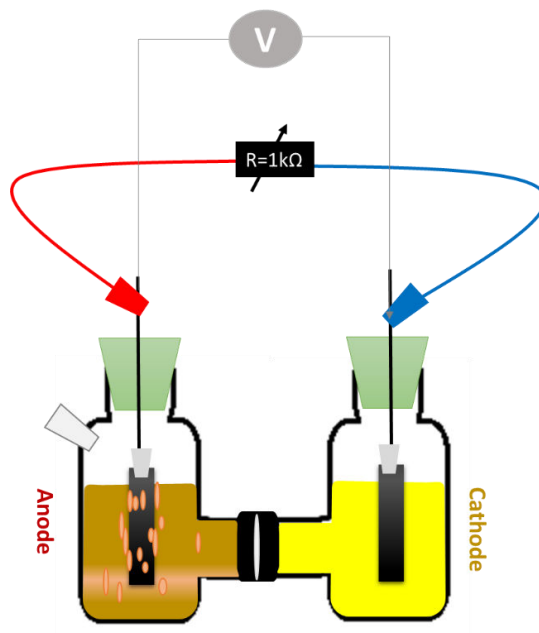


Figure 2 : Schéma simplifié pour la mesure de la différence de potentiel (ΔE) entre les deux compartiments anodique et cathodique.

II.2.1.b. Voltammétrie cyclique

Les transferts d'électrons entre une espèce électroactive et une électrode se mesurent grâce à la différence de potentiel entre deux électrodes. La première est l'électrode de travail, permettant la mesure du flux de courant résultant de la réduction ou de l'oxydation des espèces électroactives. La seconde électrode a un potentiel fixe et connu, c'est l'électrode de référence. Nous avons utilisé une électrode au calomel saturé (+241 mV vs. Électrode Standard à Hydrogène à 25 C)

Grâce à un montage à deux électrodes (électrode de travail et référence), on peut faire varier la différence de potentiel entre les deux électrodes et observer l'évolution du courant (synonyme d'une réaction électrochimique à la surface de l'électrode de travail) afin d'étudier une espèce électroactive en solution ou de connaître le potentiel de l'électrode de travail (ET). La variation de différence de potentiel et l'enregistrement du courant se fait grâce à un potentiostat (Autolab PGSTAT302N). Cependant, il faut éviter que du courant circule également dans l'électrode de référence (Ref), qui doit rester constant, conduisant à des variations du potentiel appliqué, on utilise alors une troisième électrode, la contre électrode (CE), qui permet le passage du courant traversant l'électrode de travail sans passer par l'électrode de référence. Ce dispositif à trois électrodes est schématisé à la Figure 3 ci-dessous.

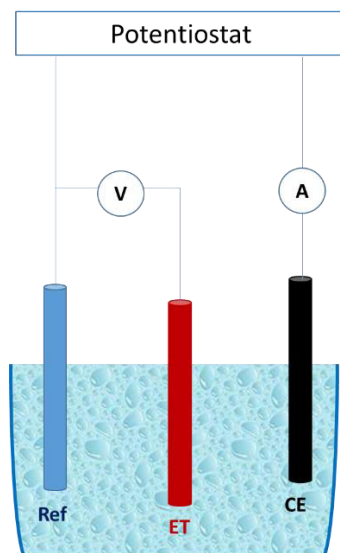


Figure 3 : Système électrochimique à trois électrodes: une électrode de travail (ET), une électrode de référence (Ref) et une contre électrode (CE).

Dans notre cas, nous avons utilisé la voltammétrie cyclique (VC) avec différents buts (modification de surface d'électrode, étude de sondes électrochimiques, étude de l'électroactivité de biofilms).

La voltammétrie cyclique est une technique qui consiste à faire varier linéairement le potentiel d'une électrode de travail entre deux bornes limites de potentiel prédéfinies par l'utilisateur. L'aspect cyclique implique que la variation de potentiel soit réalisée au moins une fois dans chaque sens de balayage.

La réponse du système étudié est mesurée sous forme de courant généré, représenté en fonction de potentiel dans un voltammogramme (Zoski, 2006).

Au cours de la mesure à l'aide de la voltammétrie cyclique, on peut observer deux types de courbe. En l'absence d'espèce redox actives présentes dans l'électrolyte ou associées à l'électrode, le voltammogramme généré est sous la forme quasi-rectangulaire représentant un comportement de charge capacitive (Figure 4). Il s'agit d'un comportement non faradique.

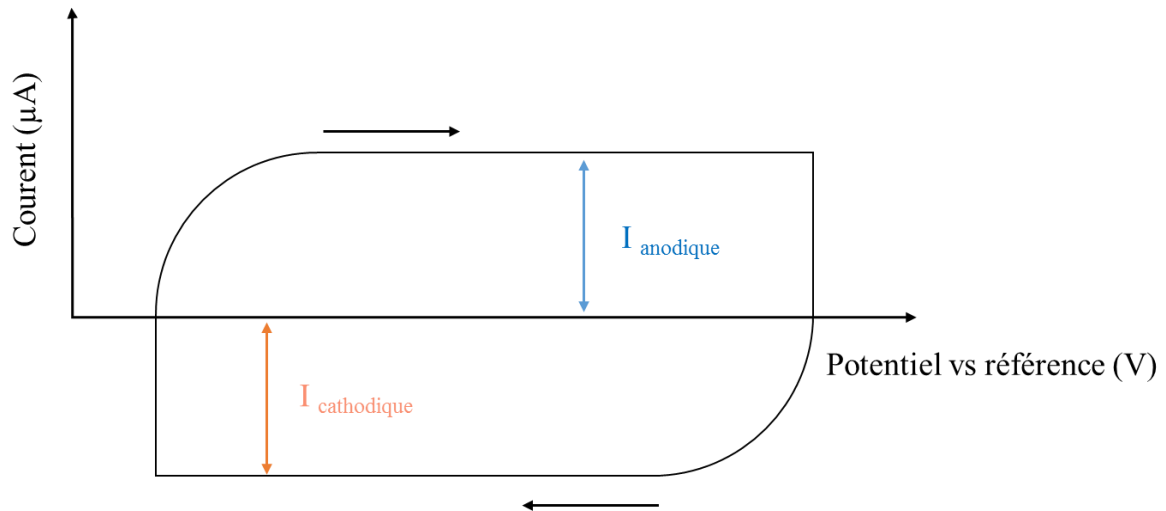


Figure 4 : Voltammétrie cyclique d'une expérience non faradique.

En présence d'espèces redox active, le voltammogramme se présente sous la forme d'une courbe avec deux pics correspondant à l'oxydation et la réduction de cette espèce (cas d'un système électrochimiquement réversible, Figure 5).

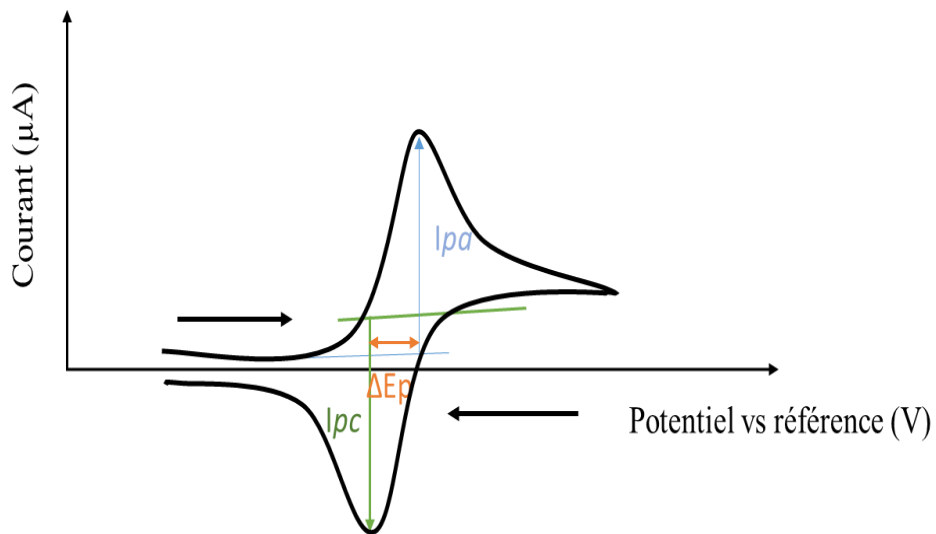


Figure 5 : Voltammétrie cyclique d'une expérience en présence d'un couple redox.

Dans ce type d'expérience de voltammétrie, on mesure le courant faradique dû à la réaction d'oxydo-réduction. Partant d'un potentiel initial (E_i) choisi tel qu'il ne provoque pas de réaction (courant nul), et en se rapprochant du potentiel d'oxydation de l'espèce, un courant positif augmente pour indiquer que l'oxydation de l'espèce active commence au voisinage de la surface de l'électrode de travail. A un potentiel suffisamment anodique, la concentration de

réducteur à la surface de l'électrode tend vers zéro et est compensée par une augmentation de la concentration de l'oxydant formé à l'électrode jusqu'à atteindre la concentration de départ de l'espèce oxydante et un courant de pic d'oxydation anodique I_{pa} est observé (courant maximal atteint dû à la compétition entre la cinétique de transfert de charge et le transport de matière à l'électrode). Á un certain potentiel fixé par l'utilisateur, le sens de balayage est inversé, tout en maintenant la vitesse v constante. C'est une réaction de réduction qui se traduit par la détection d'un pic courant de réduction cathodique I_{pc} . Dans ces conditions, pour une réaction d'oxydo-réduction électrochimiquement réversible, où les deux espèces sont solubles en solution, le courant d'oxydation I_{pa} est l'opposé du courant de réduction I_{pc} . L'écart ΔE_p entre les potentiels de pic d'oxydation et de réduction est égal à 57 mV à température ambiante ($T=20\pm 2$ °C) pour une réaction mono-électronique lorsque le système est électrochimiquement réversible (cinétique rapide du transfert d'électron).

Nous avons exploité la technique de voltammétrie cyclique pour la modification de surface de l'électrode, principalement par réduction de sels d'aryles diazonium. Nous l'avons aussi employé pour l'étude du comportement de sondes électrochimiques (e.g. ferri/ferrocyanure) avant et après la modification des surfaces (effet bloquant).

Enfin, la voltammétrie cyclique nous a permis de caractériser l'électroactivité de biofilms développés à la surface de l'électrode. Cette mesure se réalise là aussi à l'aide d'un montage à trois électrodes. Un potentiel est appliqué à l'électrode de travail (l'anode) par rapport à l'électrode de référence (une électrode au calomel saturé) introduite dans le compartiment anodique afin de caractériser l'anode et sous flux d'argon afin d'éviter l'intervention de dioxygène. Le courant résultant des réactions se produisant à l'anode circule entre cette électrode de travail et la contre électrode (la cathode de la pile). Afin d'observer l'électroactivité de biofilms bactériens sur l'électrode, on a choisi une vitesse de balayage v faible de 5 mV/s adaptée aux cinétiques des réactions métaboliques des bactéries qui forment les biofilms. Les voltammogrammes des bioanodes colonisées par des biofilms électroactifs ont été enregistrés sous différentes conditions; en saturation de substrat (20 mM d'acétate de potassium dans l'anolyte) ou bien en absence de substrat.

II.2.1.c. Chronoampérométrie

La chronoampérométrie est effectuée en utilisant un potentiostat en mode chronoampérométrie (Autolab PGSTAT302N). Cela consiste à imposer un potentiel constant durant un temps "t" fixe et on mesure l'évolution de courant au cours de ce temps; $i=f(t)$. C'est

le courant résultant des réactions électrochimiques qui se produisent à la surface de l'électrode de travail. L'allure de la courbe $i=f(t)$, montre que le courant chute au cours du temps en raison de la diminution progressive des espèces électroactives au voisinage de l'électrode de travail. Cette allure est décrite par l'équation de Cottrell (Pajkossy, 1991);

$$i(t) = nFACr \sqrt{\frac{D_r}{\pi t}} \quad \text{Équation 1}$$

Avec :

$i(t)$: courant (A)

t : temps (s)

n : nombre d'électrons échangés (mol)

F : constante de Faraday (96485 C.mol⁻¹)

A : surface de l'électrode (cm²)

C_r : concentration interfaciale de réducteur (mol.cm⁻³)

D_r : coefficient de diffusion de réducteur (cm².s⁻¹)

L'aire sous la courbe $i=f(t)$ représente la quantité de charge "Q" consommée durant la polarisation. Cette quantité de charge vérifie la loi de Faraday ci-dessous dans l'Équation 2, (Bard and Faulkner, 2001).

$$Q(t) = \int_0^t i(t)dt \quad \text{Équation 2}$$

La chronoampérométrie est effectuée à l'aide d'un montage de trois électrodes. Dans ce cas, l'anode est l'électrode de travail, la cathode est la contre électrode et la référence en calomel saturé (ECS) est placée dans le compartiment anodique (anolyte).

II.2.1.d. Courbe de puissance

Pour effectuer la courbe de puissance de la pile, on travaille avec un montage expérimental à deux électrodes: la bioanode est l'électrode de travail alors que la cathode de la pile est à la fois l'électrode de référence et la contre électrode. Avant de commencer, nous mesurons la différence de potentiel à circuit ouvert (OCV) correspondant à la différence de potentiel maximal appliquée durant la chronoampérométrie. Après, nous ajoutons du substrat

(acétate de potassium) pour être en condition saturée (20 mM). Cette différence de potentiel est appliquée durant 600 s (le temps que le courant délivré par la pile soit stable). Partant de cette valeur maximale de potentiel à circuit ouvert, nous diminuons progressivement la différence de potentiel de 0,05 V à chaque mesure. Après chaque potentiel appliqué, nous avons une valeur de courant sous forme d'un palier, l'ensemble de ces valeurs permet de tracer la courbe de puissance par la relation suivante:

$$P = \frac{U * I}{A} \quad \text{Équation 3}$$

Avec

P est la densité de puissance (W/m²)

U est la tension (V)

I est l'intensité (A)

A est la surface de l'électrode (m²)

L'allure de la courbe de puissance obtenue est présentée ci-dessous à la Figure 6.

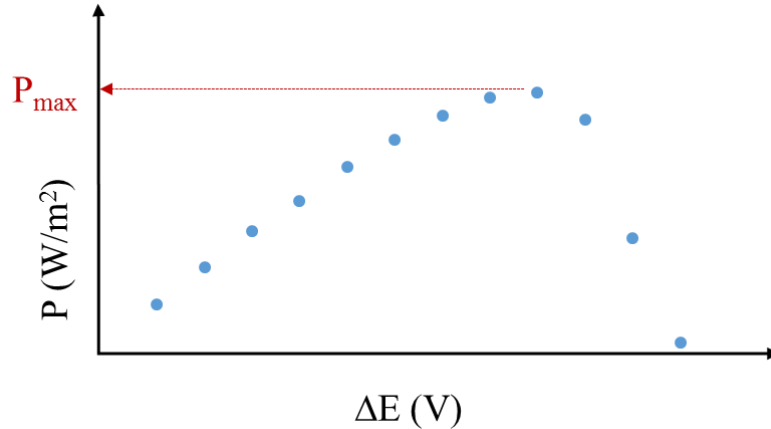


Figure 6 : Exemple d'une courbe de puissance en fonction du potentiel entre les deux électrodes de la pile.

II.2.1.e. Calculs des densités de courant et rendements faradiques

❖ Densité de courant

Toutes les courbes présentées dans cette thèse sont tracées en fonction des densités de courant, c'est-à-dire en divisant le courant obtenu par la surface projetée de l'électrode de travail.

❖ Efficacité Faradique

Le rendement faradique ou efficacité faradique est un moyen de caractériser les performances d'une pile à combustible microbienne. Cela est défini comme le rapport de la quantité d'électricité totale en "Coulomb" transférée à l'anode ($Q_{\text{récupéré}}$), présentée à la Figure 7, sur la quantité totale théorique disponible dans le substrat (Q_{fournie}). Des processus tels que la respiration aérobie et anaérobie, la croissance de la biomasse ou la formation d'intermédiaires réactionnels issus de la fermentation peuvent réduire cette grandeur (Huang and Logan, 2008).

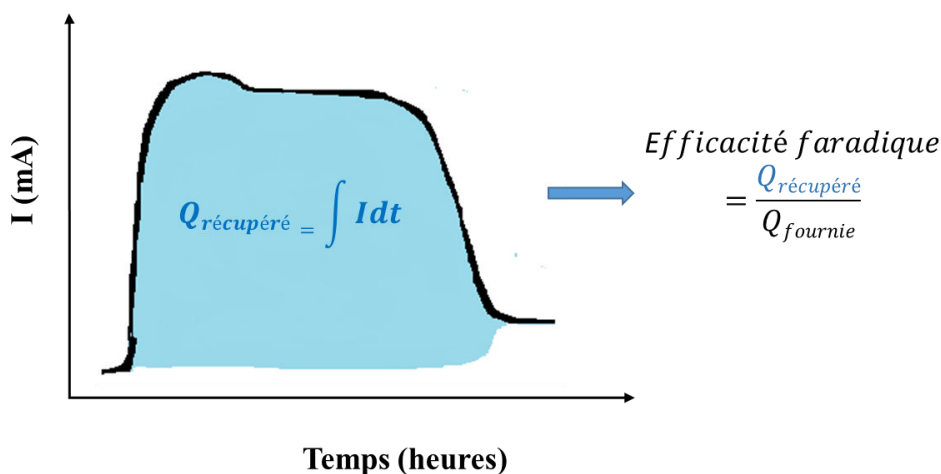


Figure 7 : schéma représentatif de rendement faradique d'un biofilm électroactif.

II.2.2. Autres techniques de caractérisation

A part l'électrochimie, différentes techniques de caractérisation ont été utilisées dans ce travail, notamment des techniques de microscopie (Microscopie à Force Atomique (en anglais, Atomic Force Microscope AFM), Microscopie Electronique à Balayage (MEB)), des techniques spectroscopiques (spectroscopie électronique par absorption UV-Vis, Spectroscopie de photoélectron X (en anglais, X-Ray photoelectron spectrometry: XPS)).

II.2.2.a. Microscopie Electronique à Balayage MEB

La Microscopie Electronique à Balayage (MEB ou SEM «Scanning Electron Microscopy» en anglais) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électron-matière. En effet, le principe du MEB consiste à balayer la surface d'un échantillon à l'aide d'un faisceau d'électrons. L'interaction entre la sonde électronique et la surface de l'échantillon génère des électrons secondaires qui sont ensuite dirigés vers un détecteur. L'intensité du signal électrique récupéré au niveau de ce détecteur dépend à la fois de la nature de l'échantillon et de la topographie de l'échantillon ce qui permet d'obtenir une cartographie de la zone balayée. Les échantillons doivent être conducteurs et doivent nécessairement être étudiés sous vide afin d'éviter le freinage et la déviation des électrons dans l'air.

Pour observer ce genre d'échantillons biologiques fragiles, non conducteurs et composés majoritairement d'eau, il faut suivre le protocole de préparation suivant.

Tout d'abord et afin de conserver la structure aussi proche que possible de l'état vivant de notre échantillon, ce dernier doit être fixé. Pour cela, les échantillons de biofilms développés sur les anodes en graphite sont prélevés en les sectionnant à l'aide d'une pince (stérile). Des morceaux des bioanodes, de petite taille (environ : 2x0.5x0.5 cm), sont trempés une nuit à température ambiante dans une solution de glutaraldéhyde ($C_5H_8O_2$) diluée à 2.5 % dans du tampon phosphate 0.1 M à pH7. Le glutaraldéhyde est un agent réticulant et permet de créer des liaisons chimiques entre les différentes molécules constituant les bactéries et la matrice d'exopolymères. Cette fixation chimique permet de conserver la structure et l'ultrastructure du matériel biologique.

Puis, nos échantillons biologiques doivent être séchés avant d'être introduits dans l'enceinte sous vide secondaire du MEB. Cette étape est délicate car elle risque de générer des artefacts de déformation. Nous avons travaillé sous la hotte, préalablement nettoyée au méthanol (afin d'être le plus stérile possible). Ce séchage est réalisé par déshydratation progressive des échantillons par un solvant organique. Cette étape est obtenue par des passages successifs des échantillons dans des bains d'éthanol ou d'acétone de concentration croissante. Nous avons trempé les échantillons pendant environ trois minutes dans des bains à 60 %, 70 %, 80 %, 90 % et 100 % d'éthanol. L'éthanol est ensuite évaporée en élevant progressivement la température et la pression jusqu'à atteindre l'état super critique. Les échantillons sont ensuite collés sur des supports métalliques.

Enfin et avant de commencer prendre des images MEB, les échantillons sont modifiés par pulvérisation cathodique d'une couche mince d'or-palladium (entre 20 et 40 nm) tout en respectant et en conservant leur topographie. Les plots avec échantillon sont introduits dans l'enceinte du métalliseur dans laquelle on fait le vide. On laisse remonter un peu la pression en introduisant le gaz argon. On applique un puissant champ électrique entre une cathode (cible en or) et une anode qui porte les plots avec échantillon. Les électrons libres entraînés en spirale par un système magnétique entrent en collision avec les atomes Ar, ce qui génère des ions Ar^+ . Ces cations sont accélérés vers la cathode qu'ils bombardent avec assez d'énergie pour arracher des atomes d'or qui tombent en pluie sur la surface des échantillons, formant ainsi une fine couche conductrice.

Le microscope à balayage électronique (MEB) utilisé est un JSM-6301F (Jeol) (Centre de Microscopie Electronique à Balayage et microAnalyse, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, dirigé par Francis Gouttefangeas). Le montage d'un microscope électronique à balayage est représenté dans la Figure 8.



Figure 8 : MEB JSM-6301F (Jeol).

II.2.2.b. Microscopie à Force Atomique (AFM)

Lors de nos expériences, la microscopie à force atomique utilisée est un AFM Pico-plus (Molecular Imaging, Phoenix, USA, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu) au sein de la plateforme SPM dont le responsable est Jean-François Bergamini.

La microscopie à force atomique (en anglais, Atomic Force Microscopy AFM), introduite en 1986 par G. Binnig, C.F. Quate et C. Gerber, est une technique qui permet d'imager la surface d'un échantillon avec une grande résolution en altitude (RIVOAL and Christian, 2005). Lors de ces travaux de thèse, des images de microscopie à force atomique ont été réalisées dans

le but de caractériser les surfaces modifiées (Bélanger and Pinson, 2011),(Brooksby and Downard, 2004b) ainsi que l'épaisseur de la couche de modifiant déposée par réduction de sels d'aryle diazonium principalement.

Pour réaliser ce dernier objectif et pour mettre en évidence l'épaisseur de la couche greffée sur l'électrode, nous employons la technique dite de « scratching » (Anariba et al., 2003b).

Elle consiste à réaliser un scratch (grattage) sur le film greffé sur l'échantillon afin de mesurer son épaisseur. Cette étape est assurée par l'imposition d'une force sur la pointe AFM pour retirer la couche présente sur la surface. Après, un balayage perpendiculaire à la rayure effectuée est réalisé pour mesurer la profondeur ou l'épaisseur du film déposé à la surface de l'électrode.

II.2.2.c. Spectroscopie de photoélectron X (XPS)

Les mesures XPS ont été effectuées soit à l'Institut de Physique de Rennes par Cristelle Mériadec soit à l'Institut des Matériaux de Nantes par Corinne Lagrost avec le support technique de Jonathan Hamon (IMN). Deux spectromètres ont été utilisés. A Rennes, il s'agit d'un modèle VSW HA 100 avec une source de rayons X Mg K α ($h\nu = 1253,6$ eV) et un analyseur de photoélectrons hémisphérique. Les spectres large et étroit ont été acquis avec une énergie de passage de 20 eV. A Nantes, un spectromètre Kratos Axis Nova avec une source Al K α ($h\nu = 1486,6$ eV) et une taille de spot de 0.7 par 0.3 mm² est utilisé. Les spectres larges sont enregistrés avec une énergie de passage de 160 eV (0,5 eV par pas) et les spectres haute résolution avec une énergie de passage de 40 eV (0.1 eV par pas). La calibration des spectres est effectuée en fixant l'énergie de C 1s à 285 eV. La composition de surface a été traitée en utilisant le logiciel Casa XPS (Casa Software, Ltd., version 2.3.18).

En particulier, j'ai utilisé cette technique afin de déterminer la nature chimique de la surface de PPF pour pouvoir réaliser une comparaison entre deux séries de substrats de Pyrolized Photoresist Film (PPF) préparées avec et sans conditions réductrices, c'est-à-dire en présence et en l'absence de H₂ (Cortés et al., 2017). Je ne détaillerai pas ces travaux dans mon manuscrit mais, brièvement, cette étude a montré que les surfaces de PPF préparées en absence de H₂, possèdent beaucoup plus de fonctions d'oxygène (groupes hydroxyles) à la surface que le PPF préparé dans des conditions réductrices. Ces terminaisons hydroxyles sont très utiles pour modifier la surface avec une monocouche ou sous-monocouche de ferrocène via une réaction SN1 entre le Ferrocène méthanol et la surface PPF en présence d'un acide fort.

II.2.2.d. Spectroscopie électronique d'absorption ultraviolet-visible

Afin d'étudier la formation des cations de diazonium lors de la diazotation de différents composés étudiés pendant ma thèse, nous avons utilisé la spectroscopie ultraviolet-visible ou spectrométrie ultraviolet-visible. C'est une technique de spectroscopie qui repose sur la transition d'électron de valence qui passe d'un état fondamental à un état excité après absorption d'un photon dans l'UV-visible. Le spectre électronique est la fonction qui relie l'intensité lumineuse absorbée par l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde selon la loi de Beer-Lambert (Équation 4), valable pour les solutions transparentes et peu concentrées.

$$A = \varepsilon * l * c \qquad \text{Équation 4}$$

Avec

l : La largeur de la cuve contenant l'échantillon (la longueur du chemin optique),

c : La concentration molaire de l'échantillon,

ε : Le coefficient d'extinction molaire (en mol⁻¹.L.cm⁻¹ si l est en cm),

Lors de nos expériences, la spectroscopie ultraviolet-visible utilisée est le UV visible spectrophotometer (UV-1605, Shimadzu).

II.2.3. Estimation de pH

Le pH de l'anolyte des piles à combustibles microbiennes a été contrôlé régulièrement avec un pH-mètre (Hanna Checker pH meter). Le pH est un paramètre important qui permet de suivre l'activité métabolique des bactéries. Ainsi l'activité de *Geobacter sulfurreducens*, par exemple, peut être ralentie dès que le pH est inférieur à 6 (Kim and Lee, 2010). À pH=5, cette activité est complètement inhibée (Patil et al., 2010).

II.3. Préparation des électrodes

II.3.1. Préparation de l'électrode de carbone vitreux

❖ Polissage et rinçage

La première étape de préparation de l'électrode de carbone vitreux est un polissage mécanique abrasif à l'aide des papiers de polissage sous eau (Waterproof Silicon Carbide Paper FEPA P ≠ 4000). C'est le seul moyen efficace connu pour nettoyer l'électrode et éliminer la couche greffée sur la surface.

Ce protocole permet d'obtenir une surface plane avec un poli miroir. L'électrode est ensuite rincée tout simplement à l'eau MilliQ (Purelab classic, ELGA : PL5242) puis gardée dans ce milieu aqueux jusqu'à utilisation.

II.3.2. Préparation de l'électrode de graphite

❖ *Polissage et rinçage*

Les électrodes utilisées dans les piles sont en carbone graphite (*Einsenhuth GmbH & co*) d'une vingtaine de centimètres carrés. Un protocole de polissage mécanique est mené en utilisant des papiers de polissage sous eau (Waterproof Silicon Carbide Paper FEPA P ≠ 2400) dans un premier temps et de Waterproof Silicon Carbide Paper FEPA P ≠ 4000 dans un deuxième temps. Pour finir le nettoyage, les électrodes subissent un rinçage soigneux à l'eau MilliQ (Purelab classic, ELGA: PL5242).

II.4. Modification de surface d'électrode

Dans cette partie de ma thèse concernant la modification de surface, nous avons modifié différents type d'électrodes (électrode de carbone vitreux, PPF, électrode de graphite et également des substrats d'or (pour analyse)) par réduction électrochimique de sels d'aryles diazonium dans des conditions expérimentales qui seront décrites dans le chapitre suivant traitant des modifications de surface (Agullo et al., 2012) (Bélangier and Pinson, 2011), (McCreery, 2008b), (Pinson and Podvorica, 2005).

Pour cette modification électrochimique, l'électrode de travail est l'électrode à modifier et la contre électrode est une électrode de platine. L'électrode de référence sera une électrode au Calomel Saturé (ECS).

II.5. Eau de la station d'épuration

Les biofilms sont développés à partir de deux sources mixtes de bactéries ; les boues d'aération de l'usine de Beaurade qui traite les eaux usées de la ville de Rennes et un extrait du sol (campus de Beaulieu, Rennes).

❖ *Inoculum :*

En biologie un inoculum est un échantillon contenant des bactéries destiné à être introduit au sein d'un milieu favorable à son développement, dans notre cas dans l'anolyte d'une pile, afin de l'étudier et de l'identifier.

II.6. Le séparateur; la membrane échangeuse d'ion

Dans les PCMs, la membrane échangeuse d'ions (MEI) est importante car elle évite tout d'abord aux réactifs des deux compartiments de réagir sans produire de l'électricité et elle maintient aussi l'équilibre des charges par la migration des ions. La MEI comporte des groupements fonctionnels ionisés, fixes, porteurs de charges positives ou négatives et des ions mobiles de signe contraire échangeables avec d'autres provenant d'une solution. Elle existe sous deux types:

1) les membranes échangeuses de cations, MECs, contenant des groupes chargés négativement fixés à une matrice de polymère tels que $-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$. Elles sont sélectivement perméables aux cations et les membranes échangeuses d'anions,

2) les membranes échangeuses d'anions, MEAs, qui contiennent des groupes chargés positivement tels que RNH_2^+ , R_2NH^+ ou aussi R_3N^+ fixés à une matrice de polymère. Elles excluent inversement les cations et sont perméables aux anions.

Parmi les membranes échangeuses de proton on peut citer les membranes en Nafion™, connues pour ses bonnes propriétés de transport du proton (Mauritz and Moore, 2004). Elles sont fréquemment utilisées dans les piles à combustibles microbiennes PCMs (Oh and Logan, 2006), (Rozendal et al., 2006). D'autres types de membranes comme des membranes échangeuses d'anions (MEA), ou des membranes d'ultrafiltration (MUF) ont été utilisées dans les PCMs (Kim et al., 2007). Bien que les performances dans les PCMs équipées de MUF soient moins élevées que dans le cas des membranes échangeuses d'anion ou de cation, le coût moindre des membranes d'UF représente une alternative à considérer.

Les MEI utilisées durant nos expériences sont des membranes échangeuses d'ions (anionique et cationique) de Fumasep® renforcé en Polyéthylène Téréphtalate (PET) de 130 μm d'épaisseur et 3.8 cm^2 de surface (Fumasep FTAM-E, Fumatech, Allemagne).

II.7. Les réacteurs: dispositifs expérimentaux

❖ *Description des piles à combustible microbiennes mises au point au laboratoire durant les travaux de thèse*

Les expériences faites au cours de ma thèse sont menées sur des piles qui possèdent une architecture dite "H". Elles comportent des orifices fermés par des bouchons et utilisés comme ports de prélèvement ou pour les différents modes d'alimentation.

La figure ci-dessous (Figure 9) présente une pile à combustible microbienne du laboratoire:



Figure 9 : PCM du laboratoire de type "H", constituée des compartiments anodique (à gauche) et cathodique (à droite).

L'architecture de piles à combustible microbienne est constituée tout simplement de deux compartiments cylindriques en verre d'un volume de 300 mL, liés à mi-hauteur par une bague de serrage qui permet aussi la tenue de la membrane séparant les compartiments. C'est une membrane échangeuse d'ions (anionique et cationique) de Fumasep[®] renforcé en Polyéthylène Téréphtalate (PET) de 130 μm d'épaisseur, et de 3,8 cm^2 de surface (Fumasep[®] FTAM-E, Fumatech, Allemagne). Après cet assemblage, un test d'étanchéité est effectué avant chaque expérience. Il suffit de remplir les deux compartiments avec de l'eau et de vérifier l'absence de fuites (Figure 10 A).

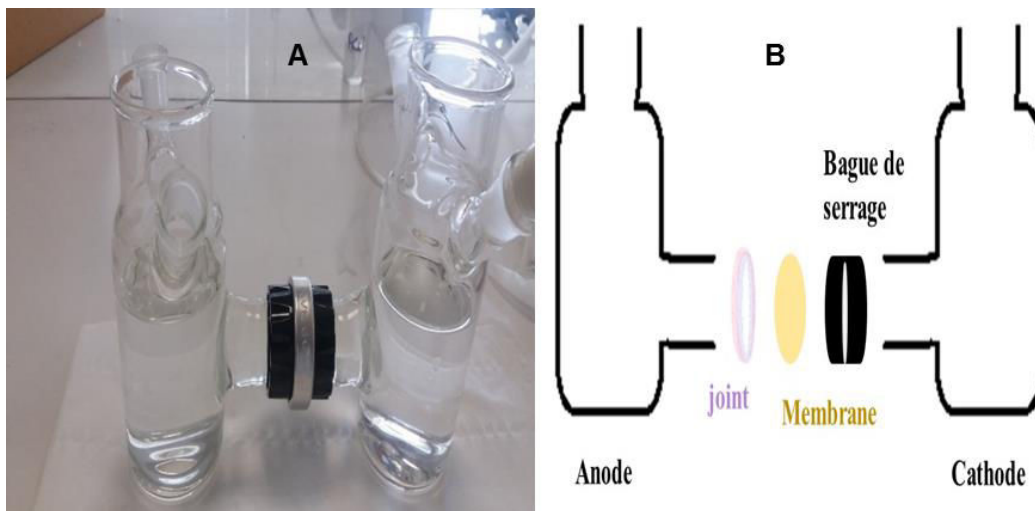


Figure 10: Photographies d'un dispositif d'une PCM (lors d'un test d'étanchéité (A)). Schéma des différents constituants de la PCM (B).

Les électrodes utilisées dans les deux compartiments (anodique et cathodique) sont en graphite (Einsenhuth GmbH & Co), d'une vingtaine de centimètres carrées connectées, grâce à des pinces crocodiles, à un fil électrique qui permettra de connecter le dispositif à une résistance externe variable (en général 1 k Ω). La pince crocodile est enfoncée dans un bouchon hermétique afin de bien fermer le dispositif pour empêcher l'oxygène de pénétrer dans le compartiment anodique car on doit travailler en conditions anaérobies (Figure 11).

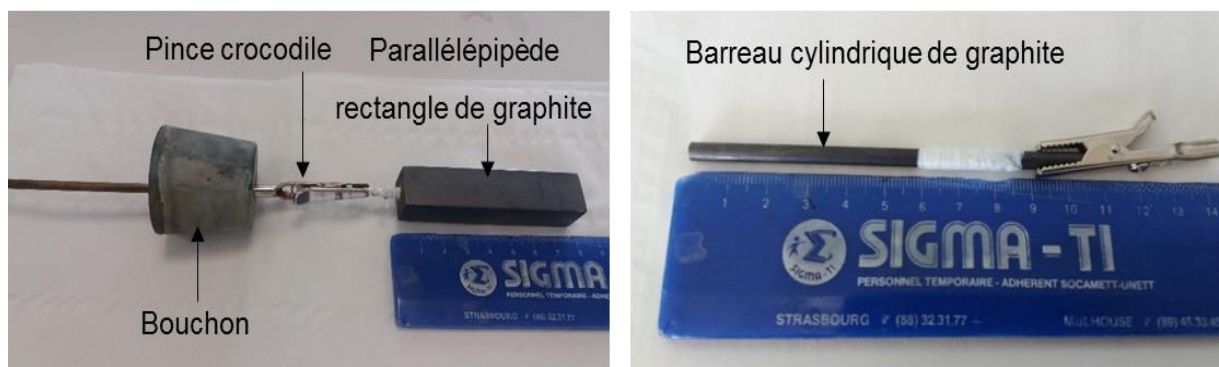


Figure 11 : Photographies représentant les électrodes de graphite utilisées à l'anode et à la cathode de la PCM et le bouchon hermétique utilisé ainsi que de la pince crocodile assurant la connexion.

L'anolyte est constituée de 200 mL d'inoculum, contenant de l'acétate à 20 mM et du tampon phosphate à 20 mM ($pK_{a(25^{\circ}C)} = 7,2$), qui permet à la fois, le maintien du pH, un apport de potassium et de phosphore mais aussi des ions mobiles (électrolyte support) qui conduisent le courant. L'anolyte est maintenu en condition anaérobie grâce à un bullage d'argon pendant 15 minutes à chaque changement de ce dernier. Son pH est mesuré quotidiennement et régulièrement ajusté à pH=7 par ajout d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique (37 %, VWR).

Le catholyte est une solution de 200 mL d'hexacyanoferrate (III) de potassium à 0.1 M (Acros organics, $E=+0,2$ V vs ECS) et du tampon phosphate à 20 mM. Le dispositif est alors placé dans un bain thermostaté à $30^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$.

II.8. Le séquençage

Le séquençage consiste à déterminer l'enchaînement linéaire d'un fragment d'ADN (acide désoxyribonucléique) ou, de façon plus générale, d'un génome. Son histoire débute en 1977 avec Maxam et Gilbert lorsqu'ils développent une technique basée sur le marquage de

radioactif de fragments et de leur coupure sélective par dégradation chimique (Maxam and Gilbert, 1977).

Dans ce contexte, une analyse communautaire bactérienne a été effectuée à l'aide du séquençage à haut débit des amplicons de l'acide ribonucléique (ARN) ribosomique 16S (ARNr 16S). Cet outil est conçu pour donner à la fois le tableau d'abondance des unités taxonomiques opérationnelles (OTU) et leur affiliation taxonomique (Escudie et al., 2015).

La technologie de séquençage se décompose en 5 grandes étapes principales: l'extraction de l'ADN, l'analyse de l'ADN grâce un nanodrop qui est un fluorospectromètre et spectrophotomètre UV-visible permettant de quantifier les échantillons d'ADN, suivie par une étape d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne), le séquençage illumina, puis l'analyse des données.

II.8.1. L'extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique qui consiste à isoler l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse. Au niveau du laboratoire de Génétique médicale et d'oncogénétique, l'extraction se fait selon deux méthodes: soit par SEL ou par KIT commercialisé. Dans notre cas, nous avons utilisé l'extraction par Kit de MoBio: PowerBiofilm DNA isolation pour analyser la nature et la composition de la communauté bactérienne dans le compartiment anodique (pour les bactéries organisées sur l'anode et sur la membrane échangeuse d'ion en biofilm, soit jeune ou mature, et pour les bactéries présentes dans l'anolyte) et aussi les différentes bactéries présentes dans la boue de station d'épuration. Cette étape était faite dans notre laboratoire et repose sur trois étapes.

II.8.1.a. Lyse des cellules bactériennes

Cette étape est effectuée via un détergent qui permet la dissolution des lipides membranaires et leur solubilisation. Ensuite une enzyme hydrolyse les protéines, des agents de chélation capturent les ions (comme le calcium) qui facilitent une élimination ultérieure. Avec le kit utilisé, on combine la lyse chimique avec une lyse mécanique. De plus le tampon de lyse de ce kit permet l'élimination des inhibiteurs de PCR (tels que l'acide humique, les métaux, les sels et les pesticides) généralement présents dans les biofilms. Il en résulte des rendements accrus d'ADN sans inhibiteur de tous types de biofilms. C'est l'aspect majeur qui nous a poussés à utiliser ce kit de MoBio: PowerBiofilm DNA isolation.

II.8.1.b. Elimination des protéines et des peptides

Après l'étape de lyse ou de dissolution des cellules, du phénol et chloroforme sont ajoutées à la solution pour précipiter les protéines. L'ADN reste en solution dans la phase aqueuse qui est récupérée par centrifugation.

II.8.1.c. Récupération de l'ADN

Dans la phase aqueuse obtenue, nous avons ajouté de l'éthanol à 100% qui précipite l'ADN sous la forme d'une « pelote ». Après plusieurs étapes de lavage à l'éthanol (75% qui solubilise toutes les impuretés) et centrifugation, l'ADN est purifié et placé dans du tampon (10Mm TRIS) afin d'être conservé, à 4°C ou à 20°C, avant d'être analysé.

II.8.2. Analyse de l'ADN

Tout d'abord, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un nanodrop qui est un fluorospectromètre et spectrophotomètre UV-visible permettant de quantifier les échantillons d'ADN, d'ARN et de protéines en quelques secondes avec 1 à 2 µL. C'est une mesure des concentrations des ARN et ADN (A260) et de la pureté des échantillons (260/280 ratio). Ce ratio consiste à détecter la contamination d'acides nucléiques présente dans une solution de protéines et plus souvent pour évaluer la contamination de protéines dans une solution d'acides nucléiques. Le ratio A260/A230 est aussi impliqué comme un deuxième indicateur de pureté, il est généralement plus élevé que le ratio A260/A280 (compris entre 2,0 – 2,2), indique une bonne pureté des acides nucléiques. Lorsque ce ratio est significativement plus faible que 2,0 – 2,2, cela révèle la présence de contaminants absorbant à 230 nm dans la solution. Plusieurs contaminants absorbant à 230 nm proviennent de l'échantillon ou de la purification, comme par exemple le phénol, l'isothiocyanate de guanidine, les carbohydrates, les peptides, l'acide humique, l'urée, l'EDTA, les polysaccharides, ... Leur présence est détectable grâce à ce ratio.

Après cette étape de quantification, la qualité de l'ADN est testée via un Bioanalyseur Agilent 2100. Les puces à ADN facilitent l'analyse des réactions PCR multiplex de haute résolution, en mesurant la taille et la concentration précises de chaque fragment. Le bioanalyseur est une plateforme micro-fluidique de quantification et de contrôle de la qualité de l'ADN, ARN, protéines et cellules, basée sur l'obtention de profils en fonction de la taille des produits.

II.8.3. L'amplification de l'ADN

La troisième étape est l'amplification clonale, par une PCR. C'est une technique d'amplification d'ADN in vitro. Elle permet d'obtenir une quantité importante d'une séquence d'ADN choisie. Cette étape nécessite l'utilisation des amorces adaptées à la réalisation de la PCR. Dans notre cas; nous avons utilisé le primer 5' (5' primer; CCTACGGGNGGCWGCAG) et le primer 3' (3' primer; GGATTAGATACCCBDGTAGTC) comme amorces.

II.8.4. Séquençage Illumina

Le système de séquençage MiSeq permet le séquençage en simultané de plusieurs millions de fragments d'ADN. La technologie utilisée repose sur une amplification en ponts des fragments d'ADN sur support solide (flow cell) suivi d'un séquençage par synthèse chimique (SBS) des colonies d'ADN préalablement amplifiés. La spécificité de cette technologie repose sur une amplification en pont (bridge PCR) des fragments à séquencer. Elle a lieu sur une surface de verre appelée flow cell (FC), similaire à une lame de microscope, divisée en huit lignes (à l'origine, une ligne par échantillon). Les fragments de la librairie à séquencer possèdent des adaptateurs à leurs extrémités. Ceux-ci vont leur permettre de se fixer de façon aléatoire sur la FC, par hybridation sur les amorces qui en couvrent la surface (Figure 12).

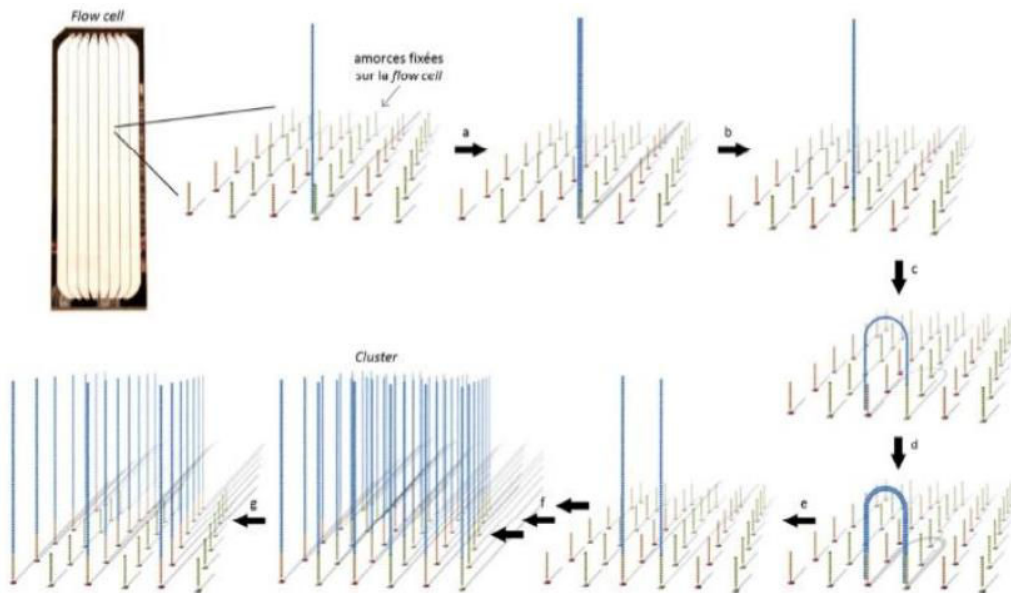


Figure 12 : Amplification en pont de la technologie Illumina.

Un nouveau brin est alors synthétisé par une polymérase (Figure 12a): il est fixé de façon covalente à la FC. Le brin d'origine est alors éliminé par dénaturation (Figure 12b) et l'extrémité libre du brin restant s'hybride à une amorce adjacente pour former un pont (Figure 12c). La polymérase synthétise à nouveau le brin complémentaire pour former un pont d'ADN double brin (Figure 12d) puis les deux copies sont libérées par dénaturation (Figure 12e). Le cycle d'amplification en pont (étapes c à e) recommence pour former à terme un regroupement d'ADN cloné en une zone appelée cluster (Figure 12f). Les brins anti-sens (correspondant aux amorces vertes) sont ensuite clivés (Figure 12g): c'est la linéarisation.

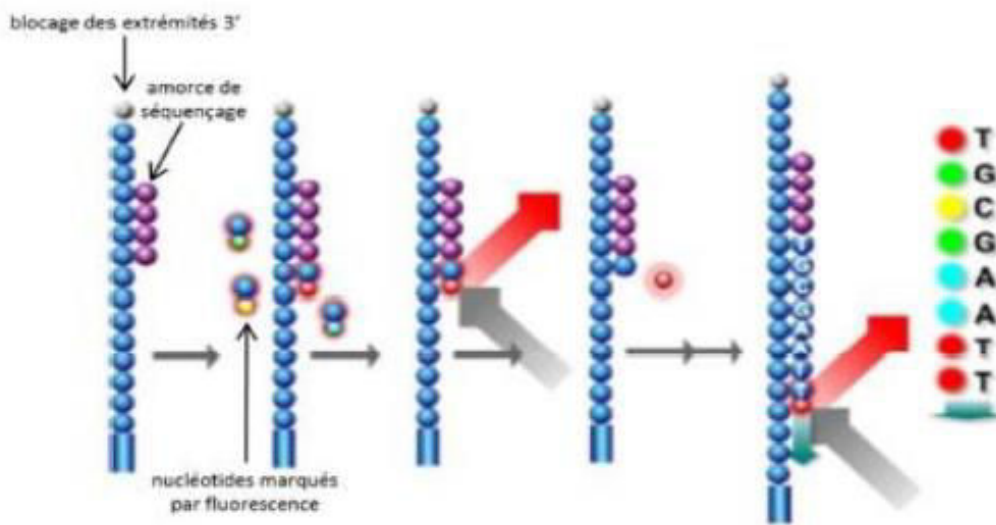


Figure 13 : Aperçu de la technologie de séquençage Illumina.

L'extrémité 3' libre des fragments d'ADN est bloquée et l'amorce de séquençage s'y hybride (Figure 13). Le séquençage s'effectue sur des centaines de millions de cluster simultanément, grâce à une chimie de terminateurs réversibles: des nucléotides bloqués marqués par fluorescence sont ajoutés ; l'un d'entre eux est incorporé, la fluorescence émise est relevée puis le fluorophore et le bloqueur sont clivés permettant l'ajout d'un nouveau nucléotide. A chaque cycle d'incorporation, une base peut être déterminée. Cette chimie a pour avantage de séquencer correctement les homopolymères. Le Genome Analyzer a cependant pour inconvénient de lire peu de bases, (36 à ses débuts, jusqu'à 150 bases aujourd'hui), ce qui le rend toutefois approprié à l'analyse de génomes dont on a une bonne annotation, comme la séquence Adn correspondant à l'ARNr 16S (Ahakoud Mohamed «le séquençage d'acide désoxyribonucléique ; principe technique, indications médicales et expérience de CHU Hassane

II, ILE DE FES», Thèse de doctorat médecine, Maroc, Université Sidi Mohamed ben Abdellah, faculté de pharmacie et de médecine, 2015, p 65).

II.8.5. Analyse des données de séquençage

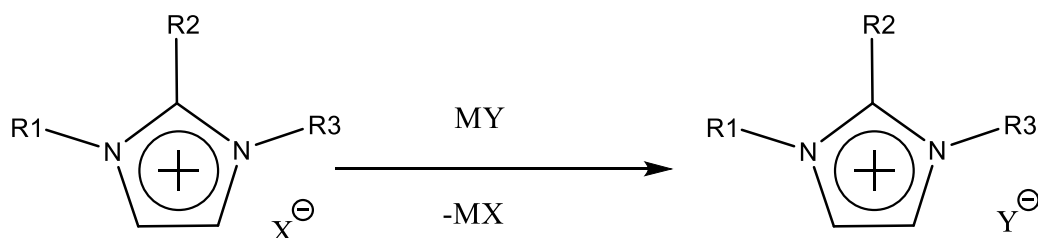
Après l'obtention de toutes les données de séquençage concernant nos espèces, la dernière étape sera alors, l'analyse de ces données. Dans ce but, nous avons utilisé la plateforme Galaxy notamment l'outil FROGS: Find Rapidly OTU with Galaxy Solution du genotoul (<http://bioinfo.genotoul.fr/>).

Dans cette analyse, il est nécessaire de commencer par un prétraitement des données pour comparer les séquences obtenues à toutes les séquences de code à barres. Les fichiers Fastq (ou une paire de fichiers FastQ) pour chaque échantillon sont inclus dans une archive et un rapport décrit le nombre de séquences attribuées pour chaque échantillon (Kozich et al., 2013), (Martin, 2011) et (Magoč and Salzberg, 2011). Après cette étape de prétraitement, une autre étape appelée Clustering swarm est envisagée pour délimiter les unités taxonomiques opérationnelles (OTU). Ensuite, et avant de finir, il faut supprimer les chimères de PCR (Mahé et al., 2014). Enfin, l'affiliation taxonomique est ajoutée dans le fichier d'abondance (Camacho et al., 2009) et (Wang et al., 2007).

Les expériences de séquençage ont été effectuées à l'université de Rennes1, équipe de l'institut génétique et développement de Rennes. J'ai participé à toutes les étapes, sous la supervision de Sophie Michon-Coudouel et Marine Biget.

II.9. Synthèse des Liquides ioniques (LI)

La préparation des liquides ioniques dérivés d'imidazolium (LI) est effectuée par la méthode d'échange d'anion à partir d'un sel d'imidazolium précurseur avec un autre sel inorganique (Wasserscheid and Welton, 2008) et (Welton, 1999).



Avec

R₁, R₂ et R₃: groupements alkyles ou H

MY: LiNTf₂, NaOTf, KPF₆, KBF₄

X: Cl, Br, I

Les LIs sont généralement des liquides incolores bien que ceux à base de PF₆⁻ ou BF₄⁻ puissent présenter une légère coloration jaune. La pureté des LI est un paramètre important pour la plupart des applications car la présence d'impuretés peut gravement affecter les propriétés physico-chimiques des LI (Noda et al., 2001), (Seddon et al., 2000) et la réactivité des systèmes catalytiques (Daguenet and Dyson, 2004) et (Magna et al., 2003). Cela nécessite parfois de les purifier (Lavages et séchages sous vide) avant usage.

❖ *Synthèse de l'acétate de 1-Butyl-3-méthylimidazolium, BMIM Acétate*

Tout d'abord, 3.5 g de chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazolium (BMIMCl) et 1.97 g d'acétate de potassium (CH₃CO₂K) sont mis en suspension dans l'acétone. Puis, la solution est laissée sous agitation pendant toute la nuit avant d'être filtrée sur célite. Ensuite, l'acétone est évaporée. Le liquide ionique obtenu est dissout dans du dichlorométhane (CH₂Cl₂) pour être filtré sur une colonne de silice/alumine (SiO₂/Al₂O₃) afin d'éliminer le KCl résiduel. Enfin, et après avoir évaporé le dichlorométhane, le liquide ionique obtenu (liquide incolore) est séché sous vide d'une pompe à palette pendant une nuit (rendement = 85%).

RMN ¹H (300MHz, (CD₃)₂CO) δ en ppm: 0.89 (t, 3H), 1.27 (m, 2H), 1.70 (s, 3H, CH₃COO-), 1.79 (m, 2H), 3.9 (s, 3H), 4.22 (m, 2H), 7.63 (m, 2H), 10.19 (s, 1H).

❖ *Synthèse du bis (trifluorométhylsulfonyl)imide de 1-Butyl-3-méthylimidazolium ; BMIM NTf₂ :*

10.5 g de bromure de 1-butyl-3-méthylimidazolium (BMIM Br) (1 eq) et 15.2 g de bis(trifluorométhylsulfonyl)-imide de lithium (LiNTf₂) (1.1 eq) ont été séparément dissous dans 10 mL d'eau. Les deux solutions de (BMIM Br) et (LiNTf₂) sont additionnées, le LI (hydrophobe) démixe immédiatement de la phase aqueuse. Le milieu est maintenu sous agitation pendant toute la nuit. La phase liquide ionique est extraite par du dichlorométhane. Cette phase organique est purifiée par un multi lavage avec de l'eau (6 fois), puis filtrée sur une colonne de silice/alumine (SiO₂/Al₂O₃). Après avoir évaporé le dichlorométhane, le liquide ionique obtenu est séché sous le vide d'une pompe à palette pendant une nuit (rendement = 87%).

RMN ^1H (300MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ en ppm: 0.96 (t, 3H), 1.42 (m, 2H), 1.90 (m, 2H), 4.07 (s, 3H), 4.38 (t, 2H), 7.71-7.78 (dd, 2H), 9.03 (s, 1H).

❖ *Synthèse d'hexafluorophosphate de 1-butyl-3-méthylimidazolium ; BMIM PF6*

Selon le même protocole que celui décrit précédemment, 15.3 g de bromure de 1-butyl-3-méthylimidazolium (BMIM Br) (1 eq) et 14.2 g d'hexafluorophosphate de potassium (KPF_6) (1.1 eq) sont engagés. On obtient un liquide ionique jaune pâle (rendement = 91%).

RMN ^1H (300MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ en ppm: 0.95 (t, 3H), 1.41 (m, 2H), 1.91 (m, 2H), 4.04 (s, 3H), 4.35 (t, 2H), 7.67-7.73 (dd, 2H), 8.93 ppm (s, 1H).

❖ *Synthèse du bromure de 1-(3-aminopropyl)-3-méthylimidazolium ; LI-NH2*

Le bromure de 1-(3-aminopropyl)-3-méthylimidazolium (LI-NH₂) est synthétisé à partir de 3-bromopropylamine hydrobromure (1. Eq) et le 1-méthylimidazole (1. Eq) qui sont dissouts dans l'éthanol. La solution a été chauffée à 84°C (dans un ballon mené d'un réfrigérant ; plaque chauffante + bain d'huile), sous agitation pendant 24 heures. Après refroidissement, le mélange turbide résultant a été purifié par l'ajout d'acétate d'éthyle goutte par goutte. Après évaporation, on obtient le LI-NH₂ sous forme d'un produit blanc qui doit être séché sous vide pendant toute la nuit (rendement = 85%).

RMN ^1H (300MHz, D_2O), δ en ppm: 2.24 (m, 2H), 3.02 (t, 2H), 3.87 (s, 3H), 4.28 (t, 2H), 7.44-7.49 (m, 2H), 8.74 (s, 1H).

Le RMN ^{13}C est bien décrit par Yang et al en (2009).

Liste des figures

Figure 1 : Structure du graphite.....	65
Figure 2 : Schéma simplifié pour la mesure de la différence de potentiel (ΔE) entre les deux compartiments anodique et cathodique.	68
Figure 3 : Système électrochimique à trois électrodes: une électrode de travail (ET), une électrode de référence (Ref) et une contre électrode (CE).	69
Figure 4 : Voltammétrie cyclique d'une expérience non faradique.	70
Figure 5 : Voltammétrie cyclique d'une expérience en présence d'un couple redox.	70
Figure 6 : Exemple d'une courbe de puissance en fonction du potentiel entre les deux électrodes de la pile.	73
Figure 7 : schéma représentatif de rendement faradique d'un biofilm électroactif.....	74
Figure 8 : MEB JSM-6301F (Jeol).....	76
Figure 9 : PCM du laboratoire de type "H", constituée des compartiments anodique (à gauche) et cathodique (à droite).....	81
Figure 10: Photographies d'un dispositif d'une PCM (lors d'un test d'étanchéité (A)). Schéma des différents constituants de la PCM (B).....	81
Figure 11 : Photographies représentant les électrodes de graphite utilisées à l'anode et à la cathode de la PCM et le bouchon hermétique utilisé ainsi que de la pince crocodile assurant la connexion.	82
Figure 12 : Amplification en pont de la technologie Illumina.	85
Figure 13 : Aperçu de la technologie de séquençage Illumina.....	86

Références du chapitre II

- Agullo, J., Canesi, S., Schaper, F., Morin, M., and Bélanger, D. (2012). Formation and Reactivity of 3-Diazopyridinium Cations and Influence on Their Reductive Electrografting on Glassy Carbon. *Langmuir* 28, 4889–4895.
- Anariba, F., DuVall, S.H., and McCreery, R.L. (2003a). Mono- and Multilayer Formation by Diazonium Reduction on Carbon Surfaces Monitored with Atomic Force Microscopy “Scratching.” *Anal. Chem.* 75, 3837–3844.
- Anariba, F., DuVall, S.H., and McCreery, R.L. (2003b). Mono- and Multilayer Formation by Diazonium Reduction on Carbon Surfaces Monitored with Atomic Force Microscopy “Scratching.” *Anal. Chem.* 75, 3837–3844.
- Bard, A.J., and Faulkner, L.R. (2001). *Electrochemical methods: fundamentals and applications* (New York: Wiley).
- Bélanger, D., and Pinson, J. (2011). Electrografting: a powerful method for surface modification. *Chem. Soc. Rev.* 40, 3995–4048.
- Brooksby, P.A., and Downard, A.J. (2004a). Electrochemical and Atomic Force Microscopy Study of Carbon Surface Modification via Diazonium Reduction in Aqueous and Acetonitrile Solutions. *Langmuir* 20, 5038–5045.
- Brooksby, P.A., and Downard, A.J. (2004b). Electrochemical and Atomic Force Microscopy Study of Carbon Surface Modification via Diazonium Reduction in Aqueous and Acetonitrile Solutions. *Langmuir* 20, 5038–5045.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., and Madden, T.L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421.
- del Campo, F.J., Godignon, P., Aldous, L., Pausas, E., Sarrión, M., Zabala, M., Prehn, R., and Compton, R.G. (2011). Fabrication of PPF Electrodes by a Rapid Thermal Process. *J. Electrochem. Soc.* 158, H63.
- Cortés, M., Smida, H., Mériadec, C., Barrière, F., and Lagrost, C. (2017). Direct SN1 reaction at oxidized PPF surfaces. *Electrochem. Commun.* 75, 48–51.
- Daguenet, C., and Dyson, P.J. (2004). Inhibition of Catalytic Activity in Ionic Liquids: Implications for Catalyst Design and the Effect of Cosolvents. *Organometallics* 23, 6080–6083.
- Escudie, F., Auer, L., Bernard, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Mariadassou, M., Hernandez Raquet, G., and Pascal, G. (2015). FROGS: Find Rapidly OTU with Galaxy Solution. In Poster Presented at Colloque d'Écologie Microbienne Organisé Par l'Association Française d'Écologie Microbienne (AFEM), Anglet, France, p.
- Huang, L., and Logan, B.E. (2008). Electricity production from xylose in fed-batch and continuous-flow microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 655–664.
- Ishii, S., Ichi, Watanabe, K., Yabuki, S., Logan, B.E., and Sekiguchi, Y. (2008). Comparison of Electrode Reduction Activities of *Geobacter sulfurreducens* and an Enriched Consortium in an Air-Cathode Microbial Fuel Cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7348–7355.
- Kim, M.-S., and Lee, Y. (2010). Optimization of culture conditions and electricity generation using *Geobacter sulfurreducens* in a dual-chambered microbial fuel-cell. *Int. J. Hydrog. Energy* 35, 13028–13034.

- Kim, H.J., Park, H.S., Hyun, M.S., Chang, I.S., Kim, M., and Kim, B.H. (2002). A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* *30*, 145–152.
- Kim, J.R., Cheng, S., Oh, S.-E., and Logan, B.E. (2007). Power Generation Using Different Cation, Anion, and Ultrafiltration Membranes in Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* *41*, 1004–1009.
- Kim, J.R., Dec, J., Bruns, M.A., and Logan, B.E. (2008). Removal of Odors from Swine Wastewater by Using Microbial Fuel Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 2540–2543.
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., and Schloss, P.D. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl. Environ. Microbiol.* *79*, 5112–5120.
- Larrosa-Guerrero, A., Scott, K., Katuri, K.P., Godinez, C., Head, I.M., and Curtis, T. (2010). Open circuit versus closed circuit enrichment of anodic biofilms in MFC: effect on performance and anodic communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *87*, 1699–1713.
- Lehr, J., Garrett, D.J., Paulik, M.G., Flavel, B.S., Brooksby, P.A., Williamson, B.E., and Downard, A.J. (2010). Patterning of Metal, Carbon, and Semiconductor Substrates with Thin Organic Films by Microcontact Printing with Aryldiazonium Salt Inks. *Anal. Chem.* *82*, 7027–7034.
- Leroux, Y.R., Fei, H., Noël, J.-M., Roux, C., and Hapiot, P. (2010). Efficient Covalent Modification of a Carbon Surface: Use of a Silyl Protecting Group To Form an Active Monolayer. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 14039–14041.
- Liu, H., Ramnarayanan, R., and Logan, B.E. (2004). Production of Electricity during Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* *38*, 2281–2285.
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., and Rabaey, K. (2006). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 5181–5192.
- Magna, L., Chauvin, Y., Niccolai, G.P., and Basset, J.-M. (2003). The Importance of Imidazolium Substituents in the Use of Imidazolium-Based Room-Temperature Ionic Liquids as Solvents for Palladium-Catalyzed Telomerization of Butadiene with Methanol. *Organometallics* *22*, 4418–4425.
- Magoč, T., and Salzberg, S.L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* *27*, 2957–2963.
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., Vargas, C. de, and Dunthorn, M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies (PeerJ PrePrints).
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* *17*, 10–12.
- Matthew K., Z., Pavel, T., Benjamin, M., R. Mark, W., and Gregory S., M. (2009). Simultaneous Decoupled Detection of Dopamine and Oxygen Using Pyrolyzed Carbon Microarrays and Fast-Scan Cyclic Voltammetry.
- Mattiuzzi, A., Jabin, I., Mangeney, C., Roux, C., Renaud, O., Santos, L., Bergamini, J.-F., Hapiot, P., and Lagrost, C. (2012). Electrografting of calix[4]arene-diazonium salts to form

- versatile robust platforms for spatially controlled surface functionalization. *Nat. Commun.* *3*, 1130.
- Mauritz, K.A., and Moore, R.B. (2004). State of Understanding of Nafion. *Chem. Rev.* *104*, 4535–4586.
- Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *74*, 560–564.
- McCreery, R.L. (2008a). Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chem. Rev.* *108*, 2646–2687.
- McCreery, R.L. (2008b). Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chem. Rev.* *108*, 2646–2687.
- Noda, A., Hayamizu, K., and Watanabe, M. (2001). Pulsed-Gradient Spin-Echo ^1H and ^{19}F NMR Ionic Diffusion Coefficient, Viscosity, and Ionic Conductivity of Non-Chloroaluminate Room-Temperature Ionic Liquids. *J. Phys. Chem. B* *105*, 4603–4610.
- Oh, S.-E., and Logan, B.E. (2006). Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *70*, 162–169.
- P. J. F. Harris (2004). Fullerene-related structure of commercial glassy carbons. *Philos. Mag.* *84*, 3159–3167.
- Pajkossy, T. (1991). Electrochemistry at fractal surfaces. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* *300*, 1–11.
- Patil, S.A., Harnisch, F., Kapadnis, B., and Schröder, U. (2010). Electroactive mixed culture biofilms in microbial bioelectrochemical systems: The role of temperature for biofilm formation and performance. *Biosens. Bioelectron.* *26*, 803–808.
- Pham, T.H., Aelterman, P., and Verstraete, W. (2009). Bioanode performance in bioelectrochemical systems: recent improvements and prospects. *Trends Biotechnol.* *27*, 168–178.
- Pinson, J., and Podvorica, F. (2005). Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts. *Chem. Soc. Rev.* *34*, 429.
- Ranganathan, S., and McCreery, R.L. (2001). Electroanalytical Performance of Carbon Films with Near-Atomic Flatness. *Anal. Chem.* *73*, 893–900.
- Ranganathan, S., McCreery, R., Majji, S.M., and Madou, M. (2000). Photoresist-derived carbon for microelectromechanical systems and electrochemical applications. *J. Electrochem. Soc.* *147*, 277–282.
- RIVOAL, J.-C., and Christian, F. (2005). Microscopie à force atomique (AFM).
- Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., and Buisman, C.J.N. (2006). Effects of Membrane Cation Transport on pH and Microbial Fuel Cell Performance. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 5206–5211.
- Sánchez-Molas, D., Cases-Utrera, J., Godignon, P., and Javier del Campo, F. (2013). Mercury detection at microfabricated pyrolyzed photoresist film (PPF) disk electrodes. *Sens. Actuators B Chem.* *186*, 293–299.
- Seddon, K.R., Stark, A., and Torres, M.-J. (2000). Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids.

- Wang, B., and Han, J.-I. (2009). A single chamber stackable microbial fuel cell with air cathode. *Biotechnol. Lett.* *31*, 387–393.
- Wang, C., Taherabadi, L., Jia, G., Madou, M., Yeh, Y., and Dunn, B. (2004). C-MEMS for the Manufacture of 3D Microbatteries. *Electrochem. Solid-State Lett.* *7*, A435.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., and Cole, J.R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 5261–5267.
- Wasserscheid, P., and Welton, T. (2008). *Ionic Liquids in Synthesis* (John Wiley & Sons).
- Watanabe, K. (2008). Recent Developments in Microbial Fuel Cell Technologies for Sustainable Bioenergy. *J. Biosci. Bioeng.* *106*, 528–536.
- Wei, J., Liang, P., and Huang, X. (2011). Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* *102*, 9335–9344.
- Welton, T. (1999). Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. *Chem. Rev.* *99*, 2071–2084.
- Zoski, C.G. (2006). *Handbook of Electrochemistry* (Elsevier).

Chapitre 3

Modification chimique de la surface de la bioanode: influence sur la performance des piles à combustible microbiennes (PCMs)

Table des matières

Chapitre III	Modification chimique de la surface de la bioanode : influence sur la performance des piles à combustible microbiennes (PCMs)	99
Chapitre III	Partie A : Modification de la surface de la bioanode	100
III.1	Point bibliographique sur les modifications de surfaces d'électrodes et intérêt de la pyridine en tant que modifiant	100
III.1.1	Modification de surfaces d'électrodes visant à faciliter le transfert électronique des bactéries vers l'électrode.....	100
III.1.1.a	Addition de polymères conducteurs et électroactifs	101
III.1.1.b	Immobilisation de médiateurs redox.....	103
III.1.1.c	Immobilisation de particules métalliques	104
III.1.2	Modifications visant à améliorer l'affinité des bactéries pour la surface des électrodes.....	106
III.1.2.a	Traitements de surfaces.....	106
III.1.2.b	Modifications spécifiques de surface.....	108
III.2	Greffage d'unités pyridine sur des surfaces de carbone.....	113
III.2.1	Stratégie de greffage choisie	113
III.2.1.a	Modification électrochimique de la surface par réduction de sels d'aryle diazonium	113
III.2.1.b	Caractérisation des surfaces modifiées	116
III.2.2	Réactivité des dérivés de l'aminopyridine lors de la diazotation	118
III.2.3	Greffage électrochimique à partir de cations diazopyridinium générés in situ....	121
III.2.4	Caractérisation des surfaces	123
III.2.4.a	Etude des surfaces modifiées par XPS et AFM	124
III.2.4.b	Etude des propriétés de blocage du transfert de charge des couches modifiées	127

III.2.4.c	Etude de l'effet de la charge consommée pour l'électrogreffage	131
III.2.4.d	Angle de contact	135
III.3	Conclusions sur la partie A	137
Chapitre III	Partie B : Influence de la modification sur la performance des piles à combustible microbiennes.....	138
III.1	Fonctionnement de la PCM du laboratoire	138
III.1.1	Electroactivité des molécules connectant le biofilm à l'anode	141
III.1.2	Influence de la concentration en acétate.....	142
III.1.3	Influence de la maturité du biofilm électroactif	144
III.2	Caractérisation de biofilm développé sur l'électrode : identification de la communauté microbienne	147
III.3	Effet de la modification de la surface sur la performance de la pile à combustible microbienne PCM	152
III.3.1	Développement de biofilm sur des électrodes modifiées.....	152
III.3.2	Catalyse de la réaction d'oxydation de l'acétate par le biofilm anodique.....	155
III.3.3	Efficacité Faradique	157
III.3.4	Densité de puissance	160
III.3.5	Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB).....	160
III.3.6	Comparaison de la performance d'une PCM fonctionnant avec une anode modifiée avec la pyridine et d'une PCM contenant une anode modifiée avec multicouches de type polyphénylène généré in situ à partir de l'aniline (phénylamine)	161
III.4	Discussion sur l'effet de la modification de surface sur la performance des biopiles	162
III.5	Caractérisation de cytochrome-c sur des électrodes de carbone vitreux.....	163
III.6	Conclusions sur la partie B.....	166
III.7	Conclusions du chapitre III	167
Liste des figures	168

Liste des tableaux	173
Références du chapitre III	174

Chapitre III Modification chimique de la surface de la bioanode : influence sur la performance des piles à combustible microbiennes (PCMs)

Introduction

Les piles à combustible microbiennes (PCMs) reposent sur des biofilms bactériens électroactifs adhérents sur la surface de l'électrode pour catalyser l'oxydation des composés organiques pour générer de l'énergie électrique. Un des facteurs les plus importants affectant la performance des PCMs est le type de film microbien qui colonise l'électrode. La composition, l'épaisseur, l'adhésion du biofilm et l'interface entre le biofilm et l'électrode jouent un rôle clé dans l'efficacité du transfert d'électrons à travers le biofilm ou entre le biofilm et l'électrode (Borole et al., 2011). Ainsi, les caractéristiques de la surface à coloniser en termes de topologie (en offrant plus de surface colonisable par les bactéries) ou de composition chimique, peuvent avoir une influence sur la performance des PCMs. Dans ce contexte, plusieurs études ont été effectuées dans le but d'optimiser l'interface biofilm/électrode afin d'augmenter les cinétiques de transfert d'électrons. Par exemple Schindler and Osborn (1979), ont rapporté que la présence de cations bivalents sur une surface favorise l'adhésion de bactéries à Gram négatif du fait d'interactions spécifiques avec les lipopolysaccharides (LPS) présents à la surface de ce type de bactéries. Des travaux antérieurs de notre groupe ont démontré que la modification de la surface de l'électrode via des films organiques fins pourrait améliorer la puissance des PCMs (Lapinsonnière et al., 2013 et Picot et al., 2011).

Ce chapitre est divisé en deux grandes parties. La première partie traite l'état de l'art concernant les modifications de surface pour l'amélioration des performances de bioanodes. Puis, nous décrirons la fonctionnalisation de surface de carbone par des unités pyridine en utilisant la chimie des diazoniums. Nous étudierons les caractéristiques électrochimiques de ces électrodes modifiées.

Dans une deuxième partie, nous exploiterons ces modifications dans des PCMs selon une configuration couramment utilisée en laboratoire.

Chapitre III Partie A : Modification de la surface de la bioanode

III.1 Point bibliographique sur les modifications de surfaces d'électrodes et intérêt de la pyridine en tant que modifiant

Généralement, l'anode fonctionnera mieux si le matériau anodique a une surface spécifique plus grande et une affinité plus élevée pour les cellules bactériennes. Dans ce but, et afin d'améliorer l'interface biofilm/anode qui joue un rôle primordial dans le transfert électronique entre les microorganismes électroactifs et l'électrode, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre. Parmi ces approches, on distinguera les nouveaux développements rapportés dans la structure et la nature des matériaux utilisés en tant qu'anodes ou encore l'introduction de fonctions spécifiques de surface ayant une affinité pour des molécules de la membrane bactérienne. Par exemple, divers nanomatériaux (comme les nanotubes de carbone, le graphène, les nanoparticules métalliques, les oxydes métalliques...) et les polymères conducteurs ont été utilisés pour revêtir des électrodes standards (Liang et al., 2011), (Liu et al., 2012), (Fan et al., 2011), (Nakamura et al., 2009), (Ding et al., 2012) et (Zhang et al., 2017). Ces modifications entraînent des changements au niveau des propriétés de surfaces des électrodes, notamment en termes de i) surface spécifique accessible aux bactéries, ii) de modulation de l'hydrophobicité, iii) de la charge de surface, iv) de la connexion électrode-biofilm.

Dans cette étude bibliographique, les différentes stratégies mises en œuvre peuvent être classées en deux catégories : une première catégorie qui vise à faciliter le transfert électronique entre les bactéries et l'anode par ajout de particules métalliques et de médiateurs redox par exemple, et une seconde qui cherche à augmenter l'affinité des bactéries pour les surfaces des électrodes.

III.1.1 Modification de surfaces d'électrodes visant à faciliter le transfert électronique des bactéries vers l'électrode

La cinétique du transfert d'électrons à l'interface biofilm/électrode est l'un des facteurs clefs qui déterminent le courant et la puissance de la PCM. Par conséquent, il est essentiel d'optimiser la morphologie et la chimie des électrodes pour favoriser un transfert rapide des électrons. Cet objectif peut être atteint grâce à la sélection de matériaux d'électrodes spécifiques, à l'enrichissement par des bactéries qui réduisent l'anode ou encore à des modifications morphologiques ou chimiques de la surface de l'électrode (Franks and Nevin, 2010)

et (Venkata Mohan et al., 2014). Ces modifications consistent notamment à recouvrir l'électrode d'un polymère conducteur ou encore à immobiliser en surface des métaux, des oxydes métalliques ou des médiateurs redox.

III.1.1.a Addition de polymères conducteurs et électroactifs

Les électrodes standards disponibles dans le commerce, comme les plaques de graphite, les tissus de carbone et les électrodes à feutre de carbone, ne possèdent que de petites tailles de pores à leurs surfaces (He et al., 2012). Généralement, les bactéries électroactives ont des tailles moyennes de 0,2 à 1 μm de diamètre et de 1 à 5 μm de longueur ; elles sont donc trop grosses pour se loger à l'intérieur des pores de ces électrodes. Ainsi, des nanomatériaux ou des polymères tels que la polyaniline ou le polypyrrole ancrés sur ces matériaux et emprisonnant les bactéries, sont développés comme anodes à haute performance (Scott et al., 2007), (Zou et al., 2008), (Jiang and Li, 2009), (Zhao et al., 2010), (Yong et al., 2012) et (Song et al., 2017). Ces électrodes fournissent des structures macroporeuses ouvertes et des surfaces fonctionnalisées favorables à la fixation bactérienne et au transfert d'électrons extracellulaires.

Dans ce contexte on peut citer des études effectuées par Yu et al., en 2011, qui consistent à immobiliser *Shewanella oneidensis* dans une matrice de biofilm artificiel constituée de polypyrrole et de particules de graphite. Afin de former cette matrice artificielle, des microparticules de graphite (< 20 μm de diamètre) sont mises en contact avec les bactéries. Les particules sont ensuite immobilisées sur du papier de carbone avant d'effectuer la polymérisation électrochimique du pyrrole afin d'emprisonner les bactéries dans le polymère conducteur. Dans ce cas, une puissance onze fois supérieure, comparée à un biofilm naturel, a été observée. D'après les auteurs, cette augmentation viendrait du fait que l'on augmente la conductivité du biofilm grâce au polymère conducteur. Scott et al., en 2007 ont aussi montré que les piles délivrent des puissances supérieures lorsqu'elles fonctionnent avec des bioanodes modifiées avec de la polyaniline, par rapport à des bioanodes non modifiées. Cette amélioration était aussi attribuée à l'augmentation de la conductivité de l'électrode modifiée par le polymère conducteur et à l'introduction de fonctions quinoïdes qui faciliteraient le transfert électronique hétérogène en agissant comme un relais électronique entre les bactéries et l'électrode. Les auteurs ont également souligné que cette augmentation de puissance pouvait être due à une augmentation de la surface spécifique de l'électrode après l'ajout de polyaniline. En effet, la présence de la polyaniline en surface modifie la topographie de l'électrode en constituant un

réseau tridimensionnel et en augmentant la rugosité, donc la surface spécifique. Or une étude par microscopie électronique à balayage (MEB) montre que les pores créés sur l'électrode sont trop petits par rapport à la taille de bactéries électroactives. Par conséquent, la modification n'augmente pas la surface disponible pour la colonisation bactérienne. Les auteurs proposent alors, que le polymère augmente la surface disponible pour la réduction de médiateurs solubles sécrétés par les bactéries pour le transfert d'électrons à l'anode. Cette observation est confirmée par Zhao et al en 2010, avec des électrodes modifiées par des polymères de polyaniline dont ils font varier la structure. Cette modification crée des pores de tailles comprises entre 10 et 100 nm et conduit à une augmentation du courant délivré par le biofilm d'un facteur 4 par rapport à une électrode non modifiée. Dans ce cas également, la taille des pores ne permettant pas une colonisation plus importante des bactéries, le polymère augmente juste la surface disponible pour la réduction de médiateurs redox solubles sécrétés par les bactéries pour le transfert d'électrons à l'anode.

Plus récemment, Yuan et al., en 2013 ont utilisé une électrode en éponge de luffa naturelle comme matériau précurseur rempli par des nanoparticules de carbone et revêtue de polyaniline. La structure poreuse de ces électrodes permet d'augmenter alors considérablement la capacité de colonisation bactérienne. Le transfert d'électron est favorisé en raison de l'interaction accrue entre les bactéries et l'anode. En utilisant une pile à un seul compartiment équipé d'une anode en éponge de luffa modifiée par la polyaniline, une densité de puissance de $1090 \pm 72 \text{ mW/m}^2$ est obtenue, ce qui est beaucoup plus élevé que celle obtenue par des anodes traditionnelles de taille similaire. Cette étude introduit une méthode prometteuse pour la fabrication d'anodes à haute performance à partir de matériaux naturels durables et peu coûteux. Dans le même but, une autre étude emploie des électrodes de carbone poreux. Une étude par microscopie électronique à balayage (MEB) démontre que les pores dans les électrodes sont bien définis avec un diamètre moyen de 400 nm, un peu plus grand que la taille d'*Escherichia coli* (*E. coli*). Cette pile délivre une puissance de 1606 mW/m^2 , à comparer aux 402 mW/m^2 dans le cas d'une anode en feutre de carbone nu, dans une solution contenant 2 g/L de glucose. L'excellente performance de cette électrode est attribuée à la taille de pores bien appropriée pour recevoir la souche *E. coli*, ce qui facilite la formation de biofilms bactériens et le transfert d'électrons entre bactéries et anodes (Chen et al., 2015). Une autre étude effectuée par (Cui et al., 2015) qui consiste à polymériser la polyaniline à la surface du feutre de graphite macroporeux, suivi d'un dépôt électrophorétique de nanotubes de carbone (CNT) montre que cette modification entraîne

une augmentation de puissance de 343% par rapport à une biopile fonctionnant avec une anode non modifiée. Une étude par microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface modifiée montre que la surface de graphite est recouverte d'un film rugueux rendant la surface hydrophile. La modification ultérieure par les CNTs augmente la surface effective et la conductivité électrique du matériau, ce qui explique l'amélioration de la performance.

III.1.1.b Immobilisation de médiateurs redox

Une seconde approche pour améliorer les performances des bioanodes est l'utilisation de médiateurs redox en solution dans le but de faciliter le transfert électronique entre le biofilm et l'anode. Cette stratégie permet des augmentations de puissance significatives; cependant, du fait de leur dégradation, les médiateurs redox doivent être continuellement renouvelés (Park et Zeikus, 2000). Afin d'améliorer la stabilité dans le temps de ces médiateurs redox, une autre stratégie permettant de moduler la connexion biofilm/anode est inspirée des piles enzymatiques, par l'immobilisation des médiateurs redox à la surface de l'anode (Heller, 1990), (Heller, 2006). Cette technique a également été appliquée dans le cas des PCMs. La première étude de ce type impliquait une culture de *Desulfovibrio desulfuricans* et du viologène polymérisé (structure Figure 1.A) comme médiateur redox immobilisé à la surface d'une électrode (Park et al., 1997). Le même groupe a étudié d'autres médiateurs, tels que le rouge neutre (structure Figure 1.B), directement immobilisé à la surface de l'électrode par des liaisons amide. Les auteurs ont observé que la modification a permis de multiplier par dix le courant délivré par la biopile (Park and Zeikus, 2000), (Park and Zeikus, 2002). D'autres médiateurs redox ont été utilisés comme l'acide anthraquinone-1,6-disulfonique, AQDS (structure Figure 1.C) et la 1,4-naphtoquinone (structure Figure 1.D) (Lowy et al., 2006), (Lowy and Tender, 2008). Par exemple, Feng et al. (2010) rapportent l'immobilisation d'AQDS par électropolymérisation du pyrrole en utilisant l'AQDS comme dopant. Dans ce cas, la PCM équipée d'une anode modifiée présente une puissance treize fois supérieure à celle d'une biopile fonctionnalisées avec une anode non modifiée.

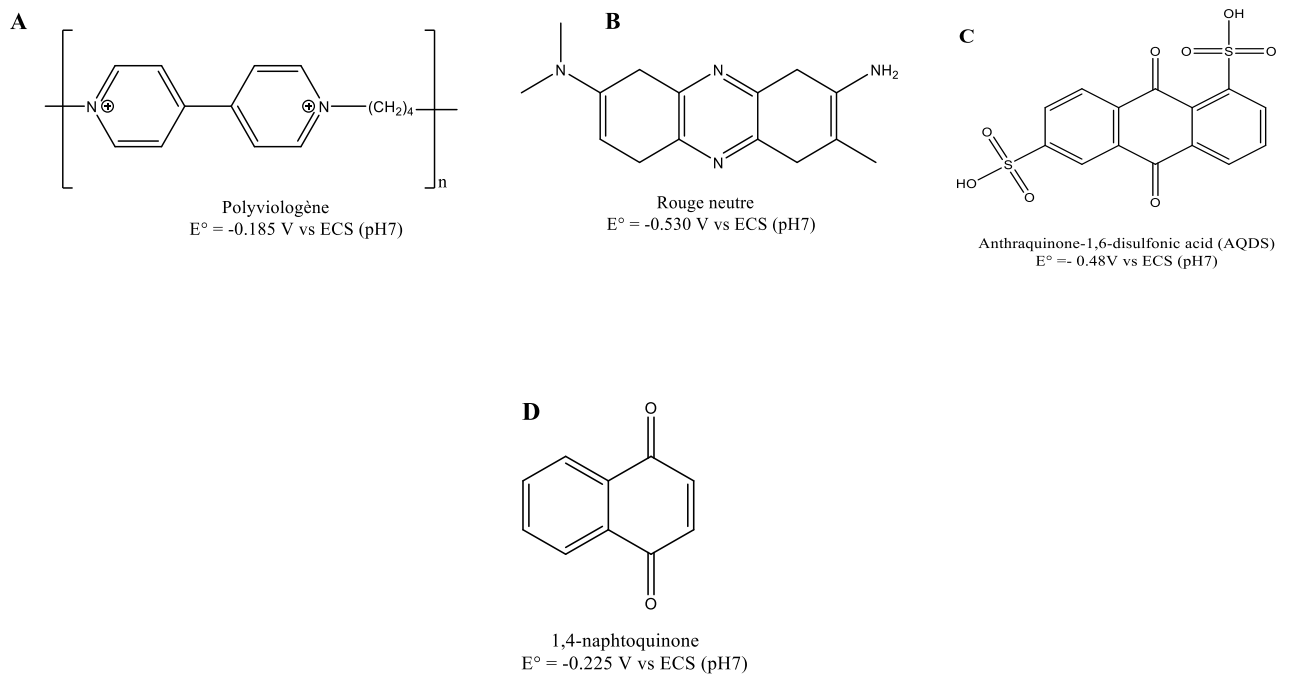


Figure 1 : Structures de quelques médiateurs redox immobilisés sur des bioanodes.

III.1.1.c Immobilisation de particules métalliques

Malgré leurs avantages (faible coût, disponibilité...), les électrodes carbonées utilisées dans les PCMs présentent des performances moindres que les électrodes métalliques, qui possèdent une résistance de transfert de charge moins importante, résultant de leur grande conductivité. Pour profiter, à la fois des avantages des matériaux carbonés et de la bonne conductivité des métaux, des particules métalliques ont été immobilisées sur des électrodes de carbone. Ainsi, (Lowy et al., 2006) ont essayé de changer la composition d'une anode en graphite en y incorporant des sels de manganèse MnSO_4 , de nickel NiCl_2 ou encore des oxydes de fer Fe_3O_4 , afin d'augmenter la densité de puissance des piles à combustible. Dans ce travail, les auteurs rapportent une étude comparative sur l'activité cinétique de différentes anodes d'une pile à combustible microbienne en mesurant les courants d'échanges I_0 aux bioanodes. Ils ont constaté que les anodes modifiées ont une activité entre 1,5 et 2,2 fois plus efficace que le graphite simple, ce qui montre que les transferts de charges des biofilms impliquant ces électrodes modifiées sont plus rapides que sur l'électrode de graphite simple. En prenant l'exemple d'une anode contenant à la fois des sels de manganèse et de nickel, la biopile délivre une puissance cinq fois supérieure à celle d'une pile fonctionnant avec une anode de graphite

simple. Selon les auteurs, les particules de manganèse et de nickel peuvent être considérées comme médiateurs du transfert d'électron entre les bactéries et l'électrode.

L'effet bénéfique d'une modification d'électrode par ajout d'oxydes de fer avait déjà été mis en évidence dans une étude antérieure (Kim et al., 2005). Avec une anode en papier de carbone poreux, les auteurs ont montré que la puissance générée est de l'ordre de 8 mW/m² avec une efficacité faradique de 40%. Lorsque l'électrode est modifiée avec des particules d'oxyde de fer, la puissance et l'efficacité faradique atteignent 30 mW/m² et 80%, respectivement. De plus, les auteurs montrent un effet inhibiteur de la production indésirable de méthane par la bioanode lorsque le biofilm se développe sur l'anode modifiée par les oxydes de fer. Vu que les oxydes de fer sont les accepteurs finaux naturels d'électrons pour les microorganismes électroactifs des PCMs, le nombre de bactéries connectées sur l'électrode modifiée avec des oxydes de fer est plus élevé que sur l'électrode de graphite non modifiée. En d'autres termes, la connexion des bactéries est beaucoup plus efficace sur l'électrode modifiée. Cela explique l'importance du courant délivré et l'efficacité faradique élevée.

Dans une autre étude, Fan et al., en 2011 ont employé la méthode de pulvérisation cathodique afin de déposer des nanoparticules d'or et de palladium en couche mince sur le graphite. Dans cette étude, entre 10 et 20 % de la surface de l'anode de graphite est recouverte par des nanoparticules (Au et Pd). Les anodes décorées avec des nanoparticules d'or et colonisées par des biofilms de *Shewanella oneidensis*, sont employées dans une cellule d'électrolyse microbienne. Elles produisent des densités de courant jusqu'à 20 fois plus élevées que dans le cas des anodes de graphite simples colonisées par les mêmes biofilms. En revanche, les anodes décorées de nanoparticules de palladium produisent des densités de courant de 50 à 150% plus élevées que l'électrode de contrôle. Dans le cas des électrodes d'or, les auteurs ont montré que plus les particules utilisées étaient volumineuses (diamètres de particules compris entre 0.2 et 1 µm), plus les courants délivrés étaient importants. Dans le cas des particules de palladium, il n'existe pas de corrélation entre la taille des particules et les courants délivrés. Ces résultats suggèrent donc que la nature des particules et/ou leur taille ont un effet sur les performances des anodes modifiées. La taille influe sur ces performances en termes de surface disponible pour les bactéries, tandis que la nature (Au versus Pd) a un effet sur les forces d'adhésion exercées par la surface. Cependant selon les auteurs, la modification entraîne une augmentation de la surface disponible pour les transferts électroniques par l'intermédiaire de médiateurs redox sécrétés. Ils proposent également que les particules déposées permettent un

meilleur contact entre les bactéries et l'électrode. Ces résultats démontrent que la nano-décoration peut améliorer considérablement la performance des anodes microbiennes, tandis que la composition chimique, la taille et la forme des nanoparticules déterminent l'amplitude de l'amélioration.

III.1.2 Modifications visant à améliorer l'affinité des bactéries pour la surface des électrodes

III.1.2.a Traitements de surfaces

Les traitements de surfaces des matériaux d'anodes des piles à combustible microbiennes peuvent être utilisés pour augmenter l'affinité de ces électrodes pour les biofilms électroactifs. Cette approche vise à modifier les propriétés de surface de matériaux d'électrodes en appliquant des traitements de surface physicochimiques assez agressifs tels que des traitements thermiques, acides ou oxydants. Par exemple, un traitement thermique, appliqué sous différentes atmosphères permet de favoriser la formation de groupements chimiques en surface. Dans ce contexte, (Wang et al., 2009b) ont testé l'effet d'un prétraitement thermique sous air ou sous ammoniac (450°C pendant 30 min) d'électrodes en maille de carbone. Grâce à ce traitement sous air, une densité de puissance maximale de 922 mW/m² (46 W/m³) est obtenue, soit 3% de plus que celle produite en utilisant une anode en maille de carbone non traitée (893 mW/m², 45 W/m³). Dans le cas de traitements à l'ammoniac, la densité de puissance est augmentée de 10% (988 mW/m², 49 W/m³). L'analyse par spectroscopie de photoélectrons à rayons X (XPS) des surfaces nettoyées ou chauffées montre que les traitements conduisent à une diminution du rapport oxygène/carbone (O/C). Les auteurs ont attribué cette diminution à une élimination d'impuretés organiques de la surface de l'électrode, ces dernières rendant plus difficile le transfert électronique interfacial à l'électrode. Le traitement à l'ammoniac a conduit à une augmentation du rapport azote/carbone (N/C), améliorant l'affinité des bactéries pour la surface de l'anode. Ces résultats montrent que ces matériaux traités thermiquement peuvent être utilisés comme anode dans une PCM, offrant de bonnes performances et même un dépassement des performances des anodes en tissu de carbone. (Cheng and Logan, 2007), ont montré par ailleurs qu'un tel traitement sous ammoniac sur des électrodes en tissus de carbone augmente considérablement la charge de surface de l'électrode (un facteur 10) et améliore les puissances d'une bioanode de 20% (plus de 1970 mW/m²), par rapport à une anode de contrôle non traitée. En outre, le temps de la formation du biofilm électroactif dans une PCM est deux fois plus

rapide. Cette amélioration des performances a été attribuée à la formation de fonctions chargées positivement sur la surface de l'électrode. Ces fonctions permettent une attraction électrostatique favorable avec les bactéries électroactives globalement chargées négativement (Terada et al., 2006).

Outre les traitements thermiques évoqués précédemment, on note également l'emploi de traitements électrochimiques. (Zhou et al., 2012) décrivent une étude concernant une modification de surface en présence d'acide nitrique par l'oxydation électrochimique d'une électrode en maille de carbone. Ce traitement entraîne une augmentation de la densité de puissance maximale de 43% (792 mW/m^2), par rapport à l'électrode de contrôle non modifiée (552 mW/m^2). L'efficacité faradique est aussi significativement augmentée d'environ 70%. L'oxydation électrochimique modifie les propriétés de l'anode, telles que la morphologie de la surface, la résistance interne et le potentiel de l'anode. Par conséquent, cela améliore la fixation microbienne et le transfert d'électrons sur la surface de l'anode. En particulier, ces traitements de surface donnent un caractère hydrophile à la surface qui est un des facteurs influençant l'adhésion bactérienne. Ainsi, les traitements d'oxydation entraînent la formation de fonctions type carboxylates qui augmentent le caractère hydrophile de la surface traitée (Shen et al., 2008). Dans le même esprit, d'autres traitements consistent à oxyder électrochimiquement la surface de l'électrode dans l'acide sulfurique (Tang et al., 2011). Dans cette étude, la puissance d'une PCM utilisant une anode de graphite traitée augmente de 39,5 % par rapport à celle d'une pile fonctionnant avec une anode non modifiée. Les auteurs ont attribué cette augmentation à la présence de groupements carboxylate capables de former des liaisons hydrogènes avec les peptides présents en surface des bactéries électroactives (Crittenden et al., 2006), (Lowy et al., 2006), (Stams et al., 2006). Certains peptides pourraient appartenir à la structure des protéines de type cytochromes *c* de la membrane externe des bactéries électroactives.

De ces études, il ressort que l'augmentation du caractère hydrophile à la surface de l'anode ainsi que la présence de charges positives augmentent les performances du dispositif (Feng et al., 2010), (Cheng and Logan, 2007). Pour expliquer cette augmentation, plusieurs hypothèses sont avancées. L'augmentation de l'adhésion bactérienne améliorant le transfert électronique biofilm/électrode est exprimée comme première hypothèse. Une seconde hypothèse est le fait que le biofilm, dans le cas d'une surface modifiée avec le groupement adéquat, se développe davantage et donc produise davantage de courant (Feng et al., 2010).

Nous avons vu aussi que le traitement thermique des électrodes conduit à une modification de la rugosité, de la porosité et de l'hydrophobicité de la surface et améliore ainsi la concentration des cellules et le développement du biofilm sur l'électrode (Cheng and Logan, 2007), (Wang et al., 2009b), (Karra et al., 2013), (Manickam et al., 2013) et (Ketep et al., 2014). Néanmoins, il est important de garder à l'esprit que les raisons de ces augmentations ne se limitent pas seulement aux aspects hydrophile/hydrophobe ou à la présence de pores à la surface mais sont le résultat de la combinaison de plusieurs paramètres. La nature des fonctions chimiques introduites de façon contrôlée en surface, peut également avoir une influence considérable sur le développement et les performances des biopiles.

III.1.2.b Modifications spécifiques de surface

Il s'agit d'introduire des groupes fonctionnels (souvent des groupes contenant de l'azote et de l'oxygène) qui améliorent la fixation des microorganismes et le développement du biofilm sur la surface de l'électrode. Plusieurs composés ont été étudiés pour la modification de surface du carbone tels que, l'acide nitrique qui assure l'activation de la surface par traitement chimique (Zhu et al., 2011), ou électrochimique (Zhou et al., 2012), l'éthylène diamine (Zhu et al., 2011), le nitrate d'ammonium (Zhou et al., 2012), le persulfate d'ammonium (Zhou et al., 2012), la polyaniline (Lai et al., 2011), la diméthylaniline (Saito et al., 2011), l'aniline (Picot et al., 2011) et les acides boroniques (Lapinsonnière et al., 2013).

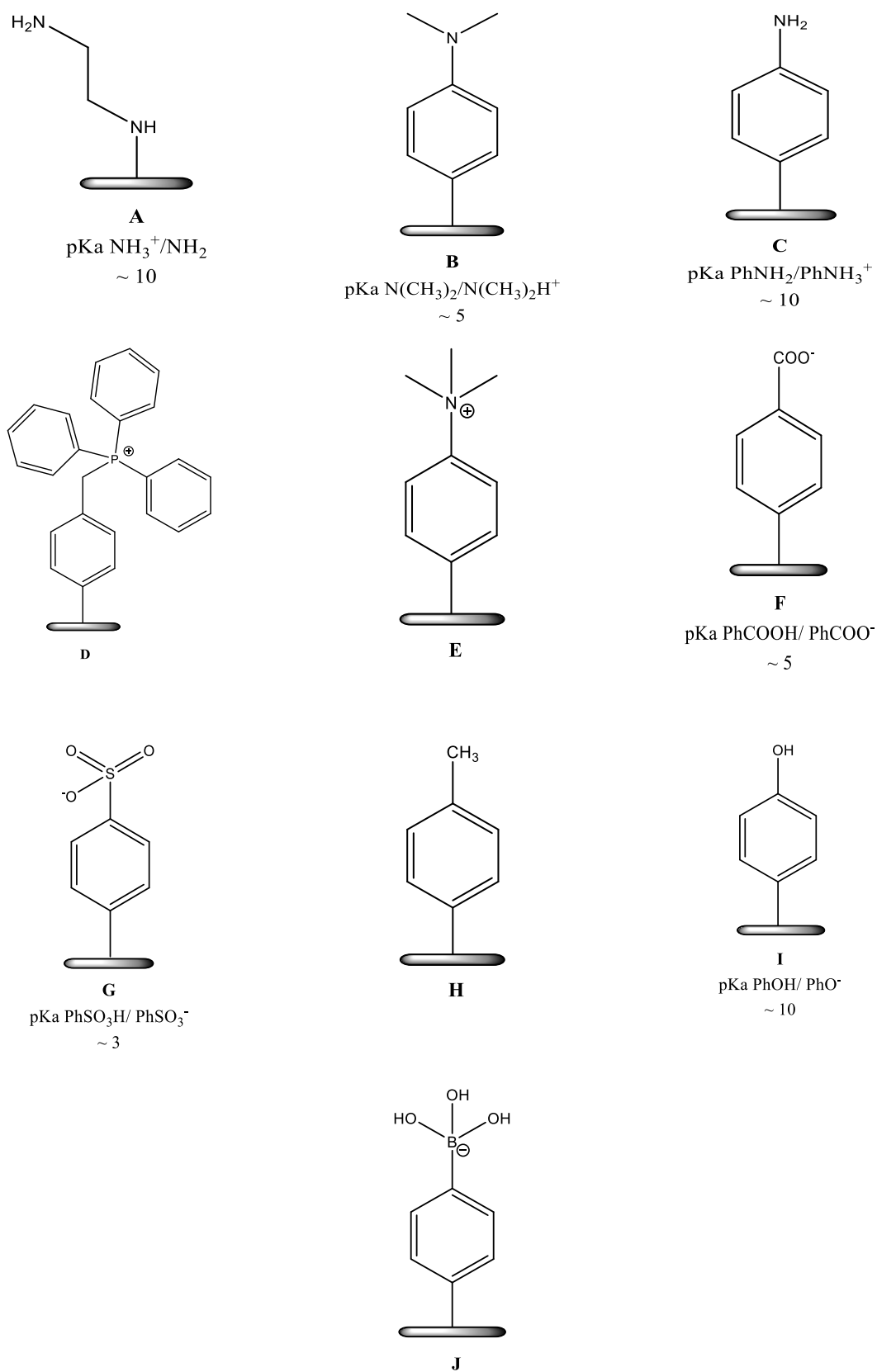


Figure 2 : Structures des molécules utilisées pour fonctionnaliser des bioanodes.

Dans ces études, les fonctions greffées sur la surface diffèrent par leurs charges et leurs propriétés hydrophile/hydrophobe. Par exemple, (Zhu et al., 2011), ont greffé de façon covalente de l'éthylène diamine sur des feutres de carbone activé (Figure 2. A, page 109). Le temps de formation de biofilm sur cette électrode modifiée est réduit de moitié et les puissances délivrées sont augmentées de 26% (1641 mW/m²). Les auteurs attribuent l'augmentation de l'affinité entre les bactéries et la surface de l'électrode à la propriété hydrophile de la surface modifiée par les groupements amine favorables à l'adhésion des bactéries. Un autre facteur qui peut être l'origine de cette amélioration, est que les fonctions modifiant la surface apportent des charges positives (au pH de l'électrolyte, pH 7), permettant une attraction électrostatiques entre les bactéries électroactives chargées négativement et l'électrode modifiée.

Toutefois cette dernière hypothèse a été contestée par les études de (Saito et al., 2011) et (Picot et al., 2011), rapportant respectivement sur le greffage du dimethylaniline (Figure 2. B) et de l'aniline (Figure 2. C). Ces études ont montré que ces modifications permettent d'augmenter significativement les puissances délivrées par rapport à une électrode non modifiée bien que les pKa des molécules et/ou des analyses XPS suggèrent que les fonctions amines ne sont pas protonées au pH de l'anolyte (pH 7). Cela implique que l'effet bénéfique des fonctions amines greffées n'est pas dû à l'introduction de charges positives en surface d'électrode. Cependant les données des deux études ne permettent pas de déterminer si les modifications entraînent une adhésion plus importante des bactéries ou si elles entraînent une meilleure connexion des bactéries en surface.

Dans le même esprit, (Guo et al., 2013) ont continué à étudier l'influence de la charge de surface et de l'hydrophobie sur l'accumulation des bactéries, la répartition taxonomique et l'activité électrochimique de différentes anodes modifiées. Les anodes étaient constituées d'électrodes de carbone vitreux modifiées par greffage électrochimique avec des sels d'aryle diazonium. La surface de chaque anode a été modifiée de manière distincte pour être hydrophile (-OH, -SO₃⁻, -N(CH₃)₃⁺) (Figure 2. I, G et E, respectivement) ou hydrophobe (-CH₃), (Figure 2H) avec une charge positive, négative ou neutre (Guo et al., 2013). Les auteurs ont constaté que les surfaces les plus chargées et hydrophiles permettent une formation plus rapide de biofilm constitué sélectivement de microorganismes électroactifs tels que *Geobacter*. Par exemple dans le cas de biofilms développés sur des anodes portant une charge positive (triméthyle ammonium, Figure 2. E), un courant de 1,2 à 1,5 plus élevé que dans le cas d'anodes modifiées par un groupement neutre (hydroxyle, Figure 2. I) est obtenu. Les biofilms

développés sur des anodes portant une charge négative (sulfonate, Figure 2. G) génèrent un courant plus faible (un facteur 1,2 à 1,4) que les anodes modifiées par un groupement neutre. Une conclusion similaire a été rapportée par (Picot et al., 2011) dans une étude effectuée dans notre laboratoire. Une diminution significative du courant anodique est observée lorsque la surface de l'anode est modifiée avec une fonction benzoate chargée négativement à pH 7 (Figure 2. F), cette modification entraîne une baisse des puissances par rapport à une électrode contrôle non modifiée. Alors qu'une modification avec une fonction triphénylphosphonium (Figure 2. D) apportant une charge positive permet d'améliorer le courant anodique délivré, ainsi que la puissance qui est augmentée de 67%. Les auteurs ont attribué cette amélioration à l'effet électrostatique répulsif ou attractif entre la couche de modifiant et les bactéries chargées négativement adhérentes à la surface de l'électrode.

Plus récemment, (Santoro et al., 2015) ont modifié par la méthode d'auto-assemblage (SAM), des électrodes d'or avec des monocouches portant différentes fonctions hydrophiles ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$) et hydrophobe ($-\text{CH}_3$). La modification avec le triméthyle ammonium ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$) entraîne un temps de formation ou démarrage du biofilm (temps de latence), plus court (15 jours) que dans le cas des autres modifiants ($-\text{OH}$: 20 jours, $-\text{COOH}$: 17 jours et $-\text{CH}_3$: 17 jours), et une puissance de $40 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ est obtenue. La modification avec une fonction hydrophobe ($-\text{CH}_3$), diminue la fixation des bactéries et le temps de développement de biofilm à la surface est porté à 17 jours. La performance de l'anode par rapport aux SAMs hydrophiles est également moins bonne (puissance de $1,2 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Le temps de développement de biofilm électroactif sur la surface de l'anode est plus court (entre 5 et 20 jours) en comparant avec l'étude effectuée par (Guo et al., 2013) en utilisant les mêmes groupements ($-\text{OH}$ et $-\text{CH}_3$). Dans ces cas, les biofilms se développent après 25,4 et 37,2 jours, respectivement. Dans l'étude effectuée par Santoro et ses collaborateurs, des analyses de séquençage, ont montré que la modification de surface influe aussi sur la population des bactéries développées sur les anodes. Par exemple, sur les électrodes modifiées avec le triméthyle ammonium chargé positivement, la population la plus élevée en pourcentage appartenait à l'embranchement des *Proteobacteria*. Cette famille de bactérie contient probablement la ou les espèces responsables du transfert direct d'électrons à l'interface biofilm/électrode, aboutissant à des performances élevées.

Une autre approche pour améliorer l'interface entre les électrodes et les biofilms a été aussi employée dans notre laboratoire (Lapinsonnière et al., 2013). L'objectif était le ciblage de groupements fonctionnels ayant une grande affinité avec des composés spécifiques de la membrane bactérienne. La membrane externe de bactéries Gram négatives électroactives connues, comme *Geobacter sulfurreducens* ou *Shewanella oneidensis*, est riche en lipopolysaccharides qui peuvent potentiellement se lier à des acides boroniques. Des électrodes de graphite ont été modifiées avec des acides boroniques (Figure 2J), et ont servi d'anode. Cette étude a montré qu'après le développement du biofilm, la PCM fonctionnant avec ces électrodes modifiées présente un courant et des densités de puissance maximales plus élevés d'un facteur de 1,7 et de 1,6, respectivement, par rapport à une biopile employant une électrode non modifiée. Une connexion plus efficace des bactéries électroactives sur la surface modifiée résultant des liaisons entre les lipopolysaccharides dans les membranes bactériennes et la fonction acide phénylboronique est supposée être à l'origine des améliorations. Cette interaction favorise d'abord l'adhésion bactérienne mais peut ensuite être étendue aux exopolysaccharides sécrétés par le biofilm.

Finalement, ces études montrent que l'introduction de molécules spécifiques sur la surface d'électrodes a un impact sur les performances des bioanodes. Jusqu'ici peu d'exemple rapportant l'introduction des fonctions ciblant spécifiquement des interactions chimiques avec des molécules constituant les bactéries électroactives ont été décrits. Il semble néanmoins intéressant de trouver un modifiant capable de se lier ou d'interagir chimiquement avec les bactéries. Cela constitue un des objectifs de ces travaux de thèse, en particulier avec la membrane externe de ces bactéries puisqu'il s'agit de la structure en contact direct avec l'électrode.

En conclusion, les propriétés hydrophobes/hydrophiles de la surface définissent le contact électrode-électrolyte et donc la capacité de transfert de charge ainsi que la fixation de bactéries et la formation de biofilm. La charge de surface de l'électrode d'autre part, influence également la fixation des bactéries. Parallèlement, les types de population microbienne présentent dans les eaux usées influenceront grandement la formation de biofilms électroactifs capables de participer au transfert d'électrons. Tous ces paramètres sont très importants pour une PCM présentant une haute performance, c'est-à-dire délivrant un courant et une densité de puissance maximum.

III.2 Greffage d'unités pyridine sur des surfaces de carbone

Il est important de noter, que les paramètres présentés précédemment (la charge de surface et le caractère hydrophobe des matériaux, les traitements de nettoyage des surfaces et leur rugosité), jouent un rôle important au cours de l'adhésion primaire du micro-organisme, c'est-à-dire au cours de la première phase de l'adhésion des micro-organismes lors de la formation d'un biofilm et même après le développement, pour faciliter le transfert électronique entre ces bactéries et la surface d'électrode.

En effet, toutes les modifications testées introduisent sur la surface de l'électrode des fonctionnalités chimiques, en modifiant donc les propriétés physico-chimiques, ce qui influence alors l'affinité des bactéries pour la surface. Par conséquent, cela peut influencer le transfert électronique entre la bactérie et l'électrode. En effet, il est probable que les molécules introduites à l'interface biofilm-électrode puissent agir directement ou indirectement sur la conformation des protéines telles que les cytochromes membranaires impliqués dans la connexion des bactéries électroactives à l'anode dans la PCM (Wang et al., 2009a), (Wang et al., 2012) et (Lapinsonnière et al., 2013).

Dans cette optique, j'ai donc voulu tester l'effet d'une modification « spécifique » en introduisant de la pyridine en surface d'électrodes de graphite par la méthode de réduction de sels d'aryles diazonium. La pyridine est en effet connue pour être un ligand efficace de l'ion fer de l'hème du cytochrome de type *c*.

III.2.1 Stratégie de greffage choisie

La modification des surfaces constitue un domaine de recherche très important, couvrant différents champs d'applications (catalyse, capteurs, traitement de surfaces, électronique organique ou moléculaire, etc.). De nombreuses méthodes peuvent répondre à cet objectif, par exemple, l'oxydation des amines primaires (Gallardo et al., 2006), des carboxylates (Brooksby et al., 2005), des réactifs de Grignard (Fellah et al., 2006), ou à partir de la réduction des monomères vinyliques (Palacin et al., 2004) et des sels de diazonium (Pinson et Podvorica, 2005).

III.2.1.a Modification électrochimique de la surface par réduction de sels d'aryle diazonium

La première modification d'électrode par réduction de sel d'aryle diazonium a été observée par Parker et al. en 1980, quand ils ont mis en évidence la formation d'une couche

passivante lors de la réduction de sels d'aryle diazonium sur une électrode métallique (Parker et al., 1980). Mais la nature de la couche obtenue, bloquante vis-à-vis du transfert électronique, n'a pas été étudiée. Ce n'est qu'en 1992, que Jean Pinson et ses collaborateurs ont réellement étudié le mécanisme de la réduction de sels d'aryle diazonium (Delamar et al., 1992) et (Allongue et al., 1997). Depuis, par sa simplicité et son efficacité, cette méthode a été utilisée dans de nombreux domaines notamment en chimie des matériaux (Pinson and Podvorica, 2005), (Cougnon et al., 2009), (Bélanger et Pinson, 2011).

La Figure 3, ci-dessous, présente la méthode électrochimique de la modification de surfaces par réduction de sels de diazonium. Les sels d'aryles diazonium sont obtenus assez facilement par diazotation d'un composé amine précurseur. Cette étape peut également être effectuée *in situ*, directement dans la cellule électrochimique (Sadowska et al., 2009). Cette méthode évite de synthétiser et d'isoler le sel de diazonium, qui risque parfois d'exploser, et permet de s'affranchir du problème de stabilité de certains sels de diazonium que l'on ne peut pas conserver longtemps. Le sel de diazonium est obtenu soit en milieux aqueux acide (par exemple HCl à 0.5M) (étape I), par action du nitrite de sodium (NaNO_2) (Baranton and Bélanger, 2005), soit en milieu organique (par exemple l'acétonitrile), par action d'alkylnitrite (Baranton and Bélanger, 2008). La surface à modifier est utilisée comme électrode de travail (cathode). Un potentiel est appliqué à cette électrode et entraîne la formation d'un radical et d'un dégagement de diazote (N_2) (étape II). Ce radical extrêmement réactif est produit au voisinage de l'électrode ; il est capable de former une liaison covalente avec celle-ci (étape III). Les radicaux peuvent se greffer sur la surface de l'électrode mais aussi sur les unités phényles déjà greffées pour former de multicouches de type polyphénylène greffées de façon covalente au substrat (étape IV) (Pinson and Podvorica, 2005). Bien que la nature covalente de la liaison créée entre la molécule immobilisée et le substrat soit difficile à démontrer, la bonne tenue des surfaces modifiées aux ultrasons dans différents solvants (acétonitrile, DMF, dichlorométhane...), ainsi qu'à haute température (jusqu'à 700K) (Allongue et al., 1997), prouve la formation d'un lien chimique très fort et exclut la formation de liaisons faibles telles que les liaisons hydrogènes ou aussi les interactions de Van Der Waals.

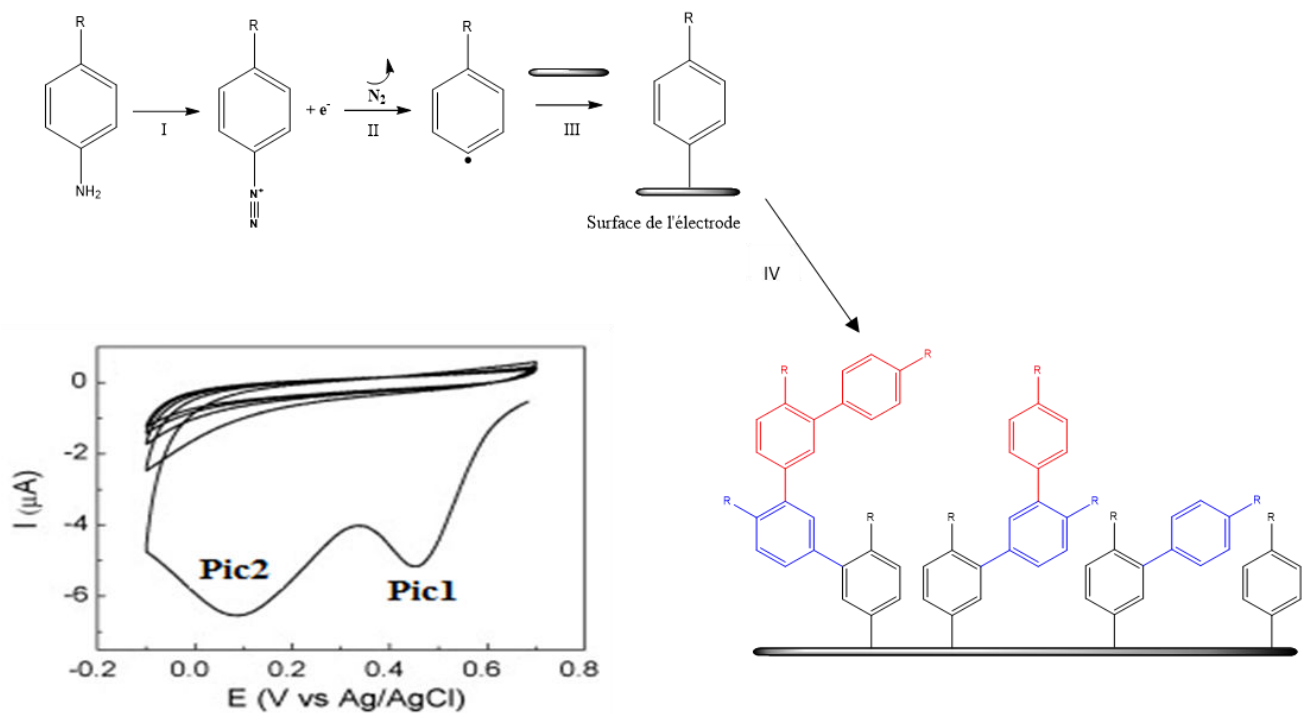


Figure 3 : Modification de surface par réduction de sel de diazonium ; (I) Diazotation du dérivé d'aniline, (II) Électroréduction du cation diazonium, (III) Formation de liaison covalente à la surface de l'électrode et (IV) Formation de multicouches de type polyphénylène ; Voltammétrie cyclique typique de la réduction d'un cation aryle diazonium ($N_2^+(C_6H_4)NO_2$), (Baranton and Bélanger, 2008).

La réduction de sels d'aryles diazonium peut être effectuée soit à potentiel imposé durant un temps fixe, par chronoampérométrie, soit par cyclage du potentiel en enregistrant des voltammogrammes cycliques. Sur la Figure 3, plusieurs cycles de balayages ont été enregistrés. On observe classiquement sur le premier cycle une large vague de réduction (Pic2) proche de 0,0 V vs Ag/AgCl (Baranton and Bélanger, 2005) et (Baranton and Bélanger, 2008) et (Lee et al., 2016), correspondant à la réduction irréversible du cation aryle diazonium en radical aryle. Les auteurs ont suggéré que le premier pic est dû à la réduction de cation aryle diazonium catalysée par une interaction avec le substrat et que le second correspondrait à la réduction puis à un greffage sur la surface de l'électrode. Sur les cycles successifs suivants, on constate une disparition du signal et une diminution importante du courant des pics dû à la passivation de l'électrode recouverte par la couche de polyphénylène greffée. Celle-ci rend le transfert électronique interfacial plus difficile, ce qui inhibe peu à peu la réduction des sels d'aryles diazonium en solution. La formation de couches multiples ainsi que l'épaisseur de la couche greffée dépend de la surface, du diazonium utilisé, des conditions de greffage (potentiel

appliquées, de la concentration en diazonium, du nombre de balayages ou du temps en chronoampérométrie) qui influencent la charge consommée pour la réaction de greffage (Anariba et al., 2003) et (Kariuki and McDermott, 1999).

III.2.1.b Caractérisation des surfaces modifiées

Différentes techniques d'analyse permettent de mettre en évidence le greffage de sels d'aryles diazonium. Parmi ces techniques on peut citer celles qui peuvent être utilisées pour donner des renseignements structuraux sur les composés chimiques greffés, appelées techniques de caractérisations spectrales telles que les spectroscopies vibrationnelles (spectroscopie d'absorption infrarouge de surface (IRRAS), Raman) (Kariuki and McDermott, 2001), (Liu and McCreery, 1995) et (Itoh and McCreery, 2002). La spectroscopie de photoélectrons à rayons X (XPS) est aussi utilisée pour identifier la composition chimique en surface (Saby et al., 1997), (Allongue et al., 1997) et (Hurley and McCreery, 2004).

D'autres techniques de caractérisation par imagerie sont également possibles, comme la microscopie à force atomique (AFM). Cette technique permet également d'évaluer l'épaisseur des couches greffées sur les surfaces, par la méthode dite de « scratching », qui consiste à gratter la couche organique avec la pointe AFM en mode contact et à imager la rayure pour obtenir le profil de profondeur (Figure 4), (Anariba et al., 2003), (Brooksby and Downard, 2004) et (Bélangier and Pinson, 2011). La mesure de l'angle de contact d'une surface modifiée peut aussi donner des informations complémentaires sur l'hydrophobicité de la surface étudiée (Pan et al., 2007).

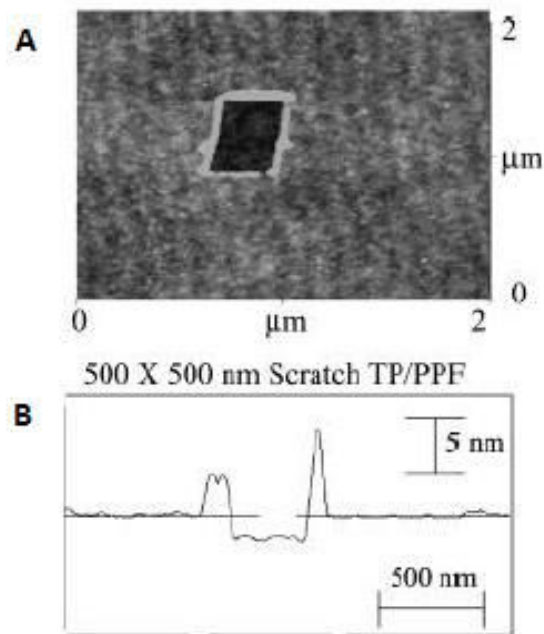


Figure 4 ; (A): Exemple d'une image AFM en mode contact d'une monocouche de terphényle formée à la surface de PPF (500 / 500 nm). (B): Le profil de profondeur correspondant pour mesurer l'épaisseur de la couche déposée (Anariba et al., 2003).

Afin de caractériser l'électrode modifiée et de prouver indirectement la présence d'une couche greffée sur la surface, d'autres techniques de caractérisation électrochimiques sont possibles. L'une d'entre elles qui est très employée, est la comparaison des voltammogrammes de l'oxydoréduction d'une sonde redox électrochimique, sur l'électrode, avant et après modification (Downard, 2000), (Downard and Prince, 2001) et (Schauuff et al., 2009). Dans notre travail, nous avons utilisé la sonde redox ferricyanure de potassium avant et après modification de la surface. Après greffage de couches organiques sur la surface de l'électrode, une augmentation de l'écart entre les pics d'oxydation et de réduction (ΔE_p) permet de mettre en évidence la présence d'une couche bloquante entraînant la diminution de la vitesse de transfert électronique hétérogène entre la sonde redox et la surface (Liu et al., 2005a). Ce transfert d'électrons peut être même totalement inhibé et cette situation est habituellement atteinte par la présence d'une multicouche isolante homogène (4-5 nm) à la surface (Figure 5).

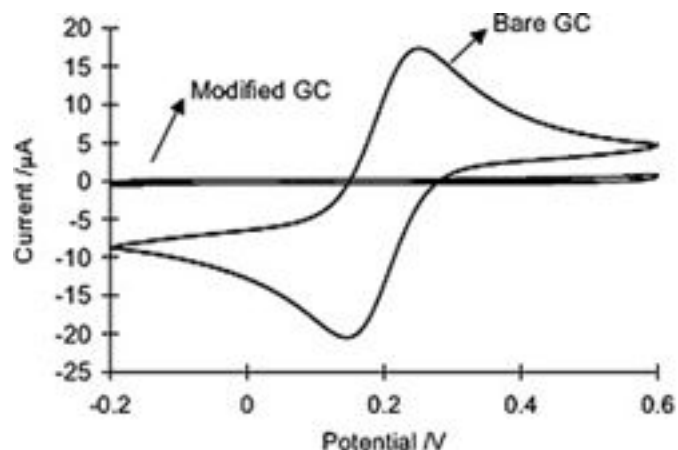


Figure 5 : Exemple du voltammogramme présentant la réponse d'une sonde redox sur des électrodes de carbone vitreux avant et après modification. La figure est adaptée de (Liu et al., 2005a).

L'électrogreffage, et plus généralement, le greffage, à partir de sels d'aryles diazonium est devenu une méthode reconnue pour la fonctionnalisation de surface. Cette méthode simple et commode s'applique à un grand nombre de matériaux, carbone sous toutes ses formes, métaux, semi-conducteurs, isolants, etc. On peut faire varier la nature des substituants portés par le groupement phényle, offrant de nombreuses possibilités pour construire des surfaces fonctionnelles.

A priori, cette méthodologie peut être tout à fait transposée à la pyridine, qui est un composé hétérocyclique simple dont la structure est très proche de celle du benzène. Pourtant assez peu de travaux décrivent l'utilisation de cations diazopyridinium pour modifier une surface (Agullo et al., 2012a), (Agullo et al., 2012b), (Bayazit et al., 2010), (Yeşildağ and Ekinci, 2010), (Yang et al., 2012), (Leinonen and Lajunen, 2011) et (Li et al., 2015).

III.2.2 Réactivité des dérivés de l'aminopyridine lors de la diazotation

Trois dérivés aminopyridine, 2-, 3-, et 4-aminopyridine sont étudiés dans ce travail, comme précurseurs pour la formation de cations diazopyridinium (Figure 6).

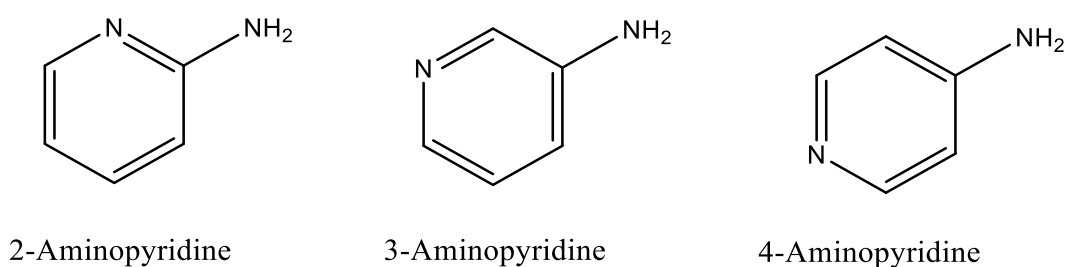


Figure 6 : Structures de trois dérivés aminopyridine.

La 3-aminopyridine est la plus souvent utilisée pour des modifications de surfaces à partir de la réduction des cations 4-diazopyridinium car la 4- et la 2-aminopyridine donnent des cations diazonium réputés instables (Agullo et al., 2012b) et (Yeşildağ and Ekinici, 2010). La diazotation des aminopyridines est assez délicate. Les sels de diazopyridinium ne sont pas des sels stables, contrairement aux sels d'aryle diazonium classiques. Cela nécessite de les former *in situ* à partir de l'aminopyridine précurseur. On trouve néanmoins certains travaux où des surfaces (Si, carbone), ont été modifiées à partir de la 4-aminopyridine (Bayazit et al., 2010), (Yang et al., 2012) et (Ivanova et al., 2005). Toutefois, on sait que la diazotation de la 2-amino-, de la 3-amino- et de la 4-aminopyridine, est possible dans des solutions d'acides minéraux diluées (Butler, 1975) et (Kalatzis and Mastrokalos, 1974). La diazotation entraîne généralement la formation d'hydroxypyridines considérés comme principaux produits (Butler, 1975).

Nous avons commencé par suivre la diazotation de ces trois dérivés d'aminopyridine par spectroscopie d'absorption UV-Visible dans les conditions expérimentales utilisées pour la modification de surfaces par électrogreffage, c'est-à-dire la production *in situ* des cations de diazopyridinium correspondants par addition de 2 équivalents de nitrite de sodium (NaNO₂). Les spectres de la 2-amino-, 3-amino- et 4-aminopyridine enregistrés dans un milieu acide HCl à 0,5 M présentent les bandes d'absorption caractéristiques de ces dérivés protonés (pyridinium) à 230 et 300 nm pour la 2-aminopyridine, 250 et 315 nm pour la 3-aminopyridine et 262 nm pour la 4-aminopyridine (Figure 7, courbes noires) (Steck et al., 1948). Après ajout de NaNO₂, les spectres sont enregistrés à différents temps et présentent des évolutions différentes selon la nature des dérivés aminopyridine testés (Figure 7). Dans le cas de la 3-aminopyridine, nous observons la formation rapide de 3-hydroxypyridinium après 60 minutes (Figure 7. B) suggérant la diazotation rapide de la molécule. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Agullo et al., 2012a). En revanche, la formation de l'hydroxypyridinium paraît plus lente dans le cas de deux autres dérivés. Dans le spectre correspondant à la 2-aminopyridine (Figure 7. A),

on observe que l'intensité de la bande d'absorption à 300 nm diminue avec un élargissement de la bande, devenant clairement visible 60 min après l'ajout de NaNO_2 . L'élargissement de la bande conduit à l'apparition d'une nouvelle bande à 283 nm, qui finalement se déplace à 278 nm après 1440 min (24 heures). La bande à 283 nm pourrait être attribuée à la superposition des bandes d'absorption correspondant aux cations diazopyridinium produits (Kalatzis, 1967). (Kalatzis and Mastrokalos, 1974), et aux molécules de 2-hydroxypyridinium ($\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$) qui sont formées à partir de l'hydrolyse du diazopyridinium. Après ajout de NaNO_2 en solution, on observe que l'intensité de la bande d'absorption de la 4-aminopyridine à 262 nm diminue également de façon monotone avec l'apparition d'une nouvelle bande à 233 nm après 5 heures, ce qui correspond à l'absorption de la 4-hydroxypyridinium. Nous supposons que la bande d'absorption de cations de diazopyridinium produits, à 285 nm, (Kalatzis, 1967), est totalement masquée par la bande d'absorption de la 4-aminopyridine résiduelle (forme protonée). En effet le coefficient d'extinction molaire du 4-diazopyridinium est beaucoup plus petit ($\epsilon = 2720 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) que celui du 4-aminopyridinium ($\epsilon = 18850 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (Bunton et al., 1974).

Ces résultats suggèrent que des ions diazonium sont formés avec les trois dérivés d'aminopyridine lors de la diazotation *in situ* en milieu aqueux acide, et ils sont transformés en leurs produits hydrolysés.

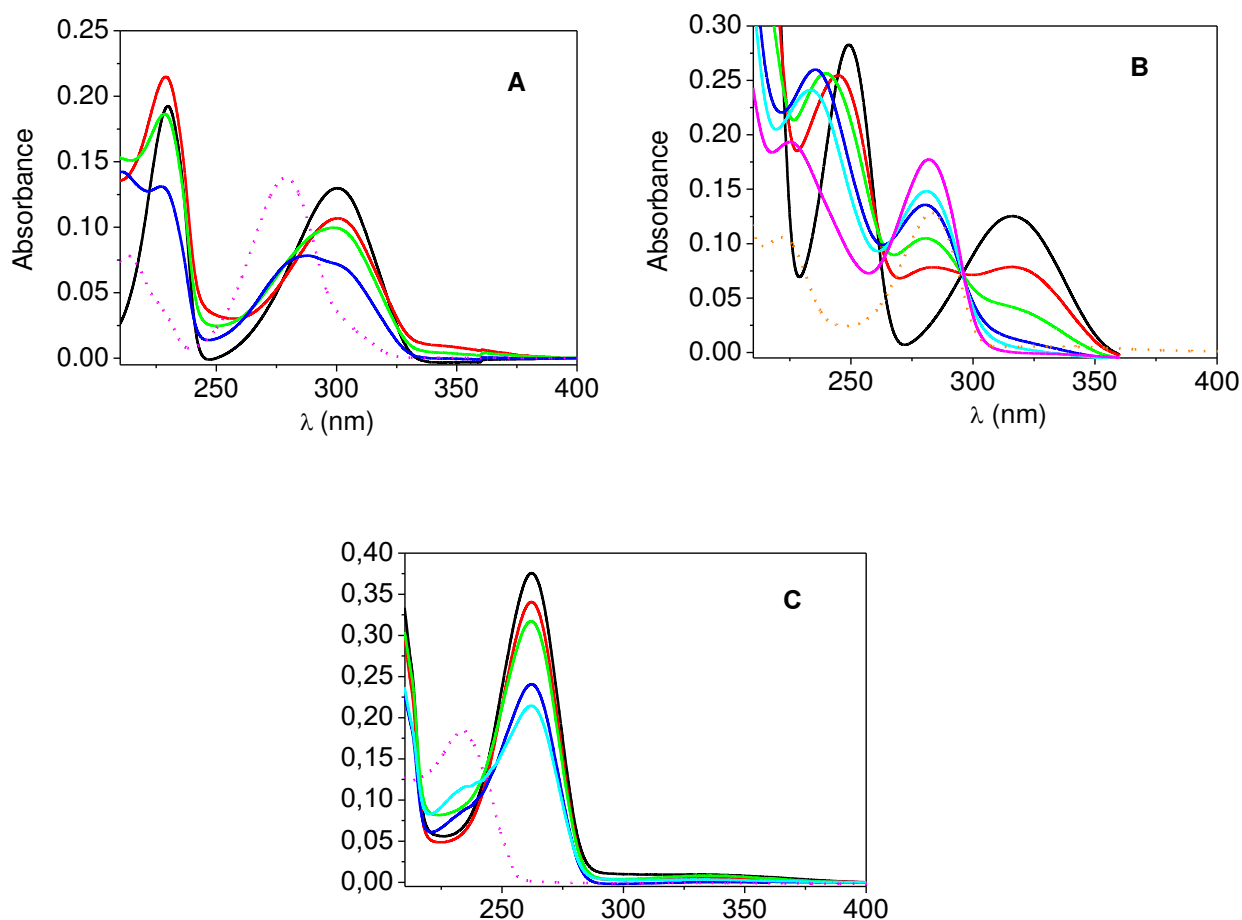


Figure 7 : Spectres d'absorption UV-visible dans HCl à 0,5 M de $2 \cdot 10^{-5}$ M (A) 2-aminopyridine (ligne solide noire), (B) 3-aminopyridine (courbe noire) (C) 4-aminopyridine (courbe noire). Après addition de 2 équivalents de NaNO_2 , les spectres ont été enregistrés à différents temps ; (A) après 10 min (courbe rouge), 60 min (courbe verte), 300 min (courbe bleue) et 1440 min (courbe cyan). (B) après 1 min (courbe rouge), 5 min (courbe verte), 10 min (courbe bleue), 30 min (courbe cyan) et 60 min (courbe magenta). (C) après 10 min (courbe rouge), 60 min (courbe verte), 300 min (courbe bleue) et 1440 min (courbe cyan). Les spectres d'absorption des composés hydroxypyridinium correspondants sont également présentés (lignes pointillées).

III.2.3 Greffage électrochimique à partir de cations diazopyridinium générés in situ

Les électrodes utilisées en tant que bioanodes dans les piles à combustible microbiennes sont en général des électrodes en graphite mesurant plusieurs dizaines de cm^2 . Il est assez délicat d'utiliser ce matériau pour analyser et caractériser le processus de fonctionnalisation car la réactivité de sa surface n'est pas uniforme. J'ai donc choisi dans un premier temps, d'étudier le greffage du sel de diazonium de départ sur des électrodes dites analytiques, en or ou en carbone vitreux de petite surface ($< 0.5 \text{ cm}^2$).

La réduction électrochimique des cations diazopyridinium formés *in situ* à partir des différents précurseurs amino pyridine est effectuée soit par voltammétrie cyclique, soit par chronoampérométrie. La Figure 8 ci-dessous, montre les voltammogrammes typiques obtenus pour la réduction *in situ* des cations de 4-diazopyridinium. Le sel de diazonium est formé directement dans la cellule électrochimique à partir de 4-aminopyridine (20 mM) en milieu aqueux acide (HCl à 0.5 M), après ajout de nitrite de sodium (NaNO_2 à 40 mM), dans un bain de glace et après bullage d'argon. Cette méthode est inspirée de la méthode décrite par Bélanger et al, (Baranton and Bélanger, 2005), (Lyskawa and Bélanger, 2006). 30 secondes après addition de nitrite de sodium, le potentiel est balayé entre 0,4 V et -0,3 V à une vitesse de balayage de 0,05 V/s. La charge cathodique consommée par la réaction est intégrée à chaque cycle. On observe le comportement caractéristique de l'électroréduction de cations de diazonium, avec une diminution de l'intensité de courant cathodique pendant les cycles consécutifs. Il correspond à la formation d'une espèce radicalaire lors de la réduction, par départ du groupement azote (Figure 9), capable de former de liaisons covalentes avec la surface de l'électrode (Bélanger and Pinson, 2011). On observe alors la diminution de l'intensité du courant au cours des cycles suivants. L'allure des voltammogrammes enregistrés au cours du greffage électrochimique des sels de diazopyridinium constitue une première indication du bon déroulement du greffage. Nous avons également réalisé l'électrogreffage en balayant le potentiel entre 0,5 et -0,8 V tel qu'indiqué par al. (Agullo et al., 2012b), (Figure 8. B). Les propriétés de blocage de cette dernière couche sont similaires à celles obtenues avec les conditions de la Figure 8A (voir plus loin). En outre, (Agullo et al., 2012b) ont montré que le nitrite de sodium peut être réduit de manière compétitive à des potentiels supérieurs à -0,4 V, donc nous avons choisi de limiter à -0.3 V le potentiel cathodique appliqué (Figure 8A).

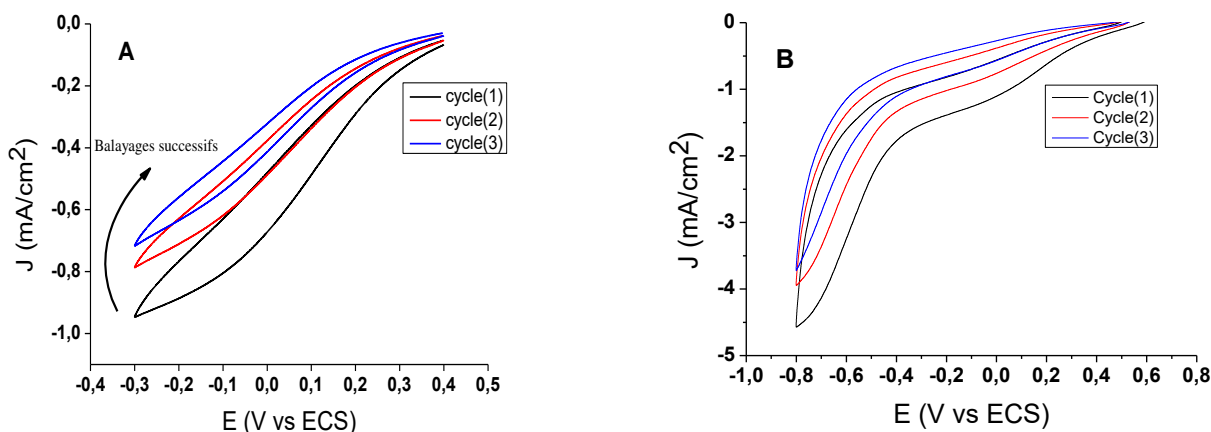


Figure 8 : Voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode de carbone vitreux lors du greffage du sel de diazopyridinium généré in situ à partir de 4-aminopyridine (20 mM) par ajout de NaNO_2 (40 mM) dans HCl à 0,5 M. (A) voltammogrammes enregistrés pour une modification en 3 cycles en balayant le potentiel entre 0,4 V et -0,3 V vs ECS. (B) voltammogrammes enregistrés pour une modification en 10 cycles en balayant le potentiel entre 0,6 V et -0,8 V vs ECS. La vitesse de balayage est de $0,05 \text{ V s}^{-1}$.

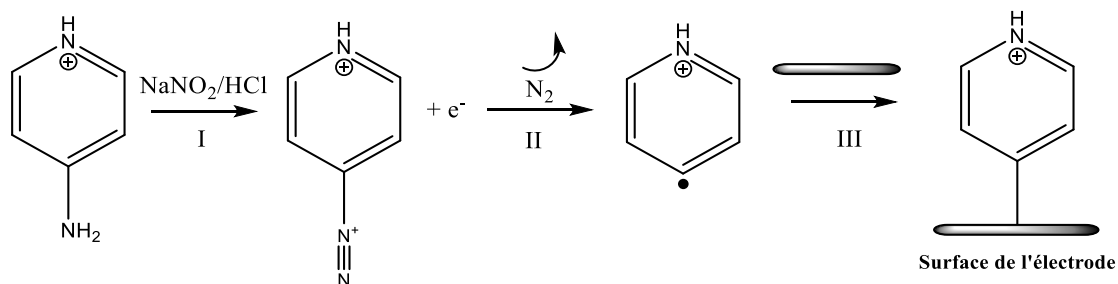


Figure 9: Modification de surface par réduction de sel de diazonium ; (I) Diazotation de l'aminopyridinium, (II) Électroréduction du cation diazonium, (III) Formation de liaison covalente à la surface de l'électrode.

III.2.4 Caractérisation des surfaces

Afin de caractériser la surface de l'électrode modifiée, différentes techniques ont été utilisées, spectroscopique (Spectroscopie de Photoélectrons à rayons X ; XPS), Microscopie à Force Atomique (AFM) et des mesures électrochimiques. Dans ce cas, nous avons employé la voltammétrie cyclique pour étudier les propriétés de blocage des couches greffées vis-à-vis du ferricyanure, employé comme sonde redox.

III.2.4.a Etude des surfaces modifiées par XPS et AFM

La spectroscopie de photoélectrons à rayons X (XPS) a été utilisée afin de vérifier la présence de la pyridine en surface des électrodes au cours du processus de fonctionnalisation. Dans cette expérience, nous avons utilisé des surfaces d'or au lieu de carbone afin de nous affranchir de la grande contribution des atomes de carbone du substrat lui-même.

Les trois surfaces modifiées à partir de la 2-amino, 3-amino et 4-aminopyridine ont été préparées par chronoampérométrie en appliquant un potentiel de réduction (respectivement -0,25, -0,35 et -0,30 V vs ECS), pendant un temps d'électrolyse de 300 s, avec une densité de charge de 22 mC/cm², 15 mC/cm² et 28 mC/cm² respectivement. Ce potentiel de réduction a été appliqué 30 s après l'addition de nitrite de sodium (NaNO₂) dans la cellule électrochimique. Les spectres XPS montrent la présence de carbone C 1s (285 eV, 22-46% atomique), d'oxygène (532 eV, 5-7% atomique, également présent sur des échantillons d'or nus) et de l'azote N 1s (400 eV, de 1,7 à 6% atomique) ainsi que des pics intenses dus aux photoélectrons issus du substrat d'or. Dans cette étude, la présence du pic de photoélectrons N 1s est une bonne indication du greffage des unités pyridine à la surface d'électrode. Le spectre de N 1s est décomposé en plusieurs composantes (Figure 10).

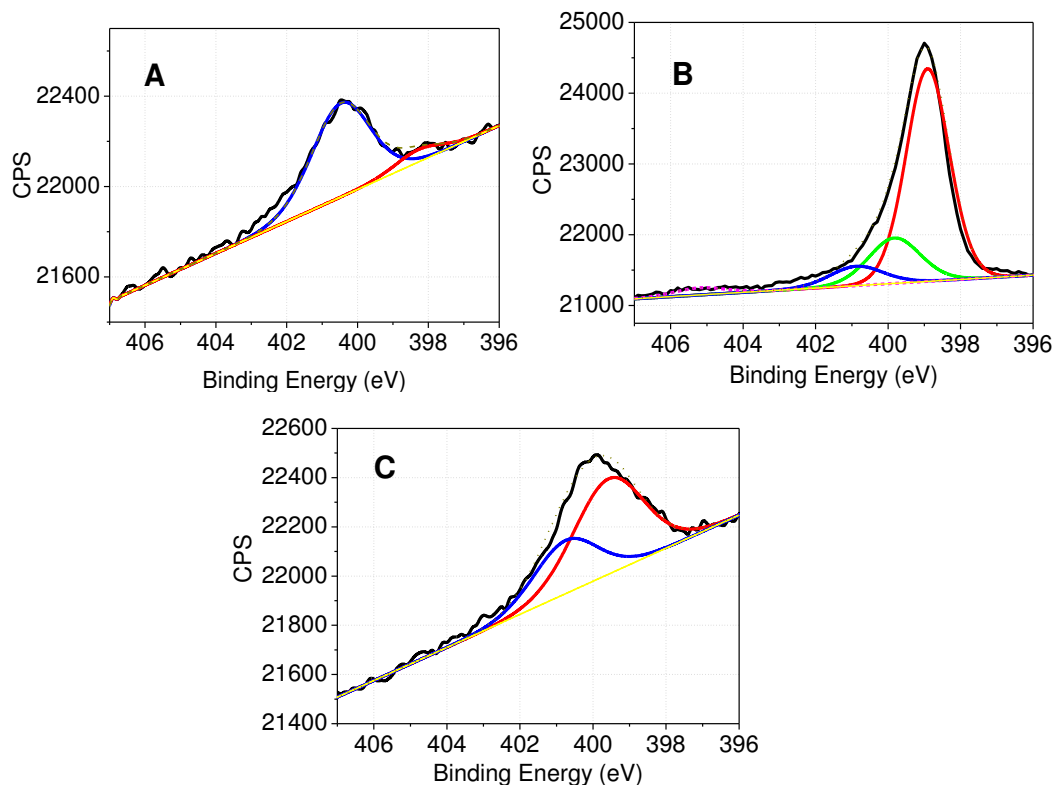


Figure 10 : Spectres de photoélectron $N 1s$ à haute résolution pour des électrodes d'or modifiées par électrogreffage de cations de diazopyridinium produits *in situ* dans HCl à $0,5 M$, $30 s$ après l'addition de $NaNO_2$ à partir de (A) 2-aminopyridine, (B) 3-aminopyridine et (C) 4-aminopyridine.

L'absence de pic à $403,8 eV$ indique qu'il n'y pas de cations de diazonium qui restent adsorbés à la surface (Finn and Jolly, 1972). Pour les trois échantillons, les pics obtenus à $398,6-399,3 eV$ sont attribués à l'azote neutre de la pyridine tandis que la contribution à $400,7-400,8 eV$ correspond à la pyridine protonée (Hendrickson et al., 1969). Vu le pK_a des différents dérivés de la pyridine ($6,86$, $9,17$ et $5,98$ pour la 2-amino-, 3-amino- et 4-aminopyridine, respectivement), l'atome d'azote des aminopyridines est sous sa forme protonée dans la solution d' HCl . Après l'électrogreffage, on obtient une unité pyridinium attachée à la surface de l'électrode, dont le pK_a devient alors proche de celui de la pyridine ($pK_a = 5,2$). Le rinçage abondant de la surface avec de l'eau ultra pure après sa modification, peut amener à une neutralisation partielle des groupes pyridinium. La variation de la contribution relative de l'azote neutre par rapport à la pyridine protonée parmi les différents échantillons est probablement due à une différence dans la procédure de lavage. Une composante supplémentaire à $399,9 eV$ correspondant à des liaisons $-N\equiv N-$ se trouve également dans le

cas de des électrodes modifiées à partir de 3-aminopyridine (Figure 10. B). Cette observation concorde avec celle faite par (Agullo et al., 2012b) , (Agullo et al., 2012a). Il est intéressant de noter que cette contribution est absente dans le cas de deux autres composés aminopyridine (2-amino et 4-aminopyridine). On peut également observer que l'intensité des signaux N 1s et C 1s relativement au signal dû à l'or, est moins intense avec ces deux composés, que ceux enregistrés dans le cas de la 3-aminopyridine, ce qui suggère la formation de couches plus minces pour la 2-amino et 4-aminopyridine. Ainsi, les rapports atomiques C/Au ou N/Au utilisés comme paramètres quantitatifs sont significativement plus importants dans le cas de la couche préparée avec la 3-aminopyridine que pour les deux autres dérivés de la pyridine (Tableau 1). On peut également observer que le rapport atomique N/Au est plus faible pour la couche préparée à partir de la 2-aminopyridine que pour le film à partir de la 4-aminopyridine, ce qui suggère que la 2-aminopyridine se greffe en film plus mince et/ou moins dense que la 4-aminopyridine. Ces observations sont confortées par des mesures ellipsométriques effectuées pour estimer l'épaisseur des couches sur les surfaces d'or (Tableau 1).

	C/Au	N/Au	Épaisseur (nm)
2-aminopyridine après 30s	0,38	0,022	0,96 ^a
2-aminopyridine après 24 h	0,30	0,013	1,2 ^a
3 aminopyridine après 30s	1,11	0,14	4,1 ^a
4-aminopyridine après 30s	0,35	0,036	2,1 ^a 0,9 ± 0,3 ^b
4-aminopyridine après 5h	0,33	0,038	2,3 ^a

Tableau 1 : Rapport atomique XPS pour la surface d'or modifiée par des cations diazopyridinium in situ produites à partir de 2-, 3-, 4-aminopyridine après 30s, 5 h ou 24 h de l'addition de 2 eq. de NaNO₂. Épaisseur estimée par ; a) mesures ellipsométriques des surfaces d'or correspondantes et b) la méthode de scratching sur substrat PPF assurée par AFM.

A cause de la rugosité élevée du substrat d'or, les valeurs d'épaisseur ne peuvent pas être considérées ici comme des valeurs absolues. En effet, en utilisant la méthode de « scratching » par microscopie à force atomique (AFM) (Figure 11), on obtient une valeur d'épaisseur inférieure à 1 nm (0.9 ± 2 nm), pour un film de 4-aminopyridine préparé avec des surfaces de PPF (Pyrolized Photoresist Film), qui possèdent une rugosité de surface très faible (moins de 0.5 nm) (Ranganathan and McCreery, 2001), (del Campo et al., 2011) et (Anariba et al., 2003). Cependant, les valeurs obtenues sur les surfaces d'or peuvent être comparées en tant que tendance et montrent qu'un film plus épais est obtenu avec la 3-aminopyridine (Tableau 1). Dans ce dernier cas, il est probable qu'une multicouche soit formée, comme déjà signalé par (Agullo et al., 2012a). Cela est en accord avec la présence d'un pic à 399,9 eV dans les analyses XPS correspondant à des liaisons $-N \equiv N-$.

En tenant compte de l'évolution de la réactivité de diazonium observée par spectroscopie d'absorption UV-Visible, des surfaces d'or ont été également préparées avec la 2-amino et 4-aminopyridine après 24 h et 5 h suite à l'addition de $NaNO_2$, respectivement. Les analyses XPS et les mesures ellipsométriques donnent des résultats similaires (Tableau 1) à ceux obtenus après 30s, indiquant que des films minces sont obtenus dans tous les cas.

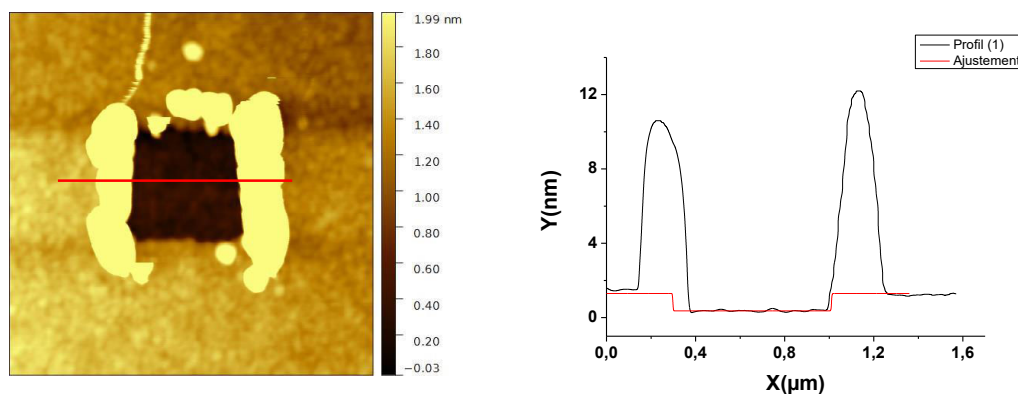


Figure 11 : Image AFM du scratching d'une surface de PPF couverte d'une couche de 4-aminopyridine et profil de trou formé (une rayure de 500 à 500 nm en mode contact).

III.2.4.b Etude des propriétés de blocage du transfert de charge des couches modifiées

Afin de vérifier l'effet de la modification sur le transfert électronique à la surface de l'électrode, nous avons étudié par voltamétrie cyclique le comportement électrochimique du ferricyanure de potassium sur les différentes électrodes modifiées et non modifiées. Ces études

permettent de démontrer indirectement la présence des couches greffées et d'évaluer leur concentration surfacique relative et leur compacité (D'Amour and Bélanger, 2003).

La Figure 12 montre les voltammogrammes obtenus après modification d'électrodes en carbone vitreux, par voltammétrie cyclique. Des résultats similaires sont obtenus avec des électrodes en or. En général, sur électrode nue, l'écart faible ($\Delta E_p = 75 \text{ mV}$) entre le pic de réduction et le pic d'oxydation du couple redox ferro/ferricyanure témoigne d'un transfert électronique assez rapide. Après modification, les propriétés de blocage sont facilement détectées à travers l'augmentation de l'écart pic-à-pic ΔE_p et la diminution de l'intensité de courant correspondant au système redox de la sonde, car la couche greffée agit comme une barrière qui ralentit considérablement la cinétique du transfert électronique.

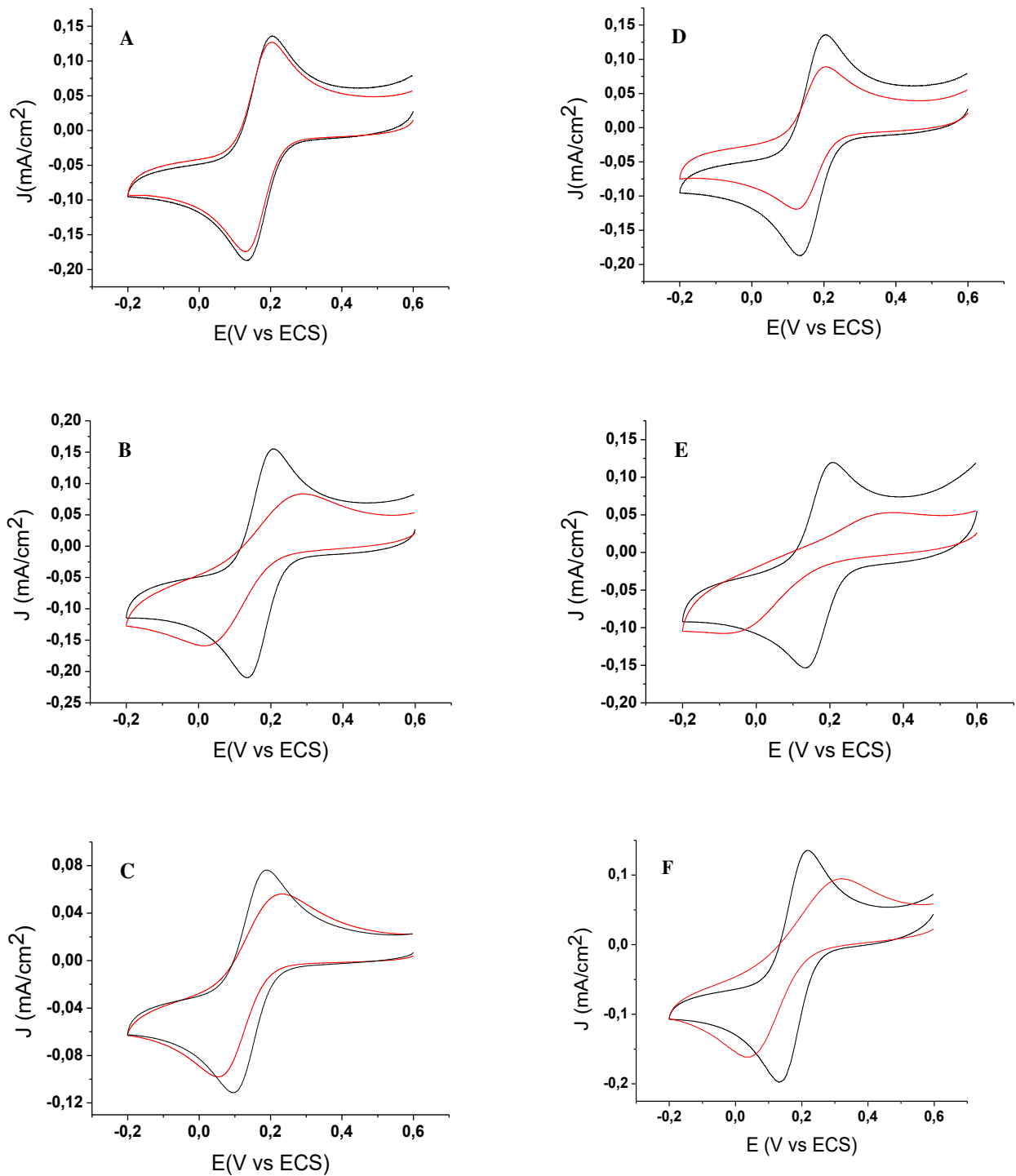


Figure 12 : Voltammogrammes cycliques de 1 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ dans une solution aqueuse 0,1 M KCl à pH = 7,5 (colonne gauche) et à pH = 9 (colonne droite) pour les électrodes de carbone vitreux (courbes noires) et pour électrodes de carbone modifiées (courbes rouges). Les électrodes modifiées ont été préparées à partir de la 2-aminopyridine (A, D), 3-aminopyridine (B, E) et 4-aminopyridine (C, F).

La vitesse de balayage est $0,05 \text{ V s}^{-1}$.

Les propriétés de blocage ont été étudiées à $\text{pH} > \text{pK}_a$ de la pyridine (≈ 5). En effet, dans une solution aqueuse acide ($\text{pH} = 2$), les voltammogrammes des surfaces de carbone modifiées sont presque identiques à ceux des surfaces nues en raison de l'interaction électrostatique entre les unités pyridinium greffées (chargées positivement) et les ions ferrocyanure/ferricyanure chargés négativement. À $\text{pH} = 7,5$ et $\text{pH} = 9$, un effet de blocage important est observé pour les films préparés avec la 3-aminopyridine, cet effet étant plus marqué à $\text{pH} = 9$ car la déprotonation de la pyridine greffée est beaucoup plus efficace dans une solution aqueuse basique. Le même comportement général peut être observé pour les électrodes modifiées avec les deux autres dérivés de pyridine (2-amino et 4-aminopyridine). Cependant, l'amplitude de l'effet de blocage varie fortement en fonction de la nature de l'aminopyridine. Pour la couche préparée à partir de la 2-aminopyridine, nous observons un effet de blocage très faible à $\text{pH} = 9$ et aucun effet significatif à $\text{pH} = 7,5$ par rapport à l'électrode nue. Ce résultat suggère la formation d'une couche mince, peu compacte avec des îlots organiques dispersés sur la surface de l'électrode. Cela est aussi en accord avec la faible valeur du rapport atomique N/Au obtenu à partir des données XPS. Le caractère bloquant est significativement plus fort dans le cas de couches préparées à partir de la 4-aminopyridine, bien qu'il soit moins marqué que pour la couche obtenue à partir de la 3-aminopyridine. Cela est en accord avec la formation des couches plus épaisses avec la 3-aminopyridine qu'avec la 4-aminopyridine, comme le suggèrent l'analyse XPS et les mesures ellipsométriques. Néanmoins, le comportement électrochimique de la sonde redox vis-à-vis des électrodes préparées à partir de 4-aminopyridine indique clairement la formation d'une couche mince mais plutôt compacte. Les images de topographie obtenues à partir d'analyses AFM sur des surfaces de PPF confirment qu'une couche homogène est formée par l'électrogreffage de cations diazopyridinium produits à partir de la 4-aminopyridine (Figure 13). Ces images montrent que la surface de PPF greffée présente des structures de surface presque identiques et de mêmes dimensions que celles des substrats de PPF nus, ce qui indique un dépôt uniforme sur la surface. Après modification de la surface, les images AFM révèlent que la rugosité de surface « R_a » (Rugosité moyenne arithmétique), n'a augmenté que légèrement ($R_a = 0,4 \text{ nm}$) par rapport à la surface nue ($R_a = 0,1 \text{ nm}$), ce qui est en accord avec la formation d'un film fin.

Ces résultats sont très intéressants et démontrent que les caractéristiques des couches greffées à partir de la 4-aminopyridine sont particulièrement bien adaptées pour moduler l'interface électrode/biofilm. En particulier, ces couches ne bloquent pas le transfert d'électrons

tout en étant bien homogènes. Par ailleurs, l'atome d'azote du greffon pyridine est en position para, « pointant » vers le solvant, donc plus accessible en principe aux cytochromes membranaires des bactéries par rapport aux autres isomères.

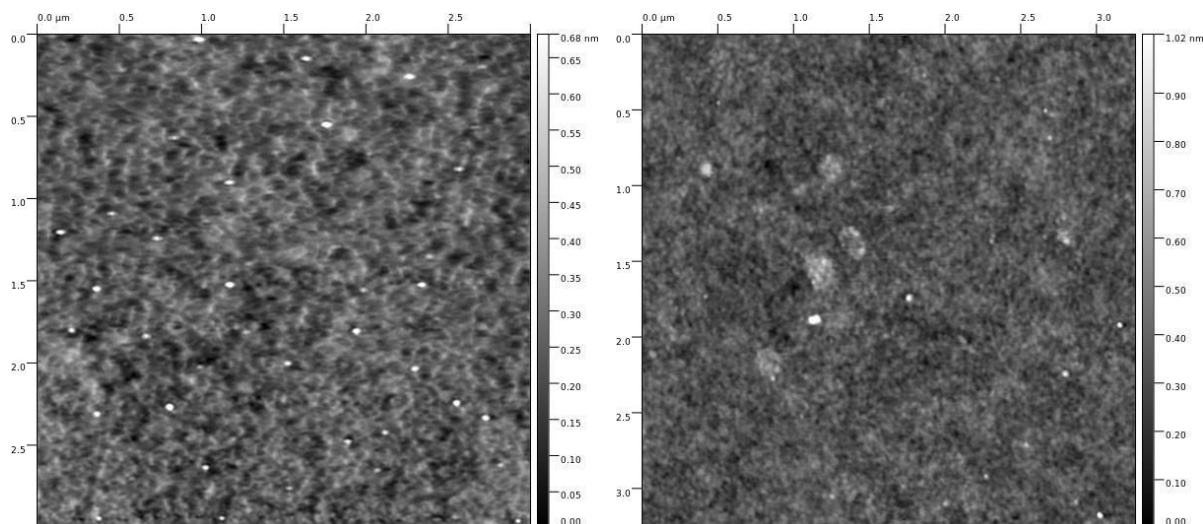


Figure 13 : Images AFM d'une électrode de PPF (surface de $3 \times 3 \mu\text{m}^2$) : PPF nu (à gauche) et PPF modifié à partir de 4-aminopyridine (à droite).

III.2.4.c Etude de l'effet de la charge consommée pour l'électrogreffage

Une spécificité intéressante de la méthode de réduction électrochimique des cations diazonium est la possibilité de moduler l'épaisseur de la couche en contrôlant la densité de charge (mC/cm^2) consommée lors du processus de réduction du sel de diazonium (en faisant varier les paramètres expérimentaux: le nombre de cycles en voltamétrie cyclique ou le temps en chronoampérométrie) (Pinson and Podvorica, 2005) et (Bélangier and Pinson, 2011). En principe, une charge plus importante permet de produire une couche plus épaisse, qui a, par conséquent, un effet bloquant plus élevé envers les sondes redox.

Dans le cas de greffage de groupement pyridinium à partir de la 4-aminopyridine, nous avons effectué des modifications avec différentes densités de charge. Le comportement des électrodes modifiées a été étudié en présence de ferricyanure de potassium à $\text{pH} = 9$. La Figure 14 ci-dessous présente le voltammogramme de la réduction du ferricyanure de potassium (1 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ dans une solution aqueuse de KCl à 0,1 M à $\text{pH} = 9$ sur électrode de carbone vitreux (diamètre 3mm), modifiée par réduction chimique de la 4-aminopyridine en utilisant deux quantités de charges différentes pour une même surface ($Q = 4 \text{ mC}$ et $Q = 10 \text{ mC}$).

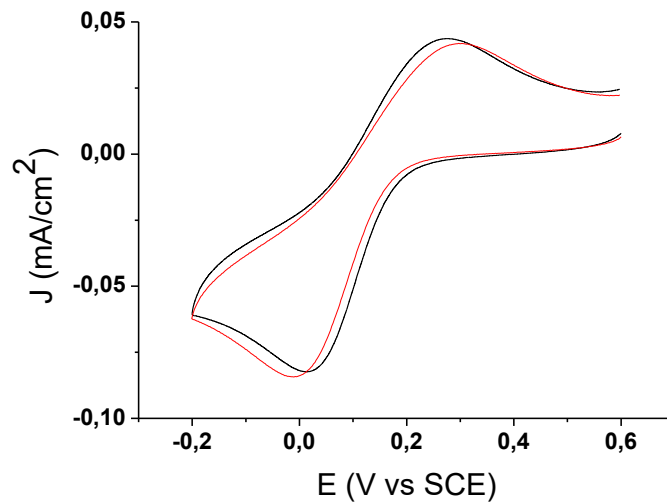


Figure 14 : Voltammogrammes de l'oxydoréduction du ferricyanure de potassium (1 mM de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ dans une solution aqueuse de KCl à 0,1 M) à pH = 9 sur électrode de carbone vitreux (diamètre 3mm), modifiée par réduction chimique de la 4-aminopyridine avec $Q = 4$ mC (courbe noire) et $Q = 10$ mC (courbe rouge), $\nu = 50$ V s⁻¹.

En général, le « degré » de la modification de surface dépend de la quantité de charge passée pendant le greffage; plus la charge est importante plus la modification est forte, c'est-à-dire que la concentration surfacique de l'espèce greffée est plus importante. Dans notre cas et si on utilise l'écart entre les deux pics d'oxydoréduction (ΔE_p) comme paramètre de quantification, les voltammogrammes montrent que le transfert électronique entre la sonde redox et la surface modifiée traduit par le ΔE_p , est de même ordre de grandeur pour les deux quantités de charge (ΔE_p est de 258 mV dans le cas de $Q=4$ mC et de 283 mV dans le cas de $Q=10$ mC). Quelle que soit la quantité de charge consommée, la couche greffée ne bloque pas complètement le transfert d'électron, qui reste relativement rapide pour les deux greffages.

Cette observation est renforcée par une autre expérience qui consiste à modifier plusieurs électrodes avec différentes quantités de charge et à analyser l'écart entre les deux pics d'oxydoréduction (ΔE_p) de la sonde redox mesuré pour chaque modification. La Figure 15 présente la variation de ΔE_p en fonction de la quantité de charge passée.

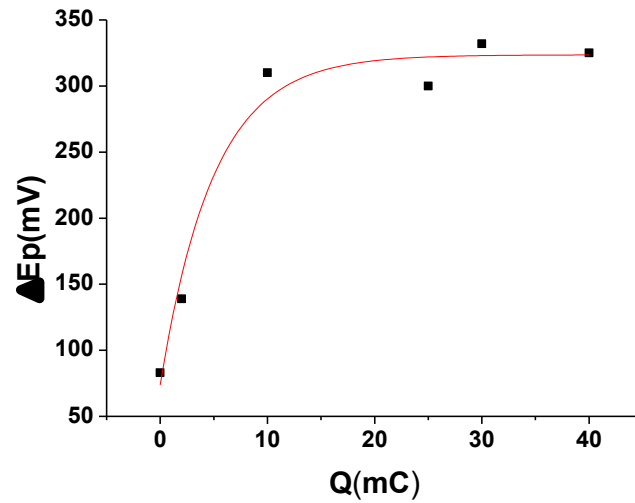


Figure 15 : Dépendance de l'écart entre les pics d'oxydoréduction (ΔE_p) de la quantité de charge passée pendant la modification (Q).

En observant la figure ci-dessus, nous remarquons que l'effet de blocage le plus élevé est rapidement obtenu et ne peut pas être augmenté en prolongeant le temps d'électrolyse même avec une consommation de charge importante (jusqu'à 40 mC), ce qui suggère que la croissance de la couche est auto-limitée à une épaisseur donnée (films fins).

Une expérience supplémentaire, consiste à comparer le comportement électrochimique de notre sonde redox sur des électrodes modifiées par la réduction de cations 4-aminopyridinium d'une part et de cations benzenediazonium d'autre part. Comme pour les cations diazopyridinium, les cations benzenediazonium sont formés *in situ*. On obtient des couches de polyphénylène en surface après électrogreffage (Picot et al., 2011). Les deux greffages ont été effectués avec des quantités de charge proches (environ 4 mC). Dans un milieu basique (pH = 9), la réponse des électrodes modifiées en présence de ferricyanure de potassium est présentée sur la Figure 16 ci-dessous.

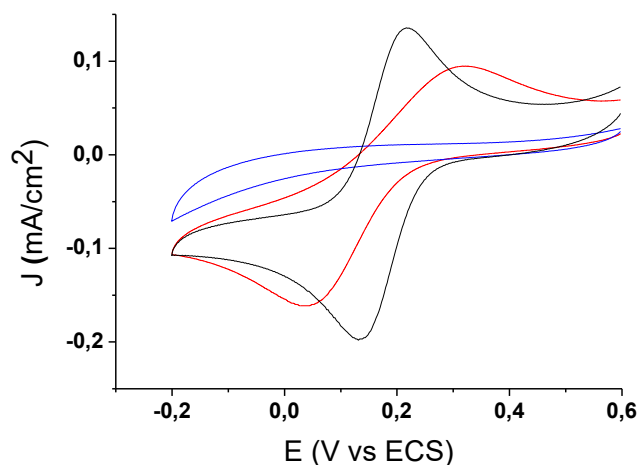


Figure 16 : Réduction (vitesse de balayage de $0,05 \text{ V s}^{-1}$) du ferricyanure de potassium (1 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ dans une solution aqueuse de KCl à $0,1 \text{ M}$) sur des électrodes modifiées à $\text{pH} = 9$: électrode modifiée avec la pyridine (courbe rouge) et électrode modifiée avec le phényle (courbe bleue) par la réduction de 4-aminopyridine diazonium et phényldiazonium, respectivement. Les deux électrodes sont comparées à une électrode non modifiée (courbe noire).

Les voltammogrammes montrent que le transfert électronique entre la sonde redox et la surface modifiée avec le phényle avec une faible charge (4 mC) est très lent, de telle sorte que le ΔE_p a tellement augmenté qu'il n'est plus détectable dans cette plage de potentiel. Dans ce cas, l'électrode est dite «complètement bloquante» vis-à-vis de la réduction du ferricyanure de potassium (Picot et al., 2011). En revanche, dans le cas d'une électrode modifiée avec de la pyridine le signal électrochimique du couple ferricyanure/ferrocyanure montre deux pics de réduction et d'oxydation avec un $\Delta E_p = 250 \text{ mV}$ et une nette chute du courant faradique maximum. Ce comportement est typique d'une électrode partiellement bloquée, comme discutée dans les paragraphes précédents.

Nous avons effectué plusieurs expériences d'électrogreffage, en faisant varier la charge consommée pour la réduction des diazoniums. Puis nous avons analysé le comportement électrochimique du ferricyanure sur ces électrodes modifiées. Nous avons tracé la variation de l'écart des pics d'oxydo-réduction (ΔE_p) en fonction de la charge consommée pour la modification de la surface (Figure 17). Dans le cas de la modification avec le phényldiazonium, ΔE_p augmente rapidement pour atteindre une valeur de plus que 1100 mV à une quantité de charge assez faible (5 mC). Cela suggère que le polyphénylène se greffe sur la surface en multicouches. En revanche, dans le cas de la pyridine, ΔE_p atteint très rapidement une valeur

plateau (~300 mV) pour des quantités de charge consommée assez faibles (7 mC). Cette valeur de ΔE_p correspond à un blocage partiel de l'électrode vis-à-vis du transfert d'électron, et, contrairement au cas du phényldiazonium, on n'observe pas d'inhibition totale du transfert électronique dans la zone de potentiels étudiés même pour des quantités de charge consommée importantes (40 mC). Cela renforce l'idée que l'on obtient systématiquement des films fins à partir de l'électrogreffage des diazopyridiniums. La réactivité de ces derniers est telle que la croissance des films est auto-limitée à des faibles épaisseurs (de l'ordre de quelques nanomètres).

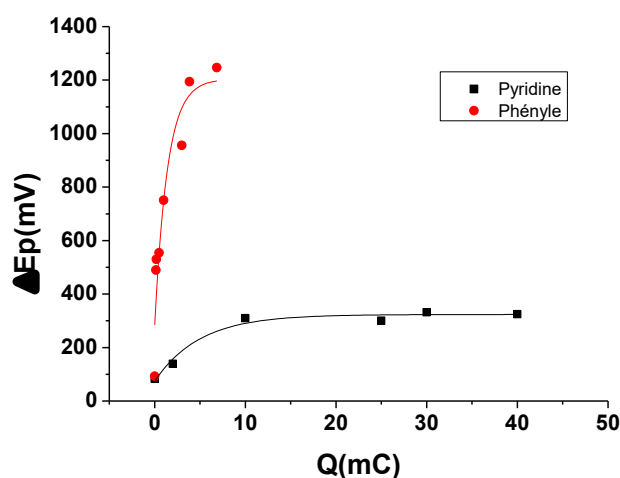


Figure 17 : Dépendance de l'écart entre les pics d'oxydoréduction (ΔE_p) de la quantité de charge passée pendant la modification (Q) en utilisant deux modifiants différents ; dans le cas de la pyridine (courbe noire) et dans le cas de phényle (courbe rouge).

Ce résultat est particulièrement intéressant pour une application dans une PCM. Ce film fin est susceptible d'influencer l'adhésion des bactéries et leur connexion avec l'anode, tout en préservant l'efficacité du transfert d'électrons (pas d'inhibition).

III.2.4.d Angle de contact

Comme nous l'avons évoqué précédemment, à part l'épaisseur de la couche greffée à la surface de l'électrode, l'hydrophilicité de surface, est aussi connue pour avoir un impact sur l'adhésion bactérienne. Cela peut constituer un autre facteur à l'origine de l'augmentation des performances d'une PCM suite à une modification de surface d'électrode. Dans notre cas, des mesures d'angle de contact ont été effectuées sur des électrodes de PPF (Pyrolized Photoresist Film) avant et après modification avec la pyridine. Une mesure d'angle de contact se fait en

déposant une goutte de liquide (dans notre cas de l'eau ultra pure pH = 7.09, le greffon est donc majoritairement sous sa forme protonée pyridinium), sur la surface de PPF et en mesurant l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide « θ ». En fonction de la valeur de l'angle θ , on définit l'hydrophilicité/hydrophobicité de la surface.

L'angle de contact de la surface de PPF avant modification était de l'ordre de $82 \pm 1^\circ$, indiquant que la surface de PPF est une surface relativement hydrophobe. Après greffage des unités pyridine, l'angle de contact de la surface modifiée est égal à $52 \pm 3^\circ$, démontrant que la modification de surface rend la surface beaucoup plus hydrophile que le substrat PPF de départ. Ce résultat constitue une autre preuve de la présence d'une couche de la pyridine sur la surface de PPF. Comme évoqué au début de ce chapitre, l'hydrophilicité/hydrophobicité de surface est un facteur influençant la bioadhésion et peut donc avoir une influence sur les performances des PCMs (Zhu et al., 2011), (Feng et al., 2010). De façon générale, il est admis que l'affinité entre les bactéries et la surface de l'électrode à propriété hydrophile est favorable à l'adhésion des bactéries (Grivet et al., 2000), d'où l'intérêt de ces couches de pyridine greffée sur les électrodes dans le cadre de cette étude.

III.3 Conclusions sur la partie A

L'ensemble des analyses par électrochimie, par spectroscopie XPS et par AFM mettent en évidence que la procédure de fonctionnalisation mise au point au cours de ce travail de thèse permet de greffer de façon covalente la 2-amino, la 3-amino et la 4-aminopyridinium sur des surfaces d'électrodes. Plus particulièrement, la 4-aminopyridine se greffe en couche fine et compacte sans ralentir de façon excessive les cinétiques de transfert d'électrons entre une sonde électrochimique, le ferricyanure de potassium, et l'électrode. Ces couches sont donc, particulièrement intéressantes pour moduler l'interface entre les biofilms microbiens électroactifs et l'électrode car on peut obtenir, de façon reproductible, des films minces et homogènes, présentant des propriétés hydrophiles, et qui ne bloquent que très peu le transfert électronique. Cette procédure a alors été appliquée pour modifier des plaques de graphite de plusieurs dizaines de cm², utilisées par la suite comme bioanodes microbiennes.

Chapitre III Partie B : Influence de la modification sur la performance des piles à combustible microbiennes

III.1 Fonctionnement de la PCM du laboratoire

L'ensemble des travaux discutés dans cette partie a été réalisée avec la configuration classique des piles en H (Schaetzle et al., 2009) (détaillée dans le chapitre II matériels et méthodes). Il s'agit d'une pile mise au point au laboratoire dans laquelle l'anode et la cathode sont séparées par une membrane échangeuse de cations et reliées par une résistance de 1 k Ω . L'anolyte est constituée de 200 mL d'inoculum, contenant de l'acétate à 20 mM et du tampon phosphate à 20 mM ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$), pKa (25°C) = 7,2, qui permet à la fois, le maintien du pH, un apport de potassium et de phosphore mais aussi des ions mobiles (électrolyte support) qui conduisent le courant. L'anolyte est maintenu en condition anaérobie grâce à un bullage d'argon quand nécessaire. Son pH est mesuré quotidiennement et ajusté à pH=7 si besoin. Afin de se concentrer sur les phénomènes anodiques, nous avons opté pour des cathodes abiotiques plongées dans une solution (catholyte) de 200 mL de ferricyanure de potassium à 0.1 M et du tampon phosphate à 20 mM ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$). Le dispositif est alors placé dans un bain thermostaté à 30 \pm 2°C. L'évolution de la tension de la biopile est mesurée régulièrement à l'aide d'un voltmètre pendant quelques jours à quelques semaines (Chapitre II).

La croissance du biofilm est surveillée par des mesures de la tension aux bornes de la pile à courant nul; une différence de tension de 600 à 700 mV indique la présence d'un biofilm électro-actif dû à une connexion des bactéries électroactives à l'électrode grâce à une série de réactions faisant intervenir de nombreux cytochromes, protéines, médiateurs redox solubles ou liés à la membrane. Pour confirmer le développement du biofilm, les voltamétries cycliques ont été effectuées sur les bioanodes (en tant qu'électrodes de travail), la réponse du système est enregistrée sous forme de courant en fonction du potentiel appliqué. Cette technologie de caractérisation est utilisée par de nombreux auteurs sur des biofilms anodiques (Harnisch and Freguia, 2012), (Katuri et al., 2012) et (Fricke et al., 2008). La Figure 18 présente deux voltammogrammes caractéristiques obtenus au laboratoire dans le cas d'une bioanode en présence et en absence d'acétate en tant que substrat. Dans ce cas, nous observons une courbe bioélectrocatalytique classique présentant un maximum du courant à un potentiel d'environ -0,55 V qui correspond au potentiel auquel l'acétate est oxydé catalytiquement. La vitesse de

balayage utilisée est de 5 mV/s. Cette faible vitesse est adaptée aux cinétiques des réactions métaboliques des bactéries.

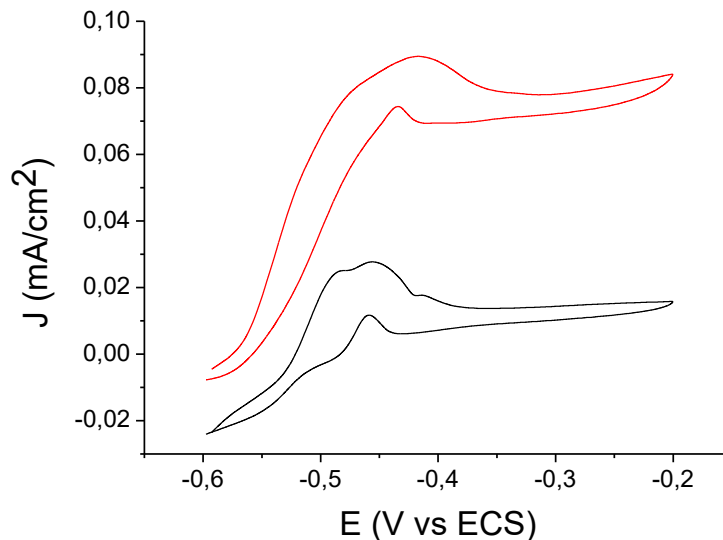


Figure 18 : Exemple de voltammogrammes ($v = 5 \text{ mV/s}$) enregistrés sur une bioanode (non préalablement modifiée chimiquement) en présence du substrat (acétate de potassium, 20 mM) (courbe rouge) ou en absence de substrat (courbe noire) dans l'anolyte. Ici exemple d'un biofilm âgé de deux semaines développé sur une anode de graphite qui possède une surface d'environ 9 cm^2 .

En absence de substrat (courbe noire), la voltamétrie cyclique permet de mettre en évidence la présence d'au moins trois systèmes électrochimiques redox en contact avec l'électrode. Ils sont attribués à l'électroactivité des protéines redox de surface impliquées dans le transfert électronique. Les bactéries impliquées dans une bioanode microbienne sont capables de transférer des électrons issus de leur activité métabolique vers l'anode en utilisant une chaîne d'intermédiaires jouant le rôle de relais électroniques. Ces systèmes redox détectés en absence de substrat sont alors attribués à la présence des relais redox, présents à la surface des bactéries et directement connectés à l'électrode, capable d'agir comme des intermédiaires dans le transfert électronique biofilm/électrode (Fricke et al., 2008) et (Katuri et al., 2010).

Dans le deuxième cas et lorsque le milieu est saturé en acétate (courbe rouge), le voltammogramme obtenu possède une forme proche d'une sigmoïde, caractéristique de l'oxydation catalytique de l'acétate par un biofilm électroactif, dont on peut mesurer le courant catalytique maximal à un potentiel donné. Notons que l'électrode atteint un plateau de courant

à partir de -0,3 V vs. ECS. Ce type de comportement sigmoïdal a également été identifié sur des biofilms formés avec des cultures pures de *Geobacter sulfurreducens* (Marsili et al., 2010).

Un autre moyen de caractériser les piles est de s'intéresser aux performances électriques en effectuant des courbes de polarisation lorsque que la PCM est dans la phase stationnaire, c'est-à-dire quand le courant délivré par cette pile est stable. Ces courbes permettent de connaître les puissances maximales délivrées par la pile (figure19).

Afin d'obtenir une courbe de densité de puissance, la première étape consiste à effectuer une courbe de polarisation qui permet de connaître la valeur du courant délivré par la PCM à une différence de potentiel (ddp) donnée. Afin d'obtenir une courbe de polarisation ($I = f(\text{ddp})$), nous avons utilisé un montage à deux électrodes (détaillé en chapitre II), avec l'anode comme électrode de travail et la cathode servant à la fois de contre-électrode et d'électrode de référence. A l'aide d'un potentiostat en mode chronoampérométrie, plusieurs différences de potentiel (ddp) entre l'anode et la cathode sont appliquées à la pile pendant un temps donné (pendant 400 s dans notre cas), et le courant délivré par la pile correspondant est relevé lorsqu'il atteint un palier : les mesures sont prises lorsque le courant est quasi-stationnaire.

Finalement, après l'obtention de la courbe de polarisation, la densité de puissance étant le produit des valeurs de différences de potentiel (ddp) et de la densité de courant, on obtient les courbes de densité de puissance ($P = f(\text{ddp})$, Équation 1).

$$P = \frac{U * I}{A} \quad \text{Équation 1}$$

Avec

P est la densité de puissance (W/m^2)

U est la tension (V)

I est l'intensité (A)

A est la surface de l'électrode (m^2)

La Figure 19 ci-dessous, présente un exemple de la densité de puissance d'une pile fonctionnant avec une anode de graphite non modifiée chimiquement. Le biofilm est développé depuis un mois. Cette étude montre une puissance maximale d'environ $300 \text{ mW}/\text{m}^2$ (valeur moyenne déterminée sur une dizaine de dispositifs inoculés dans les mêmes conditions:

300 mW/m² ± 10mW). Toutes les valeurs de densité de puissance rapportées dans ce chapitre sont normalisées par rapport à la surface projetée de l'anode (surface géométrique).

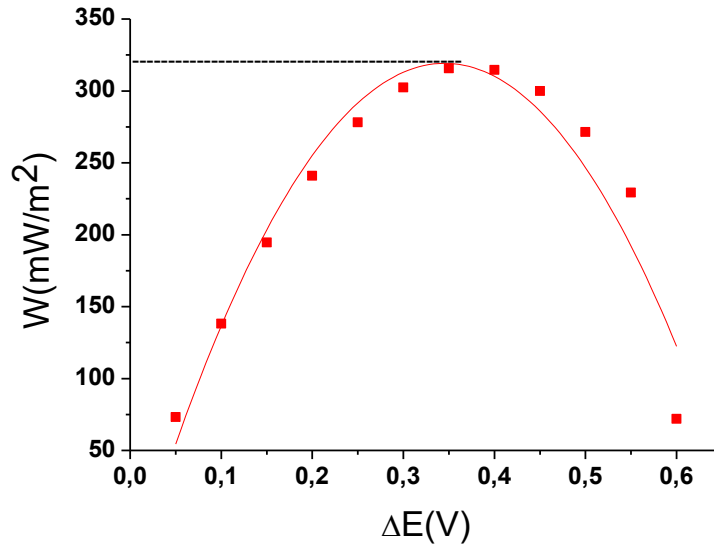


Figure 19: Courbes de densité de puissance effectuées sur la PCM contenant une anode de graphite non modifiée chimiquement et colonisée par un biofilm électroactif depuis un mois.

III.1.1 Electroactivité des molécules connectant le biofilm à l'anode

Pour examiner plus en détail l'électroactivité des molécules redox permettant d'assurer la connexion entre le biofilm et l'anode, la voltamétrie cyclique a été réalisée sur les anodes des PCMs à une faible vitesse de balayage (5 mV/s) lorsque le milieu est appauvri en acétate (lorsque le courant dans la PCM est faible), (Figure 20).

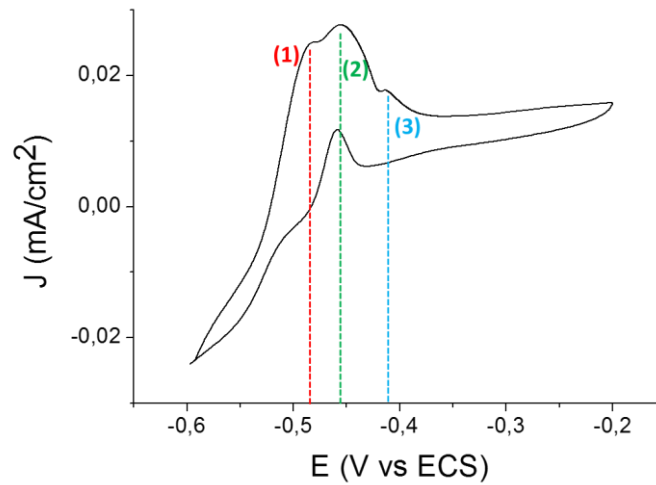


Figure 20 : Voltammogramme d'un biofilm jeune (10 jours) en absence d'acétate. Vitesse de balayage: 5 mV/s.

Le voltammogramme montre trois systèmes redox (pic (1) - $0,48 \pm 0,01$, (2) - $0,45 \pm 0,01$ et (3) - $0,40 \pm 0,01$ V vs ECS). La plupart des études montrent un ou deux pics dans la gamme de potentiel de - 0,49 V à - 0,40 V vs ECS. Par exemple, (Fricke et al., 2008) ont observé un pic électrocatalytiquement actif avec un potentiel formel de - 0,42 V vs ECS. (Katuri et al., 2010) ont rapporté deux pics d'oxydation à - 0,46 V vs ECS et - 0,43 V vs ECS, et (Marsili et al., 2008) ont observé des pics d'oxydation à - 0,40 V vs ECS et - 0,46 V vs ECS. Les potentiels de pics (2) et (3) sont comparables à ces pics signalés et leurs potentiels sont proches des potentiels rapportés pour des cytochrome membranaire de type *c* ; cytochrome OmcZ (- 0,46 V vs ECS) et le cytochrome OmcB (- 0,43 V vs ECS) purifié de *G. sulfurreducens* (Katuri et al., 2010) et (Inoue et al., 2010).

III.1.2 Influence de la concentration en acétate

Au cours des expériences effectuées pendant mes études sur les PCMs, nous avons utilisé de l'acétate en tant que substrat pour étudier l'efficacité de biofilms microbiens. Connaître la concentration d'acétate qu'il faut ajouter dans l'anolyte en tant que carburant, est un point clé dans la PCM. Pour cette raison, nous avons voulu étudier l'effet de différentes concentrations en acétate. Le courant maximal fourni par des biofilms développés sur une électrode de graphite, a été testé en fonction de la concentration de l'acétate ajoutée dans l'anolyte (~ 0 mM, 10 mM, 20 mM et 40 mM d'acétate de potassium).

Les différents voltammogrammes effectués sur l'électrode colonisée par un biofilm électroactif sont représentés sur la figure ci-dessous (Figure 21).

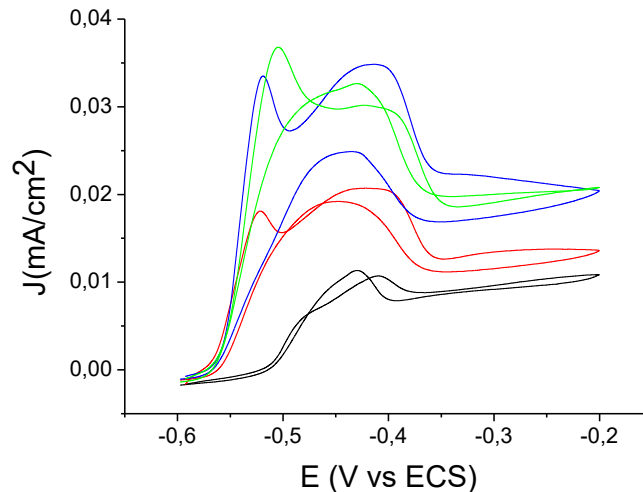


Figure 21 : voltammogrammes ($v = 5 \text{ mV/s}$) enregistrés sur une bioanode nue en présence d'acétate de potassium à différentes concentrations dans l'anolyte ($\sim 0 \text{ mM}$; courbe noire, 10 mM ; courbe rouge, 20 mM ; courbe bleue et 40 mM ; courbe verte).

Ici exemple d'un biofilm jeune (4 jours), développé sur une anode de graphite qui possède une surface d'environ 20 cm^2 .

Tout d'abord, nous observons que la forme des voltammogrammes est conservée dans les différents cas. Des courbes sigmoïdes avec des pics redox, ont déjà été décrites dans la littérature avec des biofilms multi-espèces formés à partir d'eaux usées domestiques alimentés avec de l'acétate de 1 à 10 mM (Liu et al., 2005b). La Figure 21 montre aussi que le courant catalytique de l'oxydation de l'acétate augmente en fonction de la quantité d'acétate ajoutée dans l'anolyte. Plus on ajoute de substrat oxydable par les bactéries électroactives, plus le courant délivré est important jusqu'à ce que la concentration de l'acétate devienne limitante à 20 mM . A ce stade, les microorganismes ne peuvent pas oxyder plus de substrat. A grande concentration, le métabolisme des bactéries électroactives n'est plus capable de fournir les espèces réduites à l'anode, ce qui crée une limite liée à la consommation du substrat (l'acétate). De plus, on observe que la pente liée à l'augmentation du courant par catalyse bactérienne de l'oxydation de l'acétate est plus importante que celle correspondante au premier ajout de l'acétate et que le potentiel d'oxydation de ce substrat est décalé vers des potentiels plus négatifs. Il passe de -0.5 V vs ECS avant l'ajout de l'acétate, à -0.57 V vs ECS . Ce résultat

indique une augmentation de la vitesse du transfert d'électrons entre les microorganismes électroactifs formant le biofilm et l'anode en présence de l'acétate. Par conséquent, la concentration du substrat dans l'anolyte peut influencer l'activité métabolique et donc les vitesses des réactions catalytiques à l'électrode.

Compte tenu de ces résultats, dans toutes les expériences effectuées pendant mes études sur les PCMs, nous avons utilisé de l'acétate en saturation à une concentration de 20 mM.

III.1.3 Influence de la maturité du biofilm électroactif

Dans cette partie, nous cherchons à comparer les performances électriques des biofilms matures par rapport aux biofilms jeunes. Les expériences ont été réalisées selon les conditions standards définies au chapitre II. L'analyse des voltammogrammes effectués sur des bioanodes de PCMs en présence d'acétate à 20 mM, substrat directement oxydable par les bactéries électroactives, montre que la densité de courant maximal délivré par un biofilm électroactif jeune (3 jours) est deux fois supérieure à celle délivrée par un biofilm mature (1 mois) (Figure 22).

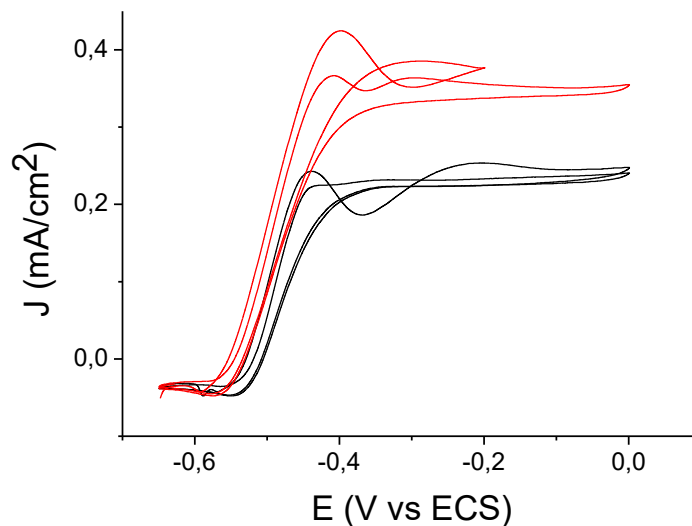


Figure 22 : Oxydation de l'acétate (20 mM) sur un biofilm mature (1 mois) (courbe noire) et un biofilm jeune (3 jours) (courbe rouge), étudiée par voltamétrie cyclique dans l'anolyte. Vitesse de balayage: $v=5$ mV/s.

Cette baisse de courant délivré a été attribuée à la fois à une augmentation de la résistance au transfert des électrons et à une baisse de la diffusion de substrat dans les biofilms. En effet,

dans des biofilms épais, seulement la partie supérieure du biofilm a accès à l'acétate ajouté dans l'anolyte. L'autre partie du biofilm, proche de l'anode n'a pas directement accès au substrat (l'acétate) et peut être composée de bactéries mortes et de matrice d'exopolymères. Cette matrice est capable de continuer à conduire le flux d'électrons générés dans la partie supérieure du biofilm jusqu'à l'électrode mais elles augmentent la résistance au transfert des électrons à l'anode (Kato Marcus et al., 2007). Des couches supplémentaires de microorganismes fermentaires et méthanogènes pas forcément conducteurs développés sur le biofilm électroactif peuvent aussi contribuer à diminuer les performances des biofilms, en limitant le transport de masse (pénétration de l'acétate dans le biofilm) et à la conductivité (transfert des électrons dans l'épaisseur du biofilm). Ce développement des bactéries non électroactives peut d'ailleurs être visible à l'œil nu sur les bioanodes. En effet, les biofilms jeunes sont de couleur rose orangée (Figure 23. A), typique de la présence de bactéries électroactives de type *Geobacter*. Lorsque des substrats fermentescibles sont fournis, la surface du biofilm prend une couleur marron-grise liée au développement d'autres espèces bactériennes (Figure 23. B). Selon (Malvankar et al., 2012), ces espèces bactériennes sont des bactéries probablement responsables de la fermentation des substrats en acides organiques utilisables par les bactéries électroactives. Sur les biofilms matures, le développement supplémentaire de bactéries entraîne des transports de masse et une conductivité très limités.

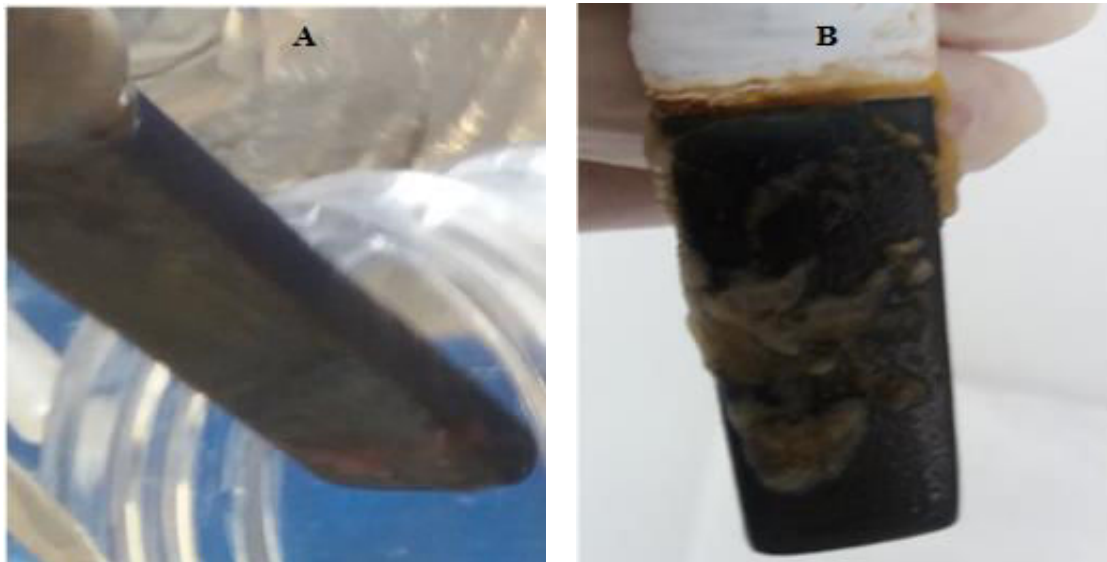


Figure 23 : photos des biofilms développés sur des anodes de graphite, (A) biofilm jeune (couleur rose orangée), (B) biofilm mature (couleur marron-grise).

De plus, le potentiel seuil de l'oxydation du substrat semble être décalé vers des potentiels plus positifs sur le biofilm mature. Il passe de -0.55 V vs ECS sur le biofilm jeune, à -0.5 V vs ECS (Figure 22). Ce décalage est une autre conséquence de la baisse de conductivité dans les biofilms épais et matures. Cette conductivité diminuée peut en effet augmenter les surtensions des réactions à l'anode d'après les mesures d'impédance réalisées par (Malvankar et al., 2012) sur des biofilms de différentes conductivités.

Plusieurs expériences ont été effectuées en parallèle afin d'assurer la reproductibilité et de confirmer ou non l'effet de la maturité des biofilms sur leur performance. Les résultats sont reproductibles, dans les biofilms matures les performances électriques sont limitées principalement par le transfert des électrons dans l'épaisseur du biofilm.

Un autre facteur important pour évaluer la performance d'une PCM et sa capacité à produire de l'électricité est la densité de puissance. La Figure 24 représente la densité de puissance des PCMs qui fonctionnent avec des biofilms mature et jeune. On peut constater clairement que, dans le cas d'un biofilm jeune, âgé de trois jours, la densité de puissance augmente progressivement pour atteindre une valeur de puissance maximale d'environ 300 mW/m², cette valeur correspond à une puissance plus de 10 fois supérieure à celle d'un biofilm mature, âgé d'un mois. Ainsi, la maturité du biofilm formé sur la surface anodique de la pile à combustible a une influence marquée sur la production de bioélectricité et la densité de puissance maximale délivrée. Cette baisse de performances est majoritairement attribuable à l'augmentation de la résistance interne dans le biofilm, dues au développement de bactéries non électroactives à l'anode, comme discuté dans le paragraphe précédent.

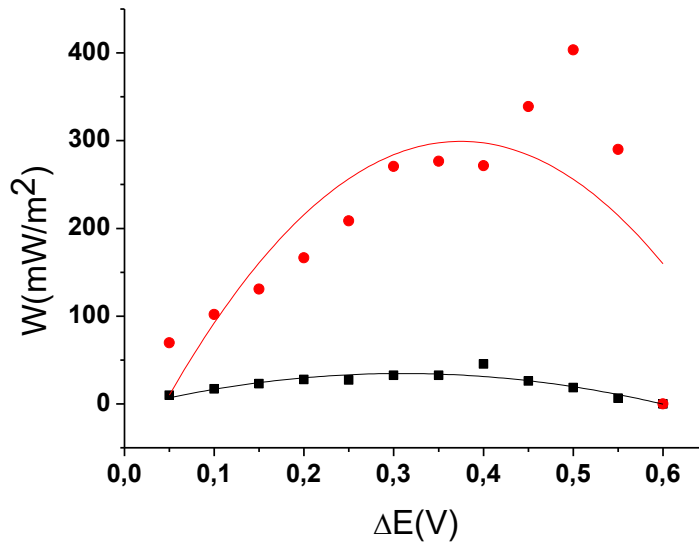


Figure 24 : Courbes de densité de puissance effectuées sur une PCM contenant une anode de graphite colonisée par un biofilm électroactif ; biofilm jeune (courbe rouge), biofilm mature (courbe noire).

III.2 Caractérisation de biofilm développé sur l'électrode : identification de la communauté microbienne

La performance des bioanodes dans un système bioélectrochimique dépend fortement des microorganismes constituant les biofilms développés sur l'anode. Le développement de biofilms efficaces et électroactifs est une clef permettant de générer des densités de courant élevées et des densités de puissance maximales. La présence d'une population microbienne électroactive et suffisante dans l'anolyte, mènera à une bioanode à haute performance (Ichihashi et al., 2014).

Dans ce contexte et dans le but d'identifier les genres bactériens présents dans le compartiment anodique de nos biopiles, une analyse métagénomique de la communauté microbienne a été effectuée sur des échantillons d'électrodes colonisées par des biofilms jeunes et matures, sur un échantillon de la membrane échangeuse des ions séparant les deux compartiments de la pile et aussi sur une boue d'eau usée avant et après son utilisation dans une PCM. Après extraction et amplification des ADNs codant pour l'ARN ribosomal 16S, la communauté microbienne sur l'électrode et dans l'anolyte a été identifiée en utilisant la technologie de séquençage. Le principe, ainsi que les différentes étapes de cette technologie ont été détaillés dans le chapitre II. L'ensemble de ces analyses a été réalisé par l'équipe de la

plateforme Génomique Environnementale et Humaine de l'université de Rennes 1 et j'ai réalisé le traitement des données.

Beaucoup de microorganismes possèdent la capacité de transférer les électrons dérivés du métabolisme des matières organiques vers l'anode. Dans le but d'identifier les communautés bactériennes présentes dans les piles à combustible microbiennes, six échantillons ont été analysés.

En général, dans le séquençage des gènes de l'ARNr 16S, certaines séquences de gènes sont à l'état d'ébauches très fragmentaires et incomplètes; d'autres donnent une vision beaucoup plus complète du génome. Cela reflète l'effort de séquençage. Ainsi pour évaluer si la méthode expérimentale ayant permis d'obtenir les séquences est suffisamment correcte pour obtenir une information proche de la réalité, on évalue l'effort de séquençage notamment via la courbe de raréfaction, présenté dans la Figure 25 ci-dessous. L'effort de séquence est suffisant pour l'ensemble des échantillons à l'exception de l'échantillon «Anode Mature». En effet cet échantillon ne présente pas assez de séquences, on peut observer que la courbe de raréfaction correspondant à l'échantillon «Anode Mature» ne montre pas totalement un plateau. Les séquences issues de cet échantillon seront donc retirées lors des traitements ultérieurs et remplacées par celles d'un autre échantillon appelé « replicat anode mature ». Pour les autres échantillons l'effort de séquençage est suffisant et donne une vision plus complète du génome permettant d'obtenir une information fiable sur les genres présent dans les PCMs.

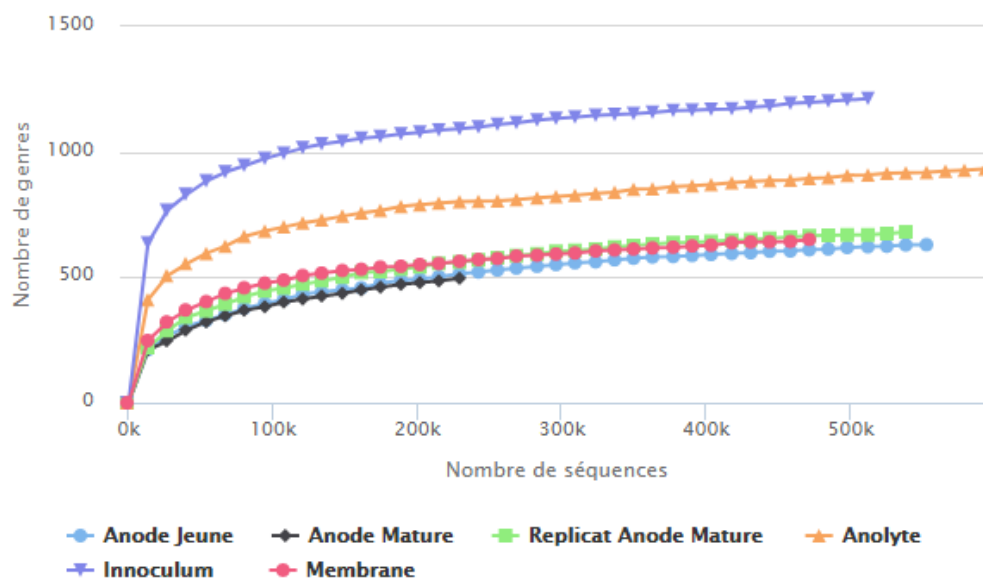


Figure 25 : Courbe de raréfaction du jeu de séquences obtenues.

Le dendrogramme ci-dessous (Figure 26) permet de séparer les échantillons en trois groupes bien distincts: l'inoculum, les anodes (matures et jeunes) et l'anolyte/la membrane. Cela indique que les genres composant chacun de ces trois groupes sont très divers et peuvent s'expliquer par les conditions appliquées sur les différents échantillons. L'inoculum (boue de station d'épuration) contient de nombreux types de métabolisme bactériens: aérobies, anaérobies hétérotrophes (qui doivent assimiler des substances organiques pour assurer leurs fonctions métaboliques et sont incapables de produire ces substances organiques à partir de matière minérale et autotrophes (capables de synthétiser de la matière organique à partir de matière minérale). Ces microorganismes utilisent des éléments minéraux simples comme l'oxygène, l'hydrogène, carbone (CO₂ par exemple), l'azote et divers sels minéraux pour assurer leurs fonctions métaboliques. Alors qu'en principe les échantillons anodiques contiennent une majorité de bactéries électroactives, hétérotrophes et anaérobies, l'anolyte et la membrane peuvent contenir des bactéries anaérobies et hétérotrophes mais aussi des autotrophes. Cependant, on s'attend à ce que les proportions de bactéries électroactives soient relativement faibles dans ces échantillons.

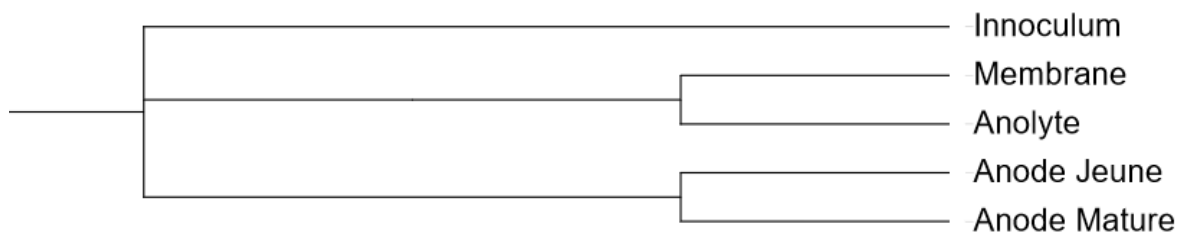


Figure 26 : Dendrogramme.

Les résultats du séquençage sont regroupés dans la Figure 27 ci-dessous. Les principaux embranchement bactériens observés dans l'ensemble des échantillons sont *Proteobacteria* (de 20 à 60%), *Bacteroidetes* (de 15 à 30%), *Firmicutes* (de 5 à 20%), *Deferribacteria* (de 1 à 40%) et grand pourcentage de bactéries non classifiées (Kim et al., 2006).

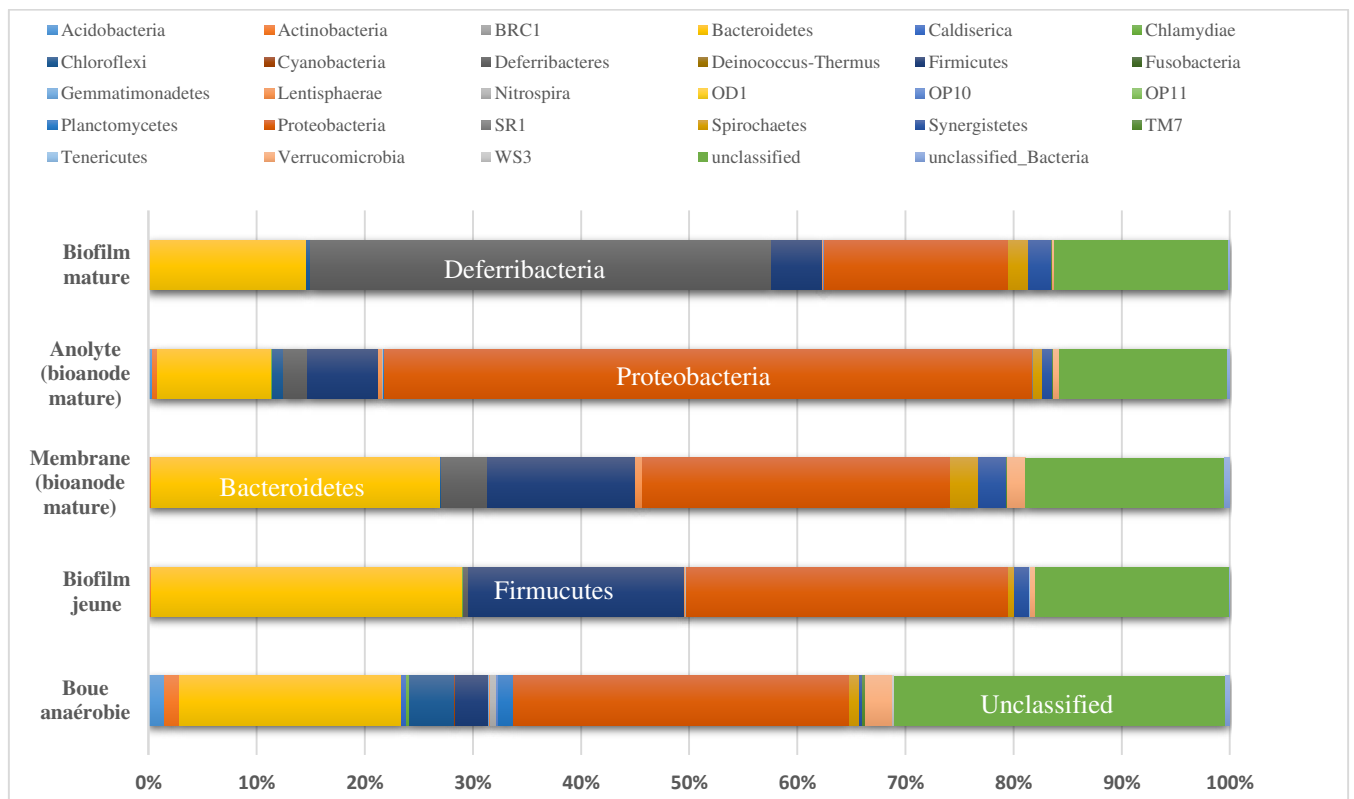


Figure 27 : Analyse des communautés de biofilm; diagrammes montrant l'abondance de la séquence en pourcentage selon la taxonomie au niveau d'embranchement des biofilms d'électrodes.

Tout d'abord, nous remarquons que les *Proteobacteria* à Gram négatif, est l'embranchement majoritaire dans le biofilm électroactif, il représente à lui seul plus de 30% de la totalité des espèces. Plusieurs membres de l'embranchement *Proteobacteria* ont été signalés comme des microbes électrochimiquement actifs dans les systèmes bioélectrochimiques (Ishii et al., 2012), (Ishii et al., 2013), (Ishii et al., 2014), (Cristiani et al., 2013). Selon la littérature, les biofilms sont souvent enrichis en bactéries connues pour réduire les oxydes de fer, et particulièrement des bactéries électroactives de la famille des *Geobacteraceae* appartenant au groupe *Proteobacteria* (Kiely et al., 2011) et (Pant et al., 2010). Une autre étude (Yates et al., 2012) a même montré que des biofilms anodiques développés à partir de différentes sources mixtes de bactéries s'enrichissent progressivement en bactéries de la famille *Geobacteraceae*, lorsque l'acétate est utilisé comme substrat.

Connaissant cela, nous avons voulu connaître la proportion de *Geobacteraceae* dans nos échantillons. Dans notre étude, le genre *Geobacter* est présent à différents pourcentage en fonction de l'échantillon. Dans le cas d'une boue anaérobie de l'eau usée de départ, on trouve

moins de 0,2 % de *Geobacter* par rapport à la totalité des espèces. Pour l'analyse de l'ADN d'un biofilm jeune par rapport à un autre mature, les résultats montrent que le biofilm jeune, est enrichi d'environ 13,5 % de *Geobacter*. En revanche, celui-ci ne représente plus que de 7 à 8% pour les biofilms matures (Tableau 2).

Echantillons	% en Proteobacteria	% en Geobacter / total
Boue anaérobie Beaurade	31,5	0,2
Anode jeune « anaérobie »	30	13,4
Anode mature « anaérobie »	36	8
Membrane échangeuse des ions (biopile mature)	28,5	0,39
Anolyte mature « anaérobie »	60	9
Anode mature « anaérobie »	17	7

Tableau 2 : Pourcentages des différentes bactéries identifiées lors des analyses effectuées sur nos échantillons.

Cette observation est en accord avec l'analyse des courbes de puissance et de courant catalytique de l'oxydation de l'acétate étudiées dans le paragraphe précédent. Dans les biofilms matures, les performances électriques sont limitées en majorité par la diminution de la quantité des espèces électroactives dans le biofilm et d'autres microorganismes pas forcément conducteurs se développent sur ces biofilms. En outre, le développement de bactéries dans l'ensemble de l'anolyte et notamment sur la membrane échangeuse d'ions séparant le compartiment anodique du compartiment cathodique, présente aussi l'une des principales limites du biofilm mature. L'analyse de l'ADN d'une membrane échangeuse d'ions utilisée dans la même biopile mature, montre la présence de différentes espèces développées sur cette membrane. Ce développement entraîne un colmatage des pores de la membrane, ce qui diminue le transport des ions entre les deux compartiments et augmente la résistance interne de la pile. Le développement bactérien sur la membrane est favorisé par la diffusion d'oxygène de la cathode vers l'anode à travers la membrane (Kim et al., 2006).

En conclusion, cette approche de l'analyse des communautés bactériennes existant dans le compartiment anodique des PCMs par séquençage nous a permis de confirmer que les *Geobacter* sont responsables au transfert électronique dans les PCMs et plus précisément dans les bioanodes. Nous avons aussi mis en évidence les limites des biofilms matures; diminution du pourcentage des *Geobacter* dans le biofilm mature, développement des bactéries sur la membrane échangeuse d'ions et aussi développement des autres espèces non électroactives, sur l'anode.

III.3 Effet de la modification de la surface sur la performance de la pile à combustible microbienne PCM

La première phase du travail de thèse présentée dans la première partie de ce chapitre consistait à modifier et caractériser des électrodes de carbone vitreux. La deuxième section de ce chapitre a pour objectif d'étudier la modulation des propriétés de surface d'une anode de graphite afin d'optimiser les performances de PCMs. Tout d'abord, et afin d'étudier l'effet de la pyridine greffée dans le développement du biofilm, plusieurs PCMs ont été fabriquées. Les PCMs avec des électrodes modifiées avec la pyridine comme anodes ont été étudiées et comparées aux PCMs de contrôle préparées avec des électrodes non modifiées utilisées en tant qu'anodes. Une deuxième série de contrôle de PCMs avec des électrodes non modifiées mais contenant 0,1 mM de pyridine ajoutée à l'anolyte, a également été testée. La performance de ces PCMs sera étudiée successivement, en termes de temps de développement des biofilms électroactifs, de puissances délivrées par les piles et de courant lié à la catalyse bactérienne de l'oxydation de l'acétate mesuré par voltamétrie cyclique à faible vitesse de balayage (5 mV/s). Dans cette étude, l'acétate a été utilisé comme combustible à l'anode et le ferricyanure de potassium comme accepteur d'électrons terminal à la cathode.

III.3.1 Développement de biofilm sur des électrodes modifiées

Afin de comprendre l'effet de la pyridine sur le développement des biofilms, les électrodes fonctionnalisées ont été intégrées en tant qu'anodes dans trois PCMs en même temps que d'autres PCMs de contrôles contenant des surfaces de graphite non modifiées. La croissance du biofilm a été surveillée par la mesure régulière de la différence de potentiel (ddp) aux bornes des biopiles au cours du temps. Une courbe représentative de la ddp en fonction du temps des anodes modifiées et non modifiées, est présentée en Figure 28.

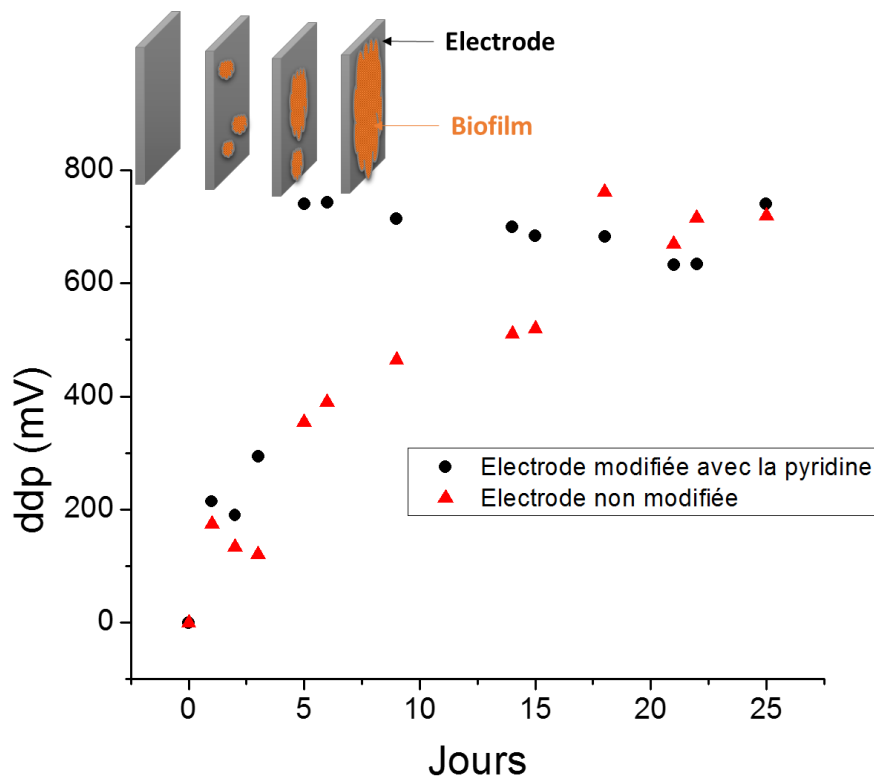


Figure 28 : Courbe de différence de potentiel en fonction du temps. Anodes modifiées avec la pyridine (ronds noirs) et anodes non modifiées (triangles rouges).

Dans cet exemple, on étudie le temps de développement, appelé aussi temps de latence qui correspond à la durée entre le moment où on ajoute le substrat (l'acétate) dans l'électrolyte de la pile, et le moment où on commence à observer la multiplication des bactéries électroactives en surface traduit par l'observation d'un courant catalytique de l'oxydation de l'acétate.

Pour les deux types de bioanodes étudiées, on observe les phénomènes classiques liés à la mise en place d'un biofilm électroactif. On observe un temps de latence de plusieurs jours, durant lesquels la différence de potentiel mesurée (ddp) entre l'anode et la cathode est faible et augmente très peu, puis on assiste à une augmentation exponentielle de ddp correspondant à la connexion et au développement en surface des bactéries électroactives; enfin le courant atteint un plateau, correspondant à la formation du biofilm électroactif efficace sur l'électrode. La Figure 28 montre un développement du biofilm plus ou moins rapide selon les électrodes. On observe que dans le cas d'une électrode modifiée avec la pyridine, le biofilm se développe plus vite que sur une électrode de graphite non modifiée. Après environ deux jours, l'anode modifiée possède une phase de croissance exponentielle de la valeur de ddp correspondant à la connexion

et au développement des bactéries électroactives sur cette surface. Lorsque la valeur de ddp devient stable, on a alors une phase stationnaire où on peut déterminer la valeur maximale de ddp correspondant à la formation du biofilm électroactif sur l'électrode.

En revanche, dans le cas de l'anode non modifiée, la valeur de ddp augmente lentement durant plus de 15 jours, avant d'atteindre un plateau correspondant à la formation de biofilm électroactif. En comparant alors les deux cas, on peut noter que le biofilm électroactif se développe plus vite sur l'électrode modifiée avec une couche fine et compacte de pyridine que sur une anode de graphite non modifiée.

Le temps (heures) moyen nécessaire à la formation du biofilm sur des électrodes modifiées et non modifiées, mesuré sur trois séries d'expériences est compilé dans le Tableau 3 suivant.

Temps mis pour le développement d'un biofilm électroactif

Anode en graphite non modifiée	168 ± 12 h
Anode modifiée avec pyridine	46 ± 6 h

Tableau 3 : Temps moyen mis pour le développement d'un biofilm électroactif sur des anodes modifiées et non modifiées.

III.3.2 Catalyse de la réaction d'oxydation de l'acétate par le biofilm anodique

Pour confirmer le développement du biofilm, les voltamétries cycliques ont été effectuées dans les conditions de saturation en acétate (20 mM d'acétate). Comme on peut l'observer sur la Figure 29, le voltammogramme montre les courbes bioélectrocatalytiques classiques présentant un courant catalytique maximum dû à l'oxydation de l'acétate au voisinage de -0,5 V vs ECS. En comparant les valeurs des courants catalytiques maximum de l'oxydation de l'acétate sur les deux types de biofilm, on mesure 0,10 et 0,025 mA/cm² dans le cas de l'anode de graphite modifiée avec une couche fine de la pyridine et l'anode de graphite nue, respectivement. Il est clair que la pyridine a un effet sur le développement et l'efficacité du biofilm. Lorsque le biofilm est cultivé sur une anode non modifiée, le courant catalytique de l'oxydation de l'acétate est trois fois plus faible que celui en présence de la pyridine greffée sur la surface de l'anode. De plus, on constate que la pente liée à l'augmentation du courant par catalyse bactérienne de l'oxydation de l'acétate est plus forte dans le cas des biofilms développés sur des électrodes modifiées avec une couche fine de la pyridine. La présence de la pyridine modifiant la surface est favorable pour le transfert des électrons entre les microorganismes électroactifs formant le biofilm et l'anode.

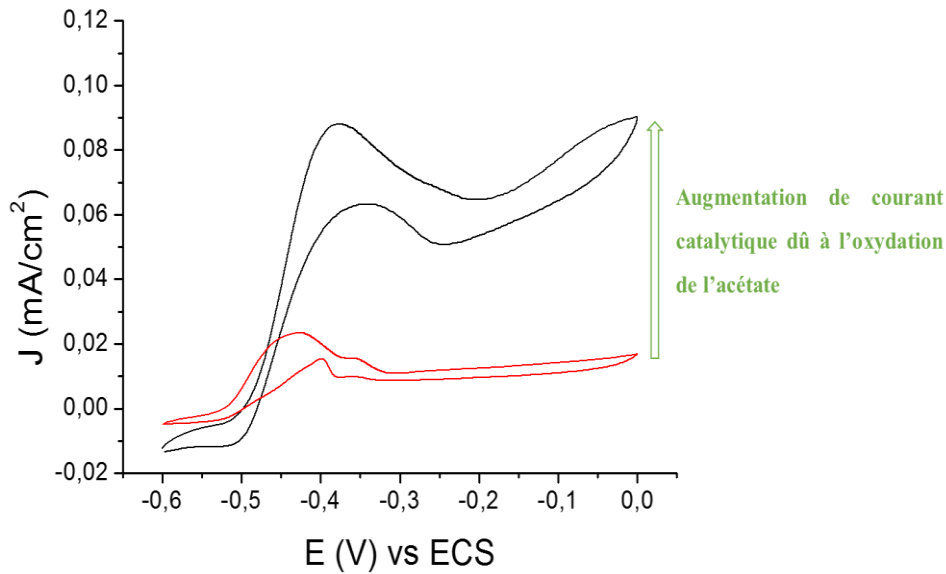


Figure 29 : Voltammogrammes cycliques présentant l'oxydation biocatalytique de l'acétate par le biofilm en présence d'une concentration non limitante d'acétate (20mM), sur une anode de graphite modifiée avec la pyridine (courbe noire) et sur une anode de graphite nue (courbe rouge). $v=5\text{mV/s}$.

Les courants catalytiques dus à l'oxydation des substrats que nous mesurons sur les bioanodes modifiées et nues dans notre étude sont présentés dans le Tableau 4 ci-dessous. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus précédemment par la mesure de potentiels des PCMs.

Densités de courant catalytique moyennes mesurées

Anode non modifié	$0.02 \pm 0.01 \text{ mA.cm}^{-2}$
Anode modifiée avec pyridine	$0.1 \pm 0.02 \text{ mA.cm}^{-2}$

Tableau 4 : Densités de courant catalytique moyennes dues à l'oxydation du substrat à l'anode, mesurées par voltamétrie cyclique à vitesse de balayage lente à 5 mV.s^{-1} . Les voltamétries cycliques sont réalisées en présence d'une concentration non limitante de substrat, soit 20mM. La valeur du courant catalytique est prise sur le plateau de courant observé sur les voltammogrammes, à 0 V vs ECS et ramenées à la surface projetée des anodes (ici, de l'ordre de 25 cm^2).

III.3.3 Efficacité Faradique

Si on raisonne uniquement sur l'oxydation du combustible (l'acétate), on peut caractériser les performances d'une pile à combustible microbienne en étudiant l'évolution de la quantité de substrat réellement utilisée par le biofilm pour la génération du courant. Ce rendement est appelé efficacité faradique et représente le rapport entre la quantité de charge potentiellement libérée par les composés oxydables fournis aux bactéries et la quantité de charge effectivement récupérée en électricité à travers le circuit externe. Afin de calculer l'efficacité faradique de PCMs, des mesures chronoampérométriques, en appliquant un potentiel correspondant à l'activité catalytique maximale ($E = -0.4V$ vs ECS), ont été enregistrées. Ainsi, on a ajouté 2 mM d'acétate au début de chaque expérience (au courant stable), et le courant délivré a été enregistré en fonction du temps à une température constante jusqu'à la consommation entière de substrat par les bactéries du réacteur. La Figure 30 présente les allures de chronoamperométries effectués sur une anode de graphite modifiée avec la pyridine et colonisée par un biofilm jeune (7 jours) et sur une autre anode de graphite non modifiée et colonisée par un biofilm de même âge.

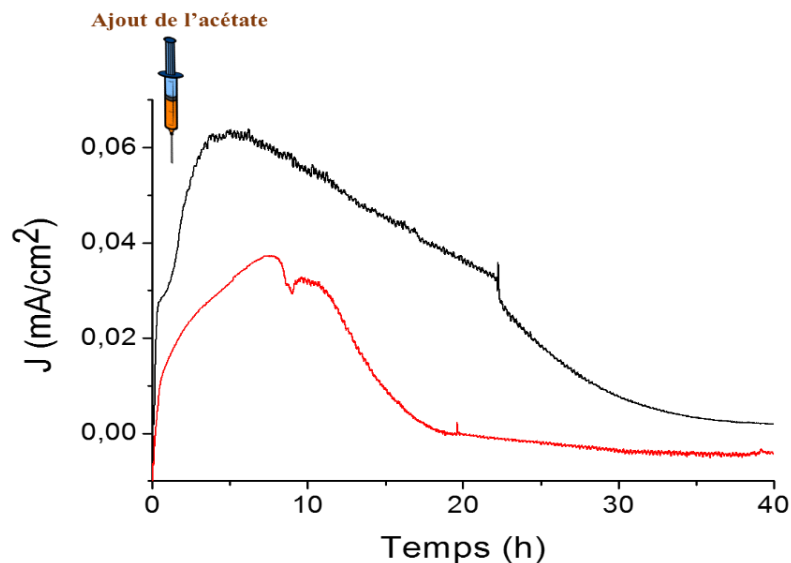


Figure 30 : Courbes chronoampérométriques de biofilms jeunes développés sur graphite modifié avec la pyridine (courbe noire) et de biofilms jeunes développés sur graphite nu (courbe rouge), enregistrées à un potentiel correspondant au courant maximum ($E = -0,4 V$ vs ECS) après injection de 2 mM d'acétate de potassium.

Les rendements faradiques de différentes PCMs utilisant les électrodes modifiées avec la pyridine et des électrodes non modifiées sont présentés dans le Tableau 5 ci-dessous. Ils sont en accord avec les observations effectuées à partir de voltamétrie cyclique. Les biofilms développés sur des électrodes modifiées sont plus efficaces que ceux développés sur des électrodes de graphite nues. L'efficacité maximale (40%) a été obtenue dans le cas de bioanodes jeunes modifiées avec la pyridine, alors que la bioanode non modifiée ne possède que 10% de rendement faradique.

Anodes	Efficacité Faradique %
Electrode modifiée	40 ± 3
Electrode non modifiée	10 ± 1

Tableau 5 : Rendements faradiques calculés pour les électrodes modifiées avec la pyridine et non modifiées utilisés dans cette étude. Les expériences ont été réalisées sur des piles dont les bioanodes sont jeunes (développement initial du biofilm lors de 2 batchs successifs d'acétate).

Après 3 à 4 semaines, le même biofilm développé sur une anode modifiée avec la pyridine montre une diminution de l'efficacité jusqu'à 10% (Tableau 6). Le courant de l'oxydation de l'acétate est plus faible que celui en présence d'un biofilm jeune (Figure 31) montrant que la catalyse de l'oxydation de l'acétate est beaucoup moins efficace. Comme discuté précédemment, les biofilms matures contiennent des couches supplémentaires de microorganismes fermentaires et méthanogènes, ce qui augmente les limites liées au transport de masse (pénétration de l'acétate dans le biofilm) et à la conductivité (transfert des électrons dans l'épaisseur du biofilm).

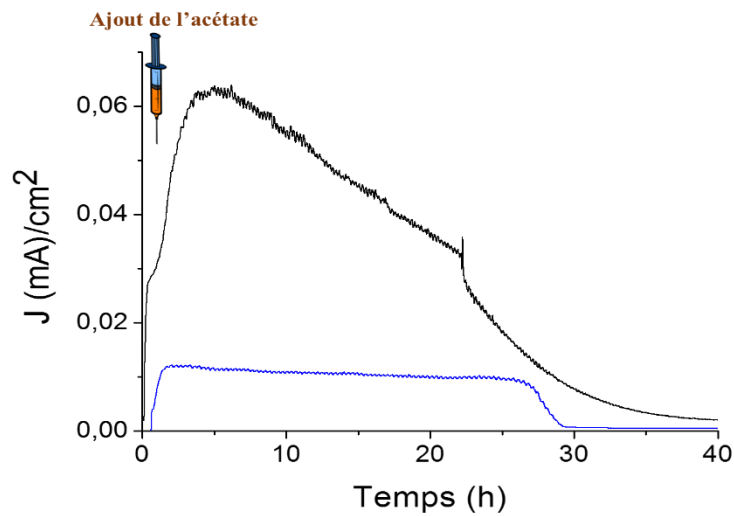


Figure 31 : Courbes chronoampérométriques de biofilms jeunes (7 jours) développés sur graphite modifié avec la pyridine (courbe noire) et du même biofilm après un mois de développement (courbe bleue), enregistrées à un potentiel correspondant au courant maximum ($E = -0,4 \text{ V vs ECS}$) après injection de 2 mM d'acétate de potassium.

Anode	Efficacité Faradique %
Biofilm jeune	40 ± 2
Biofilm mature	9 ± 1

Tableau 6 : Rendements faradiques calculés pour les électrodes modifiées avec la pyridine. Les expériences ont été réalisées sur des piles dont les bioanodes sont à différentes phases (jeune et mature), (développement initial du biofilm lors de 2 batchs successifs d'acétate).

Que ce soit en courant ou en rendement faradique, les bioanodes fonctionnalisées avec la pyridine en surface sont plus efficaces que celles non modifiées. Cette différence de performance est attribuée à une augmentation de la connexion dans le cas de la présence de la pyridine greffée en couche fine et compacte à la surface de l'anode sans ralentir de façon excessive les cinétiques de transfert d'électrons entre les bactéries et l'électrode. Ce film de pyridine greffé à la surface de l'anode qui peut être protonée au pH de l'anolyte ($\text{pH} = 7$), joue un « rôle attracteur » pour les bactéries formant le biofilm. Comme montré précédemment, les biofilms sont formés de procaryotes et en particulier de *Geobacter* qui sont des bactéries à coloration de Gram négatif dont la membrane externe contient des lipopolysaccharides chargés

négativement. Cela conduit à une attraction électrostatique entre l'électrode modifiée avec la pyridine, chargée positivement à pH = 7, et ces microorganismes.

III.3.4 Densité de puissance

Pour évaluer la performance d'une PCM contenant une anode modifiée avec la pyridine et sa capacité à produire de l'électricité, la densité de puissance est comparée avec une anode non modifiée dans la Figure 32 ci-dessous.

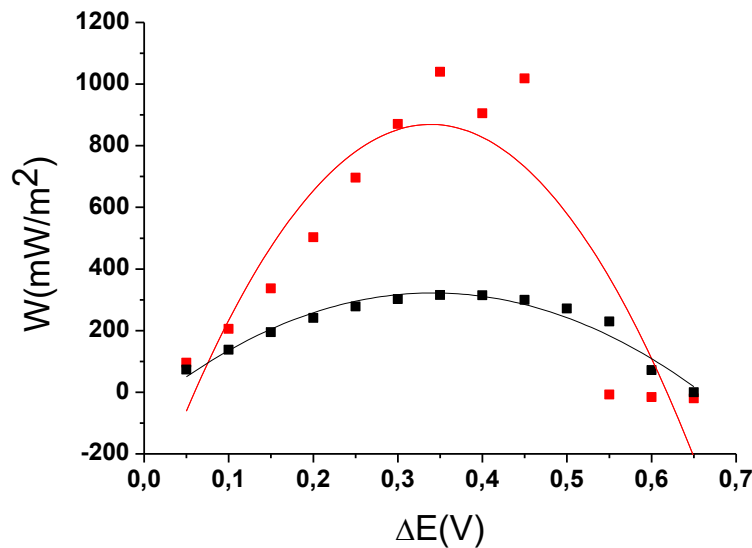


Figure 32 : Courbes de densité de puissance effectuées sur des PCMs contenant des anodes de graphite colonisées par des biofilms électroactifs jeunes (3 jours) ; Electrode modifiée avec la pyridine (courbe rouge), électrode non modifiée (courbe noire).

Six PCMs ont été fabriquées dans les mêmes conditions (Température de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, acétate à 20 mM, sans lumière et sans oxygène). Après le développement de biofilms, on établit les courbes de densité de puissance. La pile fonctionnant avec une bioanode modifiée possède une puissance d'environ cinq fois plus élevée que celle dans le cas d'une PCM contenant une bioanode non modifiée.

III.3.5 Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)

L'analyse de différentes bioanodes par microscopie électronique à balayage (MEB) a été réalisée. Les images MEB d'électrodes de graphite nues avant et après colonisation et d'électrode de graphite modifiées montrent que les biofilms (jusqu'à environ $10 \mu\text{m}$ d'épaisseur) se développent sur toutes les électrodes. Cependant, la colonisation bactérienne semble

relativement différente à la surface non modifiée par rapport à la surface modifiée par la réduction de la 4-aminopyridine diazonium. Ceci a été noté lors de la sélection de bactéries électroactives développées sur l'électrode de graphite modifiée par le greffage électrochimique de la pyridine à la surface (Figure 33). Les bactéries développées sur une anode modifiée avec une couche fine de la pyridine ont un aspect légèrement différent de celles adhérentes sur une anode de graphite non modifiée.

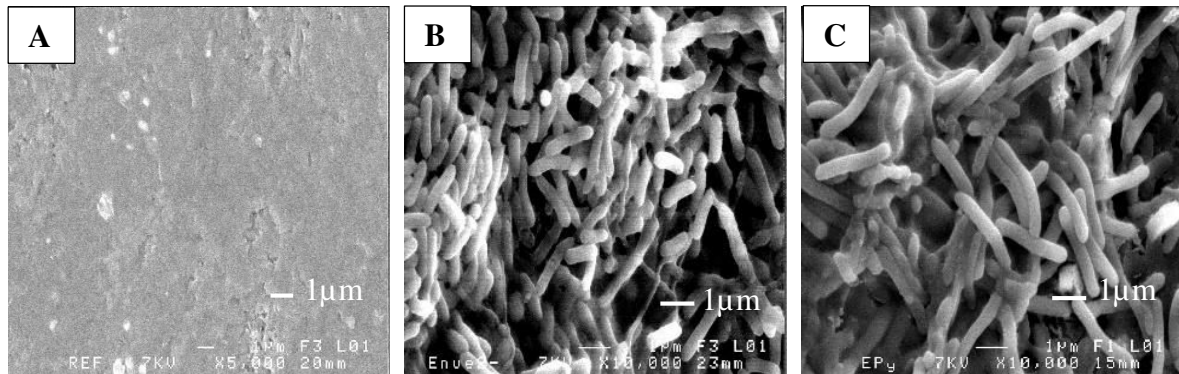


Figure 33: Image par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) d'une électrode de graphite nue (A), d'une anode de graphite non modifiée colonisée par un biofilm électroactif (B) et d'une anodes de graphite modifiée avec la pyridine et colonisée par un biofilm (C).

III.3.6 Comparaison de la performance d'une PCM fonctionnant avec une anode modifiée avec la pyridine et d'une PCM contenant une anode modifiée avec multicouches de type polyphénylène généré *in situ* à partir de l'aniline (phénylamine)

Nous avons comparé les performances de PCMs contenant des anodes en graphite modifiées avec la pyridine à celles de PCMs fonctionnant avec des anodes modifiées avec multicouches de type polyphénylène générées *in situ* à partir de l'aniline. Tout d'abord, des électrodes de graphite ont été modifiées avec la pyridine et le polyphénylène avec la même quantité de charge de modification ($Q = 2\text{mC}$). Après cette modification, des PCMs ont été fabriquées avec ces électrodes modifiées en tant qu'anodes. La Figure 34 montre que les PCMs qui utilisent des anodes modifiées avec une couche fine de la pyridine, d'épaisseur inférieure à 1 nm (0.9 ± 0.2 nm), sont plus efficaces que celles fonctionnant avec des anodes modifiées avec des multicouches de type polyphénylène. Cette amélioration peut être attribuée à la formation d'un film fin et compact, homogène qui ne bloque pas complètement le transfert électronique à la surface de l'électrode, dans le cas de pyridine par rapport au multicouches polyphénylènes formées dans le cas de l'aniline, comme mis en évidence au début de ce chapitre.

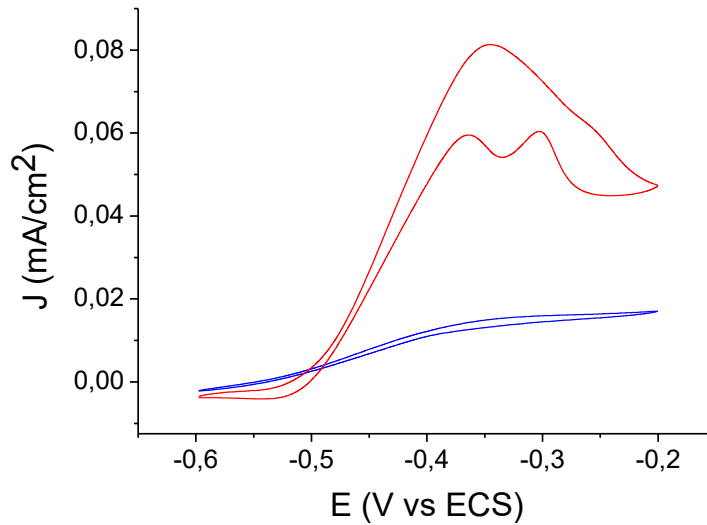


Figure 34: Voltammogrammes cycliques présentant l'oxydation biocatalytique de l'acétate par le biofilms en présence d'une concentration non limitante d'acétate (20mM), sur une anode de graphite modifiée avec la pyridine (courbe rouge) et sur une anode de graphite modifiée avec le phényle (courbe bleue). $v=5\text{mV/s}$.

III.4 Discussion sur l'effet de la modification de surface sur la performance des biopiles

Des améliorations "temporaires" de la capacité catalytique ont été observées lors de l'utilisation d'électrodes de graphite modifiées par la pyridine comme anodes pour les PCMs. Une première explication pourrait être que la pyridine se coordonne au centre métallique de l'hème du cytochrome de type-c de la membrane externe de bactéries formant le biofilm, de sorte que lorsque la pyridine est greffée sur l'électrode, elle améliore le transfert d'électrons entre la bactérie et l'anode. Pour cette raison, les PCMs préparées avec ces électrodes présentent une performance plus importante par rapport à une PCM fonctionnant avec une anode non modifiée, soit en terme de courant catalytique ou de densité de puissance, pendant les premières semaines. Un autre facteur pouvant expliquer cet effet bénéfique est le fait que la pyridine, en milieu tampon, est partiellement protonée à la surface de l'électrode ce qui amène à une attraction électrostatique entre les bactéries qui sont en général à Gram positif ou négatif, mais globalement chargées négativement, et cette électrode modifiée. Une fois que le biofilm se développe, l'effet de surface devient moins remarquable car d'autres facteurs contribuent à l'efficacité de la PCM, comme le transfert d'électrons entre les bactéries ou la diffusion d'acétate

à l'intérieur du biofilm, des paramètres pouvant servir d'étape limitante du processus. En effet, les observations effectuées sur les biofilms cultivés sur des électrodes modifiées avec la pyridine et de graphite nu montrent des résultats similaires après quelques semaines.

III.5 Caractérisation de cytochrome-c sur des électrodes de carbone vitreux

Pour tester plus précisément l'hypothèse concernant la coordination entre la pyridine greffée sur la surface et le cytochrome de type *c* de la membrane externe de bactéries électroactives de biofilm, des expériences complémentaires ont été effectuées. Tout d'abord, l'électro-activité du cytochrome-*c* a été étudiée sur des électrodes de carbone vitreux nues par voltamétrie cyclique. 150 μM de cytochrome-*c* sont alors dissous dans une solution de tampon phosphate ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) à 0.1M, à pH=7 et sous argon. L'électroactivité de cytochrome-*c* est étudiée sur des électrodes de carbone vitreux nues et modifiées par la pyridine (Figure 35).

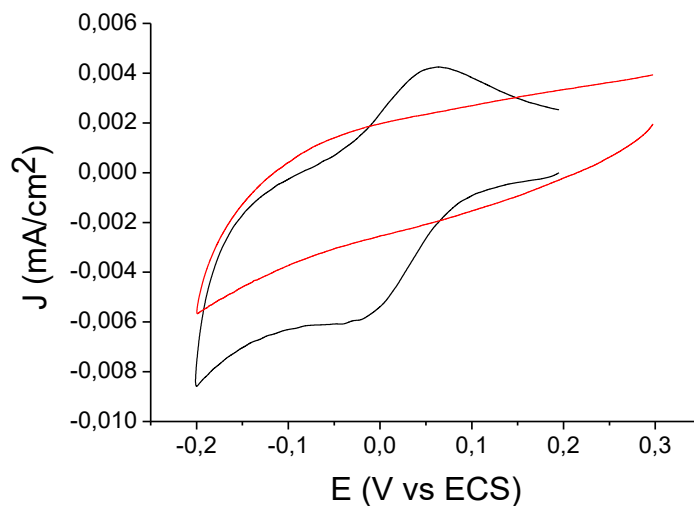


Figure 35 : Voltammogrammes de cytochrome-c ; 150 μM dans une solution aqueuse de tampon phosphate à 0.1M, à pH=7 et sous argon, enregistrés à 20 mV/s, sur des électrodes de carbone vitreux non modifiées (courbe noire) et modifiées avec la pyridine (courbe rouge).

La voltamétrie cyclique de cytochrome-*c* sur une électrode de carbone vitreux non modifiée montre un système redox au voisinage de 0.05 V vs ECS. Tout d'abord il faut noter que c'est intéressant de détecter l'électroactivité de cytochrome-*c* sur l'électrode de carbone vitreux nue, car plusieurs études ont montré qu'il est difficile d'observer le système redox du cytochrome-*c*. Tout dépend de l'état de la surface et du traitement de l'électrode de carbone vitreux (polissage de surface, nettoyage, traitement et usure de l'électrode). Après modification

de l'électrode, nous observons une disparition du système redox et on ne détecte que du courant capacitif, qui peut masquer le système redox.

À ce stade, il est difficile de vraiment conclure sur un possible effet de coordination de la pyridine comme ligand axial de l'ion fer au centre de la porphyrine constituant l'hème du cytochrome *c*. Des travaux de Davis H. Waldeck portant sur des SAMs de thiols sur or ont montré que l'unité pyridine doit être suffisamment éloignée de la surface pour permettre une fixation du cytochrome *c* (Davis et al., 2008), et donc l'observation du signal redox de cette protéine. Il est probable que dans notre cas, l'unité pyridine soit bien trop proche de la surface pour permettre une interaction efficace.

Comme expériences de contrôle, une série de PCM avec des électrodes de graphite non modifiées mais avec 0,1 mM de pyridine présente en solution dans l'anolyte ont également été réalisées. Dans ce cas, le biofilm s'est développé après deux jours de la fabrication de la PCM. Les propriétés catalytiques sont similaires à celles observées avec les anodes modifiées avec la pyridine greffée à la surface, avec une densité de courant catalytique maximale égale à 0,09 mA/cm² (Figure 36). Ces observations indiquent clairement que la pyridine a un effet bénéfique sur le développement du biofilm et l'efficacité catalytique.

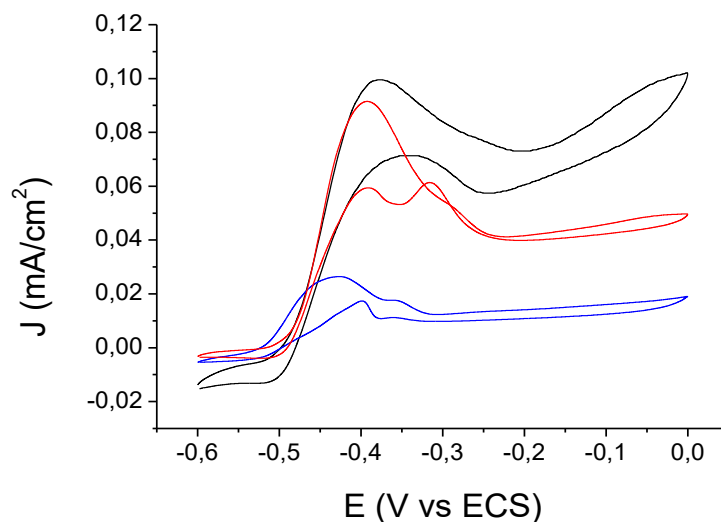


Figure 36 : Voltammogrammes cycliques présentant l'oxydation biocatalytique de l'acétate par les biofilms âgés d'une semaine, en présence d'une concentration non limitante d'acétate (20 mM), dans le cas d'une PCM contenant une anode de graphite non modifiée et colonisée par un biofilm (courbe bleue), une PCM contenant une anode de graphite non modifiée et colonisée par un biofilm en présence de 0,1 mM de la pyridine dans l'anolyte (courbe rouge) et une pile contenant une électrode de graphite modifiée avec la pyridine et colonisée par un biofilm (courbe noire). $v=5mV/s$.

Cependant, lorsque la pyridine est présente dans l'électrolyte comme espèce librement diffusante, le signal catalytique diminue rapidement à $0,015 \text{ mA/cm}^2$ après le développement du biofilm (après une semaine), (Figure 37). En revanche, les PCMs impliquant la pyridine greffée sur l'anode continuent à produire des densités de courant plus élevées pendant plusieurs semaines.

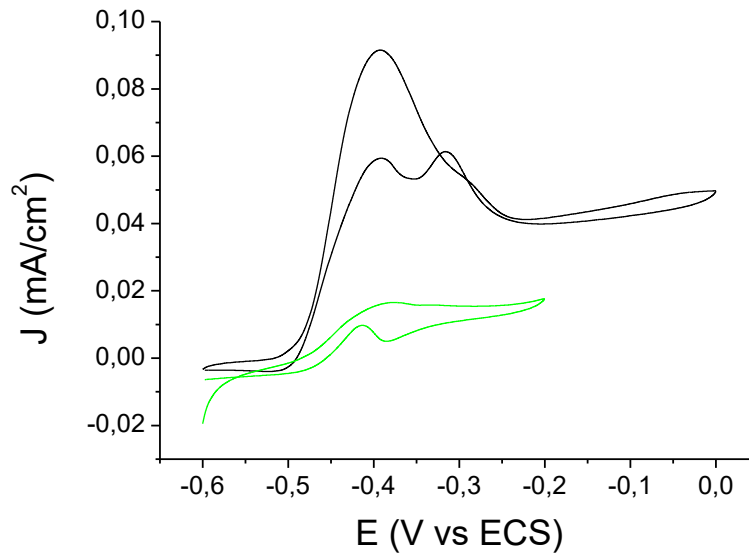


Figure 37 : Voltammogrammes cycliques présentant l'oxydation biocatalytique de l'acétate par les biofilms âgés d'une semaine en présence d'une concentration non limitante d'acétate (20 mM), dans le cas d'une PCM contenant une anode de graphite non modifiée et colonisée par un biofilm, en présence de 0,1 mM de la pyridine dans l'anolyte (courbe noire) et après une semaine de développement de biofilm (courbe verte). $v=5 \text{ mV/s}$.

Le Tableau 7 ci-dessous, montre qu'après deux semaines de l'ajout de 0.1 mM de pyridine en solution, l'efficacité faradique est de trois fois moins importante par rapport à une biopile fonctionnant avec une électrode nue et sans pyridine dans l'anolyte.

Biofilm	Efficacité faradique (%)
Biofilm jeune	10
Biofilm jeune + 0.1 mM de pyridine en solution	3

Tableau 7 : Rendements faradiques calculés pour les biopiles en présence et en absence de la pyridine dans l'anolyte. Les expériences ont été réalisées sur des piles dont les bioanodes sont jeunes (développement initial du biofilm lors de 2 batchs successifs d'acétate).

En conclusion, il est en réalité difficile d'attribuer l'augmentation des performances des bioanodes à une coordination entre le cytochrome-*c* et la pyridine greffée en surface. Il est clair toutefois que la pyridine favorise le développement du biofilm. L'hypothèse d'un effet de coordination ne peut pas être totalement écartée car la conformation des cytochromes membranaires peut être différente de celle de cytochrome *c*, permettant une interaction facilitée. Toutefois d'autres paramètres tels que des interactions électrostatiques entre les bactéries à Gram négatif et la pyridine protonée ou encore l'hydrophilicité de la surface modifiée résultante peuvent être mis en avant.

III.6 Conclusions sur la partie B

Les résultats présentent une amélioration électrocatalytique dans les piles à combustible microbiennes lorsque la pyridine est greffée sur l'électrode de graphite utilisée en tant qu'anode. Le biofilm développé sur les électrodes modifiées avec la pyridine présente à la fois un courant plus élevé et une efficacité d'oxydation d'acétate supérieure à celui développé sur des électrodes de graphite non modifiée. Les piles à combustible microbiennes contenant de la pyridine dans l'anolyte ont montré un développement plus rapide du biofilm, mais l'efficacité faradique est plus faible après seulement deux jours de développement. Des images MEB ont montré une différence d'aspect entre des bactéries adhérentes à la surface de l'électrode modifiée et les bactéries développées sur l'électrode de graphite nue. Les différences de puissances obtenues sont liées probablement à des interactions électrostatiques entre les surfaces modifiées et le biofilm anodique. En effet, comme détaillé dans le chapitre introductif, la surface des bactéries, qu'elles soient à Gram positif ou négatif, est globalement chargée négativement. On aurait donc un effet d'attraction électrostatique pour le groupement partiellement chargé positivement à pH7 (modification à partir de 4-aminopyridine diazonium) favorisant le transfert électronique biofilm/surface. Il semble aussi que la pyridine greffée à la surface de l'électrode modifie la structure de la surface de l'anode et influence l'adhésion et la connexion entre les bactéries et l'anode de la pile à combustible microbienne. L'étude effectuée sur l'effet de l'aniline greffé en multicouche sur l'électrode de graphite, a montré que les PCMs qui utilisent des anodes modifiées avec une couche fine de la pyridine, homogène qui ne bloque pas complètement le transfert électronique, sont plus efficaces que celles fonctionnant avec des anodes modifiées avec des multicouches de type polyphénylène généré *in situ* à partir de l'aniline.

III.7 Conclusions du chapitre III

En conclusion de ce chapitre, nous avons montré dans un premier temps, que la méthode de réduction chimique de sels d'aryle diazonium permet de greffer de façon covalente la 2-amino-, la 3-amino- et la 4-aminopyridinium sur des surfaces d'électrodes. Plus particulièrement, la 4-aminopyridine se greffe en couche fine et compacte sans ralentir de façon excessive les cinétiques de transfert d'électrons entre une sonde électrochimique, le ferricyanure de potassium, et l'électrode. Ces couches sont donc, particulièrement intéressantes pour moduler l'interface entre les biofilms microbiens électroactifs et l'électrode car on peut obtenir des films minces et homogènes, de façon reproductible qui ne bloquent pas complètement le transfert électronique et qui rendent la surface hydrophile favorisant l'adhésion microbienne. Cette procédure a alors été appliquée pour modifier des plaques de graphite de plusieurs dizaines de cm², introduites dans des PCMs en tant que bioanodes microbiennes. Dans ce cas, et lorsque la pyridine est greffée sur l'électrode de graphite, les résultats présentent une amélioration électrocatalytique dans les piles à combustible microbiennes. Le biofilm développé sur les électrodes modifiées avec la pyridine présente à la fois un courant plus élevé et une efficacité d'oxydation d'acétate supérieure à celui développé sur des électrodes de graphite non modifiée. Les piles à combustible microbiennes contenant de la pyridine dans l'anolyte ont montré un développement plus rapide du biofilm, mais l'efficacité faradique est plus faible après seulement deux jours de développement. Des images MEB ont montré une différence d'aspect entre de bactéries adhérees à la surface de l'électrode modifiée et les bactéries développées sur l'électrode de graphite nue. Les différences de puissances obtenues sont liées probablement à des interactions électrostatiques entre les surfaces modifiées et le biofilm anodique. En effet, comme détaillé dans le chapitre introductif, la surface des bactéries, qu'elles soient à Gram positif ou négatif, est globalement chargée négativement. On aurait donc un effet d'attraction électrostatique pour le groupement partiellement chargé positivement à pH7 (modification à partir de 4-aminopyridine diazonium) favorisant le transfert électronique biofilm/surface.. L'étude effectuée sur l'effet de l'aniline greffé en multicouche sur l'électrode de graphite, a montré que les PCMs qui utilisent des anodes modifiées avec une couche fine de la pyridine, homogène qui ne bloque pas complètement le transfert électronique, sont plus efficaces que celles fonctionnant avec des anodes modifiées avec des multicouches de type polyphénylène généré *in situ* à partir de l'aniline.

Liste des figures

- Figure 1 : Structures de quelques médiateurs redox immobilisés sur des bioanodes. ... 104
- Figure 2 : Structures des molécules utilisées pour fonctionnaliser des bioanodes..... 109
- Figure 3 : Modification de surface par réduction de sel de diazonium ; (I) Diazotation du dérivé d'aniline, (II) Électroréduction du cation diazonium,(III) Formation de liaison covalente à la surface de l'électrode et (IV) Formation de multicouches de type polyphénylène ; Voltammétrie cyclique typique de la réduction d'un cation aryle diazonium ($N_2^+(C_6H_4)NO_2$), (Baranton and Bélanger, 2008). 115
- Figure 4 ; (A): Exemple d'une image AFM en mode contact d'une monocouche de terphényle formée à la surface de PPF (500 / 500 nm). (B): Le profil de profondeur correspondant pour mesurer l'épaisseur de la couche déposée (Anariba et al., 2003). ... 117
- Figure 5 : Exemple du voltammogrammes présentant la réponse d'une sonde redox sur des électrodes de carbone vitreux avant et après modification. La figure est adaptée de (Liu et al., 2005a). 118
- Figure 6 : Structures de trois dérivés aminopyridine. 119
- Figure 7 : Spectres d'absorption UV-visible dans HCl à 0,5 M de $2 \cdot 10^{-5}$ M (A) 2-aminopyridine (ligne solide noire), (B) 3-aminopyridine (courbe noire) (C) 4-aminopyridine (courbe noire). Après addition de 2 équivalents de $NaNO_2$, les spectres ont été enregistrés à différents temps ; (A) après 10 min (courbe rouge), 60 min (courbe verte), 300 min (courbe bleue) et 1440 min (courbe cyan). (B) après 1 min (courbe rouge), 5 min (courbe verte), 10 min (courbe bleue), 30 min (courbe cyan) et 60 min (courbe magenta). (C) après 10 min (courbe rouge), 60 min (courbe verte), 300 min (courbe bleue) et 1440 min (courbe cyan). Les spectres d'absorption des composés hydroxypyridinium correspondants sont également présentés (lignes pointillées). 121
- Figure 8 : Voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode de carbone vitreux lors du greffage du sel de diazopyridinium généré in situ à partir de 4-aminopyridine (20 mM) par ajout de $NaNO_2$ (40 mM) dans HCl à 0,5 M. (A) voltammogrammes enregistrés pour une modification en 3 cycles en balayant le potentiel entre 0,4 V et -0,3 V vs ECS. (B) voltammogrammes enregistrés pour une modification en 10 cycles en balayant le potentiel entre 0,6 V et -0,8 V vs ECS. La vitesse de balayage est de $0,05 \text{ V s}^{-1}$ 123

- Figure 9: Modification de surface par réduction de sel de diazonium ; (I) Diazotation de l'aminopyridinium, (II) Électroréduction du cation diazonium, (III) Formation de liaison covalente à la surface de l'électrode. 123
- Figure 10 : Spectres de photoélectron N 1s à haute résolution pour des électrodes d'or modifiées par électrogreffage de cations de diazopyridinium produits in situ dans HCl à 0,5 M, 30 s après l'addition de NaNO₂ à partir de (A) 2-aminopyridine, (B) 3-aminopyridine et (C) 4-aminopyridine..... 125
- Figure 11 : Image AFM du scratching d'une surface de PPF couverte d'une couche de 4-aminopyridine et profil de trou formé (une rayure de 500 à 500 nm en mode contact). 127
- Figure 12 : Voltammogrammes cycliques de 1 mM de K₃[Fe(CN)₆] dans une solution aqueuse 0,1 M KCl à pH = 7,5 (colonne gauche) et à pH = 9 (colonne droite) pour les électrodes de carbone vitreux (courbes noires) et pour électrodes de carbone modifiées (courbes rouges). Les électrodes modifiées ont été préparées à partir de la 2-aminopyridine (A, D), 3-aminopyridine (B, E) et 4-aminopyridine (C, F)..... 129
- Figure 13 : Images AFM d'une électrode de PPF (surface de 3 X 3 μm²) : PPF nu (à gauche) et PPF modifié à partir de 4-aminopyridine (à droite)..... 131
- Figure 14 : Voltammogrammes de l'oxydoréduction du ferricyanure de potassium (1 mM de [Fe(CN)₆]³⁻ dans une solution aqueuse de KCl à 0,1 M) à pH = 9 sur électrode de carbone vitreux (diamètre 3mm), modifiée par réduction chimique de la 4-aminopyridine avec Q = 4 mC (courbe noire) et Q = 10 mC (courbe rouge), v = 50 V s⁻¹. 132
- Figure 15 : Dépendance de l'écart entre les pics d'oxydoréduction (ΔE_p) de la quantité de charge passée pendant la modification (Q). 133
- Figure 16 : Réduction (vitesse de balayage de 0,05 V s⁻¹) du ferricyanure de potassium (1 mM de [Fe(CN)₆]³⁻ dans une solution aqueuse de KCl à 0,1 M) sur des électrodes modifiées à pH = 9: électrode modifiée avec la pyridine (courbe rouge) et électrode modifiée avec le phényle (courbe bleue) par la réduction de 4-aminopyridine diazonium et phényldiazonium, respectivement. Les deux électrodes sont comparées à une électrode non modifiée (courbe noire). 134
- Figure 17 : Dépendance de l'écart entre les pics d'oxydoréduction (ΔE_p) de la quantité de charge passée pendant la modification (Q) en utilisant deux modifiants différents ; dans le cas de la pyridine (courbe noire) et dans le cas de phényle (courbe rouge)..... 135

Figure 18 : Exemple de voltammogrammes ($v = 5 \text{ mV/s}$) enregistrés sur une bioanode (non préalablement modifiée chimiquement) en présence du substrat (acétate de potassium, 20 mM) (courbe rouge) ou en absence de substrat (courbe noire) dans l'anolyte. Ici exemple d'un biofilm âgé de deux semaines développé sur une anode de graphite qui possède une surface d'environ 9 cm^2 139

Figure 19: Courbes de densité de puissance effectuées sur la PCM contenant une anode de graphite non modifiée chimiquement et colonisée par un biofilm électroactif depuis un mois. 141

Figure 20 : Voltammogramme d'un biofilm jeune (10 jours) en absence d'acétate. Vitesse de balayage: 5 mV/s 142

Figure 21 : voltammogrammes ($v = 5 \text{ mV/s}$) enregistrés sur une bioanode nue en présence d'acétate de potassium à différentes concentrations dans l'anolyte ($\sim 0\text{mM}$; courbe noire, 10 mM ; courbe rouge, 20 mM ; courbe bleue et 40 mM ; courbe verte). 143

Figure 22 : Oxydation de l'acétate (20 mM) sur un biofilm mature (1 mois) (courbe noire) et un biofilm jeune (3 jours) (courbe rouge), étudiée par voltamétrie cyclique dans l'anolyte. Vitesse de balayage: $v=5 \text{ mV/s}$ 144

Figure 23 : photos des biofilms développés sur des anodes de graphite, (A) biofilm jeune (couleur rose orangée), (B) biofilm mature (couleur marron-grise). 145

Figure 24 : Courbes de densité de puissance effectuées sur une PCM contenant une anode de graphite colonisée par un biofilm électroactif ; biofilm jeune (courbe rouge), biofilm mature (courbe noire). 147

Figure 25 : Courbe de raréfaction du jeu de séquences obtenues. 148

Figure 26 : Dendrogramme. 149

Figure 27 : Analyse des communautés de biofilm; diagrammes montrant l'abondance de la séquence en pourcentage selon la taxonomie au niveau d'embranchement des biofilms d'électrodes. 150

Figure 28 : Courbe de différence de potentiel en fonction du temps. Anodes modifiées avec la pyridine (ronds noirs) et anodes non modifiées (triangles rouges). 153

Figure 29 : Voltammogrammes cycliques présentant l'oxydation biocatalytique de l'acétate par le biofilm en présence d'une concentration non limitante d'acétate (20mM), sur une anode de graphite modifiée avec la pyridine (courbe noire) et sur une anode de graphite nue (courbe rouge). $v=5\text{mV/s}$ 156

- Figure 30 : Courbes chronoampérométriques de biofilms jeunes développés sur graphite modifié avec la pyridine (courbe noire) et de biofilms jeunes développés sur graphite nu (courbe rouge), enregistrées à un potentiel correspondant au courant maximum ($E = -0,4$ V vs ECS) après injection de 2 mM d'acétate de potassium. 157
- Figure 31 : Courbes chronoampérométriques de biofilms jeunes (7 jours) développés sur graphite modifié avec la pyridine (courbe noire) et du même biofilm après un mois de développement (courbe bleue), enregistrées à un potentiel correspondant au courant maximum ($E = -0,4$ V vs ECS) après injection de 2 mM d'acétate de potassium. 159
- Figure 32 : Courbes de densité de puissance effectuées sur des PCMs contenant des anodes de graphite colonisées par des biofilms électroactifs jeunes (3 jours) ; Electrode modifiée avec la pyridine (courbe rouge), électrode non modifiée (courbe noire). 160
- Figure 33: Image par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) d'une électrode de graphite nue (A), d'une anode de graphite non modifiée colonisée par un biofilm électroactif (B) et d'une anodes de graphite modifiée avec la pyridine et colonisée par un biofilm (C). 161
- Figure 34: Voltammogrammes cycliques présentant l'oxydation biocatalytique de l'acétate par le biofilms en présence d'une concentration non limitante d'acétate (20mM), sur une anode de graphite modifiée avec la pyridine (courbe rouge) et sur une anode de graphite modifiée avec le phényle (courbe bleue). $v=5$ mV/s. 162
- Figure 35 : Voltammogrammes de cytochrome-c ; 150 μ M dans une solution aqueuse de tampon phosphate à 0.1M, à pH=7 et sous argon, enregistrés à 20 mV/s, sur des électrodes de carbone vitreux non modifiées (courbe noire) et modifiées avec la pyridine (courbe rouge). 163
- Figure 36 : Voltammogrammes cycliques présentant l'oxydation biocatalytique de l'acétate par les biofilms âgés d'une semaine, en présence d'une concentration non limitante d'acétate (20 mM), dans le cas d'une PCM contenant une anode de graphite non modifiée et colonisée par un biofilm (courbe bleue), une PCM contenant une anode de graphite non modifiée et colonisée par un biofilm en présence de 0,1 mM de la pyridine dans l'anolyte (courbe rouge) et une pile contenant une électrode de graphite modifiée avec la pyridine et colonisée par un biofilm (courbe noire). $v=5$ mV/s. 164
- Figure 37 : Voltammogrammes cycliques présentant l'oxydation biocatalytique de l'acétate par les biofilms âgés d'une semaine en présence d'une concentration non limitante

d'acétate (20 mM), dans le cas d'une PCM contenant une anode de graphite non modifiée et colonsée par un biofilm, en présence de 0,1 mM de la pyridine dans l'anolyte (courbe noire) et après une semaine de développement de biofilm (courbe verte). $v=5\text{mV/s}$ 165

Liste des tableaux

Tableau 1 : Rapport atomique XPS pour la surface d'or modifiée par des cations diazopyridinium in situ produites à partir de 2-, 3-, 4-aminopyridine après 30s, 5 h ou 24 h de l'addition de 2 eq. de NaNO ₂ . Épaisseur estimée par ; a) mesures ellipsométriques des surfaces d'or correspondantes et b) la méthode de scratching sur substrat PPF assurée par AFM.	126
Tableau 2 : Pourcentages des différentes bactéries identifiées lors des analyses effectuées sur nos échantillons.	151
Tableau 3 : Temps moyen mis pour le développement d'un biofilm électroactif sur des anodes modifiées et non modifiées.	155
Tableau 4 : Densités de courant catalytique moyennes dues à l'oxydation du substrat à l'anode, mesurées par voltamétrie cyclique à vitesse de balayage lente à 5 mV.s ⁻¹ . Les voltamétries cycliques sont réalisées en présence d'une concentration non limitante de substrat, soit 20mM. La valeur du courant catalytique est prise sur le plateau de courant observé sur les voltammogrammes, à 0 V vs ECS et ramenées à la surface projetée des anodes (ici, de l'ordre de 25 cm ²).	156
Tableau 5 : Rendements faradiques calculés pour les électrodes modifiées avec la pyridine et non modifiées utilisés dans cette étude. Les expériences ont été réalisées sur des piles dont les bioanodes sont jeunes (développement initial du biofilm lors de 2 batchs successifs d'acétate).	158
Tableau 6 : Rendements faradiques calculés pour les électrodes modifiées avec la pyridine. Les expériences ont été réalisées sur des piles dont les bioanodes sont à différentes phases (jeune et mature), (développement initial du biofilm lors de 2 batchs successifs d'acétate).	159
Tableau 7 : Rendements faradiques calculés pour les biopiles en présence et en absence de la pyridine dans l'anolyte. Les expériences ont été réalisées sur des piles dont les bioanodes sont jeunes (développement initial du biofilm lors de 2 batchs successifs d'acétate). ..	165

Références du chapitre III

- Agullo, J., Canesi, S., Schaper, F., Morin, M., and Bélanger, D. (2012a). Formation and Reactivity of 3-Diazopyridinium Cations and Influence on Their Reductive Electrografting on Glassy Carbon. *Langmuir* 28, 4889–4895.
- Agullo, J., Morin, M., and Bélanger, D. (2012b). Modification of Glassy Carbon Electrode by Electrografting of In Situ Generated 3-diazopyridinium Cations. *J. Electrochem. Soc.* 159, H758–H764.
- Allongue, P., Delamar, M., Desbat, B., Fagebaume, O., Hitmi, R., Pinson, J., and Savéant, J.-M. (1997). Covalent Modification of Carbon Surfaces by Aryl Radicals Generated from the Electrochemical Reduction of Diazonium Salts. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 201–207.
- Anariba, F., DuVall, S.H., and McCreery, R.L. (2003). Mono- and Multilayer Formation by Diazonium Reduction on Carbon Surfaces Monitored with Atomic Force Microscopy “Scratching.” *Anal. Chem.* 75, 3837–3844.
- Baranton, S., and Bélanger, D. (2005). Electrochemical Derivatization of Carbon Surface by Reduction of in Situ Generated Diazonium Cations. *J. Phys. Chem. B* 109, 24401–24410.
- Baranton, S., and Bélanger, D. (2008). In situ generation of diazonium cations in organic electrolyte for electrochemical modification of electrode surface. *Electrochimica Acta* 53, 6961–6967.
- Bayazit, M.K., Clarke, L.S., Coleman, K.S., and Clarke, N. (2010). Pyridine-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes as Gelators for Poly(acrylic acid) Hydrogels. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 15814–15819.
- Bélanger, D., and Pinson, J. (2011). Electrografting: a powerful method for surface modification. *Chem. Soc. Rev.* 40, 3995–4048.
- Borole, A.P., Reguera, G., Ringeisen, B., Wang, Z.-W., Feng, Y., and Kim, B.H. (2011). Electroactive biofilms: Current status and future research needs. *Energy Environ. Sci.* 4, 4813–4834.
- Brooksby, P.A., and Downard, A.J. (2004). Electrochemical and Atomic Force Microscopy Study of Carbon Surface Modification via Diazonium Reduction in Aqueous and Acetonitrile Solutions. *Langmuir* 20, 5038–5045.
- Brooksby, P.A., Downard, A.J., and Yu, S.S.C. (2005). Effect of Applied Potential on Arylmethyl Films Oxidatively Grafted to Carbon Surfaces. *Langmuir* 21, 11304–11311.
- Bunton, C.A., Minch, M.J., and Wolfe, B.B. (1974). Decomposition of pyridine-2-and-4-diazotates. *J. Am. Chem. Soc.* 96, 3267–3275.
- Butler, R.N. (1975). Diazotization of heterocyclic primary amines. *Chem. Rev.* 75, 241–257.
- del Campo, F.J., Godignon, P., Aldous, L., Pausas, E., Sarrión, M., Zabala, M., Prehn, R., and Compton, R.G. (2011). Fabrication of PPF Electrodes by a Rapid Thermal Process. *J. Electrochem. Soc.* 158, H63.
- Chen, X., Cui, D., Wang, X., Wang, X., and Li, W. (2015). Porous carbon with defined pore size as anode of microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron.* 69, 135–141.

- Cheng, S., and Logan, B.E. (2007). Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells. *Electrochem. Commun.* 9, 492–496.
- Cougnon, C., Gohier, F., Bélanger, D., and Mauzeroll, J. (2009). In Situ Formation of Diazonium Salts from Nitro Precursors for Scanning Electrochemical Microscopy Patterning of Surfaces. *Angew. Chem.* 121, 4066–4068.
- Cristiani, P., Carvalho, M.L., Guerrini, E., Daghighi, M., Santoro, C., and Li, B. (2013). Cathodic and anodic biofilms in Single Chamber Microbial Fuel Cells. *Bioelectrochemistry* 92, 6–13.
- Crittenden, S.R., Sund, C.J., and Sumner, J.J. (2006). Mediating Electron Transfer from Bacteria to a Gold Electrode via a Self-Assembled Monolayer. *Langmuir* 22, 9473–9476.
- Cui, H.-F., Du, L., Guo, P.-B., Zhu, B., and Luong, J.H.T. (2015). Controlled modification of carbon nanotubes and polyaniline on macroporous graphite felt for high-performance microbial fuel cell anode. *J. Power Sources* 283, 46–53.
- D'Amour, M., and Bélanger, D. (2003). Stability of Substituted Phenyl Groups Electrochemically Grafted at Carbon Electrode Surface. *J. Phys. Chem. B* 107, 4811–4817.
- Davis, K.L., Drews, B.J., Yue, H., Waldeck, D.H., Knorr, K., and Clark, R.A. (2008). Electron-Transfer Kinetics of Covalently Attached Cytochrome *c*/SAM/Au Electrode Assemblies. *J. Phys. Chem. C* 112, 6571–6576.
- Delamar, M., Hitmi, R., Pinson, J., and Saveant, J.M. (1992). Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 5883–5884.
- Ding, C., Liu, H., Zhu, Y., Wan, M., and Jiang, L. (2012). Control of bacterial extracellular electron transfer by a solid-state mediator of polyaniline nanowire arrays. *Energy Environ. Sci.* 5, 8517–8522.
- Downard, A.J. (2000). Potential-Dependence of Self-Limited Films Formed by Reduction of Aryldiazonium Salts at Glassy Carbon Electrodes. *Langmuir* 16, 9680–9682.
- Downard, A.J., and Prince, M.J. (2001). Barrier Properties of Organic Monolayers on Glassy Carbon Electrodes. *Langmuir* 17, 5581–5586.
- Fan, Y., Xu, S., Schaller, R., Jiao, J., Chaplen, F., and Liu, H. (2011). Nanoparticle decorated anodes for enhanced current generation in microbial electrochemical cells. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1908–1912.
- Fellah, S., Ozanam, F., Chazalviel, J.-N., Vigneron, J., Etcheberry, A., and Stchakovsky, M. (2006). Grafting and Polymer Formation on Silicon from Unsaturated Grignards: I- Aromatic Precursors. *J. Phys. Chem. B* 110, 1665–1672.
- Feng, Y., Yang, Q., Wang, X., and Logan, B.E. (2010). Treatment of carbon fiber brush anodes for improving power generation in air-cathode microbial fuel cells. *J. Power Sources* 195, 1841–1844.
- Finn, P., and Jolly, W.L. (1972). Nitrogen 1s binding energies of some azide, dinitrogen, and nitride complexes of transition metals. *Inorg. Chem.* 11, 1434–1435.
- Franks, A.E., and Nevin, K.P. (2010). Microbial Fuel Cells, A Current Review. *Energies* 3, 899–919.

- Fricke, K., Harnisch, F., and Schröder, U. (2008). On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* *1*, 144–147.
- Gallardo, I., Pinson, J., and Vilà, N. (2006). Spontaneous Attachment of Amines to Carbon and Metallic Surfaces. *J. Phys. Chem. B* *110*, 19521–19529.
- Grivet, M., Morrier, J.J., Benay, G., and Barsotti, O. (2000). Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* *11*, 637–642.
- Guo, K., Freguia, S., Dennis, P.G., Chen, X., Donose, B.C., Keller, J., Gooding, J.J., and Rabaey, K. (2013). Effects of Surface Charge and Hydrophobicity on Anodic Biofilm Formation, Community Composition, and Current Generation in Bioelectrochemical Systems. *Environ. Sci. Technol.* *47*, 7563–7570.
- Harnisch, F., and Freguia, S. (2012). A Basic Tutorial on Cyclic Voltammetry for the Investigation of Electroactive Microbial Biofilms. *Chem. – Asian J.* *7*, 466–475.
- He, Z., Liu, J., Qiao, Y., Li, C.M., and Tan, T.T.Y. (2012). Architecture Engineering of Hierarchically Porous Chitosan/Vacuum-Stripped Graphene Scaffold as Bioanode for High Performance Microbial Fuel Cell. *Nano Lett.* *12*, 4738–4741.
- Heller, A. (1990). Electrical wiring of redox enzymes. *Acc. Chem. Res.* *23*, 128–134.
- Heller, A. (2006). Electron-conducting redox hydrogels: design, characteristics and synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *10*, 664–672.
- Hendrickson, D.N., Hollander, J.M., and Jolly, W.L. (1969). Nitrogen 1s electron binding energies. Correlations with molecular orbital calculated nitrogen charges. *Inorg. Chem.* *8*, 2642–2647.
- Hurley, B.L., and McCreery, R.L. (2004). Covalent Bonding of Organic Molecules to Cu and Al Alloy 2024 T3 Surfaces via Diazonium Ion Reduction. *J. Electrochem. Soc.* *151*, B252–B259.
- Ichihashi, O., Vishnivetskaya, T.A., and Borole, A.P. (2014). High-Performance Bioanode Development for Fermentable Substrates via Controlled Electroactive Biofilm Growth. *ChemElectroChem* *1*, 1940–1947.
- Inoue, K., Qian, X., Morgado, L., Kim, B.-C., Mester, T., Izallalen, M., Salgueiro, C.A., and Lovley, D.R. (2010). Purification and Characterization of OmcZ, an Outer-Surface, Octaheme c-Type Cytochrome Essential for Optimal Current Production by *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 3999–4007.
- Ishii, S. 'ichi, Suzuki, S., Norden-Krichmar, T.M., Nealson, K.H., Sekiguchi, Y., Gorby, Y.A., and Bretschger, O. (2012). Functionally stable and phylogenetically diverse microbial enrichments from microbial fuel cells during wastewater treatment. *PloS One* *7*, e30495.
- Ishii, S. 'ichi, Suzuki, S., Norden-Krichmar, T.M., Tenney, A., Chain, P.S.G., Scholz, M.B., Nealson, K.H., and Bretschger, O. (2013). A novel metatranscriptomic approach to identify gene expression dynamics during extracellular electron transfer. *Nat. Commun.* *4*, 1601.
- Ishii, S. 'ichi, Suzuki, S., Norden-Krichmar, T.M., Phan, T., Wanger, G., Nealson, K.H., Sekiguchi, Y., Gorby, Y.A., and Bretschger, O. (2014). Microbial population and functional dynamics associated with surface potential and carbon metabolism. *ISME J.* *8*, 963–978.

- Itoh, T., and McCreery, R.L. (2002). In Situ Raman Spectroelectrochemistry of Electron Transfer between Glassy Carbon and a Chemisorbed Nitroazobenzene Monolayer. *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 10894–10902.
- Ivanova, B.B., Arnaudov, M.G., and Mayer-Figge, H. (2005). Molecular spectral analysis and crystal structure of the 4-aminopyridinium tetrachloropalladate(II) complex salt. *Polyhedron* *24*, 1624–1630.
- Jiang, D., and Li, B. (2009). Novel electrode materials to enhance the bacterial adhesion and increase the power generation in microbial fuel cells (MFCs). *Water Sci. Technol.* *59*, 557–563.
- Kalatzis, E. (1967). Reactions of N-heteroaromatic bases with nitrous acid. Part I. Diazotisation and nitrosation of α - and γ -amino-derivatives in dilute acid solutions. *J. Chem. Soc. B Phys. Org.* *0*, 273–277.
- Kalatzis, E., and Mastrokalos, C. (1974). Reactions of N-heteroaromatic bases with nitrous acid. Part III. Kinetics of diazotisation of 2-aminopyridine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* *0*, 498–502.
- Kariuki, J.K., and McDermott, M.T. (1999). Nucleation and Growth of Functionalized Aryl Films on Graphite Electrodes. *Langmuir* *15*, 6534–6540.
- Kariuki, J.K., and McDermott, M.T. (2001). Formation of Multilayers on Glassy Carbon Electrodes via the Reduction of Diazonium Salts. *Langmuir* *17*, 5947–5951.
- Karra, U., Manickam, S.S., McCutcheon, J.R., Patel, N., and Li, B. (2013). Power generation and organics removal from wastewater using activated carbon nanofiber (ACNF) microbial fuel cells (MFCs). *Int. J. Hydrog. Energy* *38*, 1588–1597.
- Kato Marcus, A., Torres, C.I., and Rittmann, B.E. (2007). Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell. *Biotechnol. Bioeng.* *98*, 1171–1182.
- Katuri, K.P., Kavanagh, P., Rengaraj, S., and Leech, D. (2010). *Geobacter sulfurreducens* biofilms developed under different growth conditions on glassy carbon electrodes: insights using cyclic voltammetry. *Chem. Commun.* *46*, 4758–4760.
- Katuri, K.P., Rengaraj, S., Kavanagh, P., O’Flaherty, V., and Leech, D. (2012). Charge Transport through *Geobacter sulfurreducens* Biofilms Grown on Graphite Rods. *Langmuir* *28*, 7904–7913.
- Ketep, S.F., Bergel, A., Calmet, A., and Erable, B. (2014). Stainless steel foam increases the current produced by microbial bioanodes in bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* *7*, 1633–1637.
- Kiely, P.D., Regan, J.M., and Logan, B.E. (2011). The electric picnic: synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. *Curr. Opin. Biotechnol.* *22*, 378–385.
- Kim, G. t., Webster, G., Wimpenny, J. w. t., Kim, B. h., Kim, H. j., and Weightman, A. j. (2006). Bacterial community structure, compartmentalization and activity in a microbial fuel cell. *J. Appl. Microbiol.* *101*, 698–710.
- Kim, J.R., Min, B., and Logan, B.E. (2005). Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *68*, 23–30.
- Lai, B., Tang, X., Li, H., Du, Z., Liu, X., and Zhang, Q. (2011). Power production enhancement with a polyaniline modified anode in microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* *28*, 373–377.

- Lapinsonnière, L., Picot, M., Poriel, C., and Barrière, F. (2013). Phenylboronic Acid Modified Anodes Promote Faster Biofilm Adhesion and Increase Microbial Fuel Cell Performances. *Electroanalysis* 25, 601–605.
- Lee, L., Brooksby, P.A., Hapiot, P., and Downard, A.J. (2016). Electrografting of 4-Nitrobenzenediazonium Ion at Carbon Electrodes: Catalyzed and Uncatalyzed Reduction Processes. *Langmuir* 32, 468–476.
- Leinonen, H., and Lajunen, M. (2011). Fascinating distinct reactivity of 3- or 2-aminopyridines with carbon nanotubes. *Chem. Eng. J.* 172, 557–563.
- Li, Q., Schönleber, K., Zeller, P., Höhlein, I., Rieger, B., Winterlin, J., and Krischer, K. (2015). Activation of silicon surfaces for H₂ evolution by electrografting of pyridine molecules. *Surf. Sci.* 631, 185–189.
- Liang, P., Wang, H., Xia, X., Huang, X., Mo, Y., Cao, X., and Fan, M. (2011). Carbon nanotube powders as electrode modifier to enhance the activity of anodic biofilm in microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 26, 3000–3004.
- Liu, Y.-C., and McCreery, R.L. (1995). Reactions of organic monolayers on carbon surfaces observed with unenhanced Raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 11254–11259.
- Liu, G., Liu, J., Böcking, T., Eggers, P.K., and Gooding, J.J. (2005a). The modification of glassy carbon and gold electrodes with aryl diazonium salt: The impact of the electrode materials on the rate of heterogeneous electron transfer. *Chem. Phys.* 319, 136–146.
- Liu, H., Cheng, S., and Logan, B.E. (2005b). Production of Electricity from Acetate or Butyrate Using a Single-Chamber Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* 39, 658–662.
- Liu, J., Qiao, Y., Guo, C.X., Lim, S., Song, H., and Li, C.M. (2012). Graphene/carbon cloth anode for high-performance mediatorless microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 114, 275–280.
- Lowy, D.A., and Tender, L.M. (2008). Harvesting energy from the marine sediment–water interface. *J. Power Sources* 185, 70–75.
- Lowy, D.A., Tender, L.M., Zeikus, J.G., Park, D.H., and Lovley, D.R. (2006). Harvesting energy from the marine sediment–water interface II. *Biosens. Bioelectron.* 21, 2058–2063.
- Lyskawa, J., and Bélanger, D. (2006). Direct Modification of a Gold Electrode with Aminophenyl Groups by Electrochemical Reduction of in Situ Generated Aminophenyl Monodiazonium Cations. *Chem. Mater.* 18, 4755–4763.
- Malvankar, N.S., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2012). Biofilm conductivity is a decisive variable for high-current-density *Geobacter sulfurreducens* microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 5, 5790–5797.
- Manickam, S.S., Karra, U., Huang, L., Bui, N.-N., Li, B., and McCutcheon, J.R. (2013). Activated carbon nanofiber anodes for microbial fuel cells. *Carbon* 53, 19–28.
- Marsili, E., Rollefson, J.B., Baron, D.B., Hozalski, R.M., and Bond, D.R. (2008). Microbial Biofilm Voltammetry: Direct Electrochemical Characterization of Catalytic Electrode-Attached Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7329–7337.
- Marsili, E., Sun, J., and Bond, D.R. (2010). Voltammetry and Growth Physiology of *Geobacter sulfurreducens* Biofilms as a Function of Growth Stage and Imposed Electrode Potential. *Electroanalysis* 22, 865–874.

- Nakamura, R., Kai, F., Okamoto, A., Newton, G.J., and Hashimoto, K. (2009). Self-Constructed Electrically Conductive Bacterial Networks. *Angew. Chem. Int. Ed.* *48*, 508–511.
- Palacin, S., Bureau, C., Charlier, J., Deniau, G., Mouanda, B., and Viel, P. (2004). Molecule-to-Metal Bonds: Electrografting Polymers on Conducting Surfaces. *ChemPhysChem* *5*, 1468–1481.
- Pan, Q., Wang, M., and Chen, W. (2007). Hydrophobization of Metal Surfaces by Covalent Grafting of Aromatic Layer via Aryldiazonium Chemistry and Their Application in the Fabrication of Superhydrophobic Surfaces. *Chem. Lett.* *36*, 1312–1313.
- Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L., and Vanbroekhoven, K. (2010). A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresour. Technol.* *101*, 1533–1543.
- Park, D., and Zeikus, J. (2002). Impact of electrode composition on electricity generation in a single-compartment fuel cell using *Shewanella putrefaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *59*, 58–61.
- Park, D.H., and Zeikus, J.G. (2000). Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore. *Appl. Environ. Microbiol.* *66*, 1292–1297.
- Park, D.H., Kim, B.H., Moore, B., Hill, H. a. O., Song, M.K., and Rhee, H.W. (1997). Electrode reaction of *Desulfovibrio desulfuricans* modified with organic conductive compounds. *Biotechnol. Tech.* *11*, 145–148.
- Parker, D., Elisabet, A., and Bertil, H. (1980). The reaction of aryl radicals with metallic electrodes.
- Picot, M., Lapinsonnière, L., Rothballer, M., and Barrière, F. (2011). Graphite anode surface modification with controlled reduction of specific aryl diazonium salts for improved microbial fuel cells power output. *Biosens. Bioelectron.* *28*, 181–188.
- Pinson, J., and Podvorica, F. (2005). Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts. *Chem. Soc. Rev.* *34*, 429–439.
- Ranganathan, S., and McCreery, R.L. (2001). Electroanalytical Performance of Carbon Films with Near-Atomic Flatness. *Anal. Chem.* *73*, 893–900.
- Saby, C., Ortiz, B., Champagne, G.Y., and Bélanger, D. (1997). Electrochemical Modification of Glassy Carbon Electrode Using Aromatic Diazonium Salts. 1. Blocking Effect of 4-Nitrophenyl and 4-Carboxyphenyl Groups. *Langmuir* *13*, 6805–6813.
- Sadowska, K., Roberts, K.P., Wiser, R., Biernat, J.F., Jabłowska, E., and Bilewicz, R. (2009). Synthesis, characterization, and electrochemical testing of carbon nanotubes derivatized with azobenzene and anthraquinone. *Carbon* *47*, 1501–1510.
- Saito, T., Mehanna, M., Wang, X., Cusick, R.D., Feng, Y., Hickner, M.A., and Logan, B.E. (2011). Effect of nitrogen addition on the performance of microbial fuel cell anodes. *Bioresour. Technol.* *102*, 395–398.
- Santoro, C., Babanova, S., Artyushkova, K., Cornejo, J.A., Ista, L., Bretschger, O., Marsili, E., Atanassov, P., and Schuler, A.J. (2015). Influence of anode surface chemistry on microbial fuel cell operation. *Bioelectrochemistry* *106*, 141–149.
- Schaetzle, O., Barrière, F., and Schröder, U. (2009). An improved microbial fuel cell with laccase as the oxygen reduction catalyst. *Energy Environ. Sci.* *2*, 96–99.

- Schauff, S., Ciorca, M., Laforgue, A., and Bélanger, D. (2009). Electron Transfer Processes at Aryl-Modified Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis* *21*, 1499–1504.
- Schindler, M., and Osborn, M.J. (1979). Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochemistry (Mosc.)* *18*, 4425–4430.
- Scott, K., Rimbu, G.A., Katuri, K.P., Prasad, K.K., and Head, I.M. (2007). Application of Modified Carbon Anodes in Microbial Fuel Cells. *Process Saf. Environ. Prot.* *85*, 481–488.
- Shen, W., Li, Z., and Liu, Y. (2008). Surface Chemical Functional Groups Modification of Porous Carbon. *Recent Pat. Chem. Eng.* *1*, 27–40.
- Song, R.-B., Wu, Y., Lin, Z.-Q., Xie, J., Tan, C.H., Loo, J.S.C., Cao, B., Zhang, J.-R., Zhu, J.-J., and Zhang, Q. (2017). Living and Conducting: Coating Individual Bacterial Cells with In Situ Formed Polypyrrole. *Angew. Chem.*
- Stams, A.J.M., De Bok, F.A.M., Plugge, C.M., Van Eekert, M.H.A., Doling, J., and Schraa, G. (2006). Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environ. Microbiol.* *8*, 371–382.
- Steck, E.A., Ewing, G.W., and Nachod, F. (1948). Absorption Spectra of Heterocyclic Compounds. 11. Amino-Derivatives of Pyridine, Quinoline and Isoquinoline. 3397–3406.
- Tang, X., Guo, K., Li, H., Du, Z., and Tian, J. (2011). Electrochemical treatment of graphite to enhance electron transfer from bacteria to electrodes. *Bioresour. Technol.* *102*, 3558–3560.
- Terada, A., Yuasa, A., Kushimoto, T., Tsuneda, S., Katakai, A., and Tamada, M. (2006). Bacterial adhesion to and viability on positively charged polymer surfaces. *Microbiology* *152*, 3575–3583.
- Venkata Mohan, S., Velvizhi, G., Annie Modestra, J., and Srikanth, S. (2014). Microbial fuel cell: Critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements. *Renew. Sustain. Energy Rev.* *40*, 779–797.
- Wang, G.-X., Bao, W.-J., Wang, M., and Xia, X.-H. (2012). Heme plane orientation dependent direct electron transfer of cytochrome c at SAMs/Au electrodes with different wettability. *Chem. Commun.* *48*, 10859–10861.
- Wang, Q., Zhi, F., Wang, W., Xia, X., Liu, X., Meng, F., Song, Y., Yang, C., and Lu, X. (2009a). Direct Electron Transfer of Thiol-Derivatized Tetraphenylporphyrin Assembled on Gold Electrodes in an Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. C* *113*, 9359–9367.
- Wang, X., Cheng, S., Feng, Y., Merrill, M.D., Saito, T., and Logan, B.E. (2009b). Use of Carbon Mesh Anodes and the Effect of Different Pretreatment Methods on Power Production in Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* *43*, 6870–6874.
- Yang, G., Wang, L., Jia, J., Zhou, D., and Li, D. (2012). Chemically modified glassy carbon electrode for electrochemical sensing paracetamol in acidic solution. *J. Solid State Electrochem.* *16*, 2967–2977.
- Yates, M.D., Kiely, P.D., Call, D.F., Rismani-Yazdi, H., Bibby, K., Peccia, J., Regan, J.M., and Logan, B.E. (2012). Convergent development of anodic bacterial communities in microbial fuel cells. *ISME J.* *6*, 2002–2013.
- Yeşildağ, A., and Ekinçi, D. (2010). Covalent attachment of pyridine-type molecules to glassy carbon surfaces by electrochemical reduction of in situ generated diazonium salts. Formation of ruthenium complexes on ligand-modified surfaces. *Electrochimica Acta* *55*, 7000–7009.

Yong, Y.-C., Dong, X.-C., Chan-Park, M.B., Song, H., and Chen, P. (2012). Macroporous and Monolithic Anode Based on Polyaniline Hybridized Three-Dimensional Graphene for High-Performance Microbial Fuel Cells. *ACS Nano* 6, 2394–2400.

Yu, Y.-Y., Chen, H., Yong, Y.-C., Kim, D.-H., and Song, H. (2011). Conductive artificial biofilm dramatically enhances bioelectricity production in *Shewanella*-inoculated microbial fuel cells. *Chem. Commun.* 47, 12825–12827.

Yuan, Y., Zhou, S., Liu, Y., and Tang, J. (2013). Nanostructured Macroporous Bioanode Based on Polyaniline-Modified Natural Loofah Sponge for High-Performance Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* 47, 14525–14532.

Zhang, Y., Liu, L., Bruggen, B.V. der, and Yang, F. (2017). Nanocarbon based composite electrodes and their application in microbial fuel cells. *J. Mater. Chem. A* 5, 12673–12698.

Zhao, Y., Watanabe, K., Nakamura, R., Mori, S., Liu, H., Ishii, K., and Hashimoto, K. (2010). Three-Dimensional Conductive Nanowire Networks for Maximizing Anode Performance in Microbial Fuel Cells. *Chem. – Eur. J.* 16, 4982–4985.

Zhou, M., Chi, M., Wang, H., and Jin, T. (2012). Anode modification by electrochemical oxidation: A new practical method to improve the performance of microbial fuel cells. *Biochem. Eng. J.* 60, 151–155.

Zhu, N., Chen, X., Zhang, T., Wu, P., Li, P., and Wu, J. (2011). Improved performance of membrane free single-chamber air-cathode microbial fuel cells with nitric acid and ethylenediamine surface modified activated carbon fiber felt anodes. *Bioresour. Technol.* 102, 422–426.

Zou, Y., Xiang, C., Yang, L., Sun, L.-X., Xu, F., and Cao, Z. (2008). A mediatorless microbial fuel cell using polypyrrole coated carbon nanotubes composite as anode material. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 4856–4862.

Chapitre 4

Les piles à combustible microbiennes (PCMs) comme capteurs pour étudier l'impact des liquides ioniques sur une communauté bactérienne ?

Table des matières

Chapitre IV Les piles à combustible microbiennes (PCMs) comme capteurs pour étudier l'impact des liquides ioniques sur une communauté bactérienne ?	186
Introduction	186
IV.1 Point bibliographique sur l'emploi des liquides ioniques dans les biotechnologies	186
IV.1.1 Généralités sur les liquides ioniques	186
IV.1.2 Utilisation des liquides ioniques dans les biotechnologies	188
IV.2 Effet d'un liquide ionique hydrophile; l'acétate de 1-butyl-3-méthylimidazolium	192
IV.2.1 Biofilms développés sur graphite nu ou modifié avec des unités pyridine	193
IV.2.1.a Etude par voltamétrie cyclique	193
IV.2.1.b Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB).....	196
IV.2.2 Développement d'un biofilm	197
IV.2.3 Inoculum.....	198
IV.2.4 Effet de la concentration de [BMIm][AcO]	199
IV.3 Effet des liquides ioniques hydrophobes.....	202
IV.3.1 Effet de [BMIM][NTf ₂] sur des biofilms développés	202
IV.3.2 Effet sur le développement de biofilm	203
IV.4 Effet de liquides ioniques à base de cations pyridinium	204
IV.5 Conclusion sur l'effet de liquides ioniques en solution sur les PCMs.....	207
IV.6 Effet d'un LI greffé sur la surface de l'anode de la PCM	207
IV.6.1 Synthèse du bromure de 1-(3-aminopropyl)-3-méthylimidazolium ; LI-NH ₂	208
IV.6.2 Greffage de LI-NH ₂	208
IV.6.2.a Voie oxydante	209
IV.6.2.b Greffage en 2 étapes à partir de la réduction électrochimique de 4-carboxyphényldiazonium	211

IV.6.3	Effet du LI greffé sur les anodes dans le fonctionnement de PCMs	214
IV.7	Effet des liquides ioniques sur la membrane échangeuse d'ions	216
IV.8	Conclusions du chapitre IV	222
	Liste des figures	223
	Références du chapitre IV	228

Chapitre IV Les piles à combustible microbiennes (PCMs) comme capteurs pour étudier l'impact des liquides ioniques sur une communauté bactérienne ?

Introduction

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'effet des liquides ioniques sur l'activité ou le développement de biofilms électroactifs. Les liquides ioniques ont récemment émergé comme nouveaux solvants dans les biotechnologies. Après avoir décrit quelques généralités à propos des liquides ioniques, un rapide point bibliographique dans le paragraphe I permettra de positionner notre travail dans ce contexte. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la toxicité d'une sélection de liquides ioniques, très couramment utilisés, vis-à-vis de l'activité biocatalytique d'un biofilm électroactif. Nous verrons l'intérêt d'utiliser ces biofilms pour cette étude et au-delà le possible intérêt des liquides ioniques en tant que composés antimicrobien et antibiofouling.

IV.1 Point bibliographique sur l'emploi des liquides ioniques dans les biotechnologies

IV.1.1 Généralités sur les liquides ioniques

Les liquides ioniques peuvent être très simplement définis comme des sels fondus à basse température, c'est-à-dire des sels liquides à température ambiante ou proche de la température ambiante. Il est généralement admis qu'un liquide ionique possède une température de fusion inférieure à 100°C. Cependant, un grand nombre d'entre eux sont liquides en-dessous de 25°C. Les liquides ioniques que l'on considère dans ce travail sont généralement constitués d'un cation organique volumineux et dissymétrique (ammonium, imidazolium, pyridinium, pyrrolidinium, et.) et d'un anion organique ou inorganique faiblement coordonnant (hexafluorophosphate, tétrafluoroborate, nitrate, triflate, acétate, chlorure, bis(trifluorométhylsulfonyl)imide, etc.). Cette combinaison est défavorable à la formation d'un état cristallin et on aboutit donc à un fluide. Ces liquides ioniques possèdent des propriétés physico-chimiques uniques telles qu'une très faible pression de vapeur (et donc une faible inflammabilité), une très bonne stabilité thermique (jusqu'à 400°C pour certains), un état liquide dans un large domaine de température, une bonne conductivité ionique (de l'ordre de celle des

électrolytes organiques), une fenêtre électrochimique très large, et la capacité à dissoudre ou solvater une gamme très étendue de composés chimiques allant de cations métalliques (métaux de transition, terres rares, etc.), de composés organiques variés (composés organiques volatils (COVs), synthons divers) à des macromolécules (enzymes, cellulose, lignine...) (Welton, 1999), (Holbrey and Seddon, 1999) et (Seddon, 1997). On comprend donc aisément pourquoi ces composés ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique depuis une vingtaine d'années comme alternative aux solvants moléculaires (Figure 1). Ainsi, malgré leur coût, ils ont été utilisés dans de nombreuses applications, dans la synthèse et la catalyse (Wasserscheid and Keim, 2000), (Sheldon, 2001), (Welton, 2004), (Dupont and Suarez, 2006), (Hallett and Welton, 2011), dans les procédés de séparation, notamment l'extraction liquide-liquide, dans la lubrification ou encore dans des applications électrochimiques (galvanoplastie, batteries, condensateurs, cellules photo-électrochimiques, PACs) (Angell et al., 2007), (Xu et al., 2003), (H. Susan et al., 2003), (Armand et al., 2009). Le point certainement le plus intéressant des liquides ioniques est que l'on peut moduler leurs propriétés à façon, pour une application donnée, en variant la combinaison anion-cation et/ou en fonctionnalisant chimiquement les cations ou anions. Par exemple, pour un même cation 1-butyl-3-méthyl-imidazolium, l'association avec l'anion hexafluorophosphate donne un liquide ionique hydrophobe, très peu soluble dans l'eau alors que l'anion tétrafluoroborate permet de former un liquide ionique hydrophile. On les considère donc comme des « designer solvents ». Alors que le nombre de solvants conventionnels utilisés dans l'industrie est de l'ordre de $6 \cdot 10^2$, les combinaisons cations/anions possibles sont très nombreuses ($>10^6$), et donc le nombre de liquides ioniques facilement accessibles, et en constante évolution (Wasserscheid and Welton, 2008).

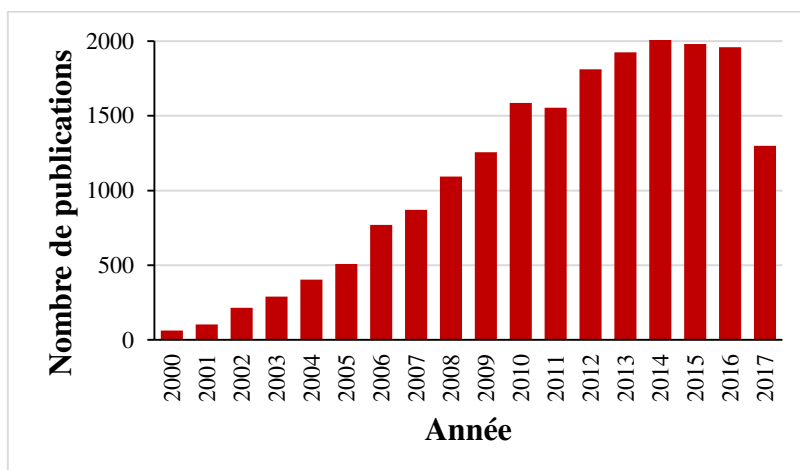


Figure 1: Evolution du nombre de publications portant sur le terme «Ionic liquid» dans la littérature depuis 2000 (d'après Sciences Direct-Août 2017).

Les liquides ioniques ont également suscité un grand intérêt dans des applications biotechnologiques telles que la biocatalyse, la transformation de la biomasse, la biodégradabilité et la délivrance de médicament (van Rantwijk and Sheldon, 2007), (Zhang et al., 2009) et (Davies, 2003). Nous allons développer plus précisément cet aspect dans le paragraphe suivant.

IV.1.2 Utilisation des liquides ioniques dans les biotechnologies

L'objectif de ce paragraphe n'est pas de faire une étude exhaustive de l'utilisation des liquides ioniques dans les biotechnologies, car les exemples sont bien trop nombreux, mais nous allons mettre en perspective quelques travaux afin de positionner notre travail dans ce contexte. Les liquides ioniques seront nommés dans le texte selon une notation couramment utilisée, les abréviations utilisées sont explicitées en fin de chapitre.

L'utilisation de liquides ioniques a permis d'augmenter significativement la stabilité opérationnelle de certaines enzymes (lipases, catalases, peroxidases, laccases...), notamment utilisées pour catalyser des réactions de biotransformation à l'échelle industrielle (Zhao, 2010), (Fujita et al., 2012), (Eshetu et al., 2016). Cette approche permet d'utiliser les enzymes plus longtemps qu'en milieu aqueux (plus de 3 semaines) et à des températures plus élevées. La lipase qui est une enzyme très robuste peut facilement être mise en suspension homogène dans un liquide ionique hydrophobe ([BMIm][PF₆]) tout en conservant son activité enzymatique (Lozano et al., 2002). Dans la majorité des autres cas, il est nécessaire d'ajouter une certaine quantité d'eau au liquide ionique pour garder la structure de la protéine nécessaire à son activité et pour la stabiliser (Fujita et al., 2012), (Mate and Alcalde, 2015). Il est ainsi possible de

conserver du cytochrome c dans un liquide ionique polaire (le dihydrogène phosphate de cholinium) contenant 20 % d'eau pendant plus d'un an sans perte significative de son activité redox (moins de 10 %) (Fujita et al., 2007). De même, l'utilisation de ce liquide ionique hydraté Hy[Chol][dhp] permet d'observer l'activité biocatalytique de la fructose déshydrogénase et de la cellobiose déshydrogénase, immobilisées sur des électrodes, pendant plus de trois semaines, à température ambiante, améliorant ainsi significativement la durée de conservation des enzymes (Fujita et al., 2011). Une autre approche consiste à « encapsuler » les enzymes dans les liquides ioniques, sans chercher à les solubiliser. Cette approche permet de protéger l'enzyme et réduire sa désactivation causée par différents facteurs extérieurs (présence de chlorures, de médiateurs redox réactifs, d'oxygène, etc.). Elle a été utilisée avec succès dans le cas des laccases (Rehmann et al., 2014), (Mate and Alcalde, 2015), (Qian et al., 2012), (Haj Kacem et al., 2017). Les laccases sont des enzymes à cuivre de type oxydase possédant une affinité vis-à-vis d'un grand nombre de substrats phénoliques ou aminés. Elles sont donc employées en tant que catalyseurs dans diverses applications de biotransformation et à la cathode des biopiles enzymatiques pour leur propriétés de réduction catalytique de l'oxygène moléculaire en eau. On peut prendre pour exemple les travaux de Rehmann et al. (Rehmann et al., 2014). Cette équipe a montré que des LIs peuvent être avantageusement utilisés pour protéger la laccase contre l'activité des médiateurs redox (TEMPO, 4-hydroxybenzylalcool, Phenothiazine et 2-hydroxybiphenyl), qui une fois oxydés, sont capables de désactiver presque complètement l'enzyme dans les 24-140 heures. Lorsque la laccase est incubée à la fois avec les médiateurs redox et des liquides ioniques à base d'imidazolium ou d'ammonium quaternaire, jusqu'à 50 % de l'activité initiale est encore observée après 188 heures. En choisissant un liquide ionique approprié, le médiateur réactif oxydé est réparti préférentiellement dans la phase liquide ionique, loin de l'enzyme dans la phase aqueuse. Cela minimise le contact entre l'enzyme et les espèces désactivantes et prolonge la durée de vie de la laccase active. Dans une publication récente, cette stratégie a été appliquée pour faire fonctionner une pile à combustible microbienne à un seul compartiment utilisant un biofilm bactérien à l'anode et de la laccase immobilisée dans un liquide ionique hydrophobe ([OMIm][NTf₂] à la cathode (Haj Kacem et al., 2017). D'autres travaux s'inspirent de cette approche pour encapsuler de la glucose oxydase dans un gel formé de [BMIm][PF₆] et de nanotubes de carbone fonctionnalisés par un médiateur redox (Sun et al., 2015) ou encore pour immobiliser le coenzyme NAD⁺/NADH et l'alcool déshydrogénase à la surface d'une électrode

(Masuda et al., 2013). Cette découverte a des implications importantes pour la mise en œuvre des réactions catalysées par les enzymes, car la durée prolongée de l'enzyme et sa stabilité ont un impact majeur sur la viabilité des procédés.

Globalement, les applications des liquides ioniques dans les biotechnologies ont essentiellement concerné la catalyse enzymatique. Les processus impliquant des microorganismes et des bactéries, c'est-à-dire la cellule entière, ont plus rarement employé des liquides ioniques alors que l'utilisation de solvants moléculaires dans des procédés multiphasique est assez courante dans ces applications. Toutefois dès 2000, un processus biphasique employant du [BMIm][PF₆] est décrit pour une réaction de biotransformation où une bactérie, *Rhodococcus R312*, catalyse la réaction transformant le 1,3-dicyanobenzène en 3-cyanobenzamide et acide 3-cyanobenzoïque (Cull et al., 2000). Le liquide ionique est utilisé comme phase extractante et permet de résoudre les problèmes d'inhibition du catalyseur dus aux substrats et aux produits. Les auteurs ne décrivent aucun effet toxique du liquide ionique sur la bactérie. Dans une autre étude, Mehmood et al. ont étudié la possibilité d'utiliser le [EMIm][AcO] et le [EMIm][MeO(H)PO₂] à faible concentration (< 5 %) pour augmenter la production de bioéthanol en favorisant la voie métabolique de la fermentation des *Saccharomyces cerevisiae* (Mehmood et al., 2015). Les auteurs ont toutefois remarqué que les microorganismes avaient besoin d'une étape d'acclimatation aux liquides ioniques. Un article de revue assez récent décrit des travaux où les liquides ioniques sont utilisés dans des procédés de biotransformation (Fan et al., 2014).

Dans le domaine des piles à combustibles microbiennes, quelques travaux ont rapporté l'utilisation de liquides ioniques. Ainsi, le tétrafluoroborate de 1-éthyl-3-méthylimidazolium ([EMIm][BF₄]) a été employé en tant qu'électrolyte dans le but de catalyser la réaction de réduction du CO₂ dans le compartiment cathodique. Dans le compartiment anodique, des bactéries *Shewanella oneidensis* sont utilisées pour catalyser l'oxydation de lactate sur l'anode. Dans cette étude, le couplage de la réduction électrochimique de CO₂ catalysée par [EMIm][BF₄] avec une cellule d'électrolyse microbienne permet de diminuer de manière significative la tension externe appliquée, ce qui offre une possibilité de réduire le CO₂ (Li et al., 2013).

Les LIs ont été aussi utilisés pour modifier la surface d'électrodes dans les piles à combustible microbiennes (Wei et al., 2016a), (Zhao et al., 2013a). Dans ces deux exemples, les chercheurs ont greffé du bromure de 1-(3-aminopropyl) -3-méthylimidazolium à la surface

de nanotubes de carbone ou de nano-feuillets de graphène. Des anodes de carbones sont alors modifiées avec ces matériaux et utilisées dans des biopiles. La densité de puissance dans la pile utilisant une anode de carbone en présence de nano-feuillets de graphène modifiées est de 601 mW/m², ce qui est 4.2 et 3 fois plus important que dans le cas des anodes de carbone nu (142 mW/m²) et de carbone en présence de nano-feuillets de graphène non modifiées (203 mW/m²) respectivement. Cette amélioration significative de la densité de puissance a été attribuée à trois facteurs principaux : (i) aux interactions électrostatiques entre l'anode modifiée qui possède une charge positive, vérifiée par la mesure du potentiel zêta, et les cellules bactériennes chargées négativement. (ii) une grande surface spécifique pour l'adhésion des cellules bactériennes et (iii) une conductivité élevée pour un transfert d'électrons plus efficace (Zhao et al., 2013b). De même, la performance de la biopile intégrant les nanotubes de carbone est meilleure avec une puissance délivrée 3 fois plus importante que dans le cas d'une anode sans liquide ionique (Wei et al., 2016a). De façon remarquable, cette biopile présente une longévité améliorée. Dans aucun des deux cas, les auteurs ne notent d'effet toxique du liquide ionique immobilisé sur les bactéries *Shewanella*.

Une autre façon d'utiliser des liquides ioniques dans ce domaine des PCMs est de les utiliser pour former des membranes ((Hernández-Fernández et al., 2015), (Hernández-Fernández et al., 2016), (Koók et al., 2017), (Haj Kacem et al., 2017). Récemment, de nouvelles membranes préparées avec des liquides ioniques ont été considérées comme des concurrents prometteurs à des polymères classiques tels que Nafion® dans les PCMs (Koók et al., 2017). Les auteurs ont montré que la PCM qui fonctionne avec des membranes fabriquées avec du [BMIM][NTf₂]) possède un rendement énergétique plus élevé que celle avec le Nafion®. L'acétate a été utilisé dans les deux cas en tant que substrat. Koók et al. ont attribué cette efficacité à la participation des LIs au transport de protons qui se déroule entre les compartiments anodique et cathodique du système bioélectrochimique. Ainsi, la quantité de liquide ionique immobilisé dans la membrane est capable d'influencer la puissance des PCMs.

Néanmoins, de nombreuses études démontrent la toxicité des liquides ioniques sur différents microorganismes ou bactéries (Diaz et al., 2011), (Freemantle, 2006), (Pang et al., 2015), (Carson et al., 2009), (Anvari et al., 2016), (Amde et al., 2015), (Zheng et al., 2016), (Jing et al., 2016). Par exemple, les travaux de Wood et al. portant sur la toxicité des liquides ioniques sur *E. Coli*, ont démontré que les liquides ioniques ont des effets d'inhibition de la croissance des bactéries dépendants de la longueur de chaîne alkyle du cation, et, dans une

moindre mesure, de la nature des anions utilisés (Wood et al., 2011). L'effet inhibiteur dépend de la longueur de la chaîne alkyle qui peut provoquer des ruptures de membranes bactériennes (Petkovic et al., 2011). Une autre étude portant sur *E. coli* et sur *Staphylococcus aureus* montre que la toxicité du liquide ionique peut également augmenter avec la charge, un système bicationique étant plus toxique (Zheng et al., 2016). A la lecture de la littérature disponible, on peut toutefois observer que les publications décrivent des observations et résultats parfois contradictoires. Par exemple, [BMIm][PF₆] à une faible concentration 1 % est rapporté comme ayant un effet toxique sur la croissance d'*E. coli* (Lee et al., 2005), (Ganske and Bornscheuer, 2006) alors que Pfruender *et al.* n'ont noté aucun effet délétère sur cette même bactérie à une concentration de liquide ionique à 20 % (Pfruender et al., 2006). Dans une autre étude ce même liquide ionique est considéré comme toxique pour *S. cerevisiae* (Sendovski et al., 2010), contrairement aux travaux cités par (Pfruender et al., 2006). Des tests de toxicité sur *Vibrio fischeri* montrent une toxicité des liquides ioniques (Thuy Pham et al., 2010) à des concentrations 700 fois moins importantes que pour une souche bactérienne de *Pseudomonas* (Azimova Maria A. et al., 2009).

Ces apparentes contradictions démontrent tout l'intérêt d'étudier l'effet de liquides ioniques sur une communauté bactérienne. Les tests de toxicité sont généralement menés sur des souches bien définies en solution (mode de croissance planctonique). Toutefois, il y a un intérêt supplémentaire à étudier l'effet toxique ou antimicrobien d'un liquide ionique sur un biofilm (Carson et al., 2009). Le biofilm constitue le mode de croissance des bactéries le plus répandu, où les communautés bactériennes s'organisent et s'auto-protègent grâce à une matrice extracellulaire, comme expliqué dans le premier chapitre. Le biofilm fournit et maintient une sorte de micro-environnement favorable à la colonisation bactérienne, ce qui explique la résistance particulière de ces biofilms vis-à-vis de nombreux biocides ou antibiotiques. De plus, le fait d'intégrer ces biofilms dans une PCM peut permettre d'enregistrer par une simple mesure de courant l'effet toxique des liquides ioniques sur les bactéries constituant le biofilm.

IV.2 Effet d'un liquide ionique hydrophile; l'acétate de 1-butyl-3-méthylimidazolium

Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier l'effet d'un liquide ionique à base de cations imidazolium qui constituent une famille de liquides ioniques abondamment étudiée et utilisée. L'acétate étant utilisé comme substrat dans nos PCMs, nous avons retenu l'acétate

comme anion. La combinaison 1-butyl-3-méthylimidazolium et acétate donne un liquide ionique hydrophile, [BMIm][AcO], (Figure 2), qui est facilement synthétisé par échange d'anions à partir de chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazolium ([BMIm][Cl]) (voir chapitre II).

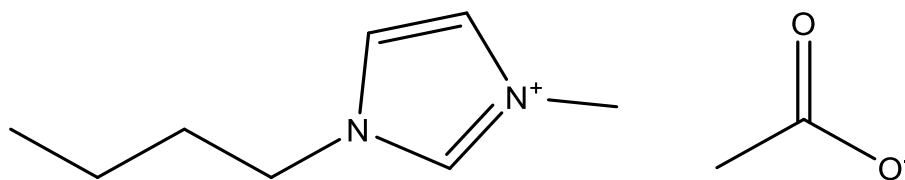


Figure 2 : Structure de l'acétate de 1-butyl-3-méthylimidazolium ([BMIm][AcO]).

IV.2.1 Biofilms développés sur graphite nu ou modifié avec des unités pyridine

IV.2.1.a Etude par voltamétrie cyclique

Des anodes de graphite, modifiées avec la pyridine et non modifiées, sont colonisées par des biofilms électroactifs. La formation des biofilms est contrôlée par la mesure de la différence de potentiel, comme expliqué dans le chapitre précédent. Dans chaque cas, on enregistre, à saturation d'acétate, un voltammogramme correspondant à l'oxydation biocatalytique de l'acétate par les biofilms. Puis 10 mM de [BMIm][AcO] sont ajoutés dans l'anolyte.

La Figure 3 ci-dessous montre l'évolution de courant catalytique de l'oxydation de l'acétate par des biofilms électroactifs mûres, âgés de trois mois, développés sur une anode modifiée avec la pyridine et sur une anode nue avant et après ajout de [BMIm][AcO].

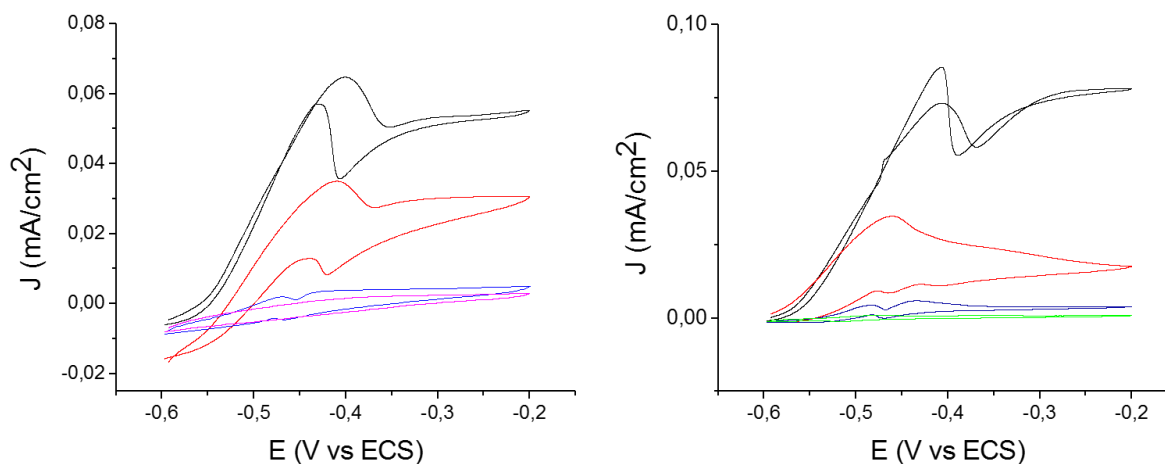


Figure 3 : Voltammogrammes cycliques présentant l'effet de [BMIm][AcO] sur le courant de l'oxydation biocatalytique de l'acétate par les biofilms. $v=5mV/s$. A gauche, biofilm développé sur une anode de graphite modifiée avec la pyridine: Avant ajout de [BMIm][AcO] (courbe noire), 30 s après l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] (courbe rouge), 3 heures après l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] (courbe bleue) et après tentative de récupération du courant catalytique par ajout de 20 mM d'acétate (courbe rose). A droite, biofilm développé sur une anode de graphite non modifiée ; Avant ajout de [BMIm][AcO] (courbe noire), 30 s après l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] (courbe rouge), 30 minutes après l'ajout de 10 mM de LI (courbe bleue) et 2 jours après l'ajout de 10 mM de LI (courbe verte).

Nous observons une chute rapide du courant catalytique de l'oxydation de l'acétate dès l'injection du liquide ionique (après 30 s). Le courant continue à diminuer jusqu'à devenir quasiment nul huit minutes après l'ajout de [BMIm][AcO]. Le courant catalytique reste nul, même après l'ajout de 20 mM de substrat (acétate) dans l'anolyte, indiquant un effet toxique pérenne du liquide ionique sur le biofilm. Une dizaine de biopiles contenant des anodes de graphite modifiées ou non avec la pyridine conduisent à la même observation, ce qui indique une bonne reproductibilité de ces résultats.

L'effet du liquide ionique est observable, assez spectaculairement, à l'œil nu. Des photos des anolytes des PCMs en absence et en présence de [BMIm][AcO] sont présentées sur la Figure 4. Le bécher (A) contient l'anolyte d'une PCM sans liquide ionique, la couleur est la même que celle de l'eau usée de départ contenant des bactéries et des matières organiques dispersées dans le milieu aqueux. Dans le cas d'un anolyte contenant le liquide ionique (B), nous observons une couleur jaunâtre et translucide environ trois jours après l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO], avec un dépôt blanchâtre au fond du bécher.



Figure 4 : Photo des anolytes des PCMs ; Sans [BMIm][AcO] (photo A) et en présence de 10 mM [BMIm][AcO] (photo B).

Une expérience de contrôle a été effectuée en ajoutant 10 mM de chlorure de potassium dans l'anolyte (Figure 5). Après avoir laissé le biofilm se développer sur l'électrode de graphite, nous avons enregistré le premier voltammogramme (courbe noire) qui présente la forme classique de la réponse d'un biofilm électroactif développé sur l'anode d'une PCM. Après ajout du chlorure de potassium dans l'anolyte, la courbe rouge, montre qu'après 24 heures il n'y a aucun effet sur le courant catalytique de l'oxydation de l'acétate. La nature des ions constituant le liquide ionique, notamment le cation est directement responsable de l'effet toxique sur le biofilm.

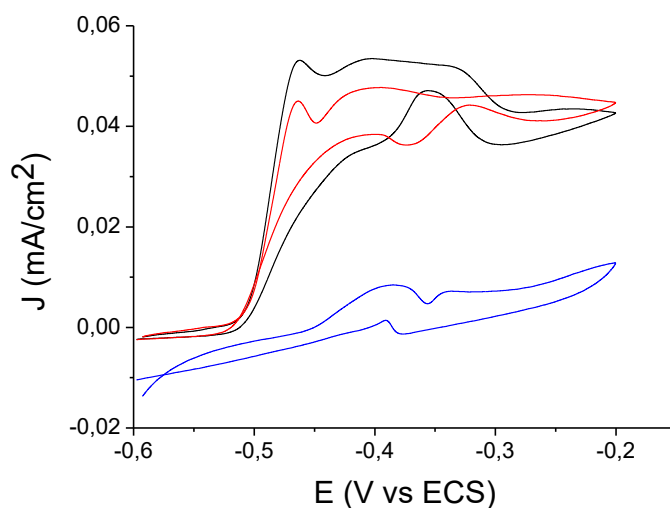


Figure 5 : Voltammogrammes cycliques comparant l'effet de l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] et de KCl sur le courant de l'oxydation biocatalytique de l'acétate par le biofilms sur une anode de graphite non modifiée; Avant ajout (courbe noire), 24 heures après l'ajout de 10 mM de KCl (courbe rouge) et 30 s après l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] (courbe bleue). $v=5\text{mV/s}$.

Lorsque le liquide ionique est introduit pour la première fois à l'anode, il est possible que le biofilm ait besoin d'un temps d'acclimatation. (Mehmood et al., 2015) ont en effet observé que *S. cerevisiae*, qui est une levure, nécessitait une phase d'acclimatation, par ajout de petites quantités de liquide ionique pour pouvoir fonctionner. De même, *Geobacillus* a pu être acclimaté par ajout de quantité croissante de [EMIm][AcO] (Jing et al., 2016). Une pile microbienne fonctionnelle avec un anolyte contenant 10 mM de [BMIm][AcO] est donc laissée dans ses conditions normales (température = 30°C, condition anaérobie et sans lumière) pendant plus d'une semaine. Nous avons ensuite ajouté 20 mM d'acétate (substrat) puis enregistré un voltammogramme (Figure 6). Le courant d'oxydation de l'acétate reste nul (courbe rouge), démontrant que les bactéries n'ont pas pu s'adapter dans ces conditions.

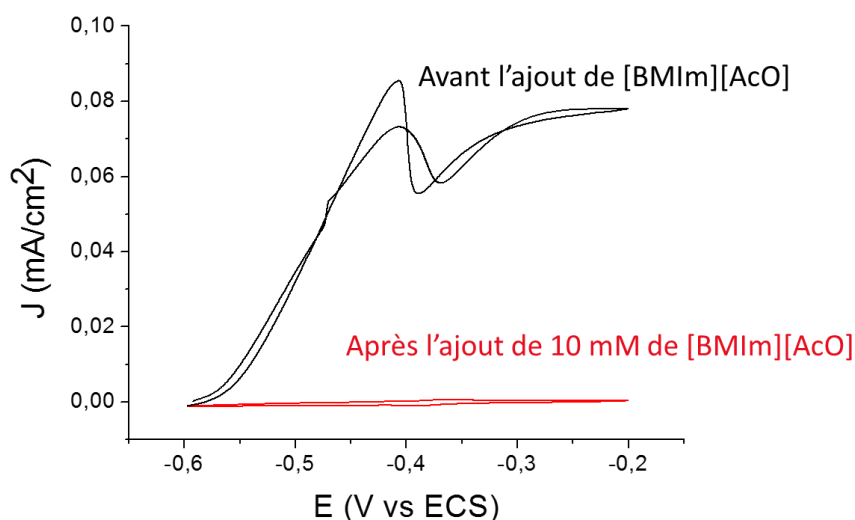


Figure 6 : Voltammogrammes cycliques présentant l'effet de LI sur le courant de l'oxydation biocatalytique de l'acétate par le biofilms sur une anode de graphite; Avant l'ajout de [BMIm][AcO] (courbe noire), après une semaine de l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] et 20 mM d'acétate (courbe rouge). $v=5mV/s$.

IV.2.1.b Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)

Les différents bioanodes fonctionnelles sont analysées par microscopie électronique à balayage (MEB). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 7 ci-dessous.

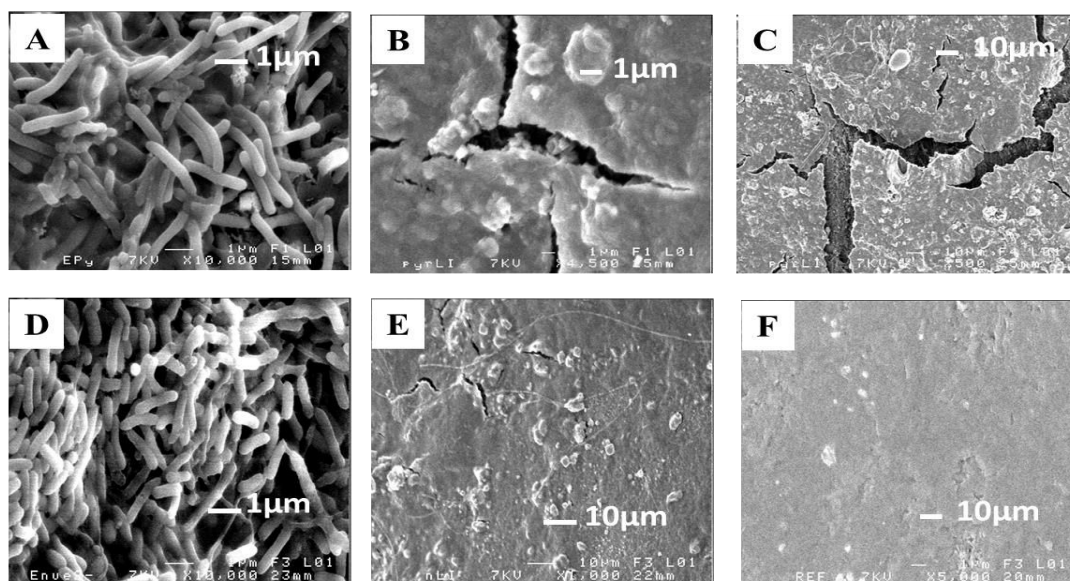


Figure 7 : Images par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) : électrode de graphite modifiée avec la pyridine et colonisée par un biofilm électroactif (A, B et C); avant l'ajout de [BMIm][AcO] (A), après l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] (B et C) ; électrode de graphite non modifiée et colonisée par un biofilm électroactif (D et E); avant l'ajout de [BMIm][AcO] (D), après l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] (E) ; électrode de graphite non colonisée (F).

Les images MEB des différentes électrodes de graphite, modifiées ou non, colonisées par des biofilms (Figure 7 A, et D), avant ajout de [BMIm][AcO], permettent d'observer des bactéries organisées de façon homogène sur les électrodes en biofilm (jusqu'à environ 10 μm d'épaisseur). Après ajout du liquide ionique dans l'anolyte, on peut très clairement voir que les biofilms ont disparu. On observe une sorte de couche qui recouvre l'électrode et qui tend à se décoller (Figure 5 B,C) ou s'est même totalement décollée (figure 5 E), donnant une image de surface très proche de celle d'une électrode de graphite propre non colonisée (Figure 7. F). Dans tous les cas, aucune trace de bactérie n'est observée.

IV.2.2 Développement d'un biofilm

Les expériences précédentes démontrent sans ambiguïté l'effet toxique de 10 mM de [BMIm][AcO] sur les bactéries formant les biofilms électroactifs. Nous sommes intéressés ensuite à l'effet de ce même liquide ionique dans les mêmes conditions de concentrations sur le développement du biofilm. Une série de quatre PCMs avec des anodes de graphite nues a été fabriquée en injectant 10 mM de [BMIm][AcO] dans l'anolyte de départ. Dans l'expérience de contrôle, en absence de liquide ionique, un biofilm électroactif se développe sur l'anode en quatre jours et on observe un courant d'oxydation biocatalytique de l'acétate (Figure 8). En présence de liquide ionique, aucun biofilm ne se développe après plusieurs jours (même après

trois mois), et la voltamétrie cyclique montre un courant nul en accord avec l'absence du biofilm électroactif responsable de l'oxydation du substrat (acétate). L'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] a un effet inhibiteur sur la formation de biofilm à la surface de l'électrode.

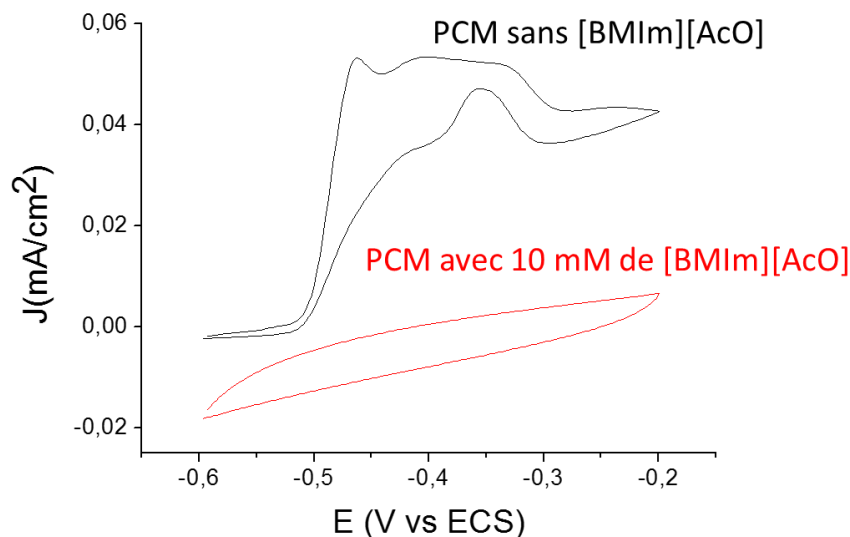


Figure 8 : Voltammogrammes cycliques présentant le courant de l'oxydation biocatalytique de l'acétate par le biofilms développé sur une anode de graphite en absence de LI (courbe noire) et en présence de 10 mM de [BMIm][AcO] dans l'anolyte de départ (courbe rouge). $v=5\text{mV/s}$.

IV.2.3 Inoculum

L'effet du liquide ionique sur les bactéries planctoniques de l'inoculum a ensuite été étudié. Nous avons analysé l'évolution de la population bactérienne par la mesure de la densité optique à 600 nm à l'aide de la loi Beer-Lambert (Équation 1). Lorsque des cellules sont en suspension dans un milieu liquide traversé par un faisceau lumineux monochromatique, la quantité de lumière absorbée et dispersée par la suspension dépend de la concentration des cellules et de leur taille. La relation entre l'absorbance et la concentration en cellules est linéaire dans une gamme de concentrations couvrant environ un ordre de grandeur.

$$A = \log_{10} \frac{I}{I_0} = \epsilon lc \quad \text{Équation 1}$$

La densité optique a été mesurée régulièrement à une longueur d'onde de 600 nm (Zheng et al., 2016) et l'évolution de la croissance de bactéries présentées dans nos échantillons est illustrée dans la Figure 9 ci-dessous. Dans cette expérience nous avons pris deux échantillons

contenant de l'eau usée diluée dans un tampon phosphate à pH = 7, et contenant 20 mM d'acétate. Dans l'un des échantillons nous avons ajouté 10 mM de [BMIm][AcO]. Les deux échantillons sont conservés à une température de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ sous des conditions anaérobiques.

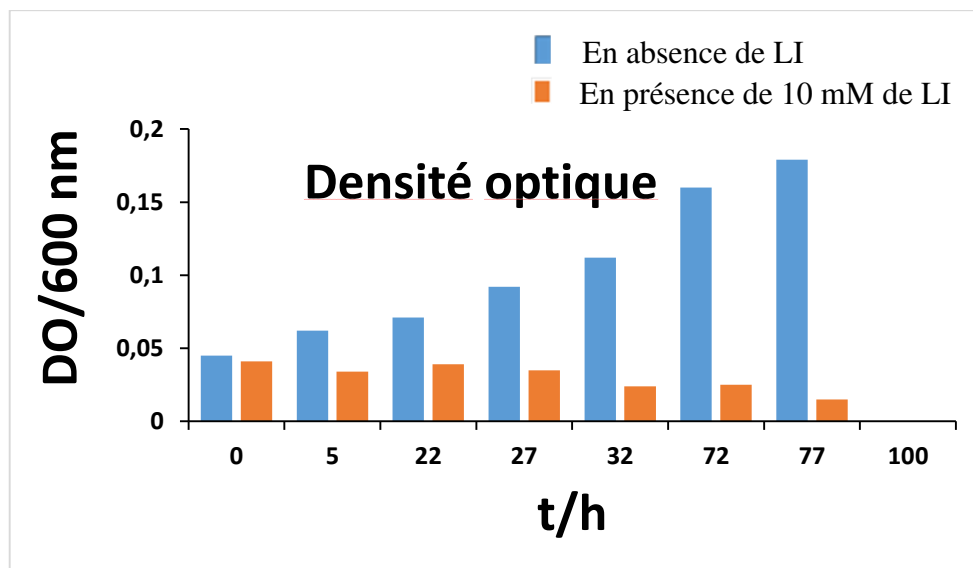


Figure 9 : Evolution de la densité optique en fonction de temps ; en absence de [BMIm][AcO] (Barres bleues) et en présence de 10 mM de [BMIm][AcO] (Barres oranges).

L'histogramme ci-dessus montre qu'en absence de liquide ionique, la densité optique augmente en fonction de temps. Cela traduit le fait que les bactéries sont en phase de croissance (multiplication). En revanche, lorsque 10 mM de [BMIm][AcO] est présent dans la solution, il n'y a pas d'augmentation de la densité optique. Une diminution de celle-ci est observée après 32 h, montrant que la quantité des bactéries présentes dans l'électrolyte diminue de façon remarquable. Cette diminution est en accord avec les résultats obtenus précédemment. Le [BMIm][AcO] est toxique vis-à-vis de la population de bactéries.

IV.2.4 Effet de la concentration de [BMIm][AcO]

Dans les études précédentes, nous avons testé l'effet de 10 mM de LI dans l'anolyte. Cette concentration, bien que modérée, peut s'avérer trop élevée, expliquant la toxicité du liquide ionique sur le biofilm. Nous avons donc effectué une série d'expériences en diminuant la concentration de [BMIm][AcO] ajouté.

Dans un premier temps, dans l'anolyte d'une PCMs contenant un biofilm électroactif déjà développé (âgé de 4 jours) sur l'anode de graphite, on ajoute 5 mM de [BMIm][AcO] et la

réponse du biofilm est enregistré par chronoampérométrie à $-0,4$ V vs ECS. La Figure 10 ci-dessous présente la réponse de la PCM lors de deux ajouts consécutifs..

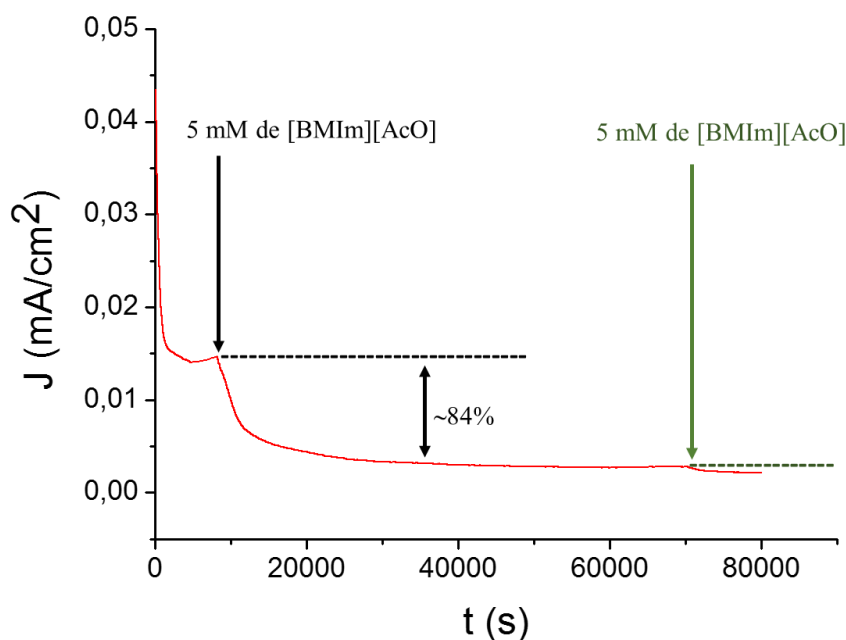


Figure 10 : Courbe chronoampérométrique illustrant l'effet de [BMIm][AcO] sur un biofilm jeune développé sur graphite enregistrée à un potentiel correspondant au courant maximum ($E = -0,4$ V vs ECS) : (1) après une première addition de 5 mM de [BMIm][AcO] dans l'anolyte et (2) après une seconde addition de 5 mM de [BMIm][AcO].

Avant l'addition de liquide ionique, on mesure la densité de courant en fonction du temps en appliquant un potentiel correspondant au courant maximum ($E = -0,4$ V vs ECS), associé à l'oxydation du substrat (acétate). A saturation d'acétate (20 mM), un courant stable est observé. Nous ajoutons alors 5 mM de [BMIm][AcO]. Immédiatement, une diminution d'environ 84 % de courant est observée sur la courbe. La deuxième addition de ce liquide ionique continue à provoquer une diminution de courant délivré par la PCM. Cette expérience est intéressante car elle indique que l'on peut littéralement suivre la toxicité du LI vis-à-vis du biofilm, assez simplement en enregistrant un courant.

Pour aller un peu plus loin, nous avons effectué des expériences en utilisant des concentrations encore plus faibles, et en injectant des concentrations croissantes de liquide ionique. Le courant catalytique issu de l'oxydation de l'acétate est mesuré à chaque ajout de [BMIm][AcO] sur les voltammogrammes ($\sim -0,45$ V vs ECS). La Figure 11 représente

l'évolution de courant de l'oxydation biocatalytique de l'acétate par un biofilm jeune (âgé de deux jours) à différentes concentrations de [BMIm][AcO].

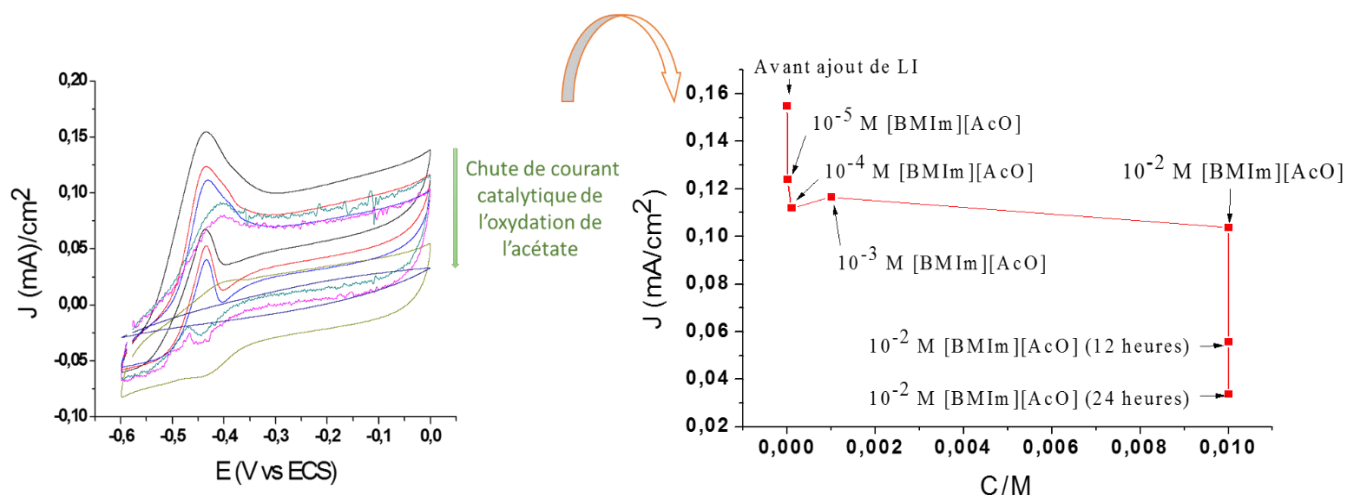


Figure 11 : À gauche, voltammogrammes cycliques présentant l'effet de [BMIm][AcO] sur le courant de l'oxydation biocatalytique de l'acétate par le biofilm sur une anode de graphite; Avant ajout de LI (courbe noire), après 30 s de l'ajout de 10^{-5} M de LI (courbe rouge), après ajout de 10^{-4} M de LI (courbe bleue), après ajout de 10^{-3} M de LI (courbe verte), après ajout de 10^{-2} M de LI (courbe rose) et après 24 heures de l'ajout de 10^{-2} M de LI (courbe violette). $v=5$ mV/s. À droite, courbe représentant l'évolution de courant catalytique de l'oxydation de l'acétate en fonction de la concentration de [BMIm][AcO] ajouté dans l'anolyte après le développement d'un biofilm sur l'anode.

Globalement, on observe que le courant catalytique de l'oxydation de l'acétate diminue progressivement en fonction de la quantité de LI ajoutée dans l'anolyte. De façon remarquable, le courant diminue même lorsque l'on ajoute une concentration très faible. On perd environ 20 % de courant catalytique de l'oxydation de l'acétate dès le premier ajout de 10^{-5} M de [BMIm][AcO] (en 4 minutes). Un ajout de 10^{-4} M entraîne une diminution un peu plus importante (28 %), mais on observe une sorte de palier puisque l'addition de 10^{-3} M, puis 10^{-2} M de [BMIm][AcO] ne conduit pas à une diminution plus importante du courant. Après 24 heures (ajout de 10^{-2} M [BMIm][AcO]), le courant est devenu quasiment nul. On observe ici que le [BMIm][AcO] a un effet toxique sur le fonctionnement du biofilm même à très faible concentration. Cet effet toxique peut être surveillé par la mesure du courant qui devrait permettre assez facilement de quantifier l'impact du liquide ionique sur le biofilm en fonction de la concentration du liquide ionique ajouté et en fonction du temps.

Comme expliqué en introduction, les propriétés comme la toxicité des liquides ioniques peuvent profondément varier en fonction de la combinaison anion/cation (Diaz et al., 2011). Nous nous sommes alors intéressés à des liquides ioniques hydrophobes, toujours à base du même cation imidazolium en changeant les anions.

IV.3 Effet des liquides ioniques hydrophobes

Dans ce cas, le 1-butyl-3-méthylimidazolium bis(trifluorométhylsulfonyl)imide ([BMIm][NTf₂]) et le 1-butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIM][PF₆]) (Figure 12), ont été synthétisés par la méthode d'échange d'anion à partir de bromure de 1-butyl-3-méthylimidazolium (protocole détaillé dans le chapitre II). Après la synthèse de ces LI, trois séries des piles à combustible microbiennes ont été fabriquées avec des anodes de graphite nues. Dans la première série, nous ajoutons 10 mM de [BMIm][NTf₂] dans l'anolyte. Dans la deuxième série, la même concentration en [BMIM][PF₆] est ajoutée dans l'anolyte. La troisième série ne contient aucun liquide ionique. On laisse évoluer les trois séries de biopiles dans les conditions normales ; température = 30 ± 2°C, sans lumière et sous condition anaérobique.

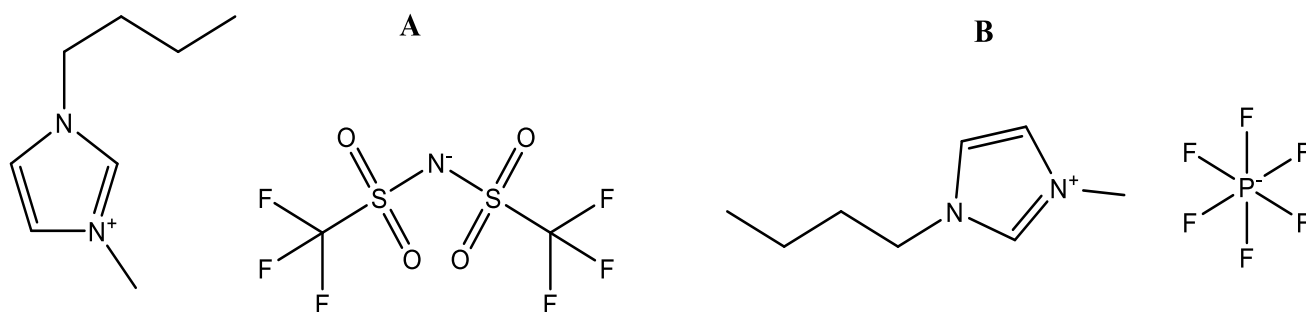


Figure 12 : structure de deux liquides ioniques hydrophiles : (A) le 1-butyl-3-méthylimidazolium bis(trifluorométhylsulfonyl)imide ([BMIm][NTf₂]), (B) le 1-butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIM][PF₆]).

IV.3.1 Effet de [BMIM][NTf₂] sur des biofilms développés

Dans la série ne contenant pas de liquides ioniques dans l'anolyte, une fois que le développement de biofilms est confirmé en effectuant les voltamétries cycliques sur les bioanodes (électrodes de travail), nous avons testé l'effet de l'ajout de 10 mM de [BMIm][NTf₂]

dans l'anolyte. La Figure 13 illustre la réponse de deux biofilms, un biofilm mature (âgé d'un mois et demi) et un biofilm jeune (âgé de cinq jours).

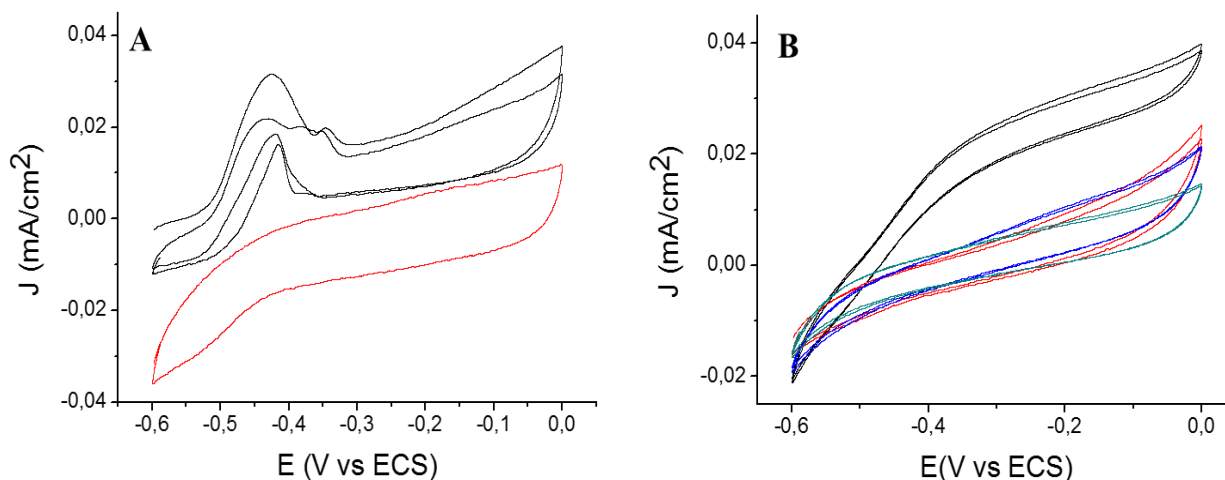


Figure 13 : Voltammogrammes cycliques présentant l'effet de $[BMIM][NTf_2]$ sur le courant de l'oxydation biocatalytique de l'acétate par un biofilm jeune âgé de 5 jours (courbe A) et un biofilm mature âgé d'un mois et demi (courbe B), sur une anode de graphite. Dans le cas de biofilm jeune (courbe A) ; avant l'ajout de LI (courbe noire), 30 s après l'ajout de 10 mM de $[BMIM][NTf_2]$ (courbe rouge). Dans le cas du biofilm mature (courbe B) ; avant l'ajout de LI (courbe noire), 30 s après l'ajout de $10^{-4}M$ de $[BMIM][NTf_2]$ (courbe rouge), après ajout de $10^{-3} M$ de $[BMIM][NTf_2]$ (courbe bleue) et après ajout de $10^{-2} M$ de $[BMIM][NTf_2]$.

La réponse de la bioanode par voltamétrie cyclique montre qu'en absence de LI (le $[BMIm][NTf_2]$) dans l'anolyte, la PCM présente un biofilm électroactif et un courant catalytique de l'oxydation de l'acétate. Quel que soit l'âge du biofilm formé sur la surface de l'anode de PCM, après l'ajout de $[BMIm][NTf_2]$ en solution, le courant chute rapidement (30 s après l'ajout de ce LI) et la réponse caractéristique du biofilm dans une PCM a disparu. Le biofilm est perturbé et il perd sa propriété catalytique en présence de $[BMIm][NTf_2]$ dans l'anolyte de PCM. Nous obtenons un effet toxique semblable à celui de $[BMIm][AcO]$ étudié dans la première partie de ce chapitre. Sur le biofilm mature, on remarque également que l'ajout de $10^{-4} M$ de $[BMIm][NTf_2]$ entraîne une diminution forte du courant d'oxydation catalytique, indiquant là aussi que le LI impacte le biofilm à faibles concentrations.

IV.3.2 Effet sur le développement de biofilm

Après avoir étudié l'effet de LIs hydrophobe sur les biofilms déjà développés sur les anodes de graphite, nous avons aussi testé l'effet de $[BMIm][NTf_2]$ et $[BMIm][PF_6]$ sur le

développement de biofilm. Deux séries de PCMs ont été fabriquées dans les mêmes conditions. Pour la première série, 10 mM de [BMIm][NTf₂] a été ajouté dans les compartiments anodiques. La deuxième série, contient 10 mM de [BMIm][PF₆]. Dans les deux cas, aucun biofilm ne se développe même après 30 jours (Figure 14). Bien que Diaz et ses collaborateurs aient montré que le [BMIm][PF₆] possède une toxicité moins importante que le [BMIm][NTf₂] (Diaz et al. 2011), ces deux types de liquides ioniques hydrophobes inhibent la formation et le développement de biofilm sur l'anode de la biopile.

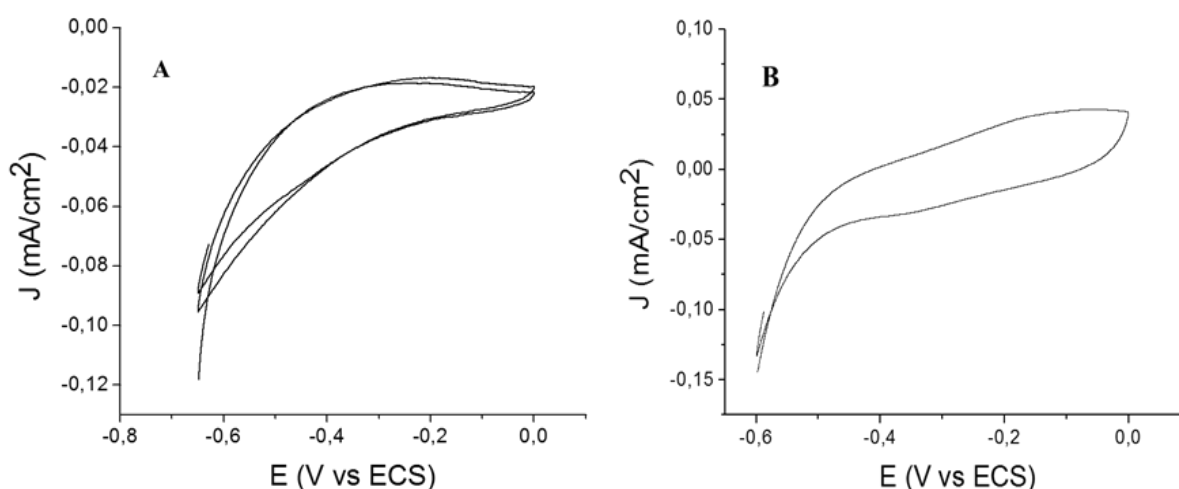


Figure 14 : Voltamétrie cyclique ($5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) d'une PCM contenant 10 mM de [BMIm][NTf₂] en solution après 1 mois de mise en fonction (courbe A) et d'une PCM contenant 10 mM de [BMIm][PF₆] en solution après 1 mois de mise en fonction (courbe B).

IV.4 Effet de liquides ioniques à base de cations pyridinium

Les LIs étudiés précédemment qu'ils soient hydrophiles ou hydrophobes, ont montré un effet toxique pour les biofilms développés sur la surface des anodes de PCMs et un effet inhibiteur sur la formation de ces biofilms. Les LIs à base de cations pyridinium sont moins toxiques que ceux à la base d'imidazolium d'après (Petkovic et al., 2011). Nous avons également observé dans le chapitre 3 précédent que la pyridine greffée sur la surface de l'électrode, partiellement sous forme pyridinium, améliore la performance de la PCM.

Nous nous sommes donc intéressés dans ce paragraphe à l'effet de deux liquides ioniques à base de cations pyridinium, le bis(trifluorométhyl)sulfonylimide de N-butylpyridinium ([Pyr₄][NTf₂]) et l'acétate de N-butylpyridinium ([Pyr₄][AcO]). Le premier liquide ionique est hydrophobe et le second hydrophile (Figure 15).

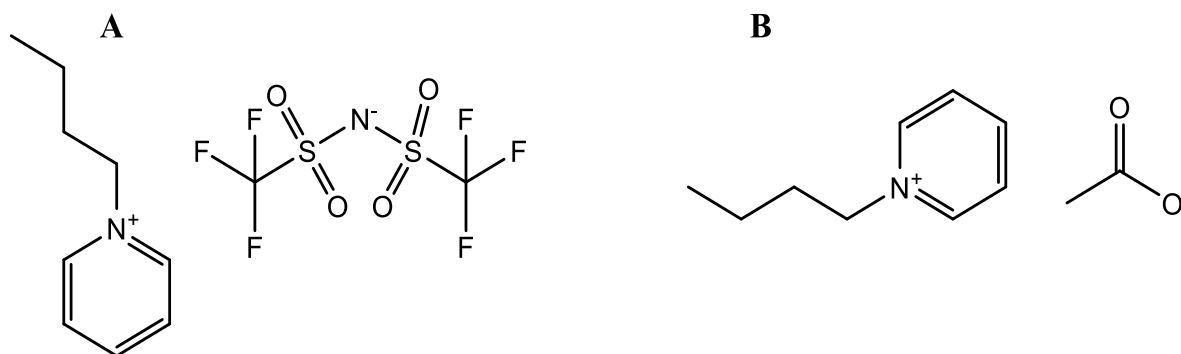


Figure 15 : Structure de deux liquides ioniques :
(A) le bis(trifluorométhyl)sulfonyl)imide de N-butylpyridinium ($[Pyr_4][NTf_2]$),
(B) l'acétate de N-butylpyridinium ($[Pyr_4][AcO]$).

Nous avons évalué l'effet de $[Pyr_4][NTf_2]$ à la fois sur le développement du biofilm et sur un biofilm jeune (6 jours) développé à l'anode de graphite (Figure 16).

Dans le premier cas, nous avons ajouté 10 mM de $[Pyr_4][NTf_2]$ dans l'anolyte. Les études montrent que le courant détecté est très faible, résultant de l'absence de biofilm anodique catalytique (Figure 16 A). Cette observation indique que le $[Pyr_4][NTf_2]$ inhibe la formation de biofilm sur l'anode.

Dans la deuxième série d'expérience, nous avons étudié l'effet de $[Pyr_4][NTf_2]$ sur le biofilm développé en injectant le liquide ionique à différentes concentrations dans l'anolyte (Figure 16 B). Comme précédemment nous nous plaçons à saturation de substrat et nous analysons l'effet du liquide ionique à partir de la variation du courant d'oxydation catalytique de l'acétate. On remarque que l'ajout d'une concentration faible (10^{-4} M) de liquide ionique n'entraîne pas de diminution significative du courant d'oxydation catalytique, contrairement à ce que l'on a pu observer avec les liquides ioniques à base de cations imidazolium. Ce résultat est en accord avec les études effectuées par (Petkovic et al., 2011) qui ont montré que les LIs à base de pyridinium sont moins toxiques que celui à base l'imidazolium. Néanmoins, en ajoutant des concentrations plus élevées, le courant catalytique de l'oxydation de l'acétate diminue fortement et est quasiment nul après ajout de 10^{-2} M de $[Pyr_4][NTf_2]$.

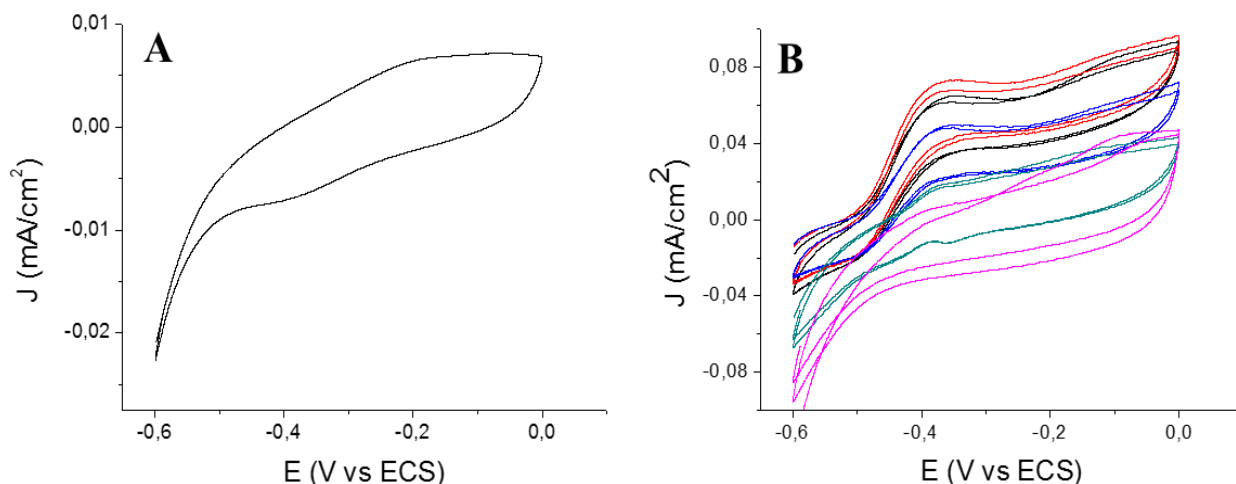


Figure 16 : Étude par voltamétrie cyclique de l'effet de $[Pyr_4][NTf_2]$ ajouté dans l'anolyte, Avant développement de biofilm (courbe A). Après six jours de développement du biofilm (courbe B) ; en saturation d'acétate (courbe rouge), 30 s après l'ajout de 10^{-4} M de $[Pyr_4][NTf_2]$ (courbe noire), 6 heures après l'ajout de 10^{-3} M de $[Pyr_4][NTf_2]$ (courbe bleue), 6 heures après l'ajout de 10^{-2} M de $[Pyr_4][NTf_2]$ (courbe verte) et 2 jours après l'ajout de 10^{-2} M de $[Pyr_4][NTf_2]$ (courbe rose). Vitesse de balayage: $v=5$ $mV.s^{-1}$.

Nous avons également évalué l'effet de $[Pyr_4][AcO]$ sur le développement du biofilm. La Figure 17 montre qu'en présence de 10 mM de $[Pyr_4][AcO]$ dans l'anolyte de la PCM, le courant détecté est très faible, résultant de l'absence de biofilm électroactif capable d'oxyder l'acétate en CO_2 . Ce résultat démontre que le $[Pyr_4][AcO]$ inhibe lui aussi la formation de biofilm sur l'anode.

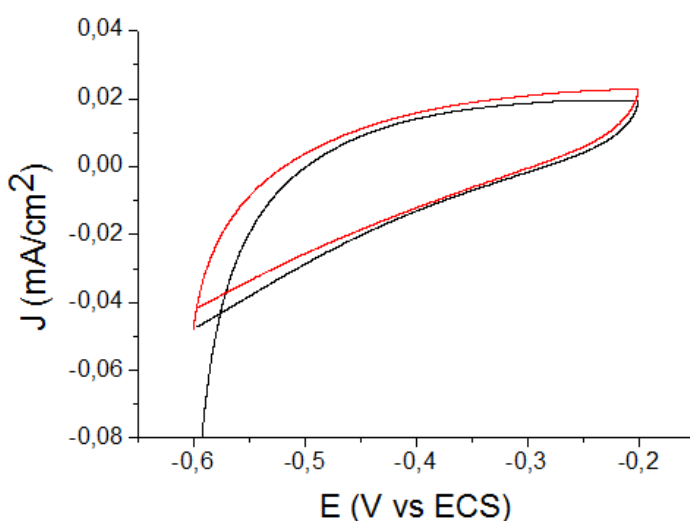


Figure 17 : Étude par voltamétrie cyclique de l'effet de $[Pyr_4][AcO]$ ajouté dans l'anolyte des PCMs avant le développement de biofilm sur la surface de l'électrode utilisée en tant qu'anode. Vitesse de balayage: $v=5$ $mV.s^{-1}$.

IV.5 Conclusion sur l'effet de liquides ioniques en solution sur les PCMs

Cinq liquides ioniques, hydrophiles ([BMIm][AcO] et [Pyr₄][AcO]) ou hydrophobes ([BMIm][NTf₂], [BMIm][PF₆] et [Pyr₄][NTf₂]), ont été étudiés dans la première partie de ce chapitre. Les différents LIs étudiés ont tous montré un effet toxique sur les biofilms des PCMs. Nous avons remarqué tout d'abord que le biofilm déjà développé sur l'anode de PCM cesse de fonctionner après l'ajout de différents LIs même à faibles concentrations. Les images MEB démontrent que le biofilm déjà développé sur les anodes, disparaît et se décolle de la surface des anodes. Dans le cas de la présence des LIs dans l'anolyte de la PCM du départ, aucun biofilm ne se développe, démontrant l'effet inhibiteur de ces composés. Les liquides ioniques testés montrent tous des capacités antimicrobiennes intéressantes dans nos conditions. Les résultats sont reproductibles d'un lot d'expériences à un autre.

Nos observations sont en accord avec différentes études effectuées par plusieurs équipes signifiant que ces liquides ioniques, miscibles à l'eau, à base d'imidazolium et de pyridinium entraînent l'inhibition de la croissance bactérienne. Le mécanisme est encore à l'étude mais plusieurs auteurs supposent que les liquides ioniques affectent la membrane cellulaire (Petkovic et al., 2011). La toxicité de ces liquides ioniques dépendrait surtout de la longueur de la chaîne alkyle portée par le cation imidazolium ou pyridinium. Les segments hydrophobes de ces composés s'insèrent dans la membrane lipidique des bactéries, conduisant à la création de pores dans la membrane cellulaire, à sa perméabilisation, sa rupture, et par conséquent, à la mort cellulaire (Gilmore et al., 2013), (Locock et al., 2014) (Zheng et al., 2016) (Jing et al., 2016). Les longueurs de chaîne considérées dans ces travaux correspondent à groupement en C10. Dans notre cas, nous obtenons une grande toxicité malgré la courte chaîne alkyle (en C4). Les différents LIs étudiés, même à faibles concentrations, entraînent généralement une perturbation importante du biofilm et par conséquent nous obtenons rapidement une chute complète du courant catalytique.

IV.6 Effet d'un LI greffé sur la surface de l'anode de la PCM

Dans le paragraphe I, nous avons vu un exemple de liquide ionique immobilisé par greffage covalent sur des surfaces de nanotubes de carbone ou des nano-feuillets de graphène (Zhao et al., 2013b), (Wei et al., 2016b). Nous avons constaté précédemment que la présence de liquide ionique dans l'anolyte, même à faibles concentrations, a un effet délétère sur le biofilm ou inhibiteur sur sa formation. Cela suppose donc de mettre le liquide ionique en

solution. D'un point de vue applicatif, le greffage ou l'immobilisation des liquides ioniques pourrait se révéler bien plus avantageux dans l'optique de lutter contre la formation du biofilm et le biocolmatage. Dans ce contexte, nous avons testé l'effet de 1-(3-aminopropyl)-3-méthylimidazolium (LI-NH₂) greffé sur les électrodes de graphite utilisées dans les PCMs.

IV.6.1 Synthèse du bromure de 1-(3-aminopropyl)-3-méthylimidazolium ; LI-NH₂

Dans un premier temps, nous avons synthétisé le bromure de 1-(3-aminopropyl)-3-méthylimidazolium (LI-NH₂) à partir d'hydrobromure de 3-bromopropylamine et de 1-méthylimidazole (selon le protocole détaillé dans le chapitre II matériels et méthodes et rapportée par (Yang et al., 2009) (Figure 18).

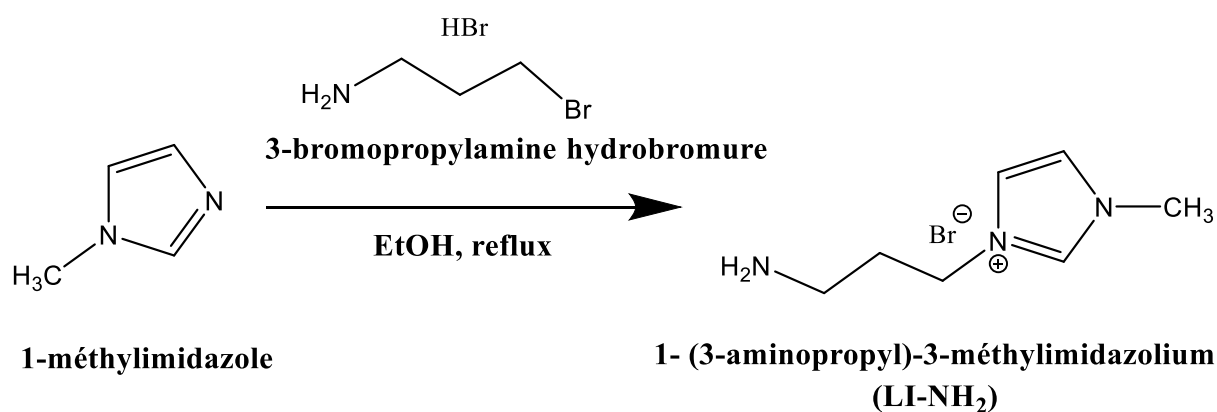


Figure 18 : Illustration de la synthèse de 1- (3-aminopropyl)-3-méthylimidazolium; LI-NH₂.

IV.6.2 Greffage de LI-NH₂

Pour pouvoir étudier la modification de surface avec ce composé, nous avons tout d'abord travaillé avec des électrodes de carbone vitreux avant d'appliquer ce greffage sur des électrodes en graphite et de les employer comme anodes dans des PCMs.

Nous avons utilisé deux méthodes de greffage, une méthode basée sur l'oxydation d'amines primaires (Gallardo et al., 2006) et une méthode en deux étapes consistant à électrogreffer le 4-carboxyphényldiazonium puis à faire un couplage chimique entre la fonction acide carboxylique immobilisée et le liquide ionique LI-NH₂ portant une fonction amine sur le cation imidazolium.

IV.6.2.a Voie oxydante

le LI-NH₂ est immobilisé sur la surface via l'oxydation de la fonction amine en milieu aprotique (*N,N*-Diméthylméthanamide ; DMF) (Figure 19). Une vague irréversible est observée par voltamétrie cyclique, et l'on observe que le courant de pic diminue faiblement au fur et à mesure des balayages récurrents. Ce comportement est assez classique de cette voie de greffage, toutefois la diminution de courant observée est généralement beaucoup plus importante.

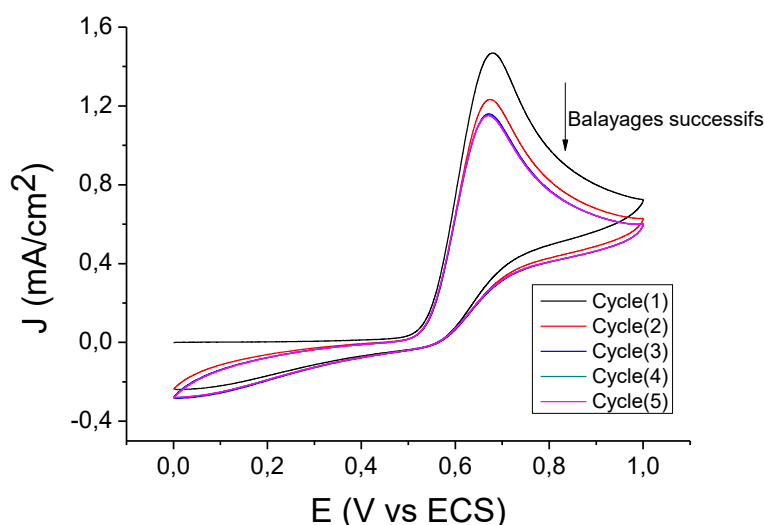


Figure 19 ; Voltammogrammes correspondant au greffage de LI-NH₂ par la méthode d'oxydation d'amines sur électrode de carbones vitreux. $v=50$ mV/s.

Nous avons voulu ensuite caractériser ces électrodes modifiées en étudiant leur réponse électrochimique vis-à-vis de sondes redox et par spectroscopie de photoélectron à rayons X (XPS). La Figure 20 présente le spectre XPS d'une surface de PPF ayant subi la modification. On voit clairement la contribution des éléments carbone et oxygène (contaminations) mais il n'est pas possible de mettre en évidence la présence d'azote (noyau imidazolium) qui pourrait confirmer l'immobilisation du liquide ionique.

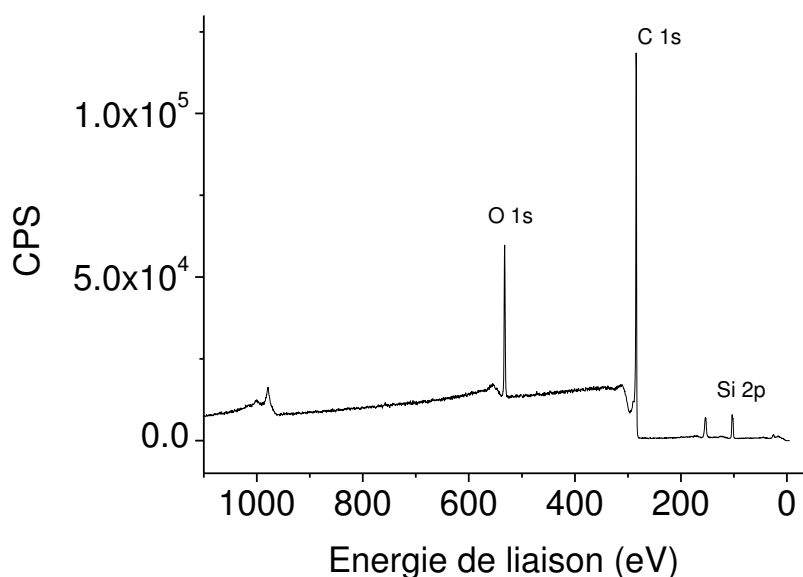


Figure 20 : Spectre XPS d'une surface de PPF modifiée avec de LI-NH₂ par la méthode d'oxydation d'amines.

De même, le comportement électrochimique d'une surface de carbone vitreux avant et après oxydation de LI-NH₂ vis-à-vis de ruthénium hexaammine et de ferricyanure de potassium ne permet pas de confirmer cette immobilisation, car on ne discerne aucune différence dans les voltammogrammes enregistrés sur surface nue ou greffée (Figure 21).

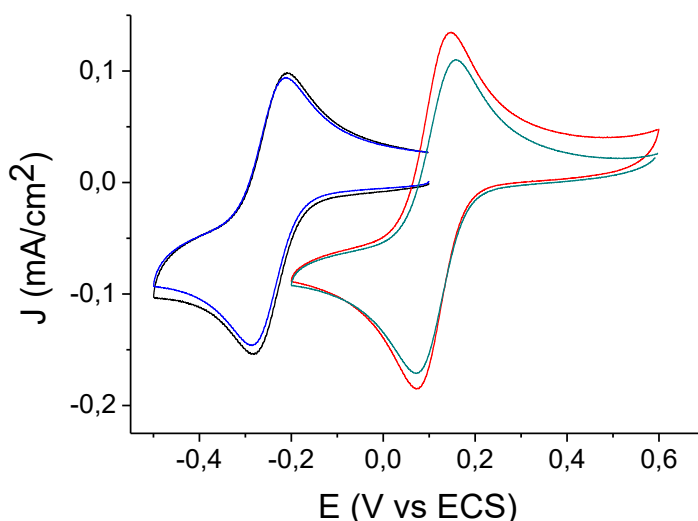


Figure 21 : Voltammogrammes d'oxydoréduction des sondes redox sur des électrodes de carbone vitreux à pH=7, avant et après modification avec LI-NH₂ par la méthode d'oxydation d'amines. $v=50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

A gauche oxydoréduction de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3]$ à 1 mM ; sur une électrode nue (courbe noire) et sur une électrode modifiée (courbe bleue).

A droite oxydoréduction de $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ à 1 mM ; sur une électrode nue (courbe verte) et sur une électrode modifiée (courbe noire).

A ce stade, nous avons échoué à mettre en évidence le greffage de LI-NH₂ sur PPF et sur carbone vitreux. Toutefois, des électrodes de graphite traitées par oxydation de LI-NH₂ ont été intégrées dans des PCMs et les résultats obtenus sont décrits plus loin.

IV.6.2.b Greffage en 2 étapes à partir de la réduction électrochimique de 4-carboxyphényldiazonium

Compte tenu des résultats assez décevants obtenus pour la caractérisation des surfaces modifiées par voie oxydante, nous sommes passés à une autre méthode de greffage en deux étapes. Dans un premier temps, nous réalisons l'électrogreffage des sels de diazonium de l'acide 4-aminobenzoïque, obtenus *in situ* à partir de l'acide 4-aminobenzoïque (20 mM) en milieu aqueux acide (HCl à 0.5 M) via l'ajout de nitrite de sodium (NaNO₂ à 40 mM). Ces surfaces d'électrodes modifiées portant des fonctions acides carboxyliques (R-COOH) sont ensuite activées par le chlorure d'oxalyle (COCl)₂ suivie par un couplage avec les fonctions NH₂ portées par le LI-NH₂. Enfin, les électrodes ont été rincées avec du DMF (diméthylformamide), de l'éthanol et de l'eau ultra pure. Les différentes étapes sont décrites sur la Figure 22.

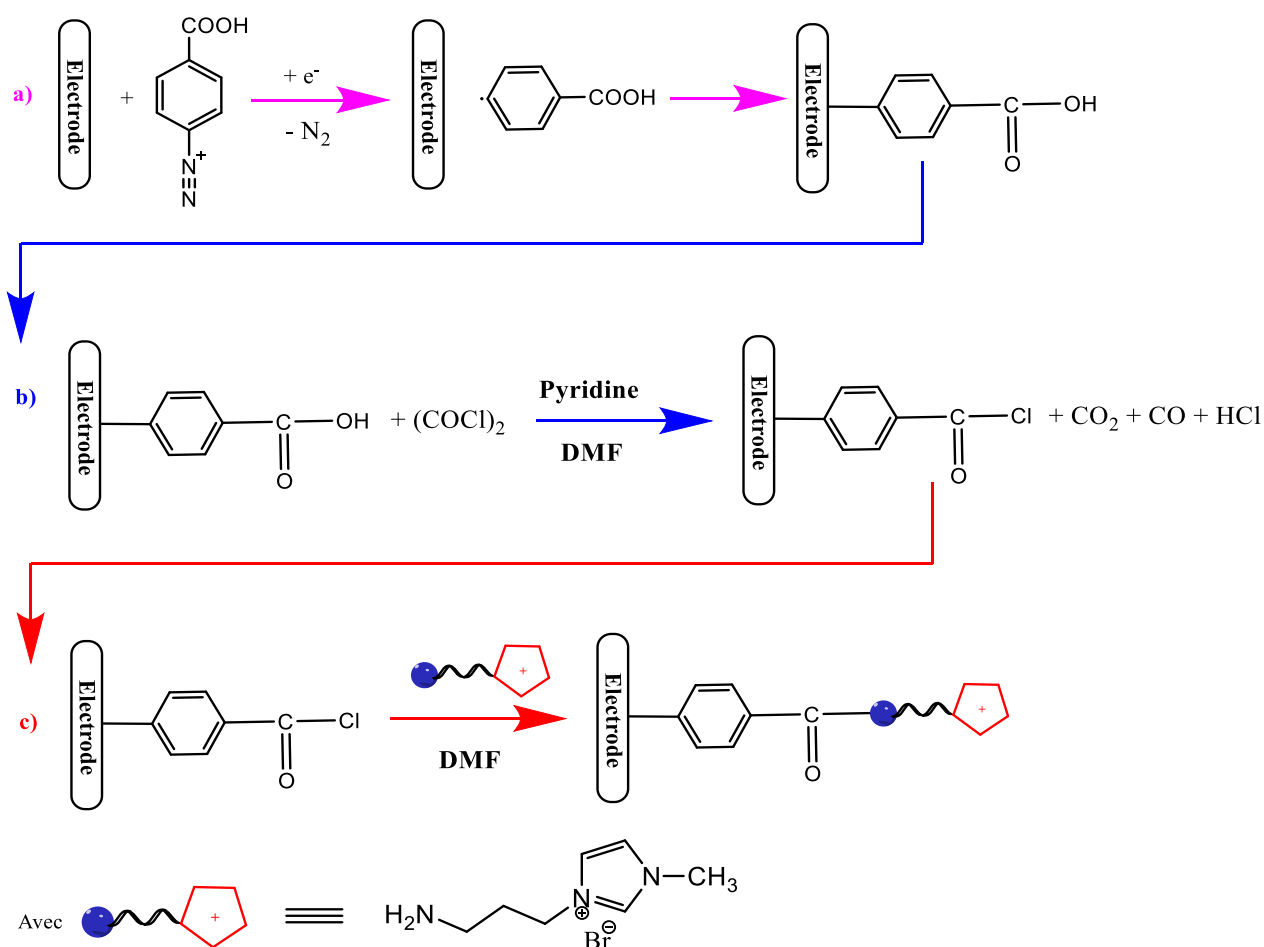


Figure 22 : Différentes étapes pour le couplage LI-NH₂ avec une couche de polyphénylène-acide acétique greffée sur une électrode de carbone vitreux. (a) formation de fonction polyphénylène acide acétique, (b) formation de chlorure d'acyle (R-COCl) sur le groupement COOH par ajout de chlorure d'oxalyle et (c) couplage de chlorure d'acyle avec le LI-NH₂.

Comme précédemment, nous avons analysé le comportement électrochimique de surfaces de carbone vitreux ainsi modifiées vis-à-vis de ferricyanure de potassium et de chlorure de ruthénium (III) hexaammine. Les électrodes se révèlent bloquantes après la première étape (Figure 22, étape a), indiquant le greffage de l'acide carboxylique. Après couplage (Figure 22, étape c), l'effet bloquant vis-à-vis de la sonde ferricyanure est perdu, probablement à cause de l'introduction de charges positives (imidazolium) en surface (Figure 23).

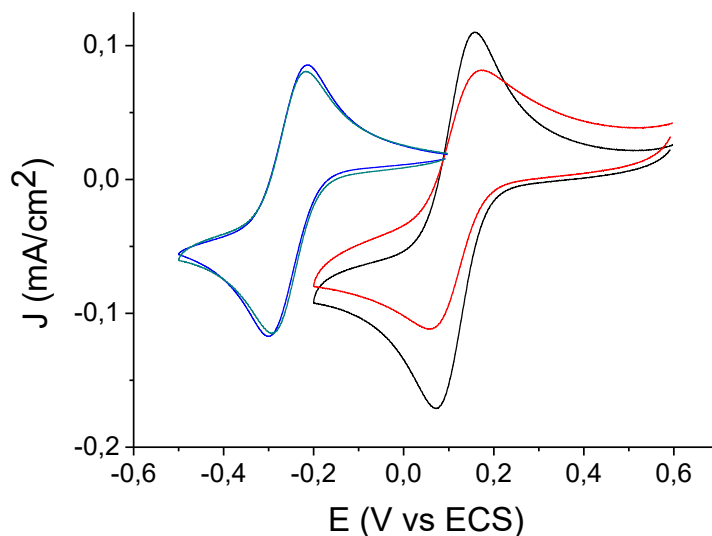


Figure 23 : Voltammogrammes d'oxydoréduction des sondes redox sur des électrodes de carbone vitreux à pH=7, avant et après modification avec de LI-NH₂ par la méthode de greffage en deux étapes. $v=50 \text{ mV.s}^{-1}$.

A gauche oxydoréduction de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ à 1 mM ; sur une électrode nue (courbe verte) et sur une électrode modifiée (courbe bleue).

A droite oxydoréduction de $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ à 1 mM ; sur une électrode nue (courbe noire) et sur une électrode modifiée (courbe rouge).

Le spectre XPS ne permet pas non plus d'affirmer avec certitude que LI-NH₂ a pu être immobilisé à la surface du PPF (Figure 24). En effet, on observe la présence d'azote sur le spectre, mais un pic du photoélectron N1s est également observé sur le spectre XPS d'une expérience de contrôle où seul l'acide carboxylique a été greffé, c'est-à-dire avant le couplage chimique. La seule différence est que la quantité d'azote relativement à la quantité de carbone (0.018) est légèrement inférieure à celle obtenue dans le premier cas (0.026).

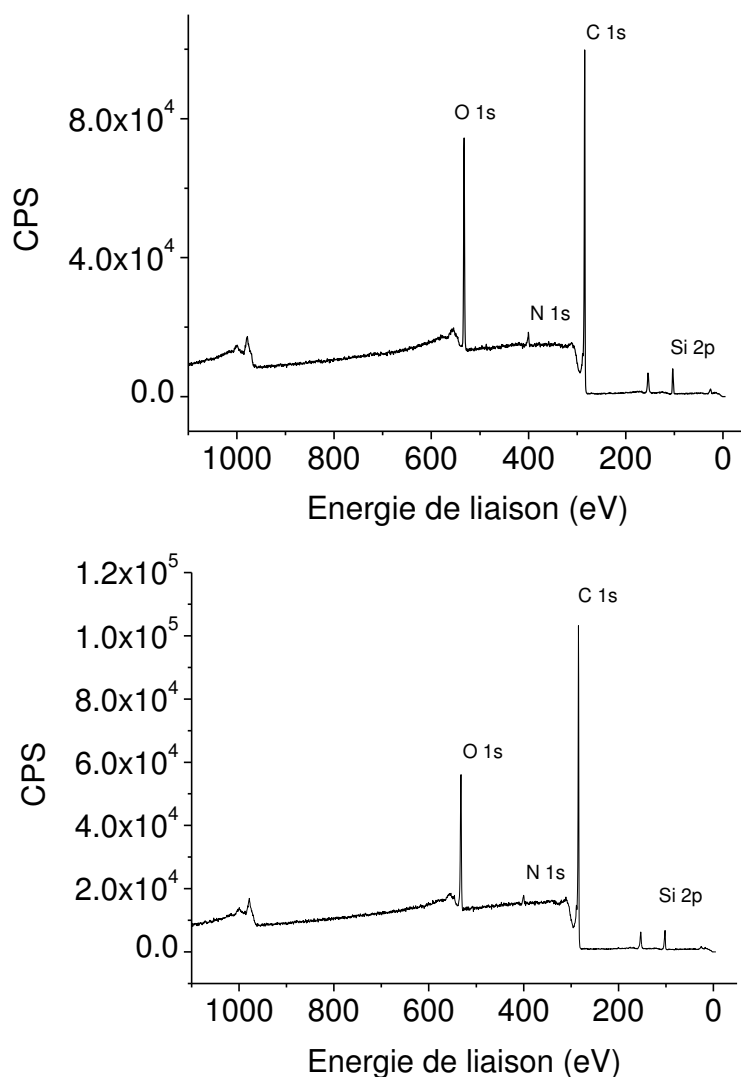


Figure 24 : Spectres XPS d'une surface de PPF modifiée avec de LI-NH₂ (en haut) et modifiée avec de COOH seulement (en bas).

Comme précédemment, nous avons tout de même appliqué cette méthodologie de greffage à des anodes de graphite intégrées par la suite dans des PCMs.

IV.6.3 Effet du LI greffé sur les anodes dans le fonctionnement de PCMs

Les électrodes de graphite « modifiées » soit par voie oxydante soit par la méthodologie en deux étapes sont employées dans des PCMs en tant qu'anodes. Classiquement, les biopiles se composent de deux compartiments. Un compartiment anodique contenant de l'eau usée, du tampon phosphate ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) à 20 mM et de l'acétate de potassium (CH_3COOK) à 20 mM. Dans le compartiment cathodique, le ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1 mM avec du tampon phosphate à 20 mM, a été utilisé en tant que catholyte. Dans toutes les PCMs les

anodes utilisées sont des barreaux de graphite d'une dizaine de centimètre carrés, « modifiées » avec le LI-NH₂ et les cathodes des barreaux ou des parallélépipèdes rectangles de graphite d'une vingtaine de centimètres carrés, non modifiées. Les biopiles sont développées dans des conditions normales (température de 30 ± 2°C, sans lumière et sans oxygène). La différence de potentiel (ΔE) est mesurée entre les deux électrodes (cathode et anode) régulièrement. Pour ces expériences, dans les deux cas, aucun biofilm ne se développe. Une série de trois biopiles a été étudiée. La Figure 25 ci-dessous montre un exemple de la réponse d'une PCM fonctionnant avec une anode de graphite modifiée avec le LI greffé à la surface.

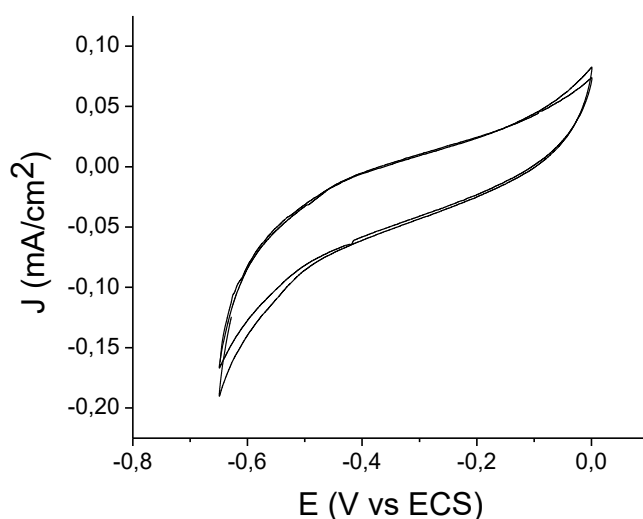


Figure 25: Exemple d'un voltammogramme (5 mV.s⁻¹) d'oxydation de l'acétate dans une PCM contenant une anode de graphite modifiée avec LI-NH₂ greffé à la surface après 1 mois de mise en fonction.

Ce résultat peut constituer une preuve indirecte de l'immobilisation de LI-NH₂ à la surface de l'anode de graphite. A part l'immobilisation de LI-NH₂, on peut envisager qu'au cours des procédures d'électrogreffage, soit lors de l'oxydation pour la voie oxydante soit lors de la réduction électrochimique du sel de diazonium, des fonctions oxygénées de type carboxylate sont générées à la surface de l'anode de graphite. Toutefois ces fonctions ne peuvent expliquer l'inhibition du développement du biofilm car plusieurs études ont montré que le biofilm est capable de se développer sur des anodes modifiées par des groupements carboxylates, même si la performance de ces PCMs est moins bonne (Santoro et al., 2015).

Il est donc probable que le LI-NH₂ puisse être immobilisé à la surface de l'anode de graphite. Celle-ci présente alors des propriétés antibiofilm. D'autres études seront bien sûr nécessaires pour confirmer ce phénomène, notamment pour mettre en évidence de façon plus directe le greffage ou l'immobilisation du liquide ionique.

IV.7 Effet des liquides ioniques sur la membrane échangeuse d'ions

Les propriétés d'inhibition des liquides sur la formation des biofilm sur les surfaces ou leur toxicité peuvent être très avantageusement utilisées pour résoudre l'une des limites opérationnelles des PCMs.

En effet, les biofilms peuvent se développer sur les membranes échangeuses d'ions utilisées dans les PCMs. Ce développement entraîne un colmatage des pores de la membrane, ce qui diminue le transport des ions entre les deux compartiments anodique et cathodique, et augmente par conséquent, la résistance interne de la pile. Ceci entraîne une diminution de la performance de ces biopiles. Au-delà du domaine des PCMs, trouver un moyen de protéger les surfaces de la formation de biofilm est une vraie problématique, car plusieurs domaines souffrent du développement de biofilms sur les surfaces. Ainsi, selon une étude de (Gindri et al., 2016), les LIs peuvent être employés pour protéger la surface de titane du développement de biofilms, notamment au niveau dentaire où les bactéries telles que: *Streptococcus mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. gordinii* et *S. uleris* sont capables de coloniser les implants dentaires en titane. En plus, les auteurs ont montré que le 1,10-bis(3-méthylimidazolium-1-yl)(décane diphénylalanine) et 1,10-bis(3-méthylimidazolium-1-yl) (décane diméthionine) peuvent être utilisés pour lutter contre l'infection due aux bactéries. De même, le chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazolium ([BMIm][Cl]) a montré sa capacité à être utilisé comme antiseptique et désinfectant de surface (Carson et al., 2009). Dans le même but, (Pang et al., 2015) ont greffé des liquides ioniques (LIs) sur des surfaces d'acier inoxydable. Dans ce travail, Pang et ses collaborateurs ont montré que la surface d'acier inoxydable modifiée avec les LIs présentait des effets antibactériens importants contre le développement d'*Escherichia coli*.

Dans le même esprit, nous cherchons à trouver un moyen de protéger la surface de la membrane contre le colmatage par les microorganismes qui a lieu dans le compartiment anodique de la PCM.

Dans un premier temps, nous vérifions le phénomène du colmatage de la membrane échangeuse d'ions à l'aide de la microscopie électronique à balayage (MEB). La Figure 26

montre des images de la membrane échangeuse de cations utilisée dans nos PCMs. Nous observons que dans le cas d'une membrane employée dans une biopile construite depuis deux mois (Figure 26 C), un biofilm se développe à la surface de cette membrane d'échange cationique. Dans le cas d'une pile contenant un biofilm jeune développé sur l'électrode et en fonctionnement depuis 5 jours, la membrane échangeuse d'ions (Figure 26 B) présente une morphologie semblable à celle d'une membrane de contrôle (Figure 26 A).

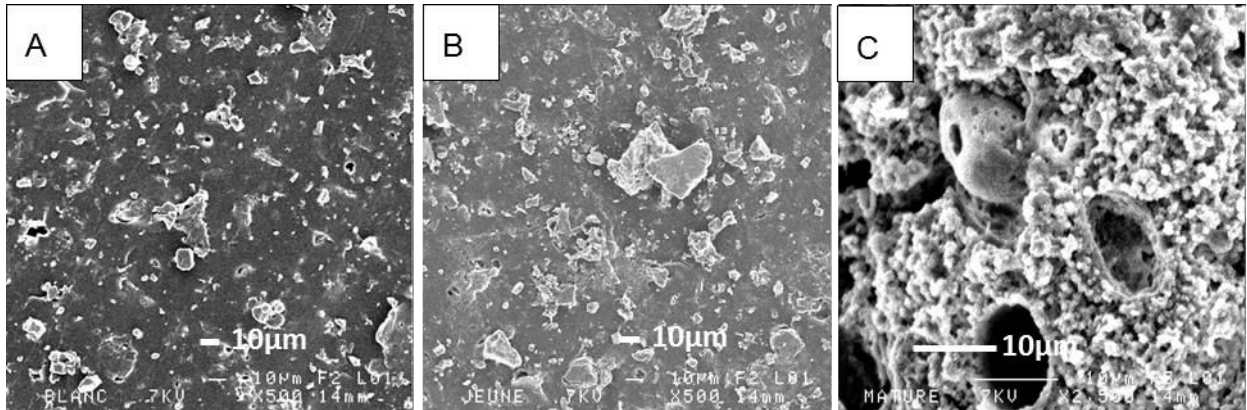


Figure 26 : Images par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) de membranes échangeuse de cations; (A) membrane de contrôle, (B) membrane utilisée dans une PCM en fonctionnement pendant 5 jours et (C) membrane utilisée dans une PCM en fonctionnement pendant deux mois.

Afin d'étudier l'effet de différents liquides ioniques sur la membrane échangeuse d'ions, nous avons coupé 5 échantillons de la membrane de Fumasep[®] renforcé en polyéthylène téréphtalate (PET) échangeuse de cations en petits carrés d'environ 1 cm² de surface (Figure 27). Cette membrane est celle que nous utilisons dans nos PCMs.



Figure 27 : Echantillon de la membrane d'échange d'ions utilisées pour étudier l'effet de différents LIs.

Quatre échantillons sont immergés pendant 4 jours dans différents LI ([BMIm][AcO], [BMIm][NTf₂], [BMIm][PF₆] et [Pyr₄][NTf₂]). Après un rinçage abondant à l'eau distillée, ces échantillons ainsi qu'un échantillon de contrôle, ont été plongés pendant deux mois dans l'eau usée contenant de l'acétate pour permettre la croissance des bactéries. Puis ces échantillons ont été analysés par MEB, suivant un traitement adéquat (voir chapitre II). La Figure 28 présente les images MEB enregistrées pour les différents échantillons.

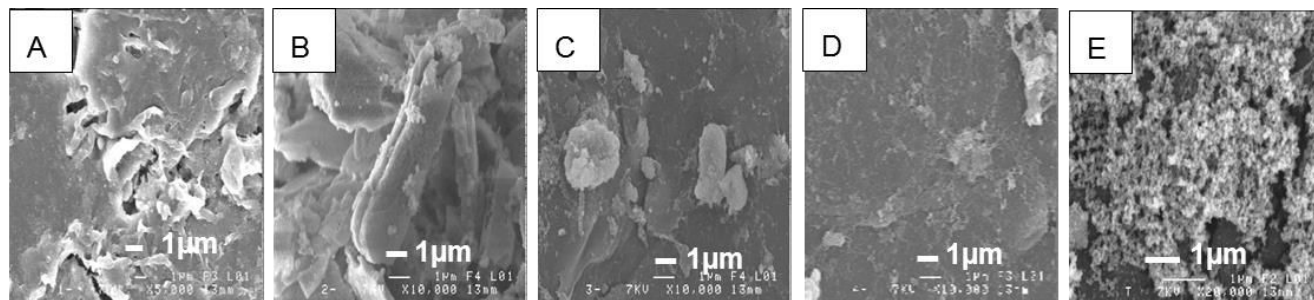


Figure 28 : Images par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) de membranes échangeuses de cations immergées dans différents LI; (A) membrane d'échange cationique mise dans l'eau usée + 20 mM d'acétate + 10 mM de [BMIm][AcO] depuis deux mois, (B) membrane d'échange cationique mise dans l'eau usée + 20 mM d'acétate + 10 mM de [BMIm][NTf₂] depuis 2 mois, (C) membrane d'échange cationique mise dans l'eau usée + 20 mM d'acétate + 10 mM de [BMIm][PF₆] depuis 2 mois, (D) membrane d'échange cationique mise dans l'eau usée + 20 mM d'acétate + 10 mM de [Pyr₄][NTf₂] depuis 2 mois; (E) membrane d'échange cationique mise dans l'eau usée + 20 mM d'acétate depuis deux mois, échantillon témoin.

De façon remarquable, les images MEB montrent que pour les membranes préalablement imprégnées de liquides ioniques, aucun biofilm ne se développe sur la surface de la membrane (Figure 28 A, B, C et D). En revanche, pour l'échantillon témoin, nous observons un biofilm développé sur la membrane d'échange de cations (Figure 28 E). Ce résultat préliminaire est très prometteur dans le but de développer une solution technique simple pour éviter à la membrane d'être colmatée par un biofilm à sa surface. Des travaux futurs, consistant à greffer les LI sur les membranes d'échange d'ions plutôt que d'imprégner les membranes, afin de limiter le lessivage des liquides ioniques dans l'anolyte, peuvent être intéressants pour éviter le développement de biofilms et par conséquent pour avoir une PCM à haute performance.

Les liquides ioniques peuvent être une réponse au biocolmatage de la membrane. Cependant, dans nos expériences en présence de 10 mM de liquides ioniques dans l'anolyte, nous avons également observé un accroissement de la perméabilité de la membrane dû aux liquides ioniques. Pour étudier plus précisément ce phénomène, nous avons utilisé des cellules

de PCMs dans lesquelles un compartiment ne contient qu'une solution aqueuse de KCl (0.1M) (compartiment A) pendant qu'une solution de ferricyanure de potassium à 1 mM en présence de KCl (0.1 M) est placée dans le deuxième compartiment (compartiment B). Les deux compartiments sont séparés par la membrane de Fumasep[®] renforcé en polyéthylène téréphtalate (PET) échangeuse de cations. Après un mois, nous n'observons pas de fuite du ferricyanure de potassium dans le compartiment A (Figure 29A). Dans une autre expérience très similaire, nous avons ajouté en plus dans le compartiment B, 10 mM de [BMIm][NTf₂]. Une semaine après l'ajout de ce LI, nous remarquons un changement de couleur de l'électrolyte dans le compartiment A (Figure 29B). L'observation a été poursuivie chaque semaine pendant quatre semaines. En examinant les différentes photos, nous observons que la concentration de ferricyanure de potassium augmente avec le temps dans le compartiment A car la coloration jaune due au ferricyanure de potassium s'intensifie (Figure 29C, D).

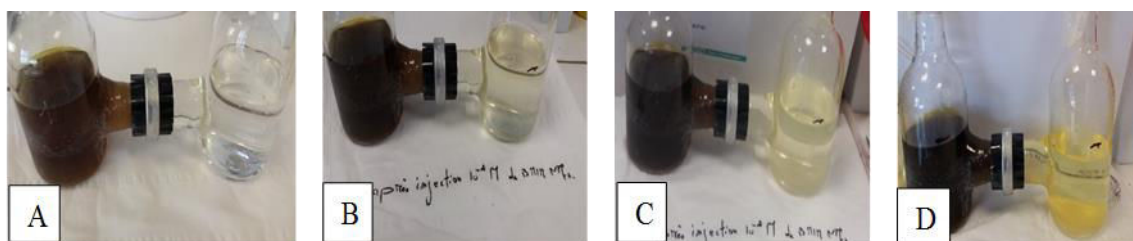


Figure 29 : Expérience effectuée pour étudier l'effet de [BMIm][NTf₂] sur la membrane d'échange d'ions. (A) avant l'injection de [BMIm][NTf₂], (B) après une semaine de l'injection de 10 mM de [BMIm][NTf₂], (C) après deux semaines de l'injection de [BMIm][NTf₂] et (D) après trois semaines de l'injection de [BMIm][NTf₂].

Nous avons également caractérisé électrochimiquement l'électrolyte du compartiment A à différents stades. La Figure 30 ci-dessous représente les voltammogrammes enregistrés sur une électrode de carbone vitreux nue, de 2 mm de diamètre dans l'électrolyte du compartiment A. Au démarrage de l'expérience, juste avant, l'ajout du liquide ionique, aucun signal redox dû au couple ferri-/ferrocyanure ne peut être observée (courbe noire).

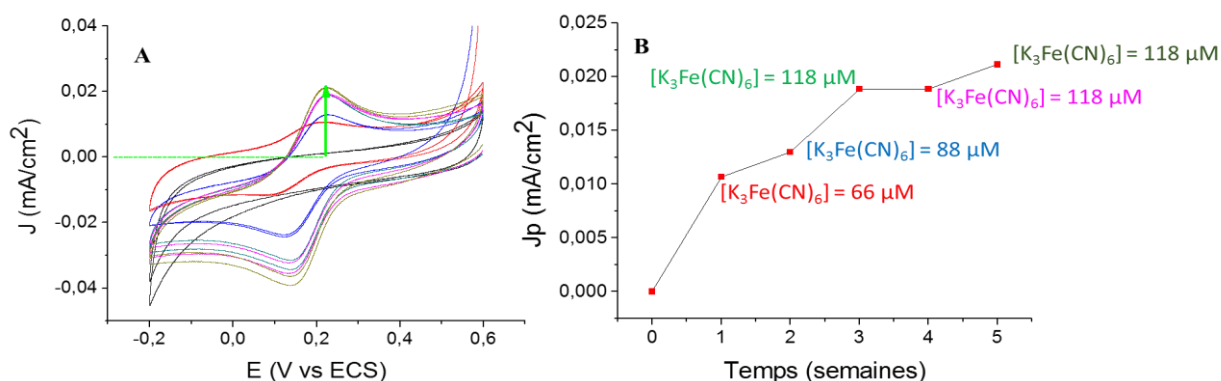


Figure 30 : (A) ; Effet de $[BMIm][NTf_2]$ sur la perméabilité de la membrane d'échange d'ions. Evolution de la concentration de ferricyanure de potassium dans le système ($H_2O + 10$ mM de $[BMIm][NTf_2] + KCl$ à 0,1 M) à $25^\circ C$ sur une électrode de carbone vitreux de diamètre de 2mm.. En absence de $[BMIm][NTf_2]$ (courbe noire). Une semaine après l'ajout de $[BMIm][NTf_2]$ (courbe rouge). Deux semaines après (courbe bleue), trois semaines après (courbe verte) et enfin un mois après l'ajout de $[BMIm][NTf_2]$ (courbe rose).

Une semaine après l'injection de 10 mM de $[BMIm][NTf_2]$, nous enregistrons un signal redox clairement défini (courbe rouge) qui correspond à la réduction réversible monoélectronique du couple ferri-/ferrocyanure de potassium. Ce signal est de mieux en mieux défini, avec une amplitude croissante après deux semaines (courbe bleue), trois semaines (courbe verte) puis quatre semaines (courbe rose). Les voltammogrammes montrent clairement que la concentration de ferricyanure de potassium augmente avec le temps dans l'électrolyte du compartiment A. Nous avons voulu calculer la concentration de $K_3Fe(CN)_6$ présente dans l'électrolyte à partir de la relation de Randles-Sevcik ci dessous.

$$I_p = 0.45nFAC\sqrt{D} \sqrt{\frac{nFv}{RT}} \quad \text{Équation 2}$$

Avec:

n: nombre d'électrons intervenant dans l'étape déterminant la vitesse de réaction

F: constante de Faraday (en $C \cdot mol^{-1}$)

A : surface de l'électrode (m^2)

C : la concentration de l'espèce étudiée dans solution

R: constante des gaz parfaits (en $JK^{-1}mol^{-1}$)

v : vitesse de balayage (Vs^{-1})

T: température (en K)

D: coefficient diffusion (m^2s^{-1})

Krulic et ses collaborateurs ont montré qu'à 25 °C et en présence de KCl comme électrolyte support, le coefficient de diffusion du ferricyanure de potassium ($D_{[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}}$) est égal à $6,9 \cdot 10^{-6} / \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ (Krulic et al., 1998). La Figure 30 (B) présente l'évolution de la concentration de ferricyanure de potassium en solution, enregistré durant 5 semaines.

Nous avons répété ces expériences avec deux autres liquides ioniques, le [BMIm][AcO] et le [Pyr₄][NTf₂]. Comme précédemment avec le [BMIm][NTf₂], les voltammogrammes enregistrés avec une électrode de carbone vitreux nue dans l'électrolyte du compartiment A montrent l'apparition du signal redox dû au couple ferri-/ferrocyanure, signal dont l'amplitude augmente avec le temps (Figure 31).

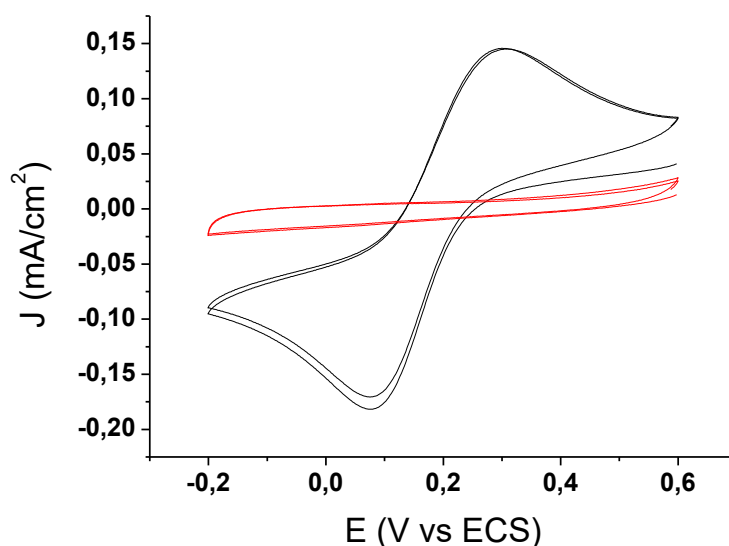


Figure 31 : Effet de [Pyr₄][NTf₂] sur la membrane de la biopile ; voltammogramme de l'anolyte d'une PCM sur électrode de carbone vitreux nue à 50 mV/s, en absence de LI (courbe rouge) et après 6 semaines d'ajout de 10 mM de de [Pyr₄][NTf₂] (courbe noire).

Ces expériences démontrent que la présence de liquides ioniques dans l'anolyte à la concentration de 10 mM modifie la perméabilité de la membrane d'échange d'ions. Des expériences supplémentaires devraient être effectuées pour analyser l'effet de la concentration en LI sur ces membranes, et plus généralement pour comprendre comment les liquides ioniques agissent sur la structure de la membrane.

IV.8 Conclusions du chapitre IV

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'effet de différents liquides ioniques sur l'activité de biofilms de piles à combustible microbiennes (PCMs). Dans cette étude, nous avons montré que ces composés possèdent une très bonne activité antimicrobienne. Les différents types de LIs testés dans ce travail ont montré un effet inhibiteur pour la croissance des microbes et un effet toxique pour les biofilms déjà développés sur la surface d'électrode. La toxicité des liquides ioniques vis-à-vis du biofilm tout comme leur effet inhibiteur peut être facilement suivi par des mesures de courant dans la biopile. Les premiers résultats que nous avons obtenus montrent que ces effets peuvent être quantifiés par l'intensité du courant enregistré. On pourrait ainsi envisager de faire des études de concentrations plus précises permettant d'évaluer le minimum de concentration inhibant la formation du biofilm tout en étudiant simultanément la cinétique du processus d'inhibition à une concentration donnée. En cela, on peut considérer que les PCMs utilisant des anodes microbiennes peuvent être des capteurs pour évaluer la toxicité des liquides ioniques.

Un autre point intéressant est la possibilité d'éviter le colmatage de la membrane échangeuse d'ions grâce aux liquides ioniques. Toutefois, on a observé que les liquides ioniques présent en solution entraînait une perméabilité non contrôlée de la membrane. Ainsi pour éviter cet effet, tout en s'affranchissant des problèmes de toxicité des liquides ioniques vis-à-vis du biofilm, on pourrait greffer un liquide ionique à la surface de la membrane. Des résultats préliminaires nous ont en effet permis de montrer l'effet inhibiteur d'un liquide ionique immobilisé à la surface du graphite. Néanmoins, ces résultats nécessitent d'être confortés notamment car nous n'avons pas pu mettre en évidence le greffage du liquide ionique par une preuve directe. Cette étude souligne l'intérêt des liquides ioniques en tant qu'agent antibiofilm. Industriellement, les biofilms microbiens sont responsables de milliards d'euros de perte de productivité chaque année car ils se développent dans presque tous les processus à base d'eau. Cependant, l'impact environnemental de ces réactifs doit être pris en considération.

Liste des figures

Figure 1: Evolution du nombre de publications portant sur le terme «Ionic liquid» dans la littérature depuis 2000 (d'après Sciences Direct-Août 2017).	188
Figure 2 : Structure de l'acétate de 1-butyl-3-méthylimidazolium ([BMIm][AcO]).....	193
Figure 3 : Voltammogrammes cycliques présentant l'effet de [BMIm][AcO] sur le courant de l'oxydation biocatalytique de l'acétate par les biofilms. $v=5\text{mV/s}$. A gauche, biofilm développé sur une anode de graphite modifiée avec la pyridine: Avant ajout de [BMIm][AcO] (courbe noire), 30 s après l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] (courbe rouge), 3 heures après l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] (courbe bleue) et après tentative de récupération du courant catalytique par ajout de 20 mM d'acétate (courbe rose). A droite, biofilm développé sur une anode de graphite non modifiée ; Avant ajout de [BMIm][AcO] (courbe noire), 30 s après l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] (courbe rouge), 30 minutes après l'ajout de 10 mM de LI (courbe bleue) et 2 jours après l'ajout de 10 mM de LI (courbe verte).	194
Figure 4 : Photo des anolytes des PCMs ; Sans [BMIm][AcO] (photo A) et en présence de 10 mM [BMIm][AcO] (photo B).	195
Figure 5 : Voltammogrammes cycliques comparant l'effet de l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] et de KCl sur le courant de l'oxydation biocatalytique de l'acétate par le biofilms sur une anode de graphite non modifiée; Avant ajout (courbe noire), 24 heures après l'ajout de 10 mM de KCl (courbe rouge) et 30 s après l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] (courbe bleue). $v=5\text{mV/s}$	195
Figure 6 : Voltammogrammes cycliques présentant l'effet de LI sur le courant de l'oxydation biocatalytique de l'acétate par le biofilms sur une anode de graphite; Avant l'ajout de [BMIm][AcO](courbe noire), après une semaine de l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO]et 20 mM d'acétate (courbe rouge). $v=5\text{mV/s}$	196
Figure 7 : Images par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) : électrode de graphite modifiée avec la pyridine et colonisée par un biofilm électroactif (A, B et C); avant l'ajout de [BMIm][AcO] (A), après l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] (B et C) ; électrode de graphite non modifiée et colonisée par un biofilm électroactif (D et E); avant l'ajout de [BMIm][AcO] (D), après l'ajout de 10 mM de [BMIm][AcO] (E) ; électrode de graphite non colonisée (F).	197

- Figure 8 : Voltammogrammes cycliques présentant le courant de l'oxydation biocatalytique de l'acétate par le biofilms développé sur une anode de graphite en absence de LI (courbe noire) et en présence de 10 mM de [BMIm][AcO] dans l'anolyte de départ (courbe rouge). $v=5\text{mV/s}$ 198
- Figure 9 : Evolution de la densité optique en fonction de temps ; en absence de [BMIm][AcO] (Barres bleues) et en présence de 10 mM de [BMIm][AcO] (Barres oranges). 199
- Figure 10 : Courbe chronoamperométrique illustrant l'effet de [BMIm][AcO] sur un biofilm jeune développé sur graphite enregistrée à un potentiel correspond au courant maximum ($E = -0,4 \text{ V vs ECS}$) : (1) après une première addition de 5 mM de [BMIm][AcO] dans l'anolyte et (2) après une seconde addition de 5 mM de [BMIm][AcO]. 200
- Figure 11 : À gauche, voltammogrammes cycliques présentant l'effet de [BMIm][AcO] sur le courant de l'oxydation biocatalytique de l'acétate par le biofilm sur une anode de graphite; Avant ajout de LI (courbe noire), après 30 s de l'ajout de 10^{-5}M de LI (courbe rouge), après ajout de 10^{-4} M de LI (courbe bleue), après ajout de 10^{-3} M de LI (courbe verte), après ajout de 10^{-2} M de LI (courbe rose) et après 24 heures de l'ajout de 10^{-2} M de LI (courbe violette). $v=5\text{mV/s}$. À droite, courbe représentant l'évolution de courant catalytique de l'oxydation de l'acétate en fonction de la concentration de [BMIm][AcO] ajouté dans l'anolyte après le développement d'un biofilm sur l'anode..... 201
- Figure 12 : structure de deux liquides ioniques hydrophiles : (A) le 1-butyl-3-méthylimidazolium bis(trifluorométhylsulfonyl)imide ([BMIm][NTf₂]), (B) le 1-butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIM][PF₆]). 202
- Figure 13 : Voltammogrammes cycliques présentant l'effet de [BMIM][NTf₂] sur le courant de l'oxydation biocatalytique de l'acétate par un biofilm jeune âgé de 5 jours (courbe A) et un biofilm mature âgé d'un mois et demi (courbe B), sur une anode de graphite. Dans le cas de biofilm jeune (courbe A) ; avant l'ajout de LI (courbe noire), 30 s après l'ajout de 10 mM de [BMIM][NTf₂] (courbe rouge). Dans le cas du biofilm mature (courbe B) ; avant l'ajout de LI (courbe noire), 30 s après l'ajout de 10^{-4}M de [BMIM][NTf₂] (courbe rouge), après ajout de 10^{-3} M de [BMIM][NTf₂] (courbe bleue) et après ajout de 10^{-2} M de [BMIM][NTf₂]..... 203

Figure 14 : Voltamétrie cyclique (5 mV.s ⁻¹) d'une PCM contenant 10 mM de [BMIm][NTf ₂] en solution après 1 mois de mise en fonction (courbe A) et d'une PCM contenant 10 mM de [BMIm][PF ₆] en solution après 1 mois de mise en fonction (courbe B).....	204
Figure 15 : Structure de deux liquides ioniques :.....	205
Figure 16 : Étude par voltamétrie cyclique de l'effet de [Pyr ₄][NTf ₂] ajouté dans l'anolyte., Avant développement de biofilm (courbe A). Après six jours de développement du biofilm (courbe B) ; en saturation d'acétate (courbe rouge), 30 s après l'ajout de 10 ⁻⁴ M de [Pyr ₄][NTf ₂] (courbe noire), 6 heures après l'ajout de 10 ⁻³ M de [Pyr ₄][NTf ₂] (courbe bleue), 6 heures après l'ajout de 10 ⁻² M de [Pyr ₄][NTf ₂] (courbe verte) et 2 jours après l'ajout de.....	206
Figure 17 : Étude par voltamétrie cyclique de l'effet de [Pyr ₄][AcO] ajouté dans l'anolyte des PCMs avant le développement de biofilm sur la surface de l'électrode utilisée en tant qu'anode. Vitesse de balayage: v=5 mV.s ⁻¹	206
Figure 18 : Illustration de la synthèse de 1- (3-aminopropyl)-3-méthylimidazolium; LI-NH ₂	208
Figure 19 ; Voltammogrammes correspondant au greffage de LI-NH ₂ par la méthode d'oxydation d'amines sur électrode de carbones vitreux. v=50 mV/s.	209
Figure 20 : Spectre XPS d'une surface de PPF modifiée avec de LI-NH ₂ par la méthode d'oxydation d'amines.	210
Figure 21 : Voltammogrammes d'oxydoréduction des sondes redox sur des électrodes de carbone vitreux à pH=7, avant et après modification avec LI-NH ₂ par la méthode d'oxydation d'amines. v=50 mV.s ⁻¹	210
Figure 22 : Différentes étapes pour le couplage LI-NH ₂ avec une couche de polyphénylène-acide acétique greffée sur une électrode de carbone vitreux. (a) formation de fonction polyphénylène acide acétique, (b) formation de chlorure d'acyle (R-COCl) sur le groupement COOH par ajout de chlorure d'oxalyle et (c) couplage de chlorure d'acyle avec le LI-NH ₂	212
Figure 23 : Voltammogrammes d'oxydoréduction des sondes redox sur des électrodes de carbone vitreux à pH=7, avant et après modification avec de LI-NH ₂ par la méthode de greffage en deux étapes. v=50 mV.s ⁻¹	213

Figure 24 : Spectres XPS d'une surface de PPF modifiée avec de LI-NH ₂ (en haut) et modifiée avec de COOH seulement (en bas).	214
Figure 25: Exemple d'un voltammogramme (5 mV.s ⁻¹) d'oxydation de l'acétate dans une PCM contenant une anode de graphite modifiée avec LI-NH ₂ greffé à la surface après 1 mois de mise en fonction.....	215
Figure 26 : Images par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) de membranes échangeuse de cations; (A) membrane de contrôle, (B) membrane utilisée dans une PCM en fonctionnement pendant 5 jours et (C) membrane utilisée dans une PCM en fonctionnement pendant deux mois.....	217
Figure 27 : Echantillon de la membrane d'échange d'ions utilisées pour étudier l'effet de différents LIs.	217
Figure 28 : Images par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) de membranes échangeuses de cations immergées dans différents LIs; (A) membrane d'échange cationique mise dans l'eau usée + 20 mM d'acétate + 10 mM de [BMIm][AcO] depuis deux mois, (B) membrane d'échange cationique mise dans l'eau usée + 20 mM d'acétate + 10 mM de [BMIm][NTf ₂] depuis 2 mois, (C) membrane d'échange cationique mise dans l'eau usée + 20 mM d'acétate + 10 mM de [BMIm][PF ₆] depuis 2 mois, (D) membrane d'échange cationique mise dans l'eau usée + 20 mM d'acétate + 10 mM de [Pyr ₄][NTf ₂] depuis 2 mois; (E) membrane d'échange cationique mise dans l'eau usée + 20 mM d'acétate depuis deux mois, échantillon témoin.	218
Figure 29 : Expérience effectuée pour étudier l'effet de [BMIm][NTf ₂] sur la membrane d'échange d'ions. (A) avant l'injection de [BMIm][NTf ₂], (B) après une semaine de l'injection de 10 mM de [BMIm][NTf ₂], (C) après deux semaines de l'injection de [BMIm][NTf ₂] et (D) après trois semaines de l'injection de [BMIm][NTf ₂].	219
Figure 30 : (A) ; Effet de [BMIm][NTf ₂] sur la perméabilité de la membrane d'échange d'ions. Evolution de la concentration de ferricyanure de potassium dans le système (H ₂ O+10 mM de [BMIm][NTf ₂]+KCl à 0,1 M) à 25°C sur une électrode de carbone vitreux de diamètre de 2mm.. En absence de [BMIm][NTf ₂](courbe noire). Une semaine après l'ajout de [BMIm][NTf ₂] (courbe rouge). Deux semaines après (courbe bleue), trois semaines après (courbe verte) et enfin un mois après l'ajout de [BMIm][NTf ₂] (courbe rose).....	220

Figure 31 : Effet de [Pyr₄][NTf₂] sur la membrane de la biopile ; voltammogramme de l'anolyte d'une PCM sur électrode de carbone vitreux nue à 50 mV/s, en absence de LI (courbe rouge) et après 6 semaines d'ajout de 10 mM de de [Pyr₄][NTf₂] (courbe noire).
..... 221

Références du chapitre IV

- Amde, M., Liu, J.-F., and Pang, L. (2015). Environmental Application, Fate, Effects, and Concerns of Ionic Liquids: A Review. *Environ. Sci. Technol.* *49*, 12611–12627.
- Angell, C.A., Byrne, N., and Belieres, J.-P. (2007). Parallel Developments in Aprotic and Protic Ionic Liquids: Physical Chemistry and Applications. *Acc. Chem. Res.* *40*, 1228–1236.
- Anvari, S., Hajfarajollah, H., Mokhtarani, B., Enayati, M., Sharifi, A., and Mirzaei, M. (2016). Antibacterial and anti-adhesive properties of ionic liquids with various cationic and anionic heads toward pathogenic bacteria. *J. Mol. Liq.* *221*, 685–690.
- Armand, M., Endres, F., MacFarlane, D.R., Ohno, H., and Scrosati, B. (2009). Ionic-liquid materials for the electrochemical challenges of the future. *Nat. Mater.* *8*, 621–629.
- Azimova Maria A., Morton Samuel A., and Frymier Paul D. (2009). Comparison of Three Bacterial Toxicity Assays for Imidazolium-Derived Ionic Liquids. *J. Environ. Eng.* *135*, 1388–1392.
- Carson, L., Chau, P.K.W., Earle, M.J., Gilea, M.A., Gilmore, B.F., Gorman, S.P., McCann, M.T., and Seddon, K.R. (2009). Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Green Chem.* *11*, 492–497.
- Cull, S. g., Holbrey, J. d., Vargas-Mora, V., Seddon, K. r., and Lye, G. j. (2000). Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. *Biotechnol. Bioeng.* *69*, 227–233.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* *2*, 114–122.
- Diaz, E., Monsalvo, V., Palomar, J., and Mohedano, A.F. (2011). Ionic Liquids: Bacterial Degradation in Wastewater Treatment Plants. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, (John Wiley & Sons, Ltd), p.
- Dupont, J., and Suarez, P.A.Z. (2006). Physico-chemical processes in imidazolium ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *8*, 2441–2452.
- Eshetu, G.G., Armand, M., Ohno, H., Scrosati, B., and Passerini, S. (2016). Ionic liquids as tailored media for the synthesis and processing of energy conversion materials. *Energy Env. Sci* *9*, 49–61.
- Fan, L.-L., Li, H.-J., and Chen, Q.-H. (2014). Applications and Mechanisms of Ionic Liquids in Whole-Cell Biotransformation. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 12196–12216.
- Freemantle, M. (2006). Ionic liquids can be distilled after all (AMER CHEMICAL SOC 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA).
- Fujita, K., MacFarlane, D.R., Forsyth, M., Yoshizawa-Fujita, M., Murata, K., Nakamura, N., and Ohno, H. (2007). Solubility and Stability of Cytochrome c in Hydrated Ionic Liquids: Effect of Oxo Acid Residues and Kosmotropicity. *Biomacromolecules* *8*, 2080–2086.
- Fujita, K., Nakamura, N., Murata, K., Igarashi, K., Samejima, M., and Ohno, H. (2011). Electrochemical analysis of electrode-immobilized dehydrogenases in hydrated choline dihydrogen phosphate-type ionic liquid. *Electrochimica Acta* *56*, 7224–7227.

- Fujita, K., Murata, K., Masuda, M., Nakamura, N., and Ohno, H. (2012). Ionic liquids designed for advanced applications in bioelectrochemistry. *RSC Adv.* 2, 4018–4030.
- Gallardo, I., Pinson, J., and Vilà, N. (2006). Spontaneous Attachment of Amines to Carbon and Metallic Surfaces. *J. Phys. Chem. B* 110, 19521–19529.
- Ganske, F., and Bornscheuer, U.T. (2006). Growth of *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Bacillus cereus* in the Presence of the Ionic Liquids [BMIM][BF₄] and [BMIM][PF₆] and Organic Solvents. *Biotechnol. Lett.* 28, 465–469.
- Gilmore, B.F., Andrews, G.P., Borberly, G., Earle, M.J., Gilea, M.A., Gorman, S.P., Lowry, A.F., McLaughlin, M., and Seddon, K.R. (2013). Enhanced antimicrobial activities of 1-alkyl-3-methyl imidazolium ionic liquids based on silver or copper containing anions. *New J. Chem.* 37, 873–876.
- Gindri, I.M., Palmer, K.L., Siddiqui, D.A., Aghyarian, S., Frizzo, C.P., Martins, M.A.P., and Rodrigues, D.C. (2016). Evaluation of mammalian and bacterial cell activity on titanium surface coated with dicationic imidazolium-based ionic liquids. *RSC Adv.* 6, 36475–36483.
- Haj Kacem, S., Galai, S., Pérez de los Ríos, A., Hernández Fernández, F.J., and Smaali, I. (2017). New efficient laccase immobilization strategy using ionic liquids for biocatalysis and microbial fuel cells applications: New Polymeric Ionic Liquid Laccase Membrane. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*
- Hallett, J.P., and Welton, T. (2011). Room-Temperature Ionic Liquids: Solvents for Synthesis and Catalysis. *Chem. Rev.* 111, 3508–3576.
- Hernández-Fernández, F.J., Pérez de los Ríos, A., Mateo-Ramírez, F., Godínez, C., Lozano-Blanco, L.J., Moreno, J.I., and Tomás-Alonso, F. (2015). New application of supported ionic liquids membranes as proton exchange membranes in microbial fuel cell for waste water treatment. *Chem. Eng. J.* 279, 115–119.
- Hernández-Fernández, F.J., de los Ríos, A.P., Mateo-Ramírez, F., Juárez, M.D., Lozano-Blanco, L.J., and Godínez, C. (2016). New application of polymer inclusion membrane based on ionic liquids as proton exchange membrane in microbial fuel cell. *Sep. Purif. Technol.* 160, 51–58.
- Holbrey, J.D., and Seddon, K.R. (1999). Ionic Liquids. *Clean Prod. Process.* 1, 223–236.
- H. Susan, M.A.B., Noda, A., Mitsushima, S., and Watanabe, M. (2003). Brønsted acid–base ionic liquids and their use as new materials for anhydrous proton conductors. *Chem. Commun.* 0, 938–939.
- Jing, B., Lan, N., Qiu, J., and Zhu, Y. (2016). Interaction of Ionic Liquids with a Lipid Bilayer: A Biophysical Study of Ionic Liquid Cytotoxicity. *J. Phys. Chem. B* 120, 2781–2789.
- Koók, L., Nemestóthy, N., Bakonyi, P., Zhen, G., Kumar, G., Lu, X., Su, L., Saratale, G.D., Kim, S.-H., and Gubicza, L. (2017). Performance evaluation of microbial electrochemical systems operated with Nafion and supported ionic liquid membranes. *Chemosphere* 175, 350–355.
- Krulic, D., Fatouros, N., and Khoshtariya, D.E. (1998). Kinetic data for the hexacyanoferrate (II)/(III) couple on platinum electrode in various chlorides of monovalent cations. *J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.* 95, 497–512.

- Lee, S.-M., Chang, W.-J., Choi, A.-R., and Koo, Y.-M. (2005). Influence of ionic liquids on the growth of *Escherichia coli*. *Korean J. Chem. Eng.* *22*, 687–690.
- Li, Z., Wang, Q., Liu, D., Yang, B., Zhang, X., and Lei, L. (2013). Ionic liquid-mediated electrochemical CO₂ reduction in a microbial electrolysis cell. *Electrochem. Commun.* *35*, 91–93.
- Locock, K.E.S., Michl, T.D., Stevens, N., Hayball, J.D., Vasilev, K., Postma, A., Griesser, H.J., Meagher, L., and Haeussler, M. (2014). Antimicrobial Polymethacrylates Synthesized as Mimics of Tryptophan-Rich Cationic Peptides. *ACS Macro Lett.* *3*, 319–323.
- Lozano, P., Diego, T. de, Carrié, D., Vaultier, M., and Iborra, J.L. (2002). Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Chem. Commun.* *0*, 692–693.
- Masuda, M., Motoyama, Y., Kuwahara, J., Nakamura, N., and Ohno, H. (2013). A paradoxical method for NAD⁺/NADH accumulation on an electrode surface using a hydrophobic ionic liquid. *Biosens. Bioelectron.* *39*, 334–337.
- Mate, D.M., and Alcalde, M. (2015). Laccase engineering: From rational design to directed evolution. *Biotechnol. Adv.* *33*, 25–40.
- Mehmood, N., Husson, E., Jacquard, C., Wewetzer, S., Büchs, J., Sarazin, C., and Gosselin, I. (2015). Impact of two ionic liquids, 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate and 1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate, on *Saccharomyces cerevisiae*: metabolic, physiologic, and morphological investigations. *Biotechnol. Biofuels* *8*, 17.
- Pang, L.Q., Zhong, L.J., Zhou, H.F., Wu, X.E., and Chen, X.D. (2015). Grafting of ionic liquids on stainless steel surface for antibacterial application. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *126*, 162–168.
- Petkovic, M., Seddon, K.R., Rebelo, L.P.N., and Pereira, C.S. (2011). Ionic liquids: a pathway to environmental acceptability. *Chem. Soc. Rev.* *40*, 1383–1403.
- Pfruender, H., Jones, R., and Weuster-Botz, D. (2006). Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis. *J. Biotechnol.* *124*, 182–190.
- Qian, Q., Su, L., Yu, P., Cheng, H., Lin, Y., Jin, X., and Mao, L. (2012). Ionic Liquid-Assisted Preparation of Laccase-Based Biocathodes with Improved Biocompatibility. *J. Phys. Chem. B* *116*, 5185–5191.
- van Rantwijk, F., and Sheldon, R.A. (2007). Biocatalysis in Ionic Liquids. *Chem. Rev.* *107*, 2757–2785.
- Rehmann, L., Ivanova, E., Nimal Gunaratne, H.Q., R. Seddon, K., and Stephens, G. (2014). Enhanced laccase stability through mediator partitioning into hydrophobic ionic liquids. *Green Chem.* *16*, 1462–1469.
- Santoro, C., Babanova, S., Artyushkova, K., Cornejo, J.A., Ista, L., Bretschger, O., Marsili, E., Atanassov, P., and Schuler, A.J. (2015). Influence of anode surface chemistry on microbial fuel cell operation. *Bioelectrochemistry* *106*, 141–149.
- Seddon, K.R. (1997). Ionic Liquids for Clean Technology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* *68*, 351–356.
- Sendovski, M., Nir, N., and Fishman, A. (2010). Bioproduction of 2-Phenylethanol in a Biphasic Ionic Liquid Aqueous System. *J. Agric. Food Chem.* *58*, 2260–2265.

- Sheldon, R. (2001). Catalytic reactions in ionic liquids. *Chem. Commun.* 0, 2399–2407.
- Sun, L., Zhang, X., Wang, W., and Chen, J. (2015). Carbon nanotube–ionic liquid composite gel based high-performance bioanode for glucose/O₂ biofuel cells. *Anal Methods* 7, 5060–5066.
- Thuy Pham, T.P., Cho, C.-W., and Yun, Y.-S. (2010). Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Res.* 44, 352–372.
- Wasserscheid, P., and Keim, W. (2000). Ionic Liquids—New “Solutions” for Transition Metal Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 3772–3789.
- Wasserscheid, P., and Welton, T. (2008). *Ionic Liquids in Synthesis* (John Wiley & Sons).
- Wei, H., Wu, X.-S., Zou, L., Wen, G.-Y., Liu, D.-Y., and Qiao, Y. (2016a). Amine-terminated ionic liquid functionalized carbon nanotubes for enhanced interfacial electron transfer of *Shewanella putrefaciens* anode in microbial fuel cells. *J. Power Sources* 315, 192–198.
- Wei, H., Wu, X.-S., Zou, L., Wen, G.-Y., Liu, D.-Y., and Qiao, Y. (2016b). Amine-terminated ionic liquid functionalized carbon nanotubes for enhanced interfacial electron transfer of *Shewanella putrefaciens* anode in microbial fuel cells. *J. Power Sources* 315, 192–198.
- Welton, T. (1999). Room-Temperature Ionic Liquids. *Solvents for Synthesis and Catalysis*. *Chem. Rev.* 99, 2071–2084.
- Welton, T. (2004). Ionic liquids in catalysis. *Coord. Chem. Rev.* 248, 2459–2477.
- Wood, N., Ferguson, J.L., Gunaratne, H.Q.N., Seddon, K.R., Goodacre, R., and Stephens, G.M. (2011). Screening ionic liquids for use in biotransformations with whole microbial cells. *Green Chem.* 13, 1843–1851.
- Xu, W., Wang, L.-M., Nieman, R.A., and Angell, C.A. (2003). Ionic Liquids of Chelated Orthoborates as Model Ionic Glassformers. *J. Phys. Chem. B* 107, 11749–11756.
- Yang, H., Shan, C., Li, F., Han, D., Zhang, Q., and Niu, L. (2009). Covalent functionalization of polydisperse chemically-converted graphene sheets with amine-terminated ionic liquid. *Chem. Commun.* 0, 3880–3882.
- Zhang, Y., Chen, X., Lan, J., You, J., and Chen, L. (2009). Synthesis and Biological Applications of Imidazolium-Based Polymerized Ionic Liquid as a Gene Delivery Vector. *Chem. Biol. Drug Des.* 74, 282–288.
- Zhao, H. (2010). Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids—a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 891–907.
- Zhao, C., Wang, Y., Shi, F., Zhang, J., and Zhu, J.-J. (2013a). High biocurrent generation in *Shewanella*-inoculated microbial fuel cells using ionic liquid functionalized graphene nanosheets as an anode. *Chem. Commun.* 49, 6668–6670.
- Zhao, C., Wang, Y., Shi, F., Zhang, J., and Zhu, J.-J. (2013b). High biocurrent generation in *Shewanella*-inoculated microbial fuel cells using ionic liquid functionalized graphene nanosheets as an anode. *Chem. Commun.* 49, 6668.
- Zheng, Z., Xu, Q., Guo, J., Qin, J., Mao, H., Wang, B., and Yan, F. (2016). Structure–Antibacterial Activity Relationships of Imidazolium-Type Ionic Liquid Monomers, Poly(ionic liquids) and Poly(ionic liquid) Membranes: Effect of Alkyl Chain Length and Cations. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 12684–12692.

Conclusions générales et perspectives

Les travaux effectués durant ces trois années de thèse avaient pour objectif d'étudier et d'optimiser des anodes microbiennes employées dans les piles à combustible microbiennes (PCMs). Les PCMs sont des dispositifs microbio-électrochimiques qui utilisent des biofilms bactériens électroactifs adhérents sur la surface de l'électrode afin de catalyser des réactions d'oxydoréduction anodique et/ou cathodique pour générer de l'énergie électrique (Logan et al., 2006).

Malgré une amélioration des performances et de la connaissance des électrodes microbiennes, le domaine des biopiles est toujours à l'état de développement en raison de faibles densités de puissances obtenues qui sont de l'ordre de quelques centaines de milliwatts par m² d'électrode.

Mon travail s'est orienté vers deux grands axes de recherche. J'ai d'abord étudié l'optimisation d'une anode microbienne en utilisant une anode modifiée avec des groupements pyridine. D'autre part, comme la nature et les propriétés physicochimiques de l'anolyte sont également un paramètre important dans le développement et les performances du biofilm bactérien électroactif, j'ai utilisé les PCMs pour étudier l'effet de l'ajout de différents liquides ioniques dans l'anolyte et évaluer leur toxicité.

La première partie de ce travail de thèse a été l'amélioration de la connexion des biofilms électroactifs à l'anode grâce à la fonctionnalisation de surface. Notre objectif était de greffer des fonctions chimiques de type pyridine sur la surface de l'électrode. Cette couche organique est obtenue via le greffage covalent de radicaux pyridyles sur la surface de l'électrode en utilisant la réduction électrochimique de cations diazopyridinium (Agullo et al., 2012). Dans un premier temps, nous avons montré que la méthode de réduction chimique de sels d'aryle diazonium a permis de greffer de façon covalente le 2-, 3- et 4-aminopyridinium sur des surfaces d'électrodes. Plus particulièrement, la 4-aminopyridine se greffe en couche fine et compacte sans ralentir de façon excessive les cinétiques de transfert d'électron entre une sonde électrochimique, le ferricyanure de potassium, et l'électrode. Ces couches sont donc, particulièrement intéressantes pour moduler l'interface entre les biofilms microbiens électroactifs et l'électrode car on peut obtenir des films minces et homogènes de façon reproductible qui ne bloquent pas complètement le transfert électronique et qui rendent la surface hydrophile favorisant l'adhésion microbienne. Des plaques de graphite de plusieurs dizaines de cm² ont été modifiées de cette façon et introduites dans des PCMs en tant que bioanodes microbiennes. Nous avons montré que cela permet de réduire le temps de formation

des biofilms et d'augmenter les performances des bioanodes développées. Les différences de puissances obtenues sont probablement dues à des interactions électrostatiques entre les surfaces modifiées et le biofilm anodique. En effet, la surface des bactéries est globalement chargée négativement. On aurait donc un effet d'attraction électrostatique pour le groupement partiellement chargé positivement à pH 7 (pyridinium) favorisant le transfert électronique biofilm/électrode. Il semble aussi que la pyridine greffée à la surface de l'électrode ait changé la structure de la surface de l'anode et a influencé l'adhésion et la connexion entre les bactéries et l'anode de la pile à combustible microbienne. Une étude comparative effectuée avec des anodes modifiées avec des multicouches de type polyphénylène (non protonable et plus hydrophobe) a montré des performances moindres qu'avec les anodes modifiées par des groupements pyridine.

Les liquides ioniques (LIs) à température ambiante présentent des propriétés uniques, notamment en termes de solvation, et leur utilisation dans des applications biotechnologiques a récemment émergé (Hapiot and Lagrost, 2008). Toutefois, leurs effets sur les biofilms bactériens restent encore peu connus. Pour ces raisons, le deuxième thème de ce travail de thèse était l'étude de l'effet de différents liquides ioniques hydrophiles et hydrophobes à base de cations imidazolium ou pyridinium dans l'anolyte à faible quantité, ou immobilisés à la surface de l'anode, sur l'activité de biofilms de piles à combustible microbiennes (PCMs).

Nous avons montré que l'ajout de certains liquides ioniques dans l'anolyte, ou immobilisés à la surface de l'anode inhibe le développement du biofilm. En effet, les différents types de LIs hydrophiles et hydrophobes à base de cations imidazolium ou pyridinium testés dans ce travail possèdent une excellente activité antimicrobienne. Un effet inhibiteur pour la croissance des microbes et un effet toxique pour les biofilms déjà développés sur la surface d'électrode est obtenu en présence de LIs dans l'anolyte même à très faible concentration. Cela offre la possibilité d'utiliser les bioanodes microbiennes en tant que biocapteurs pour la toxicité de ces liquides ioniques. Cet aspect important de l'activité antimicrobienne des LIs n'est évidemment pas favorable pour augmenter les performances des PCMs, mais nos résultats sont intéressants pour d'autres applications comme la lutte anti-bio-colmatage. Par exemple, nous avons montré qu'en présence de LIs, la membrane d'échange d'ions séparant les deux compartiments de la PCM, ne peut pas être colmatée par le développement d'un biofilm si les molécules anti-biofilms sont greffées sur la membrane, cela permettrait de préserver les propriétés de séparateur de la membrane de la PCM.

En perspective, ces travaux ouvrent plusieurs voies. Concernant les fonctionnalisations de surface, elles peuvent être encore plus spécifiques. On peut en effet imaginer le greffage de molécules ayant une affinité spécifique pour des souches ou espèces bactériennes que l'on veut cibler en surface des électrodes. D'autre part, il est aussi intéressant d'étudier et de modifier sur des électrodes granulaires dans des piles à combustible microbiennes en flux (Collaboration Wageningen University Sub-Department of Environmental Technology) (Deeke et al., 2015).

Cette étude souligne aussi l'intérêt des liquides ioniques en tant qu'agents antibiofilms qui pourraient avoir une gamme d'applications cliniques et industrielles. La membrane est un élément clef d'une PCM car elle permet le transport des protons de l'anode à la cathode. Cependant, dans une PCM en fonctionnement, le colmatage de la membrane peut compromettre son rôle. Des images par microscopie électronique à balayage ont montré le développement d'un biofilm microbien sur la membrane échangeuse d'ions. Greffer les groupements fonctionnels responsables de l'effet antimicrobien dans les liquides ioniques étudiés est une voie de recherche à développer pour éviter une des limites de la PCMs. Dans le même temps, cette stratégie éviterait le lessivage des liquides ioniques vers l'anolyte (ou le catholyte), potentiellement délétère pour le biofilm et permettrait également d'éviter l'augmentation de perméabilité de la membrane lors de l'ajout de liquides ioniques en solution.

Références

- Agullo, J., Canesi, S., Schaper, F., Morin, M., and Bélanger, D. (2012). Formation and Reactivity of 3-Diazopyridinium Cations and Influence on Their Reductive Electrografting on Glassy Carbon. *Langmuir* 28, 4889–4895.
- Deeke, A., Sleutels, T.H.J.A., Donkers, T.F.W., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., and Ter Heijne, A. (2015). Fluidized Capacitive Bioanode As a Novel Reactor Concept for the Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1929–1935.
- Hapiot, P., and Lagrost, C. (2008). Electrochemical Reactivity in Room-Temperature Ionic Liquids. *Chem. Rev.* 108, 2238–2264.
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., and Rabaey, K. (2006). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5181–5192.

CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

Publications :

- 1) H. Smiba, E. Lebègue, J-F. Bergamini, F. Barrière, C. Lagrost
“*Reductive electrografting of in situ produced diazopyridinium cations: tailoring the interface between carbon electrodes and electroactive bacterial films*”. *Bioelectrochemistry*, 2018, 120, 157-165, doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.12.006.
- 2) H. Smida, T. Flinois, E. Lebègue, C. Lagrost, F. Barrière
“*Microbial fuel cells – Wastewater utilization*”, In Reference Module in Chemistry Molecular Sciences and Chemical Engineering Elsevier, 2017, doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13465-1 (Chapitre de livre).
- 3) M. Cortés, H. Smida, C. Mériadec, F. Barrière, C. Lagrost
“*Direct SNI reaction at oxidized PPF surface*”, *Electrochemistry Communications*, 2017, 75, 48-51 (doi.org/10.1016/j.elecom.2016.12.016).
- 4) E. Lebègue, H. Smida, T. Flinois, V. Vié, C. Lagrost, F. Barrière
“*An optimal surface concentration of pure cardiolipin deposited onto glassy carbon electrode promoting the direct electron transfer of cytochrome-c*”, *Electroanalytical Chemistry*, 2018, 808, 286-292 (doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.12.024).
- 5) Y. Ai, H. Smida, J. Ghilane, N. Vila, J. Ghanbaja, A. Walcarius, J. C. Lacroix
“*Copper Nanowires through Oriented Mesoporous Silica: A Step towards Protected and Parallel Atomic Switches*”, *Scientific Reports*, 2017, 7: 17752 (doi: 10.1038/s41598-017-17048-z).

Article en préparation

- 6) H. Smida, C. Lagrost, F. Barrière
“*Microbial bioanodes as sensors for ionic liquids toxicity and anti-biofouling properties*”.

Conférences internationales:

En tant qu'orateur:

- 1) H. Smida, M. Cortés, T. Flinois, F. Barrière, C. Lagrost.
«*Greffage de pyridine sur graphite pour le développement de biofilms bactériens anodiques*». Journées d'Electrochimie 2015. Rome (Italie) 6-10 Juillet 2015.

En tant que co-auteur:

2) Y. Ai, H. Smida, A. Walcarius, J. Ghilane, J.C. Lacroix.

«*Conductance Quantization of Copper Nanowires on Indium Tin Oxide and on Oriented Mesoporous Silica toward Protected Atomic Nanowires Nanowires*».

Journées d'Electrochimie 2015. Rome (Italie) 6-10 Juillet 2015.

3) F. Barrière, H. Smida, C. Lagrost

«*Microbial bioanodes as sensors for ionic liquids toxicity and anti-biofouling properties*».

General meeting of the international society for microbial electrochemistry and technology.

Lisbon 3-6 Octobre 2017.

Conférences nationales en tant qu'orateur:

4) H. Smida, M. Cortés, F. Barrière, C. Lagrost.

«*Greffage de pyridine sur graphite pour le développement de biofilms bactériens anodiques*».

RNB 2015 - 7^e Colloque du Réseau National Biofilms. Toulouse (France) 2-3 Décembre 2015.

Conférences locales en tant qu'orateur:

5) H. Smida, M. Cortés, F. Barrière, C. Lagrost.

«*Pyridine grafting over graphite anodes for bacterial biofilms development*».

JDD 2016- *Journée des doctorants*. Rennes (France) 13 Janvier 2016.

6) H. Smida, F. Barrière, C. Lagrost

«*Tuning of electroactive microbial biofilms interface with an electrode surface: surface modification and medium effect*». JDD ISCR 2016- *Journée des doctorants institut des sciences chimiques Rennes*. Rennes (France) 18 Octobre 2016.

7) H. Smida, F. Barrière, C. Lagrost

«*Ionic liquid (IL) effects on the microbial bioanodes*»

Séminaire à l'extérieur de l'équipe MaCSE, UMR 6226, Saint Jacut. (France) 6-7 juin 2017.

Enseignement :

➤ **Durant l'année Universitaire 2015/2016:** Contrat d'enseignement en qualité de doctorant contractuel (68 heures), université Rennes1

✓ **Travaux pratiques de Chimie Théorique & Electrochimie (Master 1)**

TP1 : Etude de la décomposition de l'eau sur différentes électrodes.

TP2 : Comportement électrochimique de quelques métaux.

TP3 : Etude d'un système rapide $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$.

TP4 : Dosages potentiométriques et ampérométriques.

✓ **Travaux pratiques de Chimie Inorganique 2 et diagrammes de phases (Licence 2, 16 heures)**

✓ **Travaux pratiques d'équilibre chimique dans l'eau (Licence 1)**

TP1 : Dosage de solutions d'acide fort par une solution de base forte.

TP2 : Dosage de solutions de monoacide ou de monobase faible.

TP3 : Dosage de solutions d'acides faibles.

TP4 : Les complexes métalliques.

TP5 : Equilibre de complexation. Equilibre de précipitation.

TP6 : Equilibre de précipitation. Titrage des ions chlorure par la méthode de Mohr.

TP7 : Oxydo-réduction.

TP8 : Dosage redox d'une solution de fer (II) par une solution de cérium (IV).

Correction des comptes rendus des étudiants sur ce TP pour les 2 années universitaires consécutives.

➤ **Durant l'année Universitaire 2016-2017:** Contrat d'enseignement en qualité de doctorant contractuel (67 heures), Université Rennes 1.

✓ **Travaux pratiques de Chimie Théorique & Electrochimie (Master 1)**

TP1 : Etude de la décomposition de l'eau sur différentes électrodes.

TP2 : Comportement électrochimique de quelques métaux.

TP3 : Etude du système rapide $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$.

TP4 : Dosages potentiométriques et ampérométriques.

✓ **Travaux pratiques de chimie du vivant (Master 1)**

TP1 : Partie 1 : Recherches bibliographiques : Utilisation d'outils bioinformatiques.

Partie 2 : RMN des protéines en solution dans l'eau.

TP2 : Chromatographie sur résine échangeuse d'ions.

TP3 : Caractérisation spectroscopique et étude de stabilité

Partie 1 : Caractérisation UV-Visible des différents états physiologiques de l'Hémoglobine

Partie 2 : Caractérisation UV-Visible des différents états physiologiques de la Myoglobine et étude de sa stabilité vis-à-vis d'un agent chaotropique : le chlorure de guanidinium.

✓ **Travaux pratiques d'équilibre chimique dans l'eau (Licence 1)**

TP1: Dosage de solutions d'acide fort par une solution de base forte.

TP2: Dosage de solutions de monoacide ou de monobase faible.

TP3: Dosage de solutions d'acides faibles.

TP4: Les complexes métalliques.

TP5: Equilibre de complexation. Equilibre de précipitation.

Correction des comptes rendus des étudiants sur ce TP pour les 2 années universitaires consécutives.

Lauréate d'une Bourse attribuée par la Société Chimique de France pour participer aux "Journées d'Electrochimie 2015".

Supervision des activités de recherche :

2014/2015 : Thomas Flinois, stage de Master1 Biologie-Agronomie-Santé, mention Microbiologie Fondamentale et Appliquée, Université Rennes1 (Couplage entre métabolisme bactérien électroactifs et électrodes modifiées, Direction Dr. F. Barrière). thomas.flinois@univ-rennes1.fr

2015/2016 : Thomas Flinois, stage de Master2 Biologie-Agronomie-Santé, mention Microbiologie Fondamentale et Appliquée, Université Rennes1 (Etude des biocathodes à oxygène, couplées au métabolisme azoté des biofilms électroactifs, Direction Dr. F. Barrière). thomas.flinois@univ-rennes1.fr

2016/2017 : Simon Bee, stage de BTS métier des services de l'environnement, lycée Blaise Pascal/charbonnière-les-bain Lyon (Etude de l'interface électrode-biofilm électroactif ainsi que les effets de milieu, Direction Dr. C. Lagrost), Simon.bee43@gmail.fr

Collaborations :

Wageningen University Sub-Department of Environmental Technology "*Electrodes granulaires dans des piles à combustible microbiennes*". Novembre 2016.

Sous la direction de Pr. Annemiek ter Heijne; <http://www.annemiekterheijne.nl>

Université de Lorraine à Nancy (LCPME) "*Electrodes composites des bactéries électroactives anodiques ; des anodes de carbone et des médiateurs redox*".

Sous la direction de Dr. Mathieu ETIENNE; mathieu.etienne@lcpme.cnrs-nancy.fr

Université de Grenoble "*Médiateur redox pour un catalyseur enzymatique des réactions d'oxydoréduction*". Sous la direction de M. Abdelkader zebda ; abdelkader.zebda@imag.fr

REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse ont été réalisés à l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes, au sein de l'équipe MaCSE (UMR CNRS 6226 - Université de Rennes1) grâce au soutien financier du Ministère Français de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

En premier lieu, je remercie Claire Mangeney, professeure à l'Université Paris-Descartes, et Mathieu Etienne, Directeur de Recherche CNRS à l'Université de Lorraine pour avoir accepté d'être rapporteurs de ces travaux de thèse. Je suis également très reconnaissante à Jean-Christophe Lacroix (professeur, Université Paris-Diderot), Jean-Pierre Hurvois (professeur, Université de Rennes 1) et Charles Cougnon (chargé de recherche au CNRS, Université d'Angers) d'avoir bien voulu faire partie du jury de soutenance et de juger mes travaux.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Frédéric Barrière et Corinne Lagrost, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour leurs multiples conseils et pour toutes les heures qu'ils ont consacrées à diriger cette recherche. Je les remercie en particulier de leur volonté de me faire participer aux collaborations à l'université de Wageningen et de Nancy, et aux conférences internationales, nationales et locales. J'aimerais également leur dire à quel point j'ai apprécié leur grande disponibilité et leur respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je leur ai adressés. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à leurs qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Un grand merci à tous les membres du groupe MaCSE. En particulier, je remercie Marc Fourmigué et Dominique Lorcy pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe, Yann Leroux pour m'avoir formé à la fabrication des électrodes de PPF, Jean-François Bergamini pour les expériences d'AFM. Je voudrais aussi remercier Serge Roy pour tout le travail administratif et Stéphanie pour son humour, sa gentillesse et son dynamisme dans la gestion technique de l'équipe et sans oublier notre chère Christine que l'on a perdue récemment et qui restera vivante dans notre mémoire. Repose bien dans ta tombe.

Remerciements

Mes sincères remerciements vont à la section de chimie, et en particulier à son président, Jean-Pierre Hurvois pour m'avoir donnée l'opportunité de découvrir le domaine de l'enseignement durant deux ans de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier tous les autres gens du laboratoire, chercheurs, thésards, stagiaires pour leur disponibilité, leur sympathie. Merci à mes collègues doctorants du laboratoire. Plus particulièrement, je tiens à remercier Yara Acéta, Meritxell Cortés, Estelle Lebègue, Jean-David Peltier et Thomas Flinois pour l'ambiance amicale qui règne au sein du laboratoire.

J'aimerais également remercier mes amis et amies, Maha, Nihel, Soukaina, Samira et Faiza, qui m'ont apportée leur soutien moral pendant ces années d'études.

Sans oublier la plus belle rencontre inattendue de ma vie. Brahim Mazhoud avec qui j'ai partagé beaucoup d'émotions, de joies et de tendresses. Je lui exprime ici mes remerciements pour son soutien constant dans les moments difficiles de mon travail.

Une vie professionnelle ne serait réussie sans une vie personnelle bien remplie, je tiens donc à dire un grand merci à ma famille sans qui rien de cela n'aurait été possible. Aida, Ali, Lotfi, Sami, Zied, Hamdi, Nazir, Sana, Ahmed et Hadil. Leur présence et leurs encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.

Un grand merci à ma mère EL HAJA ZMORDA et mon père BEN SMIDA, qui ont cru en moi et m'ont soutenu tout le long du chemin, merci pour tous. Je vous aime...

Je dédie ce diplôme à mon cher frère Lotfi (El Aref), qui vient de nous quitter, tu resteras vivant dans mon cœur et mon mémoire. Je t'aime...

Résumé

Les piles à combustible microbiennes (PCM) sont des dispositifs bio-électrochimiques qui utilisent des biofilms bactériens électroactifs afin de catalyser des réactions d'oxydoréduction anodique et/ou cathodique pour générer de l'énergie électrique. Afin de promouvoir le développement et la connexion des biofilms, points clé dans les performances des PCM, la surface de l'anode de graphite est fonctionnalisée par des unités pyridine. Celles-ci sont greffées de façon covalente *via* la réduction électrochimique de cations diazopyridinium, formés *in situ* à partir de précurseurs amine, en s'inspirant de la méthode d'électrogreffage des sels d'aryle diazonium. Cela permet d'obtenir une interface très robuste. En comparant la réactivité de différents dérivés aminopyridine et les propriétés des couches greffées résultantes, la réduction des cations *para*-diazopyridinium conduit à des films fins et compacts, bien adaptés pour favoriser l'adhésion bactérienne et le transfert d'électrons entre la surface de l'anode et les bactéries électroactives. La présence d'unités pyridine immobilisées en surface de l'anode permet un développement plus rapide du biofilm et des performances accrues de la PCM pour des biofilms jeunes. Par comparaison, une anode modifiée par des multicouches de polyphénylène puis colonisée par un biofilm bactérien se révèle moins efficace pour la catalyse de l'oxydation de l'acétate. La nature et les propriétés physicochimiques de l'électrolyte sont également un paramètre important dans le développement du biofilm bactérien. Les liquides ioniques à température ambiante présentent des propriétés uniques, notamment en termes de solvation, et leur utilisation dans des applications biotechnologiques a récemment émergé. Toutefois, leurs effets sur les biofilms bactériens restent encore peu connus. L'ajout d'une sélection de liquides ioniques hydrophiles et hydrophobes à base de cations imidazolium ou pyridinium dans l'anolyte, même en très faible quantité, ou immobilisés à la surface de l'anode inhibe le développement du biofilm.

Mots clefs: Pile à combustible microbienne, biofilm électroactif, modification de surface, pyridine, liquides ioniques.

Abstract

Microbial Fuel Cells (MFCs) are bio-electrochemical devices based on electroactive bacterial biofilms which catalyze the electron transfer both at the anode and cathode to generate electrical power. To enhance the biofilms development and to improve the biofilm-electrode connection, being both key features in the performance of the MFC, the graphite anode was functionalized by pyridine units. In order to ensure a robust interface, pyridine units are grafted covalently through the electrochemical reduction of diazopyridinium cations *in situ* formed from aminopyridine precursors, following the well-known electrografting method for aryl diazonium salts. By comparing the reactivity of various aminopyridine derivatives and the resulting grafted layers properties, the *para*-diazopyridinium cations reduction results in a thin and compact layer, which is the best suited for promoting bacterial adhesion and favorable electron transfer between the anode surface and electroactive bacteria. The presence of pyridine units immobilized on the anode surface leads to a faster biofilm development together with increased MFC performances for young biofilms. In contrast, anode modified with polyphenylene multilayers and then colonized by a bacterial biofilm has been proved to be less effective for the catalysis of acetate oxidation. On the other hand, the nature of the electrolyte and the physicochemical properties are also important parameters for the bacterial biofilm development. Room temperature ionic liquids have unique properties, particularly in terms of solvation, and their use in biotechnological applications has recently emerged. However, their effects on bacterial biofilms remain little known. The addition of a selection of hydrophilic and hydrophobic ionic liquids based on imidazolium or pyridinium cations in the anolyte, even in very small quantities, or immobilized at the anode surface inhibited the biofilm development.

Key words: Microbial fuel cell, electroactive biofilms, surface modification, pyridine, ionic liquids.